



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Fitoquímica e atividades biológicas de plantas do gênero *Mikania* (Asteraceae).”**

Luiz Elídio Gregório

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Fitoquímica e atividades biológicas de plantas do gênero *Mikania* (Asteraceae).”**

Luiz Elídio Gregório

Tese apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências  
para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área:  
**Química**

Orientador: Profa. Dra. Dionéia Camilo Rodrigues de  
Oliveira

RIBEIRÃO PRETO -SP

2008

## FICHA CATALOGRÁFICA

Gregório, Luiz Elídio  
Fitoquímica e atividades biológicas de plantas do gênero  
*Mikania* (Asteraceae). Ribeirão Preto, 2008.  
233 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:  
Química.

Orientadora: Oliveira, Dionéia Camilo Rodrigues de

1. Gênero *Mikania*. 2. Fitoquímica. 3. Atividades biológicas

## FOLHA DE APROVAÇÃO

AUTOR: Luiz Elídio Gregório

TÍTULO: Fitoquímica e atividades biológicas de plantas do gênero *Mikania* (Asteraceae).

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof.(a) Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho:

À Deus pela minha existência.

Ao meu filho Júnior e a minha esposa Fran por todo o amor, apoio, compreensão e paciência durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais Antônio e Beatriz e ao meu irmão Carlos, pelas lições de vida e pelo incentivo ao meu trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À Profa. Dra. Dionéia Camilo Rodrigues de Oliveira, pelo aceite, pela orientação e principalmente pelo exemplo de ética profissional e humanismo.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, pelo fornecimento das plantas *M. camporum* e *M. vitifolia*, pelas preciosas contribuições no exame de qualificação, e por toda consideração e atenção.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, por toda a atenção e fundamentais contribuições no exame de qualificação.

Aos Professores doutores Carlos Alexandre Carollo e Arnildo Pott pela coleta das espécies *M. parodii* e *M. pilosa* e por toda amizade e atenção.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio pelo fornecimento dos diterpenos utilizados nos estudos de fragmentação e pela antiga amizade.

À Profa. Dra. Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado pelos ensaios de concentração inibitória mínima e por toda amizade e atenção de longa data.

Ao Prof. Dr. Marcos José Salvador e a Profa. Dra. Izabel Yoko Ito pelos ensaios de atividade antifúngica.

Aos professores doutores Silvia Helena Taleb-Contini e Wagner Ferreira dos Santos e a aluna de doutorado Alexandra Olimpio Siqueira Cunha, pela realização dos ensaios de atividade anticonvulsivante.

À aluna de doutorado Gardenia Carmen Gadelha Militão e aos professores doutores Letícia V. Costa-Lotufu, Cláudia Pessoa e Manuel Odorico de Moraes pelo ensaios de atividade antitumoral.

À aluna de doutorado Fabiana Cristina Bonilha Valeri, à especialista em laboratório Maria Perpétua Freire Morais Del Lama e à Profa. Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal, pelos ensaios de atividade antialérgica.

Aos especialistas em laboratório Tomaz e Cristina por toda ajuda e atenção nas análises cromatográficas e de espectrometria de massas.

À todos os Professores, funcionários e alunos do laboratório de Química Orgânica da FCFRP/USP pela acolhida, ajuda, amizade e dedicação, nestes quatro anos muito felizes!

À Virgínia (Departamento de Química da FFCLRP/USP), pela obtenção dos espectros de RMN

À todos os professores, funcionários e alunos da FCFRP/USP e da FFCLRP/USP pela acolhida, ensinamentos e amizade.

À Lâmia e todos os funcionários da Seção de Pós-graduação do departamento de Química pela atenção e ajuda burocrática.

À FAPESP e a CAPES pelo auxílio a pesquisa.

**E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho!**

*Luiz Elídio Gregório*



## Sumário

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
1.1. Considerações gerais.....	2
1.2. Biodiversidade brasileira .....	2
1.3. O Pantanal e o cerrado brasileiros .....	3
1.4. Família Asteraceae.....	4
1.5. Tribo Eupatorieae .....	5
1.6. Subtribo Mikaniinae e o gênero <i>Mikania</i> .....	6
1.7. Justificativa para o estudo de espécies do gênero <i>Mikania</i> .....	22
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1. Material (equipamentos, reagentes e solventes) .....	26
3.2. Material vegetal .....	28
3.2.1. Coleta e identificação do material vegetal.....	28
3.2.2. Preparação dos extratos brutos de <i>Mikania parodii</i> e <i>Mikania pilosa</i> .....	30
3.3. Fracionamento do extrato bruto de <i>Mikania parodii</i> .....	30
3.3.1. Cromatografia líquida a vácuo do extrato etanólico bruto de <i>M. parodii</i> .....	30
3.3.2. Cromatografia em coluna clássica da fração 04 .....	33
3.3.3. Análise das frações 04-06 e 04-08 através de cromatografia em fase gasosa (CG). .....	34
3.3.4. Cromatografia em coluna clássica da fração 39. ....	35
3.4. Análise por espectrofotometria na região do infravermelho dos extratos etanólicos brutos de <i>M. parodii</i> e <i>M. pilosa</i> e de suas frações .....	36
3.5. Análise em CG-EM das frações 5, 10, 11, 17 e 24 obtidas a partir da CLV do extrato etanólico bruto seco de <i>M. parodii</i> .....	36
3.6. Análises e fracionamento do extrato etanólico bruto de <i>Mikania pilosa</i> Baker.....	37
3.6.1. Partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto de <i>M. pilosa</i> .....	37

3.6.2.	Cromatografia líquida a vácuo da fração hexânica de <i>M. pilosa</i> .....	38
3.6.3.	Cromatografia em coluna clássica da fração 3 obtida a partir da CLV da fração hexânica de <i>M. pilosa</i> .....	39
3.6.4.	Fracionamento da fração diclorometânica do extrato etanólico bruto de <i>M. pilosa</i> ..	40
3.7.	Análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM dos extratos etanólicos brutos de <i>M. parodii</i> e <i>M. pilosa</i> .....	41
3.8.	Análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM dos extratos de <i>M. camporum</i> , <i>M. vitifolia</i> , <i>M. pilosa</i> e <i>M. parodii</i> , utilizando como fase estacionária coluna monolítica C-18. ....	42
3.9.	Análise em CG-EM com microextração em fase sólida (SPME) por <i>headspace</i> (HS) das partes aéreas pulverizadas de <i>M. pilosa</i> (coletadas em Costa Rica – MS e Alcinópolis – MS) e dos extratos etanólicos brutos de <i>M. parodii</i> e <i>M. pilosa</i> .....	43
3.10.	Análise das reações envolvidas na fragmentação em fase gasosa através de ionização por <i>electrospray</i> e fragmentação através de ionização por elétrons (IE) de diterpenos do tipo pimarano.....	45
3.11.	Ensaio biológico com os extratos etanólicos brutos, frações e substância isolada de <i>M. parodii</i> e <i>M. pilosa</i> . ....	48
3.11.1.	Avaliação da atividade antifúngica .....	48
3.11.2.	Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em microplaca.....	48
3.11.3.	Atividade anticonvulsivante através de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ).....	50
3.11.4.	Atividade Citotóxica em Células Tumorais ( <i>in vitro</i> ) .....	52
3.11.5.	Avaliação da atividade antialérgica através da quantificação de $\beta$ -hexosaminidase por fluorescência (ensaio direto). ....	53
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
4.1.	Análise dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ das substâncias codificadas como PA-01 e PA-02. ....	58
4.2.	Análise em cromatografia em fase gasosa (CG) das frações 04-06 e 04-08 obtidas a partir do fracionamento de extrato etanólico bruto de <i>M. parodii</i> .....	60
4.3.	Elucidação estrutural das substâncias codificadas como PA-06 e PA-07, isoladas a partir do extrato de <i>M. parodii</i> .....	63
4.4.	Análise em CG-EM das frações 5, 10, 11, 17 e 24, obtidas a partir da CLV do extrato etanólico bruto de <i>M. parodii</i> . ....	67
4.5.	Análise por espectrofotometria na região do infravermelho dos extratos etanólicos brutos e de suas frações das plantas <i>M. parodii</i> e <i>M. pilosa</i> .....	69
4.6.	Análise em CG-EM das frações 1, 2, 8 e 9 obtidas a partir da CLV da fração hexânica obtida a partir do extrato etanólico bruto de <i>M. pilosa</i> .....	69
4.7.	Análise em CG-EM das frações de <i>M. pilosa</i> codificadas como 3.1 a 3.6.....	74
4.8.	Análises em IES-EM/EM das frações 11 e 12 obtidas a partir do fracionamento da fração diclorometânica de <i>M. pilosa</i> . ....	74

4.9.	Análises em CLAE-DAD-EM E CLAE-DAD-EM/EM dos extratos etanólicos brutos de <i>M. parodii</i> e <i>M. pilosa</i> .....	79
4.10.	Análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM dos extratos etanólicos brutos de <i>M. parodii</i> , <i>M. pilosa</i> , <i>M. camporum</i> e <i>M. vitifolia</i> , utilizando como fase estacionária, coluna C-18 monolítica. ....	91
4.11	Análise em cromatografia em fase gasosa com microextração em fase sólida (SPME) por <i>headspace</i> (HS) das partes aéreas pulverizadas dos exemplares de <i>M. pilosa</i> Baker coletados em Costa Rica – MS e Alcinópolis - MS e dos extratos etanólicos brutos de <i>M. parodii</i> e <i>M. pilosa</i> .....	102
4.12.	Análise das reações envolvidas na fragmentação em fase gasosa através de ionização por <i>electrospray</i> e fragmentação através de ionização por elétrons (IE) de diterpenos.....	109
4.13.	Ensaio biológicos .....	120
4.13.1.	Atividade antifúngica.....	120
4.13.2.	Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em microplaca.....	120
4.13.3.	Ensaio anticonvulsivante (crises induzidas por PTZ).....	120
4.13.4.	Atividade citotóxica em células tumorais. ....	123
4.13.5.	Avaliação da atividade antialérgica através da quantificação de $\beta$ -hexosaminidase por fluorescência (ensaio direto).....	125
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>130</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>135</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>152</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Gravura da espécie <i>M. parodii</i> Cabrera extraída de RITTER & MIOTTO ( 2005). .....	29
<b>Figura 2</b>	Fotografia da espécie <i>M. pilosa</i> Baker coltada em Costa Rica - MS .....	29
<b>Figura 3</b>	Representação da clivagem do substrato MUG (4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida) gerando a metilumbeliferona (450 nm), extraída de Naal <i>et al.</i> , 2004.....	56
<b>Figura 4</b>	Estruturas químicas do acetato de pseudotaraxasterol (PA-01) e acetato de taraxasterol (PA-02). .....	60
<b>Figura 5</b>	Estruturas químicas dos triterpenos acetato de lupeol, acetato de $\alpha$ -amirina, acetato de $\beta$ -amirina identificados na análise em CG das frações 04-06 e 04-08. ....	63
<b>Figura 6</b>	Estruturas químicas dos flavonóides caempferol-3- <i>O</i> -glicosídeo (PA-06) e da quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo (PA-07).....	67
<b>Figura 7</b>	Estrutura química da quercetina 7-metil éter.....	78
<b>Figura 8</b>	Cromatograma CLAE do extrato etanólico de <i>M. parodii</i> (UV 270 nm).....	79
<b>Figura 9</b>	Cromatograma CLAE do extrato etanólico de <i>M. pilosa</i> (UV 270 nm).....	81
<b>Figura 10</b>	Estrutura química dos ácidos quínico (1) e cafêico (2).....	83
<b>Figura 11</b>	Cromatograma da análise em CLAE-DAD-EM/EM do extrato metanólico bruto de <i>M. camporum</i> (270 nm).....	91
<b>Figura 12</b>	Cromatograma da análise em CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico de <i>M. vitifolia</i> (270 nm). ....	96
<b>Figura 13</b>	Cromatograma da análise em CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico de <i>M. pilosa</i> (270 nm).....	98
<b>Figura 14</b>	Cromatograma da análise em CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico de <i>M. parodii</i> (270 nm).....	100
<b>Figura 15</b>	Estruturas químicas dos diterpenos D1, D2, D3 e D4. ....	109
<b>Figura 16</b>	Cromatograma CG-EM (IE-70 eV) da substância codificada como D1 (Tr 17,700 min.).....	111
<b>Figura 17</b>	Cromatograma CG-EM (IE-70 eV) da substância codificada como D2 (Tr 17,077 min.).....	111
<b>Figura 18</b>	Cromatograma CG-EM (IE-70 eV) da substância codificada como D3 (Tr 15,569 min.).....	112
<b>Figura 19</b>	Cromatograma CG-EM (IE-70 eV) da substância codificada como D4 (Tr 19,023 min.).....	112

---

<b>Figura 20</b>	Estrutura geral dos diterpenos pimaranos D1 a D4.....	118
<b>Figura 21</b>	Porcentagem de $\beta$ -hexosaminidase liberada, quando as células são estimuladas pelo antígeno DNP-BSA 0,1 $\mu\text{g/mL}$ na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto da planta <i>Mikania parodii</i> Cabrera.....	126
<b>Figura 22</b>	Porcentagem de $\beta$ -hexosaminidase liberada, quando as células são estimuladas pelo antígeno DNP-BSA 0,1 $\mu\text{g/mL}$ na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto da planta <i>Mikania pilosa</i> Baker. ....	126
<b>Figura 23</b>	Porcentagem de $\beta$ -hexosaminidase liberada, quando as células são estimuladas pelo antígeno DNP-BSA 0,1 $\mu\text{g/mL}$ na presença de diferentes concentrações da fração aquosa remanescente da planta <i>Mikania pilosa</i> Baker.....	127
<b>Figura 24</b>	Porcentagem de $\beta$ -hexosaminidase liberada, quando as células são estimuladas pelo antígeno DNP-BSA 0,1 $\mu\text{g/mL}$ na presença de diferentes concentrações da caempferol-3- <i>O</i> -glicosídeo (PA-06).....	127

### Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Usos populares de espécies do gênero <i>Mikania</i> (Asteraceae).....	9
<b>Tabela 2</b>	Atividades biológicas de espécies do gênero <i>Mikania</i> (Asteraceae).....	12
<b>Tabela 3</b>	Classes químicas isoladas a partir de espécies do gênero <i>Mikania</i> (Asteraceae).....	16
<b>Tabela 4</b>	Cromatografia líquida a vácuo (CLV) do extrato etanólico bruto de <i>M. parodii</i> (PA).....	31
<b>Tabela 5</b>	Reunião das frações obtidas a partir da CLV do extrato etanólico bruto de <i>M. parodii</i> (PA).....	32
<b>Tabela 6</b>	Cromatografia em coluna clássica da fração 04.....	33
<b>Tabela 7</b>	Reunião das frações da CC da fração 04.....	33
<b>Tabela 8</b>	Cromatografia em coluna clássica da fração 39.....	35
<b>Tabela 9</b>	Reunião das frações obtidas na CC da fração 39.....	35
<b>Tabela 10</b>	Cromatografia líquida a vácuo da fração hexânica de <i>M. pilosa</i> . ....	38
<b>Tabela 11</b>	Reunião das frações obtidas na CLV da fração hexânica de <i>M. pilosa</i> . ....	39
<b>Tabela 12</b>	Cromatografia em coluna clássica da fração 3 obtida a partir da CLV da fração hexânica de <i>M. pilosa</i> .....	40
<b>Tabela 13</b>	Reunião das frações obtidas na cromatografia em coluna clássica da fração 3.....	40
<b>Tabela 14</b>	Dados dos espectros de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) das substâncias codificadas como PA-01 e PA-02 e das substâncias utilizadas como modelos comparativos (pseudotaraxasterol e taraxasterol).....	58
<b>Tabela 15</b>	Dados referentes as análises em cromatografia em fase gasosa (CG) das frações 04-06 e 04-08, em comparação com banco de padrões de triterpenóides, realizadas em coluna capilar HP-01.....	61
<b>Tabela 16</b>	Dados referentes as análises em cromatografia em fase gasosa (CG) das frações 04-06 e 04-08, em comparação com banco de padrões de triterpenóides, realizadas em coluna capilar HP-50.....	62
<b>Tabela 17</b>	Dados dos espectros de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , TMS) da substâncias utilizadas como modelos comparativos (caempferol-3- <i>O</i> -glicosídeo e isoquercetrina) e das substâncias codificadas como PA-06 e PA-07.....	64
<b>Tabela 18</b>	Dados dos espectros de RMN <sup>13</sup> C PND e DEPT 135° (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , TMS) das substâncias codificadas como PA-06 e PA-07 e das substâncias utilizadas como modelos comparativos (caempferol-3- <i>O</i> -glicosídeo e quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo) .....	65

<b>Tabela 19</b>	Resultados das análises em CG-EM das frações 5, 10, 11, 17 e 24, obtidas a partir da CLV do extrato etanólico de <i>M. parodii</i> .....	68
<b>Tabela 20</b>	Substâncias identificadas nas frações 1, 2, 8 e 9 da CLV da fração hexânica de <i>M. pilosa</i> . .....	70
<b>Tabela 21</b>	Substâncias identificadas na análises em CG-EM das frações 3.1 a 3.6 da fração hexânica de <i>M. pilosa</i> . .....	74
<b>Tabela 22</b>	Resultados das análises em IES-EM e IES-EM-EM (modo negativo) das frações 11 e 12 obtidas a partir do fracionamento da fração diclorometânica de <i>M. pilosa</i> . .....	75
<b>Tabela 23</b>	Dados do espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , TMS) da substância codificada como PI – 01 e substâncias utilizadas como modelos comparativos quercetina, quercetina 3-metil éter e quercetina 7-metil éter (δ em ppm, J em Hz). .....	76
<b>Tabela 24</b>	Dados do espectro de RMN <sup>13</sup> C PND e DEPT 135° (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , TMS) da substância codificada como PI-01 e das substâncias utilizadas como modelos comparativos (quercetina 3-metil éter e quercetina 7-metil éter).....	77
<b>Tabela 25</b>	Dados obtidos a partir da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico bruto de <i>M. parodii</i> (modo negativo).....	80
<b>Tabela 26</b>	Dados obtidos a partir da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico bruto de <i>M. parodii</i> (modo positivo).....	80
<b>Tabela 27</b>	Dados obtidos a partir da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico bruto de <i>M. pilosa</i> (modo negativo). .....	81
<b>Tabela 28</b>	Dados obtidos a partir da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico bruto de <i>M. pilosa</i> (modo positivo).....	82
<b>Tabela 29</b>	Dados espectrométricos dos derivados do ácido quínico e flavonóides identificados nas espécies <i>M. parodii</i> e <i>M. pilosa</i> através de análises em CLAE-DAD-EM/EM. ....	87
<b>Tabela 30</b>	Dados da análise em CLAE-DAD-EM/EM (modo negativo) em coluna monolítica C-18 do extrato metanólico bruto de <i>M. camporum</i> .....	91
<b>Tabela 31</b>	Dados da análise em CLAE-DAD-EM/EM (modo positivo) em coluna monolítica C-18 do extrato metanólico bruto de <i>M. camporum</i> .....	92
<b>Tabela 32</b>	Dados das análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM (modo negativo) em coluna monolítica C-18 do extrato etanólico de <i>M. vitifolia</i> .....	96

<b>Tabela 33</b>	Dados da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM (modo positivo) em coluna monolítica C-18, do extrato etanólico de <i>M. vitifolia</i> .....	97
<b>Tabela 34</b>	Dados da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM (modo negativo) do extrato etanólico de <i>M. pilosa</i> em coluna C-18 monolítica.....	98
<b>Tabela 35</b>	Dados da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM (modo positivo) do extrato etanólico de <i>M. pilosa</i> em coluna C-18 monolítica.....	99
<b>Tabela 36</b>	Dados das análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM (modo negativo) do extrato etanólico de <i>M. parodii</i> em coluna C-18 monolítica.....	100
<b>Tabela 37</b>	Dados das análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM (modo positivo) do extrato etanólico de <i>M. parodii</i> em coluna C-18 monolítica.....	101
<b>Tabela 38</b>	Substâncias identificadas na análise em cromatografia em fase gasosa com microextração em fase sólida (SPME) por <i>headspace</i> (HS) das partes aéreas pulverizadas dos exemplares de <i>M. pilosa</i> Baker coletados em Costa Rica – MS. ....	102
<b>Tabela 39</b>	Substâncias identificadas na análise em cromatografia em fase gasosa com microextração em fase sólida (SPME) por <i>headspace</i> (HS) das partes aéreas pulverizadas dos exemplares de <i>M. pilosa</i> Baker coletados em Alcinópolis – MS. ....	103
<b>Tabela 40</b>	Substâncias identificadas na análise em cromatografia em fase gasosa com microextração em fase sólida (SPME) por <i>headspace</i> (HS) do extrato etanólico bruto de <i>M. pilosa</i> coletada em Costa Rica – MS.....	104
<b>Tabela 42</b>	Porcentagem de classes químicas identificadas nas análises em HS-SPME e CG-EM das espécies <i>M. pilosa</i> e <i>M. parodii</i> .....	107
<b>Tabela 43</b>	Ionização em <i>electrospray</i> dos diterpenos D1, D2, D3 e D4, nos modos negativo e positivo.....	109
<b>Tabela 44</b>	Tempo de retenção e índice de retenção de Kovats obtidos na análise em CG-EM dos diterpenos D1, D2, D3 e D4. ....	112
<b>Tabela 45</b>	Dados dos espectros de massas (IE-70 eV) dos diterpenos codificados como D1 a D2. ....	113
<b>Tabela 46</b>	Atividade citotóxica em células tumorais de extratos de <i>Mikania parodii</i> Cabrera e <i>Mikania pilosa</i> Baker.....	124
<b>Tabela 47</b>	Resultados da avaliação da atividade antialérgica através da quantificação de $\beta$ -hexosaminidase por fluorescência (ensaio direto) dos extratos etanólicos brutos de <i>M. parodii</i> e <i>M. pilosa</i> e da substância caempferol-3-O-glicosídeo (PA-06). ....	125



## RESUMO

Neste estudo foram obtidos os extratos etanólicos das espécies *Mikania parodii* Cabrera e *Mikania pilosa* Baker, os quais foram submetidos a fracionamento utilizando as técnicas cromatografia líquida a vácuo, em coluna clássica e por exclusão. A partir da espécie *Mikania parodii* foram isolados e identificados através de comparação dos dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com a literatura os triterpenos acetato de taraxasterol e acetato de pseudotaraxasterol e os flavonóides caempferol-3-*O*-glicosídeo e quercetina-3-*O*-glicosídeo e a partir da espécie *Mikania pilosa* foi isolado e identificado o flavonóide quercetina 7-metil éter. Os extratos e frações de ambas as plantas foram analisados em técnicas hífenadas (CG-EM, CLAE-DAD-EM/EM), permitindo a identificação de 46 substâncias em *Mikania parodii* e 60 substâncias em *M. pilosa* compreendendo as seguintes classes: monoterpenos, sesquiterpenos, um diterpeno (*M. pilosa*), triterpenos, flavonóides, derivados do ácido quínico (ácidos clorogênicos), ácidos graxos e seus ésteres. O extrato etanólico bruto de *M. parodii* apresentou atividade anticonvulsivante e antialérgica. O extrato etanólico bruto de *M. pilosa* ressuspendido em água : etanol (7:3) inibiu em mais de 50% e 59% respectivamente as células HCT-8 (carcinoma de cólon) e SF925 (glioblastoma humano). A análise dos extratos polares de *M. camporum* e *M. vitifolia* em CLAE-DAD-EM/EM em comparação com dados da literatura permitiu a identificação dos derivados do ácido quínico: 5-*O-E*-cafeoilquínico, 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico, 4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico e de classes de flavonóides apresentando substituintes metila e hexoses em ambas as espécies.

Palavras-chave: Gênero *Mikania*, Fitoquímica, Atividades biológicas.

## ABSTRACT

In this study the ethanolic extracts from the species *Mikania parodii* Cabrera and *Mikania pilosa* Baker were obtained and fractionated by vacuum liquid chromatography, column chromatography and size-exclusion chromatography. From the species *M. parodii* were isolated and identified through the comparison of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data with those in the literature the triterpenes taraxasterol acetate, pseudotaraxasterol acetate and the flavonoids kaempferol-3-*O*-glucoside and quercetin-3-*O*-glucoside. From the species *Mikania pilosa* was isolated the flavonoid quercetin 7-methyl ether. The extracts and fractions of both plants were analyzed by hyphenated techniques (GC-MS and LC-MS/MS), allowing the identification of 46 compounds in *M. parodii* and 60 compounds in *M. pilosa*, comprised the classes: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpene (*M. pilosa*), triterpenes, flavonoids, quinic acid derivatives (chlorogenic acids), fatty acids and esters. The ethanolic crude extract of *M. pilosa*, resuspended in water:ethanol (7:3) inhibited more than 50 % and 59% respectively the HCT-8 (colon carcinoma) and SF925 cells (human glioblastome). The analysis of polar extracts of the *M. camporum* and *M. vitifolia* species in LC-MS/MS in comparison with literature allow the identification of quinic acid derivatives: 5-*O*-caffeoylquinic acid; 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid; 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, methyl and *O*-glucosylflavonoids in both species.

Key words: Genus *Mikania*, Phytochemistry, Biological activities.

## **1 – INTRODUÇÃO**

---

## **1 - INTRODUÇÃO**

### **1.1 - Considerações gerais**

O uso de plantas medicinais é tão remoto, quanto o início da humanidade e apresenta ainda nos dias atuais, grande valor como terapêutica para os diversos males que afligem os seres humanos.

Além da utilização de plantas medicinais na medicina popular brasileira, vários institutos de pesquisa avaliam o potencial de diversas plantas visando a obtenção de novos fitoterápicos ou de novos fármacos.

As grandes indústrias farmacêuticas buscam na natureza novas moléculas para posteriormente sintetizá-las em laboratório para o desenvolvimento de novos medicamentos, mais eficazes, seletivos e menos tóxicos (YOUNG, 1999).

A química de produtos naturais é uma ciência multidisciplinar que visa avaliar as características químicas dos diversos elementos vivos da natureza: microrganismos, animais, plantas, etc. Ao trabalhar especificamente com o reino vegetal esta ciência é chamada de fitoquímica. A fitoquímica determina os constituintes químicos produzidos pelo metabolismo secundário dos vegetais em seu processo de adaptação ao meio ambiente, através de seu isolamento e elucidação estrutural destes.

Atualmente, com os avanços da ciência principalmente nas técnicas cromatográficas e de elucidação estrutural, a fitoquímica também determina a influência de variações sazonais, circadianas e populacionais nesta constituição química (GOBBO-NETO, 2007).

## 1.2 - Biodiversidade brasileira

O Brasil apresenta cerca de 50 mil espécies de plantas, representando um sexto de todas as espécies do planeta (MYERS *et al.*, 2000), sendo que muitas espécies estão desaparecendo em um ritmo consideravelmente maior do que a identificação e a avaliação do potencial terapêutico destas, devido a poluição das águas e do solo e a desmatamento de áreas para a pecuária e/ou agricultura (CORRÊA *et al.*, 1998).

A biodiversidade brasileira constitui um dos maiores tesouros da nação, pois além de poder gerar divisas com manejo sustentado e o ecoturismo, constitui uma grande fonte de insumos para a pesquisa, o desenvolvimento e a produção de novas drogas para o tratamento das mais variadas patologias. Assim sendo, o país necessita de maiores investimentos em pesquisas com plantas medicinais .

## 1.3 – O Pantanal e o cerrado brasileiros

O Pantanal Mato-Grossense está situado entre os paralelos 16° e 21° S e os meridianos 55° e 58° W, fazendo parte dos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo uma planície sedimentar com 140.000 Km<sup>2</sup> de área preenchida com depósitos aluviais dos rios da Bacia do Alto Paraguai. A baixa declividade dificulta o escoamento das águas gerando áreas inundadas principalmente com as chuvas (meses de novembro a março) possibilitando o surgimento de vegetação higrófila (SILVA *et al.*, 2000).

O Cerrado é a formação vegetal mais representativa do Pantanal (36%), seguido pelo Cerradão (22%) que ocupa áreas mais altas e o Cerrado *sensu stricto* (14%) que ocupa áreas mais baixas (SILVA *et al.*, 2000).

O cerrado é a segunda maior área de plantas nativas do país (GUARIM NETO & MORAIS, 2003), constituindo uma das maiores áreas de diversidade vegetal do Brasil (23% do território), apresentando cerca de 10.000 espécies vegetais, sendo 4.400 consideradas endêmicas o que corresponde 1,5% das plantas do planeta (MYERS *et al.*, 2000). Os estudos de plantas medicinais do cerrado são escassos, principalmente considerando-se a área ocupada e a diversidade, este desconhecimento se agrava quando a estimativa é de que cerca de 40% do cerrado já tenha sido devastado (GUARIM-NETO & MORAIS, 2003; RATTER *et al.*, 1997).

De acordo com Kaplan *et al.* (1994) o cerrado é atualmente a vegetação com maior risco no país, pois somente 1,5 % de sua área é protegida por lei, colocando em risco uma expressiva fonte de plantas medicinais.

A vegetação do cerrado é composta por gramíneas e espécies arbóreas e arbustivas. Entre as espécies herbáceas predominam as famílias Asteraceae, Myrtaceae e Rubiaceae (RATTER *et al.*, 1997).

O incremento dos estudos com plantas medicinais da região poderia colaborar com a preservação da área (reorganizando o uso dos recursos naturais) e aumento de receita para a região e o país, devido a crescente utilização de fitoterápicos e fármacos de origem natural, tanto no Brasil, quanto no restante do mundo.

#### **1.4 - Família Asteraceae**

A família Asteraceae ou Compositae é uma das maiores famílias de plantas. De acordo com BREMER (1994) esta família compreende 1535 gêneros e cerca de 23000 espécies conhecidas, distribuídas em 3 subfamílias (Barnadeisoideae, Cichorioideae e Asteroideae).

Dentro da família Asteraceae predominam ervas perenes, subarbustos e arbustos, mas também existem videiras, cipós e árvores (BREMER, 1994).

Os membros da família Asteraceae possuem estruturas florais uniformes, portanto aspectos relativos às folhas são importantes na determinação da tribo e do gênero tais como: posição (alternadas ou compostas) e enervação (grande parte das plantas possuem folhas trinervadas). As plantas da família podem ser encontradas em diversas regiões do mundo, mas são comumente localizadas na região sudoeste dos EUA, México, Brasil, ao longo dos Andes, no mediterrâneo e nas regiões sul, sudoeste e central da Ásia e Austrália (BREMER, 1994).

Quimicamente a família apresenta como principais constituintes poliacetilenos, terpenóides, flavonóides e cumarinas (BREMER, 1994).

Foram relatadas várias atividades biológicas para as plantas da família Asteraceae, como por exemplo: espasmolítica, antiinflamatória, colerética, antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, diurética, anti-helmíntica, etc. (HEYWOOD et al., 1977; MOERMAN, 1996)

### **1.5 - Tribo Eupatorieae**

A família Asteraceae é subdividida em 17 tribos, dentre estas tribos destaca-se a Eupatorieae com 170 gêneros. Os membros da tribo Eupatorieae normalmente são videiras ou arbustos e são a maior parte da família na região Neotropical, naturalmente ocorrendo entre o norte da América, Canadá e região nordeste do hemisfério norte (KING & ROBINSON, 1987).

As tribos Eupatorieae e Senecioneae destacam-se quimicamente dentro da família Asteraceae, por produzirem alcalóides pirrolizidínicos que intoxicam

mamíferos que as utilizam como alimento, devido a hepatotoxicidade destes alcalóides. Envenenamentos causados por algumas espécies de Asteraceae, são devidos a benzofuranos encontrados na tribo Eupatorieae e raros em outras tribos (KING & ROBINSON, 1987). Os metabólitos secundários majoritários em Eupatorieae são flavonóides, sesquiterpenóides (lactonas sesquiterpênicas dos tipos germacranolídeos, eudesmanolídeos e guaianolídeos), diterpenóides e cumarinas (BREMER, 1994; KING & ROBINSON, 1987).

### **1.6 – Subtribo Mikaniinae e o gênero *Mikania***

Dentro da tribo Eupatorieae temos a subtribo monogenérica Mikaniinae, onde encontra-se o gênero *Mikania*, considerado o maior gênero Eupatorieae com cerca de 430 espécies distribuídas por todo o continente americano (KING & ROBINSON, 1987; BREMER, 1994). O gênero também está presente de norte a sul do Brasil onde foram registradas 142 espécies endêmicas e 27 cosmopolitas (BARROSO, 1958; BREMER, 1994; KING & ROBINSON, 1987).

As plantas do gênero *Mikania* são arbustivas, eretas ou volúveis, de ricas e variadas inflorescências e folhas dos mais variados tipos. A delimitação das espécies é complexa, devido os vários complexos de espécies altamente polimórficas (HERZ, 1986). Uma característica importante para a divisão das seções, na separação das chaves taxonômicas é a grande variabilidade da forma da corola (BARROSO, 1958).

Barroso (1958) baseado nas propostas feitas por Baker (1873-1876) e Robinson (1922), propõe uma divisão do gênero *Mikania* em cinco seções, considerando os caracteres: forma da folha, hábito da espécie (ereto, volúvel ou decumbente) e tipo de inflorescência.



Holmes (1996) critica estas divisões, julgando-as inadequadas, propondo uma nova divisão em duas seções (Summikania e Mikania) considerando agora o padrão de maturação do capítulo e a localização das brácteas subinvolucrais.

Inicialmente Herz (1986) propôs uma divisão do gênero em dois grupos baseada na composição química, onde o complexo *Mikania scandens* apresentaria como marcadores químicos dilactonas sesquiterpênicas altamente oxigenadas do tipo mikanolídeo e o grupo das outras Mikánias que não apresentariam estes marcadores. Entretanto em 1998, Herz ao descobrir que algumas espécies do complexo *Mikania scandens* produzem exclusivamente outras classes de lactonas, afirmou que estas dilactonas não poderiam ser mais consideradas marcadores químicos deste complexo.

O gênero *Mikania*, possui várias espécies conhecidas como “guaco”, utilizadas popularmente como expectorante, contra febre, reumatismo, problemas do sistema respiratório, para o tratamento de cólicas e desordens intestinais e também mordidas de cobra (SIMÕES *et al.*, 1989, VILEGAS *et al.*, 1997a e 1997b ; KING & ROBINSON, 1987, KISSMAN *et al.*, 1992). Economicamente além do potencial terapêutico, espécies do gênero também protegem o solo contra a erosão em áreas desprovidas de outras plantas (KISSMAN *et al.*, 1992).

As principais substâncias químicas isoladas a partir das espécies estudadas são diterpenos (principalmente os cauranos, mas também labdanos e pimaranos), também são comumente encontrados monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, cumarinas, flavonóides e lactonas sesquiterpênicas do tipo germacranolídeo (HERZ, 1998, CASTRO *et al.*, 1989 e 1986).

Apesar de algumas espécies de *Mikania* serem consagradas pelo seu uso na medicina popular (conhecidas como Guacos), menos de 12% do total de espécies do gênero *Mikania* foram quimicamente estudadas e somente cerca de 3% foram submetidas a ensaios biológicos para avaliação de suas atividades, portanto, estudos fitoquímicos e biológicos são necessários para o melhor conhecimento químico e terapêutico, contribuindo para a quimiotaxonomia do gênero e possibilitando no futuro o desenvolvimento de novos fitoterápicos e fitofármacos.

As tabelas 1, 2 e 3, apresentam respectivamente os usos populares, as atividades biológicas e as principais classes químicas isoladas a partir de espécies do gênero *Mikania*.

**Tabela 1** – Usos populares de espécies do gênero *Mikania* (Asteraceae).

Planta	Procedência	Parte utilizada / Forma de extração	Uso ou indicação	Referências
<i>M. congesta</i>	Peru	Extrato aquoso das folhas	Tônico	<i>DUKE (1994)</i>
		Decocção das folhas	Antimalárico Estimulante da secreção biliar	
<i>M. cordata</i>	Nigéria	Decocção da planta inteira fresca	Antitussígeno (adultos) Soro oftalmológico (adultos)	<i>AKAH &amp; EKEKWE (1995)</i>
		Folhas secas	Tratamento esquistossomose (adultos)	
	Bangladesh	Infusão das folhas secas	Antiúlcera	<i>PAUL et al. (2000)</i>
	Tanzânia	Decocção das folhas secas	Antimalárico	<i>GESSLER (1994)</i>
	Índia	Raízes secas	Alimento	<i>BISHAYEE &amp; CHATTERJEE (1994)</i>
Índia	infusão	Panacéia	<i>MANDAL et al. (1992)</i>	
<i>M. cordifolia</i>	Cuba	Extrato aquoso partes aéreas	Enemagogo	<i>ROIG Y MESA (1945)</i>
	Nicarágua	Decocção partes aéreas secas	Analgésico, picadas e mordidas, escoriamentos e rash cutâneos	<i>COE &amp; ANDERSON (1996)</i>
	Brasil	Extrato aquoso partes aéreas secas a sombra	Anti-reumático (adultos)	<i>ZANI et al. (1995)</i>
	Porto Rico	Extrato aquoso a quente cascas e folhas	Febrífugo (adultos)	<i>LOUSTALOT &amp; PAGAN (1949)</i>
<i>M. glomerata</i>	Brasil	Decocção planta inteira seca	Febrífugo (adultos)	<i>BRANDAO et al. (1985)</i>
	Brasil	Infusão folhas secas	Broncodilatador (adultos)	<i>VILEGAS et al. (1997a e 1997b)</i>
	Brasil	Infusão folhas frescas	Mordidas de cobra (uso tópico)	<i>RUPPELT et al. (1991)</i>

Tabela 1 - Continuação

Planta	Procedência	Parte utilizada / Forma de extração	Uso ou indicação	Referências
<i>M. glomerata</i> (continuação)	Brasil	Extrato aquoso a quente folhas frescas	Diurético e anti-hipertensivo	DE A RIBEIRO, et al. ( 1986)
	Brasil	Não especificado	Abortivo (uso oral )	ANDRADE et al. (1996)
<i>M. guaco</i>	Colômbia	Decocção planta inteira	Mordidas de cobra (uso tópico e oral)	OTERO et al. ( 2000 a e 2000 b)
	Peru	Decocção planta inteira	Mordidas de cobra	DUKE (1994)
	Peru	Infusão planta inteira	Antipirético, estomáquico, anti-reumático e contra erupções cutâneas	DUKE (1994)
	EUA	Extrato fluido folhas	Reumatismo crônico	ELI LILLY ( 1898)
<i>M. laevigata</i>	Brasil	Decocção das folhas secas	Expectorante e anti-reumático	ALICE et al. ( 1991)
<i>M. lindleyana</i>	Brasil	Folhas secas	Cicatrizante para úlceras	VAN DEN BERG (1984)
<i>M. micrantha</i>	Argentina	Extrato aquoso a quente das partes aéreas secas	Antídoto para envenenamento	GARCIA et al. (1990)
	Jamaica	Extrato aquoso a quente das partes aéreas secas	Diabetes	MORRISON & WEST ( 1982)
	México	Extrato aquoso planta inteira	Febrífugo	ZAMORA - MARTINEZ & POLA ( 1992)
	Índia	Decocção das folhas	Antídoto para envenenamento	SELVANAYAHGAM et al.( 1994)
	Peru	Decocção das folhas	Antimalárico, laxante e tratamento de secreções biliares	DUKE (1994)
	Argentina	Decocção das folhas secas	Antidiarrêico, infecções respiratórias e urinárias	PEREZ & ANESINI (1994)

Tabela 1 - Continuação

Planta	Procedência	Parte utilizada / Forma de extração	Uso ou indicação	Referências
<i>M. micrantha</i> (continuação)	Honduras	Decocção das folhas secas	Mordidas de cobra e picadas de insetos	LENTZ <i>et al</i> (1998)
	Nicarágua	Infusão das folhas frescas	Mordidas de cobra	DENNIS (1988)
	Haiti	Suco das folhas frescas	Traumas e contusões	WENIGER <i>et al.</i> (1986)
	Nicarágua	Decocção dos talos	Limpeza de ferimentos	BARRET (1994)
	Rotuma	Infusão dos talos	Uso externo em infecções bacterianas e queimaduras	MC CLATCHEY (1996)
<i>M. periplocifolia</i>	Brasil	Folhas secas	Expectorante, tratamento de distúrbios intestinais e reumatismo	SIMÕES <i>et al.</i> (1999)
<i>M. scandens</i>	Guiana Francesa	Extrato aquoso a quente das folhas	Colagogo e diurético	LUU (1975)
	Guiné	Folhas	Anti-abortivo	VASILEVA (1969)
	Madagascar	Infusão das folhas	Contra escabioses	NOVY (1997)
	Índia	Decocção das folhas secas	Dores de cabeça	TIWARI <i>et al.</i> (1979)
	Guiné Bissau	Suco de parte não especificada	Facilitar o parto	ALVARO VIERA (1959)
<i>M. sessilifolia</i>	Brasil	Decocção das partes aéreas secas	Tratamento cefaléias	HIRSCHMANN & ROJAS DE ARIAS (1990)
<i>M. setigera</i>	Brasil	Decocção da planta inteira seca	Diurético	ARAUIO (1929)
<i>M. smilacina</i>	Brasil	Extrato aquoso a quente da planta inteira seca	Antiinflamatório e anti-hipertensivo	DE OLIVEIRA & DE OLIVEIRA FERRO (1985)

**Tabela 2** – Atividades biológicas de espécies do gênero *Mikania* (Asteraceae).

Planta	Procedência	Tipo de extração / parte utilizada	Atividade biológica	Referências
<i>M. banisteriae</i>	Panamá	Extrato aquoso e extrato metanólico das folhas, ramos e galhos secos	Antiviral	HATTORI <i>et al.</i> (1995)
<i>M. cordata</i>	Índia	Extrato hidroalcoólico 50% das partes aéreas	Anticonvulsivante	BHAKUNI <i>et al.</i> (1969)
	Bangladesh	Extrato bruto planta inteira seca	Analgésico	AHMED <i>et al.</i> (2001)
	Bangladesh	Extrato em etanol 95% da planta inteira seca	Antiúlcera	MOSADDIK & ALAM (2000)
	Bangladesh	Fração alcaloídica das folhas secas	Antiúlcera	PAUL <i>et al.</i> (2000)
	Filipinas	Extrato clorofórmico das folhas secas	Antiinflamatório, inibidor da acumulação de neutrófilos e migração de leucócitos.	ISRAEL (1990)
	Tanzânia	Extrato em acetato de etila das folhas secas	Antimalárico	GESSLER <i>et al.</i> (1994)
	Índia	Extrato em diclorometano das folhas, raízes e talos secos	Antimutagênico e contra <i>Salmonella typhimurium</i>	WALL <i>et al.</i> (1988)
	Índia	Extrato metanólico das raízes	Analgésico	BHATTACHARYA <i>et al.</i> (1986)
	Índia	Extrato metanólico das raízes	Anti-hepatotóxico	MANDAL <i>et al.</i> (1992)
	Índia	Extrato metanólico das raízes	Antiinflamatório, antipirético e depressor do SNC.	BHATTACHARYA <i>et al.</i> (1992)
	Índia	Extrato metanólico das raízes secas	Antistress	BISHAYEE & CHATTERJEE (1994)
Brasil	Extrato em etanol 95% das partes aéreas secas	Tripanocida	CHIARI <i>et al.</i> (1996)	

Tabela 2 - Continuação

Planta	Procedência	Tipo de extração / parte utilizada	Atividade biológica	Referências
<i>M. cordifolia</i>		Derivado do ácido quínico	Antiinflamatório	<i>PELUSO et al.(1995)</i>
		Extrato etanólico das raízes e tronco	Tripanocida	<i>ROJAS DE ARIAS et al. (1995)</i>
		Extrato etanólico das partes aéreas	Tripanocida	<i>CHIARI et al. (1996)</i>
		Extrato aquoso das folhas	Analgésico e antiinflamatório	<i>RUPPELT et al. (1991)</i>
		Extrato etanólico das folhas	Antialérgico e antiinflamatório	<i>FIERRO et al. (1999)</i>
<i>M. fragilis</i>	Porto Rico	Extrato aquoso planta inteira fresca	Ausência de atividade moluscicida.	<i>MEDINA &amp; WOODBURY (1979)</i>
<i>M. glomerata</i>	Brasil	Infuso e extrato hidroalcoólico das folhas	Potencial mutagênico	<i>COSTA et al. (2008)</i>
	Brasil	Óleo essencial das folhas	Atividade antimicrobiana	<i>DUARTE et al. (2007)</i>
	Brasil	Extrato hidroalcoólico e metanólico	Atividade antimicrobiana	<i>BETONI et al. (2006)</i>
	Brasil	Extratos aquosos das folhas, caules e raízes	Anti-ofídica	<i>MAIORANO et al. (2005)</i>
	Brasil	Óleo essencial das folhas	Anti- <i>Candida</i>	<i>DUARTE et al. (2005)</i>
	Brasil	Extrato hidroalcoólico e sua fração hexânica	Antibacteriana	<i>YATSUDA et al. (2005)</i>
	Brasil	Extrato em diclorometano das folhas secas	Antiinflamatório e antiespasmódico	<i>DE MOURA et al. (2002)</i>
		Extrato hidroalcoólico das folhas secas	Antiespasmódico	<i>DE MOURA et al. (2002)</i>
	Brasil	Infusão das folhas frescas	Analgésico	<i>RUPPELT et al. (1991)</i>
	Brasil	Extrato em etanol 50% das folhas frescas	Diurético	<i>DE A RIBEIRO et al.(1988)</i>

Tabela 2 - Continuação

Planta	Procedência	Tipo de extração / parte utilizada	Atividade biológica	Referências
<i>M. guaco</i>	Colômbia	Extrato em etanol absoluto da planta inteira	Ausência de efeito de antídoto para envenenamentos	OTERO <i>et al.</i> (2000)
<i>M. hirsutissima</i>	Brasil	Extrato em hexano e acetato de etila das partes aéreas secas	Moluscicida	DE SOUZA <i>et al.</i> (1984)
<i>M. hoehnei</i>	Brasil	Terpenóides isolados	Tripanocida	MENDES DO NASCIMENTO <i>et al.</i> (2004)
<i>M. involucrata</i>		Extrato etanólico das folhas e tronco	Antiinflamatório	SUYENAGA <i>et al.</i> (2002)
		Extrato hexânico das partes aéreas	Antibacteriano	DAVINO <i>et al.</i> (1989)
<i>M. laevigata</i>	Brasil	Extrato hidroalcoólico das folhas	Influência na concentração de ácidos graxos	PEDROSO <i>et al.</i> (2008)
	Brasil	Óleo essencial das folhas	Atividade antimicrobiana	DUARTE <i>et al.</i> (2007)
	Brasil	Extrato hidroalcoólico das folhas	Relaxamento da traquéia em ratos	GRACA <i>et al.</i> (2007)
	Brasil	Extrato hidroalcoólico das folhas	Antiinflamatório em processos alérgicos	SANTOS <i>et al.</i> (2006)
	Brasil	Extrato em etanol 70% das folhas	Anti-ulcerogênica	BIGHETTI <i>et al.</i> (2005)
	Brasil	Extrato hidroalcoólico e sua fração hexânica	Antibacteriana	YATSUDA <i>et al.</i> (2005)
	Brasil	Infusão das folhas secas	Antimutagênico (baixa atividade)	FERNANDES & VARGAS (2003)
<i>M. luetzelburgii</i>	Brasil	Extrato em etanol 95% das partes aéreas secas à sombra	Ausência de atividade tripanocida e contra crustáceos	ZANI <i>et al.</i> (1995)
<i>M. micrantha</i>	China	Estigmasterol isolado a partir das partes aéreas	Atividade antimicrobiana	YU <i>et al.</i> (2006)
	China	Extrato alcoólico de parte não especificada	Ativo contra <i>Panonychus citri</i>	CEN <i>et al.</i> (2005)
	Honduras	Extrato em etanol a 80% folhas secas	Antibacteriano e Antifúngico	LENTZ <i>et al.</i> (1998)



Tabela 2 - Continuação

Planta	Procedência	Tipo de extração / parte utilizada	Atividade biológica	Referências
<i>M. monagasensis</i>		Quatro terpenóides	Antimicrobiano	MATHUR <i>et al.</i> (1975)
<i>M. obtusata</i>	Brasil	Extrato em etanol a 95% das partes aéreas secas à sombra	Ativo contra crustáceos e tripanocida	ZANI <i>et al.</i> (1995)
<i>M. periplocifolia</i>	Brasil	Extrato em metanol a 75% das folhas secas	Citotóxico	SIMOES <i>et al.</i> (1999)
<i>M. psilostachya</i>	Brasil	Extrato em etanol a 95% dos talos e raízes secos	Citotóxico	NASCIMENTO <i>et al.</i> (1990)
<i>M. scandens</i>	Madagascar	Extrato clorofórmico e etanólico (96%) das partes aéreas	Antimalárico	RASOANAIVO <i>et al.</i> (1999)
<i>M. schenkii</i>	Brasil	Extrato em etanol 95% das partes aéreas secas	Pequena atividade larvicida ( <i>Aedes</i> )	CONSOLI <i>et al.</i> (1988)
<i>M. sessilifolia</i>	Brasil	Extrato em etanol 95% das partes aéreas secas à sombra	Ativo contra crustáceos	ZANI <i>et al.</i> (1995)
<i>M. setigera</i>	Brasil	Extrato fluido planta inteira seca	Diurético	ARAUIO (1929)
<i>M. stipulacea</i>	Brasil	Terpenóides isolados	Tripanocida	MENDES DO NASCIMENTO <i>et al.</i> (2004)
<i>M. subverticillata</i>	Brasil	Extrato em etanol a 95% e extrato hexânico partes aéreas secas	Não moluscicida	DE SOUZA <i>et al.</i> (1984)
			Não antimalárico	BRANDAO <i>et al.</i> (1985)
<i>M. triangularis</i>	Brasil	Extrato acidificado e extrato hexânico das partes aéreas secas	Antibacteriano	CRUZ <i>et al.</i> (1996)
<i>M. urticaefolia</i>	Bolívia	Extrato em acetato de etila, etanol absoluto e éter de petróleo das folhas e talos secos	Inativo contra <i>Leishmania</i> e <i>Trypanosoma</i>	FOURNET <i>et al.</i> , (1994)

**Tabela 3** – Classes químicas isoladas a partir de espécies do gênero *Mikania* (Asteraceae).

Planta	Procedência	Parte estudada	Classes químicas encontradas	Referências
<i>Mikania aff. jeffreyi</i>	Brasil	Folhas	Sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, esteróides e flavona.	MENDES <i>et al.</i> (2005)
<i>M. alvimii</i>	Brasil	Partes aéreas	Cromonas, sesquiterpenos, diterpenos e lipídeos	BOHLMANN <i>et al.</i> (1982d)
<i>M. amara</i>	Brasil	Óleo essencial	Monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, lipídeos, alcanos e álcoois alifáticos	DA SILVA <i>et al.</i> (1984)
<i>M. arrojadoi</i>	Brasil	Raízes e partes aéreas	Lactonas sesquiterpênicas e diterpenos	BOHLMANN <i>et al.</i> (1982c)
<i>M. banisteriae</i>	Colômbia	Partes aéreas	Diterpenos	DE PEREZ <i>et al.</i> (2003)
	Costa Rica	Partes aéreas	Diterpenos	CASTRO & JAKUPOVIC (1985)
	Brasil	Óleo essencial Partes aéreas	Monoterpenos, lactonas sesquiterpênicas, lipídeos e fenilpropanóides	DA SILVA <i>et al.</i> (1984)
<i>M. batatifolia</i>	EUA	Partes aéreas	Flavona, lactonas sesquiterpênicas e triterpenos	HERZ <i>et al.</i> (1970)
<i>M. belemii</i>	Brasil	Partes aéreas	Sesquiterpenos e diterpenos	LIU (1981)
<i>M. campanulata</i>	Argentina	Partes aéreas	Lactonas sesquiterpênicas	KRAUTMANN <i>et al.</i> (2007)
<i>M. congesta</i>	Brasil	Óleo essencial Partes aéreas	Monoterpenos, lactonas sesquiterpênicas, diterpenos, fenilpropanóides, cumarinas, alcanos e álcoois alifáticos	DA SILVA <i>et al.</i> (1984)
	Peru	Partes aéreas	Diterpenos e lipídeos	HERZ & KULANTHAIVEL (1985)

Tabela 3 - Continuação

Planta	Procedência	Parte estudada	Classes químicas encontradas	Referências
<i>M. cordata</i>	Bangladesh	Óleo essencial das folhas e flores	Monoterpenos e sesquiterpenos	CHOWDHURY <i>et al.</i> (2007)
	Filipinas	Folhas	Flavonol e lactonas sesquiterpênicas	AGUINALDO <i>et al.</i> (2003)
	Malásia	Raízes	Triterpenos e carboidratos	AGUINALDO <i>et al.</i> (1995)
		Folhas e talos	Alcanos	KIANG <i>et al.</i> (1968)
<i>M. cordifolia</i>	Brasil	Partes aéreas	Lactonas sesquiterpênicas	DE OLIVEIRA <i>et al.</i> (2007)
	Brasil	Partes aéreas	Triterpenos	DE OLIVEIRA <i>et al.</i> (2006)
	Peru	Partes aéreas	Fenilpropanóides	PELLUSO <i>et al.</i> (1995)
	Costa Rica	Não especificado	Lactonas sesquiterpênicas	CASTRO <i>et al.</i> (1989)
	Argentina	Não especificado	Lactonas sesquiterpênicas	GUTIERREZ <i>et al.</i> (1987)
	África do Sul	Não especificado	Sesquiterpenos	BOHLMANN <i>et al.</i> (1978)
<i>M. cynanchifolia</i>	Brasil	Partes aéreas	Lactonas sesquiterpênicas	BOHLMANN <i>et al.</i> (1984)
<i>M. dusenii</i>	Argentina	Partes aéreas	Lactonas sesquiterpênicas	ZAMORANO <i>et al.</i> (1994)
<i>M. glomerata</i>	Brasil	Folhas	Diterpenos e cumarina	TALEB-CONTINI <i>et al.</i> (2006)
	Brasil	Ramos	Diterpenos e triterpenos	VENEZIANI & DE OLIVEIRA (1999)
	Brasil	Folhas	Cumarinas, esteróides e fenilpropanóides	VENEZIANI & DE OLIVEIRA (1999)
<i>M. goyazensis</i>	Brasil	Partes aéreas	Lipídeos, lactonas sesquiterpênicas, diterpenos e triterpenos	BOHLMANN <i>et al.</i> (1982a)
		Raízes	Monoterpenos e sesquiterpenos	BOHLMANN <i>et al.</i> (1982a)
<i>M. grazielae</i>	Brasil	Partes aéreas	Sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, esteróides e flavanonas	BOHLMANN <i>et al.</i> (1982b)

Tabela 3 - Continuação

Planta	Procedência	Parte estudada	Classes químicas encontradas	Referências
<i>M. guaco</i>	Costa Rica	Partes aéreas	Sesquiterpenos incluindo lactonas	CASTRO <i>et al.</i> (1986)
<i>M. haenkeana</i>	Argentina	Flores e folhas	Diterpenos, triterpenos, derivados do ácido benzóico, lignanas e esteróides	CUENCA <i>et al.</i> (1992)
<i>M. hirsutissima</i>	Brasil	Partes aéreas	Derivados do ácido caurenóico	OHKOSHI <i>et al.</i> (2004)
	Brasil	Partes aéreas	Flavonas, cumarinas, sesquiterpenos e diterpenos	MURADIAN <i>et al.</i> (1977)
<i>M. holwayana</i>	Costa Rica	Partes aéreas	Sesquiterpenos	CASTRO <i>et al.</i> (1989)
<i>M. hookeriana</i>	Brasil	Resina e folhas	Monoterpenos, lactonas sesquiterpênicas, diterpenos e triterpenos	REIS <i>et al.</i> (2003)
<i>M. lasiandrae</i>	Brasil	Partes aéreas	Diterpenos, triterpenos e ácido cafeoilquímico	SOARES <i>et al.</i> (2007)
<i>M. laevigata</i>	Brasil	Folhas	Diterpeno e siringaldeído	PEDROSO <i>et al.</i> (2008)
	Brasil	Folhas	Cumarinas, terpenos e ácidos orgânicos	BIGHETTI <i>et al.</i> (2005)
	Brasil	Partes aéreas	Cumarinas, diterpenos, esteróides	DAVINO <i>et al.</i> (1989)
<i>M. lindbergii</i>	Brasil	Partes aéreas	Diterpenos e triterpenos	FABBRI <i>et al.</i> (1997)
<i>M. luetzelburgii</i>	Brasil	Raízes	Sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos	LIU (1981)
<i>M. mendocina</i>	Argentina	Folhas e flores	Lactonas sesquiterpênicas	BARDON <i>et al.</i> (1996)

Tabela 3 - Continuação

Planta	Procedência	Parte estudada	Classes químicas encontradas	Referências
<i>M. micrantha</i>	China		Lactonas sesquiterpênicas, esteróides, flavonóides e ácidos clorogênicos	WU <i>et al.</i> (2007)
	China	Óleo essencial de folhas e talos	Monoterpenos (identificação por CG-EM)	FENG <i>et al.</i> (2004)
	Jamaica	Não especificado	Lactonas sesquiterpênicas	BAKIR <i>et al.</i> (2004)
	China	Planta inteira	Flavonóides e ácidos fenólicos	WEI <i>et al.</i> (2004)
	China	Planta inteira	Dilactonas sesquiterpênicas	HUANG <i>et al.</i> (2004)
	China	Partes aéreas	Flavanona	JIANG <i>et al.</i> (2001)
	Argentina	Flores e folhas	Triterpenos	CUENCA <i>et al.</i> (1988)
	Paraguai	Partes aéreas	Lactonas sesquiterpênicas	BOEKER <i>et al.</i> (1987)
<i>M. microptera</i>	Peru	Partes aéreas	Monoterpenos, lactonas sesquiterpênicas, triterpenos, cumarinas, fenilpropanóides, lipídeos e esteróides	DIAZ <i>et al.</i> (1992)
<i>M. minima</i>	Argentina	Flores e folhas	Derivado benzênico e sesquiterpenos incluindo lactonas	CUENCA <i>et al.</i> (1993)
			Triterpenos e esteróides	CUENCA <i>et al.</i> (1990)
<i>M. monagasensis</i>	México	Folhas e talos	Alcanos, monoterpenos, lactonas sesquiterpênicas, diterpenos, triterpenos e esteróides	MATHUR <i>et al.</i> (1975)
<i>M. oblongifolia</i>	Brasil	Partes aéreas	Diterpenos	VISHNEWSKI <i>et al.</i> (1977)
<i>M. obtusata</i>	Brasil	Partes aéreas	Diterpenos	ALVES <i>et al.</i> (1995)
<i>M. officinalis</i>	Não especificado	Raízes	Thiarubrine B (substância sulfurada)	ELLIS <i>et al.</i> (1995)

Tabela 3- Continuação

Planta	Procedência	Parte estudada	Classes químicas encontradas	Referências
<i>M. periplocifolia</i>	Argentina	Partes aéreas	Sesquiterpenos incluindo lactonas e diterpenos	<i>GUTIERREZ et al. (1985)</i>
<i>M. pohlii</i>	Brasil	Partes aéreas e raízes	Monoterpenos, sesquiterpenos incluindo lactonas, diterpenos e triterpenos	<i>BOHLMANN et al. (1982a)</i>
<i>M. pseudohoffmanianna</i>	Brasil	Partes aéreas	Esteróides, diterpenos, triterpenos, cumarina, flavonóide e derivado do ácido cafeoilquínico	<i>SOUZA et al. 2006</i>
<i>M. purpurascens</i>	Brasil	Partes aéreas	Monoterpenos, sesquiterpenos e flavanonas	<i>BOHLMANN et al. (1982c)</i>
<i>M. pyramidata</i>	África do Sul	Raízes	Diterpenos	<i>BOHLMANN et al. (1978)</i>
<i>M. rimachii</i>	Peru	Partes aéreas	Derivado benzênico, sesquiterpenos, triterpenos, esteróides, fenilpropanóides, carboidratos, lipídeos e cumarinas	<i>DIAZ et al. (1992)</i>
<i>M. saltensis</i>	Argentina	Flores e folhas	Lignanais, lactonas sesquiterpênicas, monoterpenos, esteróides	<i>CUENCA et al. (1991)</i>
<i>M. scandens</i>	EUA	Partes aéreas	Lactonas sesquiterpênicas	<i>HERZ et al. (1970)</i>
		Planta inteira	Lactonas sesquiterpênicas	<i>COX &amp; SIM (1974)</i>
<i>M. sessifolia</i>	Brasil	Partes aéreas	Sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos	<i>LIU (1981)</i>
		Raízes	Diterpenos	
<i>M. shushunensis</i>	Peru	Partes aéreas	Monoterpenos e sesquiterpenos, quinonas e derivados benzênicos	<i>GUTIERREZ &amp; HERZ (1988)</i>
<i>M. smilacina</i>	Brasil	Planta inteira	Cumarinas	<i>DE OLIVEIRA &amp; DE OLIVEIRA (1985)</i>

Tabela 3- Continuação

Planta	Procedência	Parte estudada	Classes químicas encontradas	Referências
<i>M. stipulacea</i>	Brasil	Planta inteira	Ácido vanílico, diterpenos, triterpenos, cumarina e esteróides	NASCIMENTO & OLIVEIRA (2001)
<i>M. triangularis</i>	Brasil	Talos	Diterpenos	CRUZ & ROQUE (1992)
		Partes aéreas	Diterpenos e esteróides	KNUDSEN <i>et al.</i> (1986)
<i>M. urticaefolia</i>	Argentina	Partes aéreas	Diterpenos e lactonas sesquiterpênicas	GUTIERREZ <i>et al.</i> (1988)
<i>M. vitifolia</i>	Costa Rica	Folhas e talos	Diterpenos e sesquiterpenos incluindo lactonas	LOBITZ <i>et al.</i> (1988); CASTRO <i>et al.</i> (1986)
<i>M. ypacarayensis</i>	Argentina	Flores e talos	Sesquiterpenos incluindo lactonas	ZAMORANO <i>et al.</i> (1985)

### 1.7- Justificativa para o estudo de espécies do gênero *Mikania*.

Considerando a escassez de estudos químicos (menos de 12%) e biológicos (menos de 3%) de espécies do gênero *Mikania*, a necessidade de estudos para auxiliar a quimiotaxonomia do gênero, principalmente devido à dificuldade de classificação taxonômica devido ao polimorfismo das espécies e a importância de estudos científicos para avaliação do potencial químico e terapêutico destas plantas brasileiras, justifica-se um estudo fitoquímico e biológico de vegetais do gênero *Mikania*. Assim sendo, foi proposto o estudo fitoquímico e a realização de ensaios biológicos, com as espécies *Mikania parodii* e *Mikania pilosa*.

De acordo com levantamento bibliográfico recente utilizando-se as ferramentas de pesquisa de dados *NAPRALERT* e *Chemical Abstracts* (apresentado anteriormente nas tabelas 1, 2 e 3), têm-se que:

A planta *Mikania parodii* Cabrera descrita em Barroso (1958) foi reclassificada em 1987 por King & Robinson, sendo então denominada *Mikania mendocina* Philip, porém segundo Barroso, *Mikania parodii* trata-se de uma planta cosmopolita com dispersão principalmente na Argentina e no Brasil (Rio grande do Sul), já King & Robinson descrevem *Mikania mendocina* com ocorrência somente na Argentina, o que coloca em dúvida esta reclassificação. *Mikania mendocina* foi submetida a estudo fitoquímico por BARDON (1996), onde foram isoladas lactonas sesquiterpênicas. Por outro lado não há relatos de estudos químicos de *Mikania parodii*. Desta forma justifica-se o estudo químico de *M. parodii*, para além de outras informações, contribuir para a solução deste problema.

A planta *Mikania pilosa* Baker, não foi submetida a nenhum estudo químico ou ensaio biológico, justificando estudos fitoquímicos e biológicos com a espécie.



## **2 – OBJETIVOS**

---

## 2 – OBJETIVOS

Os principais objetivos do presente estudo são:

- a) Fitoquímica clássica e/ou com o uso de técnicas hífenadas para a avaliação química das plantas *Mikania parodii* e *Mikania pilosa*;
- b) Aplicação de técnicas hífenadas na avaliação química dos extratos polares de *Mikania camporum* e *Mikania vitifolia*;
- c) Estudos das reações químicas envolvidas nas fragmentações em fase gasosa ionização por *electrospray* e ionização por elétrons de diterpenos;
- d) Realização de ensaios biológicos para avaliação das atividades antimicrobiana, anticonvulsivante, antitumoral e antialérgica com os extratos brutos, frações e substâncias isoladas e purificadas a partir de *Mikania parodii* e *Mikania pilosa*.

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Material (equipamentos, reagentes e solventes)

Para análises em CCDC foram utilizadas placas de vidro (5x20 cm e 20x20 cm), como fase estacionária foi utilizada sílica gel GF<sub>254</sub> (Merck, código 7730). A espessura da camada de sílica foi de 0,25 mm.

O aparato utilizado para a realização de cromatografia líquida a vácuo (CLV) foi semelhante ao utilizado por PELLETIER *et al.* (1986). Para a CLV e cromatografia em coluna clássica (CC) foram utilizadas colunas de vidro compatíveis com a massa das amostras. Como fase estacionária foram utilizadas sílica gel 60 H (Merck, código 7736) e sílica gel 60 (Merck, 230-400 mesh, código 9385), respectivamente.

Os solventes hexano, acetato de etila, etanol e metanol utilizados nos procedimentos de extração, CLV e CC foram purificados através de destilação.

Para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência, foram utilizados os solventes metanol, acetonitrila e ácido acético, todos grau HPLC e água deionizada (18 mΩ) em sistema Milli-Q, Millipore.

Os solventes deuterados utilizados no preparo de amostras enviadas a RMN foram clorofórmio-d (d = 99,96 %) da marca Aldrich e metanol-d<sub>4</sub> (d = 99,80 %) e DMSO-d<sub>6</sub> (d = 99,96 %) da marca CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Nicolet, modelo Protege 460.

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram registrados em espectrômetro Bruker-Advance DPX 300, DRX 400 e DRX 500, operando respectivamente em 300, 400 e

500 MHz para  $^1\text{H}$  e 75, 100 e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ , pertencente ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

As análises em cromatografia em fase gasosa (CG): foram realizadas em um cromatógrafo de fase gasosa Hewlett Packard (HP), modelo 5890, equipado com coluna capilar e detector de ionização em chama. Foram utilizadas as colunas capilares HP-50 (50% fenil metil silicone), com 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 $\mu\text{m}$  de espessura da fase estacionária e HP-1 (metil silicone) também com 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 $\mu\text{m}$  de espessura da fase estacionária (sílica fundida).

As análises em cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM): foram realizadas em um cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu acoplado a espectrômetro de massas, modelo QP2010 equipado com injetor automático AOC-20i. As colunas utilizadas foram: coluna capilar DB-5MS com 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 $\mu\text{m}$  de espessura da fase estacionária e coluna capilar DB-17MS 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 $\mu\text{m}$  de espessura da fase estacionária.

As análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, modelo Class Vp 20 equipado com duas bombas de solvente (LC-20AD), detector por arranjo de diodos (SPD-M20A) e sistema controlador (CBM-20A). Este cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas da marca Bruker Daltonics (Billerica, MA), modelo UltrTOF-Q, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (IES) e analisador por tempo de voo, operando nos modos negativo e positivo. As amostras foram injetadas utilizando-se um injetor Rheodyne, modelo 7125 equipado com um

loop de 20  $\mu$ L. Foram utilizadas as colunas VP-ODS-18 (Shymadzu), com 150 mm de comprimento x 2 mm de diâmetro, tamanho de partícula 4,6  $\mu$ m, contendo uma pré-coluna empacotada com GPV-ODS C-18 (5 mm x 2 mm, Sigma-Aldrich, EUA). Foram também utilizadas duas colunas monolíticas C-18 Onyx em linha (100 mm x 4,6 mm, Phenomenex, EUA), protegidas por pré-coluna do mesmo material e fabricante.

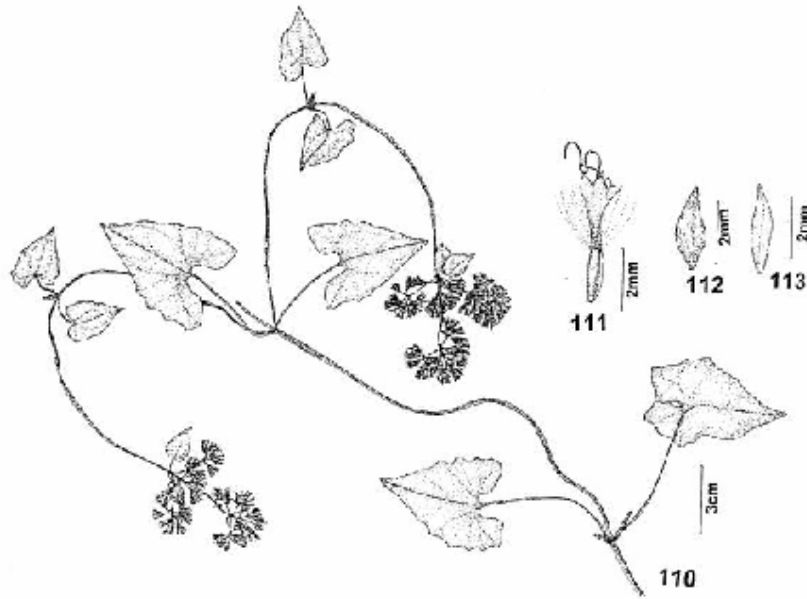
### **3.2 – Material vegetal**

#### **3.2.1- Coleta e identificação do material vegetal**

*Mikania parodii* foi coletada por Arnildo Pott e Carlos Alexandre Carollo (coleta n. 11.779) no Córrego Piúva (Fazenda Pena Verde, Rodovia-MS419), no município de Aquidauana-MS em julho de 2004 (Lat. 20° 10' 32'' S Long. 55° 43' 14'' W, alt. 160 m) e *Mikania pilosa* foi coletada por Arnildo Pott e Carlos Alexandre Carollo (coleta n. 12.250) na fazenda Mimoso (margem esquerda do rio Sucuriú) município de Costa Rica- MS em novembro de 2004 (Lat. 19° 03' 27'' S Long. 52° 59' 40'' W, alt. 460 m). Exemplares de *Mikania pilosa* foram coletados no município de Alcinópolis-MS em março de 2008, por Arnildo Pott.

*Mikania camporum* e *Mikania vitifolia* foram coletadas pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (FCFRP-USP) em maio de 2000, na Serra da Mantiqueira em Campos de Jordão – SP (coletas NPL-267 e NPL-275, respectivamente).

Todos os vegetais foram identificados pelo Prof. Dr. Roberto Lourenço Esteves do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ.



**Figura 1** – Gravura da espécie *M. parodii* Cabrera extraída de RITTER & MIOTTO (2005).



**Figura 2** – Fotografia da espécie *M. pilosa* Baker coletada em Costa Rica- MS

### **3.2.2 – Preparação dos extratos brutos de *Mikania parodii* e *Mikania pilosa*.**

O material vegetal após coleta e identificação, foi estabilizado e seco em estufa de ar circulante a cerca de 40° C, sendo posteriormente pulverizado com auxílio de moinho de faca. Foram obtidos 592,83 g de pó de *Mikania parodii* e 812,00 g de pó de *Mikania pilosa*.

Os respectivos pós obtidos foram submetidos a extração através do método percolação com fluxo de 20 gotas/min, utilizando-se como solvente extrator etanol 96%. Os extratos obtidos foram concentrados até *secura* em rotaevaporador para obtenção dos respectivos extratos brutos secos. Foram obtidos 101,78g de extrato bruto seco de *M. parodii* (17,16% de rendimento) codificado como **PA** e 114,82g de extrato bruto seco de *M. pilosa* (14,14% de rendimento) codificado como **PI**.

### **3.3 – Fracionamento do extrato bruto de *Mikania parodii***

#### **3.3.1 – Cromatografia líquida a vácuo do extrato etanólico bruto de *M. parodii*.**

Uma alíquota (45g) do extrato bruto seco obtido conforme item 3.2.2, pré-adsorvida em 45g de silicagel 60, foi fracionada através de cromatografia líquida a vácuo utilizando-se como fase estacionária 450 g de sílica gel 60 H (fase normal) e como fase móvel soluções de solventes orgânicos (hexano, acetato de etila, metanol) e água, através de um gradiente de polaridade crescente, sendo obtidas 120 frações, conforme descrito na Tabela 4.



**Tabela 4-** Cromatografia líquida a vácuo (CLV) do extrato etanólico bruto de *M. parodii* (PA)

Fase móvel	Volume de fase móvel utilizado para cada fração	Frações obtidas
Hexano	500 mL	1 - 9
Hexano : AcOEt (98 : 2)	500 mL	10
Hexano : AcOEt (97 : 3)	500 mL	11 - 15
Hexano : AcOEt (96 : 4)	500 mL	16-19
Hexano : AcOEt (94 : 6)	500 mL	20
Hexano : AcOEt (92 : 8)	500 mL	21 - 22
Hexano : AcOEt (90:10)	500 mL	23 - 26
Hexano : AcOEt (85 : 15)	500 mL	27 - 42
Hexano : AcOEt (80 : 20)	500 mL	43 - 44
Hexano : AcOEt (75 : 25)	500 mL	45 - 48
Hexano : AcOEt (70 : 30)	500 mL	49 - 51
Hexano : AcOEt (65 : 35)	500 mL	52 - 53
Hexano : AcOEt (60 : 40)	500 mL	54 - 55
Hexano : AcOEt (55 : 45)	500 mL	56 - 59
Hexano : AcOEt (50 : 50)	500 mL	60 - 67
Hexano : AcOEt (40 : 60)	500 mL	68 - 70
Hexano : AcOEt (30 : 70)	500 mL	71 - 72
Hexano : AcOEt (20 : 80)	500 mL	73 - 74
Hexano : AcOEt (10 : 90)	500 mL	75 - 76
AcOEt	500 mL	77 - 93
AcOEt : MeOH (90 : 10)	500 mL	94-104
AcOEt : MeOH (75 : 25)	500 mL	105 - 109
AcOEt : MeOH (50 : 50)	500 mL	110 - 114
MeOH	500 mL	115 -119
MeOH : H <sub>2</sub> O (50 : 50)	2000 mL	120

As frações obtidas foram submetidas a CCDC (utilizando diversas fases móveis constituídas de soluções com diferentes proporções de hexano e acetato de etila, assim como clorofórmio: metanol) e a reunião das frações está esquematizada na **Tabela 5**.

**Tabela 5** – Reunião das frações obtidas a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii* (PA).

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (g)
1-2	01	0,185
3-12	02	0,505
13	03	0,042
14-15	04	0,855
16-17	05	0,169
18	06	0,036
19-20	07	0,243
21-22	08	0,528
23-24	09	0,769
25	10	0,289
26-37	11	1,105
38-39	12	0,295
40	13	0,105
41	14	0,057
42	15	0,239
43	16	0,105
44-45	17	0,210
46	18	0,292
47	19	0,163
48	20	0,219
49	21	0,131
50	22	0,202
51-53	23	0,327
54-56	24	0,465
57	25	0,124
58-59	26	0,254
60	27	0,065
61-62	28	0,213
63-65	29	0,329
66-69	30	0,378
70-73	31	0,351
74-76	32	0,346
77	33	0,123
78-79	34	0,222
80-81	35	0,163
82-83	36	0,277
84	37	0,115
85	38	0,172
86-96	39	0,920
97-103	40	7,257
104-110	41	9,472
111	42	1,436
112	43	1,555
113	44	1,223
114-120	45	4,439

### 3.3.2 – Cromatografia em coluna clássica da fração 04

A fração 04 (m = 855 mg) resultante da CLV do extrato bruto seco de *M. parodii*, por apresentar perfil pouco complexo em CCDC (eluente Hexano 95: AcOet 5 %; reveladores UV, vanilina sulfúrica e anisaldeído) e boa massa, foi submetida a cromatografia em coluna clássica contendo como fase estacionária 90g de silicagel 60 (70-230 mesh), sendo a amostra adsorvida previamente em 1g da mesma sílica e utilizada fase móvel de polaridade crescente conforme representado na **Tabela 6**.

**Tabela 6** – Cromatografia em coluna clássica da Fração 04

Fase móvel	Volume de cada fração coletada	Frações obtidas
Hexano 100%	20 mL	1-30
Hexano 95% : AcOEt 5%	20 mL	31-40
Hexano 90% : AcOEt 10%	20 mL	41-51
Hexano 80% : AcOEt 20%	20 mL	52-61
Hexano 70% : AcOEt 30%	20 mL	62-64

AcOEt: acetato de etila

As frações obtidas foram submetidas a análise em cromatografia em camada delgada comparativa (eluentes: diferentes proporções de Hexano:AcOEt e como reveladores: UV, vanilina sulfúrica e anisaldeído), sendo a reunião das frações representada na **Tabela 7**.

**Tabela 7** – Reunião das frações da CC da fração 04

Frações	Fração resultante	Massa (g)
1-8	04-01	0,150
9-26	04-02	0,255
27-28	04-03	0,090
29-30	04-04	0,080
31-33	04-05	0,014
34-38	04-06	0,065
39-40	04-07	0,021
41-50	04-08	0,0130
51-64	04-09	0,090

Foi observada a presença de somente uma mancha em CCDC (Hexano 100%, eluída duas vezes) nas frações 04-05 e 04-07, sendo estas codificadas como substâncias PA-01 e PA-02 respectivamente e obtidos os seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . As frações 04-06 e 04-08, que apresentaram outras manchas além das visualizadas nas frações 04-05 e 04-07 foram analisadas em CG em comparação com padrões de triterpenos previamente isolados e identificados em nosso laboratório.

### **3.3.3 – Análise das frações 04-06 e 04-08 através de cromatografia em fase gasosa (CG)**

A análise foi realizada no equipamento e colunas cromatográficas capilares especificados no item 3.1.

Para a análise na coluna HP-50, a temperatura da injeção foi de 260 °C, sendo a temperatura da coluna mantida em 280 °C (isoterma) e a temperatura do detector FID 300 °C. Foi utilizada injeção no modo “split” (1:70) e o gás de arraste utilizado foi hidrogênio, como gás auxiliar nitrogênio e como padrão de referência foi utilizado o colesterol.

Para a análise na coluna HP-1, a temperatura de injeção foi 260 °C, sendo a temperatura da coluna foi de 250 °C mantidos durante 12 minutos, aumentando posteriormente a 6 °C/min até atingir 280 °C permanecendo assim por 20 minutos. A temperatura do detector FID foi de 300 °C. A injeção também foi realizada em modo “split” (1:70) e o gás de arraste foi hidrogênio e como padrão de referência também foi utilizado o colesterol.

### 3.3.4 - Cromatografia em coluna clássica da fração 39

A fração **39** (920 mg), por apresentar perfil interessante em CCDC (AcOet 80: Metanol 20, como eluente) e boa massa, foi submetida a cromatografia em coluna clássica (CC), contendo como fase estacionária 100g de sílica gel 60 (70-230 mesh) e com fase móvel gradiente de polaridade crescente conforme representado na **Tabela 8**.

**Tabela 8** – Cromatografia em coluna clássica da fração 39.

Fase móvel	Volume de cada fração coletada	Frações obtidas
AcOEt	20 mL	1-10
AcOEt : MeOH (90 : 10)	20 mL	11-20
AcOEt : MeOH (80 : 20)	20 mL	21-30
AcOEt : MeOH (70 : 30)	20 mL	31-40
AcOEt : MeOH (60 : 40)	20 mL	41-50
AcOEt : MeOH (50 : 50)	20 mL	51-60
AcOEt : MeOH (25 : 75)	20 mL	61-70
MeOH	20 mL	71-106

As frações obtidas foram submetidas a CCDC (utilizando-se como eluente sistema AcOEt : MeOH nas proporções 9:1, 7:3, 1:1 e 100% de MeOH) com sendo a reunião das frações obtidas representada na **Tabela 9**.

**Tabela 9** – Reunião das frações obtidas na CC da fração 39

Frações	Fração resultante	Massa (g)
1-22	01	0,0300
23-40	02	0,0402
41-45	03	0,0640
46-56	07	0,0101
57-66	08	0,0085
67-77	09	0,0153
78-92	10	0,1815
93-96	11	0,0085
97-98	12	0,0104
99-102	13	0,0890
103-106	14	0,1154

A partir das frações 39-03 e 39-11, por apresentarem somente uma mancha em CCDC, foram obtidos os seus espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

### **3.4 - Análise por espectrofotometria na região do infravermelho dos extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa* e de suas frações.**

A partir do extrato etanólico bruto seco de *M. parodii* e das frações 1 a 45 obtidas a partir da CLV deste extrato (item 3.3.1), foram obtidos espectros de infravermelho conforme item 3.1, com o intuito de se verificar a presença de lactonas sesquiterpênicas em *M. parodii* e realizar uma comparação com os dados obtidos por Bardón *et al.* (1996) na fitoquímica de *M. mendocina* (detalhes na introdução), onde foram isoladas através de monitoramento por infravermelho (verificação de banda de estiramento do grupo carbonila de anel lactônico), 2 lactonas sesquiterpênicas com esqueletos 15-norguaianolídeo (espectro de infravermelho com bandas em 1770 e 1765  $\text{cm}^{-1}$ ), 1 lactona com esqueleto guaianolídeo (1755  $\text{cm}^{-1}$ ), 1 lactona com esqueleto quadrangolídeo (1766  $\text{cm}^{-1}$ ) e 3 lactonas com esqueleto germacranolídeo (1759, 1759 e 1760  $\text{cm}^{-1}$ ).

Foi obtido também o espectro de infravermelho do extrato etanólico bruto seco de *M. pilosa* e das frações obtidas a partir da sua partição líquido-líquido a fim de se verificar a presença de lactonas sesquiterpênicas nestes.

### **3.5 - Análise em CG-EM das frações 5, 10, 11, 17 e 24 obtidas a partir da CLV do extrato etanólico bruto seco de *M. parodii*.**

As frações 5, 10, 11, 17 e 24 por apresentarem perfil em CCDC mais complexo e que continham as manchas presentes em outras frações foram analisadas, conforme metodologia e equipamentos descritos no item 3.1.

### **3.6 - Análises e Fracionamento do extrato etanólico bruto de *Mikania pilosa* Baker.**

#### **3.6.1 – Partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto de *M. pilosa*.**

O extrato etanólico bruto de *M. pilosa* foi submetido a partição líquido-líquido com hexano, diclorometano e acetato de etila, previamente destilados para obtenção de frações de diferentes polaridades.

A escolha por esta forma de fracionamento prévio foi feita a fim de se evitar o consumo excessivo de solventes principalmente hexano e acetato de etila observado durante a CLV do extrato etanólico bruto de *M. parodii*, onde na partição líquido-líquido os solventes são recuperados e reaproveitados, pois não são utilizadas misturas de solventes.

Para tanto, uma alíquota de 60g do extrato etanólico foi ressuspensa em 600 mL de solução metanol-água (8:2) e o sobrenadante transferido para funil de separação de 2000 mL, sendo particionado com 10 porções de 200 mL de hexano. As frações hexânicas obtidas foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo até eliminação de grande parte do hexano e transferidas para frasco previamente pesado, sendo então a reunião submetida a secagem em ar comprimido e dessecador fornecendo 2,332 g de fração hexânica seca. O precipitado da ressuspensão em metanol-água (8:2), após secagem foi transferido para frasco previamente tarado, fornecendo 17,64 g.

A fração hidroalcoólica remanescente foi concentrada em evaporador rotativo para retirada do metanol. Foram adicionados 400 mL de água e a solução foi então particionada com 10 porções de 200 mL de diclorometano e posteriormente com 10 porções de 200 mL de acetato de etila, obtendo-se as respectivas frações diclorometânica (8,55 g), acetato (11,86 g) e aquosa remanescente (18,46 g).

A fração hexânica obtida foi submetida a fracionamento através de cromatografia líquida a vácuo.

### 3.6.2 - Cromatografia líquida a vácuo da fração hexânica de *M. pilosa*.

A fração hexânica de *M. pilosa* (2,332 g) foi adsorvida em 3,0 g de silicagel 60 Merck e submetida a cromatografia líquida a vácuo em 75 g de silicagel 60 H (fase normal) com gradiente de polaridade crescente utilizando-se os solventes hexano, acetato de etila e metanol, conforme a Tabela 10.

**Tabela 10** – Cromatografia líquida a vácuo da fração hexânica de *M. pilosa*

Eluente	Volume de cada fração coletada	Número de frações coletadas
Hexano	200 mL	01
Hexano – AcOEt (95 : 5)	200 mL	01
Hexano – AcOEt (90 : 10)	200 mL	01
Hexano – AcOEt (80 : 20)	200 mL	01
Hexano – AcOEt (70 : 30)	200 mL	01
Hexano – AcOEt (60 : 40)	200 mL	01
Hexano – AcOEt (50 : 50)	200 mL	01
Hexano – AcOEt (40 : 60)	200 mL	01
Hexano – AcOEt (30 : 70)	200 mL	01
Hexano – AcOEt (20 : 80)	200 mL	01
Hexano – AcOEt (10 : 90)	200 mL	01
AcOEt	200 mL	01
AcOEt – MeOH (95 : 5)	200 mL	01
AcOEt – MeOH (90 : 10)	200 mL	01
AcOEt – MeOH (80 : 20)	200 mL	01
AcOEt – MeOH (75 : 25)	200 mL	01
AcOEt – MeOH (25 : 75)	200 mL	01
AcOEt – MeOH (10 : 90)	200 mL	01
AcOEt – MeOH (95 : 5)	200 mL	01
MeOH	400 mL	01

AcOEt: acetato de etila  
MeOH: metanol

Após análise em CCDC de fase normal (eluente hexano - diclorometano 50%; revelação UV e anisaldeído) das frações obtidas e reunião das frações coletadas, foram obtidas 12 frações resultantes, conforme Tabela 11.



**Tabela 11** – Reunião das frações obtidas na CLV da fração hexânica de *M. pilosa*

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)
1	1	656
2	2	120
3	3	184
4	4	209
5	5	115
6 e 7	6	225
8	7	230
9 e 10	8	165
11	9	95
12 a 15	10	112
16 a 18	11	170
19 e 20	12	15

As frações resultantes 1, 2, 8 e 9 obtidas a partir da CLV da fração hexânica por apresentarem perfil cromatográfico em CCDC mais complexo que as demais foram analisadas em CG-EM, conforme as condições mencionadas no item 3.1, visando a identificação de metabólitos vegetais em comparação com as bibliotecas de espectros de massas do equipamento Wiley7 e a biblioteca elaborada com padrões de sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e esteróides previamente isolados em nosso laboratório e identificados através de técnicas espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ).

A fração 3 por apresentar perfil em CCDC menos complexo, foi submetida a fracionamento através de cromatografia em coluna clássica de fase normal.

### **3.6.3 - Cromatografia em coluna clássica da fração 3 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *M. pilosa*.**

A fração 3 (184 mg) previamente adsorvida em 0,5 g de silicagel 60 Merck foi submetida a cromatografia em coluna clássica (20 g silicagel 60, Merck), utilizando gradiente de polaridade crescente com os solventes Hexano e acetato de etila conforme Tabela 12.

**Tabela 12** – Cromatografia em coluna clássica da fração 3 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *M. pilosa*.

Eluente	Volume de cada fração coletada	Número de frações coletadas
Hexano	30 mL	08
Hexano – AcOEt (95 : 5)	30 mL	05
Hexano – AcOEt (90 : 10)	30 mL	02

As frações obtidas foram analisadas em CCDC (Hexano – diclorometano 7:3, reveladores UV e anisaldeído) e a reunião das frações com perfil cromatográfico semelhante está esquematizada na Tabela 13.

**Tabela 13** – Reunião das frações obtidas na cromatografia em coluna clássica da fração 3.

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)
1 a 3	1	36
4 a 6	2	17
7 a 10	3	29
11 e 12	4	14
13 e 14	5	32
15	6	09

Todas as frações resultantes obtidas foram submetidas a análises em CG-EM nas condições descritas no item 3.1.

### **3.6.4 - Fracionamento da fração diclorometânica do extrato etanólico bruto de *M. pilosa***

Uma alíquota da fração diclorometânica de *M. pilosa* (2,0 g) obtida a partir da partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto seco de *M. pilosa* foi ressuspendida em solução de acetato de etila : metanol (50%) e centrifugada a 3000 rpm. O sobrenadante obtido foi filtrado em algodão e aplicado no topo de uma coluna contendo Sephadex LH-20. A coluna foi eluída com acetato de etila: metanol (50%) sendo coletadas 20 frações. As frações foram analisadas em CCDC onde nas

frações 11 (0,010 g) e 12 (0,013 g) foram observadas somente uma mancha com cauda. Como a fração 11 apresentou pouca cauda, as duas frações foram analisadas separadamente em IES-EM/EM no modo negativo, através de infusão direta, em equipamentos e condições semelhantes às análises em EM/EM do extrato bruto (ver itens 3.1 e 3.7).

### **3.7 – Análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM dos extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa*.**

As amostras foram preparadas através de ressuspensão de 6 mg do extrato etanólico bruto em 3 mL de solução água : etanol (7:3), sendo posteriormente filtrada em filtro Millex® (0,45 µm, 13 mm de diâmetro), sendo o sobrenadante injetado no equipamento.

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna VP-ODS-18 (Shimadzu) e a fase móvel utilizada foi água (fase A) e acetonitrila (fase B) ambos contendo 2% de ácido acético. A eluição foi realizada através de gradiente: 12% da fase B por 3 minutos, 12% a 25% da fase B em 7 minutos, 25% da fase B durante 2 min, 25% a 55% da fase B em 8 min, 55% da fase B durante 3 min, 55% a 12% da fase B em 2 min, 12% da fase B por 2 min, com fluxo de 0,5 mL/min.

As condições do espectrômetro de massas utilizadas foram: voltagem do capilar 3900 V, gás nebulizador nitrogênio, temperatura do gás 180 °C; fluxo do gás 4 L/h. Um split de razão 1:3 da fase móvel eluente do sistema CLAE foi utilizado para introduzir as amostras no capilar, onde as substâncias foram ionizadas.

**3.8 – Análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM dos extratos de *M. parodii*, *M. pilosa*, *M. camporum* e *M. vitifolia*, utilizando como fase estacionária coluna monolítica C-18.**

Os extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa*, o extrato rápido obtido da espécie *M. vitifolia* e o extrato metanólico da espécie *M. camporum* foram analisados em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM no mesmo cromatógrafo e espectrômetro de massas descritos no item 3.1, onde foi utilizada uma coluna cromatográfica para uma coluna monolítica C-18, as condições cromatográficas foram: fase móvel gradiente de água (A) e acetonitrila (B) ambos contendo 1% de ácido acético, 0 – 5 min (5% B), 15 min (20 % B), 20 min (20 % B), 30 min (50 % B) 35 min (50 % B), 45 min (100 % B), 50 min (100 % B), 52 min (5 % B) e 62 min (5 % B), com fluxo de 3 mL/min.

As condições do espectrômetro de massas utilizadas foram: voltagem do capilar 4000 V, gás nebulizador nitrogênio, temperatura do gás 180 °C; fluxo do gás 8 L/h. Um split de razão 1:6 da fase móvel eluente do sistema CLAE foi utilizado para introduzir as amostras no capilar, onde as substâncias foram ionizadas.

O extrato rápido de *M. vitifolia* foi obtido através da extração por 10 minutos de 60 mg das partes aéreas previamente secas e pulverizadas em 3 mL de solução água : etanol (7:3) sob sonicação, sendo posteriormente filtrado em filtro Millex® (0,45 µm, 13 mm de diâmetro), sendo uma alíquota de 20 µL do sobrenadante injetada no equipamento. As amostras de *M. parodii*, *M. pilosa* e *M. camporum* foram preparadas através da ressuspensão de 8 mg do extrato etanólico bruto de *M. parodii* e *M. pilosa* e do extrato metanólico de *M. camporum* em 3 mL de solução água : etanol (7:3), sendo posteriormente filtrada em filtro Millex® (0,45 µm, 13 mm

de diâmetro), sendo o sobrenadante injetado no equipamento. O extrato metanólico de *M. camporum* foi obtido previamente em nosso laboratório por Vanessa Seixas Braz, através da maceração da planta total (previamente estabilizada e seca a 40 °C e pulverizada) com diclorometano, seguida por maceração com metanol.

**3.9 – Análise em CG-EM com microextração em fase sólida (SPME) por *headspace* (HS) das partes aéreas pulverizadas de *M. pilosa* (coletadas em Costa Rica – MS e Alcinópolis – MS) e dos extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa*.**

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica desenvolvida por Pawliszyn & Arthur (1990), caracterizada pela absorção ou adsorção de analitos em uma fibra de sílica fundida revestida por um polímero absorvente. Comercialmente, existem diversos tipos de polímeros com diferentes afinidades. A utilização da SPME vem crescendo cada vez mais, já que esta não necessita da utilização de solvente. Além disso, é necessária apenas uma pequena quantidade de amostra, o tempo de análise é menor, mantendo e/ou melhorando a sensibilidade e reprodutibilidade. A SPME também evita a modificação química e produção de artefatos que podem ocorrer nos métodos convencionais de extração (STASHENKO & MARTÍNEZ, 2007).

O processo de SPME propicia o isolamento dos analitos a partir de uma matriz, concentração e introdução dos analitos no aparelho de Cromatografia em Fase Gasosa para serem analisados (ZHANG & PAWLISZYN, 1993).

Neste estudo foi utilizada para a microextração em fase sólida (SPME) fibra de polidimetilsiloxano (100 µm) da Supelco.

A extração por *headspace* foi realizada com uma alíquota de 400 mg do pó das partes aéreas de *Mikania pilosa*, colocados em vial de 4 mL, sendo o vial aquecido em banho-maria a 60 °C e a fibra exposta por 30 minutos. O mesmo procedimento foi adotado para a análise dos extratos etanólicos brutos secos das espécies *Mikania parodii* e *Mikania pilosa*, somente a quantidade de amostra utilizada foi diferente (50 mg do extrato).

As análises foram realizadas no equipamento Shimadzu QP2010 em coluna DB-5MS (especificações no item 3.1), sendo as injeções realizadas no modo splitless (250°C), utilizando hélio como gás carreador, o fluxo na coluna foi de 1,41 mL/min, pressão de 87,1 kPa e aquecimento com programação de temperatura de 60-240°C a 3°C/min.

Os espectros de massas foram obtidos através de modo de ionização por impacto eletrônico (EI), com voltagem de ionização de 70 eV, temperatura da interface em 250 °C e temperatura da fonte de ionização de 200 °C.

Foram utilizadas quatro bibliotecas para a identificação das substâncias através da comparação dos espectros de massas: Wiley 7, Nist 12, Nist 62 e uma biblioteca formada por substâncias previamente isoladas em nosso laboratório (diterpenos, triterpenos, esteróides) no estudo químico de diversas espécies vegetais e identificadas através de técnicas espectroscópicas como RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Os constituintes voláteis, analisados em CG/EM, foram identificados através da comparação de seus espectros de massas com o banco de espectros do equipamento (especificações no item 3.1) e dos índices de retenção de Kovats (IK), sendo que para a determinação dos IK foi necessária a injeção de hidrocarbonetos *n*-alcanos (C9-C22) conforme descrito por Adams (1995). Porém alguns dos

constituintes, que não apresentam os IK descritos na literatura para a comparação, foram identificados quando possuíam uma alta similaridade (acima de 95 %) com as bibliotecas acima mencionadas.

### **3.10 - Análise das reações envolvidas na fragmentação em fase gasosa através de ionização por *electrospray* e fragmentação através de ionização por elétrons (IE) de diterpenos do tipo pimarano.**

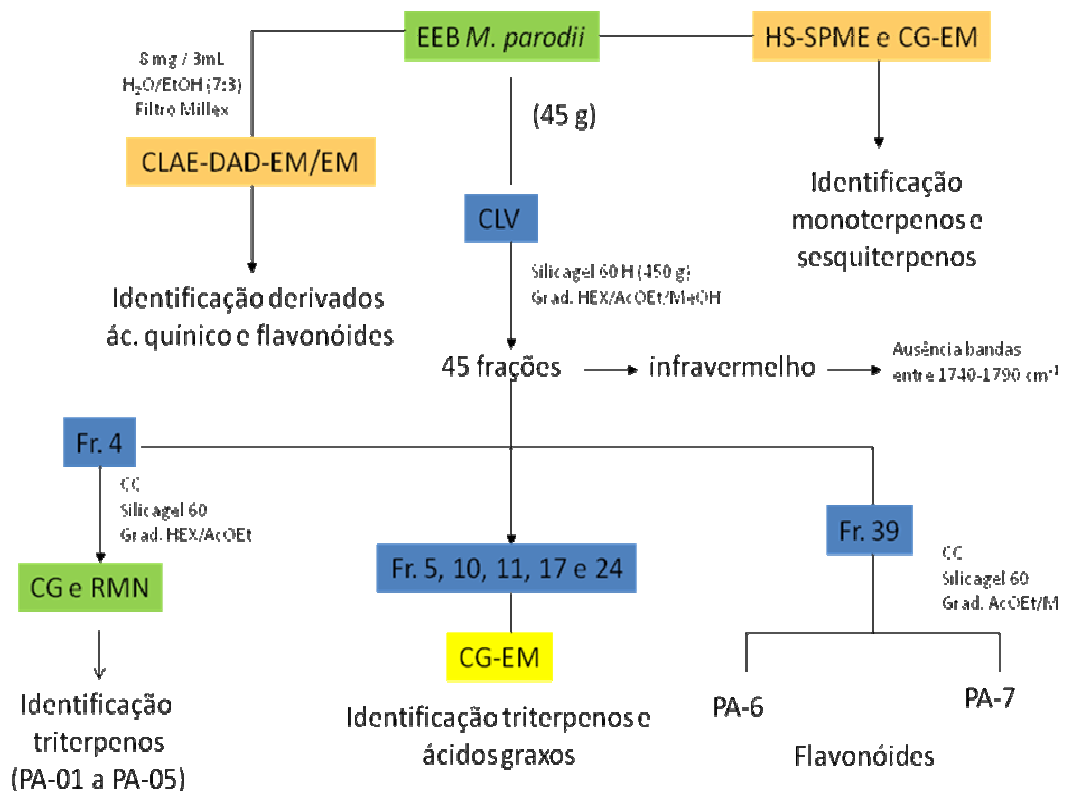
Uma vez que não foram isolados diterpenos a partir das espécies vegetais *Mikania parodii* e *Mikania pilosa*, quatro diterpenos com esqueleto pimarano isolados a partir da espécie vegetal *Viguiera arenaria* (Asteraceae), foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio da Universidade de Franca, sendo o diterpeno *ent*-8(14),15-pimaradien-3 $\beta$ -7 $\alpha$ -diol codificado como D1 (AMBRÓSIO, 2001; ainda não apresenta dados publicados em periódicos), e os diterpenos D2 ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico ou ácido pimaradienóico, D3 *ent*-8(14),15-pimaradien-3 $\beta$ -ol e D4 *ent*-8(14),15-pimaradieno-3 $\beta$ ,19-diol (AMBRÓSIO et al., 2004). Sendo que o diterpeno D2, também isolado a partir de *M. camporum* em nosso laboratório por Vanessa Seixas Braz.

As análises em espectrometria de massas com ionização por *electrospray* dos diterpenos foram realizadas no espectrômetro de massas da marca Bruker (especificações no item 3.1), operando nos modos negativo e positivo, nas condições: voltagem do capilar 3900 V, gás nebulizador nitrogênio, temperatura do gás 180 °C; fluxo do gás 4 L/h. e a ionização através de ionização por elétrons foi realizada através de CG-EM no equipamento equipamento Shimadzu QP2010 (especificações no item 3.1) em coluna DB-5 MS, em um sistema operando em ionização por

elétrons (70 eV), sendo as injeções realizadas no modo split 1:30 (250°C) nas seguintes condições: gradiente de temperatura 0-2 min 100 °C, aumentando a 15 °C/min até 200 °C, aumentando a 6 °C/min até 230 °C e aumentando a 15 °C/min até 280 °C. A determinação dos índices de retenção destes diterpenos, foi realizada através da injeção de hidrocarbonetos *n*-alcanos (C9-C32) conforme descrito por Adams (1995).

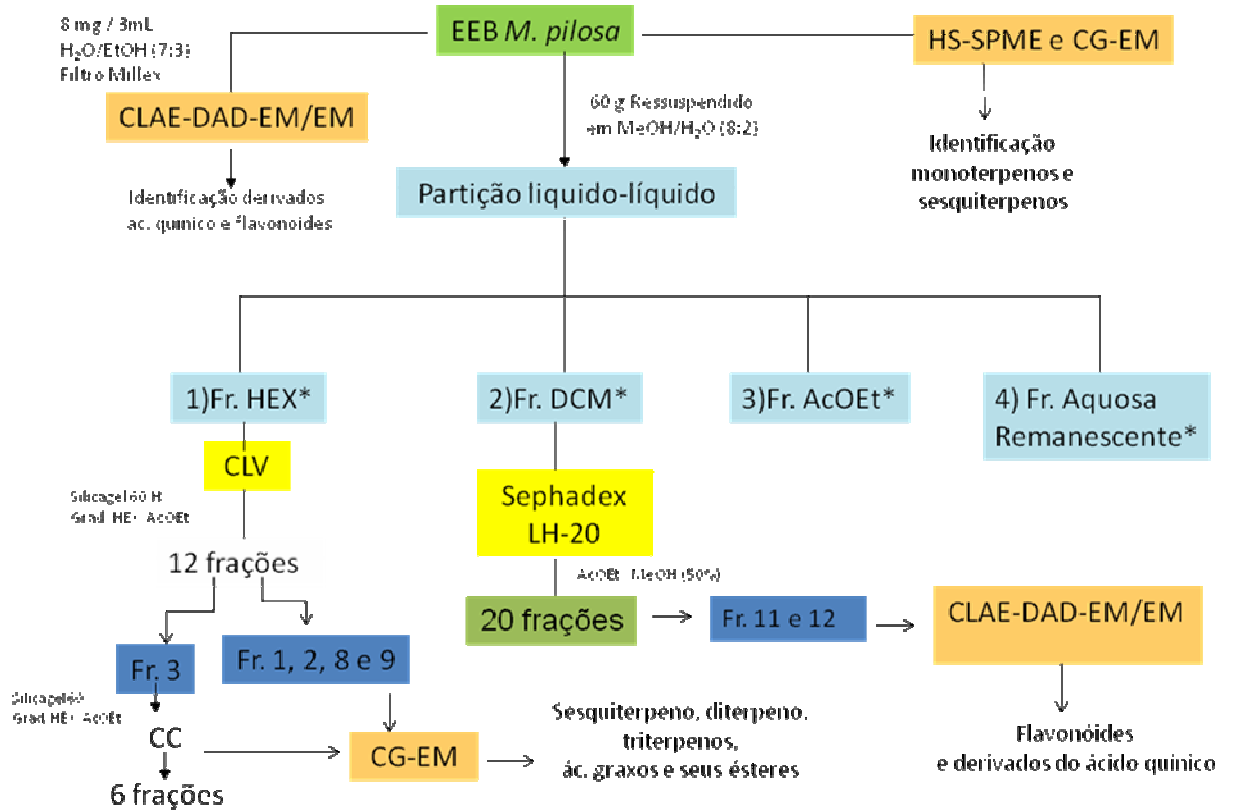
Os fluxogramas 1 e 2 representam as análises e fracionamentos do extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa* respectivamente.

**Fluxograma 1 - Análises e fracionamento do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii*.**





## Fluxograma 2 - Análises e fracionamento do extrato etanólico bruto de

*Mikania pilosa*\* Análise Infravermelho: ausência de bandas entre 1740-1790 cm<sup>-1</sup>

### **3.11 – Ensaio biológico com os extratos etanólicos brutos, frações e substância isolada de *M. parodii* e *M. pilosa*.**

#### **3.11.1 – Avaliação da atividade antifúngica**

Os ensaios foram realizados pelo Dr. Marcos José Salvador no laboratório de microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sob a orientação da Profa. Dra. Isabel Yoko Ito docente da disciplina de Microbiologia nesta Instituição.

Os extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa* foram avaliados frente aos microrganismos indicadores (leveduras) *Candida albicans* (ATCC 64548), *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida Krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) através do método de difusão, onde soluções dos extratos a 4 mg/mL em DMSO/meio RPMI-1640 (5:95) foram aplicadas em poços de 5 mm de diâmetro realizados em placas de petri contendo meio de cultura Mueller Hinton (Difco) com um inóculo de  $10^6$  UFC/mL.

Após incubação por 24 horas a 37 °C foi realizada a análise das placas para determinar a medida (em mm) dos halos de inibição porventura presentes.

#### **3.11.2 - Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em microplaca.**

Os ensaios foram realizados pela Profa. Dra. Nieve Araçari Jacometi Cardoso Furtado do Laboratório de Farmacognosia e Princípios Ativos Naturais da FCFRP/USP.

*Preparo das amostras.*

Foram preparadas soluções dos extratos etanólicos de *Mikania pilosa* e *Mikania parodii* contendo 1 mg/100 µL em DMSO. Após completa solubilização das amostras foram adicionados 1900 µL de caldo triptona soja.

*Microrganismos utilizados.*

Utilizaram-se as cepas padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25275), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) e *Lactobacillus casei* (ATCC 11578).

*Preparo do inóculo.*

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, culturas de 24 horas dos microrganismos indicadores, desenvolvidas no ágar triptona soja foram transferidas para tubos contendo 10 mL de solução salina esterilizada. Padronizaram-se estas suspensões comparando-as com o tubo 0,5 da escala de McFarland (0,1 mL de cloreto de bário a 1,0 % + 9,9 mL de ácido sulfúrico a 1,0 %) por meio da verificação das absorvâncias em 625 nm (NCCLS, 2003). Em seguida, foi feita diluição no caldo triptona soja de modo a fornecer o inóculo de  $5 \times 10^5$  UFC/mL .

*Determinação da atividade antimicrobiana das substâncias*

Em microplacas esterilizadas de 96 orifícios foram depositados um total de 100 µL da mistura do caldo triptona soja, das soluções das substâncias e das suspensões dos microrganismos. As substâncias foram avaliadas nas seguintes

concentrações: 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350 e 400 µg/mL de caldo triptona soja. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas utilizando-se o método de microdiluição em microplaca (NCCLS, 2003).

Em um dos orifícios de cada placa foi feito o controle da cultura, a qual deve apresentar crescimento bacteriano devido à ausência do agente antimicrobiano. Em outro orifício foi feito o controle de esterilidade do caldo triptona soja e em outro o controle do sistema solvente utilizado na solubilização dos extratos e das substâncias isoladas. Clorexidina foi utilizada como controle positivo.

As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados em cada orifício 30 µL de solução aquosa de resazurina a 0,02 % (PALOMINO et al., 2002). A manutenção da cor azul nos orifícios é interpretada como ausência de crescimento microbiano (microrganismo sensível à substância avaliada).

### **3.11.3 – Atividade anticonvulsivante através de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ).**

Os ensaios de atividade anticonvulsivante dos extratos etanólicos brutos de *Mikania parodii* Cabrera e *Mikania pilosa* Baker foram realizados no Laboratório de Neurobiologia e Venenos, do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela aluna de doutorado Alexandra Olimpio Siqueira Cunha, supervisionada pelo Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos e pela aluna de pós-doutorado do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Dra. Silvia Helena Taleb Contini.

As convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) são resultantes da ativação de receptores glutamatérgicos assim como da inibição da neurotransmissão inibitória GABAérgica (MELLO *et al.*, 1986). Segundo Ahmadiani *et al.* (2003), a dose mínima i.p. de PTZ necessária para que 99% dos animais apresentem crises generalizadas é de 60 mg/Kg do peso corporal do animal. Sendo assim, esta dosagem foi utilizada em nossos experimentos.

O pentilenotetrazol (PTZ) 60 mg/Kg foi dissolvido em solução salina (cloreto de sódio 0,9%). As soluções dos extratos etanólicos brutos de *Mikania parodii* e *Mikania pilosa* foram dissolvidas em solução salina com adição de Cremophor RH 40 a 10%. Antes de serem preparados, os extratos brutos foram secos em pistola a vácuo, para eliminação total do solvente. Todas as soluções foram preparadas no dia da realização dos experimentos.

Os extratos e fármacos foram administrados via intraperitoneal (i.p.) sempre no volume de 10 mL/Kg do animal.

Uma hora após a administração dos extratos brutos, os animais foram tratados com PTZ (60mg/Kg, i.p.) e mantidos individualmente em caixas plásticas.

Durante 20 minutos após a administração do PTZ, os seguintes parâmetros foram observados: latência para primeira convulsão, porcentagem de animais/grupo que desenvolveram crise tônico-clônica.

### 3.11.4 - Atividade Citotóxica em Células Tumorais (*in vitro*)

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pela aluna de doutorado Gardenia Carmen Gadelha Militão sob a supervisão dos pesquisadores Leticia V. Costa-Lotufó, Cláudia Pessoa e Manuel Odorico de Moraes.

A citotoxicidade foi obtida através do método do MTT (Mosmann, 1983) utilizando as seguintes linhagens celulares: HL-60 (leucemia – humana), HCT-8 (cólon – humana), MDAMB435 (mama – humano) e SF295 (glioblastoma humano - SNC) obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI).

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 75cm<sup>2</sup>, volume de 250mL); foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

As células em suspensão ou monocamadas foram plaqueadas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de  $3 \times 10^5$  células/mL, para células suspensas e  $0,7 \times 10^5$  células/mL para células aderidas. Os extratos testes foram incubados durante 72 horas juntamente com a suspensão de células. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1000 rpm/5 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 150µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (1000 rpm/5min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 150µL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o

auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550nm. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade. O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT).

### **3.11.5 – Avaliação da atividade antialérgica através da quantificação de $\beta$ -hexosaminidase por fluorescência (ensaio direto).**

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Química Analítica do Departamento de Física e Química da FCFRP/USP, pela aluna de doutorado Fabiana Cristina Bonilha Valeri e pela especialista em laboratório Maria Perpétua Freire Moraes Del Lama sob a supervisão da Prof. Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal. Foram avaliados os extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa*, a fração aquosa remanescente da partição líquido-líquido do extrato bruto de *M. pilosa* e a substância caempferol-3-O-glicosídeo (isolada a partir do extrato etanólico bruto de *M. parodii*).

Os mastócitos participam em processos biológicos que desencadeiam reações alérgicas como asma e rinite. A linhagem RBL-2H3, tem sido utilizada para estudar a secreção regulada em mastócitos. Estas células sensibilizadas com anti-DNP-IgE e estimuladas pelo antígeno DNP-BSA, sofrem degranulação celular e a liberação de mediadores químicos de resposta alérgica como a enzima  $\beta$ -hexosaminidase. Este ensaio tem como função quantificar esta enzima a avaliar o potencial antialérgico de amostras verificado pela redução da liberação desta (NAAL *et al.*, 2004).

*Crescimento e manutenção da cultura de células RBL-2H3*

As células RBL-2H3 foram crescidas em frascos de cultura de células, com capacidade para 250 mL, em meio mínimo essencial (MEM) contendo sais de Eagle e glutamina, suplementado com 20% de soro fetal bovino e 50,0 µg/mL de gentamicina. O frasco de cultura celular foi colocado em uma incubadora, durante 48 horas, a 37 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub>. Após este período, foi realizado o sub-cultivo celular de RBL-2H3. Como estas células crescem aderidas em monocamadas é necessário tratá-las com tripsina/EDTA (5mL), durante 5 minutos, a 37 °C, para que as proteínas de adesão sejam inativadas e as células ressuspensas no meio de cultura.

A suspensão de células foi adicionada em um tubo Falcon, de 50 mL, contendo 10 mL de meio de cultura e centrifugada por 5 minutos, a 10 °C, com rotação constante de 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 5 mL de meio de cultura (aproximadamente  $3,50 \times 10^6$  células/mL). Esse volume foi ajustado de modo a obter uma concentração de células de  $1,00 \times 10^6$  células/mL. À partir desta concentração, foram preparadas novas sub-culturas celulares ou as mesmas foram congeladas para conservar a linhagem celular.

No processo de congelamento as células foram lavadas com o meio (MEM) e posteriormente congeladas em tubos criogênicos contendo a solução de congelamento.

*Sensibilização das células*

As células RBL-2H3 ( $1,50 \times 10^5$  células/mL), foram sensibilizadas pela adição de anti-DNP-IgE (0,85 mg/mL) com um excesso de 5 vezes a concentração de receptores FcεRI. Em seguida, 250 µL da suspensão celular foram colocadas em uma



placa de cultura com 96 compartimentos. Estas células foram incubadas durante toda a noite, a 37 °C, e 5 % de CO<sub>2</sub>.

*Quantificação de β-hexosaminidase por fluorescência (ensaio direto).*

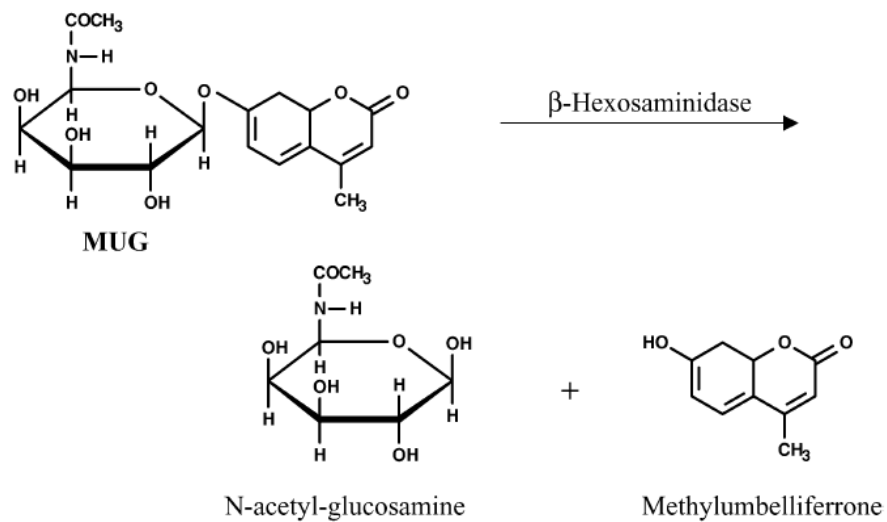
As células RBL ( $1,50 \times 10^5$  células/mL), sensibilizadas com anti-DNP-IgE (1,00 µg/mL), são aderidas em compartimentos de micro placas, durante o processo de incubação por toda a noite (~ 18 horas), e dessa forma estão prontas para o prosseguimento com o ensaio biológico.

As células RBL ( $1,50 \times 10^5$  células/mL), sensibilizadas com anti-DNP-IgE (1,00 µg/mL), são aderidas em compartimentos de micro placas, durante o processo de incubação por toda a noite (~ 18 horas), e dessa forma estão prontas para o prosseguimento com o ensaio biológico.

Para o ensaio enzimático direto, realizado em pH fisiológico, as células foram cultivadas e sensibilizadas como descrito acima. O antígeno DNP-BSA e o substrato para β-hexosaminidase foram adicionados, simultaneamente, sobre as células RBL, num volume de 150 µL cada, no pH 7,4 (Ensaio Direto sem as amostras), e as células incubadas por 90 minutos. Para o Ensaio Direto com as amostras, as células foram pré-tratadas inicialmente com diferentes concentrações (0 a 10 µg/mL) das amostras, antes do estímulo pelo antígeno DNP-BSA (0,10 µg/mL). As amostras, o antígeno e o substrato foram adicionados simultaneamente sobre as células, num volume de 100 µL cada (pH 7,4) e as células também incubadas por 90 minutos. Nesse ensaio, a adição de tampão de Tyrodes foi abolida e a fluorescência foi medida diretamente na placa de cultura, na presença de células, usando um Leitor de Fluorescência para Micro-placas (Fluorescence Microplate Reader), nos comprimentos de onda de excitação e emissão iguais a 360 e 450 nm, respectivamente. Os controles utilizados

foram: tampão salino (Tyrodes), para liberação espontânea, e Triton X-100 para liberação total de  $\beta$ -hexosaminidase.

As soluções estoque das amostras foram também preparadas em DMSO na concentração de 1,00 mg/mL e armazenadas em freezer. Para os ensaios biológicos as soluções das amostras foram diluídas em tampão de Tyrodes, nas concentrações desejadas.



**Figura 3** – Representação da clivagem do substrato MUG (4-metil-umbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida) gerando a metilumbeliferona (450 nm), extraída de Naal *et al.*, 2004.

## ***4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 – Análise dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ das substâncias codificadas como PA-01 e PA-02.

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  PND e DEPT 135° das substâncias codificadas como PA-01 (anexos 2 e 3) e PA-02 (anexos 5 e 6) estão representados na Tabela 14.

**Tabela 14** – Dados dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) das substâncias codificadas como PA-01 e PA-02 e das substâncias utilizadas como modelos comparativos (pseudotaraxasterol e taraxasterol).

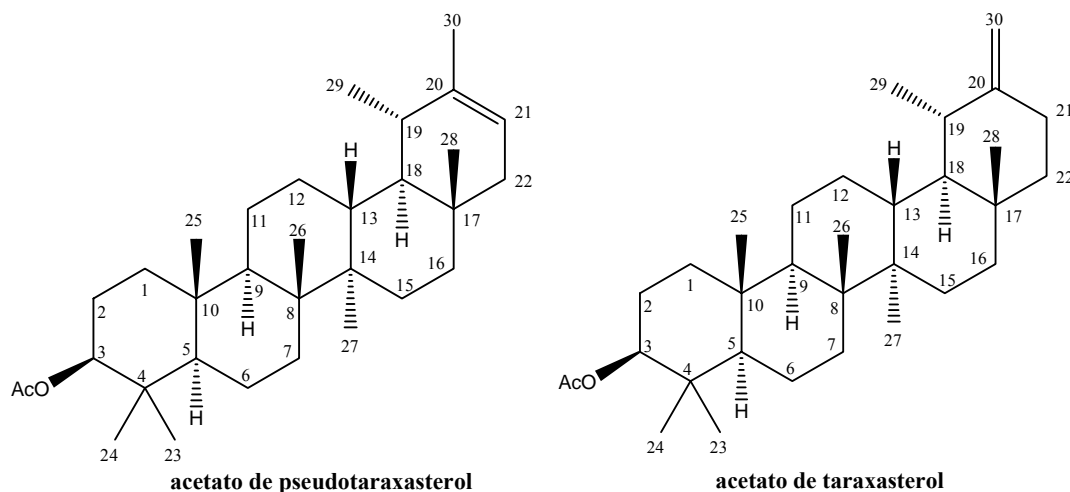
Carbono	Pseudotaraxasterol	PA-01 PND (DEPT 135°) $\delta$ em ppm	Taraxasterol PND $\delta$ em ppm	PA-02 PND (DEPT 135°) $\delta$ em ppm
C-1	38,77	38,41 ( $\text{CH}_2$ )	38,77	38,42 ( $\text{CH}_2$ )
C-2	27,41	27,01 ( $\text{CH}_2$ )	27,35	26,63 ( $\text{CH}_2$ )
C-3	78,98	80,97 (CH)	79,01	80,99 (CH)
C-4	38,86	37,77 (C)	38,82	37,37 (C)
C-5	55,31	55,35 (CH)	55,37	55,42 (CH)
C-6	18,31	18,17 ( $\text{CH}_2$ )	18,29	18,17 ( $\text{CH}_2$ )
C-7	34,25	34,14 ( $\text{CH}_2$ )	34,06	33,98 ( $\text{CH}_2$ )
C-8	41,08	41,05 (C)	40,86	40,48 (C)
C-9	50,43	50,30 (CH)	50,48	50,38 (CH)
C-10	37,10	36,99 (C)	37,12	36,61 (C)
C-11	21,56	21,61 ( $\text{CH}_2$ )	21,43	21,45 ( $\text{CH}_2$ )
C-12	27,64	27,58 ( $\text{CH}_2$ )	26,17	25,61 ( $\text{CH}_2$ )
C-13	39,23	39,17 (CH)	39,17	39,14 (CH)
C-14	42,34	42,31 (C)	42,02	41,60 (C)
C-15	27,0	23,68 ( $\text{CH}_2$ )	26,64	26,14 ( $\text{CH}_2$ )
C-16	36,71	36,67 ( $\text{CH}_2$ )	38,31	38,28 ( $\text{CH}_2$ )
C-17	34,39	34,36 (C)	34,53	34,10 (C)
C-18	48,72	48,64 (CH)	48,67	48,61 (CH)
C-19	36,30	36,30 (CH)	39,40	39,37 (CH)
C-20	139,81	139,84 (C)	154,57	154,62 (C)
C-21	118,89	118,87 (CH)	25,62	23,68 ( $\text{CH}_2$ )
C-22	42,18	42,15 ( $\text{CH}_2$ )	38,88	38,84 ( $\text{CH}_2$ )
C-23	28,00	27,94 ( $\text{CH}_3$ )	28,02	27,94 ( $\text{CH}_3$ )
C-24	15,40	16,02 ( $\text{CH}_3$ )	15,39	15,89 ( $\text{CH}_3$ )
C-25	16,30	16,51 ( $\text{CH}_3$ )	16,78	16,50 ( $\text{CH}_3$ )
C-26	16,06	16,36 ( $\text{CH}_3$ )	15,87	16,34 ( $\text{CH}_3$ )
C-27	14,75	14,69 ( $\text{CH}_3$ )	14,76	14,72 ( $\text{CH}_3$ )
C-28	17,71	17,70 ( $\text{CH}_3$ )	19,49	19,49 ( $\text{CH}_3$ )
C-29	21,54	21,64 ( $\text{CH}_3$ )	25,54	25,49 ( $\text{CH}_3$ )
C-30	21,66	21,34 ( $\text{CH}_3$ )	107,15	107,83 ( $\text{CH}_2$ )
Carbonila do grupo acetato	_____	171,05 (C)	_____	171,05 (C)
Metila do grupo acetato	_____	22,54 ( $\text{CH}_3$ )	_____	21,34 ( $\text{CH}_3$ )

\*REYNOLDS *et al.* (1986)

Analisando-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Anexo 1) da substância PA-01, nota-se um singlete em  $\delta$  2,05 com integração para 3 hidrogênios, atribuído a metila da função acetato. Em  $\delta$  4,5 têm-se um multiplete integrando para 1 hidrogênio atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono da posição 3. Em  $\delta$  5,25 há um multiplete integrando para 1 hidrogênio atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono da posição 21 (ligação dupla).

Analisando-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância PA-02 (Anexo 4), nota-se um singlete em  $\delta$  2,05 com integração para 3 hidrogênios, característico de metila do grupo acetato. Em  $\delta$  4,5 têm-se um multiplete integrando para um hidrogênio que foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono da posição 3 e em  $\delta$  4,61 encontra-se um multiplete com integração para 2 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios ligados ao carbono da posição 30 (ligação dupla).

Com base nos resultados obtidos e em comparação com dados descritos na literatura (RMN  $^{13}\text{C}$  PND e DEPT 135°), propõe-se que as substâncias PA-01 e PA-02, sejam respectivamente os triterpenos pentacíclicos **acetato de pseudotaraxasterol** e o **acetato de taraxasterol**.



**Figura 4** – Estruturas químicas do acetato de pseudotaraxasterol (PA-01) e acetato de taraxasterol (PA-02).

#### 4.2 - Análise em cromatografia em fase gasosa (CG) das frações 04-06 e 04-08 obtidas a partir do fracionamento de extrato etanólico bruto de *M. parodii*.

As frações 04-06 e 04-08 foram analisadas em cromatografia em fase gasosa (CG) em comparação com banco de padrões de triterpenos de nosso laboratório, nos equipamentos e condições descritos no item 3.1.

As **Tabelas 15 e 16** apresentam os dados obtidos nas análises realizadas em colunas capilares HP-01 (anexos 7, 8 e 9) e HP-50 (anexos 10, 11 e 12) respectivamente.

**Tabela 15** – Dados referentes as análises em cromatografia em fase gasosa (CG) das frações 04-06 e 04-08, em comparação com banco de padrões de triterpenóides, realizadas em coluna capilar HP-01.

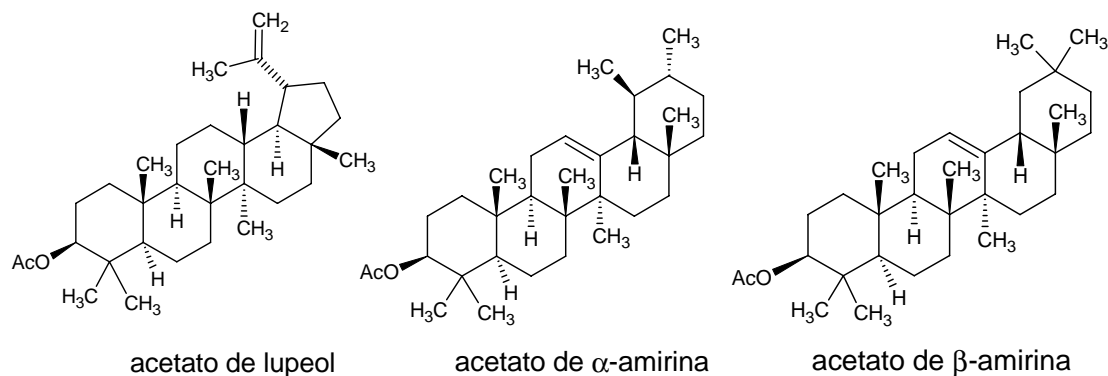
<b>PADRÕES TRITERPENOS</b>	<b>04-06</b>	<b>04-08</b>
<b>Acetato de taraxerol</b> (Tr 19,443; Rr 1,429)	-----	-----
<b>Acetato de <math>\beta</math>-amirina</b> (Tr 19,911; Rr 1,464)	19,871 (1,464) 6,58 % A	19,853 (1,464) 5,51 % A
<b>Acetato de <math>\alpha</math>-amirina e/ou lupeol</b> (Tr 20,804; Rr 1,529)	20,760 (1,530) 6,53 % A	20,746 (1,530) 4,59 % A
<b>Acetato de 11<math>\alpha</math>-12<math>\alpha</math> óxido taraxeril</b> (Tr 22,459; Rr 1,651)	-----	-----
<b>Acetato de baurenila</b> (Tr 22,590; Rr 1,666)	-----	-----
<b>Acetato de pseudo taraxasterol</b> <b>(Tr 22,715; Rr 1,674)</b>	<b>22,715 (1,674)</b> <b>61,10 % A</b>	22,688 5,63 % A
<b>Acetato de taraxasterol</b> <b>(Tr 22,915; Rr 1,690)</b>	-----	<b>22,915 (1,690)</b> <b>74,30% A</b>
<b>Acetato <math>\beta</math>-friedelanol</b> (Tr 23,280; Rr 1,711)	-----	-----
<b>Colesterol (padrão de referência)</b> (Tr 13,602)	13,571	13,560
Tr tempo de retenção (em minutos)		
Rr retenção relativa ao padrão de referência utilizado (colesterol)		
%A porcentagem de área obtida no cromatograma descontada a área do padrão de referência		
<b>Constituinte majoritário</b>		

**Tabela 16** - Dados referentes as análises em cromatografia em fase gasosa (CG) das frações 04-06 e 04-08, em comparação com banco de padrões de triterpenóides, realizadas em coluna capilar HP-50.

<b>PADRÕES TRITERPENOS</b>	<b>04-06</b>	<b>04-08</b>
Acetato de taraxerol (Tr 24,833; Rr 1,410)		
Acetato de $\beta$ -amirina (Tr 25,275; Rr 1,435)	25,092 (1,434) 8,10 % A	25,117 (1,433) 8,41 % A
Acetato de $\alpha$ -amirina (Tr 26,910; Rr 1,528)	26,721 (1,527) 1,62 % A	26,767 (1,527) 1,73 % A
Acetato de lupeol (Tr 27,555; Rr 1,565)	27,350 (1,563) 4,40 % A	27,390 (1,563) 3,22 % A
Acetato de baurenila (Tr 29,518; Rr 1,676)		
<b>Acetato de pseudo taraxasterol (Tr 31,154; Rr 1,769)</b>	<b>30,941 (1,768)</b> <b>70,75 % A</b>	30,961 (1,766) 5,17 % A
<b>Acetato de taraxasterol (Tr 31,905; Rr 1,812)</b>	31,705 (1,812) 1,82 % A	<b>31,775 (1,813)</b> <b>72,40 % A</b>
Acetato $\beta$ -friedelanol (Tr 32,070; Rr 1,821)		
<b>Colesterol (padrão de referência) (Tr 17,606)</b>	17,500	17,527
Tr tempo de retenção (em minutos)		
Rr retenção relativa ao padrão de referência utilizado (colesterol)		
% A porcentagem de área obtida no cromatograma		
<b>Constituinte majoritário</b>		

Analisando-se os dados das Tabelas 15 e 16 e os cromatogramas (anexos 7 a 12) observa-se que além dos triterpenos identificados em PA-01 e PA-02, as frações 04-06 e 04-08, apresentam como substâncias minoritárias os acetatos de outros triterpenóides:  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e lupeol.





**Figura 5** – Estruturas químicas dos triterpenos acetato de lupeol, acetato de  $\alpha$ -amirina e acetato de  $\beta$ -amirina identificados na análise em CG das frações 04-06 e 04-08.

#### 4.3 - Elucidação estrutural das substâncias codificadas como PA-06 e PA-07, isoladas a partir do extrato de *M. parodii*

A partir das substâncias codificadas como PA-06 (64mg) e PA-07 (8,5 mg) foram obtidos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (PND e DEPT 135° e também espectros bidimensionais (HMQC com DEPT 135° e HMBC).

Nas Tabelas 17 e 18 estão apresentados respectivamente os dados dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias PA-06 e PA-07 e RMN  $^{13}\text{C}$  das substâncias PA-06 e PA-07, anexos 13 a 22.

**Tabela 17** – Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS) da substâncias utilizadas como modelos comparativos (caempferol-3-*O*-glicosídeo e isoquercitrina) e das substâncias codificadas como **PA-06** e **PA-07**.

Hidrogênio	caempferol-3- <i>O</i> - glicosídeo ( $\delta$ em ppm, <i>J</i> em Hz)	PA-06 (Anexo 13, $\delta$ em ppm, <i>J</i> em Hz)	isoquercitrina* ( $\delta$ em ppm, <i>J</i> em Hz)	PA-07 (Anexo 18, $\delta$ em ppm, <i>J</i> em Hz)
6	6,21 <i>d</i> (1H, <i>J</i> = 2,0)	6,22 <i>d</i> (1H, <i>J</i> = 1,9)	6,22 <i>d</i> ( <i>J</i> = 2,0)	6,20 <i>d</i> (1H, <i>J</i> = 2,0)
8	6,43 <i>d</i> (1H, <i>J</i> = 2,0)	6,44 <i>d</i> (1H, <i>J</i> = 1,9)	6,43 <i>d</i> ( <i>J</i> = 2,0)	6,41 <i>d</i> (1H, <i>J</i> = 2,0)
2'	8,04 <i>d</i> (2H, <i>J</i> = 9,0)	8,05 <i>d</i> (2H, <i>J</i> = 8,8)	7,59 <i>d</i> ( <i>J</i> **)	7,58 <i>d</i> (1H, <i>J</i> = 2,0)
3'	6,86 <i>d</i> (2H, <i>J</i> = 9,0)	6,89 <i>d</i> (2H, <i>J</i> = 8,8)	_____	_____
5'	6,86 <i>d</i> (2H, <i>J</i> = 9,0)	6,89 <i>d</i> (2H, <i>J</i> = 8,8)	6,86 <i>d</i> ( <i>J</i> = 8,9)	6,86 <i>d</i> (1H, <i>J</i> = 9,0)
6'	8,04 <i>d</i> (2H, <i>J</i> = 9,0)	8,05 <i>d</i> (2H, <i>J</i> = 8,8)	7,58 <i>dd</i> ( <i>J</i> **)	7,58 <i>dd</i> (1H, <i>J</i> = 2,0 e 8,5)
1'' (anomérico)	**	5,47 <i>d</i> (1H, <i>J</i> = 7,3)	**	5,47 <i>d</i> (1H, <i>J</i> = 7,3)

\*HARBORNE, J. B. (1994)

\*\* Dado não mencionado

**Tabela 18** - Dados dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  PND e DEPT  $135^\circ$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS) das substâncias codificadas como **PA-06** e **PA-07** e das substâncias utilizadas como modelos comparativos (caempferol-3-*O*-glicosídeo e quercetina-3-*O*-glicosídeo)

Carbono	caempferol-3- <i>O</i> -glicosídeo* ( $\delta$ em ppm)	PA-06 PND / DEPT $135^\circ$ (Anexos 14 e 15, $\delta$ em ppm)	quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo* ( $\delta$ em ppm)	PA-07 PND / DEPT $135^\circ$ (Anexos 19 e 20, $\delta$ em ppm)
C2	156,3	156,3 (C)	156,5	156,7 (C)
C3	133,0	133,1 (C)	133,7	133,6 (C)
C4	177,4	177,4 (C)	177,6	177,8 (C)
C5	161,1	161,2 (C)	161,3	161,6 (C)
C6	98,7	98,7 (CH)	98,8	99,0 (CH)
C7	164,1	164,3 (C)	164,2	164,5 (C)
C8	93,6	93,6 (CH)	93,6	93,9 (CH)
C9	156,3	156,1 (C)	156,5	156,5 (C)
C10	104,1	103,8 (C)	104,2	104,3 (C)
C1'	121,0	120,8 (C)	121,4	121,5 (C)
C2'	130,7	130,8 (CH)	115,3	116,5 (CH)
C3'	115,0	115,0 (CH)	144,8	145,2 (C)
C4'	159,8	159,9 (C)	148,5	148,8 (C)
C5'	115,0	115,0 (CH)	116,5	115,5 (CH)
C6'	130,7	130,8 (CH)	121,6	121,9 (CH)
C1''	100,4	100,8 (CH)	101,4	101,2 (CH)
C2''	74,2	74,1 (CH)	74,3	74,4 (CH)
C3''	76,5	76,3 (CH)	76,8	76,8 (CH)
C4''	70,1	69,8 (CH)	70,3	70,3 (CH)
C5''	77,2	77,4 (CH)	77,5	77,9 (CH)
C6''	61,0	60,7 (CH <sub>2</sub> )	61,3	61,3 (CH <sub>2</sub> )

\*MARKHAM *et al.* (1978)

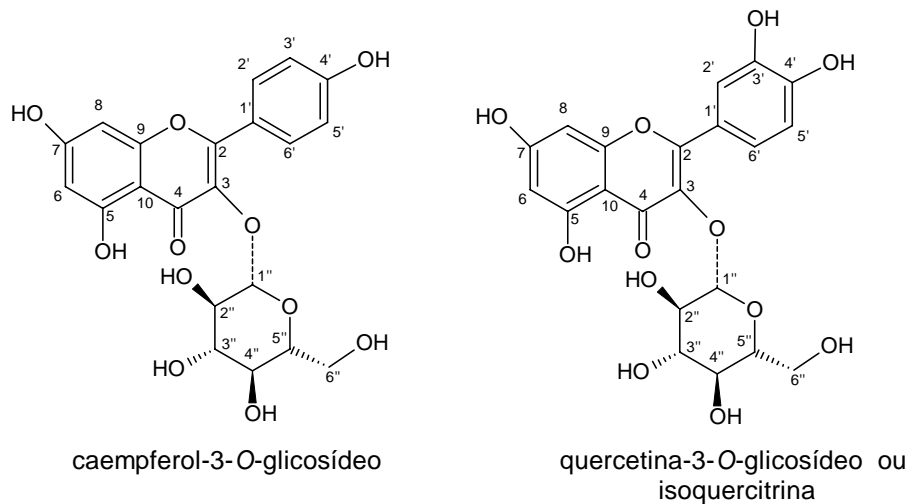
Analisando-se os dados de RMN  $^1\text{H}$  da substância codificada como PA-06, observa-se a presença de dois dubletos em  $\delta$  6,22 e 6,44, com integração para um hidrogênio cada e constante de acoplamento de 1,9 Hz para ambos, indicando acoplamento *meta*, atribuídos respectivamente aos hidrogênios ligados aos carbonos 6 e 8. Foi observada a presença de dois dubletos em  $\delta$  6,89 e 8,05 com integração para dois hidrogênios e constante de acoplamento de 8,8 Hz cada, indicando acoplamento *orto*, atribuídos respectivamente aos pares de hidrogênios 3'/5' e 2'/6'. Em  $\delta$  5,47 foi observado um dubleto com integração para um hidrogênio e constante de acoplamento de 7,3 Hz correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico de açúcar ligado ao flavonóide.

A partir dos dados das análises de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância PA-06 observa-se um sinal em  $\delta$  177,4 correspondente a carbono quaternário pela análise em DEPT  $135^\circ$  atribuído ao carbono 4 (carbonila) do flavonóide, a presença de um sinal em  $\delta$  100,8 correspondente ao carbono anomérico do açúcar ligado ao flavonóide e os outros sinais dos carbonos do açúcar entre  $\delta$  61 e 77,2, além dos outros sinais da porção aglicona do flavonóide.

Analisando-se os dados de RMN  $^1\text{H}$  da substância codificada como PA-07, observa-se também os dubletos em  $\delta$  6,20 e 6,41 com integração para 1 hidrogênio cada e constante de acoplamento de 2,0 Hz (*meta*), atribuídos respectivamente aos hidrogênios ligados aos carbonos 6 e 8. Observa-se um dubleto em  $\delta$  6,86 com integração para um hidrogênio e constante de acoplamento de 9,0 Hz (*orto*) atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono 5', um dubleto em  $\delta$  7,58 com integração para um hidrogênio e  $J = 2,0$  (acoplamento *meta*) atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono 2' e um duplo dubleto também em  $\delta$  7,58 (sobreposto ao dubleto) com constantes de acoplamento de 2,0 (*meta*) e 8,5 Hz (*orto*) atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono 6'. Observa-se também o dubleto em  $\delta$  5,47 com integração para um hidrogênio e constante de acoplamento de 7,3 Hz, referente ao carbono anomérico do açúcar ligado ao flavonóide. Assim como na substância PA-06, na análise dos dados obtidos a partir do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância PA-07 observa-se a presença do sinal correspondente ao carbono 4 ( $\delta$  177,8; DEPT  $135^\circ$  : C), dos sinais correspondentes aos carbonos do açúcar em  $\delta$  101,2 (anomérico) e entre  $\delta$  61,3 e 77,9; além dos demais sinais dos carbonos da porção aglicona do flavonóide.

Com base nos dados espectroscópicos obtidos e em comparação com dados da literatura, propõe-se que as substâncias **PA-06** e **PA-07** sejam respectivamente os

flavonóides **caempferol-3-O-glicosídeo** e **quercetina-3-O-glicosídeo** ou **isoquercitrina**:

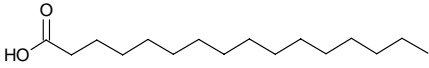
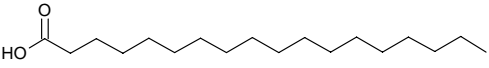
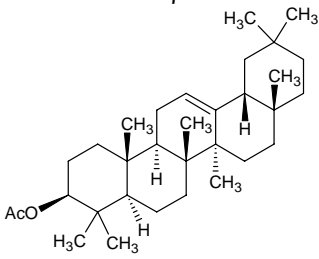
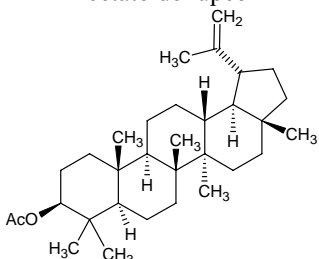
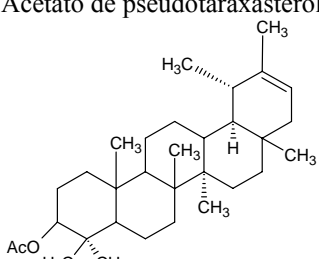
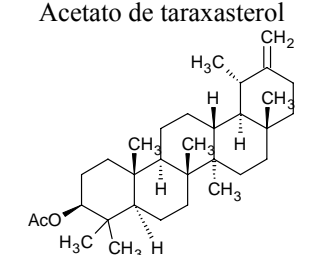


**Figura 6** – Estruturas químicas dos flavonóides caempferol-3-O-glicosídeo (PA-06) e quercetina-3-O-glicosídeo (PA-07).

#### 4.4 – Análise em CG-EM das frações 5, 10, 11, 17 e 24, obtidas a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *M. parodii*.

Os resultados obtidos nas análises em CG-EM das frações 5, 10, 11, 17 e 24 estão apresentados na Tabela 19 e o cromatograma e espectros representados nos anexos 23 a 27.

**Tabela 19** – Resultados das análises em CG-EM das frações 5, 10, 11, 17 e 24, obtidas a partir da CLV do extrato etanólico de *M. parodii*

Substância*	Tempo de retenção (minutos)	Fração e teor (%)	Similaridade com a biblioteca (%)
 <p>Ácido palmítico</p>	20,625	10 (9,25), 11 (92,65), 17 (66,80) e 24 (9,20)	95*
 <p>Ácido esteárico</p>	22,474	11(7,35)	95*
 <p>Acetato de <math>\beta</math>-amirina</p>	45,017	5 (7,48)	93**
 <p>Acetato de lupeol</p>	48,358	5 (2,95)	92**
 <p>Acetato de pseudotaraxasterol</p>	54,082	5 (8,31)	94**
 <p>Acetato de taraxasterol</p>	55,467	5 (76,16)	92**

\* Biblioteca Wiley7 (acompanha o equipamento);

\*\*Biblioteca formada com padrões de diterpenos, triterpenos e esteróides previamente isolados e identificados em nosso laboratório através de métodos espectroscópicos RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ).

#### **4.5 – Análise por espectrofotometria na região do infravermelho dos extratos etanólicos brutos e de suas frações das plantas *M. parodii* e *M. pilosa*.**

A análise por espectrofotometria no infravermelho do extrato etanólico bruto e das frações obtidas a partir do fracionamento através de cromatografia líquida a vácuo, não apresentou as bandas características do grupo carbonila de anel lactônico de lactonas sesquiterpênicas (1740 a 1790  $\text{cm}^{-1}$ ), o que evidencia a ausência ou a concentração muito reduzida desta classe de metabólitos secundários nesta espécie. Estes resultados aliados ao fato de *Mikania parodii* ser considerada uma espécie cosmopolita e *M. mendocina* ser uma espécie endêmica da Argentina, questionam a reclassificação desta espécie para *Mikania mendocina* realizada por King & Robinson (1987).

O extrato etanólico bruto de *M. pilosa* e as frações provenientes da sua partição líquido-líquido e o resíduo da ressuspensão do extrato bruto também não apresentaram as bandas características do grupo carbonila de anel lactônico de lactonas sesquiterpênicas, indicando a ausência ou a concentração muito reduzida desta classe de metabólitos secundários nesta espécie.

Os espectros na região do infravermelho dos extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa* estão representados nos anexos 28 e 29.

#### **4.6 – Análise em CG-EM das frações 1, 2, 8 e 9 obtidas a partir da CLV da fração hexânica obtida a partir do extrato etanólico bruto de *M. pilosa*.**

As frações 1, 2, 8 e 9 obtidas a partir da cromatografia líquida a vácuo (CLV) da fração hexânica de *M. pilosa* por apresentarem perfil cromatográfico em CCDC mais complexo que as outras frações da mesma CLV, foram submetidas a análise em

cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, conforme condições descritas no item 3.1, visando a identificação de metabólitos vegetais através de comparação dos espectros de massas obtidos para cada pico cromatográfico com a biblioteca Wiley<sup>7</sup> e com uma biblioteca de substâncias previamente isoladas em nosso laboratório e identificadas através de métodos espectroscópicos (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C).

As substâncias identificadas nestas frações estão representados na Tabela 20 e os cromatogramas e os espectros dos picos identificados estão representados nos Anexos 30 a 33.

**Tabela 20** - Substâncias identificadas nas frações 1, 2, 8 e 9 da CLV da fração hexânica de *M. pilosa*.

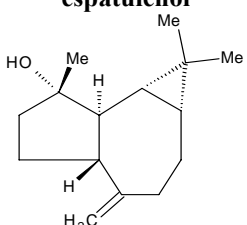
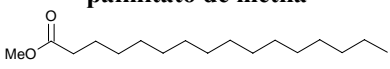
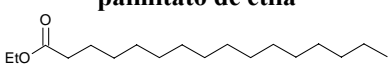
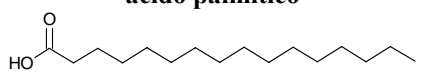
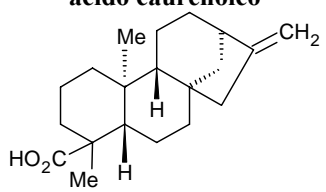
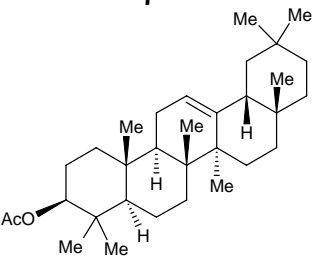
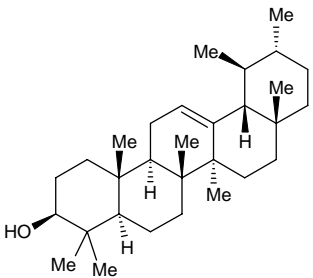
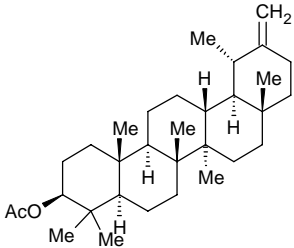
Substância	Tempo de retenção (minutos)	Fração e % de Área	Similaridade com a biblioteca
<p><b>espatulenol</b></p> 	17,367	1 (11,33)	95%*
<p><b>palmitato de metila</b></p> 	20,050	1 (4,60)	97%*
<p><b>palmitato de etila</b></p> 	20,642	1 (14,39)	96%*
<p><b>ácido palmítico</b></p> 	20,650	2 (31,01); 8 (12,23); 9 (13,41)	96%*
<p><b>ácido caurenóico</b></p> 	26,750	1 (1,67); 8 (1,85)	94%**



Tabela 20 - Continuação

Substância	Tempo de retenção (minutos)	Fração e % de Área	Similaridade com a biblioteca
<p><b>acetato <math>\beta</math>-amirina</b></p> 	44,483	1 (5,01)	95%**
<p><b><math>\alpha</math>-amirina</b></p> 	47,208	1 (2,34)	92%**
<p><b>acetato de taraxasterol</b></p> 	54,492	1 (3,19)	94%**

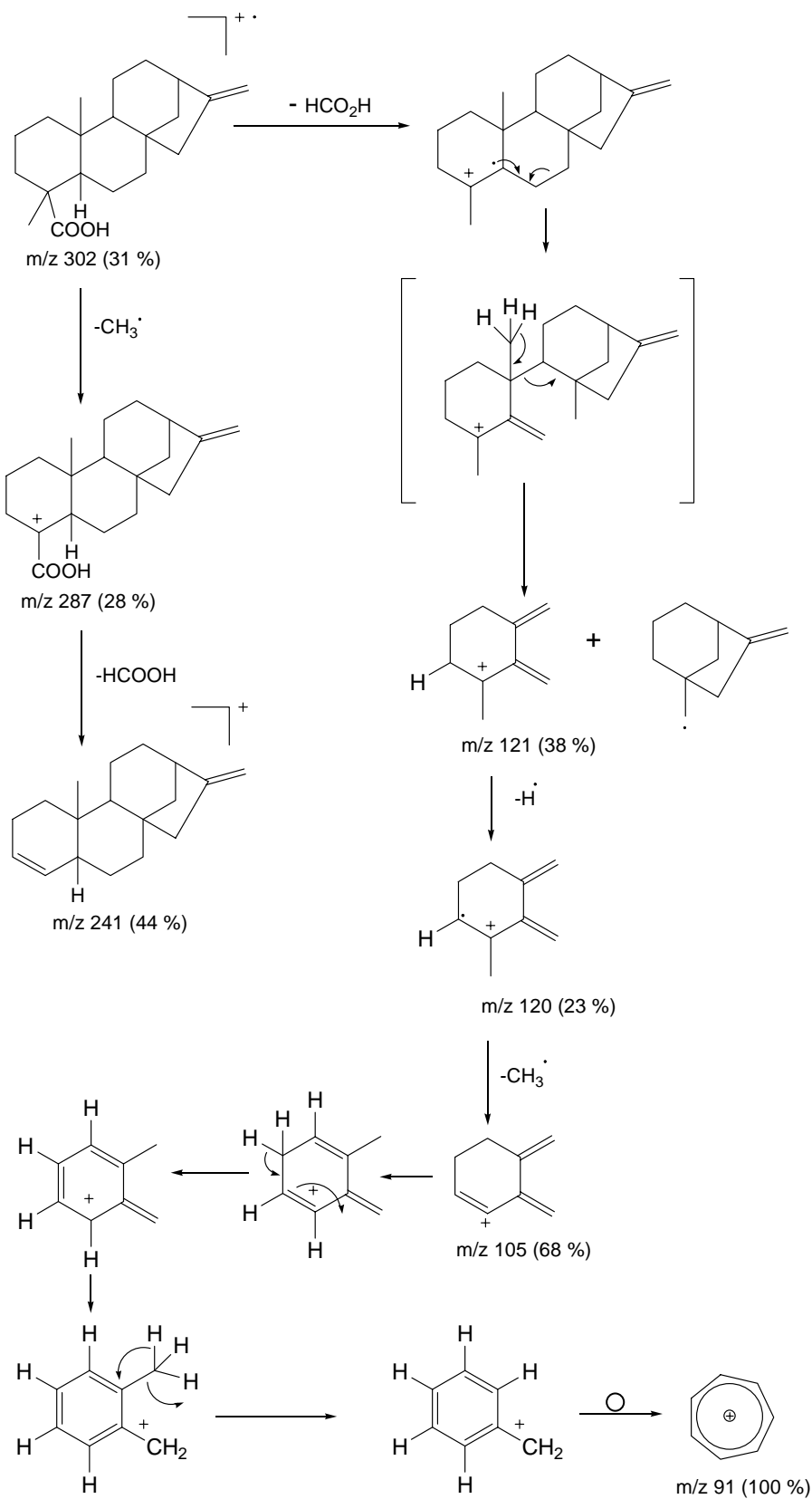
\* Biblioteca Wiley7

\*\*Biblioteca com padrões previamente isolados em nosso laboratório (diterpenos, triterpenos e esteróides), identidade confirmada através de co-injeção com padrões.

O sesquiterpeno espatulenol identificado na fração 1 (11,33 % área), teve determinado o seu índice de retenção de Kovats, uma vez que os sesquiterpenos apresentam tempos de retenção e espectros de massas muito semelhantes devido a ocorrência de rearranjos sendo que o valor obtido foi 1576, idêntico ao apresentado pela literatura (ADAMS, 1995), não deixando qualquer dúvida sobre a sua identidade.

Também foram identificados o ácido graxo palmítico e seus ésteres etílico e metílico, comumente encontrados em várias espécies vegetais. Uma proposta de fragmentação do diterpeno ácido caurenóico está representada no Esquema 1.

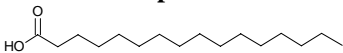
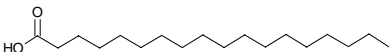
Esquema 1 – Proposta de fragmentação (IE-EM; 70 eV) do ácido caurenóico



#### 4.7 – Análise em CG-EM das frações de *M. pilosa* codificadas como 3.1 a 3.6.

As frações 3.1 a 3.6 obtidas a partir da coluna clássica da fração 3 oriunda da CLV da fração hexânica de *M. pilosa* foram submetidas a análise em CG-EM (Anexos 34 a 39) sendo identificados os seguintes metabólitos, conforme a Tabela 21.

**Tabela 21** – Substâncias identificadas na análises em CG-EM das frações 3.1 a 3.6 da fração hexânica de *M. pilosa*.

Substância	Tempo de retenção (minutos)	Fração e % de Área	Similaridade com a biblioteca
<p>Ácido palmítico</p> 	20.637	3.2 (81,42); 3.3 (94,50); 3.4 (92,51); 3.5 (91,81) e 3.6 (100,00)	96%*
<p>Ácido esteárico</p> 	22.467	3.2 (4,89) e 3.3 (1,58)	93%*

\*Biblioteca Wiley7

A fração 3.1 apesar de apresentar cromatograma com 20 picos não teve nenhum destes identificado pelas bibliotecas, nas frações 3.2 e 3.3 foi identificado o ácido esteárico em baixa concentração e a fração 3.6 apresentou um único pico integrando para 100% de área que foi identificado como ácido palmítico, também identificado nas frações 2, 8 e 9 conforme item 4.6.

#### 4.8 – Análises em IES-EM e IES-EM/EM das frações 11 e 12 obtidas a partir do fracionamento da fração diclorometânica de *M. pilosa*.

Os resultados obtidos na análise em IES-EM/EM das frações 11 e 12 obtidas a partir do fracionamento da fração diclorometânica de *M. pilosa*, estão representados na Tabela 22 e nos Anexos 40 a 43.

**Tabela 22** – Resultados das análises em IES-EM e IES-EM-EM (modo negativo) das frações 11 e 12 obtidas a partir do fracionamento da fração diclorometânica de *M. pilosa*.

FRAÇÃO	Ionização negativa IES-EM ( <i>m/z</i> )	Ionização negativa IES-EM/EM ( <i>m/z</i> ; 15 eV)	Substância proposta
11	631,1130; 515,1221; <b>315,0524*</b> ; 300,0277 (Anexo 40)	315 [M-H] <sup>-</sup> → 300 [M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> (pico base); 271 (Anexo 41)	Derivado metilado da quercetina
12	631,1130; 543,1535; 515,1217; 353,0910; 329,0672; <b>315,0527*</b> ; 300,0277; 191,0576 (Anexo 42)	315 [M-H] <sup>-</sup> → 300 [M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> (pico base); 271 (Anexo 43)	Derivado metilado da quercetina

\*ion majoritário, os demais apresentaram baixa intensidade e não puderam ser fragmentados em EM/EM.

A análise do perfil de fragmentação do íon precursor 315 [M-H]<sup>-</sup>, indica tratar-se de um derivado metilado da quercetina como a isorhamnetina ou a quercetina 3- metil éter. A análise em IES-EM demonstrou a presença de outros íons (*m/z*) com baixa intensidade: 543 [ácido diferuloilquínico - H]<sup>-</sup>, 515 [ácido dicafeoilquínico - H]<sup>-</sup>, 353 [ácido cafeoilquínico - H]<sup>-</sup>, 191 [ácido quínico - H]<sup>-</sup>, também verificados na análise em CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico bruto de *M. pilosa* (ver item 4.9).

Como a fração 11 apresentou maior pureza verificada pela menor quantidade de íons nas análises de IES-EM, ela foi codificada como substância PI-1 e foram obtidos os seus espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (PND e DEPT 135°) cujos dados estão apresentados nas Tabelas 23 e 24 e os espectros nos Anexos 44 a 46.

**Tabela 23** – Dados do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS) da substância codificada como PI – 01 e substâncias utilizadas como modelos comparativos quercetina, quercetina 3-metil éter e quercetina 7-metil éter ( $\delta$  em ppm,  $J$  em Hz).

Hidrogênio	quercetina*	quercetina 3-metil éter*	rhamnetina 3-neohesperidosídeo*	PI-01
3	OH	OCH3	O-neohesperidosídeo	_____
5	OH (12,45)	OH (12,60)	OH (12,5- 12,7)	OH (13,04)
6	6,20 d ( $J=2,1$ )	6,17 d ( $J=1,9$ Hz)	6,37 d ( $J=2,2$ Hz)	6,53 sl
7	OH	OH	OCH3	_____
8	6,42 d ( $J=2,1$ )	6,38 d ( $J=1,9$ Hz)	6,70 d ( $J=2,1$ Hz)	6,63 sl
2'	7,69 d ( $J=2,1$ )	7,52 d ( $J=2,2$ )	7,51 d ( $J=1,5$ Hz)	7,37 d ( $J=2,2$ )
3'	OH	OH	OH	_____
4'	OH	OH	OH	_____
5'	6,90 d ( $J=8,5$ )	6,90 ( $J=8,5$ )	6,80 d ( $J=7,5$ )	6,88 d ( $J=8,9$ )
6'	7,55 dd ( $J=2,1; 8,5$ )	7,42 dd ( $J=2,2; 8,5$ )	7,69 dd ( $J=1,5; 7,5$ )	7,39 dd ( $J=2,2; 8,9$ )
-OCH <sub>3</sub>	_____	não mencionado	não mencionado	3,73 s

\*MARKHAM & GEIGER, 1994

**Tabela 24** - Dados do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  PND e DEPT 135° (75 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , TMS) da substância codificada como **PI-01** e das substâncias utilizadas como modelos comparativos (quercetina 3-metil éter e quercetina 7-metil éter)

Carbono	Quercetina* 3-metil éter ( $\delta$ em ppm) Acetona- $\text{d}_6$	Quercetina** 3-metil éter ( $\delta$ em ppm) $\text{CD}_3\text{OD}$	Quercetina*** 7-metil éter ( $\delta$ em ppm) DMSO- $\text{d}_6$	PI-01 ( $\delta$ em ppm) DMSO- $\text{d}_6$	PI-01 DEPT 135° DMSO- $\text{d}_6$
C2	149,5	158,4	147,3	152,5	C
C3	139,6	139,9	136,0	131,5	C
C4	179,9	180,4	175,9	182,2	C
C5	163,6	163,5	156,0	152,9	C
C6	99,7	100,1	97,4	102,2	CH
C7	165,2	166,3	164,9	164,1	C
C8	94,8	95,1	91,8	94,3	CH
C9	158,2	158,8	160,4	157,4	C
C10	106,2	106,2	103,7	104,2	C
C1'	123,4	123,3	121,9	121,7	C
C2'	116,6	116,8	115,2	113,4	CH
C3'	145,2	146,8	145,0	145,9	C
C4'	157,1	150,3	147,0	149,8	C
C5'	116,7	116,9	115,6	116,2	CH
C6'	122,5	122,7	120,1	119,1	CH
-OCH <sub>3</sub>	60,5	60,9	55,9	60,1	CH <sub>3</sub>

\*LIN &amp; LU, 1995

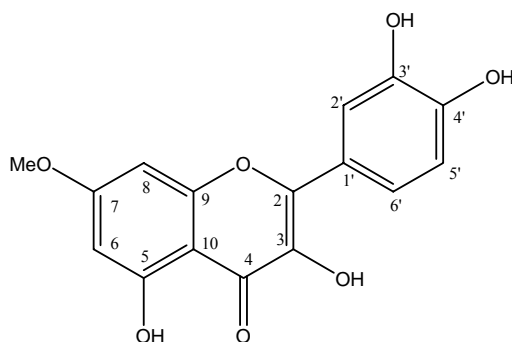
\*\*LEE *et al.*, 2003

\*\*\* WAGNER &amp; CHARI, 1976

A partir da análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  da fração 1, verifica-se a presença de um singlete em  $\delta$  3,73 com integração para três hidrogênios atribuído aos hidrogênios do grupo metoxila. Verifica-se também a presença de dois singletos largos em  $\delta$  6,53 e 6,63, com integração para um hidrogênio cada, atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos 6 e 8 respectivamente. Em  $\delta$  6,88 verifica-se a

presença de um dubleto (1 H) com constante de acoplamento ( $J$ ) igual a 8,9 Hz atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono 5' (anel B), indicando acoplamento *orto* com o duplo dubleto em  $\delta$  7,39 (1 H) com constantes de acoplamento iguais a 2,2 e 8,9 Hz atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono 6'. Em  $\delta$  7,37 verifica-se a presença de um dubleto, com integração para 1 hidrogênio, e constante de acoplamento 2,2 Hz (*meta*), atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono 2' e em  $\delta$  13,04 verifica-se um sinal indicativo de hidroxila ligada ao carbono 5.

Analisando-se os dados do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (PND e DEPT 135° da fração 11, pode-se observar a um sinal em  $\delta$  182,2, altamente desblindado, correspondente a carbono quaternário atribuído ao carbono 4 (carbonila) e o sinal característico do carbono da metoxila em  $\delta$  60,1. Assim sendo a partir dos resultados obtidos e em comparação com os dados de literatura propõe-se que a substância em questão seja o derivado metilado da quercetina, quercetina 7-metil éter, devido a melhor correlação entre os dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .



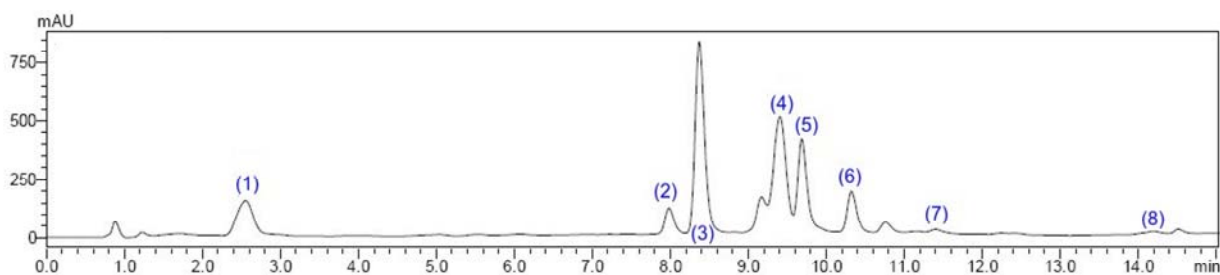
**Figura 7** – Estrutura química da quercetina 7-metil éter .



#### 4.9 – Análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM dos extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa*.

Os resultados obtidos a partir das análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM, nos modos negativo e positivo, conforme descrito no item 3.1 dos extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa*, estão representados nas Tabelas 25 a 28 e os espectros EM/EM no modo negativo nos anexos 47 e 48.

A identificação dos metabólitos secundários foi realizada a partir da comparação dos íons precursores e de seus produtos de fragmentação (razão  $m/z$  e intensidade dos fragmentos em relação ao pico base, em porcentagem) de acordo com dados de literatura, como o esquema para identificação de ácidos clorogênicos através de CLAE-EM<sup>n</sup> desenvolvido por Clifford *et al.*, 2003 e 2006 e análise dos espectros de UV (210-370 nm) dos picos obtidos através da separação por CLAE.



**Figura 8** – Cromatograma CLAE do extrato etanólico de *M. parodii* (UV 270 nm)

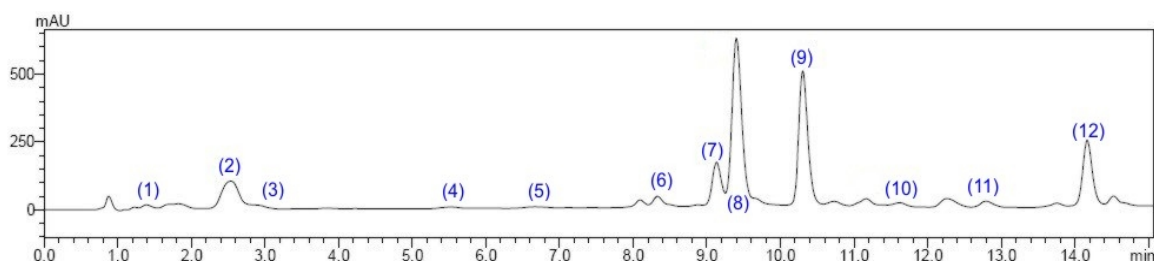
**Tabela 25-** Dados obtidos a partir da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico bruto de *M. parodii* (modo negativo).

Pico	Tempo de retenção (minutos)	Ionização negativa íons precursores	Ionização negativa EM/EM (15 eV)	UV (max)	Substância
1	3,0	353,1	353,1 → 191,1	300; 325	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico <sup>1,2</sup>
2	8,4	609,2	609,2→301,1	254; 349	rutina <sup>3</sup>
3	8,9	463,1	463,1→301,1	255; 352	quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo <sup>3</sup>
4	9,4	515,1	515,1→353,1(pico base); 335,1(20% pico base); 173,1	300; 324	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico <sup>1,2</sup>
5	9,6	515,1	515,1→353,1 (pico base); 191,1	301; 329	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico <sup>1,2</sup>
5	10,1	447,1	_____	264; 342	caempferol-3- <i>O</i> -glicosídeo
6	10,5	515,1	515,1→353,1(pico base); 173,1	300; 326	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico <sup>1,2</sup>
7	11,7	529,1	529,1→367,1(pico base); 191,1	300; 326	ácido 3- <i>O-E</i> -feruloil-5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico <sup>1,2</sup>
8	14,5	315,1	315,0→300,0	267; 328	derivado metilado da quercetina <sup>4</sup>

1-CLIFFORD *et al.* (2003) 2- CLIFFORD *et al.* (2006) 3- EXARCHOU *et al.* (2006) 4-YE *et al.* (2005)

**Tabela 26-** Dados obtidos a partir da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico bruto de *M. parodii* (modo positivo).

Pico	Tempo de retenção (minutos)	Ionização positiva íons precursores	Ionização positiva EM/EM (15 eV)	UV (max)	Substância
1	3,0	355,1	355,1 → 163,1	299; 325	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
2	8,4	611,1	_____	254; 349	rutina
3	8,9	465,1	465,1 → 303,1	255; 352	quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo
4	9,4	499,1	499,1 → 319,1; 163,1	300; 324	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
5	9,6	499,1	499,1 → 319,1; 163,1	301; 329	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
5	10,1	449,1	_____	264; 342	caempferol-3- <i>O</i> -glicosídeo
6	10,5	499,1	499,1 → 319,1; 163,1	300; 326	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
7	11,7	513,1	513,1 → 319,1 ; 163,1	300; 326	ácido 3- <i>O-E</i> -feruloil-5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
8	14,5	317,1	317,1 → 302,1	267; 328	derivado metilado da quercetina



**Figura 9** – Cromatograma CLAE do extrato etanólico de *M. pilosa* (UV 270 nm)

**Tabela 27**- Dados obtidos a partir da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico bruto de *M. pilosa* (modo negativo).

Pico	Tempo de retenção (minutos)	Ionização negativa íons precursores	Ionização negativa EM/EM (15 eV)	Substância	UV máx. (nm)
1	1,4	191,1		ácido quínico <sup>1</sup>	299; 324
2	3,0	353,1	353,1→191,1	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico <sup>1,2</sup>	300; 325
3	3,4	353,1	353,1→191,1(pico base); 173,1(50% pico base)	ácido 3- <i>O-E</i> -cafeoilquínico <sup>1,2</sup>	300; 325
4	6,0	367,1	367,1→191,1(pico base)	ácido 5- <i>O-E</i> -feruloilquínico <sup>1,2</sup>	300; 325
5	7,1	441,1	441,1→261,1(pico base); 217,1(50% pico base)	não identificado	255; 345
6	8,7	463,1	463,1→301,0	quercetina- <i>O</i> -hexose <sup>3</sup>	254; 342
7	9,3	515,1	515,1→353,1(pico base); 335,1(20% pico base); 173,1	ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico <sup>1,2</sup>	299; 324
8	10,0	515,1	515,1→353,1(pico base); 191,1	ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico <sup>1,2</sup>	300; 325
9	10,5	515,1	515,1→353,1(pico base); 173,1	ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico <sup>1,2</sup>	299; 325
10	12,8	529,1	529,1→367,1(pico base); 173,1	ácido 3- <i>O</i> -feruloil-5- <i>O</i> -cafeoilquínico <sup>1,2</sup>	299; 324
11	13,3	491,1	491,1→329,1	quercetina dimetilada +hexose	270; 335
12	14,6	315,1	315,1→300,1	metil-quercetina <sup>4</sup>	271; 344

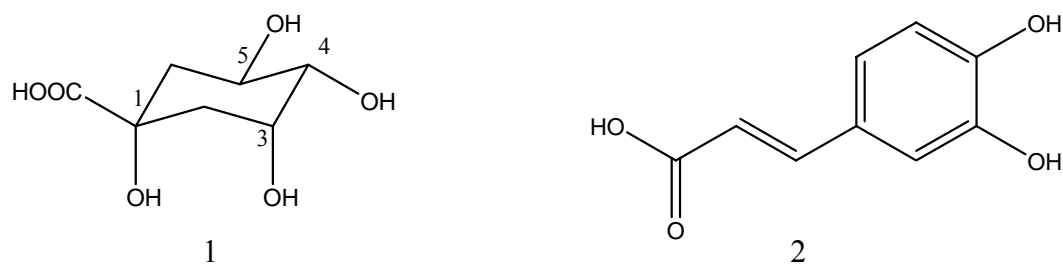
1- CLIFFORD *et al.* (2003) 2- CLIFFORD *et al.* (2006) 3- EXARCHOU *et al.* (2006) 4-YE *et al.* (2005)

**Tabela 28-** Dados obtidos a partir da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico bruto de *M. pilosa* (modo positivo)

Pico	Tempo de retenção (minutos)	Ionização positiva Íons precursores	Ionização positiva EM/EM (15 eV)	Substância	UV máx. (nm)
2	3,0	355,1	355,1 → 163,1	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	299; 324
3	3,4	355,1	355,1 → 163,1	ácido 3- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	300; 325
4	6,0	369,1	369,1 → 163,1	ácido 5- <i>O-E</i> -feruloilquínico	300; 325
6	8,7	465,1	465,1 → 303,1	quercetina- <i>O</i> -hexose	254; 342
7	9,3	499,1	499,1 → 319,1; 163,1	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	299; 324
8	10,0	499,1	499,1 → 319,1; 163,1	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	300; 325
9	10,5	499,1	499,1 → 319,1; 163,1	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	299; 325
10	12,8	513,1	_____	ácido 3- <i>O-E</i> -feruloil-5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	299; 324
11	13,3	493,1	_____	quercetina dimetilada + hexose	270; 335
12	14,6	317,1	317,1 → 302,1	metil-quercetina	271; 344

### Identificação de derivados do ácido quínico ou ácidos clorogênicos.

Os derivados do ácido quínico ou ácidos clorogênicos são resultantes de esterificações de um ou mais tipos de ácidos *trans*-cinâmicos (cinâmico, cumárico, cafêico, ferúlico e dimetoxicinâmico) com as hidroxilas do ácido quínico, gerando uma série de isômeros de posição. Tomando-se por base os ácidos dicafeoilquínicos formados pela esterificação de duas hidroxilas do ácido quínico por dois ácidos cafêicos têm-se a seguinte série de seis isômeros, constituída pelos ácidos: 1,3-dicafeoilquínico; 1,4-dicafeoilquínico; 1,5-dicafeoilquínico; 3,4-dicafeoilquínico ; 3,5-dicafeoilquínico; 4,5-dicafeoilquínico (CLIFFORD et al, 2000; CLIFFORD et al, 2003 e CLIFFORD et al, 2005).



**Figura 10** – Estrutura química dos ácidos quínico (1) e cafêico (2).

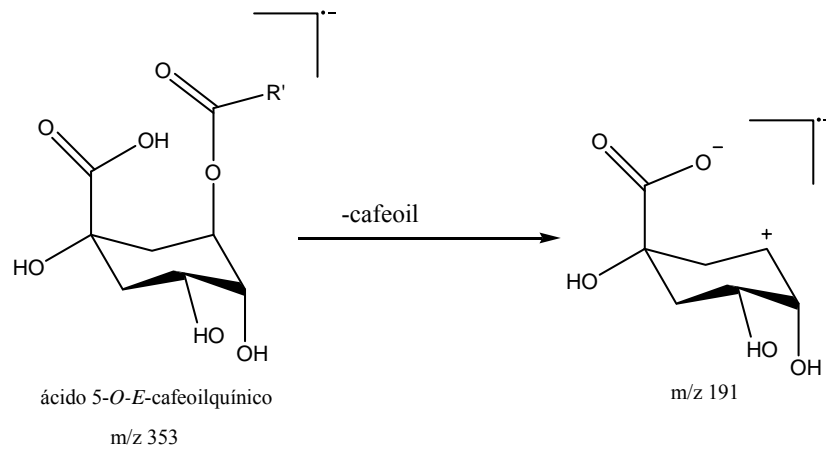
Os derivados com esterificações nas posições 3, 4 e 5 são de ocorrência comum ao contrário dos derivados com esterificação na posição 1 que apresentam ocorrência rara, sendo que várias plantas, produzem comumente somente os derivados com esterificações nas posições 3, 4, 5 (CLIFFORD et al., 2005). No caso do gênero *Mikania* foi identificado o derivado 1,5-dicafeoilquínico na espécie *M. hirsutissima* (OHKOSHI et al., 2004), o derivado 4,5-dicafeoil quínico na espécie *M. pseudohoffmaniana* (SOUZA et al., 2006) e os derivados 3,5 e 4,5-dicafeoilquínicos na espécie *M. cordifolia* (PELUSO et al., 1995).

Considerando que os espectros de íons produto (EM/EM) no modo de ionização positiva não permitem a diferenciação dos isômeros posicionais dos ácidos clorogênicos, a identificação destes foi baseada principalmente em seus espectros EM/EM, perfil de eluição em coluna C-18 e espectros de UV.

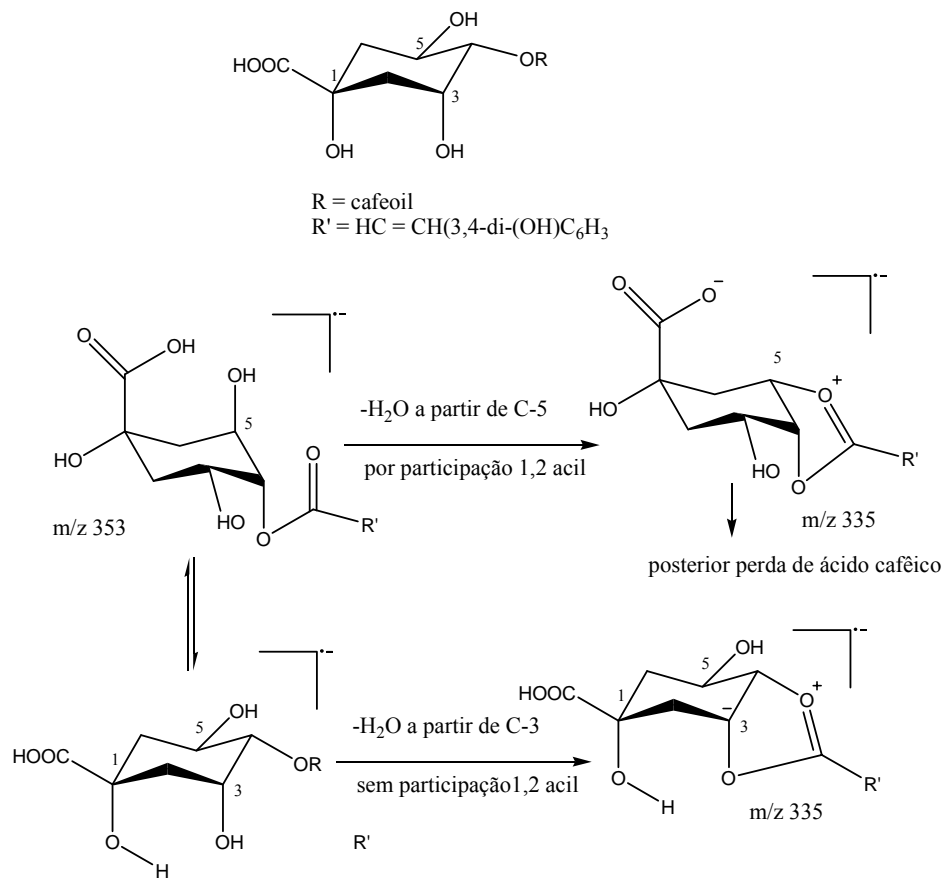
A facilidade da perda de uma unidade de um ácido *trans*-cinâmico (como o ácido cafêico) esterificada em uma posição específica do ácido quínico na fragmentação (demonstrada pela intensidade relativa do íon produto gerado por esta perda no espectro EM/EM) é influenciada principalmente pela sua proximidade espacial com carboxila ou hidroxila no carbono 1 do ácido quínico, fator que influencia o mecanismo e consequente perfil de fragmentação destes derivados. No caso dos derivados 5-acil, um hidrogênio da carboxila do ácido quínico é abstraído

para a eliminação da porção cafêica, no caso dos derivados 3-acil, é abstraído de um hidrogênio da OH em 1, e no caso dos 4-acil, como não há proximidade espacial com a carboxila ou hidroxila em 1, é necessária a perda de uma molécula de água a partir de uma das hidroxilas vizinhas (posições 3 ou 5 do ácido quínico), antes da eliminação do ácido cafêico, diagnosticada pela íon  $m/z$  335. Estas diferenças na fragmentação ocasionam consideráveis diferenças na intensidade, e às vezes na natureza, dos íons produtos nos espectros de segunda geração EM/EM, o que possibilita a diferenciação entre os isômeros de posição (CLIFFORD *et al.*, 2003, 2005, 2006). Ver esquemas 2, 3 e 4.

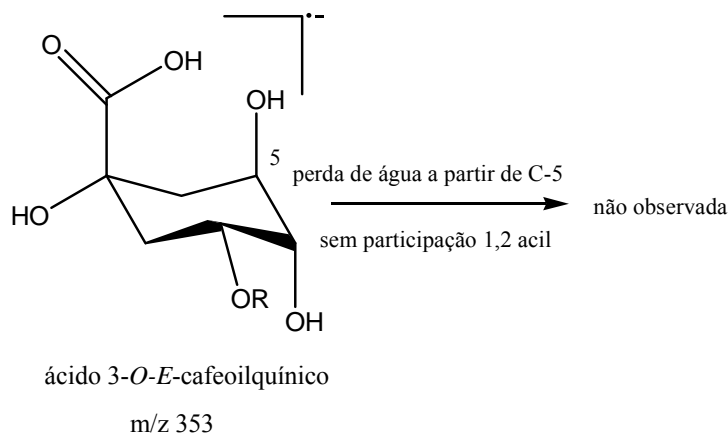
**Esquema 2** – Perda do ácido cafêico no ácido 5-*O-E*-cafeoilquinico extraído de CLIFFORD *et al.*, 2003.



**Esquema 3** – Perda do ácido cafêico no ácido 4-*O-E*-cafeoilquinico extraído de CLIFFORD *et al.*, 2003.



**Esquema 4** – Perda do ácido cafêico no ácido 3-*O-E*-cafeoilquínico extraído de CLIFFORD *et al.*, 2003.



### Identificação dos flavonóides

Os flavonóides caempferol-3-*O*-glicosídeo e quercetina-3-*O*-glicosídeo identificados nas análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico bruto de *M. parodii*, foram isolados a partir do fracionamento do mesmo extrato e identificados através de análises espectroscópicas RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ver item 4.3).

O flavonóide derivado metilado da quercetina (quercetina 7-metil-éter) identificado nas análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico bruto de *M. pilosa* foi isolado a partir do fracionamento do mesmo extrato, sendo sua elucidação estrutural realizada através de análises espectroscópicas RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ver item 4.8).

A elucidação dos flavonóides também foi baseada em dados e informações sobre espectros de massas presentes na literatura (MA *et al.*, 1999; CUYCKENS & CLAEYS, 2004; CUYCKENS *et al.*, 2002).



Os dados espectrométricos dos derivados do ácido quínico e dos flavonóides identificados estão representados na tabela 29.

**Tabela 29** - Dados espectrométricos dos derivados do ácido quínico e flavonóides identificados nas espécies *M. parodii* e *M. pilosa* através de análises em CLAE-DAD-EM/EM.

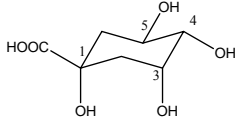
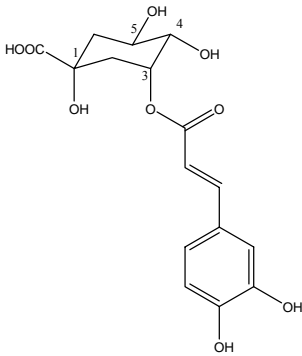
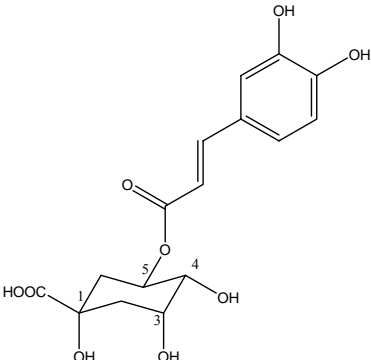
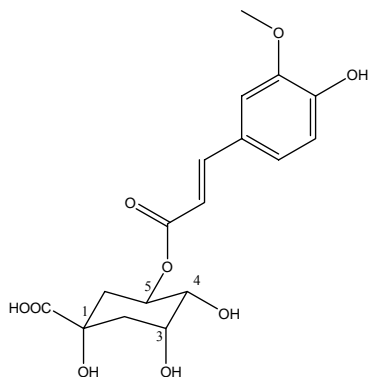
Substância	Ionização (modo negativo)
<p data-bbox="531 633 687 663"><b>ácido quínico</b></p> 	<p data-bbox="943 633 1259 663">IES-EM <math>m/z</math> : 191,1 [M – H]<sup>-</sup></p>
<p data-bbox="456 880 762 909"><b>ácido 3-<i>O-E</i>-cafeoilquínico</b></p> 	<p data-bbox="943 880 1426 965">IES-EM <math>m/z</math> : 353,1 [M – H]<sup>-</sup>, EM/EM: 191,1 [M – cafeoil]<sup>-</sup> (pico base); 173,1 [M – cafeoil – H<sub>2</sub>O] (51%)</p>
<p data-bbox="456 1352 762 1382"><b>ácido 5-<i>O-E</i>-cafeoilquínico</b></p> 	<p data-bbox="943 1352 1426 1415">IES-EM <math>m/z</math> : 353,1 [M – H]<sup>-</sup>, EM/EM: 191,1 [M – cafeoil]<sup>-</sup> (pico base).</p>

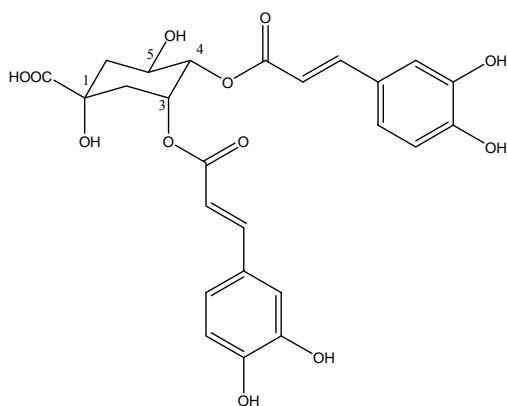
Tabela 29 - Continuação

**ácido 5- *O-E*-feruloilquínico**

IES-EM  $m/z$  : 367,1 [M – H]<sup>-</sup>, EM/EM:  
191,1 [M – feruloil]<sup>-</sup> (pico base).

**ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoilquínico**

IES-EM  $m/z$  : 515,1 [M – H]<sup>-</sup>, EM/EM:  
353,1 [M – cafeoil]<sup>-</sup> (pico base); 335,1 [M –  
cafeoil – H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> (21%); 173,1 [M – 2 cafeoil  
– H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> (41%).

**ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico**

IES-EM  $m/z$  : 515,1 [M – H]<sup>-</sup>, EM/EM:  
353,1 [M – cafeoil]<sup>-</sup> (pico base); 191,1 [M –  
2 cafeoil]<sup>-</sup> (85%).

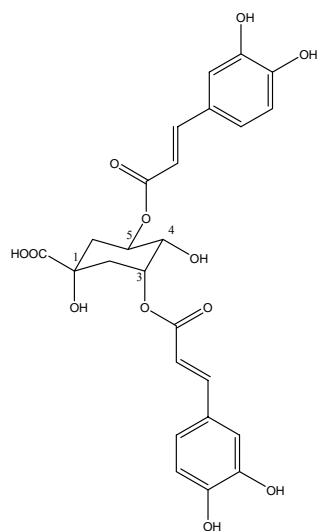
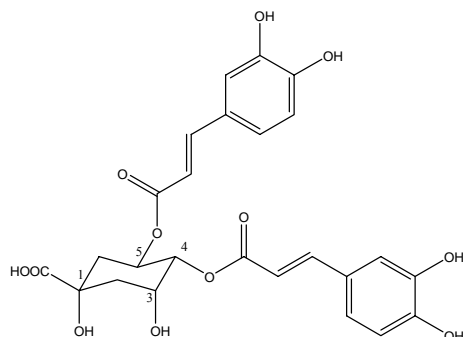
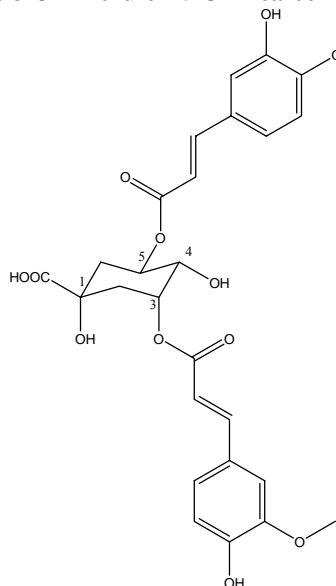


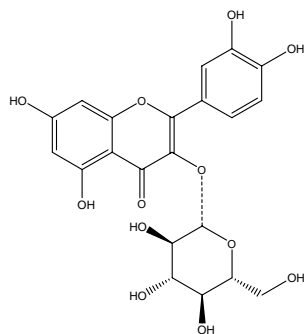
Tabela 29 - Continuação

**ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico**

IES-EM  $m/z$  : 515,1 [M - H]<sup>-</sup>, EM/EM:  
353,1 [M - cafeoil]<sup>-</sup> (pico base); 173,1 [M -  
2 cafeoil - H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> (38%).

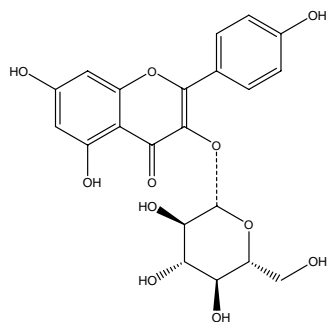
**ácido 3-*O-E*-feruloil-5-*O-E*-cafeoilquínico**

IES-EM  $m/z$  : 529,1 [M - H]<sup>-</sup>, EM/EM:  
367,1 [M - cafeoil]<sup>-</sup> (pico base); 193,1 [M -  
cafeoil - feruloil]<sup>-</sup> (29%).

**quercetina-3-*O*-glicosídeo**

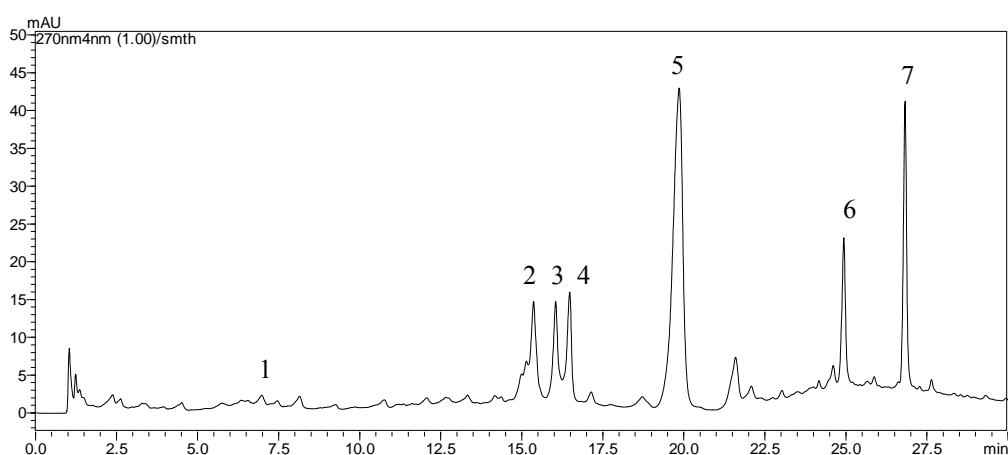
IES-EM  $m/z$  : 463,1 [M - H]<sup>-</sup>, EM/EM:  
301,1 [M - glicose]<sup>-</sup> (pico base).

Tabela 29 - Continuação

caempferol-3-*O*-glicosídeoIES-EM  $m/z$  : 447,1[M - H]<sup>-</sup>

**4.10 – Análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM dos extratos etanólicos brutos de *M. parodii*, *M. pilosa*, *M. camporum* e *M. vitifolia*, utilizando como fase estacionária, coluna C-18 monolítica.**

Os resultados das análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato metanólico bruto de *M. camporum* estão representados na Figura 9 e Tabelas 30 a 31.



**Figura 11** - Cromatograma da análise em CLAE-DAD-EM/EM do extrato metanólico de *M. camporum* (270 nm).

**Tabela 30** – Dados da análise em CLAE-DAD-EM/EM (modo negativo) em coluna monolítica C-18, do extrato metanólico bruto de *M. camporum*.

Pico	Tempo de retenção (min)	CLAE-EM (-)	CLAE-EM/EM (-) 15 eV	UV máx. (nm)	Substância / Classe proposta
1	6,977	353,1	353→ 191	299; 326	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
2	15,358	515,1	515→353 pb; 191,1	301; 327	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
3	16,042	477,1	477→315 pb; 300	274; 333	derivado metilado da quercetina contendo <i>O</i> - hexose
4	16,474	515,1	515→353 pb; 179; 173	301; 327	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
5	19,851	491,1	491→329	274; 329	derivado dimetilado da quercetina contendo <i>O</i> - hexose
6	24,930	329,1	329→314 pb; 299	272; 343	derivado dimetilado da quercetina
7	26,819	313,1	313→298; 283 pb	274; 333	Derivado dimetilado do caempferol

pb – pico base

**Tabela 31** – Dados da análise em CLAE-DAD-EM/EM (modo positivo) em coluna monolítica C-18, do extrato metanólico bruto de *M. camporum*.

Pico	Tempo de retenção (min)	CLAE-EM (+)	CLAE-EM/EM (+) 15 eV	UV máx. (nm)	Substância / Classe Proposta
1	6,977	355,1	355→163	299; 326	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
2	15,358	499,1	499→163	301; 327	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
3	16,042	479,1	479→317	274; 333	quercetina metilada + hexose
4	16,474	499,1	499→163	301; 327	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
5	19,851	493,1	493→331	274; 329	quercetina dimetilada + hexose
6	24,930	331,1	331→298	272; 343	quercetina dimetilada
7	26,819	315,1	315→282	274; 333	caempferol dimetilado

A partir da análise dos dados obtidos das análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato metanólico bruto de *M. camporum*, representados nas Tabelas 30 e 31, têm-se que:

Os picos 1, 2 e 4 apresentaram perfil de fragmentação e espectros de UV, característicos de ácidos clorogênicos ( $\approx 300, 325$ ), onde no pico 1 para o modo de ionização negativa temos um íon com  $m/z 353,1 [M-H]^-$  (diagnóstico de ácido cafeoilquínico), cuja fragmentação forneceu o íon  $m/z 191 [M\text{-cafeoil}]^-$ , no modo de ionização positiva obteve-se o íon com  $m/z 355,1 [M+H]^+$ .

Para o pico 2 temos no modo de ionização negativa o íon com  $m/z 515,1 [M-H]^-$  (diagnóstico de ácido dicafeoilquínico), cuja fragmentação forneceu os íons  $m/z 353 [M\text{-cafeoil}]^-$  e  $m/z 191 [M - 2 \text{cafeoil}]^-$ , para o modo de ionização positiva foi observado o íon com  $m/z 499,1 [M+H-H_2O]^+$ .

Para o pico 4 temos no modo de ionização negativa o íon com  $m/z$  515,1 [M-H]<sup>-</sup>, cuja fragmentação forneceu os íons  $m/z$  353 [M-cafeoil]<sup>-</sup> e  $m/z$  173 [M-2cafeoil-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, para o modo de ionização positiva foi observado o íon com  $m/z$  499 [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

Com base nos dados observados e em comparação com dados presentes na literatura (CLIFFORD, 2003, 2005 e 2006; GOBBO-NETO, 2007), propõe-se que os picos 1, 2 e 4 correspondam respectivamente aos ácidos clorogênicos 5-*O-E*-cafeoil quínico, 3,5-di-*O-E*-cafeoil quínico e 4,5-di-*O-E*-cafeoil quínico.

A identificação dos flavonóides (picos 3, 5, 6 e 7) foi realizada com base em informações de espectros de massas presentes na literatura (MA *et al.*, 1999 e 2001; CUYCKENS & CLAEYS, 2004 e 2005; CARERI *et al.*, 1999; CUYCKENS *et al.*, 2002; CAVALIERE *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008), seus espectros de UV e a ocorrência no gênero *Mikania*.

O pico 3 apresentou, no modo de ionização negativa, íon com  $m/z$  477,1 [M-H]<sup>-</sup> que segundo Tolonen & Uusitalo (2004), corresponde a flavonol contendo 3 hidroxilas livres, uma hidroxila metilada e uma hidroxila substituída por uma hexose (glicose ou galactose). O espectro de fragmentação do íon  $m/z$  477,1 forneceu os íons  $m/z$  315 [M-hexose]<sup>-</sup> e  $m/z$  300 [M-hexose-CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup>. No modo de ionização positiva foi verificado o íon  $m/z$  479,1 [M+H]<sup>+</sup>, cuja fragmentação gerou o íon  $m/z$  317 [M+H-hexose]<sup>+</sup>. O espectro de UV apresentou absorção máxima em 274 e 333 nm, assim sendo, propõe-se que este pico corresponda a um derivado metilado da quercetina, contendo uma *O*-hexose (glicose ou galactose).

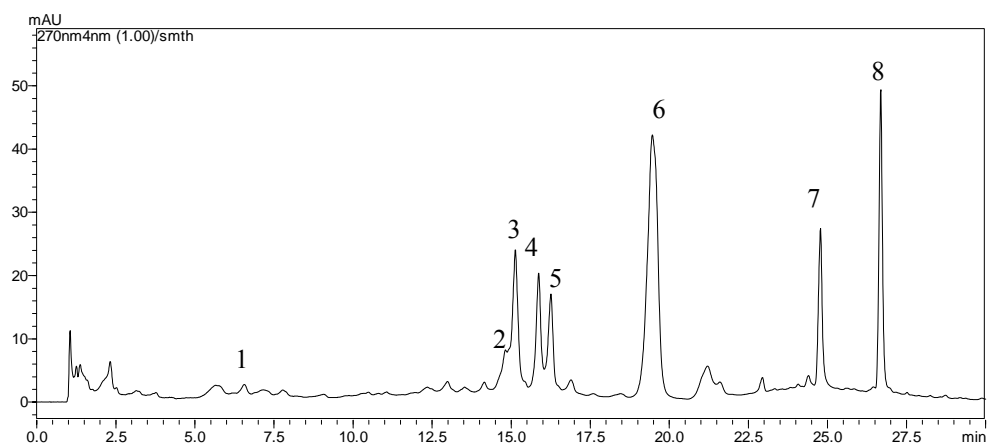
O pico 5 apresentou no modo de ionização negativa, íon com  $m/z$  491,1  $[M-H]^-$ , cuja fragmentação forneceu o íon com  $m/z$  329  $[M\text{-hexose}]^-$ , no modo de ionização positiva apresentou o íon com  $m/z$  493,1  $[M+H]^+$ , cuja fragmentação forneceu o íon com  $m/z$  331  $[M+H\text{-hexose}]^+$ , o espectro de UV apresentou máximos de absorção em 274 (banda II) e 329 (banda I). Considerando os dados de UV, de EM e EM/EM obtidos, propõe-se que o pico 5 corresponda a um derivado dimetilado da quercetina com uma hidroxila substituída por uma hexose.

O pico 6 no modo de ionização negativa apresentou o íon com  $m/z$  329,1  $[M-H]^-$ , cuja fragmentação forneceu os íons  $m/z$  314  $[M - CH_3]^-$  e  $m/z$  299  $[M - 2 CH_3]^-$ , no modo de ionização positiva apresentou o íon  $m/z$  331,1  $[M+H]^+$ , cuja fragmentação forneceu o íon com  $m/z$  298  $[M+H-H_2O-CH_3]^+$ , o espectro de UV apresentou máximo de absorção em 272 (banda II) e 343 (banda I). Assim sendo, considerando os dados de UV, de EM e EM/EM obtidos, propõe-se que o pico 3 corresponda a um derivado dimetilado da quercetina.

O pico 7 no modo de ionização negativa apresentou íon com  $m/z$  313,1  $[M - H]^-$ , cuja fragmentação forneceu os íons 298  $[M-H-CH_3]^-$  e 283  $[M - H - 2 CH_3]^-$ , no modo de ionização positiva forneceu o íon  $m/z$  315,1  $[M+H]^+$ , cuja fragmentação forneceu o íon 282  $[M+H-H_2O-CH_3]^+$ . O espectro de UV apresentou absorção máxima em 274 (banda II) e 333 (banda I). Considerando os dados de UV, de EM e EM/EM obtidos, propõe-se que o pico 7 corresponda a um derivado dimetilado do caempferol.



As substâncias identificadas nas análises dos extratos de *M. vitifolia*, *M. pilosa* e *M. parodii* foram identificadas segundo a mesma metodologia e referências na literatura adotados na identificação dos constituintes em *M. camporum* e estão representadas nas tabelas 32 a 37.



**Figura 12** - Cromatograma da análise em CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico de *M. vitifolia* (270 nm).

**Tabela 32** – Dados das análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM (modo negativo) em coluna monolítica C-18, do extrato etanólico de *M. vitifolia*.

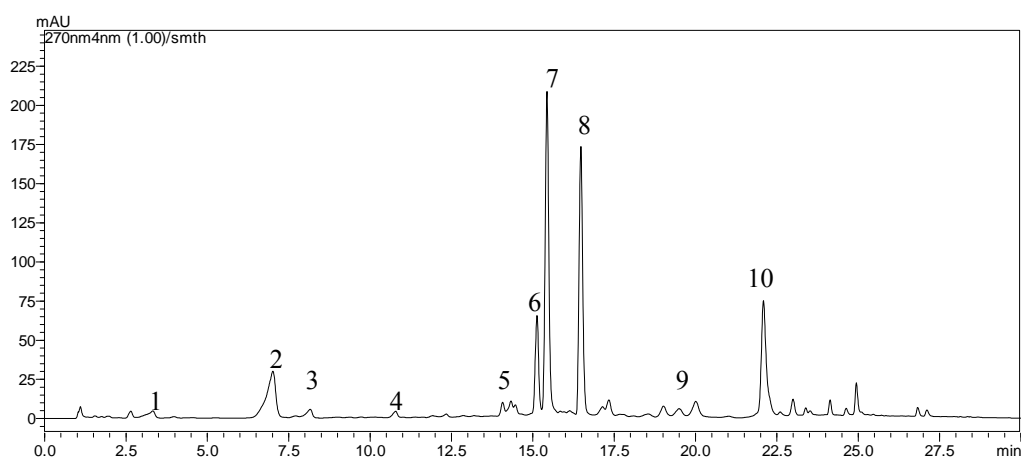
Pico	Tempo de retenção (min)	CLAE-EM (-)	CLAE-EM/EM (-) 15 eV	UV máx. (nm)	Substância / Classe proposta
1	6,516	353,1	353→191	298; 325	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
2	14,794	447,1		264; 329	caempferol- <i>O</i> - hexose
3	15,104	515,1	515→353 pb; 191; 179	300; 327	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
4	15,848	477,1	477→315 pb; 300	273; 333	derivado metilado da quercetina contendo <i>O</i> - hexose
5	16,231	515,1	515→353 pb; 179; 173	299; 326	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
6	19,445	491,1	491→329 pb; 314; 299	274; 330	Derivado dimetilado da quercetina contendo <i>O</i> -hexose
7	24,766	329,1	329→314; 299 pb	272; 343	derivado dimetilado da quercetina
8	26,675	313,1	313→298; 283 pb	274; 333	caempferol dimetilado

pb – pico base

**Tabela 33** – Dados da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM (modo positivo) em coluna monolítica C-18, do extrato etanólico de *M. vitifolia*.

Pico	Tempo de retenção (min)	CLAE-EM (+)	CLAE-EM/EM (+) 15 eV	UV máx. (nm)	Substância / Classe Proposta
1	6,516	355,1	355→163	298; 325	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
2	14,794	449,1	449→287*	264; 329	caempferol- <i>O</i> -hexose
3	15,104	499,1	499→163	300; 327	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
4	15,848	479,1	479→317	273; 333	derivado metilado da quercetina contendo <i>O</i> -hexose
5	16,231	517,1	499→163	299; 326	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
6	19,445	493,1	493→331 pb; 298	274; 330	derivado dimetilado da quercetina contendo <i>O</i> -hexose
7	24,766	331,1	331→301	272; 343	derivado dimetilado da quercetina
8	26,675	315,1	315→300; 282 pb	274; 333	derivado dimetilado do caempferol

pb- pico base      \* $m/z$  449 [M+H]<sup>+</sup>;  $m/z$  287 [M+H-hexose]<sup>+</sup>



**Figura 13** – Cromatograma da análise em CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico de *M. pilosa* (270 nm).

**Tabela 34** – Dados da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM (modo negativo) do extrato etanólico de *M. pilosa* em coluna C-18 monolítica.

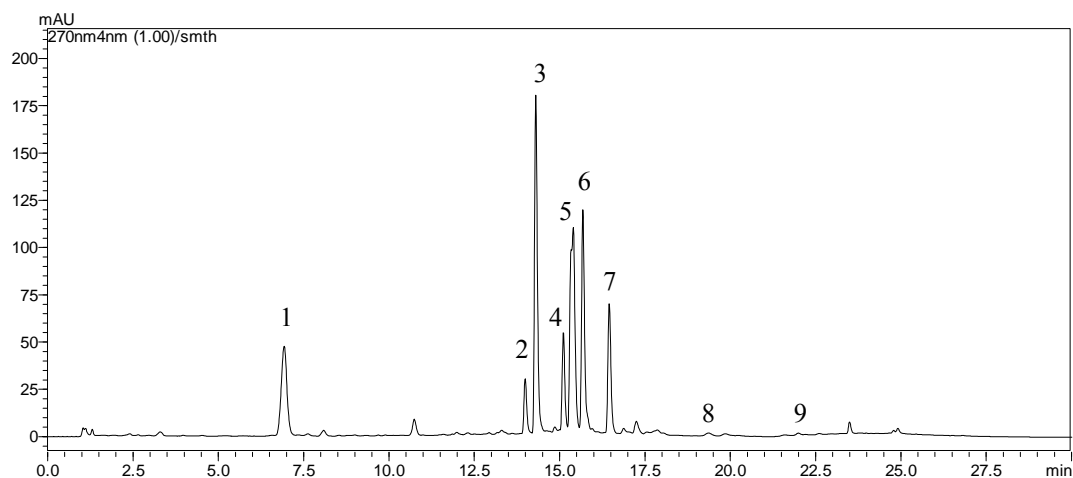
Pico	Tempo de retenção (min)	CLAE-EM (-)	CLAE-EM/EM (-) 15 eV	UV máx. (nm)	Substância / Classe proposta
1	3,319	191,1		299; 324	ácido quínico
2	6,994	353,1	353→191	300; 325	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
3	8,159	353,1	353→191 pb; 173 (50 % pb)	299; 325	ácido 3- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
4	10,797	367,1	367→191	299; 325	ácido 5- <i>O-E</i> -feruloilquínico
5	14,071	463,1	463→301	254; 342	quercetina- <i>O</i> -hexose
6	15,131	515,1	515→353 pb; 335 (20 % pb); 173	299; 324	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
7	15,437	515,1	515→353 pb; 191	300; 325	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
8	16,475	515,1	515→353 pb; 173	299; 325	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
9	19,497	529,1	529→367 pb; 173	299; 324	ácido 3- <i>O-E</i> -feruloil-5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
10	22,082	315,1	315→300	265; 327	derivado metilado da quercetina

pb- pico base

**Tabela 35** – Dados da análise em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM (modo positivo) do extrato etanólico de *M. pilosa* em coluna C-18 monolítica.

Pico	Tempo de retenção (min)	CLAE-EM (+)	CLAE-EM/EM (+) 15 eV	UV máx. (nm)	Substância / Classe proposta
2	6,994	355,1	355→163	300; 325	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
3	8,159	355,1	355→163	299; 325	ácido 3- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
4	10,797	369,1	369→163	299; 325	ácido 5- <i>O-E</i> -feruloilquínico
5	14,071	465,1	465→303	254; 342	quercetina- <i>O</i> -hexose
6	15,131	499,1	499→319 pb; 163	299; 324	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
7	15,437	499,1	499→319 pb; 163	300; 325	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
8	16,475	499,1	499→319 pb; 163	299; 325	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
9	19,497	513,1		299; 324	ácido 3- <i>O-E</i> -feruloil-5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
10	22,082	317,1	317→302	265; 327	derivado metilado da quercetina

pb- pico base



**Figura 14** - Cromatograma da análise em CLAE-DAD-EM/EM do extrato etanólico de *M. parodii* (270 nm).

**Tabela 36** – Dados das análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM (modo negativo) do extrato etanólico de *M. parodii* em coluna C-18 monolítica.

Pico	Tempo de retenção (min)	CLAE-EM (-)	CLAE-EM/EM (-) 15 eV	UV máx. (nm)	Substância / Classe proposta
1	6,923	353,1	353→191	299; 325	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
2	13,985	609,2	609→301	254; 349	rutina
3	14,294	463,1	463→301	255; 352	quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo
4	15,102	515,1	515→353 pb; 335 (20 % pb); 173	300; 325	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
5	15,395	515,1	515→353; 191	299; 324	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
6	15,674	447,1		264; 342	caempferol-3- <i>O</i> -glicosídeo
7	16,447	515,1	515→353 pb; 173	299; 325	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
8	19,354	529,1	529→367 pb; 191	300; 324	ácido 3- <i>O-E</i> -feruloil-5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
9	21,990	315,1	315→300	264; 326	derivado metilado da quercetina

pb- pico base

**Tabela 37** – Dados das análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM (modo positivo) do extrato etanólico de *M. parodii* em coluna C-18 monolítica.

Pico	Tempo de retenção (min)	CLAE-EM (+)	CLAE-EM/EM (+) 15 eV	UV máx. (nm)	Substância / Classe proposta
1	6,923	355,1	355→163	299; 325	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
2	13,985	611,1		254; 349	rutina
3	14,294	465,1	465→303	255; 352	quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo
4	15,102	499,1	499→319 pb; 163	300; 325	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
5	15,395	499,1	499→319 pb; 163	299; 324	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
6	15,674	449,1		264; 342	caempferol-3- <i>O</i> -glicosídeo
7	16,447	499,1	499→319 pb; 163	299; 325	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
8	19,354	513,1	513→319 pb; 163	300; 324	ácido 3- <i>O-E</i> -feruloil-5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
9	21,990	317,1	317→302	264; 326	derivado metilado da quercetina

pb- pico base

**4.11 – Análise em cromatografia em fase gasosa com microextração em fase sólida (SPME) por *headspace* (HS) das partes aéreas pulverizadas dos exemplares de *M. pilosa* Baker coletados em Costa Rica – MS e Alcinópolis - MS e dos extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa*.**

Os resultados obtidos a partir da extração em HS-SPME (*headspace* - microextração em fase sólida) com fibra de polidimetilsiloxano e posterior análise CG-EM das partes aéreas dos exemplares de *Mikania pilosa* coletados em Costa Rica – MS e Alcinópolis, assim como dos extratos etanólicos brutos de *Mikania parodii* e *Mikania pilosa* coletada em Costa Rica, conforme as condições descritas no item 3.1, estão representados nas Tabelas 38 a 42.

**Tabela 38** - Substâncias identificadas na análise em cromatografia em fase gasosa com microextração em fase sólida (SPME) por *headspace* (HS) das partes aéreas pulverizadas dos exemplares de *M. pilosa* Baker coletados em Costa Rica – MS.

Pico	TR	%Área	IK	IK literatura	Substância	Classe química
1	5,200	0,16	933	939	$\alpha$ -pineno	monoterpeno*
2	7,783	0,16	1024	-----	carvomenteno	monoterpeno*
3	7,942	0,74	1029	1031	limoneno	monoterpeno*
4	13,767	0,11	1180	1177	4-terpineol	monoterpeno**
5	14,883	0,11	1206	1204	decanal	aldeído
6	15,417	0,18	1219	1217	<i>E</i> -carveol	monoterpeno**
7	16,433	0,31	1242	1242	carvona	monoterpeno**
8	20,792	0,51	1345	1351	$\alpha$ -cubebeno	sesquiterpeno*
9	21,683	0,55	1366	1372	$\alpha$ -ylangeno	sesquiterpeno*
10	22,000	2,54	1372	1376	$\alpha$ -copaeno	sesquiterpeno*
11	22,317	0,20	1380	1384	$\beta$ -bourboneno	sesquiterpeno*
12	22,592	0,85	1387	1391	$\beta$ -elemeno	sesquiterpeno*
13	22,967	0,12	1395	1409	decanoato de etila	éster
14	23,792	2,19	1415	1418	$\beta$ -cariofileno	sesquiterpeno*
15	24,225	0,83	1427	1432	$\beta$ -gurjuneno	sesquiterpeno*
16	24,450	0,14	1431	1439	$\alpha$ -guaiano	sesquiterpeno*
17	24,550	0,50	1434	1439	aromadendreno	sesquiterpeno*
18	25,092	1,66	1447	1453	<i>Z</i> -geranil acetona	cetona
19	25,267	0,55	1451	1454	$\alpha$ -humuleno	sesquiterpeno*
20	25,433	1,46	1456	1461	<i>allo</i> -aromadendreno	sesquiterpeno*
21	26,000	1,00	1469	1475	$\beta$ -chamigreno	sesquiterpeno*
22	26,108	2,00	1471	-----	$\alpha$ -amorfenno	sesquiterpeno*
23	26,292	0,77	1476	1480	germacreno-D	sesquiterpeno*
24	26,392	0,90	1478	1473	$\gamma$ -gurjuneno	sesquiterpeno*
25	26,667	6,01	1485	1485	$\beta$ -selineno	sesquiterpeno*



Tabela 38 - Continuação

Pico	TR	%Área	IK	IK literatura	Substância	Classe química
26	26,792	0,88	1488	1491	valenceno	sesquiterpeno*
27	26,933	1,19	1491	1494	$\alpha$ -selineno	sesquiterpeno*
28	27,075	0,82	1495	1499	$\alpha$ -muuroleno	sesquiterpeno*
29	27,225	1,90	1499	1493	viridifloreno	sesquiterpeno*
30	27,508	1,39	1505	1509	$\beta$ -bisaboleno	sesquiterpeno*
31	27,625	0,80	1507	1513	$\gamma$ -cadineno	sesquiterpeno*
32	27,917	11,23	1517	1524	$\delta$ -cadineno	sesquiterpeno*
33	28,000	0,23	1518	1521	Z-calameneno	sesquiterpeno*
34	28,733	1,56	1530	1542	$\alpha$ -calacoreno	sesquiterpeno*
35	29,742	0,74	1550	-----	1,5-epoxisalvial-4(14)-eno	sesquiterpeno**
36	30,300	31,43	1563	1576	espatulenol	sesquiterpeno**
37	30,383	4,20	1564	1565	ledol	sesquiterpeno**
38	30,742	1,21	1581	-----	salvial-4(14)-en-1-ona	sesquiterpeno**
39	31,375	2,28	1604	1606	epóxido de humuleno	sesquiterpeno**
40	32,367	0,56	1631	1640	<i>epi</i> - $\alpha$ -cadinol	sesquiterpeno**
41	32,458	0,69	1632	-----	cariofila-4(12),8(13)-dien-5- $\beta$ -ol	sesquiterpeno**
42	32,717	0,43	1640	1641	<i>epi</i> - $\alpha$ -muurolol	sesquiterpeno**
43	33,767	1,37	1668	1674	cadaleno	sesquiterpeno*
44	34,308	0,65	1682	1683	$\alpha$ -bisabolol	sesquiterpeno**
45	34,967	0,28	1700	1700	heptadecano	
46	39,908	0,99	1840	-----	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	cetona
47	42,158	0,12	1906	-----	farnesil acetona	cetona
48	42,758	0,26	1925	-----	palmitato de metila	éster

TR: tempo de retenção IK: índice de retenção de Kovats \*hidrocarboneto \*\*oxigenado

Tabela 39 - Substâncias identificadas na análise em cromatografia em fase gasosa com microextração em fase sólida (SPME) por *headspace* (HS) das partes aéreas pulverizadas dos exemplares de *M. pilosa* Baker coletados em Alcínópolis – MS.

Pico	TR	%Área	IK	IK literatura	Substância	Classe química
1	5,128	0,781	933	939	$\alpha$ -pineno	monoterpeno*
2	6,130	0,223	971	976	sabineno	monoterpeno*
3	6,569	0,480	988	991	mirceno	monoterpeno*
4	7,827	9,261	1027	1031	limoneno	monoterpeno*
5	10,341	0,272	1097	1098	linalool	monoterpeno**
6	10,533	0,094	1102	1098	nonanal	aldeído
7	11,401	0,089	1124	1133	Tujanol	monoterpeno**
8	11,608	0,217	1129	1134	óxido de <i>cis</i> -limoneno	monoterpeno**
9	11,786	0,345	1133	1139	óxido de <i>trans</i> -limoneno	monoterpeno**
10	12,141	0,086	1142	1144	verbenol	monoterpeno**
11	12,811	0,053	1159	1162	pinocarvona	monoterpeno**
12	13,718	0,076	1182	1179	naftaleno	hidrocarboneto aromático
13	15,216	0,289	1217	1217	<i>trans</i> -carveol	monoterpeno**
14	15,783	0,069	1230	1229	<i>cis</i> -carveol	monoterpeno**
15	16,254	0,505	1241	1242	carvona	monoterpeno**
16	20,092	0,843	1329	1339	$\delta$ -elemeno	sesquiterpeno*
17	20,576	0,284	1341	1351	$\alpha$ -cubebeno	sesquiterpeno*
18	21,437	0,716	1361	1372	$\alpha$ -ylangeno	sesquiterpeno*

Tabela 39 - Continuação

Pico	TR	%Área	IK	IK literatura	Substância	Classe química
19	21,792	3,731	1370	1376	$\alpha$ -copaeno	sesquiterpeno*
20	22,083	1,080	1376	1384	$\beta$ -bourboneno	sesquiterpeno*
21	22,395	3,521	1383	1391	$\beta$ -elemeno	sesquiterpeno*
22	22,567	0,182	1387	1391	$\beta$ -cubebeno	sesquiterpeno*
23	23,579	6,404	1417	1418	$\beta$ -cariofileno	sesquiterpeno*
24	24,341	0,290	1430	1439	aromadendreno	sesquiterpeno*
25	25,042	0,797	1448	1454	$\alpha$ -humuleno	sesquiterpeno*
26	25,210	0,912	1452	1461	allo-aromadendreno	sesquiterpeno*
27	25,992	1,604	1471	-----	$\alpha$ -amorfenol	sesquiterpeno*
28	26,258	22,372	1477	1480	germacreno-D	sesquiterpeno*
29	26,434	0,571	1482	1485	$\beta$ -selineno	sesquiterpeno*
30	26,741	5,292	1489	1494	biciclogermacreno	sesquiterpeno*
31	27,402	0,895	1506	1513	$\gamma$ -cadineno	sesquiterpeno*
32	27,701	6,702	1513	1524	$\delta$ -cadineno	sesquiterpeno*
33	27,785	0,107	1516	1521	Z-calameneno	sesquiterpeno*
34	28,492	0,233	1533	1542	$\alpha$ -calacoreno	sesquiterpeno*
35	29,108	0,257	1549	1556	germacreno-B	sesquiterpeno*
36	29,299	0,157	1554	1563	$\beta$ -calacoreno	sesquiterpeno*
37	29,426	0,124	1557	1564	E-nerolidol	sesquiterpeno**
38	29,950	5,281	1570	1576	Espatulenol	sesquiterpeno**
39	30,074	1,608	1574	1581	óxido de cariofileno	sesquiterpeno**
40	30,467	0,423	1584	-----	salvial-4(14)-en-1-ona	sesquiterpeno**
41	31,107	0,345	1600	1606	epóxido de humuleno	sesquiterpeno**
42	35,259	0,154	1711	-----	hexadecanal (aldeído palmítico)	aldeído
43	39,677	0,037	1844	-----	2-pentadecanona,6,10,14-trimetil	cetona
44	44,765	0,014	1990	-----	palmitato de etila	éster

TR: tempo de retenção IK: índice de retenção de Kovats \*hidrocarboneto \*\*oxigenado

Tabela 40 - Substâncias identificadas na análise em cromatografia em fase gasosa com microextração em fase sólida (SPME) por *headspace* (HS) do extrato etanólico bruto de *M. pilosa* coletada em Costa Rica – MS.

Pico	TR	%Área	IK	IK literatura	Substância	Classe química
1	7,783	0,11	1024	-----	carvomenteno	monoterpeno*
2	7,971	0,52	1029	1031	limoneno	monoterpeno*
3	13,772	1,52	1180	1177	4-terpineol	monoterpeno**
4	15,426	0,48	1206	1217	E-carveol	monoterpeno**
5	16,458	0,48	1242	1242	carvona	monoterpeno**
6	21,706	0,67	1366	1372	$\alpha$ -ylangeno	sesquiterpeno*
7	22,012	1,77	1372	1376	$\alpha$ -copaeno	sesquiterpeno*
8	22,319	0,28	1380	1384	$\beta$ -bourboneno	sesquiterpeno*
9	22,608	0,52	1387	1391	$\beta$ -elemeno	sesquiterpeno*
10	22,980	0,16	1395	1409	decanoato de etila	éster
11	23,808	1,31	1415	1418	$\beta$ -cariofileno	sesquiterpeno*
12	24,225	0,43	1427	1432	$\beta$ -gurjuneno	sesquiterpeno*
13	24,467	0,05	1431	1439	$\alpha$ -guaieno	sesquiterpeno*
14	24,568	0,51	1434	1439	aromadendreno	sesquiterpeno*
15	25,115	1,47	1447	1453	Z-geranil acetona	cetona
16	25,288	0,46	1451	1454	$\alpha$ -humuleno	sesquiterpeno*
17	25,458	1,37	1456	1461	alloaromadendreno	sesquiterpeno*
18	26,127	1,27	1471	-----	$\alpha$ -amorfenol	sesquiterpeno*

Tabela 40 - Continuação

Pico	TR	%Área	IK	IK literatura	Substância	Classe química
19	26,711	5,61	1485	1485	$\beta$ -selineno	sesquiterpeno*
20	26,819	0,70	1488	1491	valenceno	sesquiterpeno*
21	26,957	0,79	1491	1494	$\alpha$ -selineno	sesquiterpeno*
22	27,102	0,95	1495	1499	$\alpha$ -muuroleno	sesquiterpeno*
23	27,253	1,50	1499	1493	viridifloreno	sesquiterpeno*
24	27,529	0,87	1505	1509	$\beta$ -bisaboleno	sesquiterpeno*
25	27,653	0,70	1507	1513	$\gamma$ -cadineno	sesquiterpeno*
26	27,949	7,00	1517	1524	$\delta$ -cadineno	sesquiterpeno*
27	28,039	0,35	1518	1521	Z-calameneno	sesquiterpeno*
28	28,806	4,11	1530	1542	$\alpha$ -calacoreno	sesquiterpeno*
29	29,768	0,75	1550	-----	1,5-epoxisalvial-4(14)-eno	sesquiterpeno**
30	30,277	14,29	1563	1576	espatulenol	sesquiterpeno**
31	30,392	0,66	1564	1565	ledol	sesquiterpeno**
32	30,767	0,45	1587	-----	salvial-4(14)en-1-ona	sesquiterpeno**
33	31,377	0,40	1604	1606	epóxido de humuleno	sesquiterpeno**
34	32,747	0,39	1640	1641	epi- $\alpha$ -muurolol	sesquiterpeno**
35	33,808	2,02	1668	1674	cadaleno	sesquiterpeno*
36	34,332	0,26	1682	1683	$\alpha$ -bisabolol	sesquiterpeno**
37	34,997	0,14	1700	1700	heptadecano	hidrocarboneto
38	39,938	0,26	1840	-----	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	cetona
39	42,790	0,44	1925	-----	palmitato de metila	éster
40	45,017	0,90	1993	-----	palmitato de etila	éster

TR: tempo de retenção IK: índice de retenção de Kovats \*hidrocarboneto \*\*oxigenado

Tabela 41 - Substâncias identificadas na análise em cromatografia em fase gasosa com microextração em fase sólida (SPME) por *headspace* (HS) do extrato etanólico bruto de *M. parodii* coletada em Aquidauana – MS.

Pico	TR	%Área	IK	IK literatura	Substância	Classe química
1	6,300	0,13	975	976	sabineno	monoterpeno*
2	7,775	0,04	1024	-----	carvomenteno	monoterpeno*
3	7,974	0,19	1031	1031	limoneno	monoterpeno*
4	13,711	0,12	1178	1173	mentol	monoterpeno**
5	14,900	0,04	1207	1204	decanal	aldeído
6	18,399	0,22	1288	1285	safrol	monoterpeno**
7	20,828	0,19	1345	1351	$\alpha$ -cubebeno	sesquiterpeno*
8	21,994	0,23	1370	1376	$\alpha$ -copaeno	sesquiterpeno*
9	22,163	0,23	1376	1380	$\beta$ -damascenona	isoprenóide
10	23,283	0,26	1403	1409	$\alpha$ -gurjuneno	sesquiterpeno*
11	23,791	0,48	1415	1418	$\beta$ -cariofileno	sesquiterpeno*
12	24,185	0,19	1430	1436	$\alpha$ -bergamoteno	sesquiterpeno*
13	25,291	0,78	1451	1458	<i>trans</i> - $\beta$ -farneseno	sesquiterpeno*
14	25,437	0,30	1455	1452	<i>allo</i> -aromadendreno	sesquiterpeno*
15	26,643	0,93	1484	1485	$\beta$ -selineno	sesquiterpeno*
16	26,931	0,73	1491	1494	$\alpha$ -selineno	sesquiterpeno*
17	27,078	0,79	1494	1499	$\alpha$ -muuroleno	sesquiterpeno*
18	27,510	0,90	1505	1509	$\beta$ -bisaboleno	sesquiterpeno*
19	27,638	0,46	1508	1513	$\gamma$ -cadineno	sesquiterpeno*
20	27,897	4,54	1515	1524	$\delta$ -cadineno	sesquiterpeno*
21	28,016	1,16	1518	1521	Z-calameneno	sesquiterpeno*
22	28,748	1,44	1537	1542	$\alpha$ -calacoreno	sesquiterpeno*
23	29,664	2,84	1560	1564	<i>E</i> -nerolidol	sesquiterpeno**

Tabela 41- Continuação

Pico	TR	%Área	IK	IK literatura	Substância	Classe química
24	30,134	1,98	1572	1576	espatulenol	sesquiterpeno**
25	30,321	0,50	1577	1581	óxido de cariofileno	sesquiterpeno**
26	30,729	0,89	1587	-----	salvial-4(14)-en-1-ona	sesquiterpeno**
27	33,173	1,84	1651	1653	$\alpha$ -cadinol	sesquiterpeno**
28	35,001	0,48	1700	1700	heptadecano	hidrocarboneto
29	38,327	0,55	1793	-----	pentadecanoato de etila	éster
30	42,185	0,24	1906	-----	farnesil acetona	cetona
31	42,804	2,22	1925	-----	palmitato de metila	éster
32	45,041	4,58	1994	-----	palmitato de etila	éster

TR: tempo de retenção IK: índice de retenção de Kovats \*hidrocarboneto \*\*oxigenado

A determinação do índice de retenção de Kovats (IK) e a comparação dos espectros de massas dos picos cromatográficos com bibliotecas de espectros permitiu a identificação de 48 substâncias, na análise das partes aéreas de *Mikania pilosa* coletada em Costa Rica - MS sendo as substâncias majoritárias representadas por espatulenol (31,43 %),  $\delta$ -cadineno (11,23 %),  $\beta$ -selineno (6,01 %) e ledol (4,20 %), sendo que o espatulenol e o palmitato de metila, já haviam sido identificados nas análises em CG-EM de subfrações oriundas da fração hexânica obtida a partir do extrato etanólico desta planta. Seguindo o mesmo procedimento foram identificadas 44 substâncias a partir da análise das partes aéreas da mesma espécie coletada em Alcinópolis – MS, sendo as substâncias majoritárias representadas por germacreno-D (22,37 %),  $\delta$ -cadineno (6,70 %),  $\beta$ -cariofileno (6,40 %), biciclogermacreno (5,29 %) e espatulenol (5,28 %).

A partir da análise do extrato etanólico bruto de *M. pilosa* coletada em Costa Rica - MS foram identificadas 40 substâncias, sendo 39 também identificadas na análise das partes aéreas e o palmitato de etila o qual já havia sido identificado na análise em CG-EM de subfrações oriundas da fração hexânica, obtida a partir deste mesmo extrato. Os principais constituintes identificados foram: espatulenol (14,29%),  $\beta$ -selineno (5,61%),  $\delta$ -cadineno (7,00%),  $\alpha$ -calacoreno (4,11%) e cadaleno (2,02%). Seguindo o mesmo procedimento foram identificadas 32 substâncias no

extrato etanólico bruto de *Mikania parodii*, sendo os principais constituintes identificados: palmitato de etila (4,58%),  $\delta$ -cadineno (4,54%), *E*-nerolidol (2,84%); palmitato de metila (2,22%); espatulenol (1,98%) e  $\alpha$ -cadinol (1,84%).

A Tabela 42 apresenta o percentual de substâncias e classes químicas identificadas nas análises acima descritas.

**Tabela 42** – Porcentagem de classes químicas identificadas nas análises em HS-SPME e CG-EM das espécies *M. pilosa* e *M. parodii*.

AMOSTRAS	Partes aéreas de	Partes aéreas de	Extrato Bruto de	Extrato Bruto de	
	<i>M. pilosa</i> coletada em Costa Rica -MS	<i>M. pilosa</i> coletada em Alcinópolis -MS	<i>M. pilosa</i> coletada em Costa Rica -MS	<i>M. parodii</i> coletada em Aquidauana -MS	
CLASSES QUÍMICAS IDENTIFICADAS (%)	M	1,06	10,74	0,63	0,36
	MO	0,60	1,94	2,48	0,34
	S	41,00	56,88	33,24	13,38
	SO	43,84	7,78	17,2	8,05
	O	3,26	0,37	3,23	8,11
	TOTAL	89,76	77,71	56,78	29,88

M – monoterpenos MO – monoterpenos oxigenados S – sesquiterpenos  
SO – sesquiterpenos oxigenados O – outras classes

Analisando-se os dados constantes da tabela 34, dentro das substâncias identificadas, têm-se que a amostra de *Mikania pilosa* coletada em Costa Rica apresentou como classes majoritárias sesquiterpenos oxigenados (43,84 %) e

sesquiterpenos não oxigenados (41,00 %), apresentando um perfil diferente da amostra coletada em Alcinópolis-MS que apresentou como classes majoritárias sesquiterpenos não oxigenados (56,88%) e monoterpenos não oxigenados (10,74 %). Apesar da secagem e estabilização das partes aéreas a 40 °C, foi possível a identificação de monoterpenos, mesmo nos extratos etanólicos que foram concentrados em evaporador rotativo também a 40 °C.

Infelizmente não foi possível a obtenção de amostras do material vegetal fresco, o que permitiria a identificação de uma quantidade maior de substâncias, principalmente monoterpenos. Contudo a microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) e posterior análise em CG-EM permitiu a identificação, sem a necessidade de procedimentos de *clean-up*, de uma quantidade considerável de substâncias químicas principalmente monoterpenos e sesquiterpenos em todas as amostras avaliadas, mesmo em baixas concentrações, o que seria muito mais complexo e dispendioso, ou até mesmo impossível utilizando-se os processos fitoquímicos convencionais de isolamento e identificação de substâncias.

Os cromatogramas das análises estão representados nos Anexos 51 a 54.

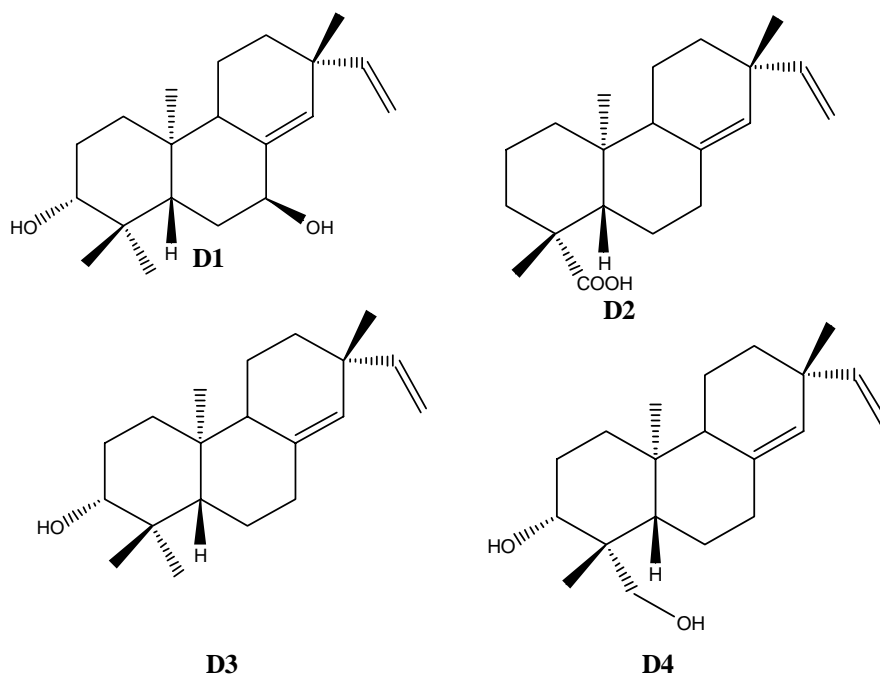
#### 4.12 - Análise das reações envolvidas na fragmentação em fase gasosa através de ionização por *electrospray* e fragmentação através de ionização por elétrons (IE) de diterpenos.

Os dados obtidos a partir das análises dos diterpenos D1, D2, D3 e D4 em IES-EM, nos modos positivo e negativo estão representados na Tabela 43 e os espectros de D1, D2 e D4 nos Anexos 55, 56 e 57. A estrutura química dos diterpenos está representada na Figura 15.

**Tabela 43** – Ionização em *electrospray* dos diterpenos D1, D2, D3 e D4, nos modos negativo e positivo.

Substância	Ionização modo negativo (m/z)	Ionização modo positivo (m/z)
D1	303,2* [M – H] <sup>-</sup>	327,2 [M + Na] <sup>+</sup>
D2	301,2 [M – H] <sup>-</sup>	325,2 [M + Na] <sup>+</sup>
D3	Não ionizou	Não ionizou
D4	303,2 [M – H] <sup>-</sup>	327,2 [M + Na] <sup>+</sup>

\*reduzida ionização



**Figura 15** – Estruturas químicas dos diterpenos D1, D2, D3 e D4.

Conforme os dados da tabela o diterpeno D1 apresentou baixa ionização no modo negativo e boa ionização no modo positivo, onde foi observado o íon da molécula cationizada com sódio, o diterpeno D2 apresentou boa ionização nos dois modos, onde foram observados o íon com  $m/z$  301,2 relativa a molécula desprotonada no modo negativo e o íon com  $m/z$  325,2 correspondente a molécula cationizada com sódio, a boa ionização deste diterpeno deve-se possivelmente a presença da função ácida, que favorece a desprotonação no modo positivo e cationização no modo positivo.

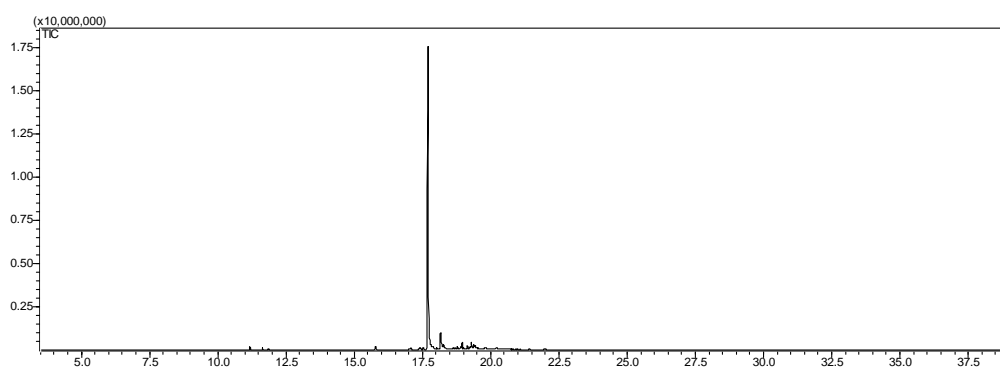
O diterpeno D3 não ionizou em nenhum dos modos, possivelmente devido a ausência de função ácida na molécula e a presença de somente uma hidroxila (ponto de desprotonação e cationização) na molécula.

O diterpeno D4 ionizou nos dois modos, apresentando no modo negativo o íon com  $m/z$  303,2 correspondendo a molécula desprotonada e no modo positivo o íon com  $m/z$  327,2 correspondendo a molécula cationizada com sódio, assim como o diterpeno D1 ele apresenta duas hidroxilas o que poderia justificar a ionização dos dois e a ausência de ionização em D3 que apresenta somente uma hidroxila. No diterpeno D4 as hidroxilas estão mais próximas que em D1, ambas no anel A, aumentando a polaridade da molécula e facilitando a sua ionização.

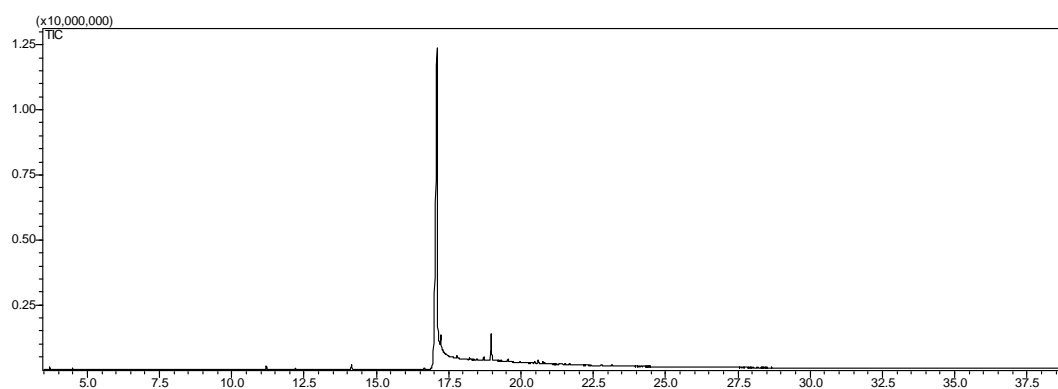
Os quatro diterpenos foram analisados em IES-EM/EM com energias de colisão entre 5 e 40 eV, onde não foi observada a fragmentação de nenhum deles, a ausência de fragmentação em sistema de baixa energia, ocorreu possivelmente devido a ausência de funcionalizações como anéis contendo heteroátomos e metoxilas, nas estruturas avaliadas.



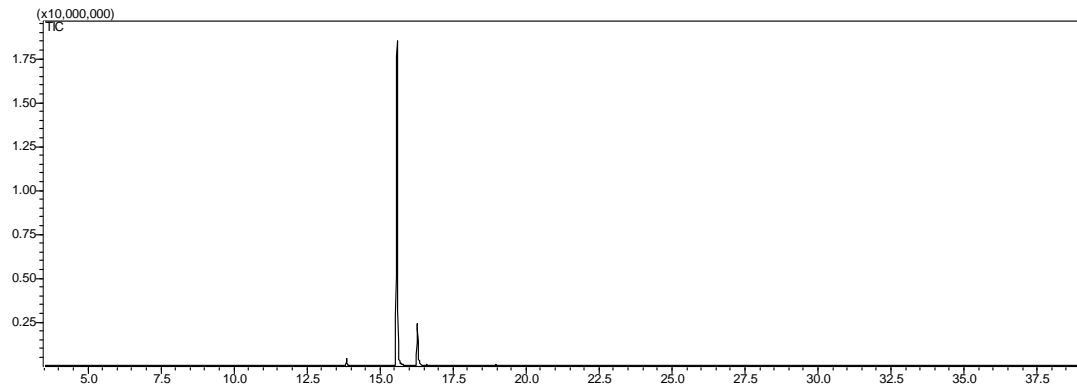
Os quatro diterpenos foram então analisados em CG-EM com ionização por elétrons a 70 eV, sendo também determinados o seus respectivos índices de retenção de Kovats (Tabela 44). Os dados dos índices de retenção obtidos e dos espectros de massas obtidos estão representados nas Tabelas 44 e 45 a proposta de fragmentação está representada nos Esquemas 5, 6, 7 e 8. Os cromatogramas estão representados na Figuras 16 a 19, os espectros se encontram nos Anexos 58 a 61.



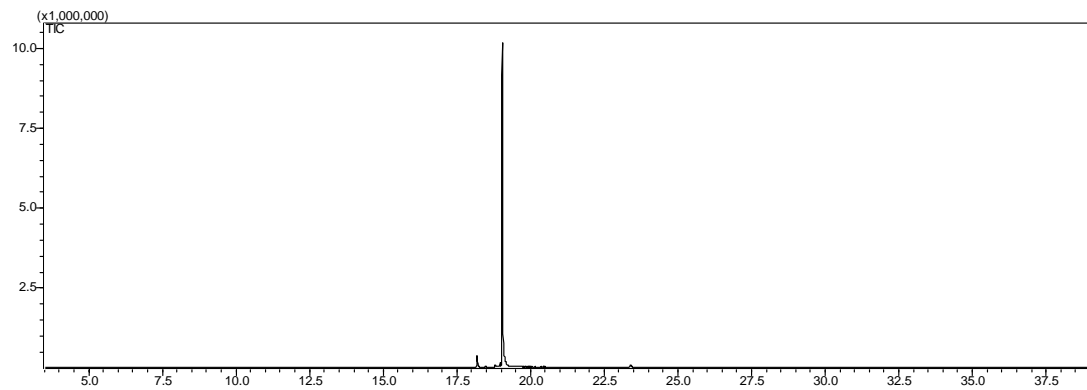
**Figura 16** - Cromatograma CG-EM (IE-70 eV) da substância codificada como D1 (Tr 17,700 min.).



**Figura 17** - Cromatograma CG-EM (IE-70 eV) da substância codificada como D2 (Tr 17,077 min.).



**Figura 18** - Cromatograma CG-EM (IE-70 eV) da substância codificada como D3 (Tr 15,569 min.).



**Figura 19**- Cromatograma CG-EM (IE-70 eV) da substância codificada como D4 (Tr 19,023 min.).

**Tabela 44** – Tempo de retenção e índice de retenção de Kovats obtidos na análise em CG-EM dos diterpenos D1, D2, D3 e D4.

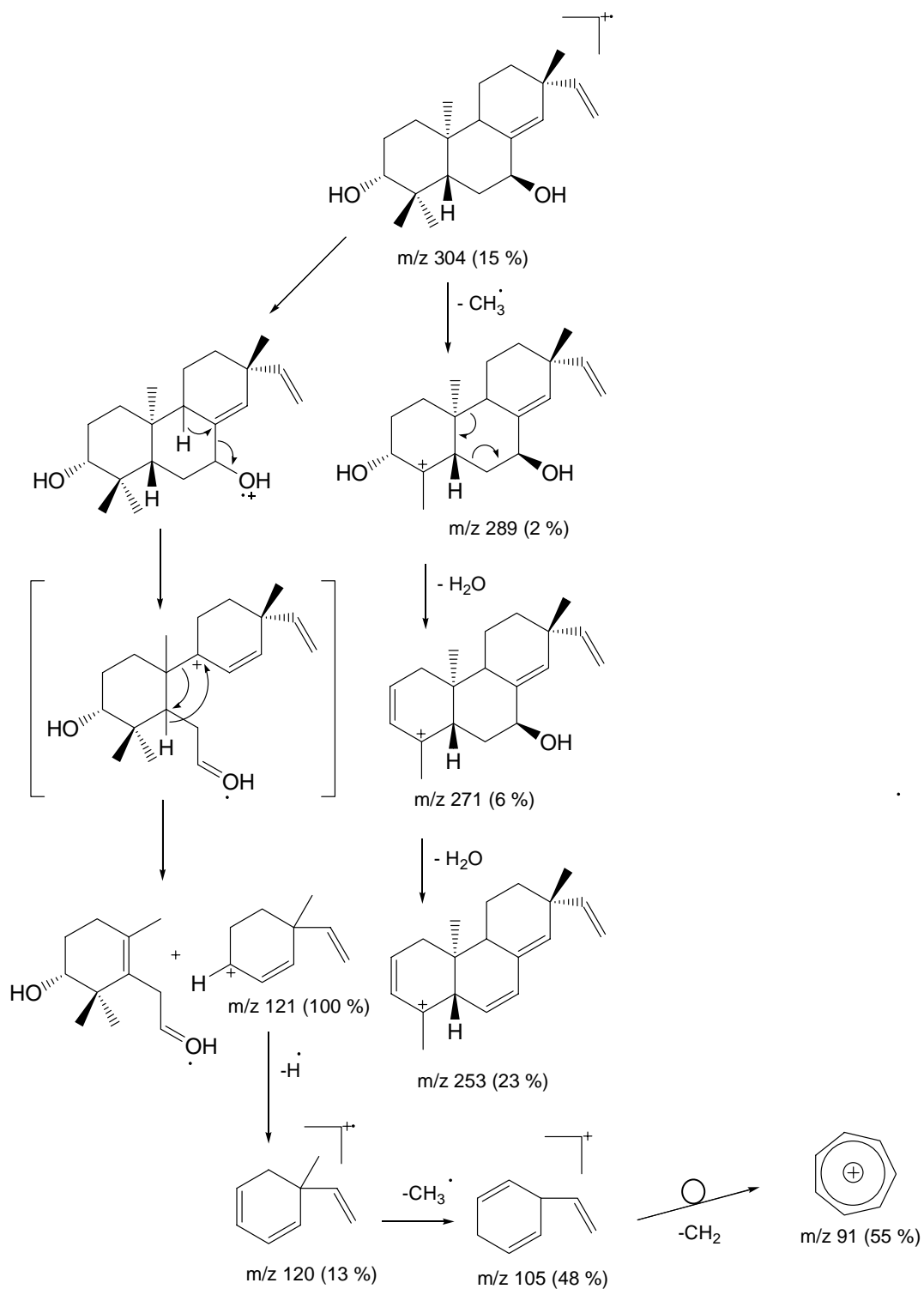
Substância	Tempo de retenção (min.)	Índice de retenção de Kovats
D1	17,700	2281
D2	17,077	2159
D3	15,569	2028
D4	19,023	2460

**Tabela 45** - Dados dos espectros de massas (IE- 70 eV) dos diterpenos codificados como D1 a D4.

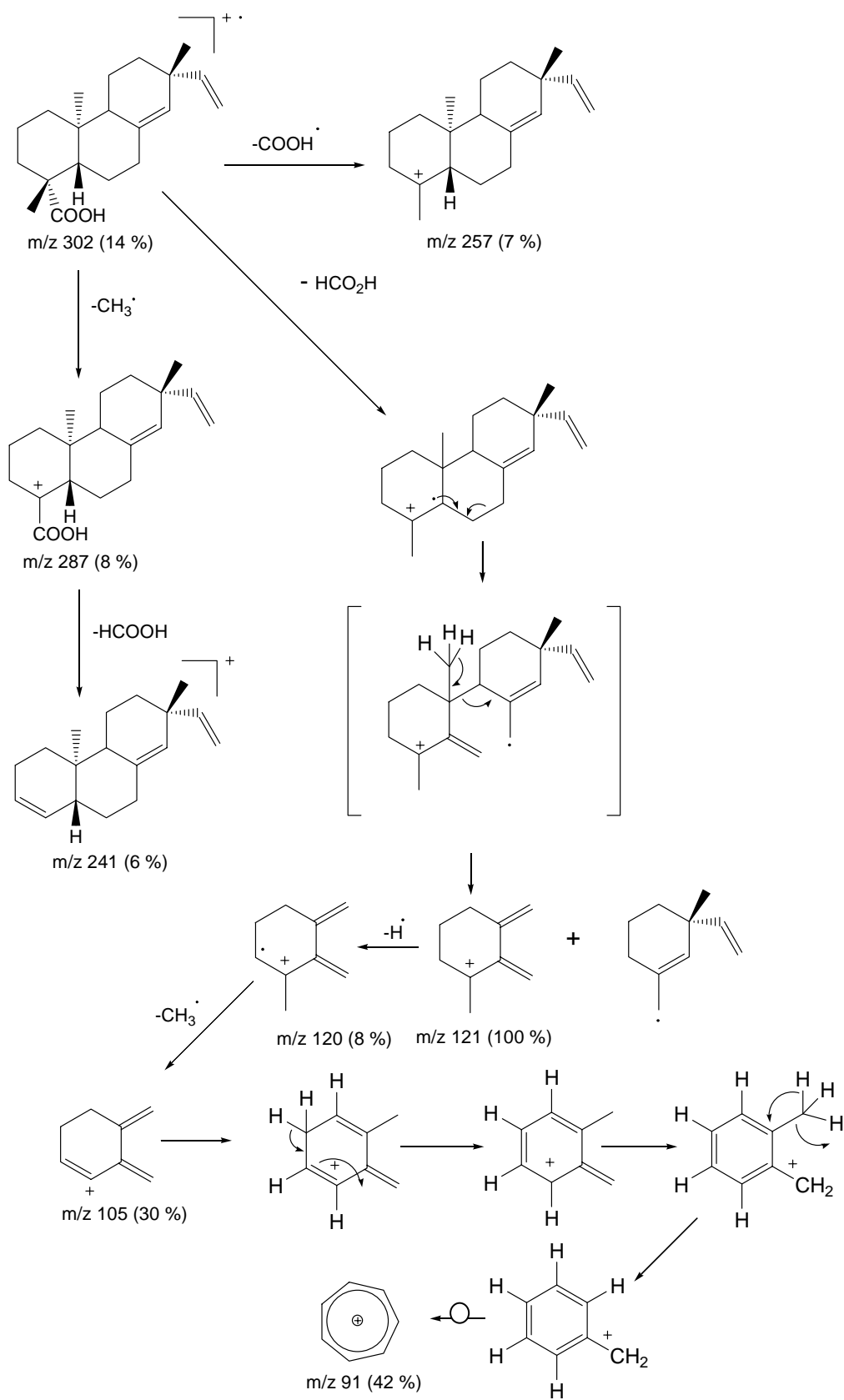
D1	D2	D3	D4
<b>304 (15 %)</b>	<b>302 (14 %)</b>	<b>288 (3 %)</b>	<b>304 (2 %)</b>
289 (2 %)	287 (8 %)	273 (4 %)	286 (10 %)
271 (6 %)	257 (7 %)	270 (7 %)	271 (6 %)
253 (23 %)	241 (6 %)	255 (11 %)	255 (18 %)
<b>121 (100 %)</b>	<b>121 (100 %)</b>	<b>135 (100 %)</b>	<b>121 (100 %)</b>
<b>120 (13 %)</b>	<b>120 (8%)</b>	<b>120 (5 %)</b>	<b>120 (43 %)</b>
<b>105 (48 %)</b>	<b>105 (30 %)</b>	<b>105 (17 %)</b>	<b>105 (68 %)</b>
<b>91 (55 %)</b>	<b>91 (42 %)</b>	<b>91 (24 %)</b>	<b>91 (83 %)</b>

- **íon molecular**
- **pico base**
- **íons comuns a todas as amostras**
- **% em relação ao pico base**

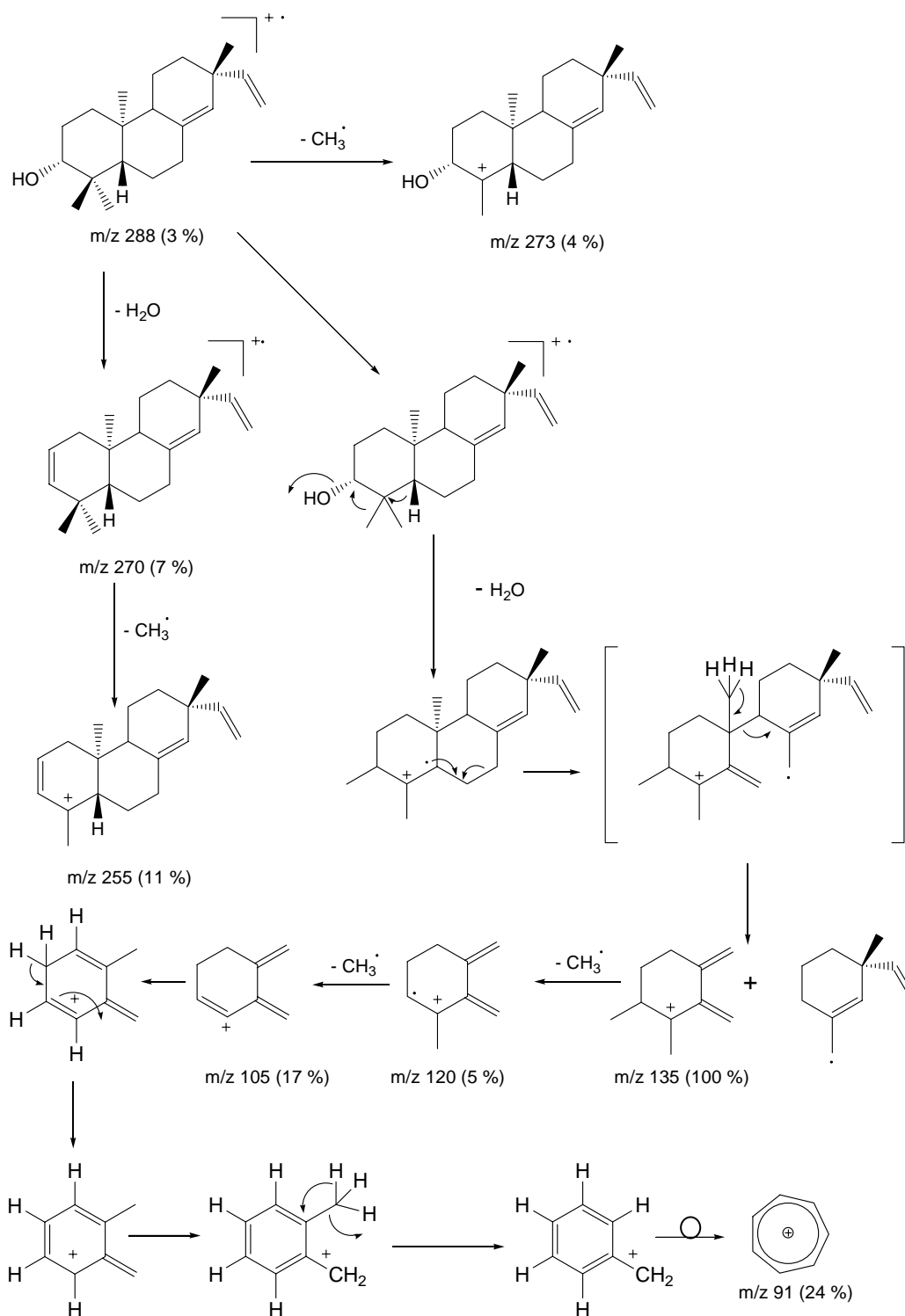
Esquema 5 - Proposta de fragmentação da substância D-1



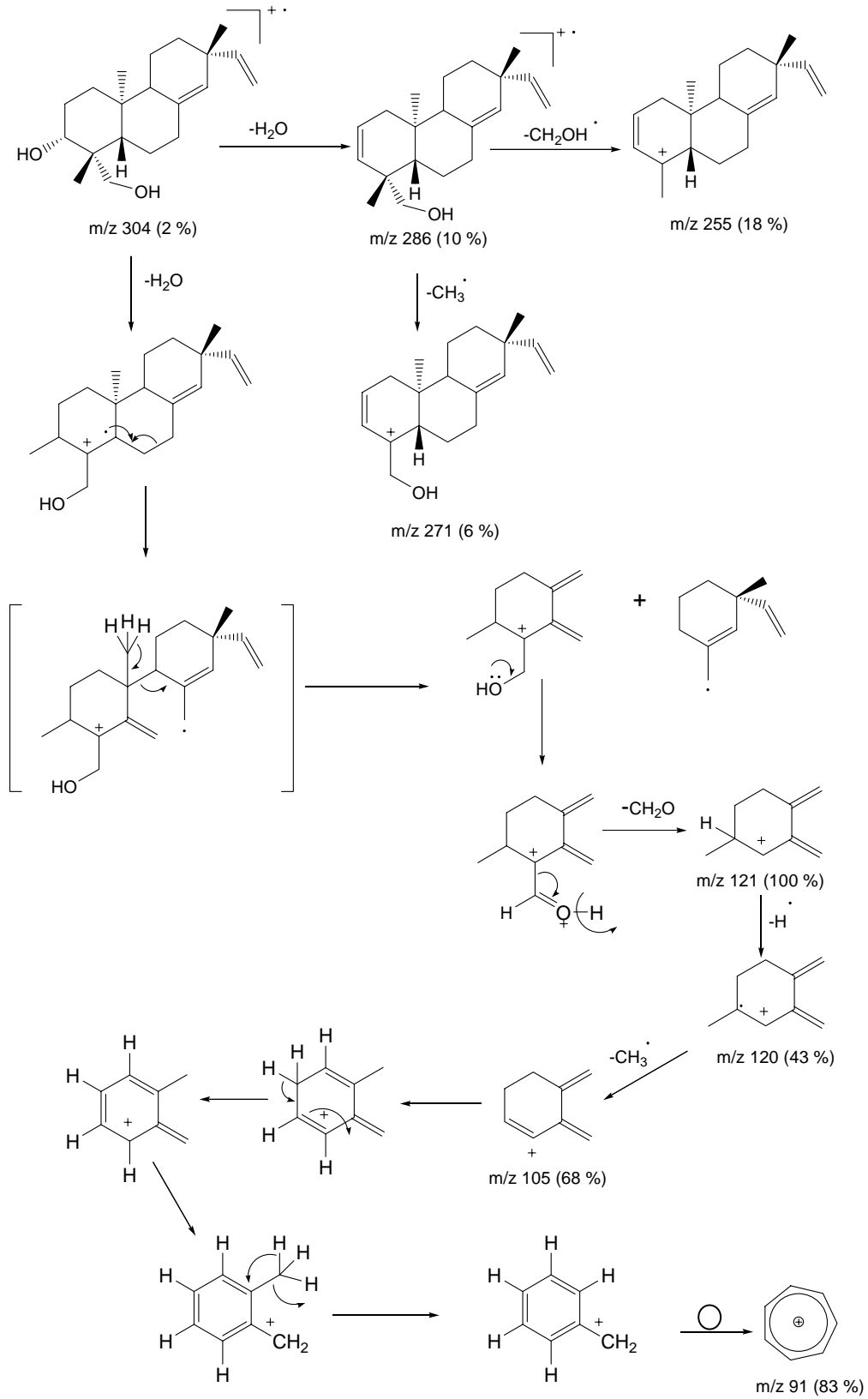
Esquema 6 - Proposta de fragmentação da substância D-2

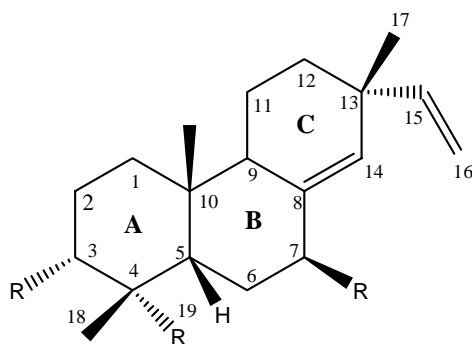


Esquema 7 - Proposta de fragmentação da substância D-3



Esquema 8 - Proposta de fragmentação da substância D-4





**Figura 20** - Estrutura geral dos diterpenos pimaranos D1 a D4

A análise dos dados obtidos nas fragmentações (IE- 70 eV) dos diterpenos D1 a D4, permitiu a identificação dos íons moleculares com intensidade relativa ao pico base de 15 % D1, 14 % para D2, 3 % para D3 e 2 % para D4.

De acordo com a nossa proposta de fragmentação, para D1 têm-se os fragmentos correspondentes a perda de um grupamento metila radicalar ( $m/z$  289; 2 %), seguida pela eliminação em sequência de duas moléculas de água atribuída aos fragmentos  $m/z$  271 (6 %) e  $m/z$  253 (23 %). A proposta de sequência de fragmentação que leva a formação do pico base, tem início com a quebra da ligação 7-8 e posterior formação do intermediário, seguida pelo rompimento da ligação 9-10, sendo o pico base formado pelo carbocátion derivado do anel C. O fragmento  $m/z$  121 (pico base) sofre então perda de hidrogênio radicalar, formando o fragmento  $m/z$  120 (13 %), que após perder uma metila radicalar e formação do fragmento  $m/z$  105 (48 %), sofre perda de  $\text{CH}_2$  e rearranjo formando o íon tropílio  $m/z$  91(55 %).

Para D2 propõe-se os fragmentos formados a partir da perda de uma metila ( $m/z$  287; 8 %) e de  $\text{COOH}$  ( $m/z$  257; 7%) radicalares e perda de ácido fórmico com posterior formação do intermediário, seguido pelo rompimento da ligação 6 -7, que conduz a formação do pico base constituído pelo carbocátion derivado do anel A, que após perda de um hidrogênio radicalar, levou ao fragmento  $m/z$  120 (8 %),



seguida da perda de uma metila radicalar (fragmento  $m/z$  105; 30 %). O fragmento  $m/z$  105, após rearranjo e perda de  $\text{CH}_2$  leva a formação do íon tropílio ( $m/z$  91; 42 %).

Para o diterpeno D3, foram propostos os fragmentos obtidos a partir da perda de uma metila radicalar ( $m/z$  273; 4 %), da perda de uma molécula de água ( $m/z$  270; 7 %) seguida pela perda de uma metila radicalar ( $m/z$  255; 11 %). Ao contrário dos outros diterpenos avaliados, o seu pico base apresentou  $m/z$  135 (100 %), em nossa proposta ele, tem origem a partir do rearranjo com a transferência de hidrogênio da posição 5 para 4 e transferência da metila de 4 para 3 com a saída da hidroxila em 3 e do hidrogênio em 4, através da eliminação de uma molécula de água formando o intermediário correspondente, onde após o rompimento da ligação 9-10 é obtido o pico base, constituído pelo carbocátion derivado do anel A. Após a perda de duas metilas radicalares formando os fragmentos com  $m/z$  120 (5 %) e  $m/z$  105 (17 %), seguido por perda de  $\text{CH}_2$  e rearranjo obtêm-se o íon tropílio ( $m/z$  91; 24 %).

Para o diterpeno D4 propõe-se que o fragmento  $m/z$  286 (10 %), seja obtido pela perda de uma molécula de água, após a saída da hidroxila ligada em 3 e do hidrogênio em 2, com a formação de uma ligação dupla entre eles. Após a perda de  $\text{CH}_2\text{OH}$  radicalar, obtêm-se o fragmento  $m/z$  255 (18%). O fragmento  $m/z$  271 (6 %) é obtido através da perda de uma metila radicalar ao invés de  $\text{CH}_2\text{OH}$  radicalar. A formação do pico base com  $m/z$  121 ocorre após a perda de uma molécula de água e posterior rompimento das ligações 6-7 e 9-10, seguida da perda de  $\text{CH}_2\text{O}$  (formaldeído) a formação do íon tropílio ( $m/z$  91; 83 %) a partir do pico base segue o mesmo mecanismo proposto para D2 e D3.

#### **4.13– Ensaio biológicos**

##### **4.13.1 -Atividade antifúngica**

Os extratos etanólicos de brutos secos de *Mikania parodii* e *Mikania pilosa* não interferiram com o desenvolvimento microbiano dos microrganismos indicadores avaliados na concentração avaliada (4 mg/mL).

##### **4.13.2 - Determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em microplaca.**

Os extratos etanólicos brutos das espécies *M. parodii* e *M. pilosa* não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos patógenos avaliados no protocolo utilizado, sendo que a concentração máxima avaliada foi de 400 µg/mL.

Considerando que a atividade antimicrobiana é atribuída a presença de diterpenos do tipo caurano (LENTZ *et al.*, 1998), a ausência de atividade antimicrobiana para os extratos de *M. parodii* e *M. pilosa* pode ser explicada pela ausência ou concentração muito reduzida de diterpenos derivados do ácido caurenóico, uma vez que não foram identificados diterpenos nas análises de CG-EM das frações de *M. parodii* e o diterpeno ácido caurenóico foi identificado em concentração inferior a 2% nas subfrações oriundas da fração hexânica, apresentando assim concentração muito reduzida no extrato etanólico bruto.

##### **4.13.3 - Ensaio anticonvulsivante (crise induzida por PTZ)**

Segundo Fisher (1989), a epilepsia é caracterizada por um conjunto de alterações cerebrais, com diversas causas e sintomas, comumente manifestadas por crises crônicas.

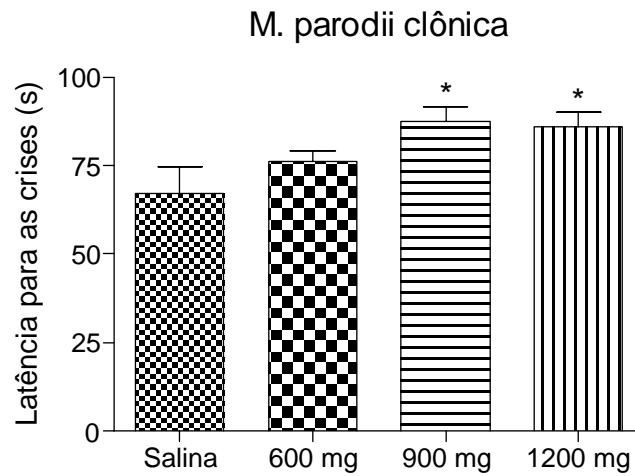
O paradigma de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) em roedores representa um modelo válido para se estudar a mioclonia (contração muscular brusca, involuntária e de brevíssima duração) generalizada humana (LOSCHER & SCHIMIDT, 1988), sendo amplamente empregado nos estudos que visam buscar fármacos com ação anticonvulsivante (OJEWOLE & AMABEOKU, 2006), onde as convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol são resultantes da ativação de receptores glutamatérgicos e inibição da neurotransmissão inibitória GABAérgica.

Epilepsia, classificação básica das crises generalizadas:

Crises Tônicas: se caracterizam por contrações musculares repentinas e duradouras, deixando os membros tensos, estendidos. Ocorre perda imediata de consciência. Frequentemente há desvio dos olhos e cabeça para um lado, às vezes rotação de todo o corpo.

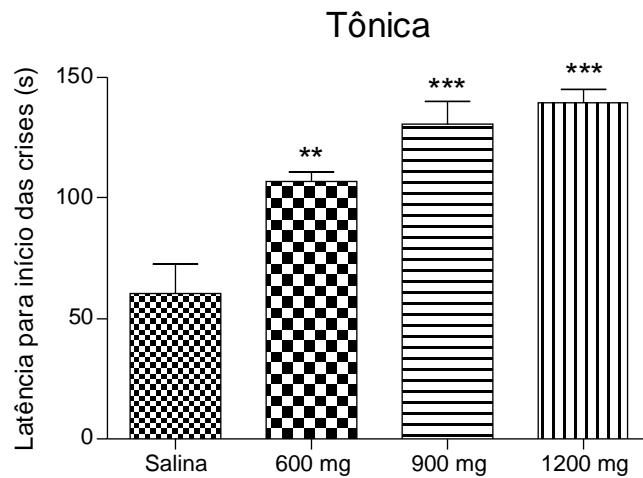
Crises clônicas: estas crises são generalizadas, na qual o componente tônico não está presente, ocorrendo somente abalos repetitivos (abalos clônicos são movimentos de flexão e estiramento dos membros de forma repetitiva e rítmica. A amplitude dos movimentos não é reduzida com a redução da frequência destes.

Em relação ao tempo de latência (em segundos) para o início das crises clônicas (**Gráfico 1**), o extrato etanólico das partes aéreas de *Mikania parodii* aumentou o tempo médio de latência para 76 s, 87s e 86s em comparação com o controle salina (67 s) respectivamente nas dose de 600, 900 e 1200 mg/kg; sendo os dados estatisticamente significativos (Teste Qui-quadrado).



**Gráfico 1** – Latência para início das crises (em segundos) clônicas versus dose (em mg/Kg)

Com relação ao tempo de latência (em segundos) para o início das crises tônicas (**Gráfico 2**), o extrato etanólico das partes aéreas de *Mikania parodii* aumentou o tempo médio de latência para 107 s, 130 s e 139 s em comparação com o controle salina (60 s) respectivamente nas doses de 600, 900 e 1200 mg/kg, ou seja, apresentando atividade anticonvulsivante principalmente para as crises tônicas. Controle (Teste Qui-quadrado).



**Gráfico 2** – Latência para início das crises tônicas (em segundos) versus dose (em mg/Kg).

Com relação a planta *Mikania pilosa* a avaliação para o teste de latência (em segundos) para o início tanto das crises clônicas quanto para as tônicas não apresentou dados estatisticamente significativos (Teste Qui-Quadrado).

#### 4.13.4 - Atividade citotóxica em células tumorais

Os resultados da atividade citotóxica em células tumorais dos extratos etanólicos brutos e extratos etanólicos ressuspensos em água/etanol (7:3) de *Mikania parodii* e *Mikania pilosa* em células tumorais, estão representados na Tabela 46. Os resultados são apresentados como a média da porcentagem de inibição (%) e erro padrão da média (EPM) para carcinoma de cólon (HCT-8), glioblastoma humano (SF925) e MDAMB435 (carcinoma de mama).

Todos os extratos foram testados na concentração de 25 µg/mL. Os extratos ressuspensos foram preparados do mesmo modo que os utilizados nas análises em CLAE-DAD-EM/EM, sendo testados neste ensaio por terem apresentado substâncias

com potencial antitumoral como flavonóides e ácidos clorogênicos (LEE & ZHU, 2006; IWAI *et al.*, 2004; KOK *et al.*, 2008).

**Tabela 46** – Atividade citotóxica em células tumorais de extratos de *Mikania parodii* Cabrera e *Mikania pilosa* Baker.

Amostra	HCT-8 (carcinoma de cólon)		SF925 (glioblastoma humano)		MDAMB435 (carcinoma de mama)	
	% de inibição	EPM*	% de inibição	EPM*	% de inibição	EPM*
<i>M. parodii</i> (EEB)	8,55	8,77	0		0	
<i>M. parodii</i> (EEBR)	20,67	1,87	0		1,08	1,52
<i>M. pilosa</i> (EEB)	46,03	4,10	35,66	12,12	22,65	1,21
<i>M. pilosa</i> (EEBR)	50,62	5,54	59,55	1,38	41,03	1,30

\*erro padrão da média

\*\*EEB – extrato etanólico bruto obtido a partir da percolação das partes aéreas com etanol 96%

\*\*\*EEBR – extrato etanólico bruto ressuspendido em água/etanol (70:30)

Com base nos resultados obtidos verificou-se que os extratos ressuspendidos em água/etanol (70:30) apresentaram maior atividade citotóxica nos três tipos de células tumorais utilizados, indicando que o enriquecimento do extrato com substâncias mais polares (flavonóides e ácidos clorogênicos) aumentou a sua atividade antitumoral.

O extratos de *M. parodii* avaliados não apresentaram atividade antitumoral significativa.

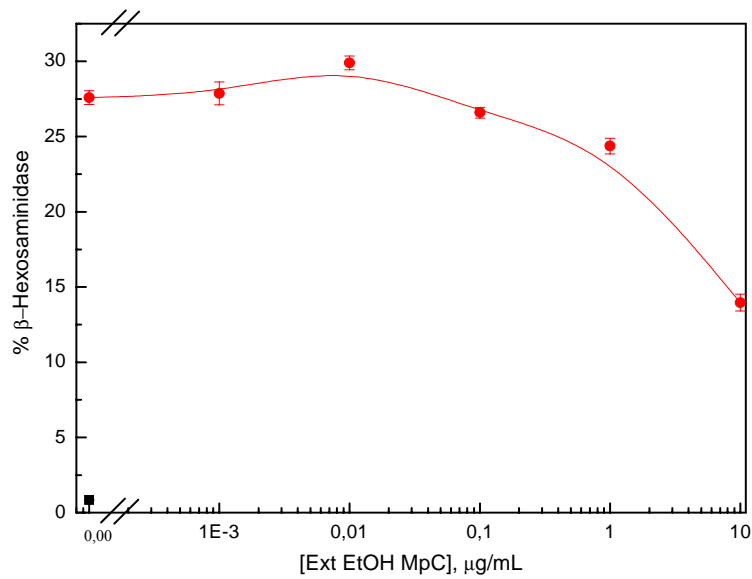
O extrato ressuspendido de *Mikania pilosa* inibiu em mais de 50% e 59% respectivamente as células HCT-8 (carcinoma de cólon) e SF925 (glioblastoma humano). Apesar desta inibição ser inferior aos valores desejados para uma substância isolada (80%), ainda assim ele apresentou potencial atividade antitumoral, principalmente considerando que ele foi avaliado a concentração de 25 µg/mL, que é baixa para um extrato.

#### 4.13.5 - Avaliação da atividade antialérgica através da quantificação de $\beta$ -hexosaminidase por fluorescência (ensaio direto).

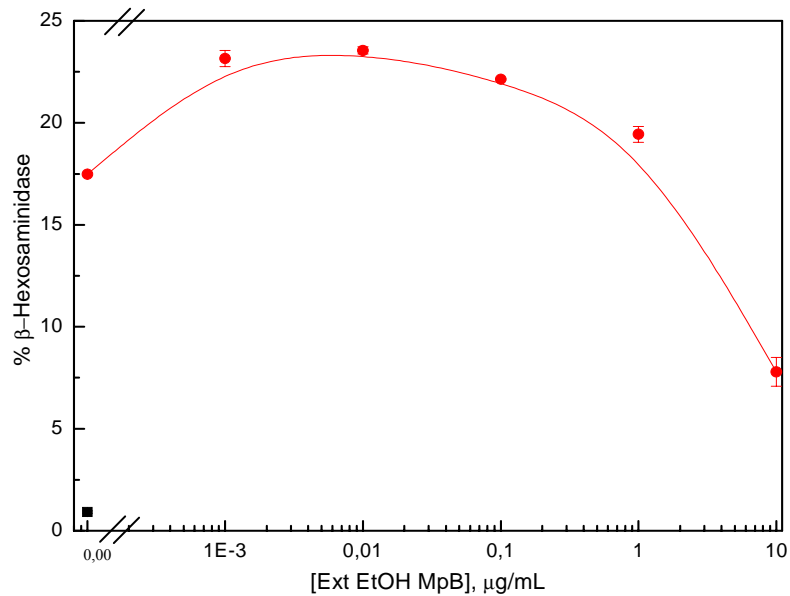
Os resultados obtidos na avaliação da atividade antialérgica através da quantificação de  $\beta$ -hexosaminidase por fluorescência (ensaio direto) dos extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa*, da fração aquosa remanescente da partição líquido-líquido do extrato bruto de *M. pilosa* e da substância caempferol-3-O-glicosídeo (PA-06) estão representados na Tabela 47 e nas figuras 21 a 24.

**Tabela 47** – Resultados da avaliação da atividade antialérgica através da quantificação de  $\beta$ -hexosaminidase por fluorescência (ensaio direto) dos extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa* e da substância caempferol-3-O-glicosídeo (PA-06).

Amostras	% Inibição $Ic_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Extrato etanólico <i>Mikania parodii</i> Cabrera (MpC Et)	10,0
caempferol-3-glicosídeo (PA-06)	6,7
Extrato etanólico <i>Mikania pilosa</i> Baker (MpB Et)	9,2
Fração aquosa remanescente <i>Mikania pilosa</i> Baker	8,4

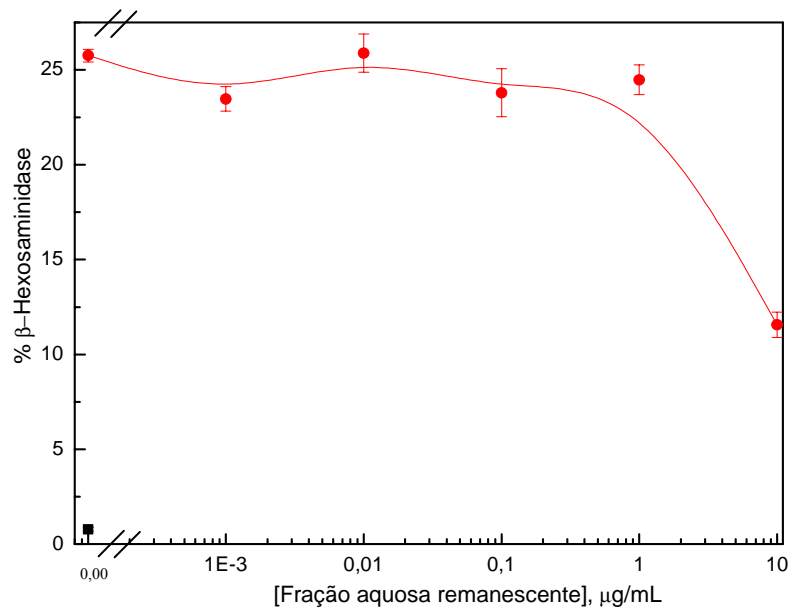


**Figura 21** - Porcentagem de  $\beta$ -hexosaminidase liberada, quando as células são estimuladas pelo antígeno DNP-BSA  $0,1 \mu\text{g/mL}$  na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico da planta *Mikania parodii* Cabrera.

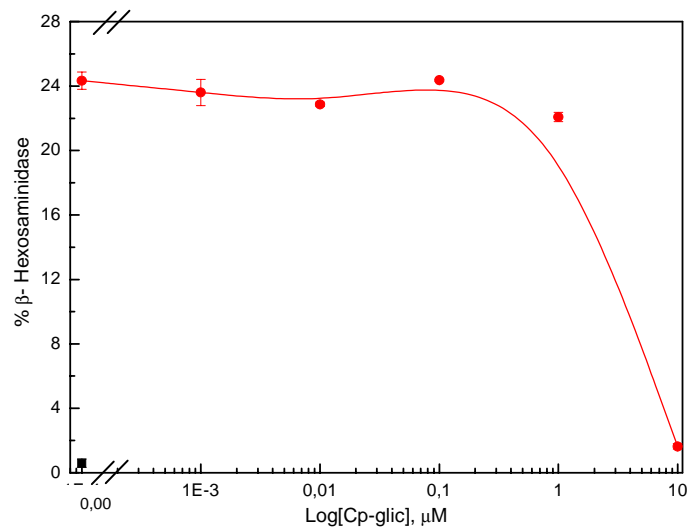


**Figura 22** - Porcentagem de  $\beta$ -hexosaminidase liberada, quando as células são estimuladas pelo antígeno DNP-BSA  $0,1 \mu\text{g/mL}$  na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico da planta *Mikania pilosa* Baker.





**Figura 23** - Porcentagem de  $\beta$ -hexosaminidase liberada, quando as células são estimuladas pelo antígeno DNP-BSA 0,1  $\mu\text{g/mL}$  na presença de diferentes concentrações da fração aquosa remanescente da planta *Mikania pilosa* Baker.



**Figura 24** - Porcentagem de  $\beta$ -hexosaminidase liberada, quando as células são estimuladas pelo antígeno DNP-BSA 0,1  $\mu\text{g/mL}$  na presença de diferentes concentrações da substância caempferol-3-O-glicosídeo (PA-06)

Conforme os resultados obtidos, o extrato etanólico bruto de *M. parodii* inibiu em 50 % a enzima  $\beta$ -hexosaminidase a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , a substância caempferol-3-*O*-glicosídeo isolada a partir do fracionamento deste extrato promoveu o mesmo efeito a concentração de 6,7  $\mu\text{g/mL}$ .

O extrato etanólico bruto de *M. pilosa* inibiu em 50 % a enzima  $\beta$ -hexosaminidase a concentração de 9,2  $\mu\text{g/mL}$  e a fração aquosa remanescente obtida a partir da partição líquido-líquido do mesmo extrato promoveu o mesmo efeito a concentração de 8,4  $\mu\text{g/mL}$ .

A partir dos resultados obtidos foi verificada a atividade antialérgica em todas as amostras avaliadas.

## **5 – CONCLUSÕES**

---

## 5 - CONCLUSÕES

*O estudo fitoquímico da espécie M. parodii possibilitou o isolamento e/ou identificação das seguintes classes de metabólitos secundários:*

**Monoterpenos:** sabineno, carvomenteno, limoneno, mentol e safrol.

**Sesquiterpenos:**  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -gurjuneno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -bergamoteno, *trans*- $\beta$ -farneseno, *alloaromadendreno*,  $\beta$ -selineno,  $\alpha$ -selineno,  $\alpha$ -muuroleno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\gamma$ -cadineno,  $\delta$ -cadineno, *Z*-calameneno,  $\alpha$ -calacoreno, *E*-nerolidol, espatulenol, óxido de cariofileno, salvial-4(14)-en-1-ona,  $\alpha$ -cadinol.

**Triterpenos:** acetato de taraxasterol, acetato de pseudotaraxasterol, acetato de lupeol, acetato de  $\alpha$ -amirina e acetato de  $\beta$ -amirina.

**Flavonóides:** caempferol-3-*O*-glicosídeo, quercetina-3-*O*-glicosídeo, rutina, e um derivado metilado da quercetina (padrão de substituição não definido)

**Derivados do ácido quínico (ácidos clorogênicos):** ácido 5-*O*-*E*-cafeoilquínico, ácido 3,4-di-*O*-*E*-cafeoilquínico, ácido 3,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico, ácido 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico e o ácido 3-*O*-*E*-feruloil-5-*O*-*E*-cafeoilquínico.

**Outras classes:** ácidos palmítico e esteárico (ácidos graxos), decanal (aldeído), heptadecano (hidrocarboneto), pentadecanoato de etila, palmitato de metila e palmitato de etila (ésteres).

A baixa concentração ou ausência de lactonas sesquiterpênicas verificada através de análise em espectrofotometria na região do infravermelho tanto no extrato etanólico bruto, quanto nas frações oriundas do fracionamento deste extrato através de CLV; aliada ao fato de *M. parodii* ser considerada uma espécie cosmopolita (BARROSO, 1958), colocam em dúvida a reclassificação de *M. parodii* a *M.*

*mendocina* realizada por King & Robinson (1987), que consideram *M. mendocina* como espécie endêmica da Argentina.

***O estudo fitoquímico da espécie M. pilosa coletada em Costa Rica - MS possibilitou o isolamento e/ou identificação das seguintes classes de metabólitos secundários:***

**Monoterpenos:**  $\alpha$ -pineno, carvomenteno, limoneno, 4-terpineol, *E*-carveol, carvona

**Sesquiterpenos:**  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -ylangeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -bourboneno,  $\beta$ -elemeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -gurjuneno,  $\alpha$ -guaieno, aromadendreno,  $\alpha$ -humuleno, *allo*-aromadendreno,  $\beta$ -chamigreno,  $\alpha$ -amorfenol, germacreno-D,  $\gamma$ -gurjuneno,  $\beta$ -selineno,  $\alpha$ -selineno,  $\alpha$ -muuroleno, viridifloreno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\gamma$ -cadineno,  $\delta$ -cadineno, *Z*-calameneno,  $\alpha$ -calacoreno, 1,5-epoxisalvial-4(14)-eno, espatulenol, ledol, salvial-4(14)-en-1-ona, epóxido de humuleno, *epi*- $\alpha$ -cadinol, cariofila-4(12),8(13)-dien-5- $\beta$ -ol, *epi*- $\alpha$ -muurolol, cadaleno e  $\alpha$ -bisabolol.

**Diterpenos:** ácido caurenóico

**Triterpenos:**  $\alpha$ -amirina, acetato de  $\beta$ -amirina, acetato de taraxasterol

**Flavonóides:** quercetina 7-metil éter, quercetina-*O*-hexose;

**Ácido quínico e seus derivados:** ácido 5-*O*-*E*-cafeoilquínico, ácido 3-*O*-*E*-cafeoilquínico, ácido 5-*O*-*E*-feruloil quínico, ácido 3,4-di-*O*-*E*-cafeoil quínico, ácido 3,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico, ácido 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico e o ácido 3-*O*-*E*-feruloil-5-*O*-*E*-cafeoilquínico;

**Outras classes:** ácido palmítico e esteárico (ácidos graxos), palmitato de metila, palmitato de etila, decanoato de etila (ésteres), *Z*-geranil acetona (cetona).

*A aplicação de técnicas hifenadas para a avaliação química dos extratos polares de M. camporum e M. vitifolia, permitiu a identificação das seguintes substâncias/classes químicas:*

**Na planta *M. camporum*:** ácido 5-*O-E*-cafeoilquínico, ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico, flavonóide provavelmente um derivado metilado da quercetina contendo uma *O*-hexose ligada, ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico, flavonóide provavelmente um derivado dimetilado da quercetina contendo uma *O*-hexose ligada, flavonóide provavelmente um derivado dimetilado da quercetina e um flavonóide provavelmente um derivado dimetilado do caempferol.

**Na planta *M. vitifolia*:** ácido 5-*O-E*-cafeoilquínico, flavonóide provavelmente um caempferol com uma *O*-hexose ligada, ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico, flavonóide provavelmente um derivado metilado da quercetina contendo uma *O*-hexose ligada, ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico, flavonóide provavelmente um derivado dimetilado da quercetina contendo uma *O*-hexose ligada e o flavonóide provavelmente um derivado dimetilado do caempferol.

*A partir do estudo das reações químicas envolvidas nas fragmentações em fase gasosa através de ionização por electrospray e ionização por elétrons de diterpenos, pode-se concluir que:*

Da série de diterpenos com esqueleto pimarano avaliada, nenhum diterpeno apresentou fragmentação entre 5 e 40 eV de energia de colisão, o que não permitiu o estudo das fragmentações em fase gasosa através de ionização por *electrospray*, podendo este resultado ser explicado pela baixa funcionalização das estruturas químicas estudadas. Todavia, os diterpenos foram fragmentados através de ionização

por elétrons (70 eV) e foram propostas as vias de fragmentação para os quatro diterpenos avaliados.

***Ensaio biológicos com extratos, frações e substâncias isoladas a partir de M. parodii e M. pilosa.***

Os extratos etanólicos brutos de *M. parodii* e *M. pilosa* não apresentaram atividade antimicrobiana nos dois ensaios realizados: atividade antifúngica e determinação da concentração inibitória mínima pelo método de diluição em microplaca.

O extrato etanólico bruto de *M. parodii* apresentou atividade anticonvulsivante aumentando o tempo de latência para o início das crises clônicas em 20 segundos na concentração de 900 mg/Kg e aumentando o tempo de latência para o início das crises tônicas em 79 segundos na concentração de 1200 mg/Kg em comparação com o controle negativo salina. O extrato etanólico bruto de *M. pilosa* não apresentou atividade anticonvulsivante estatisticamente significativa nas concentrações avaliadas (600, 900 e 1200 mg/Kg).

O extrato etanólico bruto de *M. pilosa* ressuspendido em H<sub>2</sub>O:EtOH 7:3 apresentou potencial atividade antitumoral para um extrato, inibindo em mais de 50% e 59% respectivamente as células HCT-8 (carcinoma de cólon) e SF925 (glioblastoma humano). O extrato etanólico bruto de *M. parodii* não apresentou atividade antitumoral significativa.

Em relação a atividade antialérgica avaliada o extrato etanólico bruto de *M. parodii*, a substância caempferol-3-*O*-glicosídeo, o extrato etanólico bruto de *M. pilosa* e a fração aquosa remanescente obtida a partir da partição líquido-líquido do mesmo extrato apresentaram atividade antialérgica.

## **6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**, Allured Publishing Corporation, USA, 1995.

AGUINALDO, A. M.; PADOLINA, W. G.; ABE, F.; YAMAUCHI, T. Flavonoids from *Mikania cordata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 6, p. 665-668, 2003

AGUINALDO, A. M.; ABE, F.; YAMAUCHI, T.; PADOLINA, W. G. Germacranolides of *Mikania cordata*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1441-1443, 1995.

AHMADIANI, A.; MANDGARY, A.; SAYYAH, M. Anticonvulsant effect of flutamide on seizures induced by pentylenetetrazole: involvement of benzodiazepine receptors. **Epilepsia**, v.44, p.629-635, 2003.

AHMED, M. RAHMAN, M. T.; ALIMUZZAMAN, M.; SHILPI, J. A. Analgesic sesquiterpene dilactone from *Mikania cordata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 8, p. 919-921, 2001.

AKAH, P. A. & EKEKWE, R. K. Ethnopharmacology of some Asteraceae family used in Nigerian traditional medicine. **Fitoterapia**, v. 66, n. 4, p. 351-355, 1995.

ALICE, C. B. VARGAS, V. M. F.; SILVA, G. A. A. B.; DE SIQUEIRA, N. C. S.; SCHAPOVAL, E. E. S.; GLEVE, J. HENRIQUES, J. A. P.; HENRIQUES, A. T. Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n. 2, p. 165-171, 1991.

ALVARO VIERA, R. Subsídio para o estudo da flora medicinal da Guiné Portuguesa. **Agência-Geral do Ultramar, Lisboa**, 1959

ALVES, T. M.; CHAVES, P. P. G.; SANTOS, L. M. S. T.; NAGEM, T. J.; MURTA, S. M.; CERAVOLO, I. P.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Tripanosoma cruzi*. **Planta Medica**, v. 61, n.1, p. 85-87, 1995.

AMBRÓSIO, S. R.; SCHORR, K.; DA COSTA, F. B. Terpenoids of *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 221-224, 2004.

AMBRÓSIO, S. R. **Investigação fitoquímica das raízes de *Viguiera arenaria* Baker (Asteraceae) e ensaios biológicos**. 2001. 151 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo Ribeirão Preto, 2001.

ANDRADE, A.A. B. D.; ARAUJO, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; MENDONÇA, F.; MENDOÇA, D. Use of medicinal plants during the puereral gravid cycle. **J. Bras. Ginecol.**, v.106, n. 5, p. 177-185, 1996.

ARAUIO, A. On diuresis and its medications under the influence of various fluid extracts of Brazilian plants. **Tese Universidade de São Paulo- Lab.Pharm. Fac. Med. S. Paulo, Brasil**, 1929.

BAKIR, M.; FACEY, P. C.; HASSAN, I.; MULDER, W. H.; PORTER, R. B. Mikanolide from Jamaican *Mikania micrantha*. **Acta Crystallographica**, v. C60, n. 11, p. 798-800, 2004.

BARDON, A.; CARDONA, L.; CATALAN, C. A. N.; PEDRO, J. R.. 15-Norguaianolides and Germacranolides from *Mikania mendocina*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 845-849, 1996.

BARRETT, B. Medicinal plants of Nicaragua's Atlantic Coast. **Eco. Bot.**, v.48, n. 1, p. 8 – 20, 1994.

BARROSO, G. M. Mikaniae do Brasil. Rio de Janeiro, **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 16, 1958.

BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; FERMANDES JÚNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 387-390, 2006.

BHAKUNI, O. S.; DHAR, M. L.; DHAR, M. M.; DHAWAN, B. N.; MEHROTRA, B. N. . Screening of Indian plants for biological activity. Part II. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 7, p. 250-262, 1969.

BHATTACHARYA, S.; MAHAPATRA, P. K.; CHAUDHURI, A. K. N. Some pharmacological actions of *Mikania cordata*. **Planta Medica**, v. 52, n. 6, p. 539-540, 1986.

BHATTACHARYA, S. PAL, S.; CHAUDHURI, A. K. N. Pharmacological studies of the antiinflammatory profile of *Mikania cordata* (Burm) B.L.Robinson Root Extract in rodents. **Phytother. Res.**, v.6, n. 5, p 255-260, 1992.

BIGHETTI, A. E.; ANTONIO, M. A.; KOHN, L. K.; REHDER, V. L. G.; FOGGIO, M. A.; POSSENTI, A.; VILELA, L.; CARVALHO, J. E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, n. 1-2, p. 72-77, 2005.

BISHAYEE, A. & CHATTERJEE, M. Anticarcinogenic Biological Response of *Mikania Cordata*: Reflections in Hepatic Biotransformartion Systems. **Cancer Lett.**, V.81, N. 2, P. 193-200, 1994a.

- BISHAYEE, A. & CHATTERJEE, M. Anti-stress potential of *Mikania cordata* root extract in mice. **Int. J. Pharmacog.**, v. 32, n. 2, p. 126-134, 1994b.
- BOEKER, R. JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. GERMACRA-1, 10Z, 4E-DIEN-12,8-ALPHA-OLIDES from *Mikania micrantha*. **Planta Medica**, v. 53, n. 1, p. 105-106, 1987.
- BOHLMANN, F. NATU, A. A.; MAHANTA, P. K. Naturally occurring terpene derivatives. 122. New diterpenes and germacranolides from *Mikania* species. **Phytochemistry**, v. 17, p. 483-485, 1978.
- BOHLMANN, F.; ADLER, A.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Naturally occurring terpene derivatives. 412. A dimeric germacranolide and other sesquiterpene lactones from *Mikania* species. **Phytochemistry**, v. 21, n. 6, p. 1349 – 1355, 1982a.
- BOHLMANN, F.; ADLER, A.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Naturally occurring terpene derivatives. Part 418. Germacranolides from *Mikania grazielae*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1169-1170, 1982b.
- BOHLMANN, F.; SINGH, P.; JAKUPOVIC, J.; ROBINSON, H.; KING, R. M. Naturally occurring terpene derivatives . Part 377. An epoxygermacranolide and further constituents from *Mikania* species. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 705-707, 1982c.
- BOHLMANN, F.; ADLER, A.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Naturally occurring terpene derivatives . Part 374. Ent-labdanes from *Mikania alvimii*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 1, p. 173-176, 1982d.
- BOHLMANN, F. TSANKOVA, E.; KING, R. M. ; ROBINSON, H. Five mikanolide derivatives from *Mikania cynanchifolia* and their biogenetic relationships. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p. 1099-1101, 1984.
- BRANDAO, M.; BOTELHO, M.; KRETTLI, E. Antimalarial experimental chemotherapy using natural products. **Cienc. Cult.**, v.37, n. 7, p. 1152-1163, 1985.
- BREMER, K. **Asteraceae: Cladistics and Classification**. Portland, Timber Press, Inc., 1994.
- CASTRO, V. & JAKUPOVIC, J. 4-BETA,19-EPOXY-NORKAURENE and other diterpenes from *Mikania banisteriae*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2450 – 2451, 1985.
- CASTRO, V.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F. Sesquiterpene lactones from *Mikania* species. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1750-1752, 1986.
- CASTRO, V.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F. Germacranolides from *Mikania* species. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 527-530, 1989.

- CEN, Y.; PANG, X.; XU, C.; DENG, Q. Control effects of *Mikania micrantha* alcohol extract on citrus red mite *Panonychus citri*. **Zhongguo ke xue yuan Shenyang ying yong sheng tai yan jiu suo zhu ban** (ISSN: 1001-9332), v. 16, n. 4, p. 754-757, 2005.
- CHIARI, E.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; SAUDE, D. A.; PERRY, K. S. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; GRANDI, T. S. M.; STEHMANN, J. R.; ANJOS, A. M. G.; DE OLIVEIRA, A. B. In vitro screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phyther. Res.**, v. 10, n. 7, p. 636-638, 1996.
- CHOWDHURY, J. U.; NANDI, N. C.; YUSUF, M. Aromatic plants of Bangladesh: constituents of the leaf and flower oils of *Mikania cordata* (Burm.f.) Rob. **Indian Perfumer**, v. 51, n. 3, p. 56-59, 2007.
- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.*, v. 80, p. 1033-1043, 2000.
- CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical Scheme for LC-MS<sup>n</sup> Identification of Chlorogenic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2900-2911, 2003.
- CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S. KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS<sup>n</sup>. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 3821-3832, 2005.
- CLIFFORD, M. N.; ZHENG, W.; NIKOLAI KUHNERT. Profiling the Chlorogenic Acids of Aster by HPLC-MS<sup>n</sup>. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 384-393, 2006.
- COE, F. G. & ANDERSON, G.J. Screening of medicinal plants used by the garifuna of eastern Nicaragua for bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.53, p. 29-50, 1996.
- CONSOLI, R. A. G. B.; MENDES, N. M.; PEREIRA, J. P.; SANTOS, B. D. S.; LAMOUNIER, M. A. Larvicidal properties of plant extracts against *Aedes fluviatis* (Lutz)(Diptera: Culicidae) in the laboratory. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 83, n. 1, p. 87-93, 1988.
- CORDELL, G. A., SHIN, Y. G. Finding the needle in the haystack. The dereplication of the natural product extracts. **Pure Appl. Chem.**, v. 71, p. 1089-1094, 1999.
- CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas Mediciniais (Do cultivo à terapêutica)**. 2ª edição, Editora Vozes, Petrópolis, Rio de Janeiro, 1998.
- COSTA, R. J.; DINIZ, A.; MANTOVANI, M. S.; JORDÃO, B. Q. In vitro study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 86-93, 2008.

COX, P. J. & SIM, G. A. Sesquiterpenoids. Part XVII. X-ray crystallographic determination of the stereochemistry and conformation of dihydromikanolide, a germacranolide diepoxide. **J. Chem. Soc. Perkin. Trans. II**, p. 1355-1359, 1974.

CROTTI, A. E. M.; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M. D.; GATES, P. J.; LOPES, N. P. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high-molecular weight compounds. In: TAFT, C. A. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Kerala, India: Research Signpost, p. 99-141, 2006.

CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; GIESBRECHT, A. M.; DAVINO, S. C. Antibiotic activity of diterpenes from *Mikania triangularis*. **Fitoterapia**, v.67, n. 2, p.189-190, 1996.

CRUZ, F. G. & ROQUE, N. F. Diterpene acids from *Mikania triangularis*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2793-2796, 1992.

CUENCA, M. D. R.; BORKOSKY, S.; CATALAN, C. A. N.; GOEDKEN, V. L.; DIAZ, J. G.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones of *Mikania minima*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1509-1513, 1993.

CUENCA, M. D. R.; BORKOSKY, S.; CATALAN, C. A. N.; DIAZ, J. G.; HERZ, W. A cadinanolide and other sesquiterpene lactones from *Mikania Haenkeana*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3521-3525, 1992.

CUENCA, M. D. R. & CATALAN, C. A. N. Monoterpenes and lignans from *Mikania saltensis*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 4, p. 1162-1164, 1991.

CUENCA, M. D. R.; CATALAN, C. A. N.; KOKKE, W. C. M. C. 14, 15-DIHYDROXYGERMACRANOLIDES and other constituents of *Mikania minima*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 3, p 686-691, 1990.

CUENCA, M. D. R.; BARDON, A.; CATALAN, C. A. N. Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 3, p. 625-626, 1988.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **J. Mass Spectrom.**, v. 39, p. 1-15, 2004.

CUYCKENS, F.; MA, Y. L.; POCSFALVI, G.; CLAYES, M. Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. **Analisis.**, v. 28, p. 888-895, 2000.

DA SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S.; MAIA, L. G. S. Essencial oils of some Amazonian *Mikania* species. **Phytochemistry**, v. 23, n. 10, p. 2374-2376, 1984.

DAVINO, S. C.; GIESBRECHT, A. M. & ROQUE, N. F. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivatives substituted on carbon-15. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, v. 22, n. 9, p. 1127-1129, 1989.

DE A RIBEIRO, R.; BARROS, F.; MARGARIDA, M.; MELO, R. F.; MUNIZ, C.; CHIEIA, S.; WANDERLEY, M. G.; GOMES, C.; TROLIN, G. Acute diuretic effects in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo, Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, n. 1, p. 19 – 29, 1988.

DE A RIBEIRO, R.; FIUZA DE MELO, M. M. R.; DE BARROS, F.; GOMES, C.; TROLIN, G. Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.15, n. 3, p. 261-269, 1986.

DE MOURA, R. S.; COSTA, S. S.; JANSEN, J.; SILVA, C. A.; LOPES, C. S.; BERNARDO FILHO, M.; DA SILVA, V. N.; CRIDDLE, D. N.; PORTELA, N.; RUBENICH, L. M. S.; ARAUJO, R. G.; CARVALHO, L. C. R. M. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **J. Pharm. Pharmacol.**,v. 54, n. 2, p. 249-256, 2002.

DE OLIVEIRA, F. & DE OLIVEIRA FERRO, V. Pharmacognostic characterization of the crude drug and fluid extract of “GUACO DAS SETE SANGRIAS” – *Mikania Smilacina* D. C. **Rev. Fac. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, v. 21, n.1, p. 1-13, 1985.

DE OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M. A.; AKISSUE, G.; AKISSUE, M. K. Isolation and identification of chemical components of *Mikania glomerata* Sprengel and *Mikania laevigata* Schultz BIP. EX. Baker. **Rev. Fac. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, v. 22, n. 2, p. 169-183, 2004.

DE OLIVEIRA, P. A.; TURATTI, I. C. C.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Comparative analysis of triterpenoids from *Mikania cordifolia* collected from four different locations. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, 2006.

DE OLIVEIRA, P. A.; GREGÓRIO, L. E.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Comparative analysis of sesquiterpene lactones from *Mikania cordifolia* collected from three different locations. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 43, n. 2, p. 140-142, 2007

DE PEREZ, C. E. Diterpene acids and esters from *Mikania banisteriae*. **Revista Colombiana de Química**, v. 32, n. 2, p. 75-80, 2003.

DE SOUZA, C. P.; LIMA DE AZEVEDO, M. L.; LOPES, J. L. C.; SARTI, J.; SANTOS FILHO, D. D.; LOPES, J. N. C.; VICHNEWSKI, W.; NASI, A. M. T. T.; FILHO, H. F. L. Chemoprophylaxis of Schistosomiasis: molluscicidal activity of natural products. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 56, n. 3, p. 333-338, 1984.

DENNIS, P. A. Herbal medicine among the Miskito of Eastern Nicaragua. **Econ. Bot.**, v. 42, n. 1, p. 16-28, 1988.

DIAZ, J. G.; GOEDKEN, V. L.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Mikania rimachii* and *Mikania microptera*. **Phytochemistry**, v. 31, n.2, p. 597-608, 1992.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, M. G.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n.2, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, 197-2001, 2007.

DUKE, J. A. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**, 181 p, 1994.

ELI LILLY CO.INDIANAPOLIS IN 46206 USA. **Lilly's Hand Book Of Pharmacy And Therapeutics 5<sup>th</sup>. Rev.**,Eli Lilly And Co, Indianapolis, 1898.

ELLIS, S. M.; BALZA, F.; CONSTABEL, P.; HUDSON, J. B.; TOWER, H. N. Thiarubrines: novel dithiacyclohexadiene polyene photosensitizers from higher plants. **Light-Activated Pest Control. Acs Symposium Series** 616, p.164-178, 1995.

EXARCHOU, V.; FIAMEGOS, Y. C.; BEEK, T. A.; NANOS, C.; VERVOORT, J. Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. **Journal of Chromatography A**, v.1112, p. 293-302, 2006.

FABBRI, H.; DE OLIVEIRA, D. C. R.; VICHNEWSKI, W. HERZ, W. Diterpenes of *Mikania lindbergii* Baker. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 6, p. 563-564, 1997.

FENG, H.; LI, Y.; YE, W.; YU, Z.; HUANG, Z. Chemical constituents in essential oil from stem and leaf of *Mikania micrantha* HBK. **Zhongcaoyao**, v. 35, n. 1, p. 17-18, 2004.

FERNANDES, J. B. F. & VARGAS, V. M. F. Mutagenic and antimutagenic potential of the medicinal plants *M. laevigata* and *C. xanthocarpa*. **Phytother. Res.**, v. 17, n. 3, p.269-273, 2003.

FIERRO, I. M.; DA SILVA, A. C. B.; LOPES, C. S.; DE MOURA, R. S. & BARJAFIDALGO, C. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 19-24, 1999.

FISHER, R.S. Animal models of the epilepsies. **Brain Res. Rev.**, v.14, p.245-278, 1989.

FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUNOZ, V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, n. 1-2, p. 19-37, 1994.

GARCIA, G. H.; CAMPOS, R.; DE TORRES, R. A.; BROUSSALIS, A.; FERRARO, G.; MARTINO, V.; COUSSIO, J. Antiherpetic activity of some Argentine medicinal plants. **Fitoterapia**, v.61, n. 6, p. 542-546, 1990.

GESSLER, M. C.; NKUNYAK, M. H. H.; MWASUMBI, L. B.; HEINRICH, M.; TANNER, M. Screening Tanzanian medicinal plants for antimalarial activity. **Acta Tropica**, v. 56, n. 1, p. 65-77, 1994.

GOBBO-NETO, L. **Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais.** 2007. 254 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

GRACA, C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RATTMANN, Y. D.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; SASSAKI, G. L.; RIECK, L.; PONTAROLO, R.; SILVA-SANTOS, J. E.; MARQUES, M. C. A. *In vivo* assessment of safety and mechanisms underlying *in vitro* relaxation induced by *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker in the rat trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 430-439, 2007.

GUARIM NETO, C.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: Um estudo bibliográfico. **Acta Bot. Bras.**, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

GUTIERREZ, A. B. & HERZ, W. Bisabolones and other constituents of *Mikania shushunensis*. **Phytochemistry**, v. 27, n.12, p. 3871-3874, 1988.

GUTIERREZ, A. B.; OBERTI, J. C.; HERZ, W. Germacran -5, 14, 6, 12-diolides from *Mikania urticifolia*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 3, p. 938-939, 1988.

GUTIERREZ, A. B.; OBERTI, J. C.; SOSA, V. E.; HERZ, W. Melampolides from *Mikania cordifolia*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2315-2320, 1987.

GUTIERREZ, A. B.; OBERTI, J. C.; KULANTHAIVEL, P.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and diterpenes from *Mikania periplocifolia*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 12, p. 2967-2971, 1985.

HARBORNE, J. B. **The Flavonoids: advances in research since 1986**, 1<sup>a</sup> ed., Chapman & Hall, London, 1994, 676 p.

HATTORI, M.; NAKABAYASHI, T.; LIM, Y. A.; MIYASHIRO, H.; KUROKAWA, M.; SHIRAKI, K.; GUPTA, M. P.; CORREA, M.; PILAPITIYA, U. Inhibitory effects of various Ayurvedic and Panamanian medicinal plants on the infection of Herpes simplex virus-1 *in vitro* and *in vivo*. **Phytother. Res.**, v. 9, n.4, p. 270-276, 1995.



HERZ, W.; SANTHANAM, P. S.; WAGNER, H.; HOER, R.; HORHAMMER, L.; FARKAS, L. Isolation, structure, and síntesis of 5,6,7,4'-Tetrahydroxy-3'-Methoxyflavone (Batatifoline), a new flavone from *Mikania batatifolia* D. C. **Chem. Ber.**, v. 103, p. 1822-1827, 1970a.

HERZ, W.; SUBRAMANIAN, P. S.; SANTHANAM, P. S.; AOTA, K.; HALIL, A. L. Structure elucidation of sesquiterpene dilactones from *Mikania scandens* (L) Willd. **J. Org. Chem.**, v. 35, p. 1453-1464, 1970b.

HERZ, W. & KULANTHAIVEL, P. Diterpenes and sesquiterpene lactones from *Mikania congesta*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1761-1768, 1985.

HERZ, W. Constituents of *Mikania* species. **New trends in Natural Products Chemistry**, v. 26, p. 143-154, 1986.

HERZ, W. Terpenoid chemistry of *Mikania* species. **Journal Indian Chem. Soc.**, v.75, n.10-12, p. 559-564, 1998.

HEYWOOD, V. H.; HARBONE, J. B. E & TURNER, B. L. **The Biology and Chemistry of the Compositae**. New York, Academic Press, v.1, 1977.

HIRSCHMANN, G. S. & ROJAS DE ARIAS, A. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 159-172, 1990.

HOLMES, W. C. A proposed sectional classification for *Mikania* (Eupatorieae). In: Compositae: **Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Royal Botanic Gardens**, v.1, p. 621-626, 1996.

HOSTETTMANN, K. On the use of plants and plant-derived compounds for the control of Schistosomiasis. **Naturwissenschaften**, V. 71, N. 5, P. 247-251, 1984.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L.; TERRAUX, C. Modern screening techniques for plant extracts. **Pharm. Biol.**, v. 39, p.18-31, 2001

HUANG, H.; YE, W.; WU, P. LIN, L.WEI, X. New Sesquiterpene Dilactones from *Mikania micrantha*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 734-736, 2004.

ISRAEL, M. C. An evaluation of the anti-inflammatory properties of *Mikania cordata* (Burm. F.) B. L. Robinson. **Acta Manilana**, v. 38, n. 1, p. 75-81, 1990.

IWAI, K.; KISHIMOTO, N.; KAKINO, Y; MOCHIDA, K.; FUJITA, T. *In vitro* antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 15, p. 4893-4898, 2004.

JIANG, R. W.; HE, Z. D.; BUT, P. P. H.; CHAN, Y. M.; MA, S. C.; MAK, T. C. W. A novel 1:1 complex of potassium mikanin-3-o-sulfate with methanol. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 49, n. 9, p. 1166-1169, 2001.

- KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R. & GOTTLIEB, O. R. Chemical diversity of plants from Brazilian Cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 66 (Supl. 1 - parte I): 50-55, 1994.
- KIANG, A. K.; SIM, K. Y.; YOONG, S. W. Constituents of *Mikania cordata* (Compositae) – II. **Phytochemistry**, v. 7, p. 1035, 1968.
- KING, R. M. & ROBINSON, H. **The genera of the Eupatorieae (Asteraceae)**. Lawrence, Allen Press, Inc, v. 22, p. 418-426, 1987.
- KISSMANN, K. G. & GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. São Paulo, BASF Brasileira S. A., 1992.
- KNUDSEN, F. S.; VILEGAS, W.; OLIVEIRA, F.; ROQUE, N. F. Pimaradiene diterpenes from *Mikania triangularis*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1240-1242, 1986.
- KOK, T. M. de; BREDA, S. G. van; MANSON, M. M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. **European Journal of Nutrition**, v. 47, p. 51-59, 2008.
- KRAUTMANN, M.; RISCALA, E. C. DE; BURGUEÑO-TAPIA, E.; MORA-PEREZ, Y.; CATALÁN, C. A.; JOSEPH-NATHAN, P. C-15-functionalized eudesmanolides from *Mikania campanulata*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 7, p. 1173-1179, 2007.
- LEE, W. J.; ZHU, B. T. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 2, p. 269-277, 2006.
- LENTZ, D. L.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D.; MEURER-GRIMES, B.; PASSEITER, C. M.; CORDERO, J.; IBRAHIMI, O. OKUNADE, A. L. Antimicrobial properties of Honduran Medicinal Plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.63, n. 3, p. 253-263, 1998.
- LIU, G. S. Studies on alkannin-beta-prime-dimethylacrylate, a new naphthoquinone derivative isolated from *Arnebia euchroma*. **Yao Hsueh T'ung Pao**, v. 16, n.5, p. 14-15, 1981.
- LOBITZ, G. O. Kaurene diterpenes from *Mikania vitifolia*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 805-809, 1998.
- LOSCHER, W.; SCHIMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Research**, v.2, p.145-181, 1988.
- LOUSTALOT, A. J. & PAGAN, C. Local "fever" plants tested for presence of alkaloids. **El Crisol (Puerto Rico)**, v.3, n. 5, p. 3, 1949.

- LUU, C. Notes on the traditional Pharmacopoeia of French Guyana. **Plant Med. Phytother.**, v. 9, p. 125-135, 1975.
- MA, Y. L.; HEUVEL, H. V.; CLAEYS, M. Characterization of 3-Methoxyflavones using fast-atom bombardment and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 13, p. 1932-1942, 1999.
- MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M. A. F.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; PEREIRA, P. S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n.3, p. 364-370, 2005.
- MANDAL, P. K.; BISHAYEE, A.; CHATTERJEE, M. Stimulation of tissue repair by *Mikania cordata* root extract in carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. **Phytother. Res.**, v. 7, n.1, p. 103-105, 1993.
- MANDAL, P.K.; BISHAYEE, A.; CHATTERJEE, M. Stimulation of hepatic protein synthesis in response to *Mikania cordata* root extract in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Ital. J. Biochem.**, v.41, n. 6, p.345-351, 1992.
- MANGURO, L. O. A.; UGI, I.; LEMMEN, P.; HERMANN, R. Flavonol glycosides of *Warburgia ugandensis* leaves. **Phytochemistry**, v. 64, p. 891-896, 2003.
- MATHUR, S. B.; TELLO, P. G.; FERMIN, C. M.; MORA-ARELLANO, V. Terpenoids of *Mikania monagasensis* and their biological activities. **Rev. Latino Amer. Quim.**, v. 6, n. 4, p. 201-205, 1975.
- MC CLATCHEY, W. The ethnopharmacopeia of Rotuma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, n. 3, p. 147-156, 1996.
- MEDINA, F. R. & WOODBURY, R. Terrestrial plants molluscicidal to lymnaeid hosts of Fascioliasis hepatica in Puerto Rico. **J. Agr. Univ. Puerto Rico**, v. 63, p.366-376, 1979.
- MELLO, L.E.A.; BOTOLOTO, Z.A.; CAALHEIRO, E.A. Modelos experimentais de epilepsia: Uma revisão. **Neurobiologia**, v.49, p.231-268, 1986.
- MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S.; ROQUE, N. F. Terpenes from *Mikania aff. jeffreyi* (Asteraceae). **Z. Naturforsch.**, v. 60b, p. 875-879, 2005.
- MENDES DO NASCIMENTO, A.; CHAVES, J. S.; ALBUQUERQUE, S.; RODRIGUES DE OLIVEIRA, D. C. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 381-384, 2004.
- MOERMAN, D. E. Analysis of the food plants and drug plants of native north América. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, n.1, p. 1-22, 1996.
- MORRISON, E. Y. S. A. & WEST, M. A preliminary study of the effects of some west indian medicinal plants on blood sugar levels in the dog. **West Indian Med. J.**, v. 31, p. 194-197, 1982.

- MOSADDIK, M. A. & ALAM, K. M. F. The anti-ulcerogenic effect of an alkaloidal fraction from *Mikania cordata* on diclofenac sodium-induced gastrointestinal lesions in rats. **J Pharm. Pharmacol.**, v. 52, n. 9, p. 1157-1162, 2000.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. & KEN, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 24 February 2000.
- NAAL, R. M. Z. G.; TABB, J.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B. *In situ* measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 791-796, 2004.
- NASCIMENTO, A. M. & OLIVEIRA, D. C. R. Kaurene diterpenes and other chemical constituents from *Mikania stipulacea* (M. VAHL) Willd. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 12, n. 4, p. 552-555, 2001.
- NASCIMENTO, S. C.; CHIAPPETA, A. A.; LIMA, R. M. O. C. Antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco, Brazil. **Fitoterapia**, v. 61, n. 4, p. 353 – 355, 1990.
- NOVY, J. W. Medicinal plants of the Eastern region of Madagascar. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 119-126, 1997.
- NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition*. **NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4)**. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- OHKOSHI, E.; KAMO, S.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. ent-Kaurenoic acids from *Mikania hirsutissima* (Compositae). **Phytochemistry**, v. 65, n. 7, p. 885-890, 2004.
- OJEWOLE, J.A.O.; AMABEOKU, G.J. Anticonvulsant Effect of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) Leaf Aqueous Extract in Mice. **Phytotherapy Research**, v.20, p.696-700, 2006.
- OTERO, R.; NUNEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMENEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DIAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the Northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 233-241, 2000a.
- OTERO, R.; FONNEGRA, R.; JIMENEZ, S. L.; NUNEZ, V.; EVANS, N.; ALZATE, S. P.; GARCIA, M. E.; SALDARRIAGA, M.; VALLE, G. D.; OSORIO, R. G.; DIAZ, A.; VALDERRAMA, R.; DUQUE, A. Snakebites and Ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part I: Traditional use of plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 3, p. 493-504, 2000b.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, S. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46:2720-2722, 2002.

PAUL, R. K.; JABBAR, A.; RASHID, M. A. Antiulcer activity of *Mikania cordata*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 701-703, 2000.

PAWLISZYN, J.; ARTHUR, C. L. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

PEDROSO, A. P. D.; SANTOS, S. C.; STEIL, A. A.; DESCHAMPS, F. BARISON, A.; CAMPOS, F.; BIAVATTI, M. W. Isolation of syringaldehyde from *Mikania laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 63-69, 2008.

PELLETIER, S. W. et al. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 49, n.5, p. 892, 1986.

PELUSO, G. FEO, V.; DE SIMONE, F.; BRESCIANO, E. & VUOTTO, M. L. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 5, p. 639-649, 1995.

PEREZ, C. & ANESINI, C. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by Argentinean medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 65, n. 2, p. 169-172, 1994.

RASOANAIVO, P.; RATSIMAMANGA URVEG, S.; RAMANITRAHASIMBOLA, D.; RAFATRO, H.; RAKOTO RATSIMAMANGA, A. Criblage d'extraits de plantes de Madagascar pour recherche d'activité antipaludique et d'effet potentialisateur de la chloroquine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 2, p. 117-126, 1999.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F. & BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany** 80: 223-230, 1997.

REIS, A. A.; MENDES, C. C.; FERRAZ, T. P. L.; ROQUE, N. F. Terpenes from *Mikania hookeriana*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 9, p. 1061-1062, 2003.

REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S.; POPLAWSKI, J. Total Assignment of  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  Spectra of Three Isomeric Triterpenol Derivatives by 2D NMR: An investigation of the Potential Utility of  $^1\text{H}$  Chemical Shifts in Structural Investigations of Complex Natural Products. **Tetrahedron**, v. 42, n. 13, p. 3419-3428, 1986.

RITTER, M. R. & MIOTTO, S. T. S. Taxonomia de *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v. 32, n. 3, p. 309-359, 2005.

ROIG Y MESA, J. T. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. **Ministerio de Agricultura, Republica de Cuba, Havana**, 872p., 1945.

ROJAS DE ARIAS, A.; FERRO, E.; INCHAUSTI, A.; ASCURRA, M.; ACOSTA, N.; RODRIGUEZ, E. & FOURNET, A. mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, n. 1, p. 35-41, 1995.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONCALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom-1. analgesic and anti-inflammatory activities. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 86, p. 203-205, 1991.

SANTOS, S. C.; KRUEGER, C. L.; STEIL, A. A.; KREUGER, M. R.; BIAVATTI, M. W.; WISNIEWSKI JÚNIOR, A. L. C Characterisation of Guaco Medicinal Extracts, *M. laevigata* and *M. glomerata*, and their Effects on Allergic Pneumonitis. **Planta Med.**, v. 72, p. 679-684, 2006.

SELVANAYAHGAM, Z. E.; GNANEVENDHAN, S. G.; BALAKRISHNA, K.; RAO, R. B. Antsnake venom botanicals from ethnomedicine. **J. Herbs Spices Med. Plants**, v. 2, n.4, p. 45-100, 1994.

SILVA, M. P; MAURO, R.; MOURÃO, G. & COUTINHO, MARCOS. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 143-152, jun. 2000.

SIMÕES, C. M.O.; FALKENBERG, M.; AULER MENTZ, L.; SCHENKEL, E. P.; AMOROS, M. GIRRE, L. Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extracts. **Phytomedicine**, v.6, n. 3, p. 205-214, 1999.

SIMÕES, C. M. O; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E. & STHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, Editora da Universidade/UFRS, 1989.

SOARES, A. P.; DO NASCIMENTO, A. M., TALEB-CONTINI, S. H.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Constituents of *Mikania lasiandrae*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 6, 2007.

SOUZA, J. M.; TALEB-CONTINI, S. H.; OLIVEIRA, D. C. R. Phytochemical study of *Mikania pseudohoffmanianna* G. M. Barroso ex W. C. Holmes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.2 abr./jun., 2006.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction, **Journal of Biochemical and Biophysical methods**, v. 70, p. 235-242, 2007.

SUYENAGA, E. S.; RECHIE, E.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E.; CHAVES, C. G. & HENRI, A. T. Anti-inflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n.6, p. 519-523, 2002.

- TALEB-CONTINI, S. H.; SANTOS, P. A.; VENEZIANI, R. C. S.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C.; LOPES, N. P.; OLIVEIRA, D. C. R. Differences in secondary metabolites from leaf extracts of *Mikania glomerata* Sprengel obtained by micropropagation and cuttings. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16 (Supl.), p. 596-598, 2006.
- TIWARI, K. C.; MAJUNDER, R.; BHATTACHARJEE, S. Folklore medicines from Assam and Arunachal Pradesh (District Tirap). **Int. J. Crude Drug Res.**, v. 17, n.2, p. 61-67, 1979.
- TOLONEN, A.; UUSITALO, J. Fast screening method for the analysis of total flavonoid content in plants and foodstuffs by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry with polarity switching. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 18, p. 3113-3122, 2004.
- VAN DEN BERG, M. A. Ver-o-peso: The ethnobotany of an Amazonian market. **Advances In Economic Botany Ethnobotany in the Neotropics G.T. Prance & J A Kallunki (Eds) New York Botanical Garden Bronx NY**, v. 1, p. 140-149, 1984.
- VASILEVA, B. **Plantes medicinales de Guinee. Conakry, Republique de Guinee**, 1969
- VENEZIANI, R. C. S. & OLIVEIRA, D. C. R. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27 , n. 1, p. 99-102, 1999.
- VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E. & LANÇAS, F. M. Extraction of Low-Polarity Compounds (with Emphasis on Coumarin and Kaurenoic Acid) from *Mikania glomerata* ('guaco') Leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 5, p. 266-270, 1997a.
- VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E. & LANÇAS, F. M. Determination of coumarin and kaurenoic acid in *Mikania glomerata* ('guaco') Leaves by Capillary Gas Chromatography **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 2, p. 74-77, 1997b.
- VISHNEWSKI, W.; FREITAS LEITÃO FILHO, H.; MURARI, R.; HERZ, W. Cinnamoylgrandifloric acid from *Mikania oblongifolia*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 2028, 1977.
- WALL, M. E.; WANI, M. C.; HUGHES, T. J.; TAYLOR, H. Plant antimutagenic agents, 1. General bioassay and isolation procedures. **Journal of Natural Products**, v. 51, n.5, p. 866-873, 1988.
- WEI, X.; HUANG, H.; WU, P.; CAO, H.; YE, W. Phenolic constituents from *Mikania micrantha*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 1091-1096, 2004.
- WENIGER, B.; ROUZIER, M.; DAGUILH, R.; HENRYS, D.; HENRYS, J. H.; ANTON, R. Popular medicine of the Central Plateau of Haiti. 2. Ethnopharmacological inventory. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, n. 1, p. 13-30, 1986.

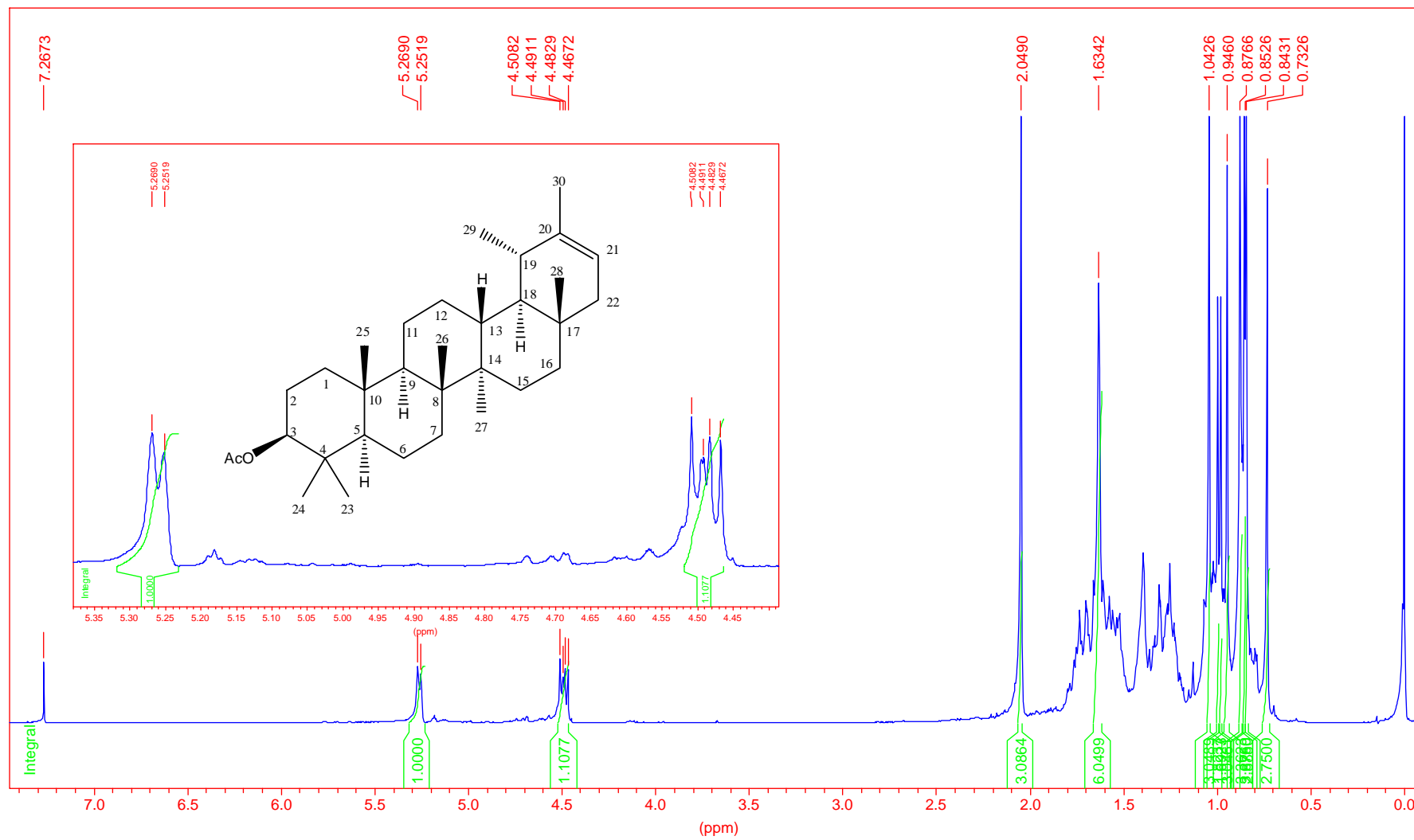
- WU, Y.; ZHU, G.; HONG, G.; FANG, H. Study on chemical constituents on *Mikania micrantha*. **Shenzhen Daxue Xuebao, Ligongban**, v. 24, n. 1, p. 102-105, 2007.
- YATSUDA, R.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; MURATA, R. M.; REHDER, V. L. G.; MELO L. V.; KOO, H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of *mutans streptococci*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 183-189, 2005.
- YE, M.; YAN, Y.; GUO, D. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug Tu-Si-Zi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 1469-1484, 2005.
- YOUNG, R. N. Importance of biodiversity to the modern pharmaceutical industry. **Pure Appl. Chem.**, vol. 71, n. 9, p. 1655-1661, 1999.
- YU, X.; FENG, J.; LIU, X.; ZHUANG, S.; ZHANG, X. Active anti-microbial ingredients in stems and leaves of *Mikania micrantha*. **Xibei Zhiwu Xuebao**, v. 26, n. 5, 1001-1006, 2006.
- ZAMORA-MARTINEZ, M. C. & POLA, C. N. P. Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Vera Cruz, México. **Journal of Ethnopharmacology**, v.35, n. 3, p. 229-257, 1992.
- ZAMORANO, G.; CATALAN, C. A. N.; DIAZ, J. G.; HERZ, W. Sesquiterpene dilactones from *Mikania ypacarayensis*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1257-1260, 1995.
- ZAMORANO, G.; CATALAN, C. A. N.; DIAZ, J. G.; HERZ, W. Germacranolides and sesquiterpene dilactones from *Mikania dusenii*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 1, p. 187-190, 1994.
- ZANI, C. L.; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; DE OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; GRANDI, T. S. M. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p.47-50, 1995.
- ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Headspace solid phase microextraction, **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 1843-1852, 1993.



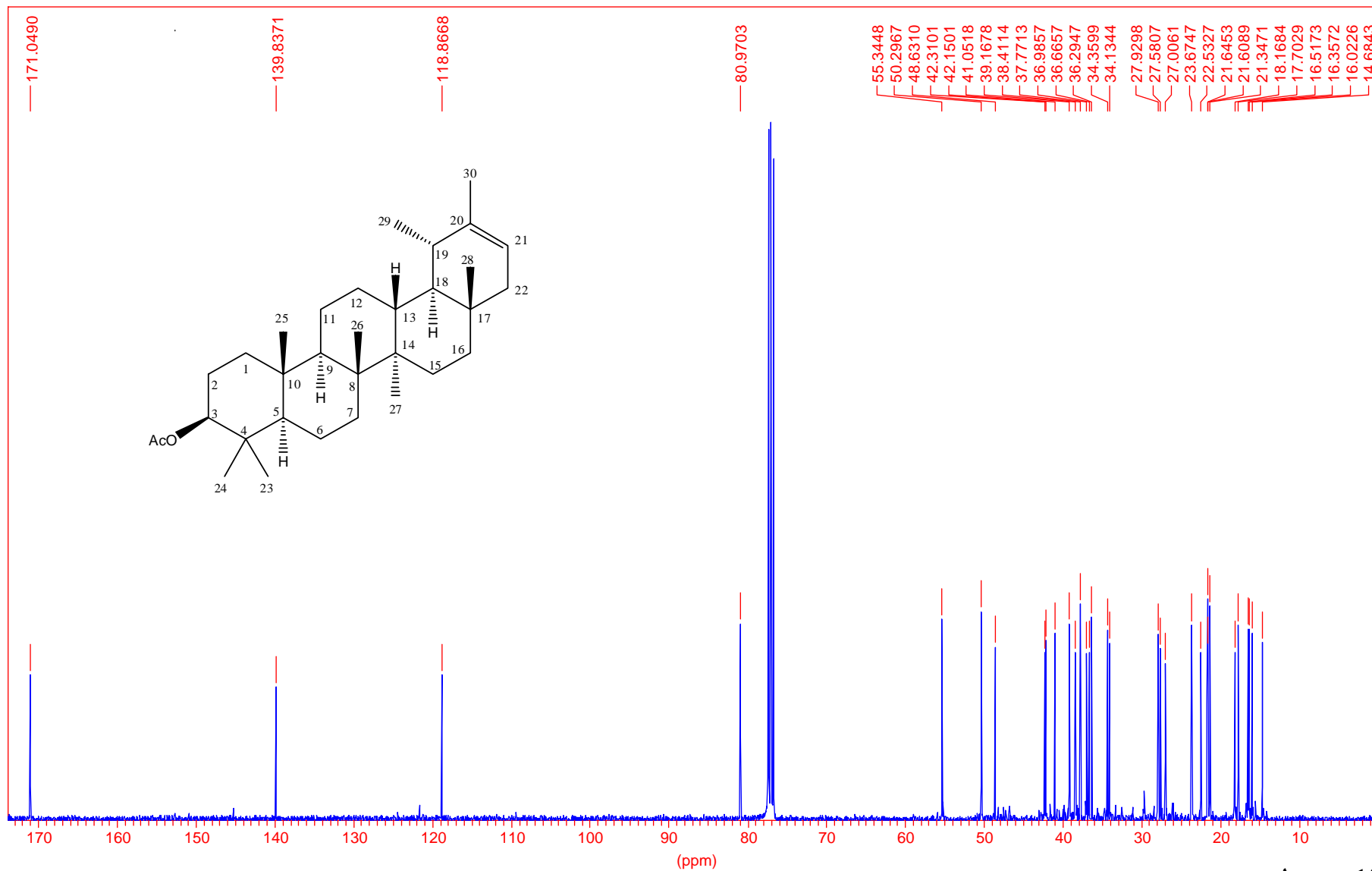
***ANEXOS***

---

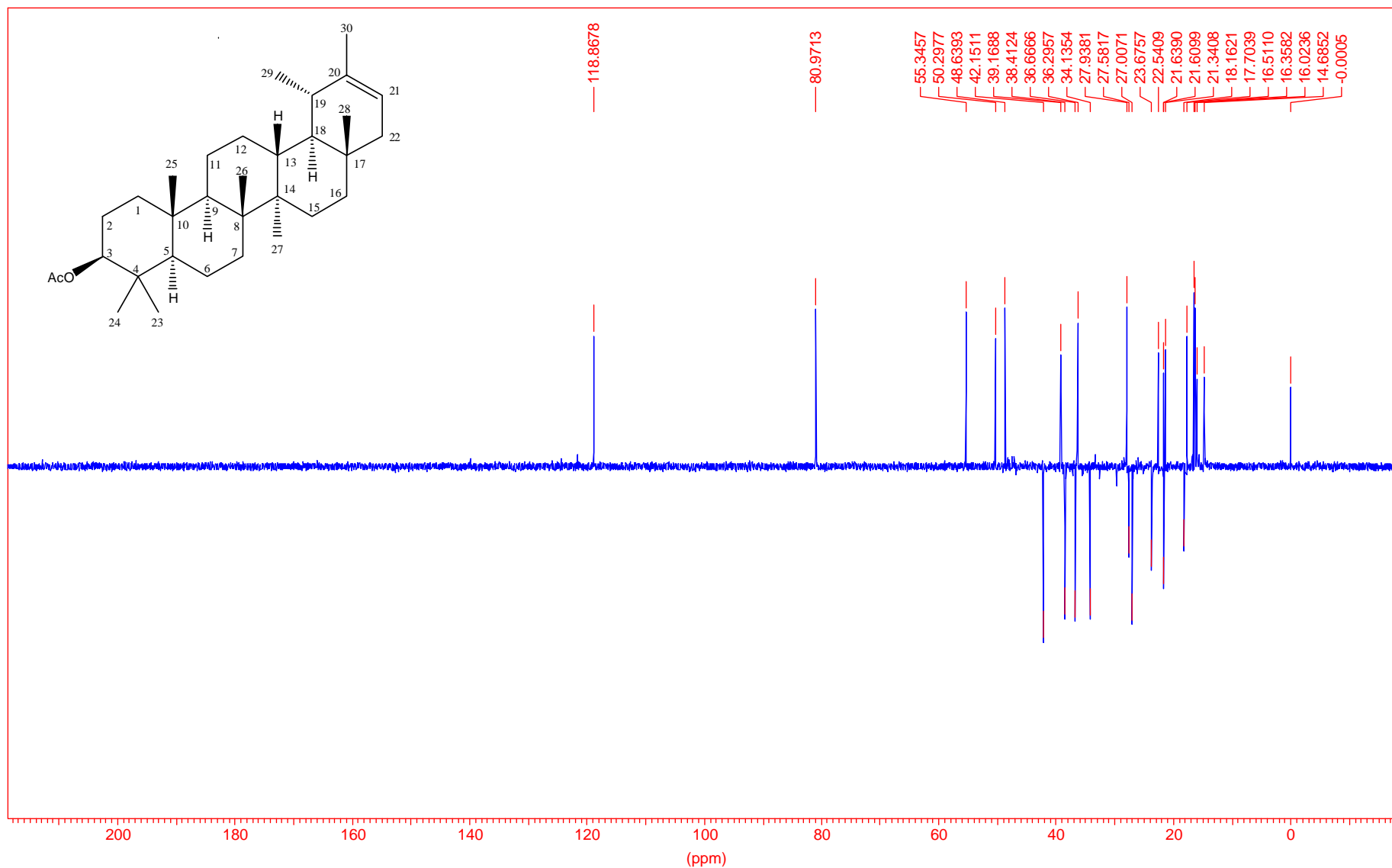
Anexo 1 – Espectro RMN <sup>1</sup>H da substância PA-01 (400 MHz, clorofórmio-d, TMS)



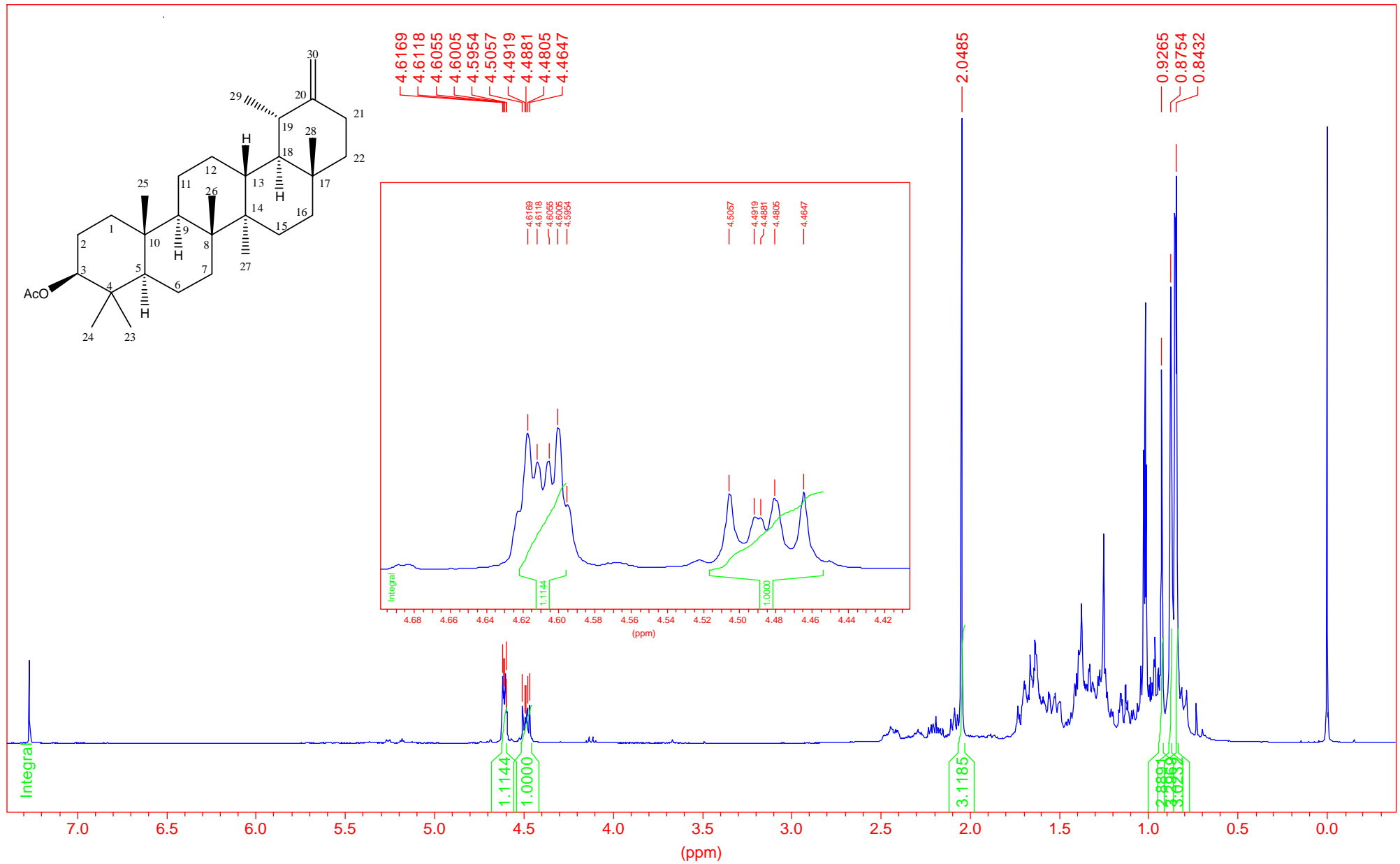
Anexo 2 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C da substância PA-01(100 MHz, clorofórmio-d, TMS)



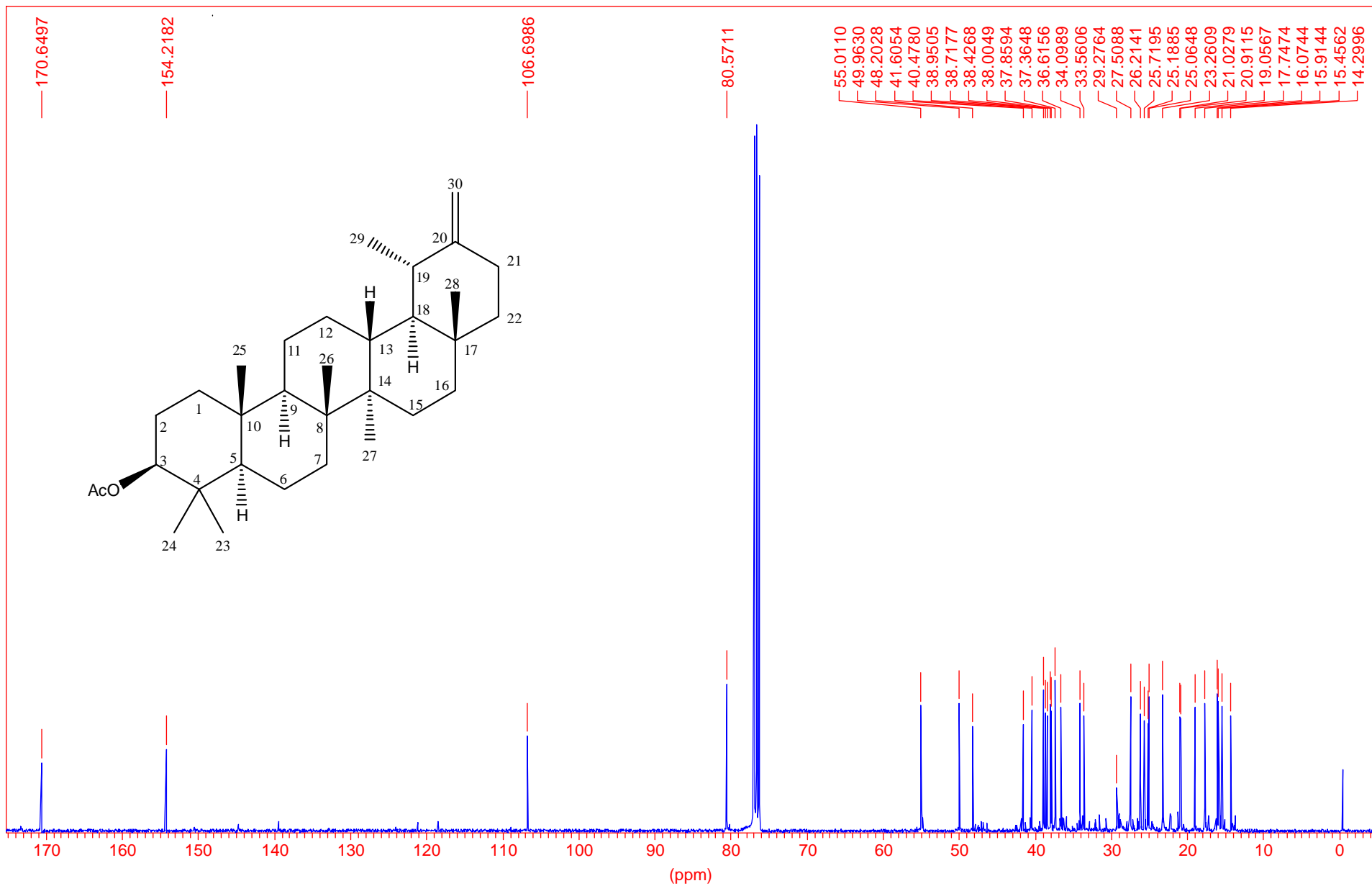
Anexo 3 – Espectro RMN <sup>13</sup>C DEPT 35° da substância PA-01 (100 MHz, clorofórmio-d, TMS)



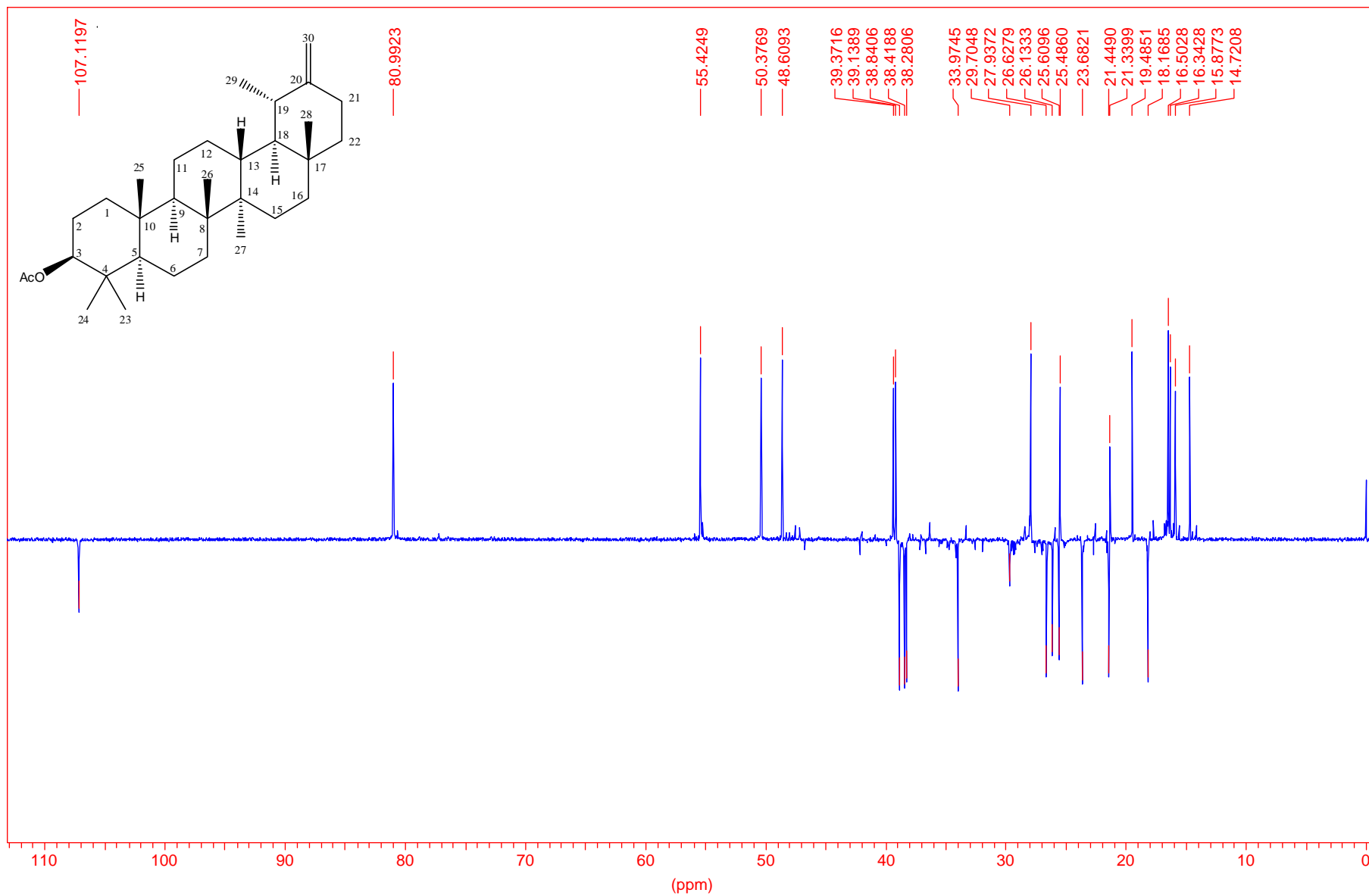
Anexo 4 – Espectro RMN <sup>1</sup>H da substância PA-02 (400 MHz, clorofórmio-d, TMS)



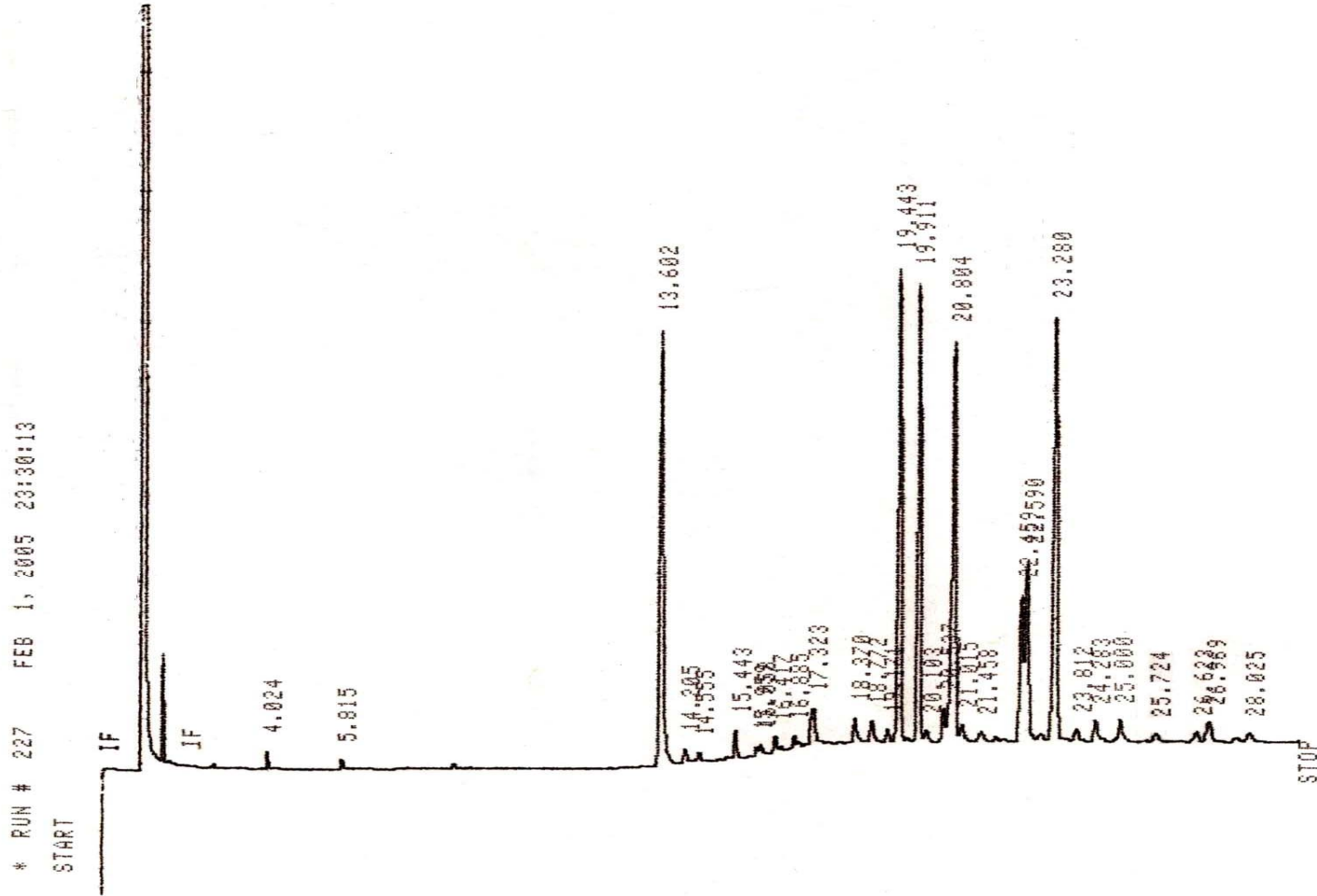
Anexo 5 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C da substância PA-02 (100 MHz, clorofórmio-d, TMS)



Anexo 6- Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° da substância PA-02 (100 MHz, clorofórmio-d, TMS)

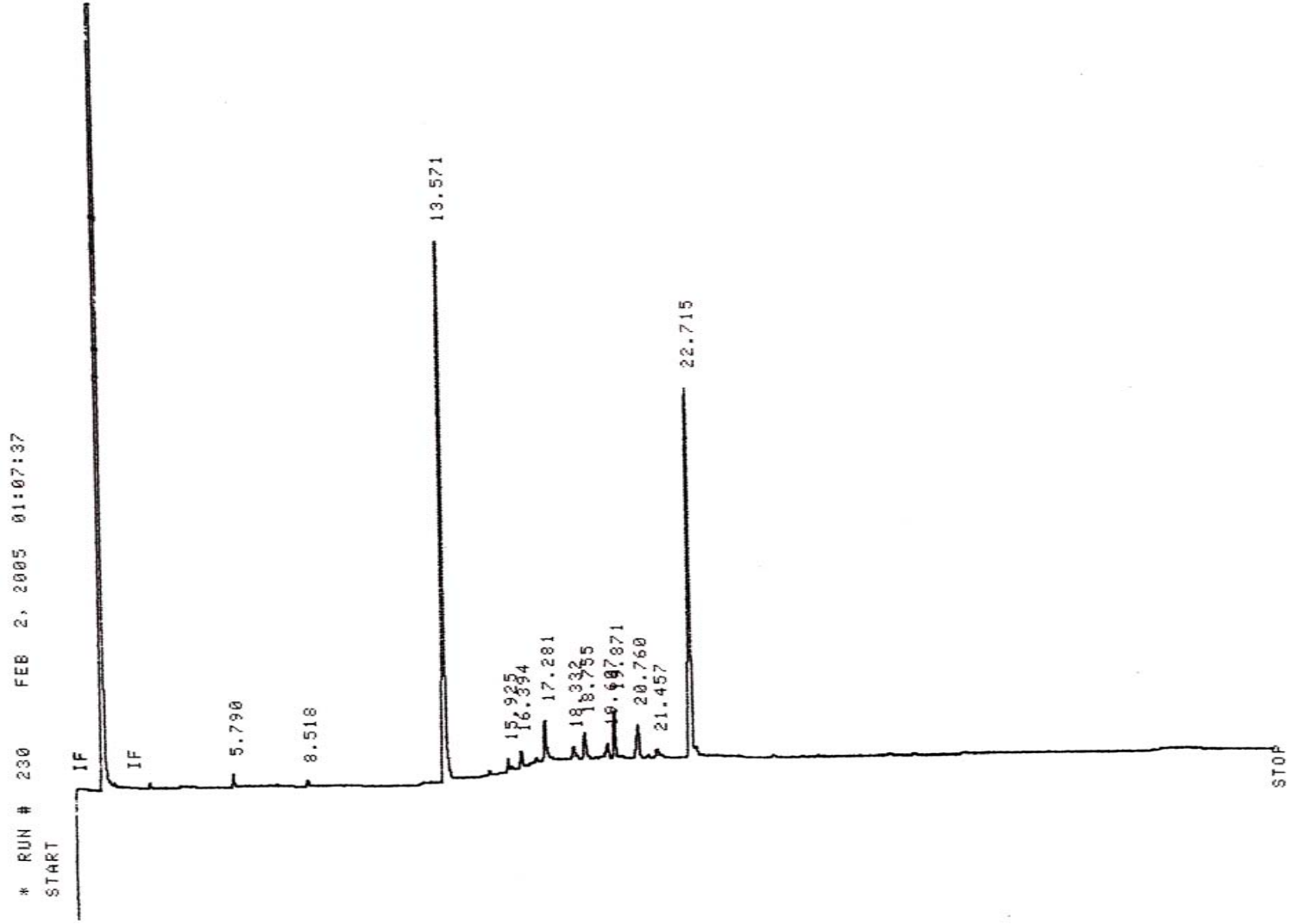


Anexo 7 - Cromatograma CG padrões de triterpenos em coluna HP-1

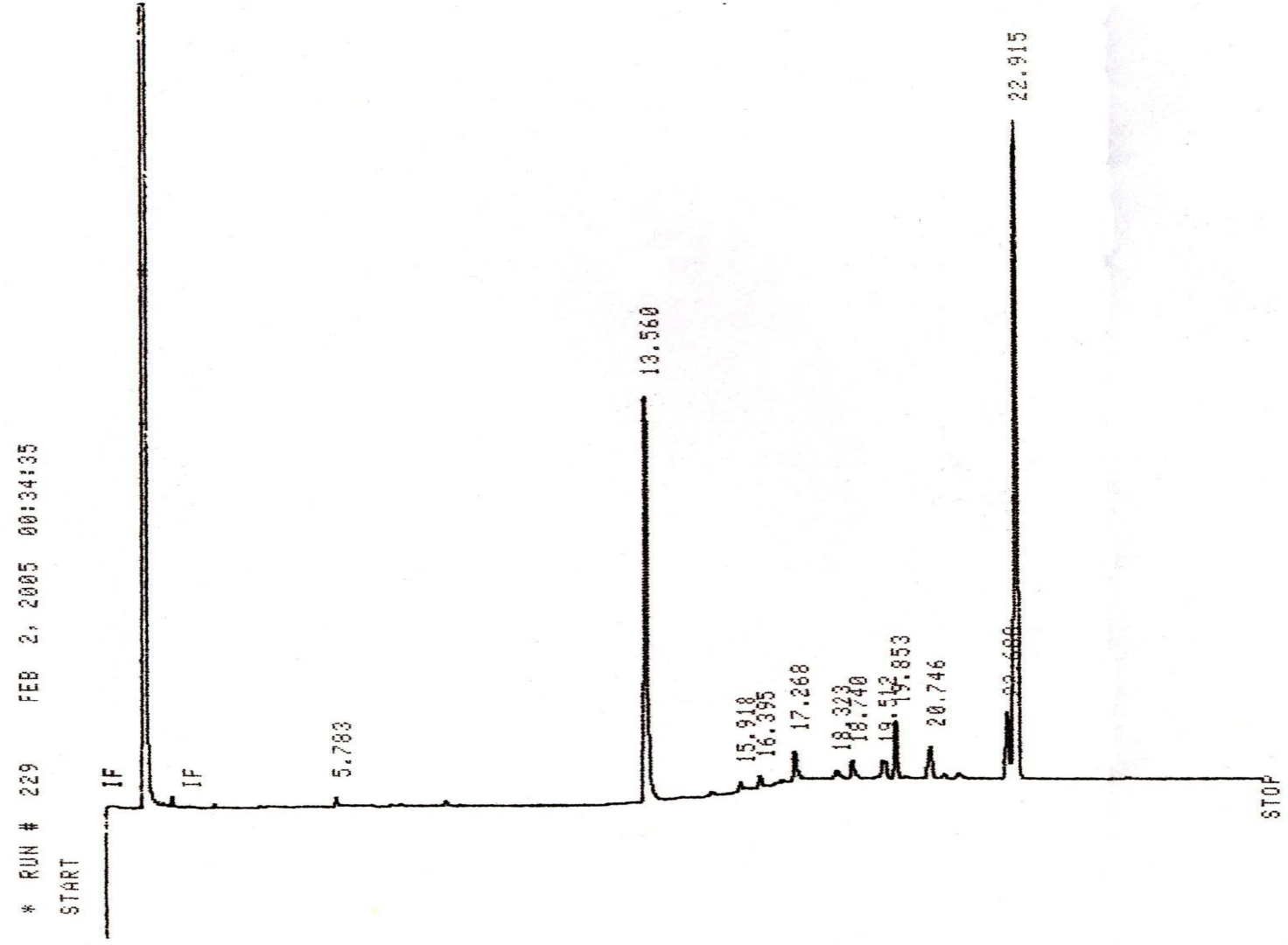




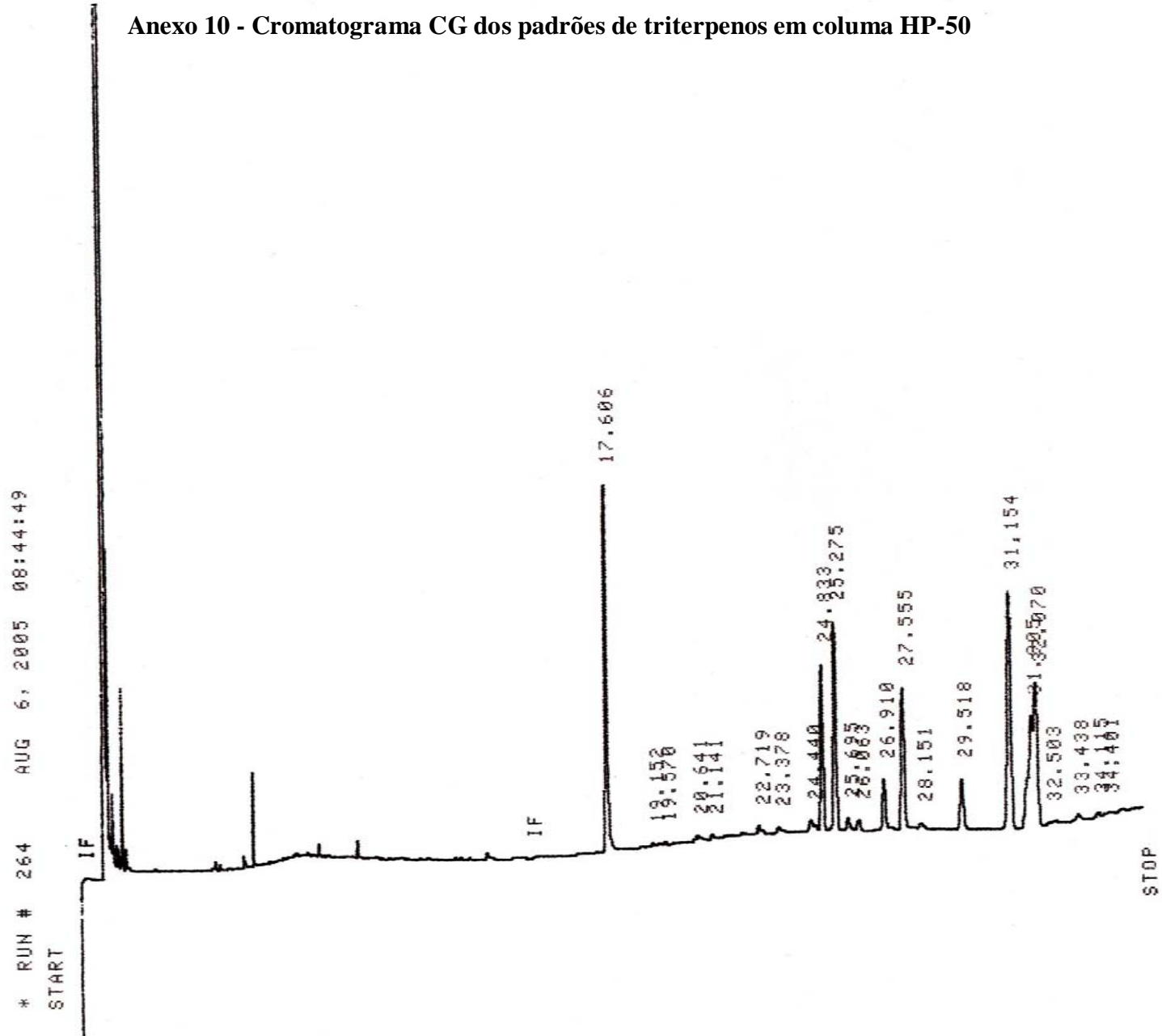
Anexo 8 - Cromatograma CG da fração 04.06 em coluna HP-1



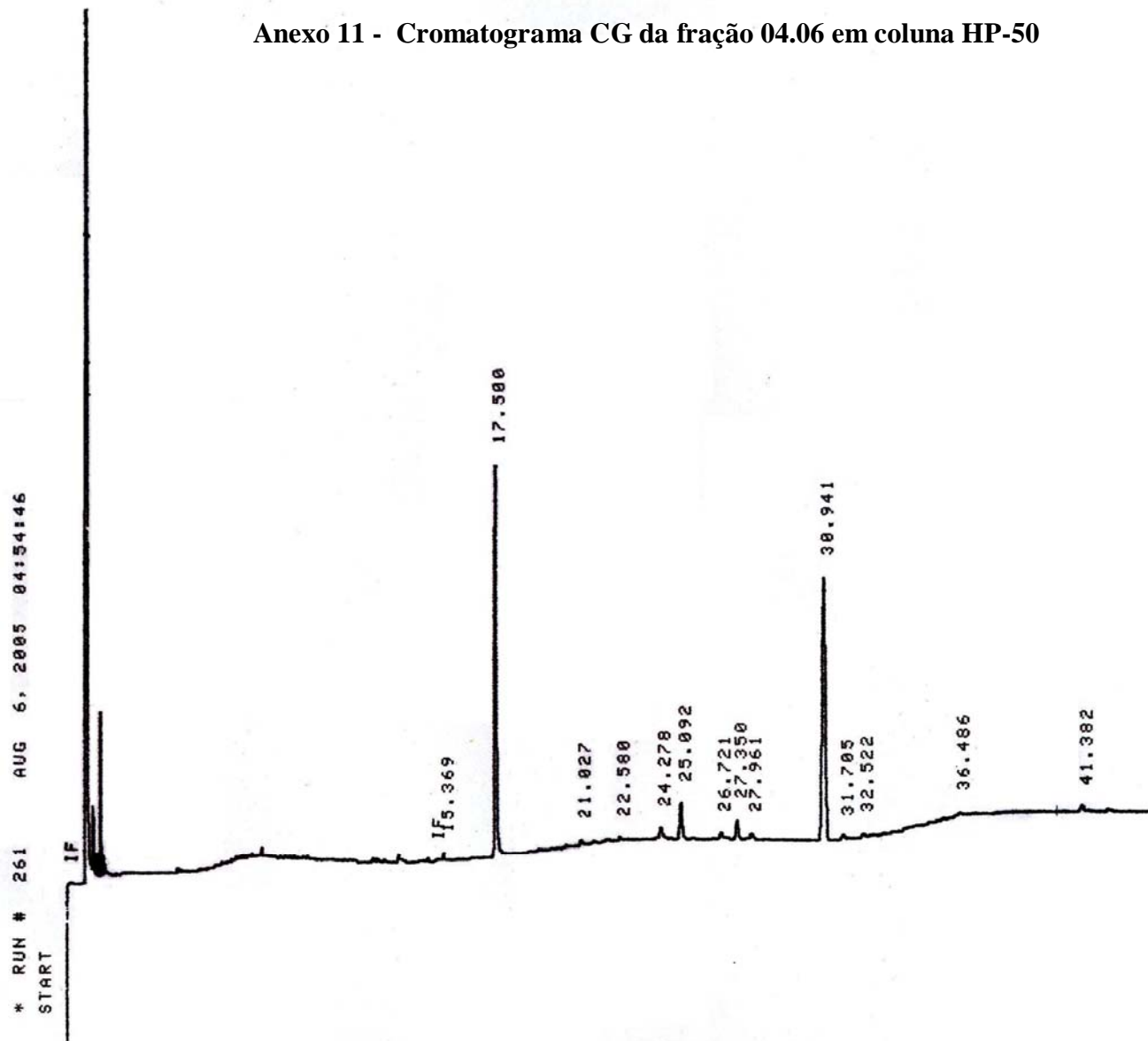
Anexo 9 - Cromatograma CG da fração 04.08 em coluna HP-1



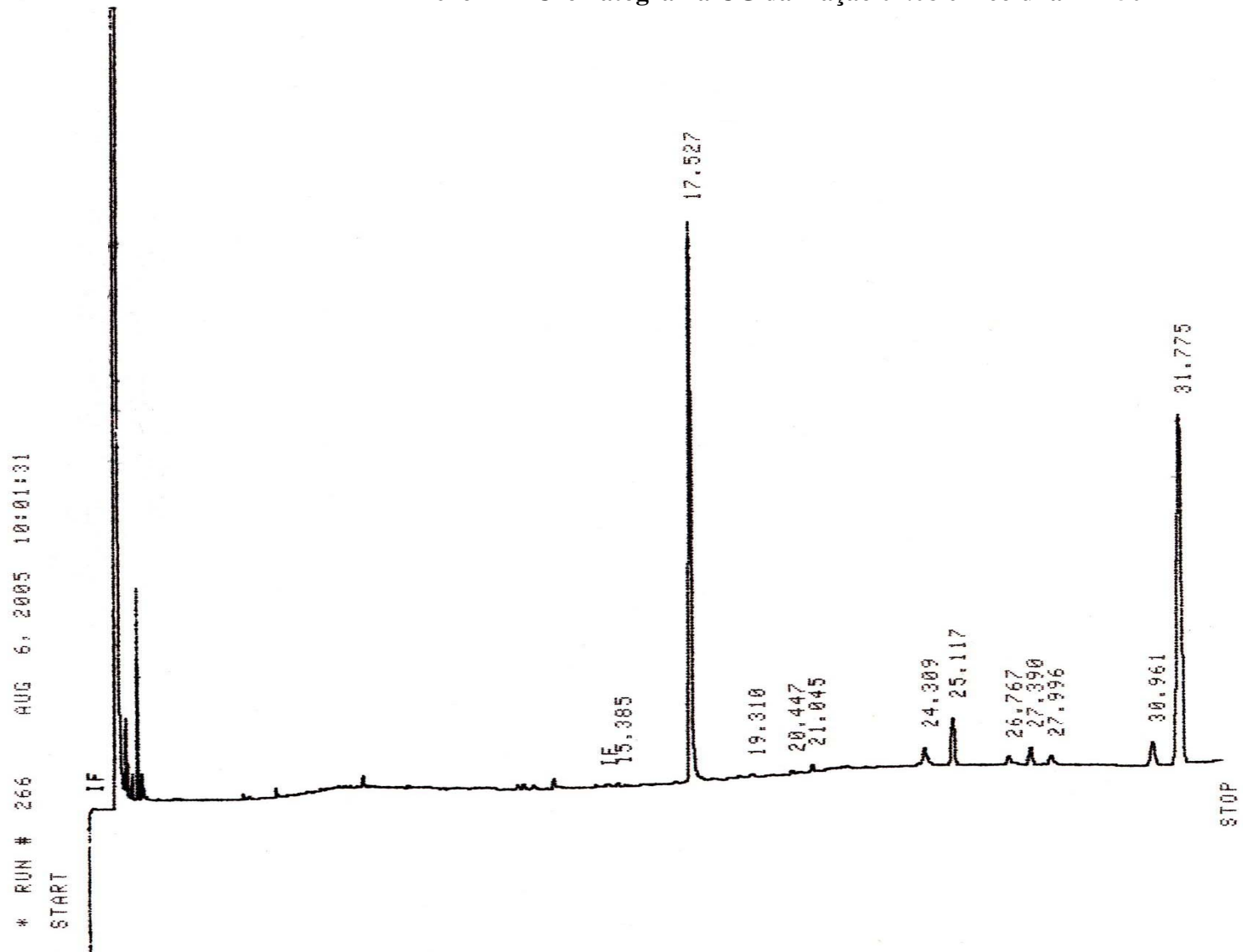
Anexo 10 - Cromatograma CG dos padrões de triterpenos em coluna HP-50



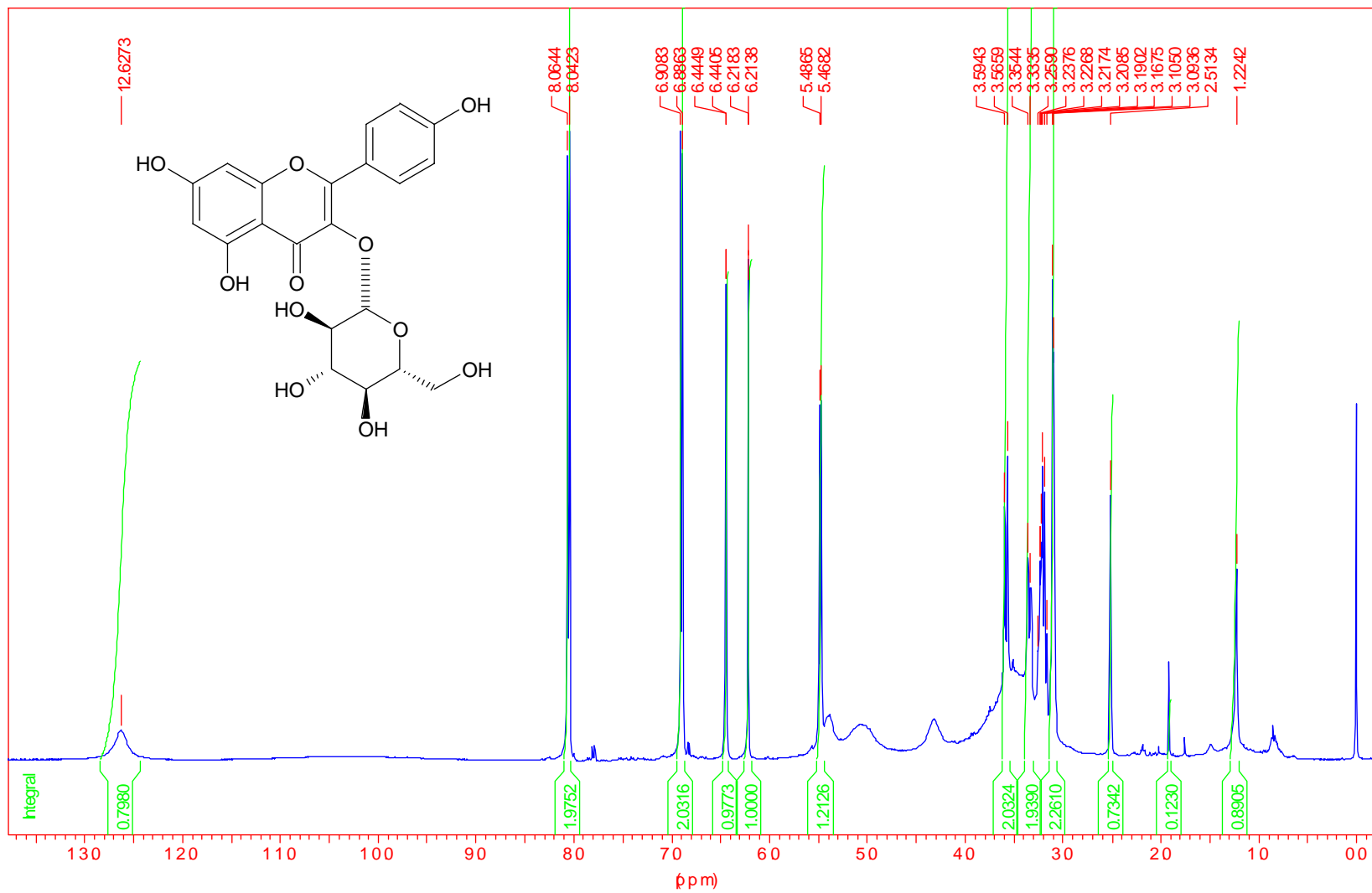
Anexo 11 - Cromatograma CG da fração 04.06 em coluna HP-50



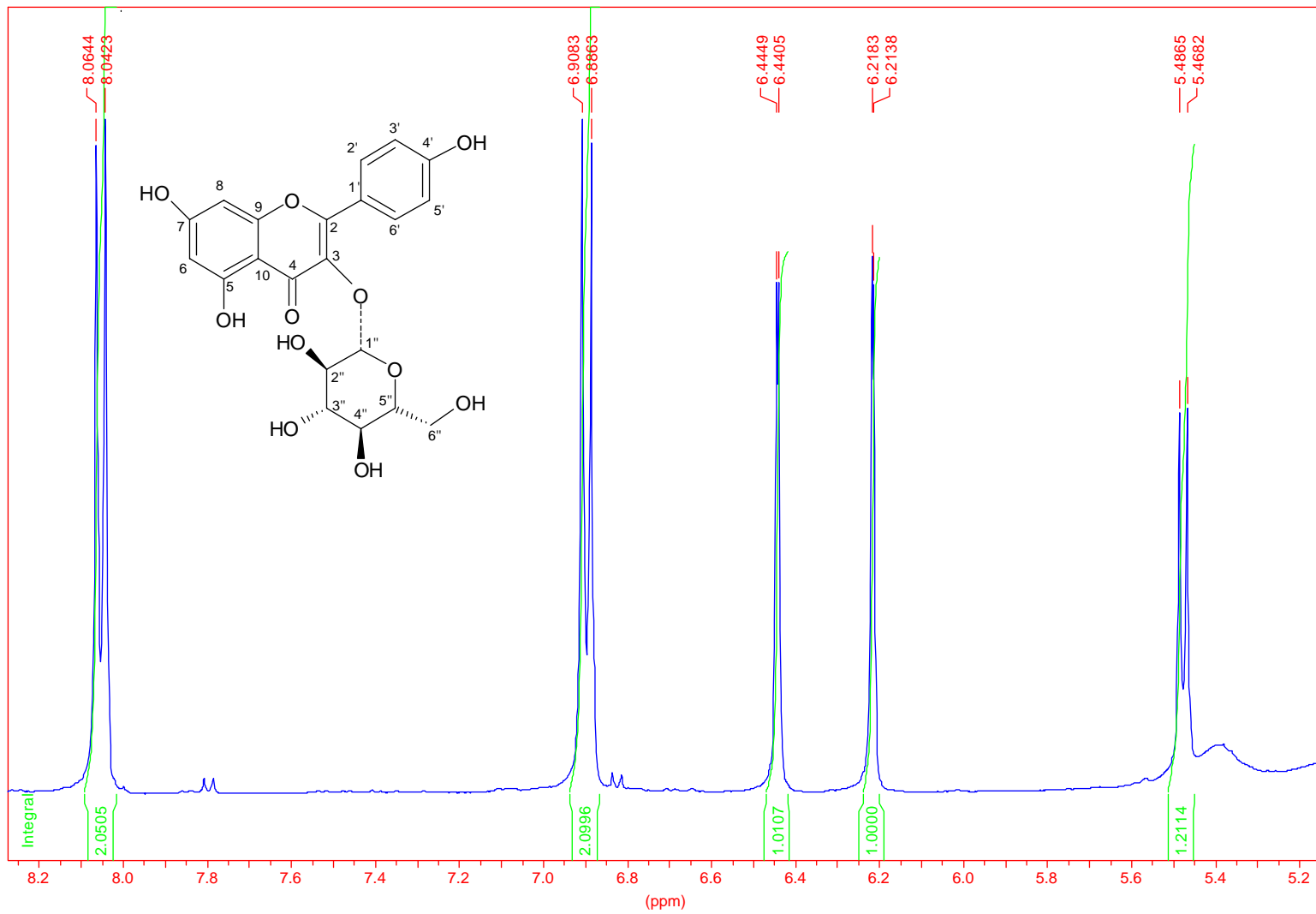
Anexo 12 – Cromatograma CG da fração 04.08 em coluna HP-50



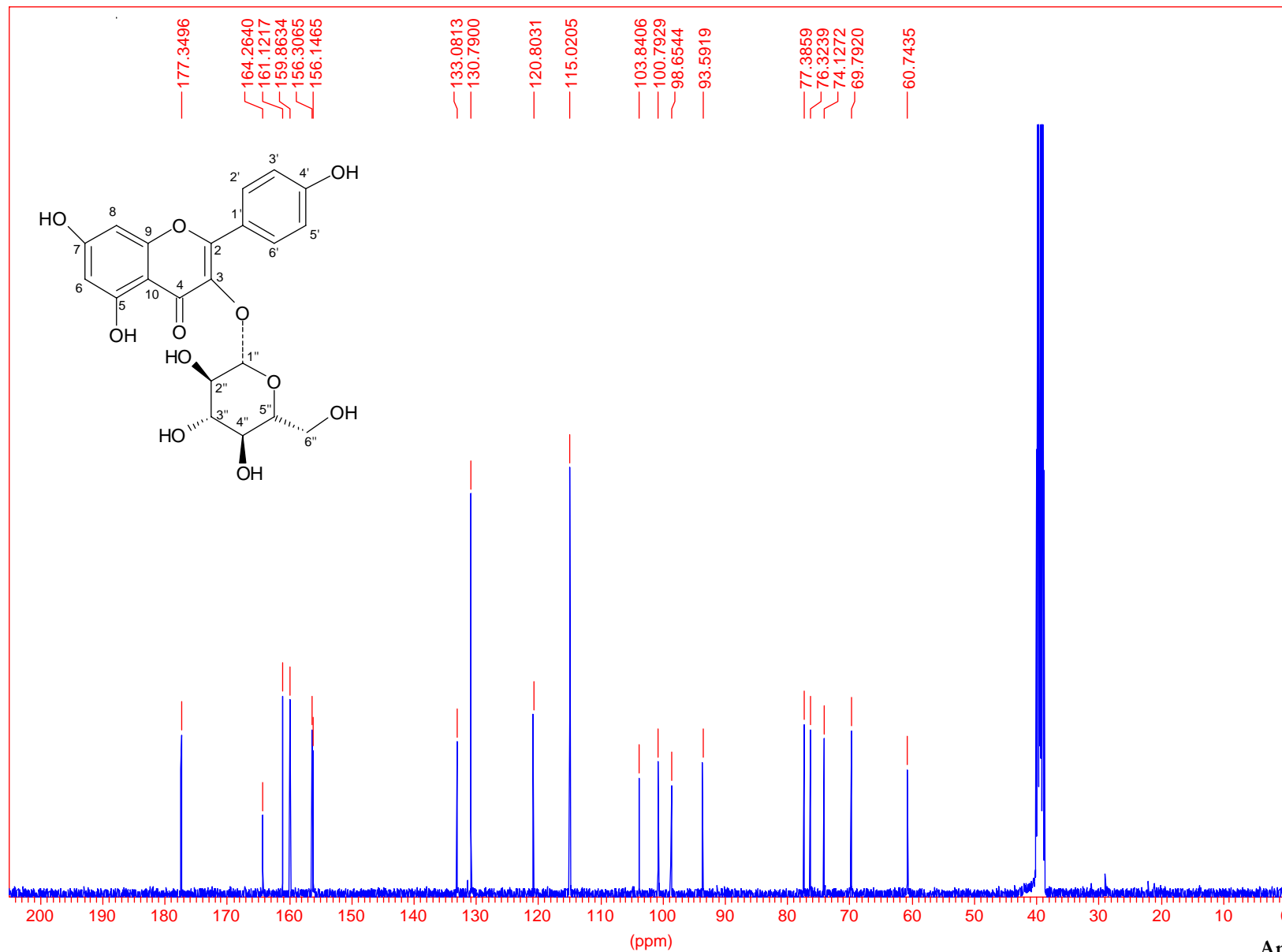
Anexo 13.1 – Espectro RMN <sup>1</sup>H da substância PA.06 (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS)



Anexo 13.2 – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância PA.06 (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS)

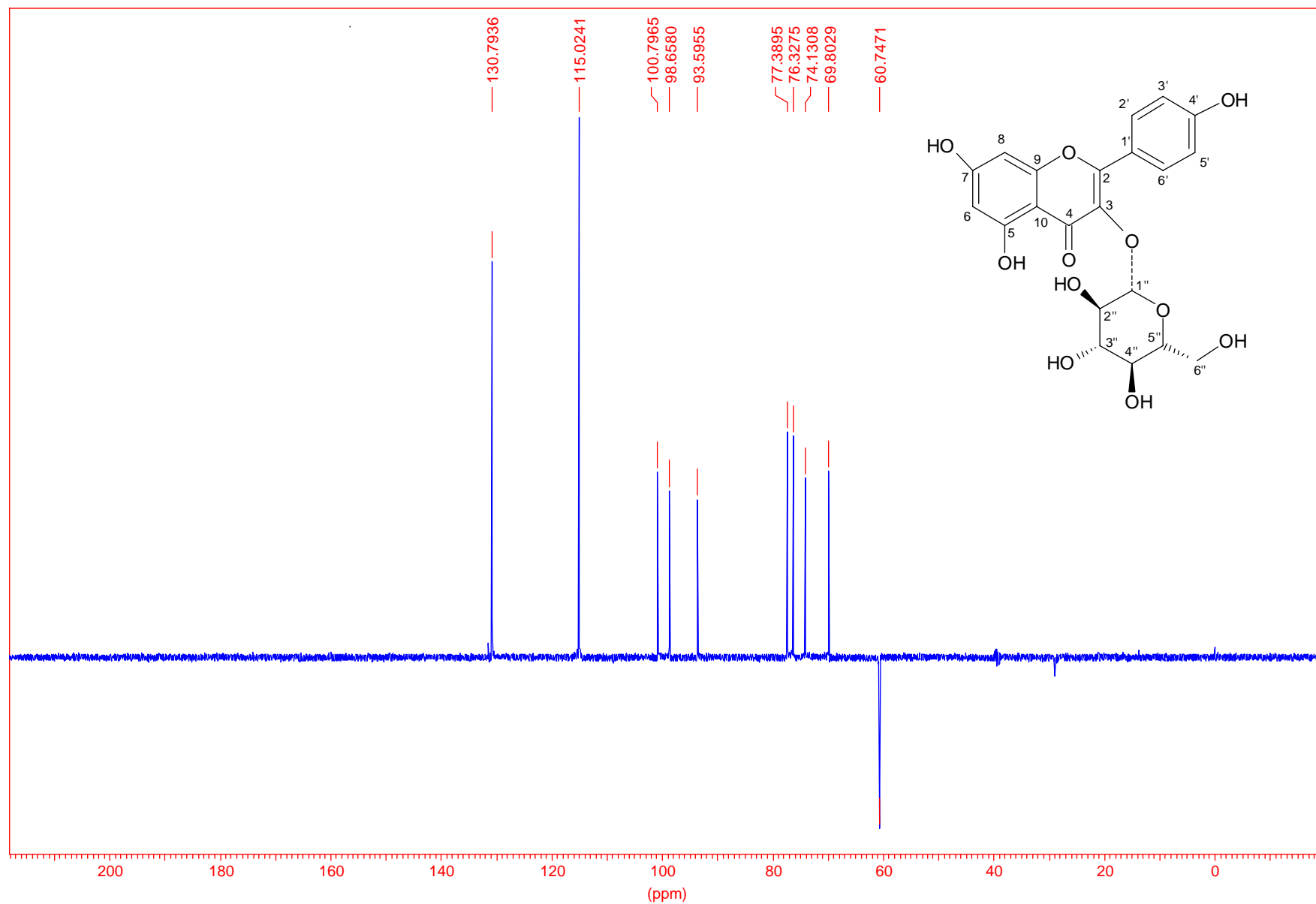


Anexo 14 - Espectro RMN <sup>13</sup>C da substância PA.06 (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS)

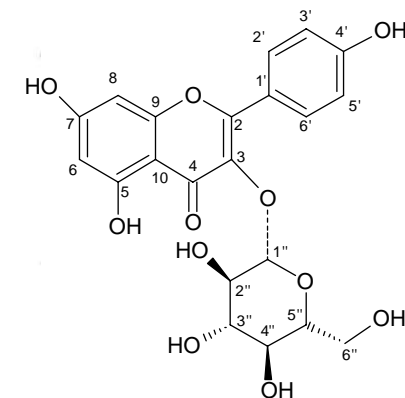
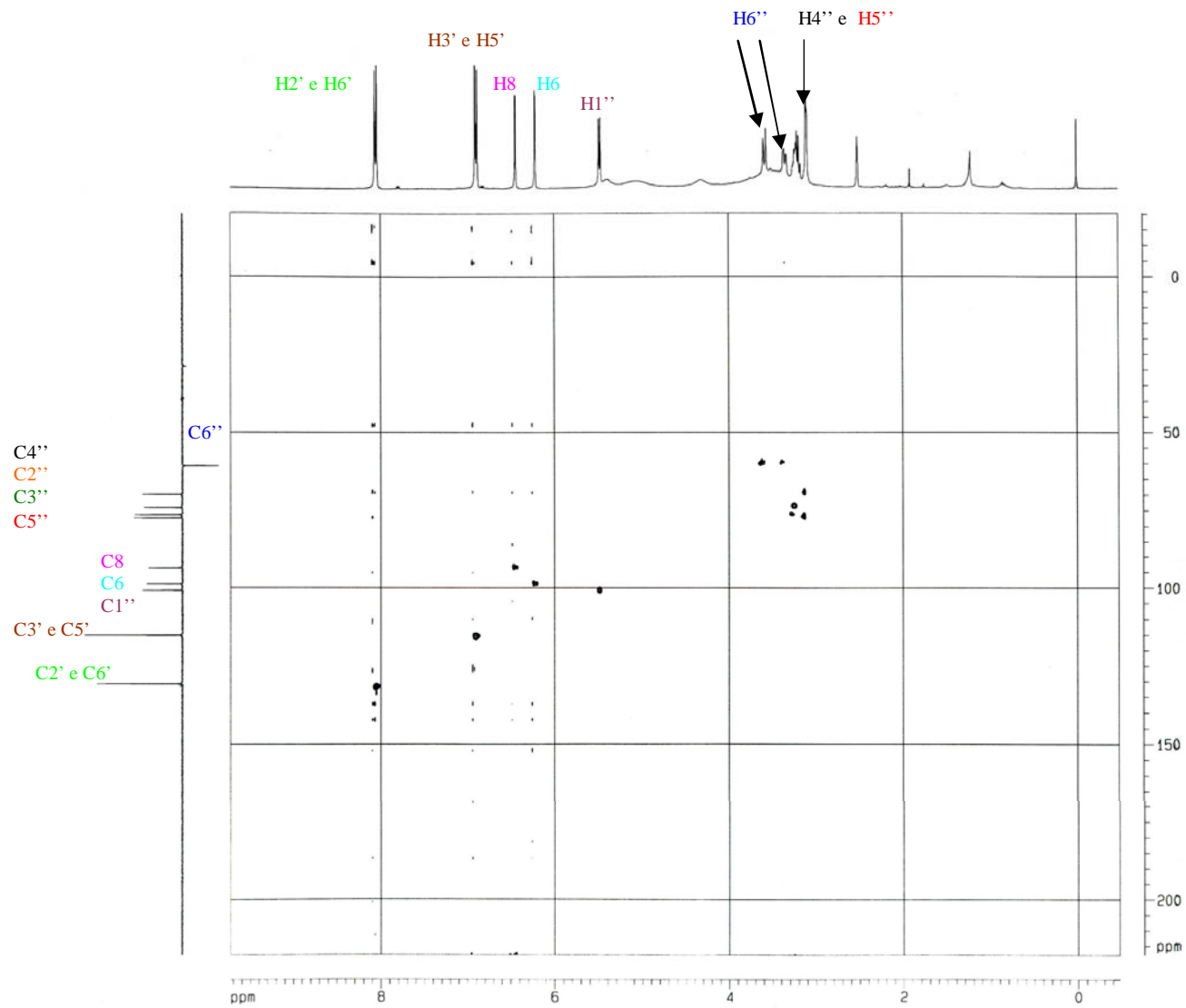




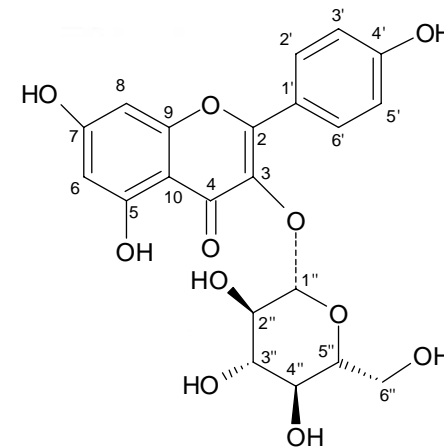
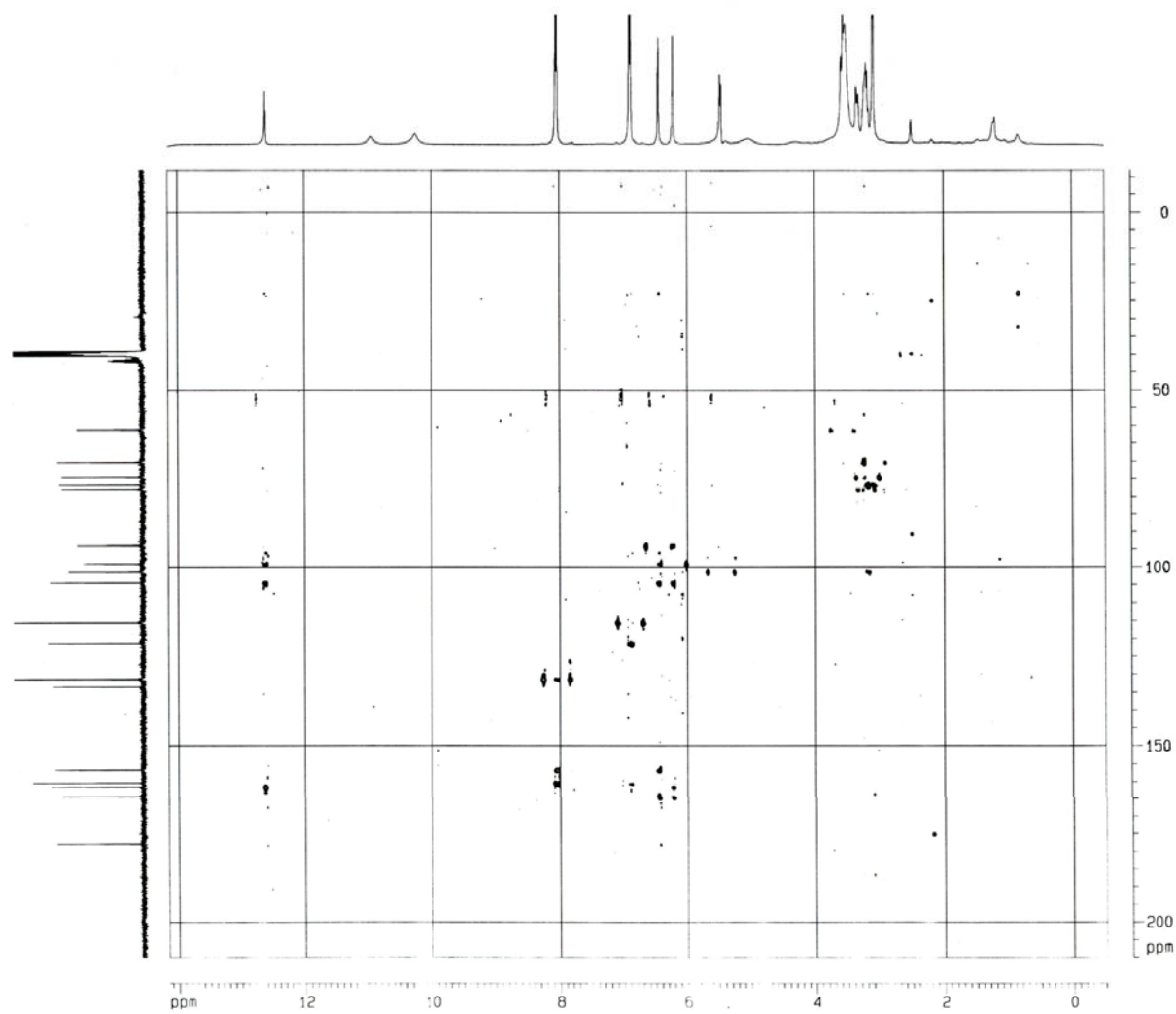
Anexo 15 –Espectro RMN 13C DEPT 135° da substância PA.06 (100 MHz, DMSO-d6, TMS)



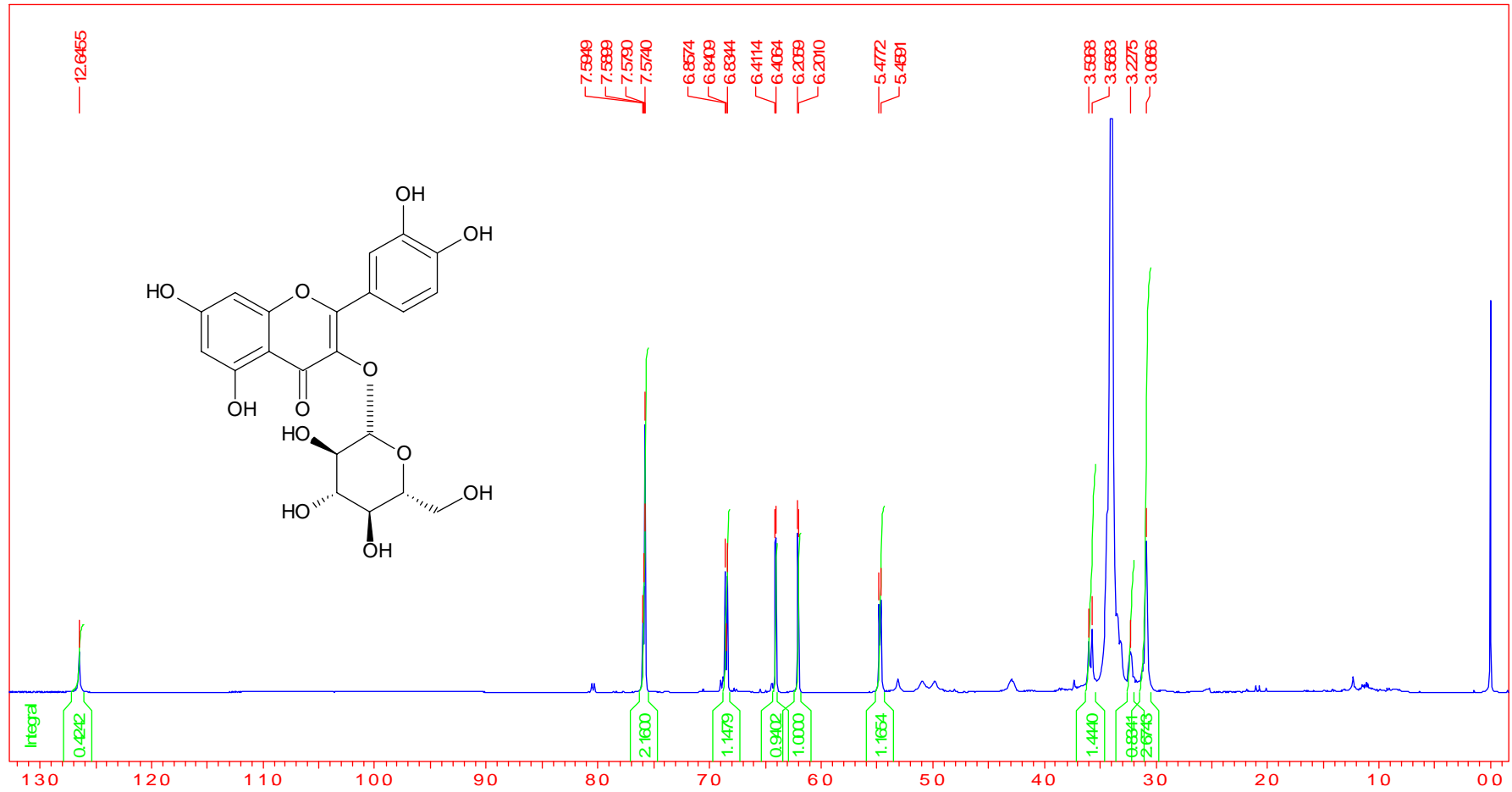
Anexo 16 - HMQC c/ DEPT 135° da substância PA.06



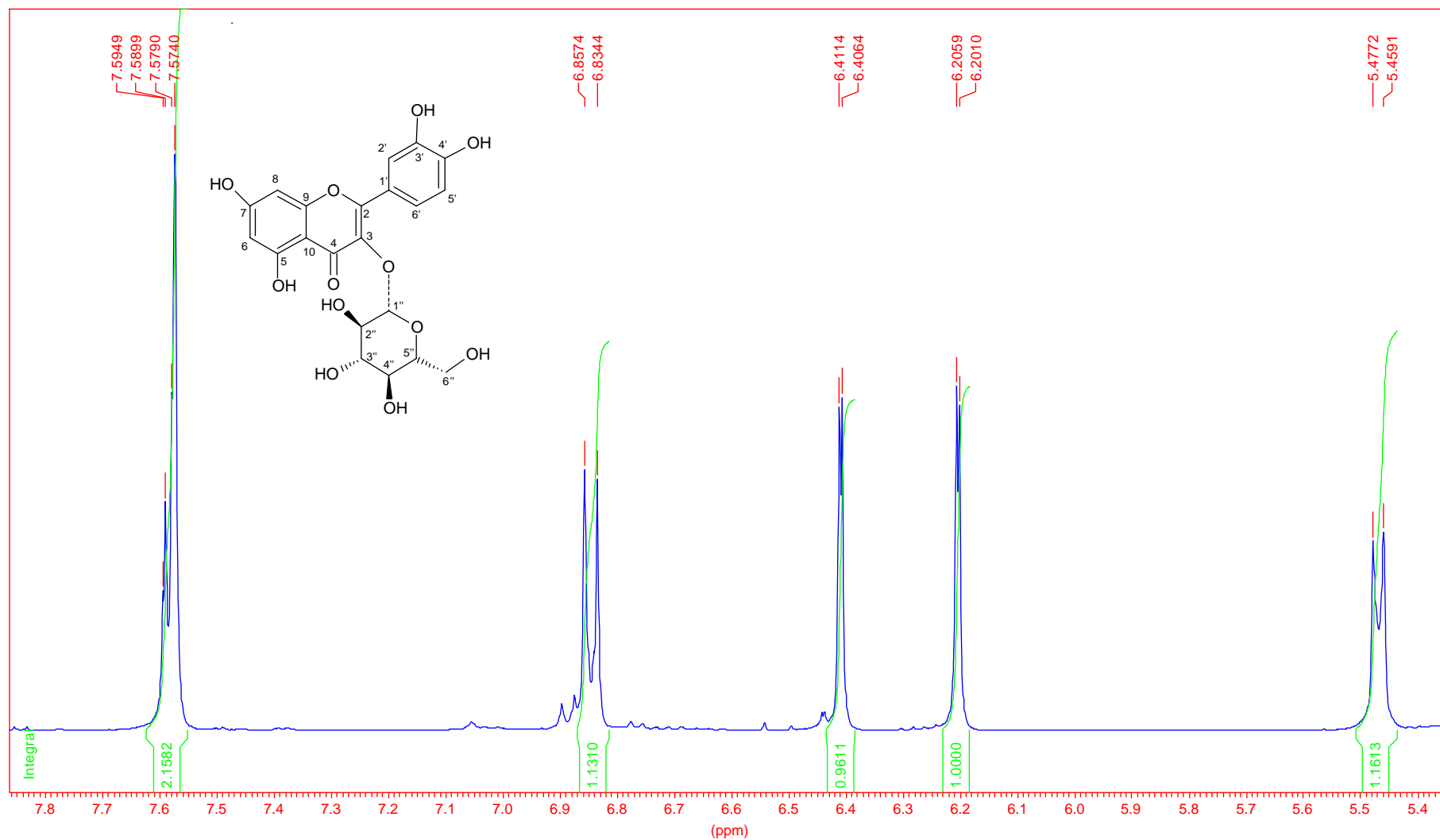
Anexo 17 – Espectro de HMBC da substância PA.06 (DMSO-d<sub>6</sub>)



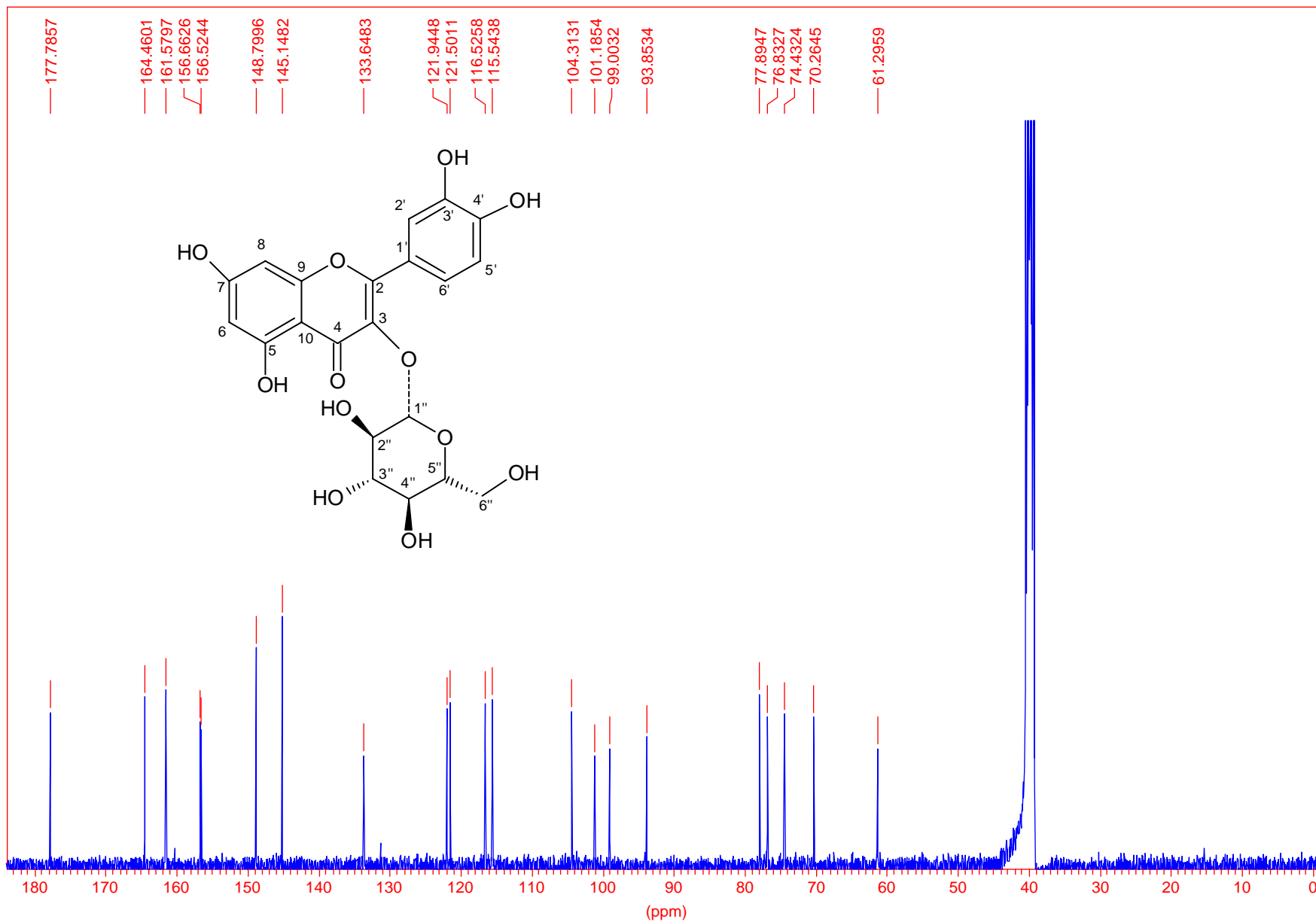
Anexo 18.1 – Espectro RMN <sup>1</sup>H da substância PA-07 (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS)



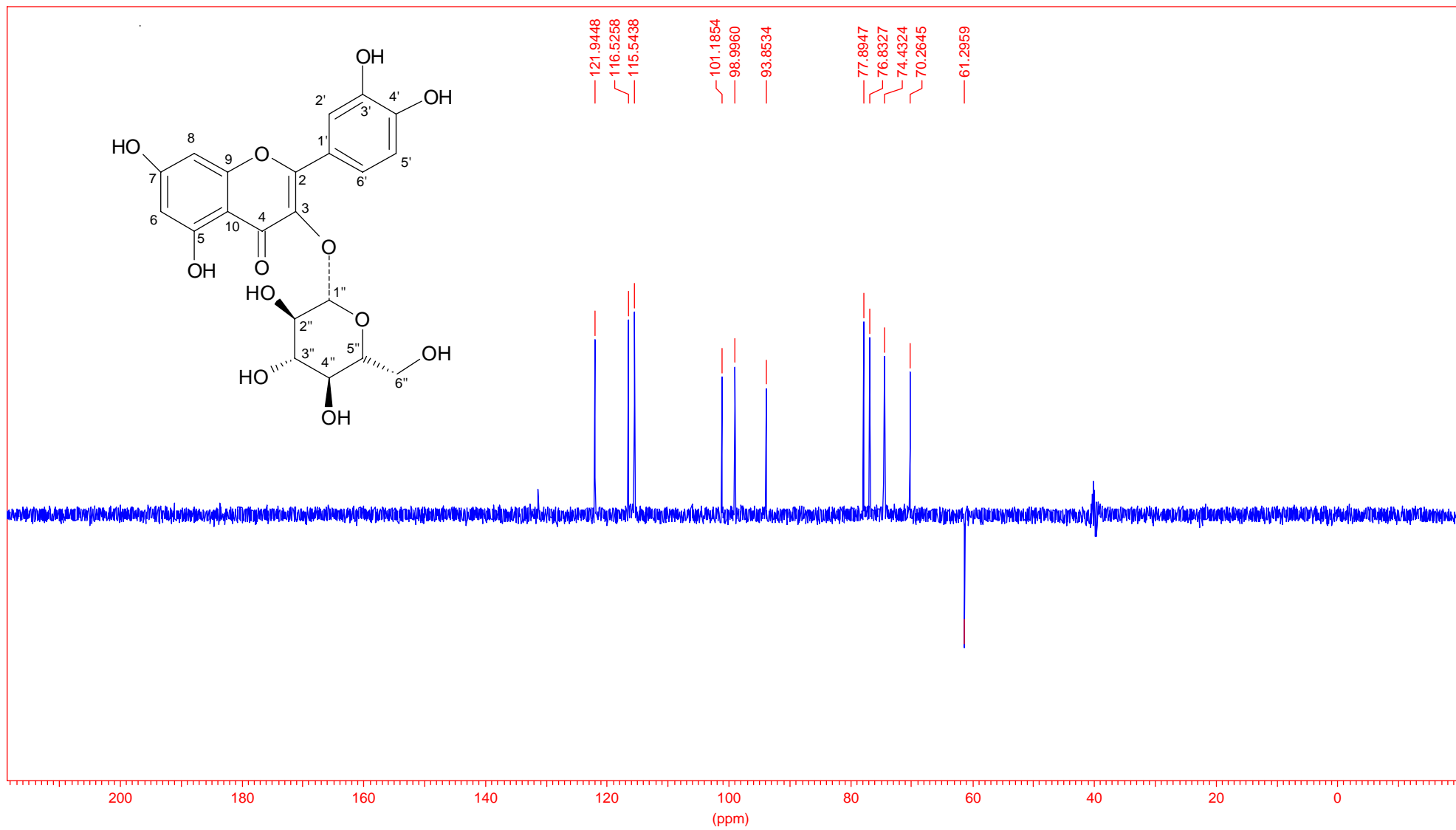
Anexo 18.2 - Expansão do espectro RMN <sup>1</sup>H da substância PA-07 (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS)



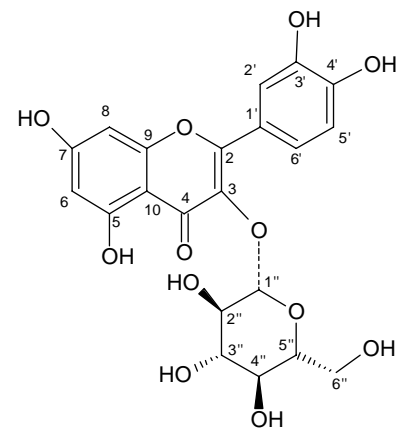
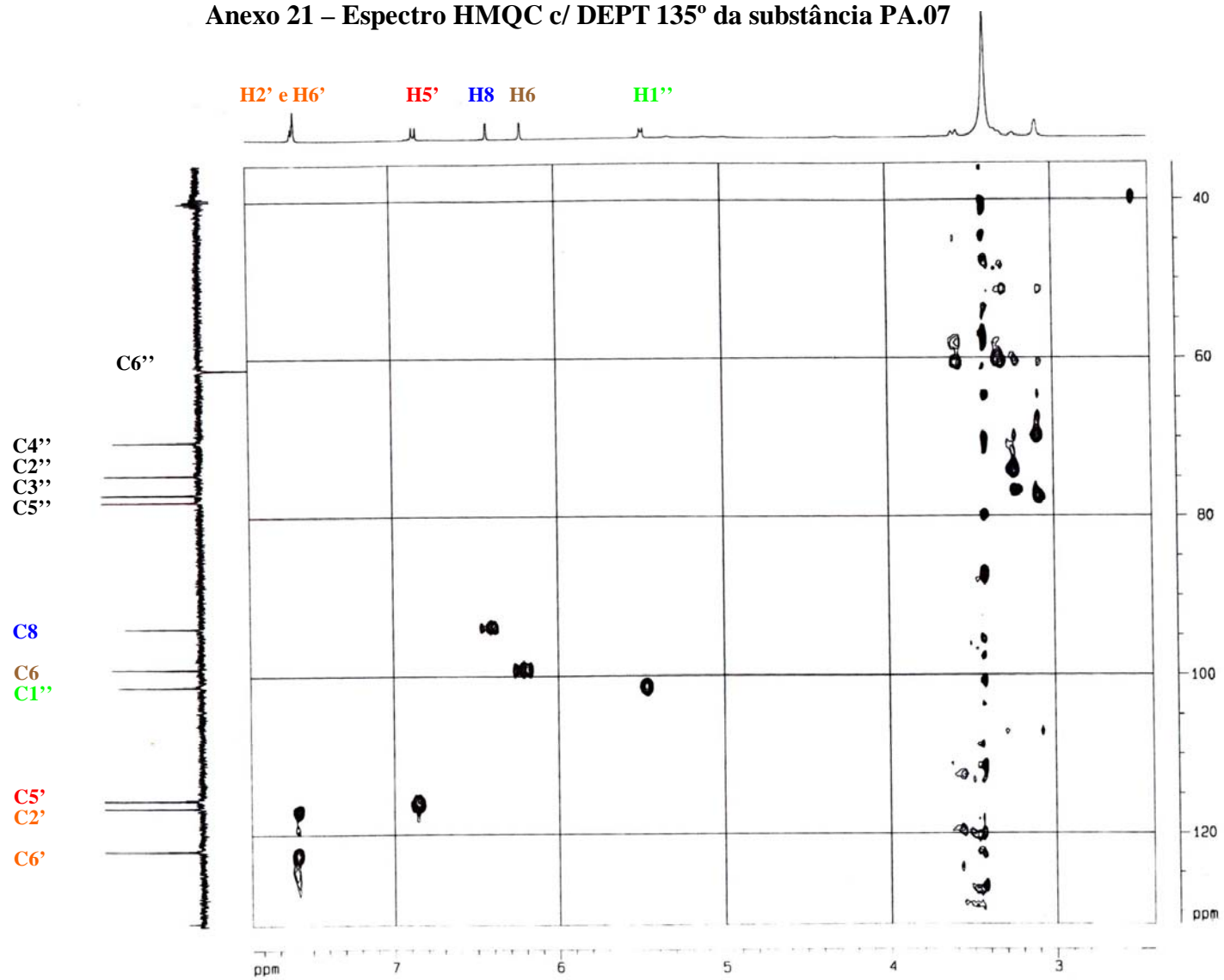
Anexo 19 – Espectro RMN <sup>13</sup>C da substância PA-07 (100 MHz, DMSO-d6, TMS)



Anexo 20 – Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° da substância PA-07 (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS)

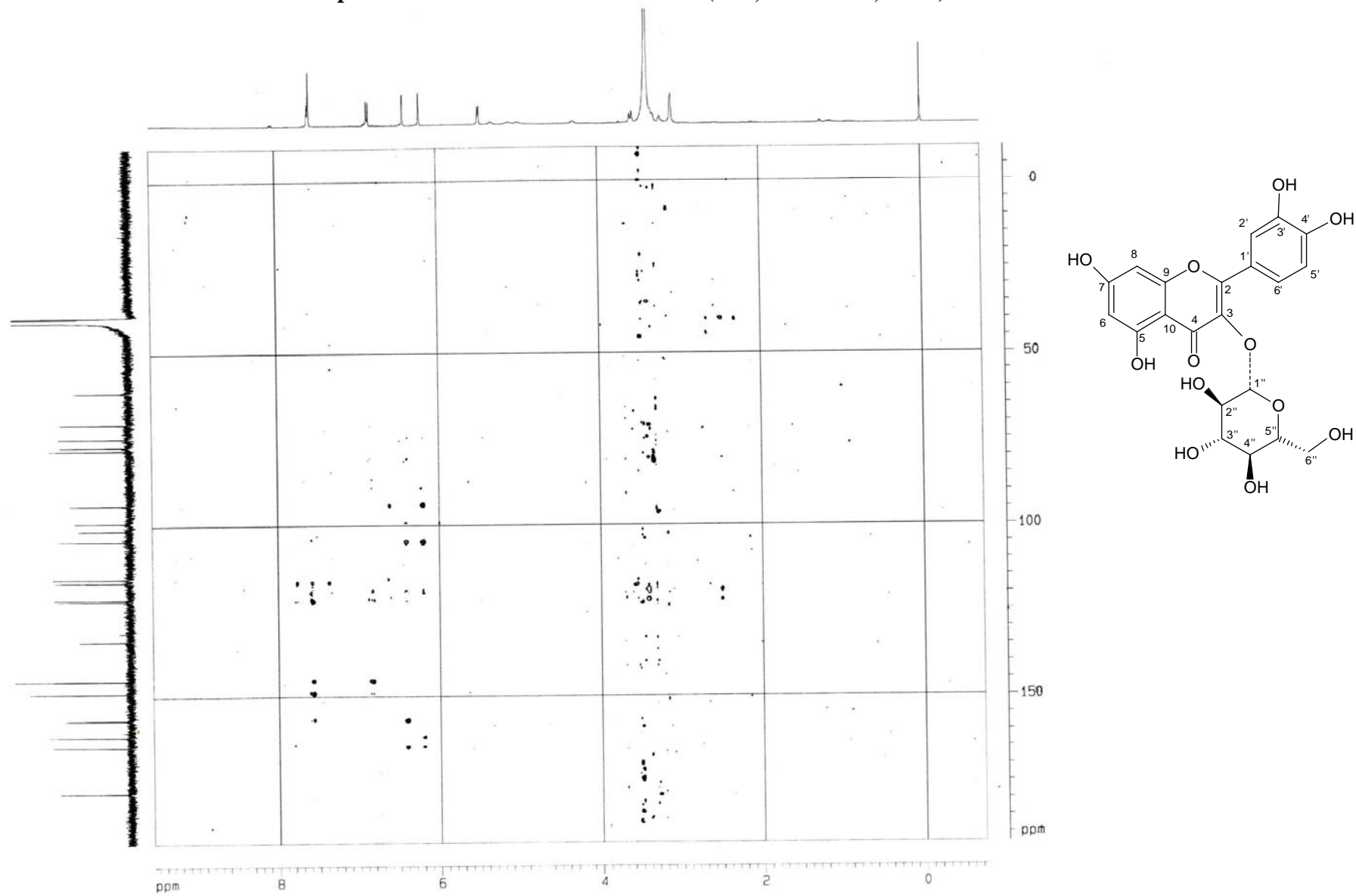


Anexo 21 – Espectro HMQC c/ DEPT 135° da substância PA.07

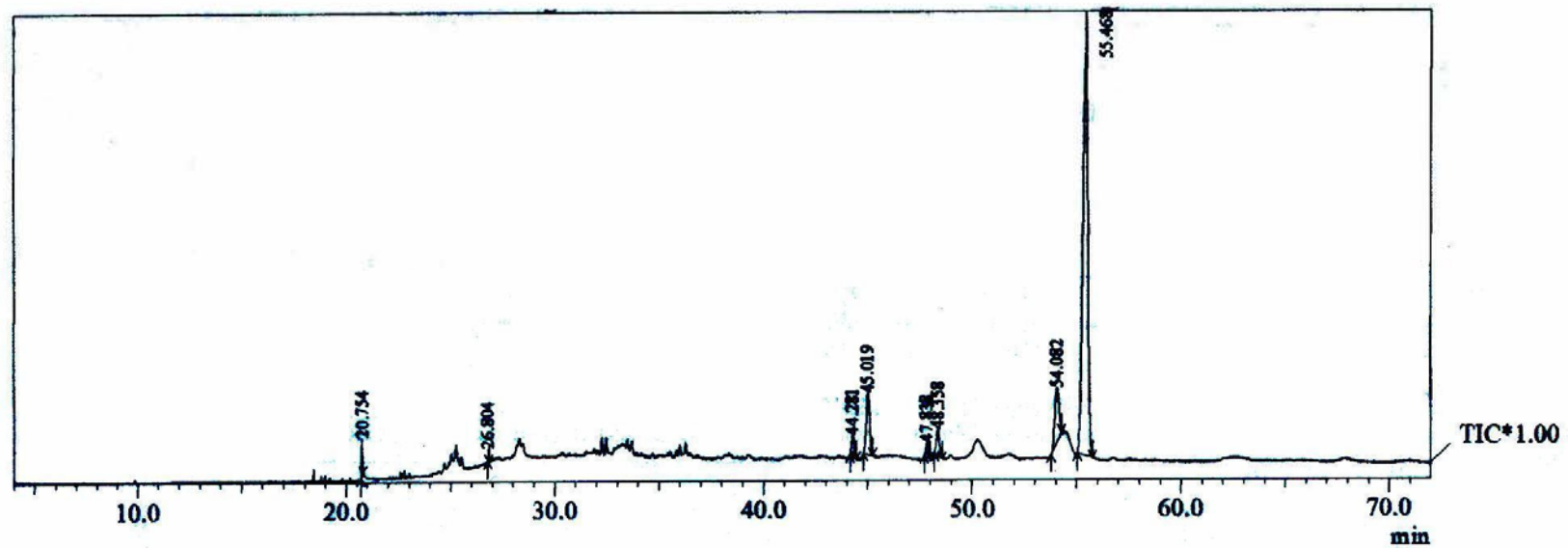




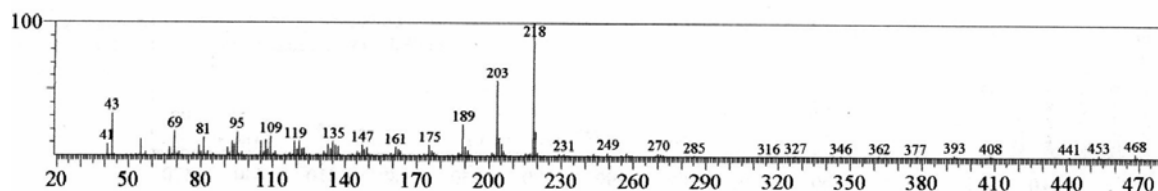
Anexo 22 - Espectro HMBC da substância PA.07 (8Hz, DMSO-d6, TMS)



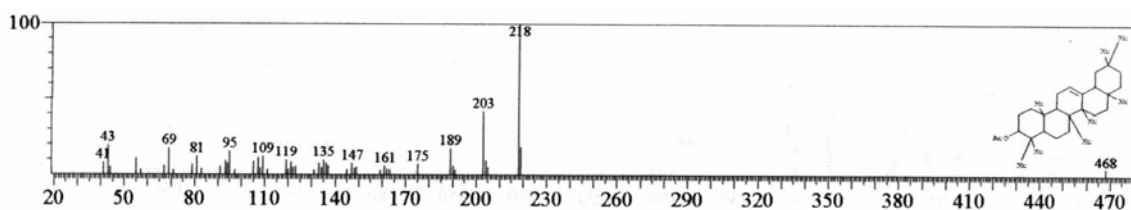
**Anexo 23.1 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 5 obtida a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii*.**



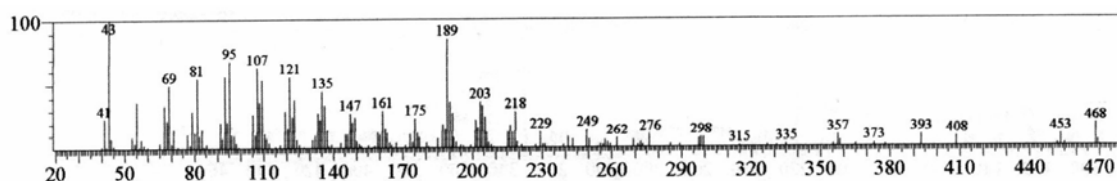
### Anexo 23.2 - Espectros IE-EM da fração 5 obtida a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii*.



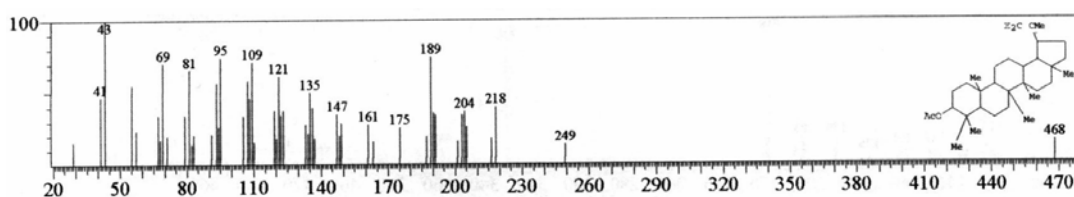
Espectro EM do pico com tempo de retenção de 45,019 minutos



Espectro EM da substância acetato de  $\beta$ -amirina (biblioteca padrões do laboratório)

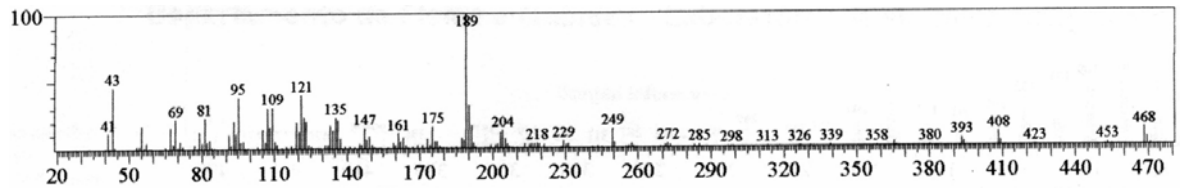


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 48,358 minutos

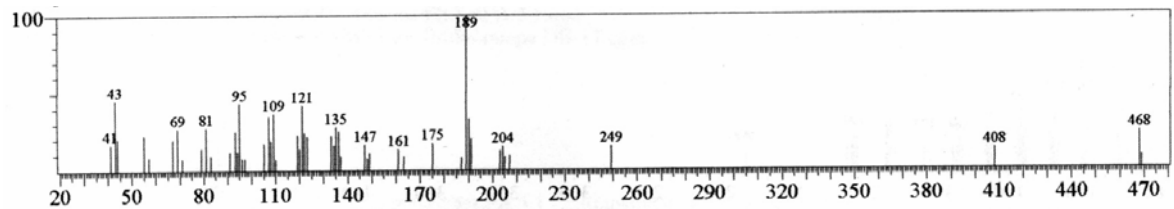


Espectro EM da substância acetato de lupeol (biblioteca padrões do laboratório)

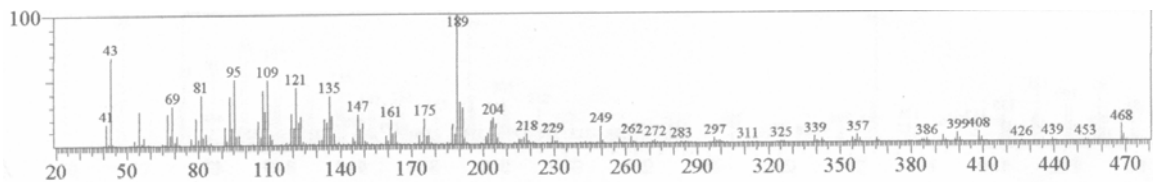
**Anexo 23.3 - Espectros IE-EM da fração 5 obtida a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii* (continuação).**



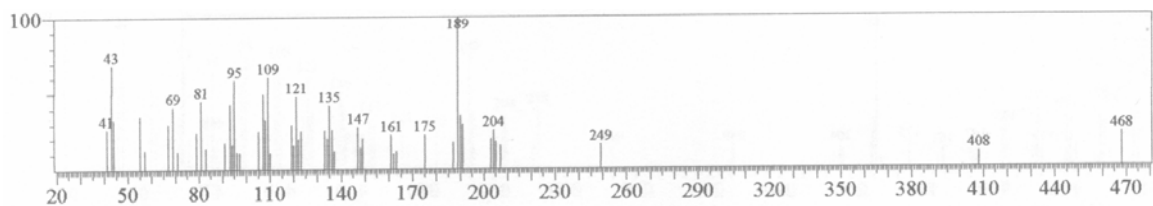
Espectro EM do pico com tempo de retenção de 54,083 minutos



Espectro EM da substância acetato de pseudo taraxasterol (biblioteca padrões do laboratório)

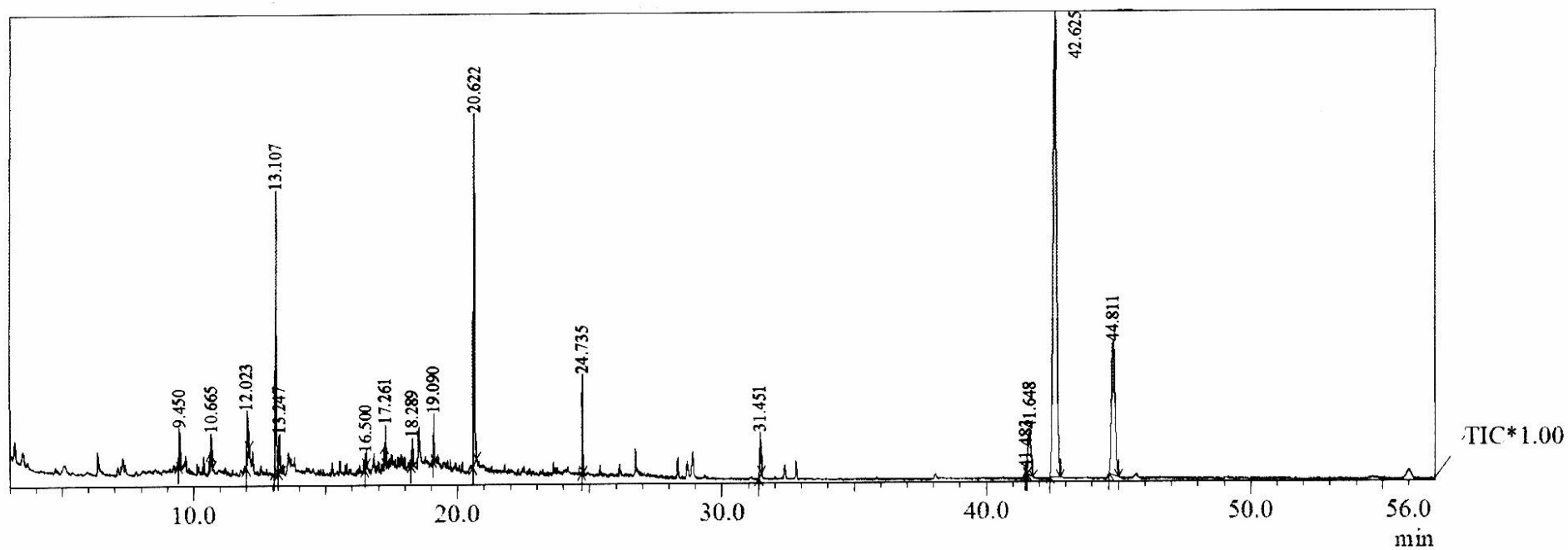


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 55,467 minutos

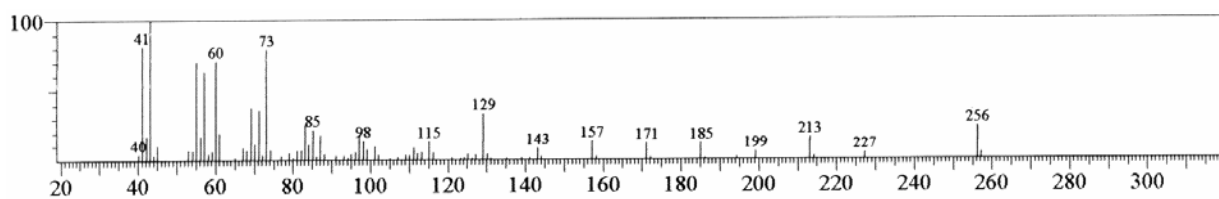


Espectro EM da substância acetato de taraxasterol (biblioteca padrões do laboratório)

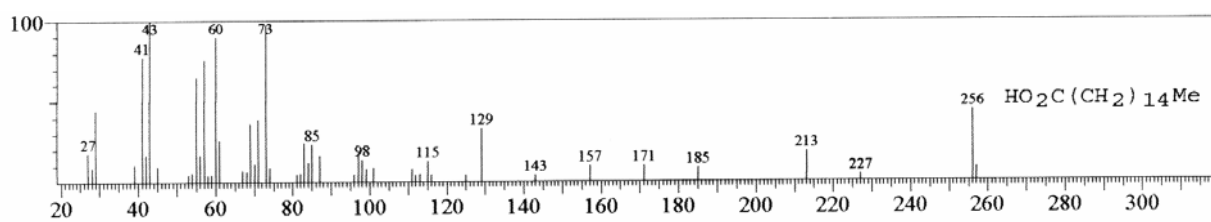
**Anexo 24.1 - Cromatograma da análise em CG-EM da fração 10 obtida a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii*.**



**Anexo 24.2 - Espectros IE-EM da fração 10 obtida a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii*.**

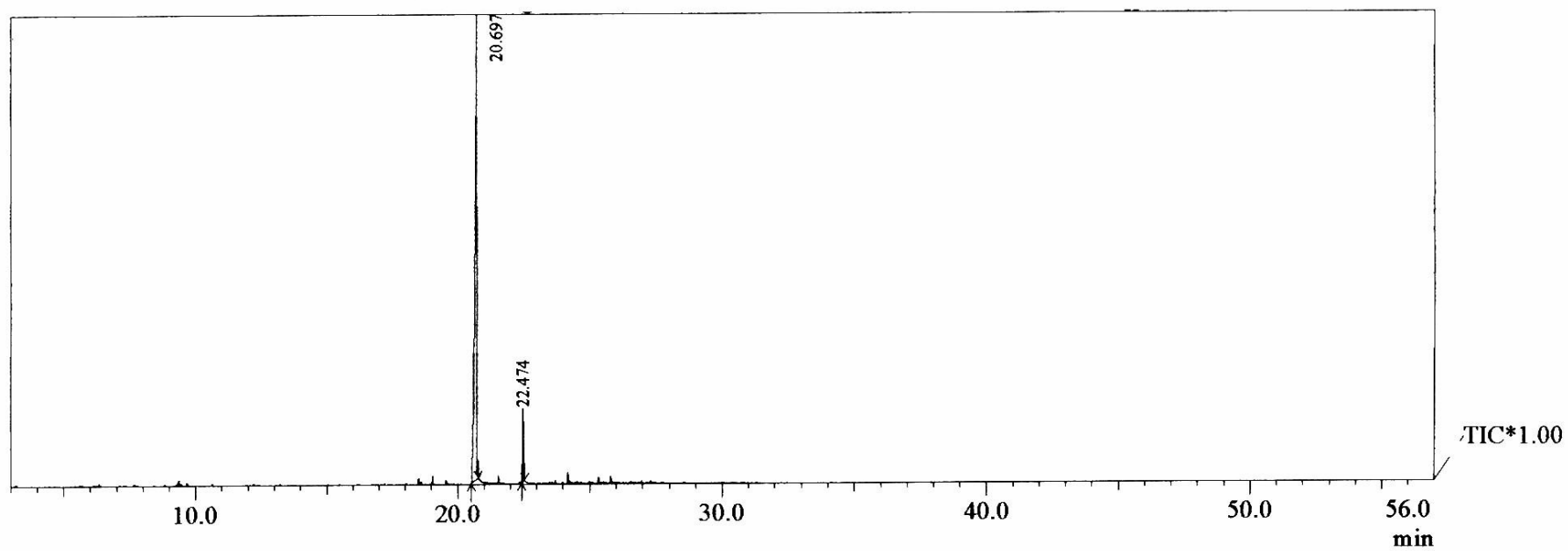


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 20,622 minutos

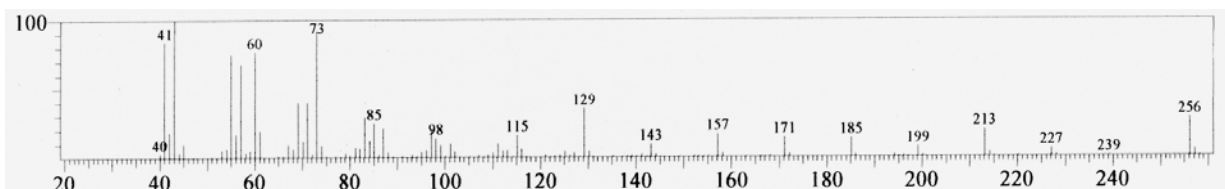


Espectro EM da substância ácido palmítico (biblioteca Wiley 7)

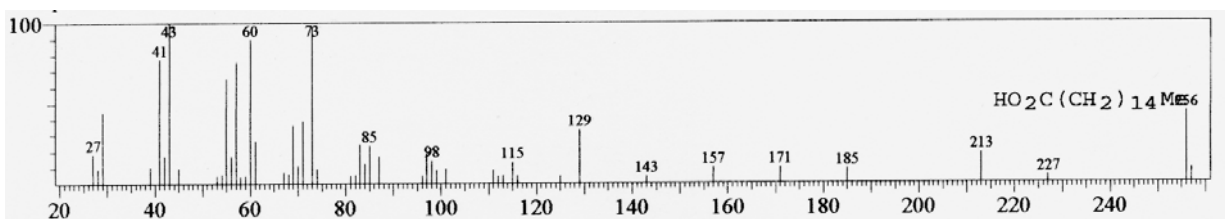
**Anexo 25.1 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 11 obtida a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii*.**



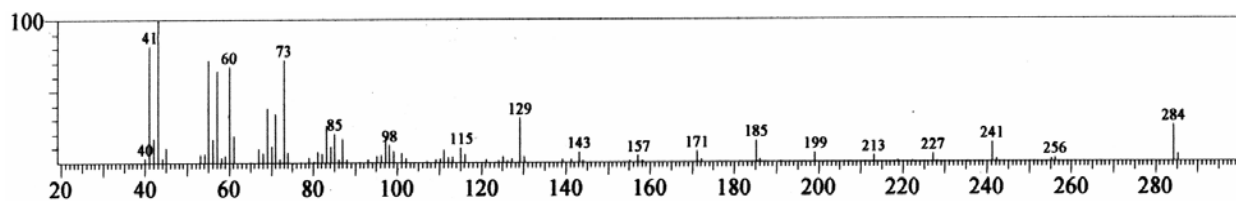
**Anexo 25.2 - Espectros IE-EM da fração 11 obtida a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii*.**



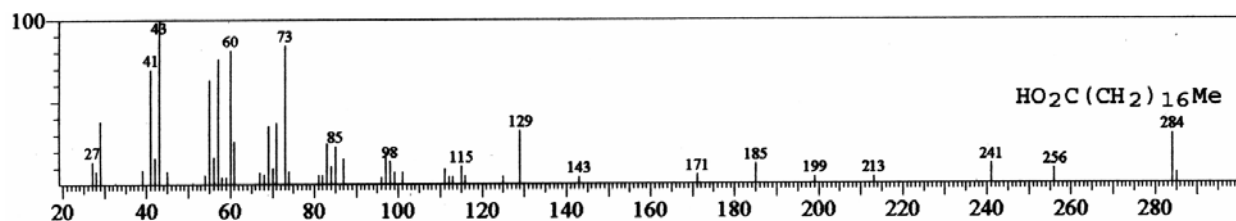
Espectro EM do pico com tempo de retenção de 20.697 minutos



Espectro EM da substância ácido palmítico (biblioteca Wiley 7)



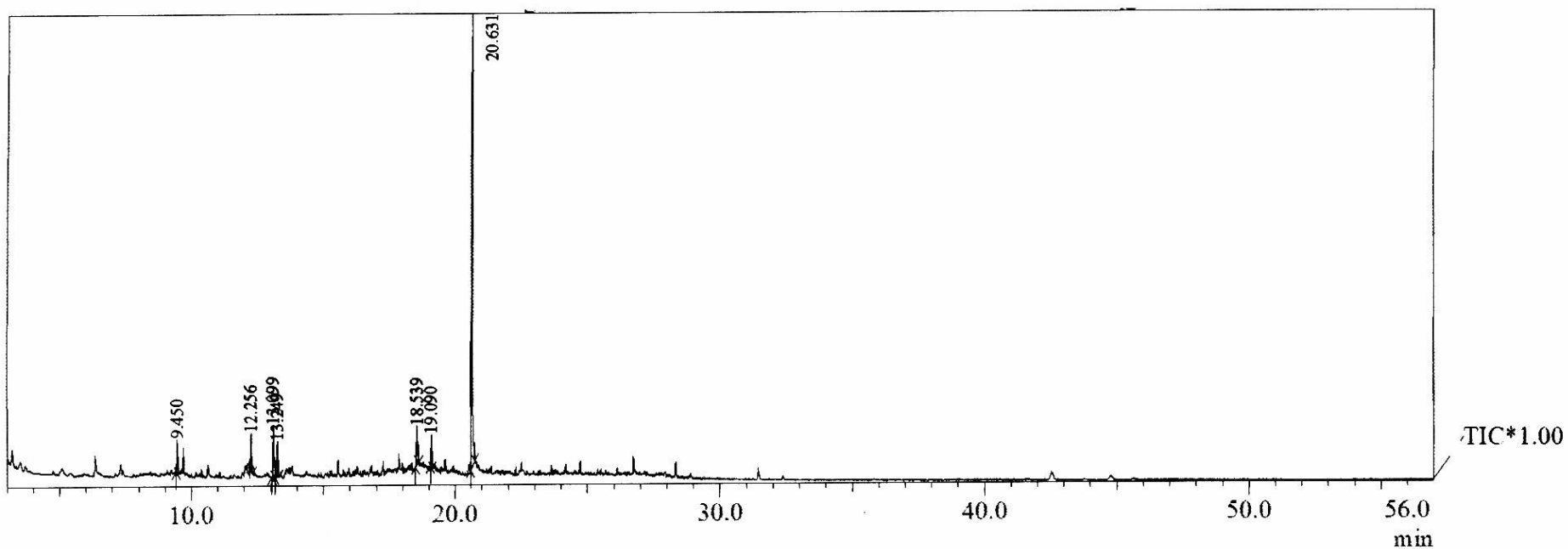
Espectro EM do pico com tempo de retenção de 22.474 minutos



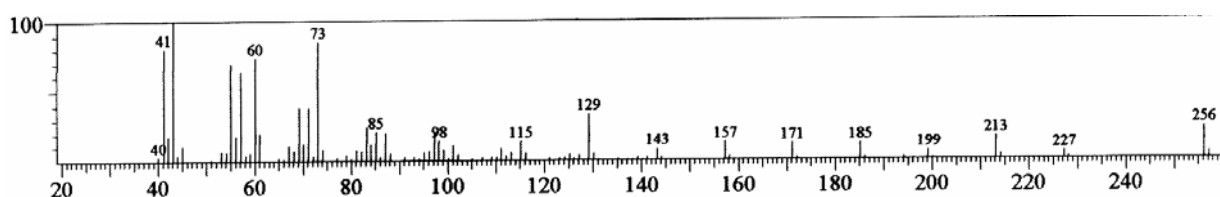
Espectro EM da substância ácido esteárico (biblioteca Wiley 7)



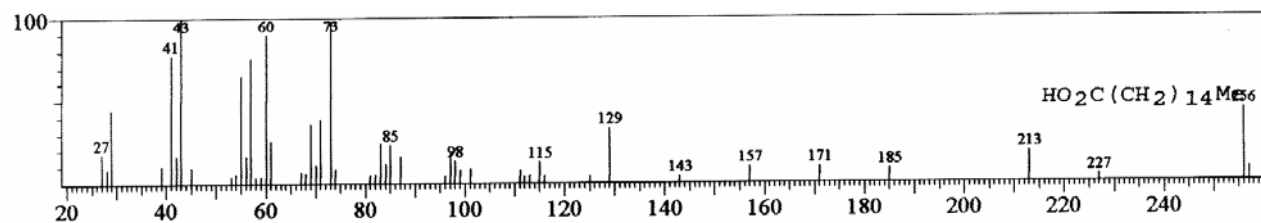
**Anexo 26.1 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 17 obtida a partir do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii*.**



**Anexo 26.2 – Espectros IE-EM da fração 17 obtida a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii*.**

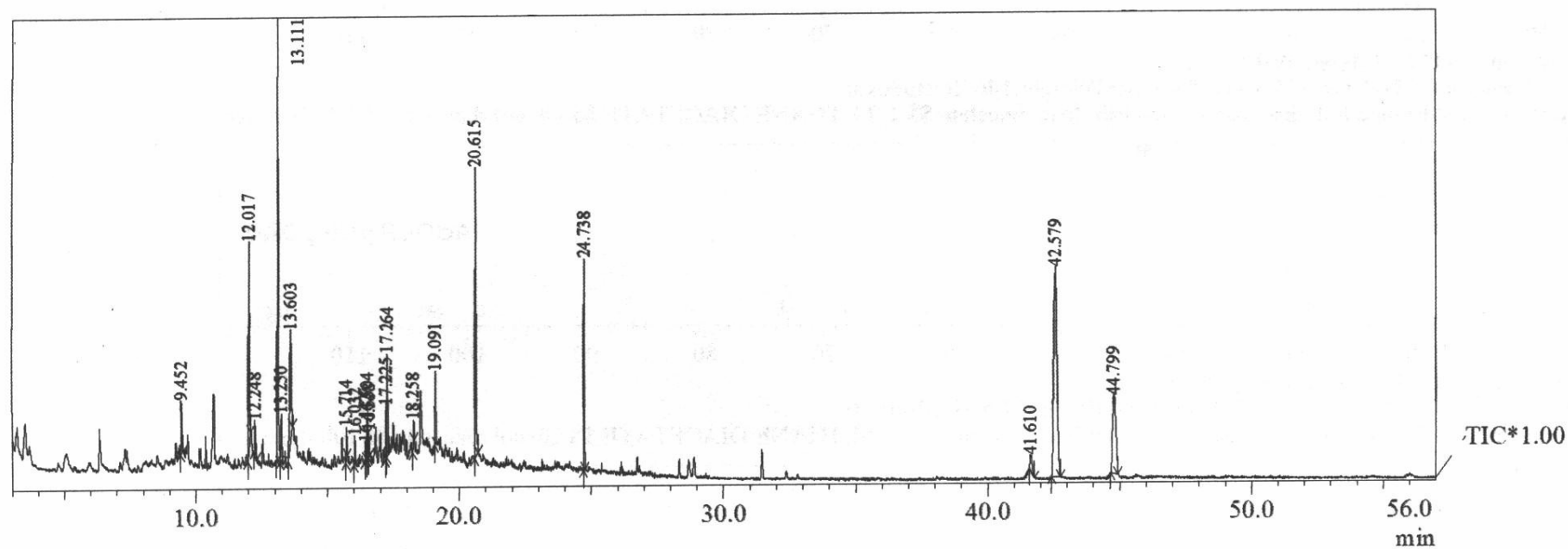


Espectro de EM do pico com tempo de retenção de 20,631 minutos

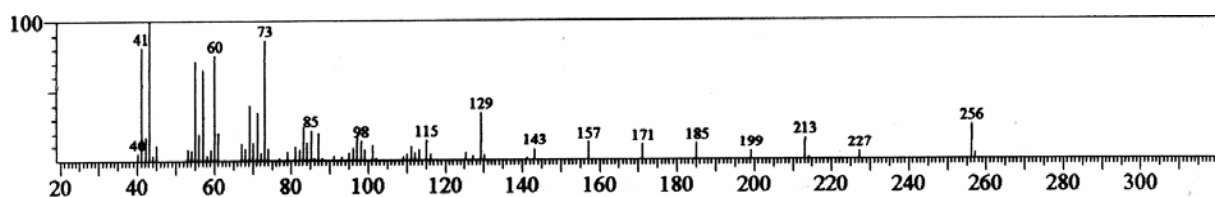


Espectro de EM da substância ácido palmítico (biblioteca padrões do laboratório)

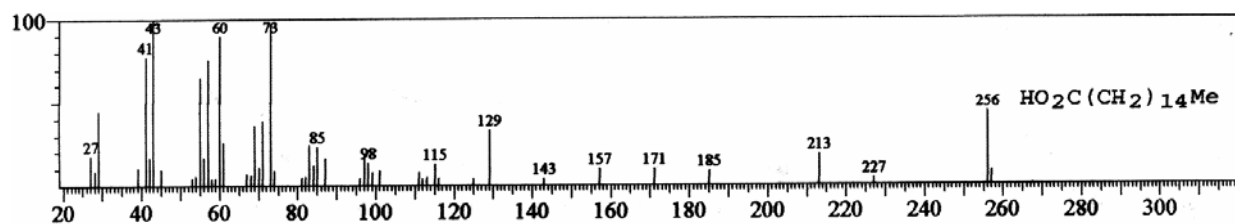
**Anexo 27.1 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 24 obtida a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii*.**



**Anexo 27.2 – Espectros IE-EM da fração 24 obtida a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii*.**

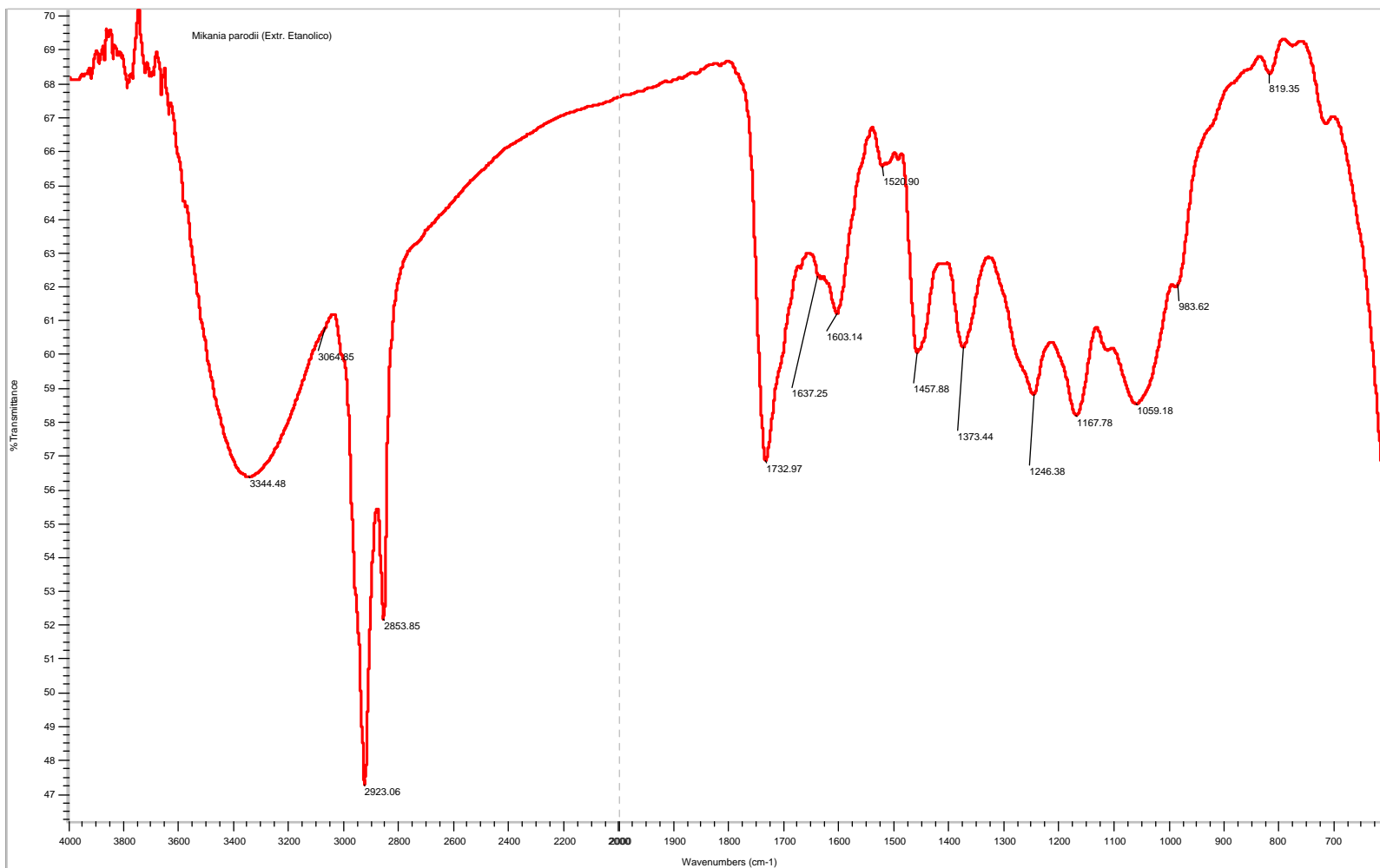


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 20.615 minutos

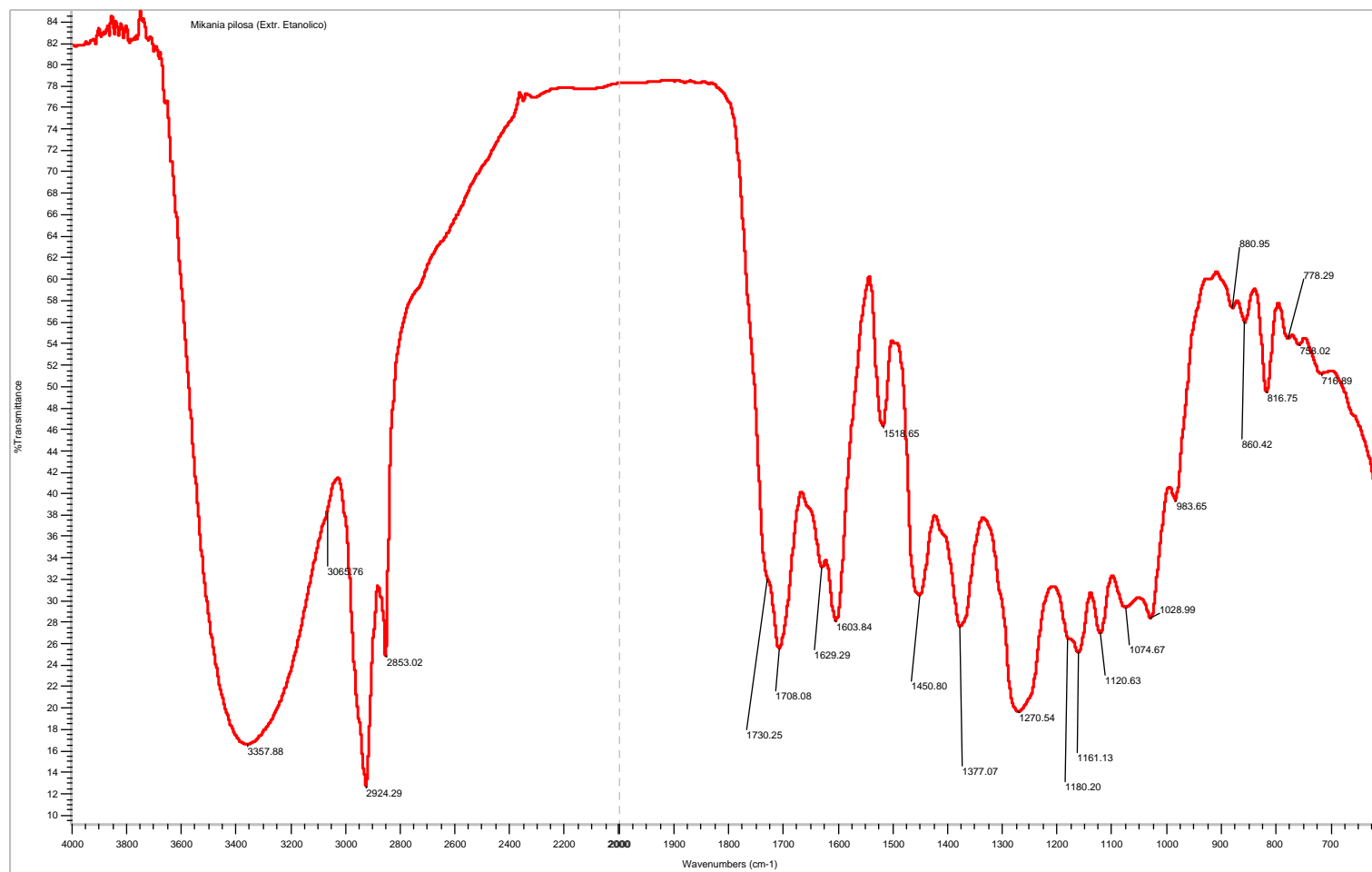


Espectro EM da substância ácido palmítico (biblioteca padrões do laboratório)

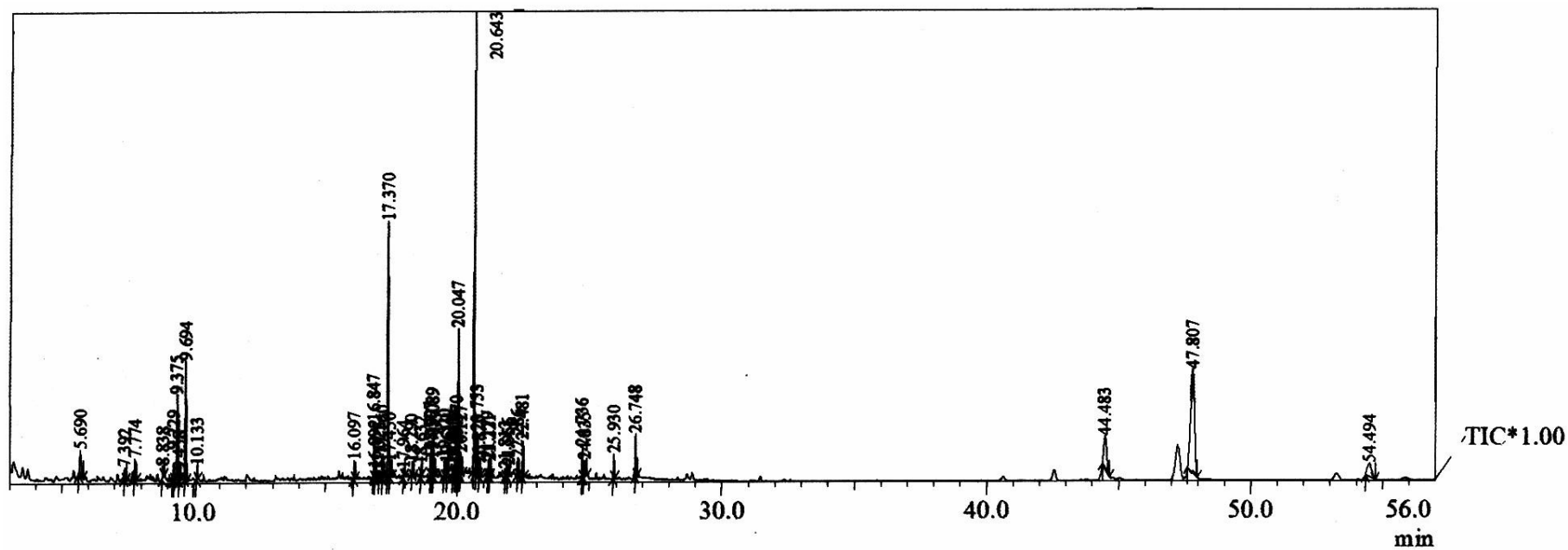
## Anexo 28 – Espectro de infravermelho do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii*



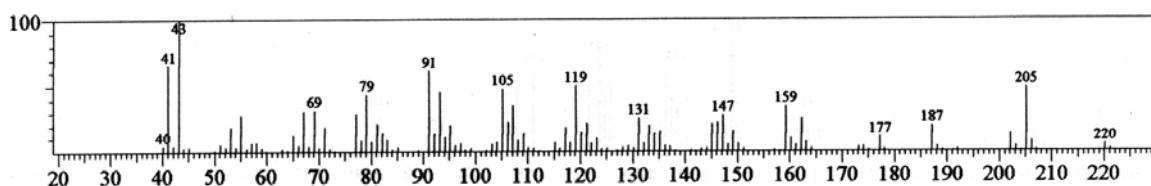
## Anexo 29 – Espectro de infravermelho do extrato etanólico bruto de *Mikania pilosa*



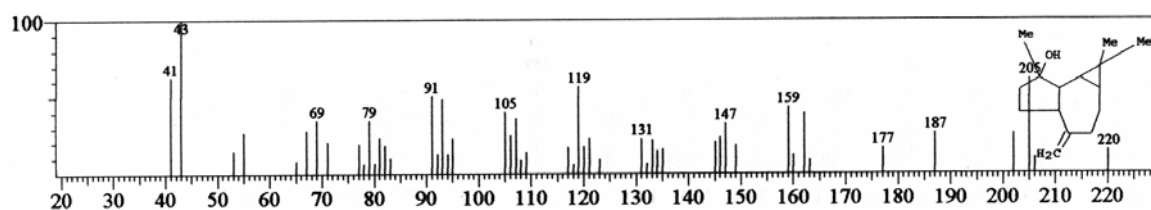
Anexo 30.1 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 1 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.



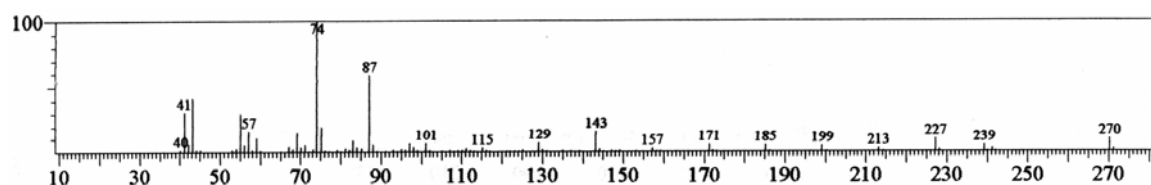
**Anexo 30.2 – Espectros IE-EM da fração 1 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.**



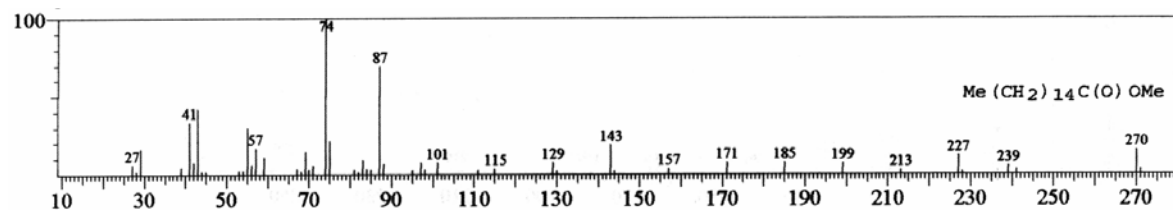
Espectro EM do pico com tempo de retenção de 17,370 minutos



Espectro EM da substância spatulenol (biblioteca Wiley 7)



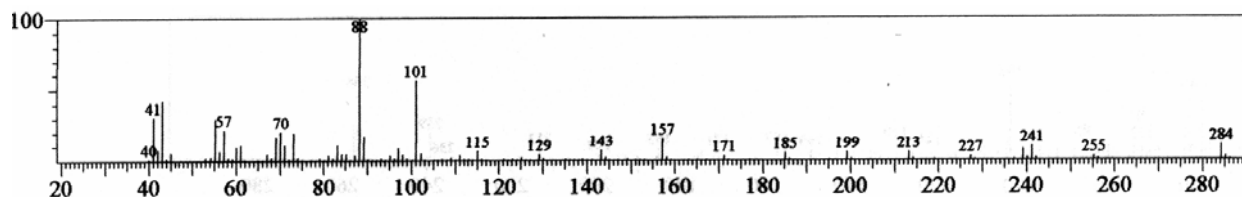
Espectro EM do pico com tempo de retenção de 20,047 minutos



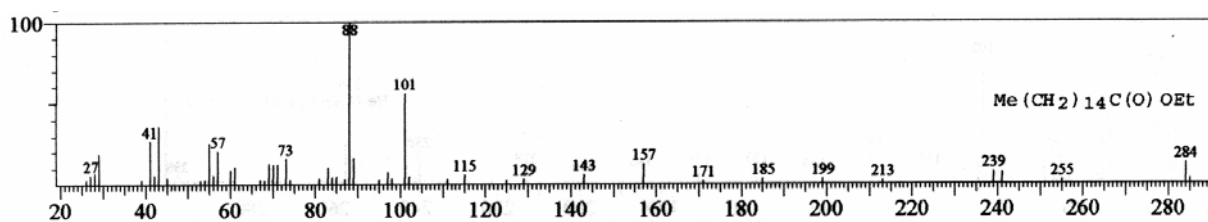
Espectro EM da substância metil palmitato (biblioteca Wiley 7)



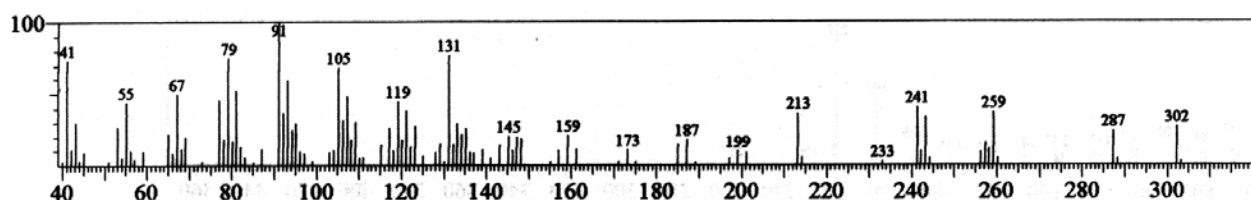
**Anexo 30.3 – Espectros IE-EM da fração 1 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa* (continuação).**



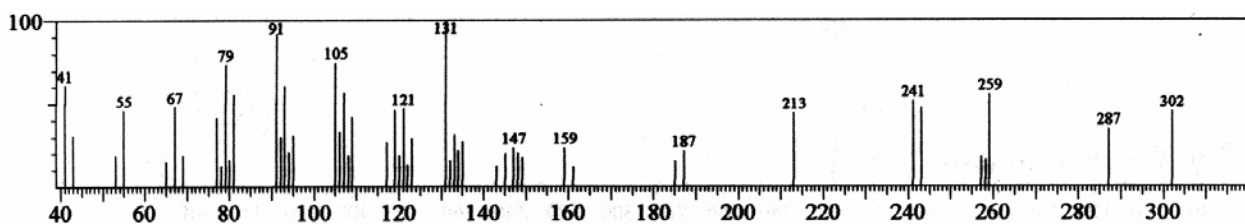
Espectro EM do pico com tempo de retenção de 20,643



Espectro EM da substância etil palmitato (biblioteca Wiley 7)

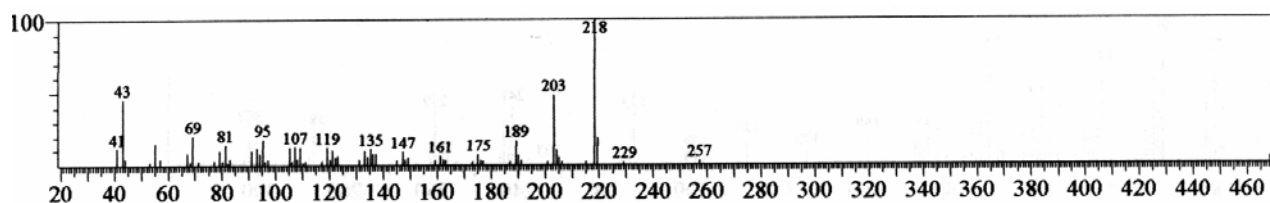


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 26,748 minutos

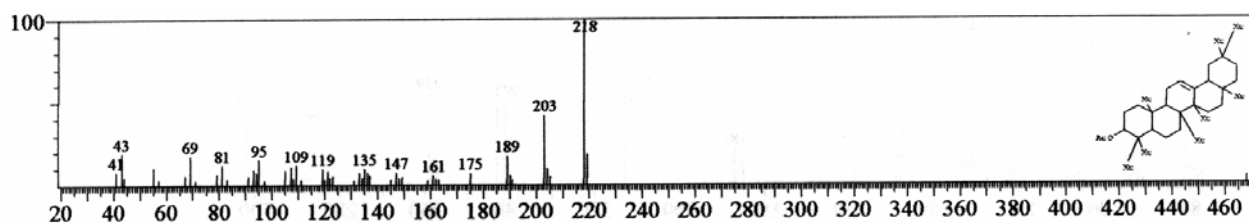


Espectro EM da substância ácido caurenico (biblioteca padrões do laboratório)

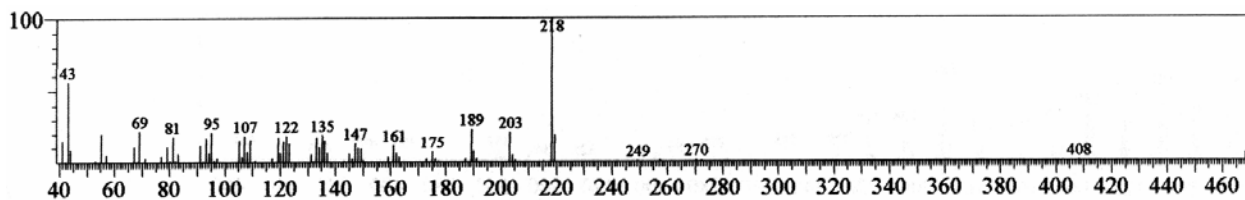
### Anexo 30.4 – Espectros IE-EM da fração 1 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa* (continuação)



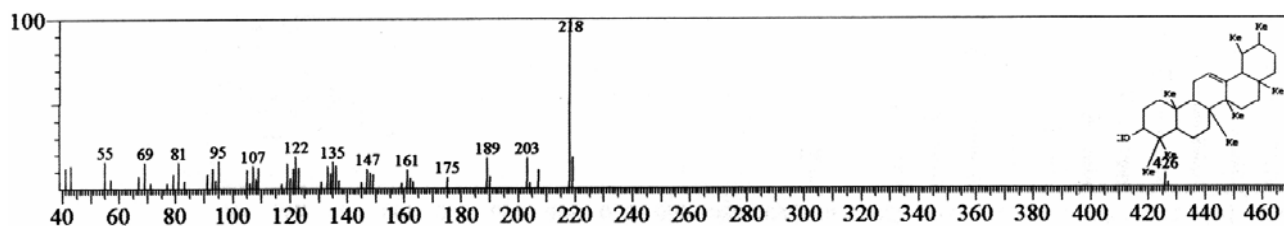
Espectro EM do pico com tempo de retenção de 44,483 minutos



Espectro EM da substância acetato de  $\beta$ -amirina (biblioteca padrões do laboratório)

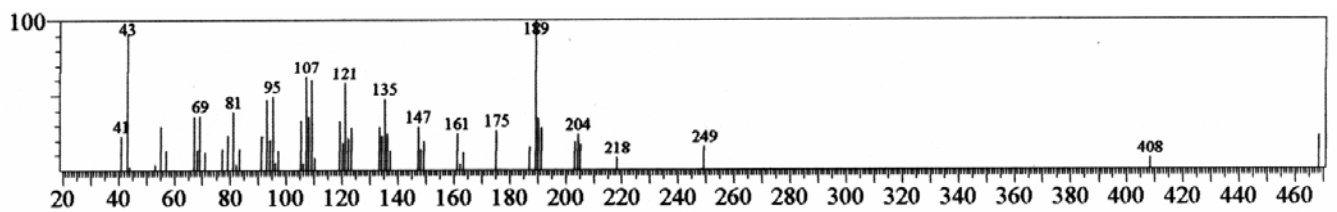


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 47,208 minutos

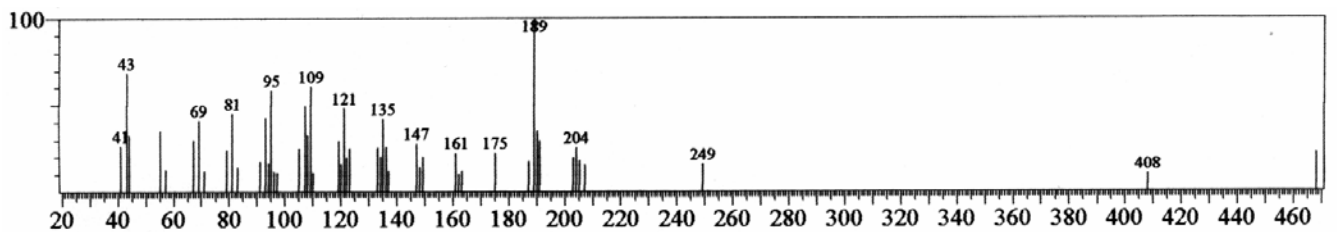


Espectro EM da substância  $\alpha$ -amirina (biblioteca padrões do laboratório)

**Anexo 30.5 – Espectros IE-EM da fração 1 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa* (continuação).**

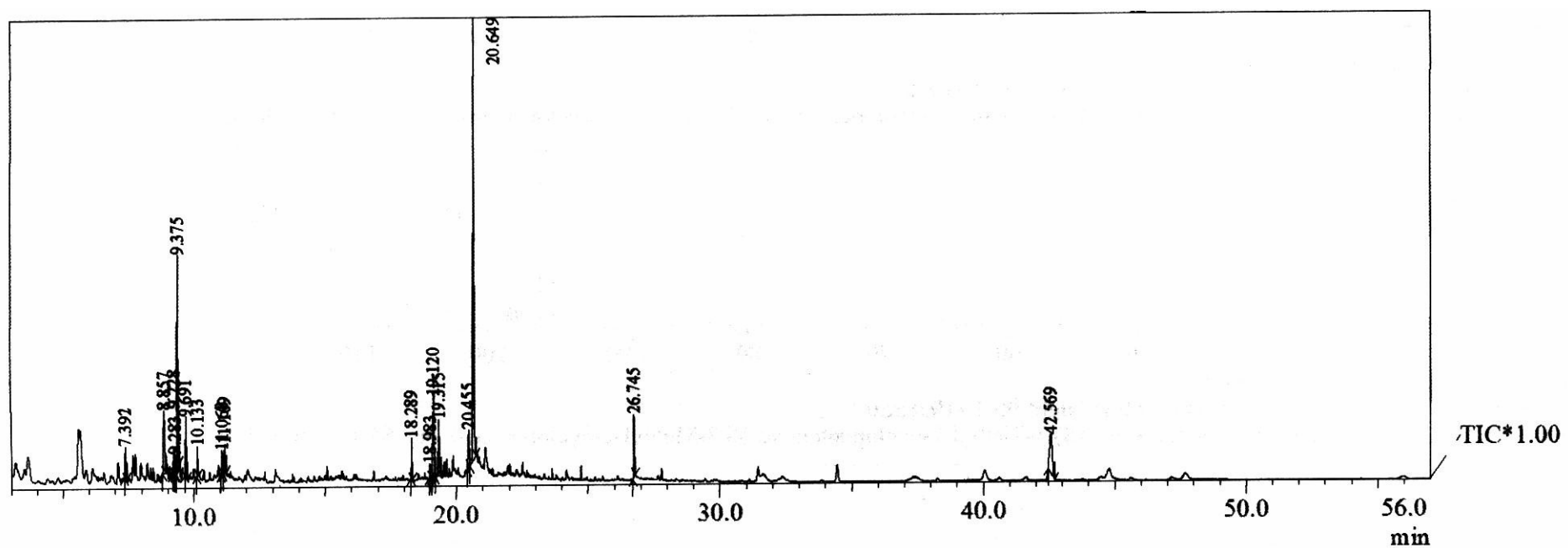


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 54,494 minutos

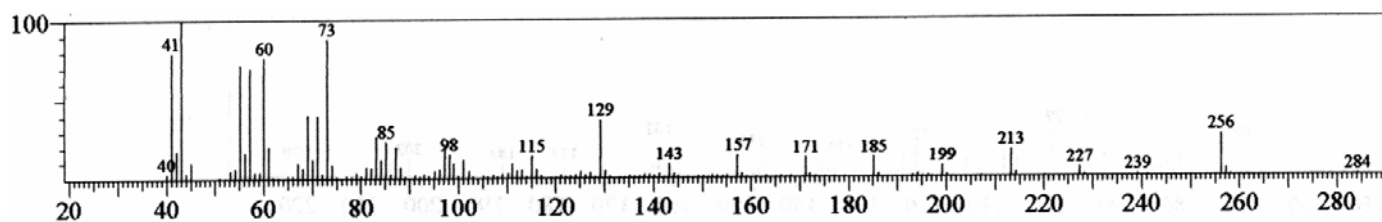


Espectro EM da substância acetato de taraxasterol (biblioteca padrões do laboratório)

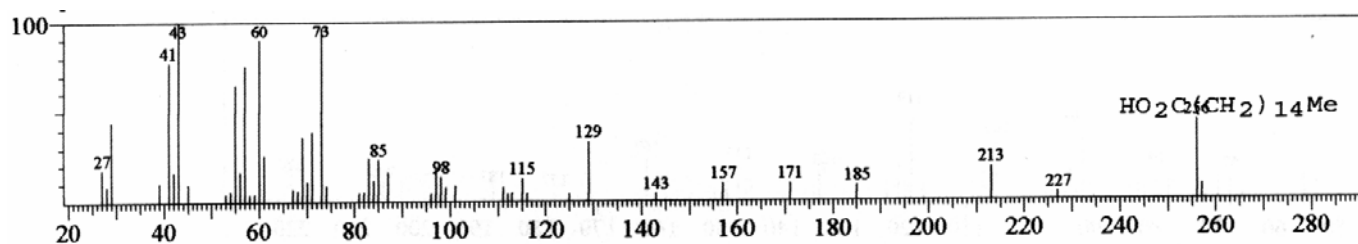
Anexo 31.1 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 2 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.



**Anexo 31.2 – Espectros IE-EM da fração 2 obtida a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *Mikania pilosa*.**

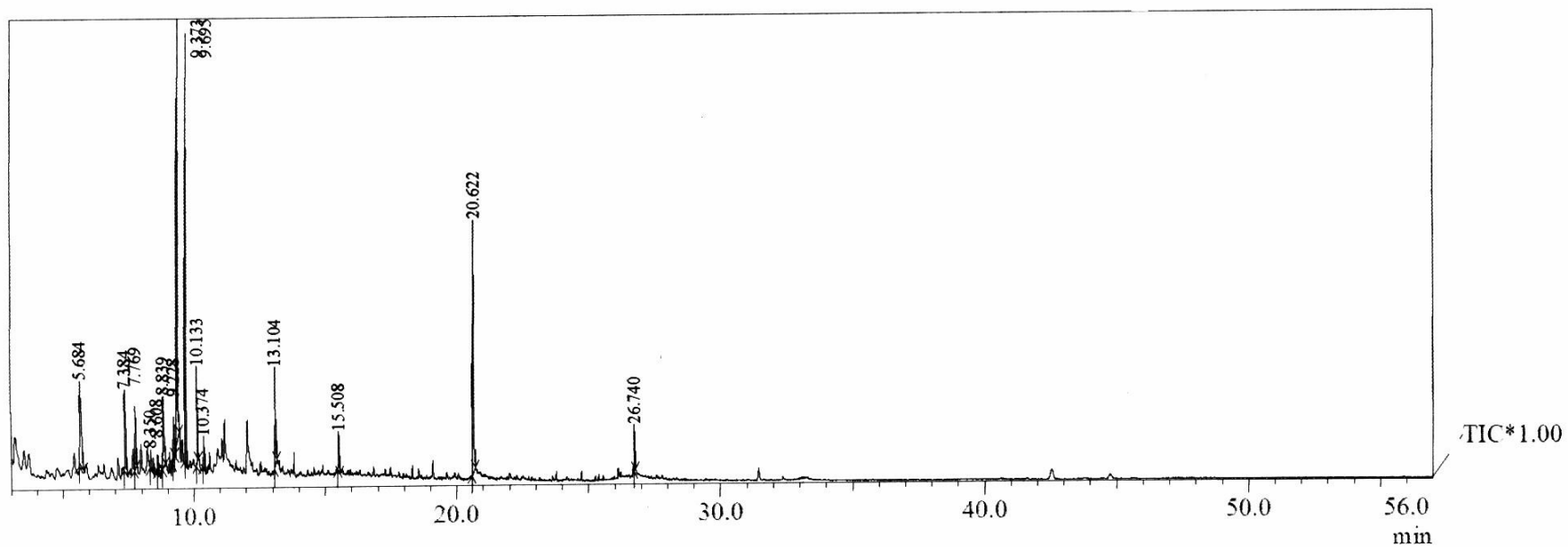


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 20,649 minutos

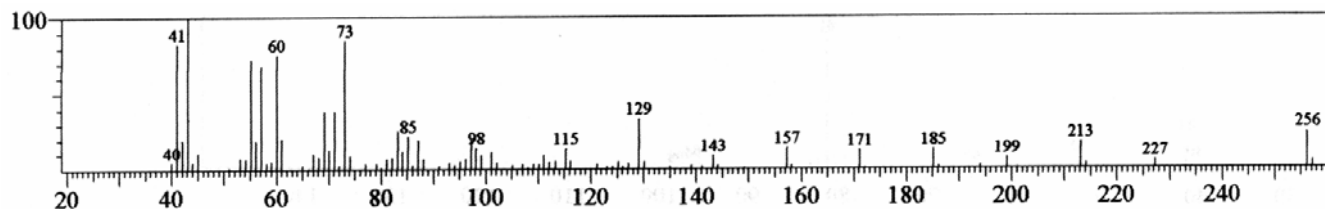


Espectro EM da substância ácido palmítico (biblioteca padrões do laboratório)

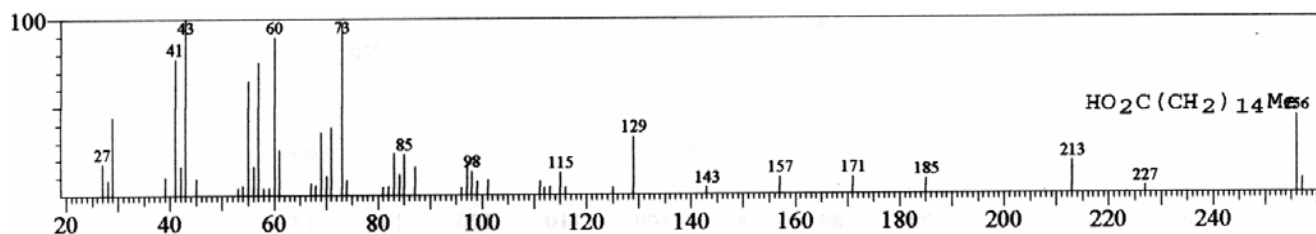
**Anexo 32.1 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 8 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.**



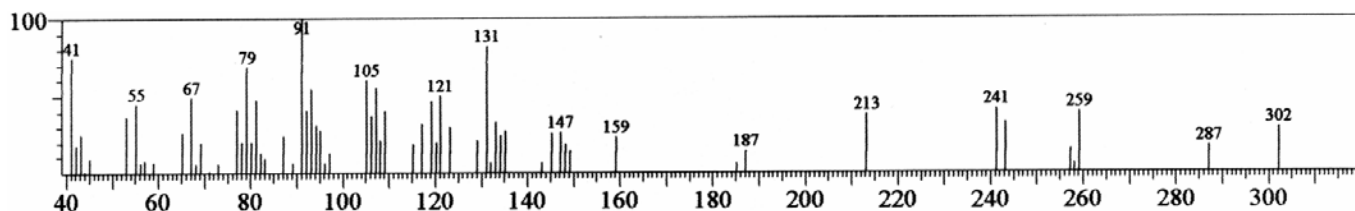
**Anexo 32.2 – Espectros IE-EM da fração 8 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.**



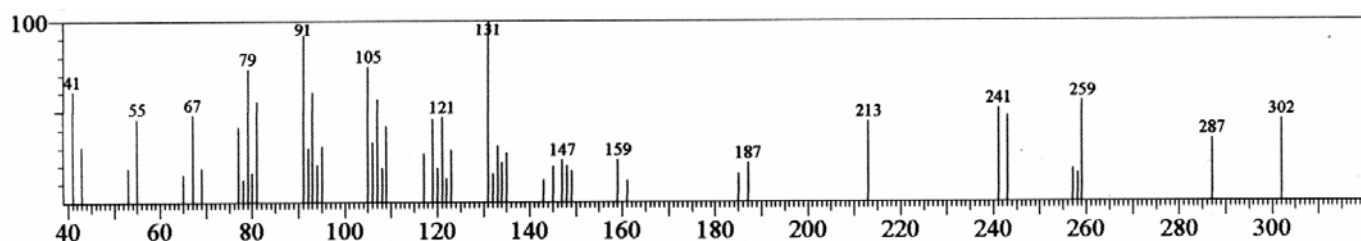
Espectro EM do pico com tempo de retenção de 20,622 minutos.



Espectro EM da substância ácido palmítico (biblioteca padrões do laboratório)

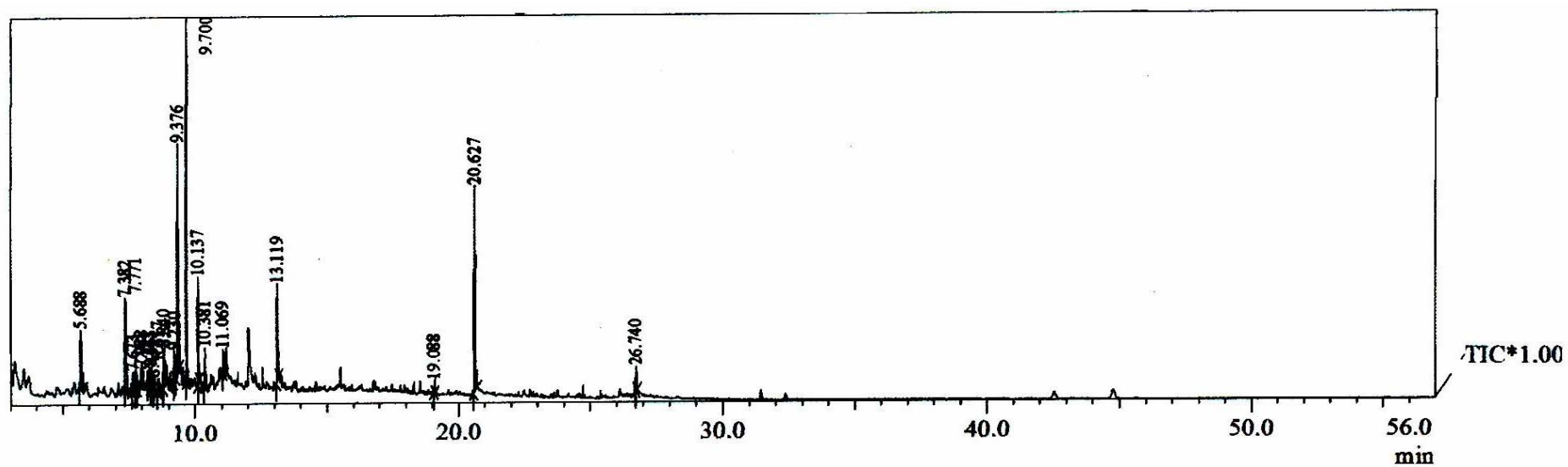


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 26,740 minutos.



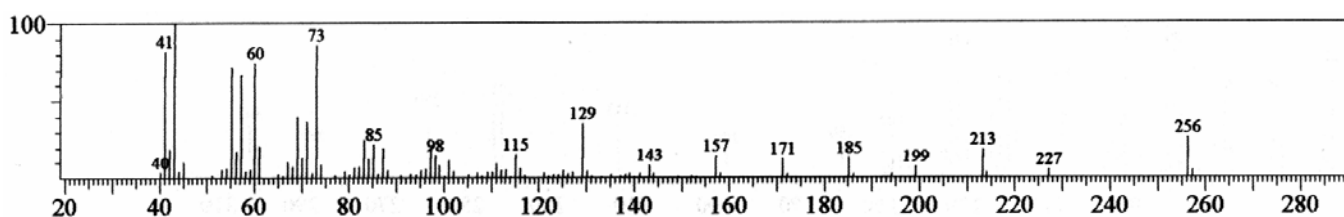
Espectro EM da substância ácido caurenico (biblioteca padrões do laboratório)

**Anexo 33.1 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 9 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.**

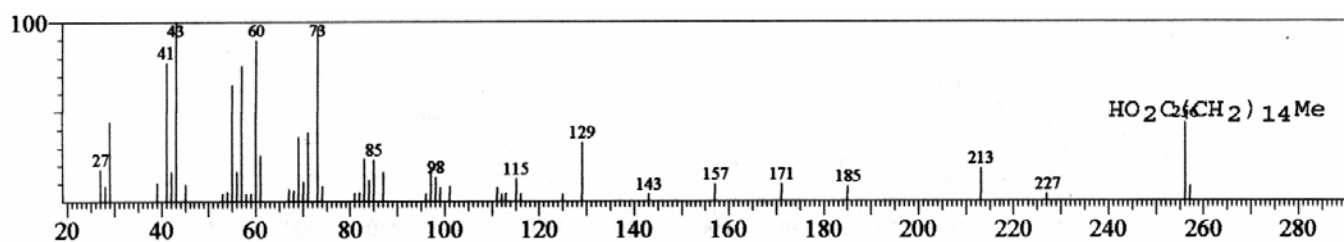




**Anexo 33.2 – Espectros IE-EM da fração 9 obtida a partir da CLV do extrato etanólico bruto de *Mikania pilosa*.**

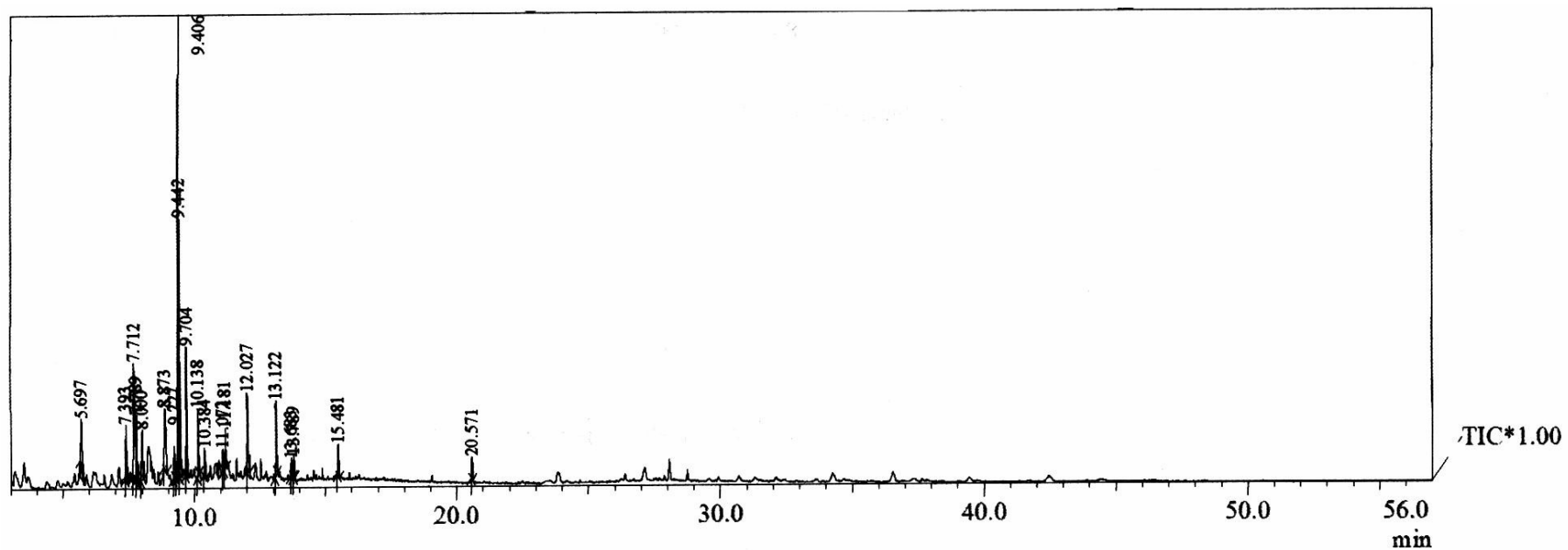


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 20,627 minutos

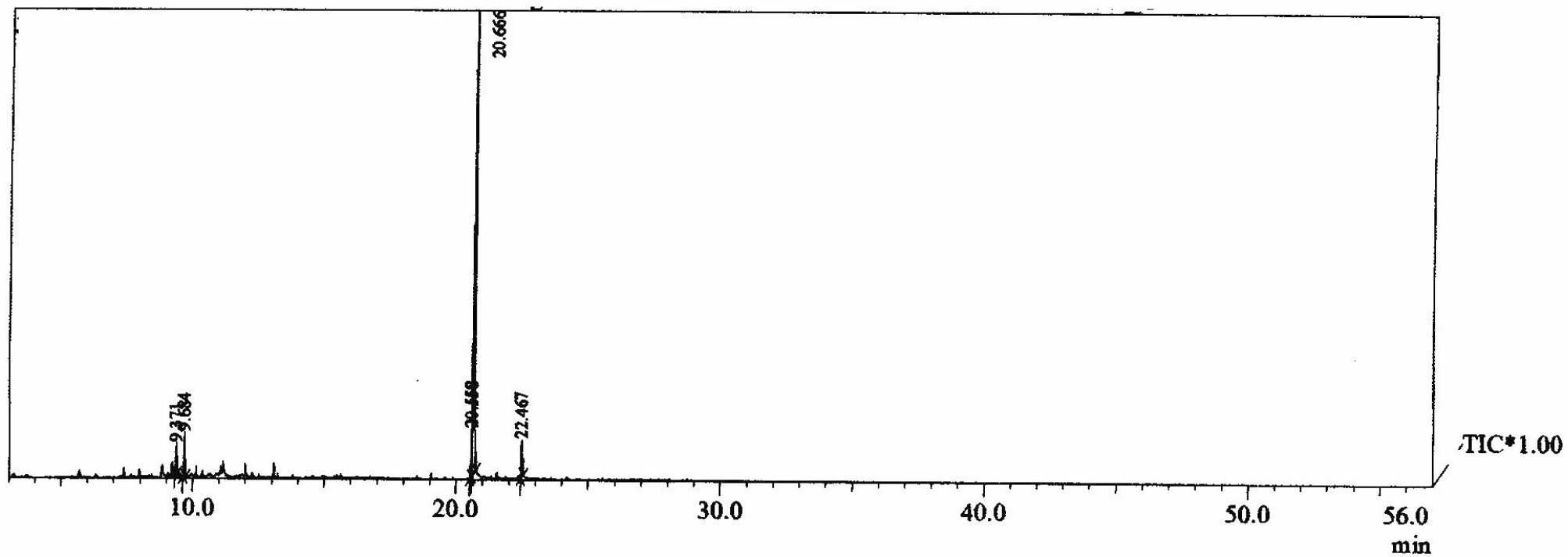


Espectro EM da substância ácido palmítico (biblioteca padrões do laboratório)

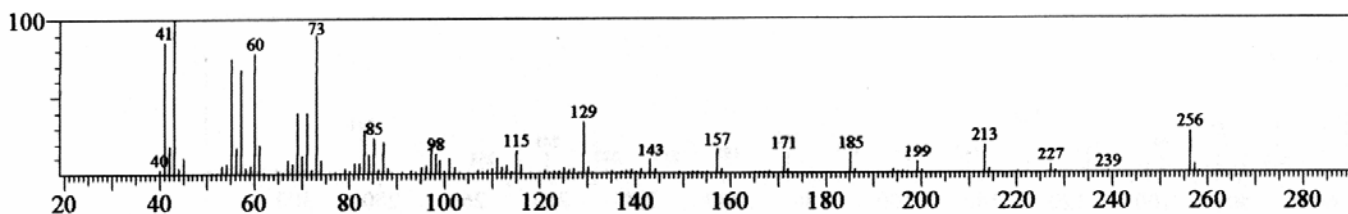
**Anexo 34 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 3.1 a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.**



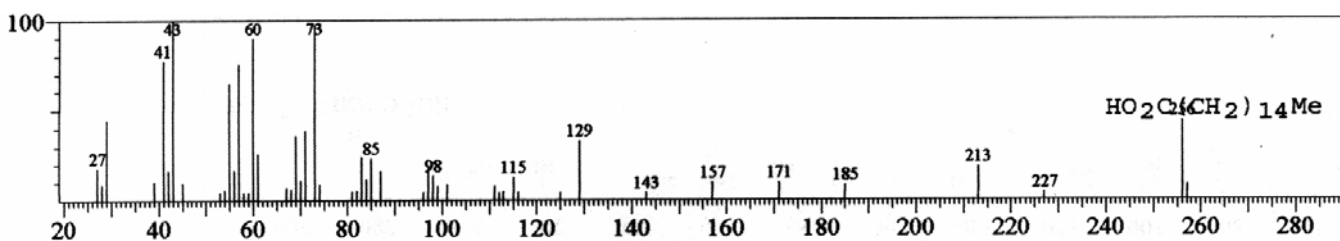
**Anexo 35.1 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 3.2 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.**



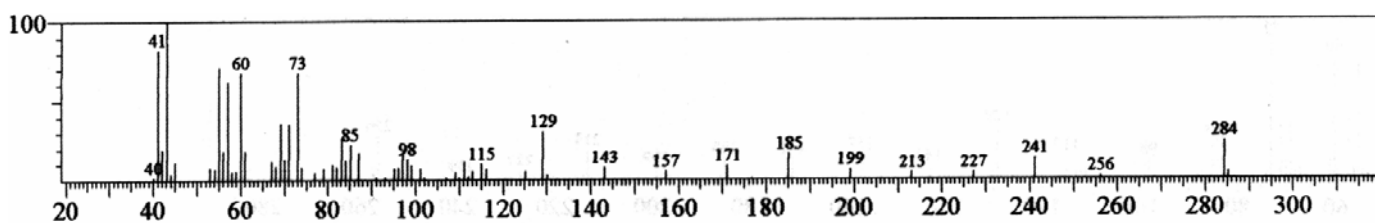
### Anexo 35.2 – Espectros IE-EM da fração 3.2 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.



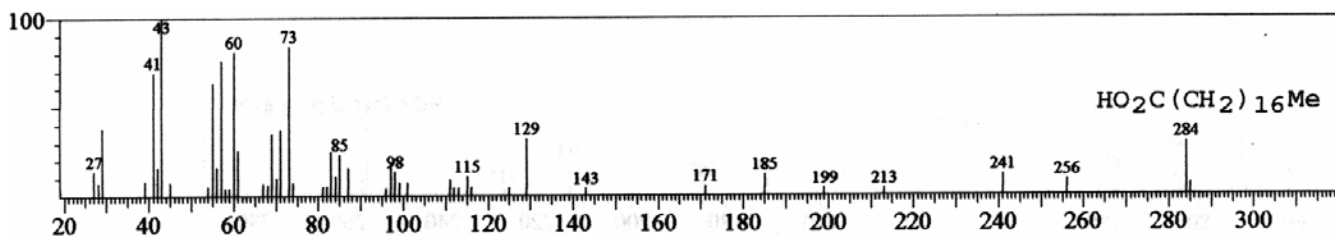
Espectro EM do pico com tempo de retenção de 20,666 minutos



Espectro EM da substância ácido palmítico (biblioteca Wiley 7)

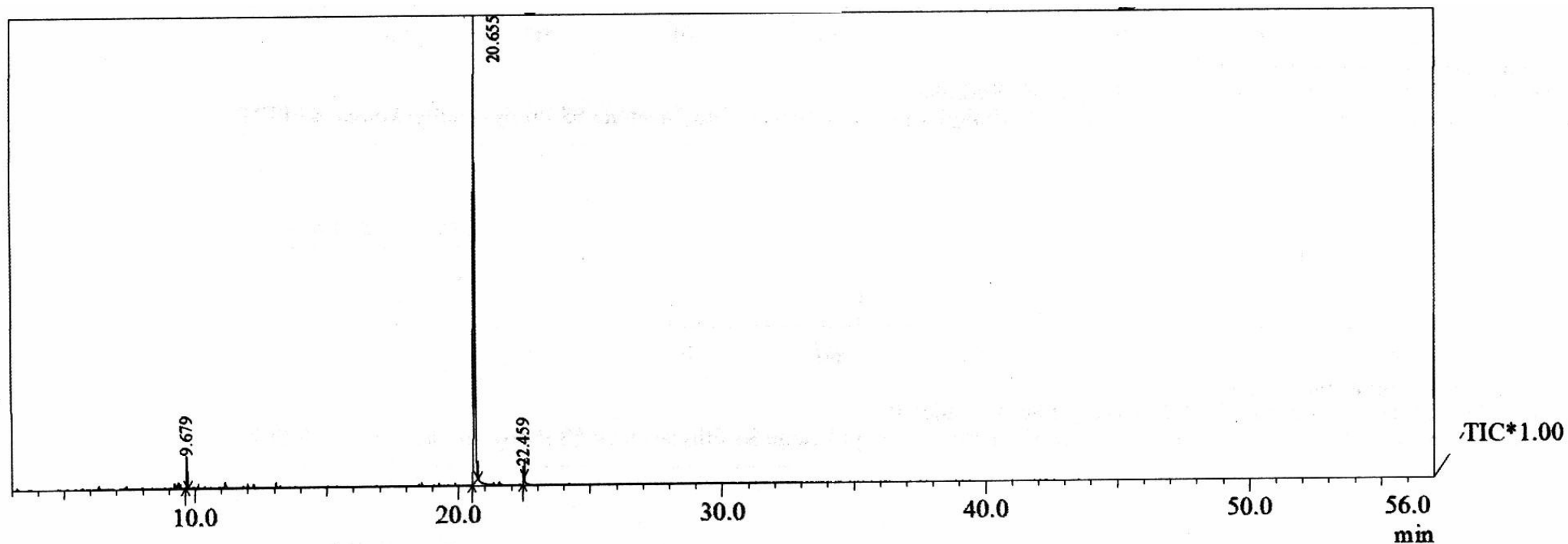


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 22,467 minutos

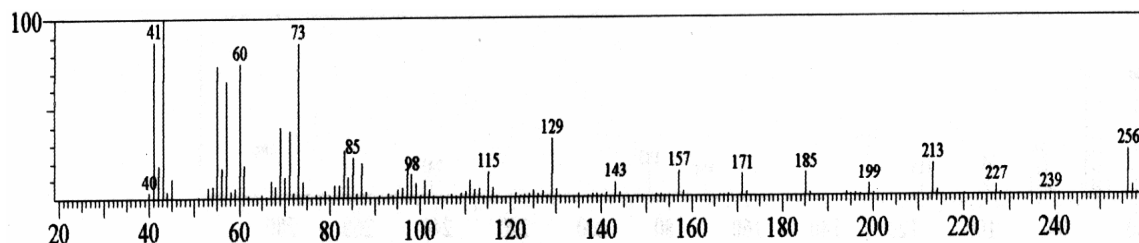


Espectro EM da substância ácido esteárico (biblioteca Wiley 7)

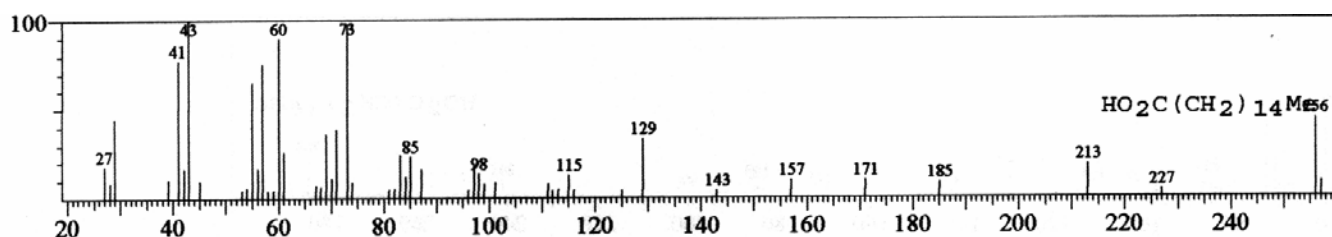
**Anexo 36.1 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 3.3 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.**



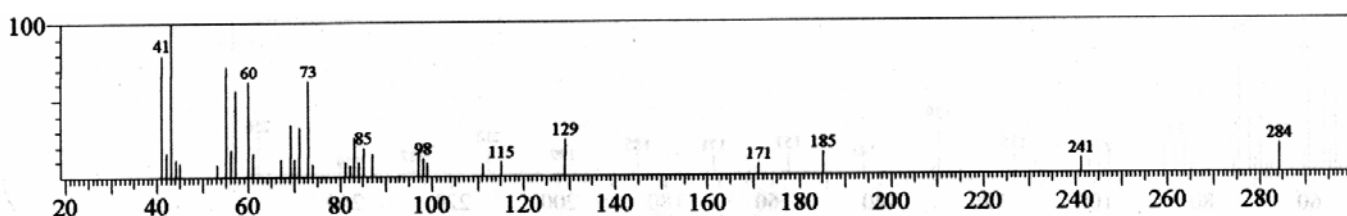
**Anexo 36.2 – Espectros IE-EM da fração 3.3 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.**



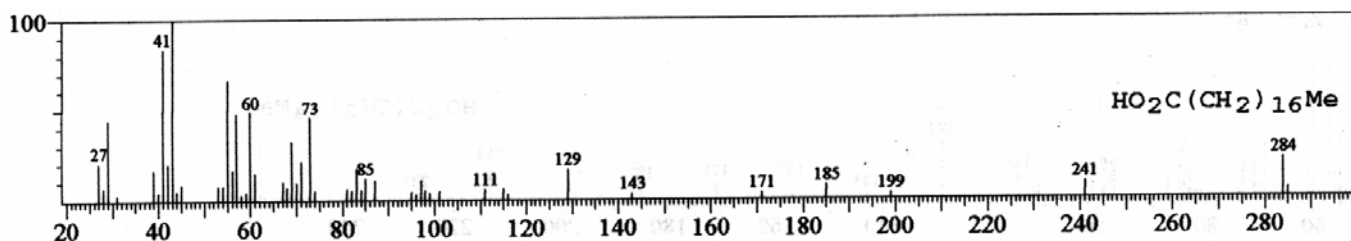
Espectro EM do pico com tempo de retenção de 20,655 minutos



Espectro EM da substância ácido palmítico (biblioteca padrões do laboratório)

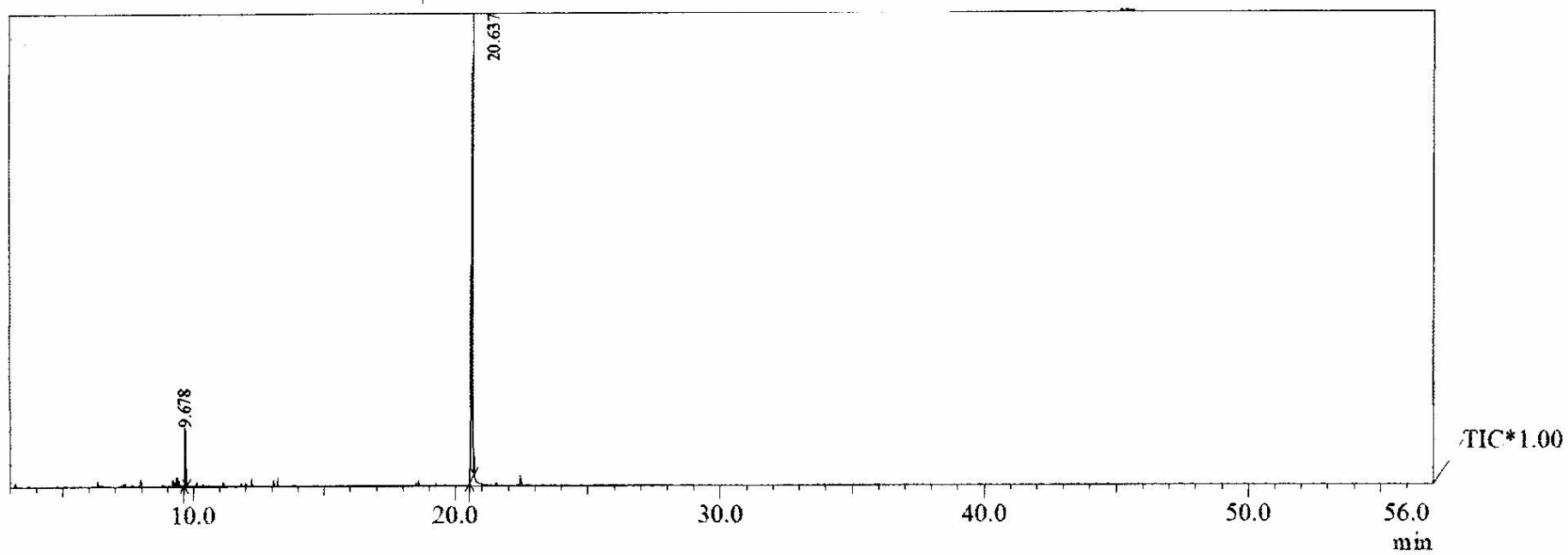


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 22,459 minutos

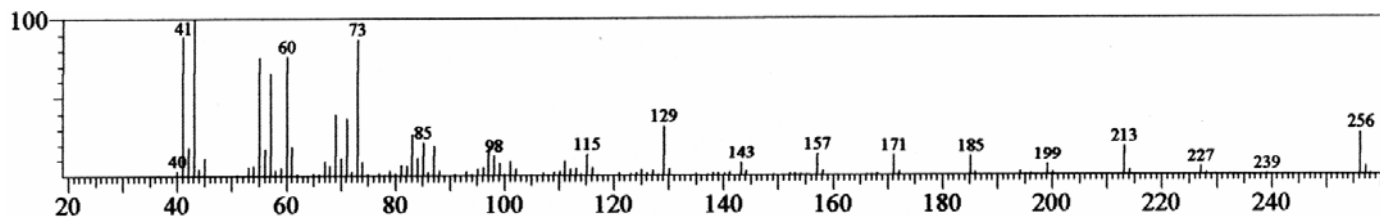


Espectro EM da substância ácido esteárico (biblioteca padrões do laboratório)

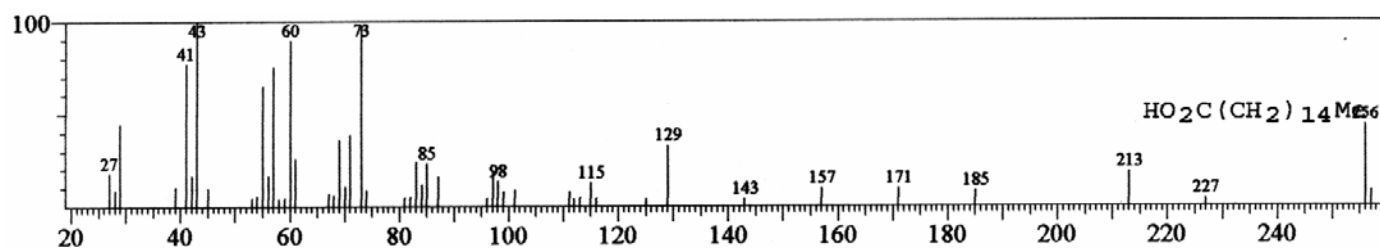
Anexo 37.1 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 3.4 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.



**Anexo 37.2 – Espectros IE-EM da fração codificada como 3.4 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.**



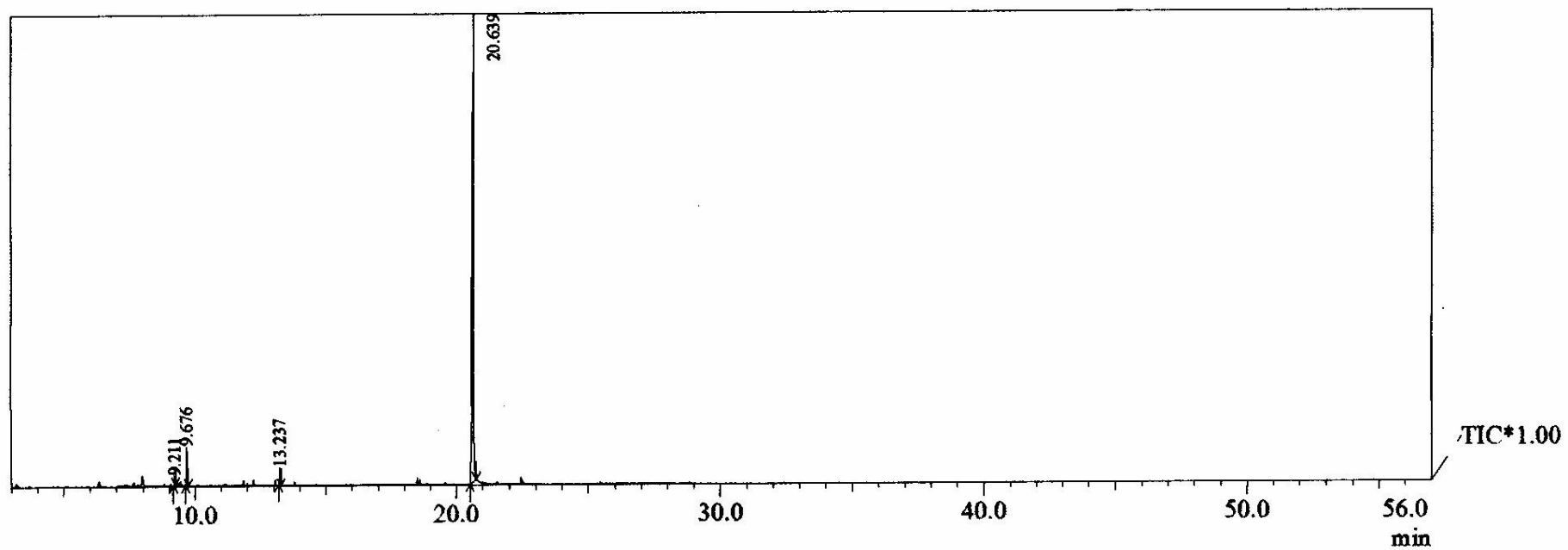
Espectro EM do pico com tempo de retenção de 20,637 minutos



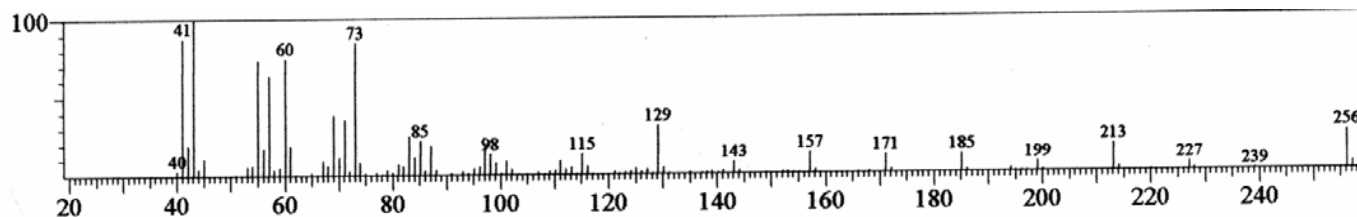
Espectro EM da substância ácido palmítico (biblioteca My library)



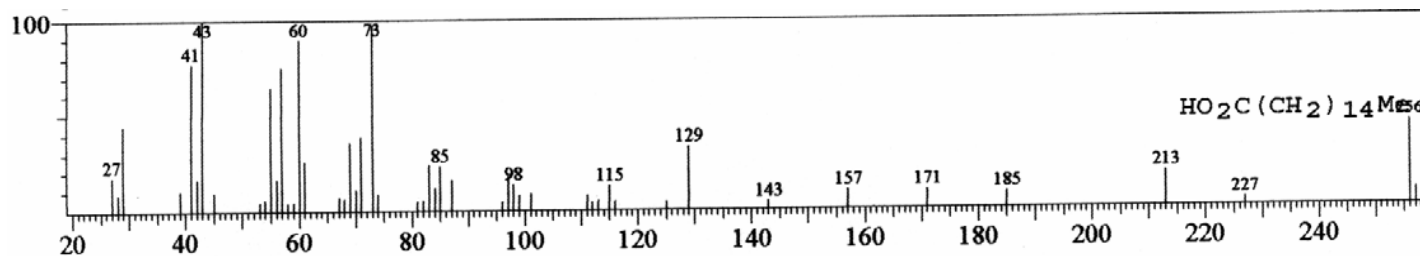
**Anexo 38.1 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 3.5 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.**



**Anexo 38.2 – Espectros IE-EM da fração 3.5 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.**

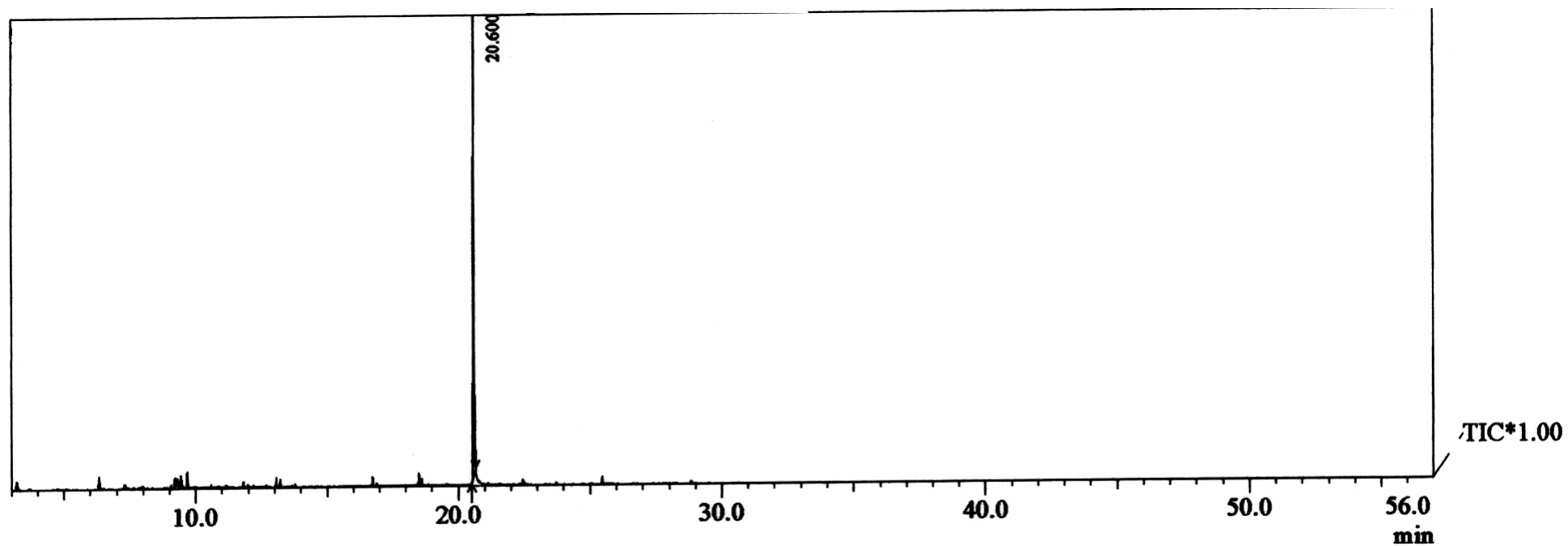


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 20,639 minutos

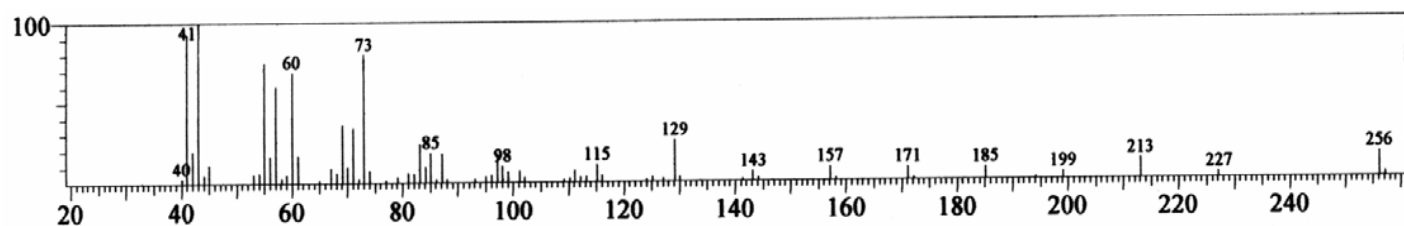


Espectro EM da substância ácido palmítico (biblioteca padrões do laboratório)

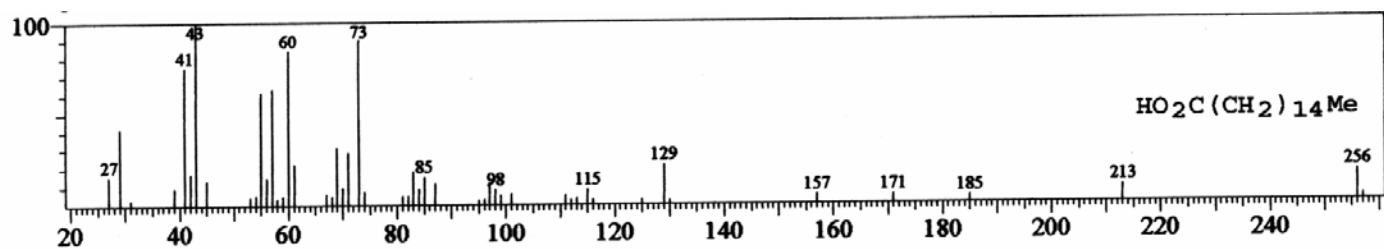
**Anexo 39.1 – Cromatograma da análise em CG-EM da fração 3.6 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.**



**Anexo 39.2 – Espectros IE-EM da fração 3.6 obtida a partir da CLV da fração hexânica de *Mikania pilosa*.**

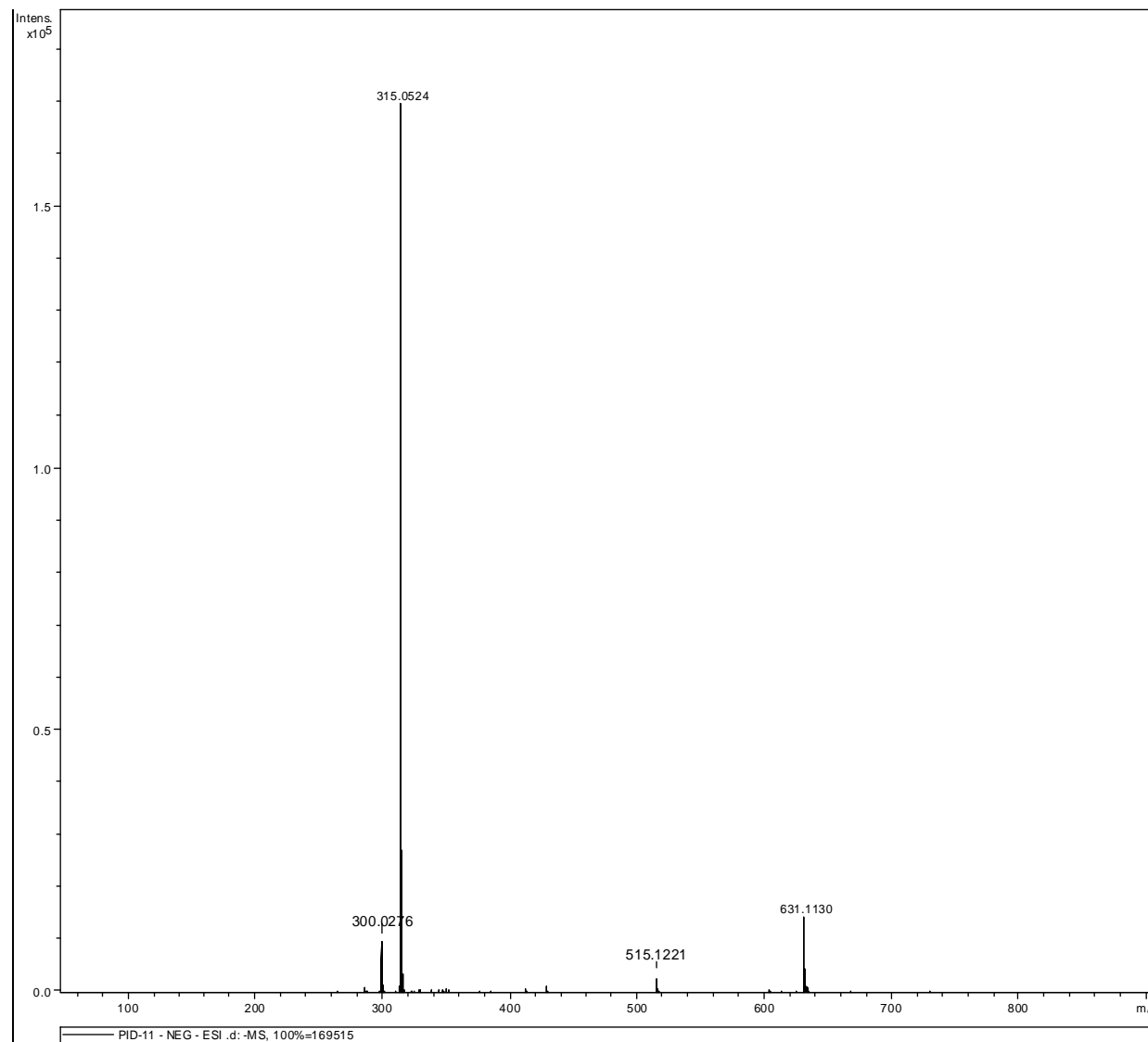


Espectro EM do pico com tempo de retenção de 20,600 minutos

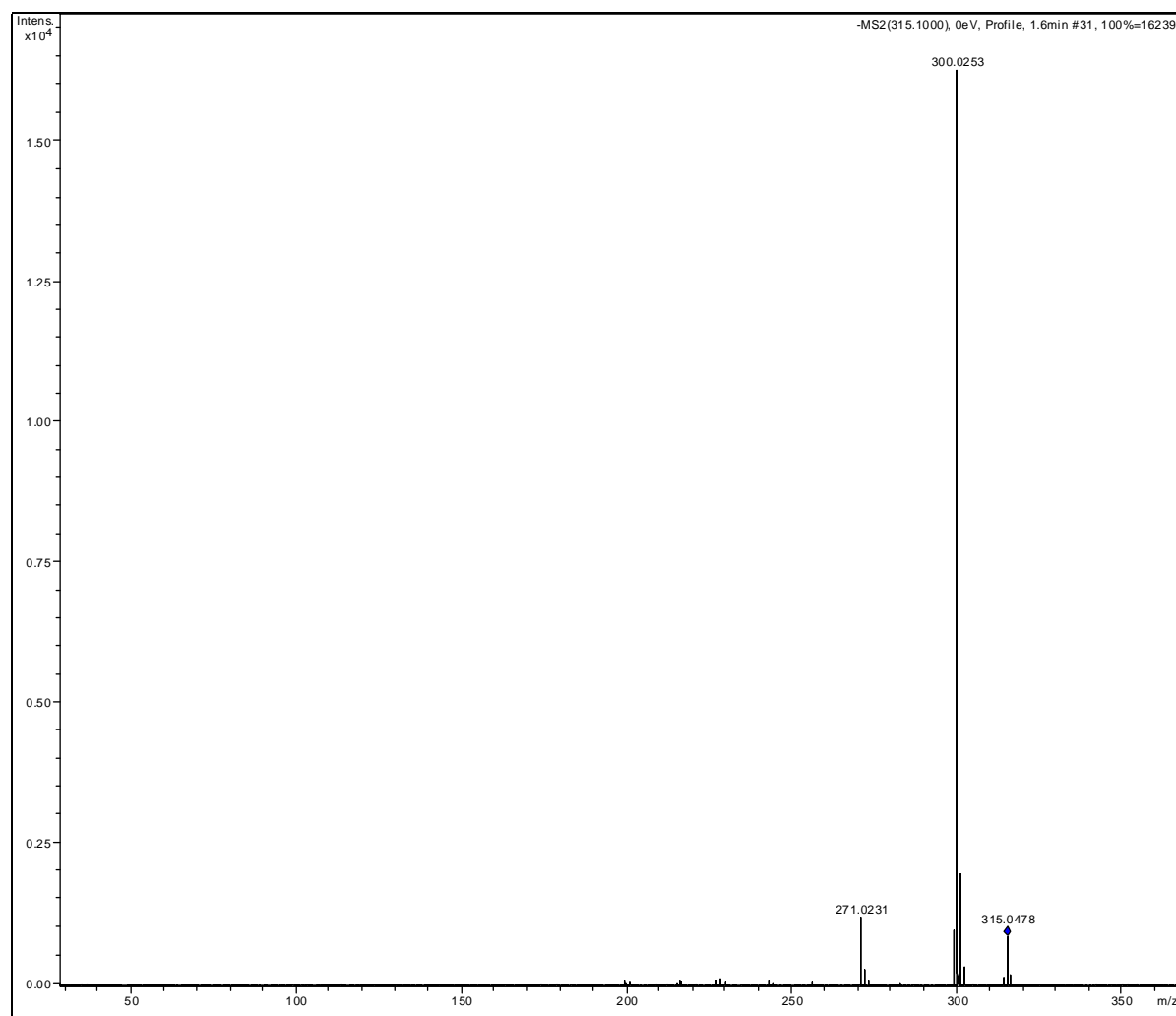


Espectro EM da substância ácido palmítico (biblioteca padrões do laboratório)

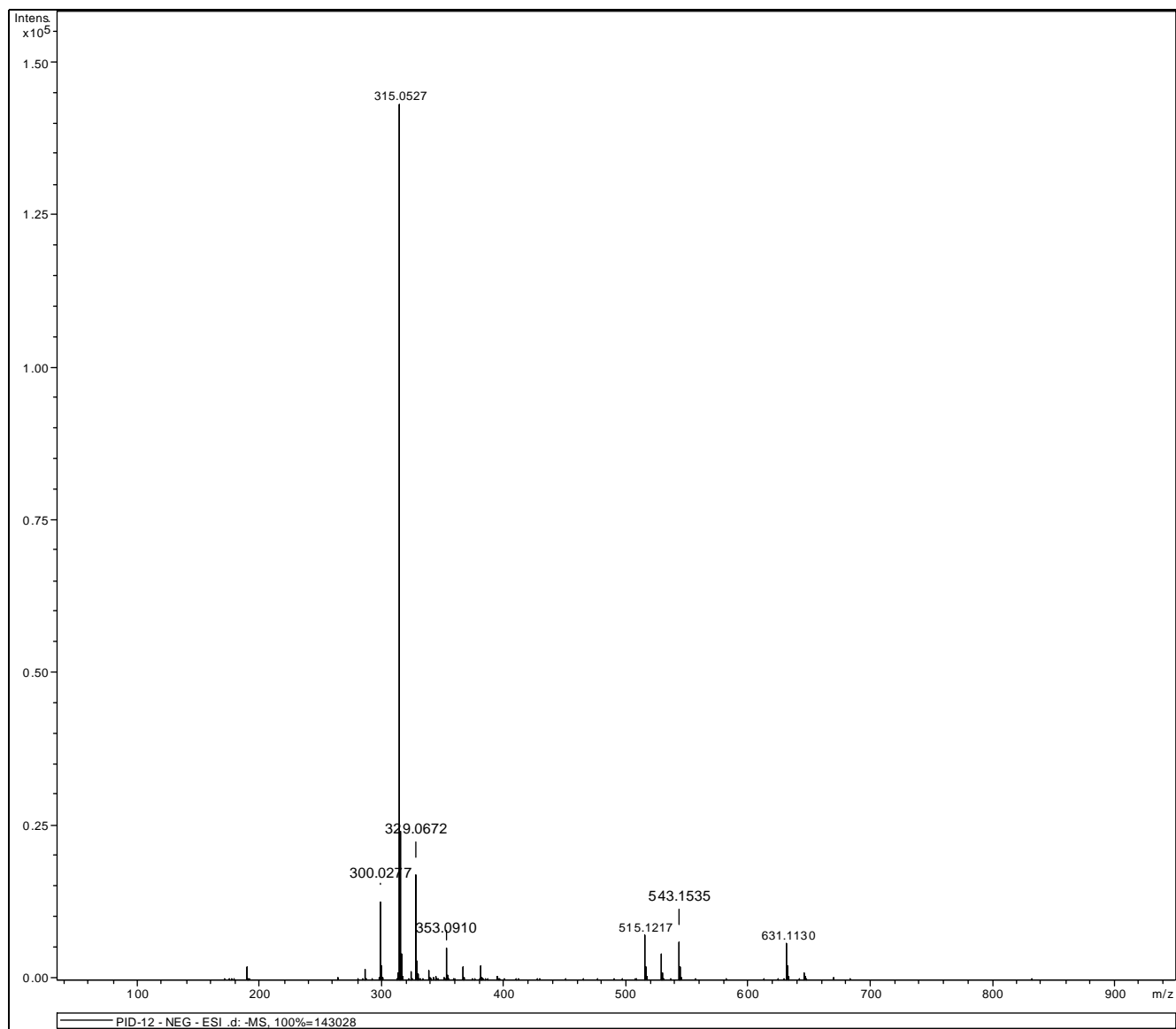
Anexo 40 – Espectro IES-EM (modo negativo) da fração 11 obtida a partir do fracionamento da fração diclorometânica de *Mikania pilosa*



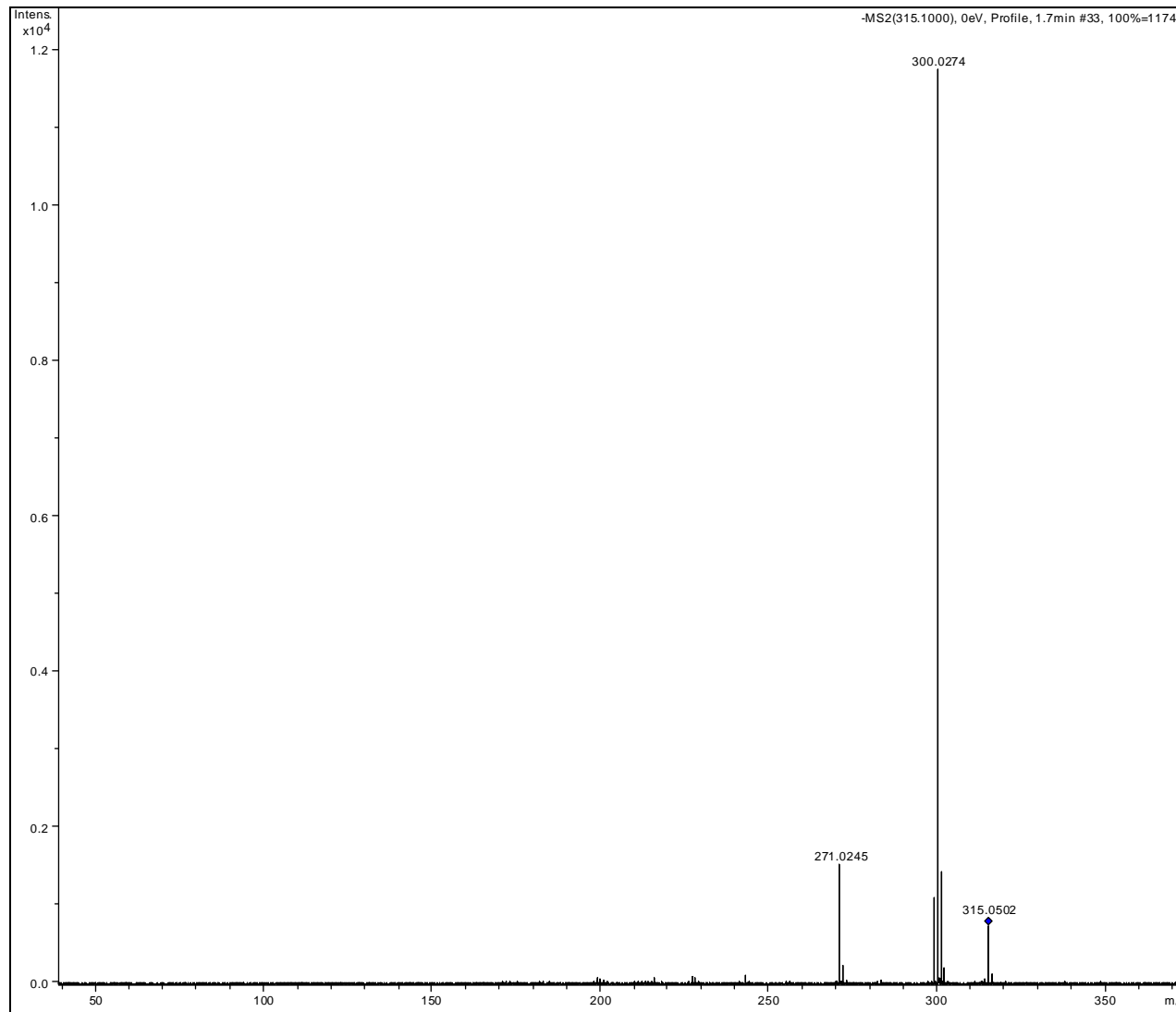
Anexo 41 – Espectro IES-EM/EM (modo negativo) da fração 11 obtida a partir do fracionamento da fração diclorometânica de *Mikania pilosa*



Anexo 42 – Espectro IES-EM (modo negativo) da fração 12 obtida a partir do fracionamento da fração diclorometânica de *Mikania pilosa*

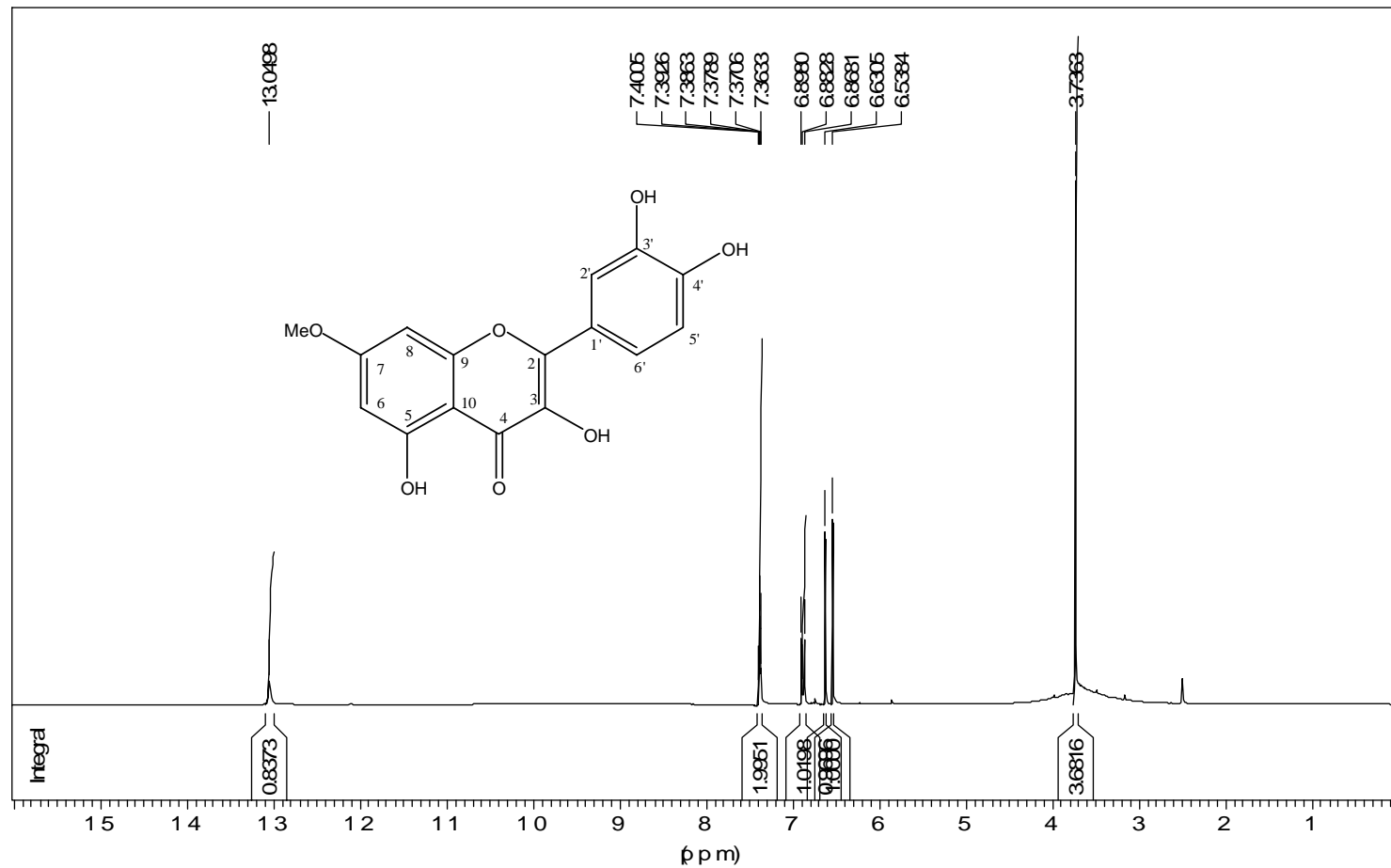


Anexo 43 – Espectro IES-EM/EM (modo negativo) da fração 12 obtida a partir do fracionamento da fração diclorometânica de *Mikania pilosa*

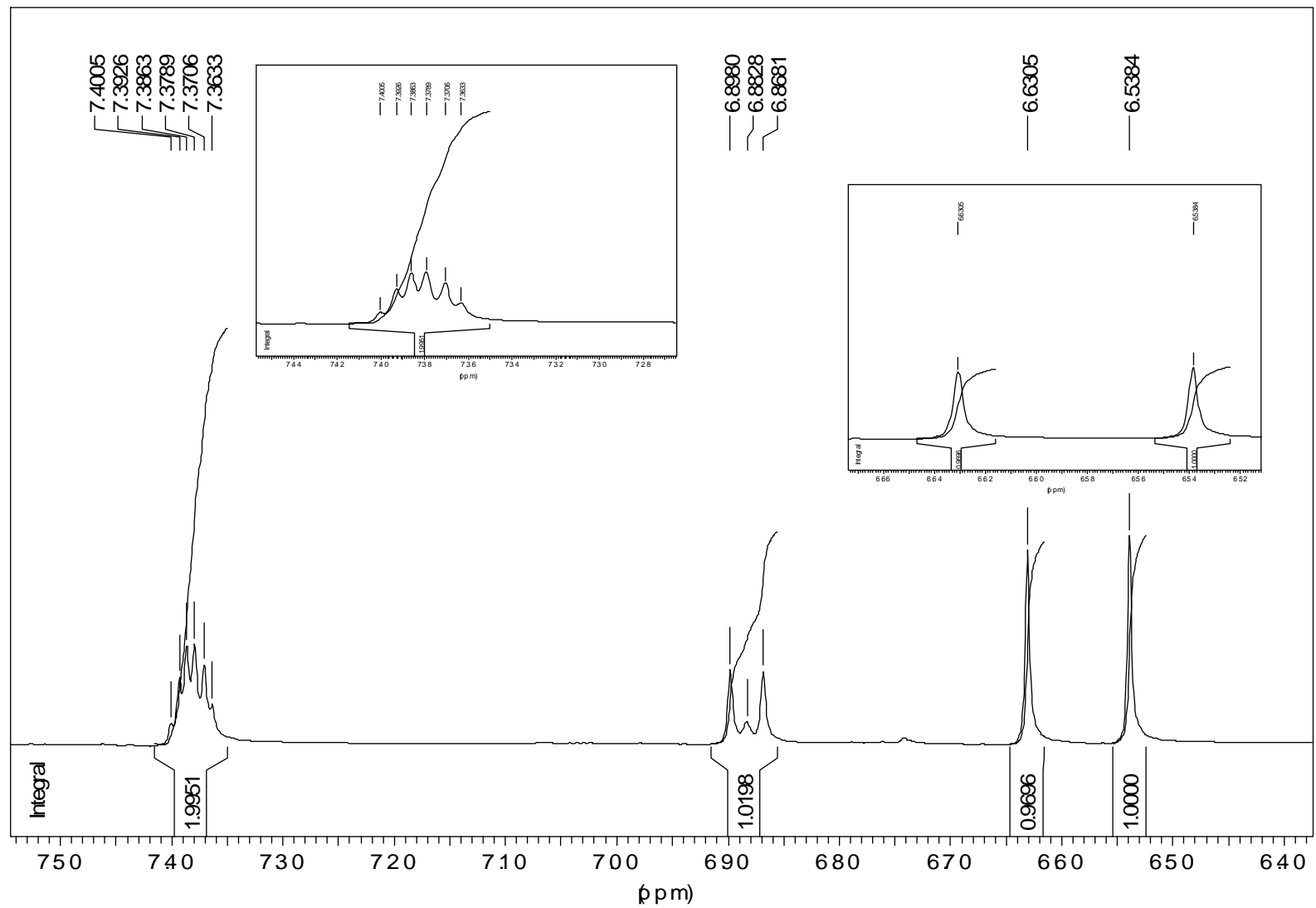




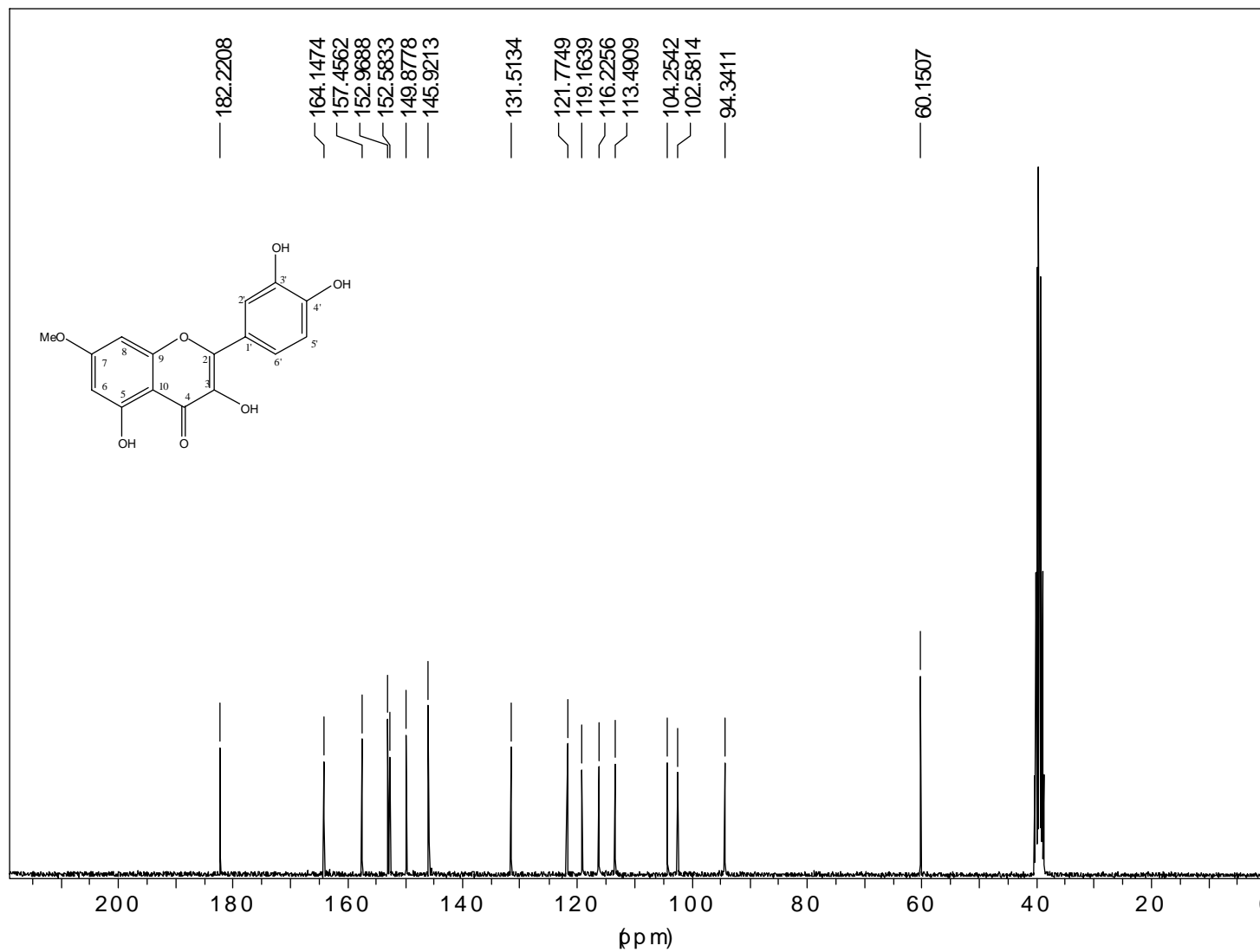
Anexo 44.1 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância codificada como PI-01 (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS)



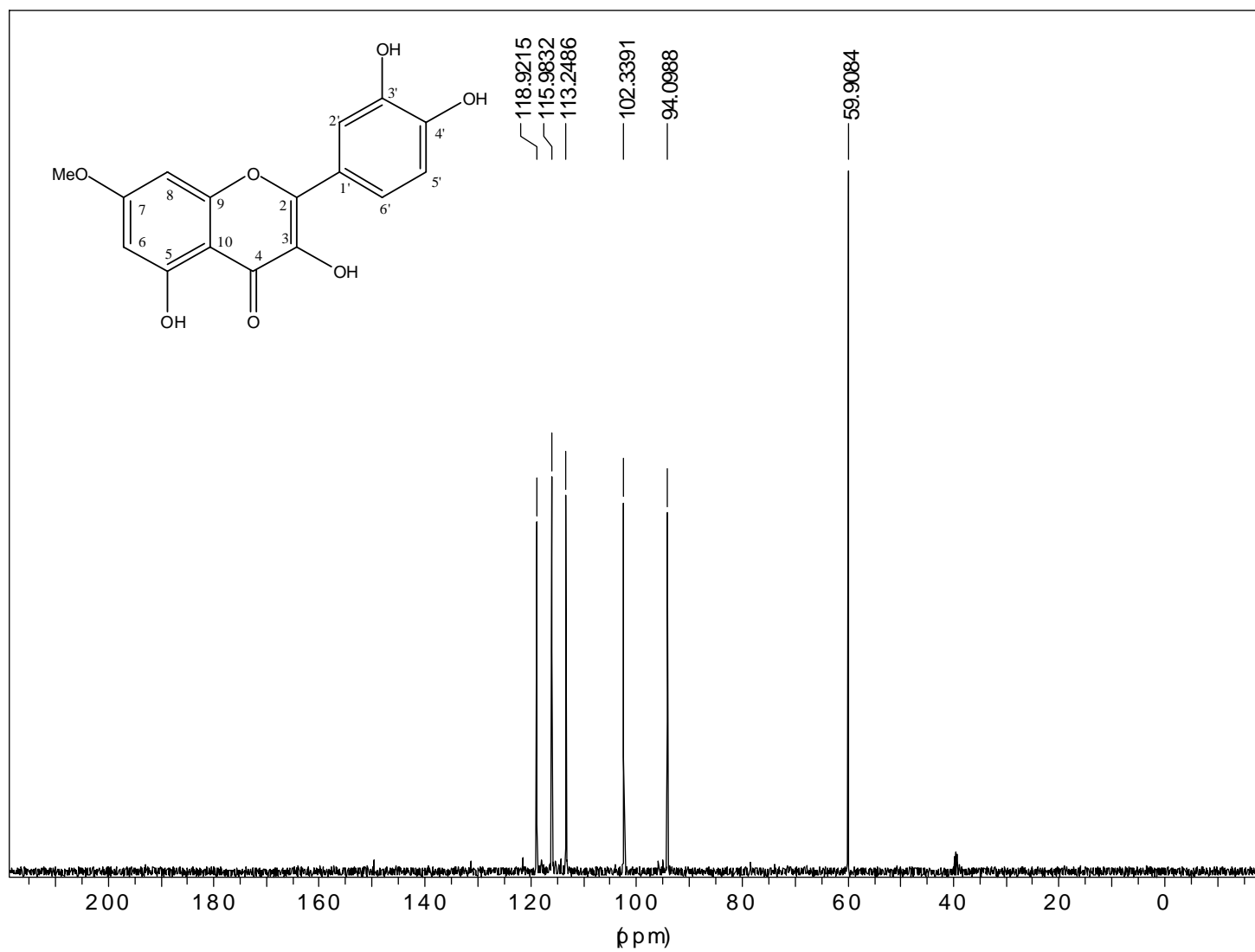
Anexo 44.2 – Expansões do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância codificada como PI-01 (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , TMS)



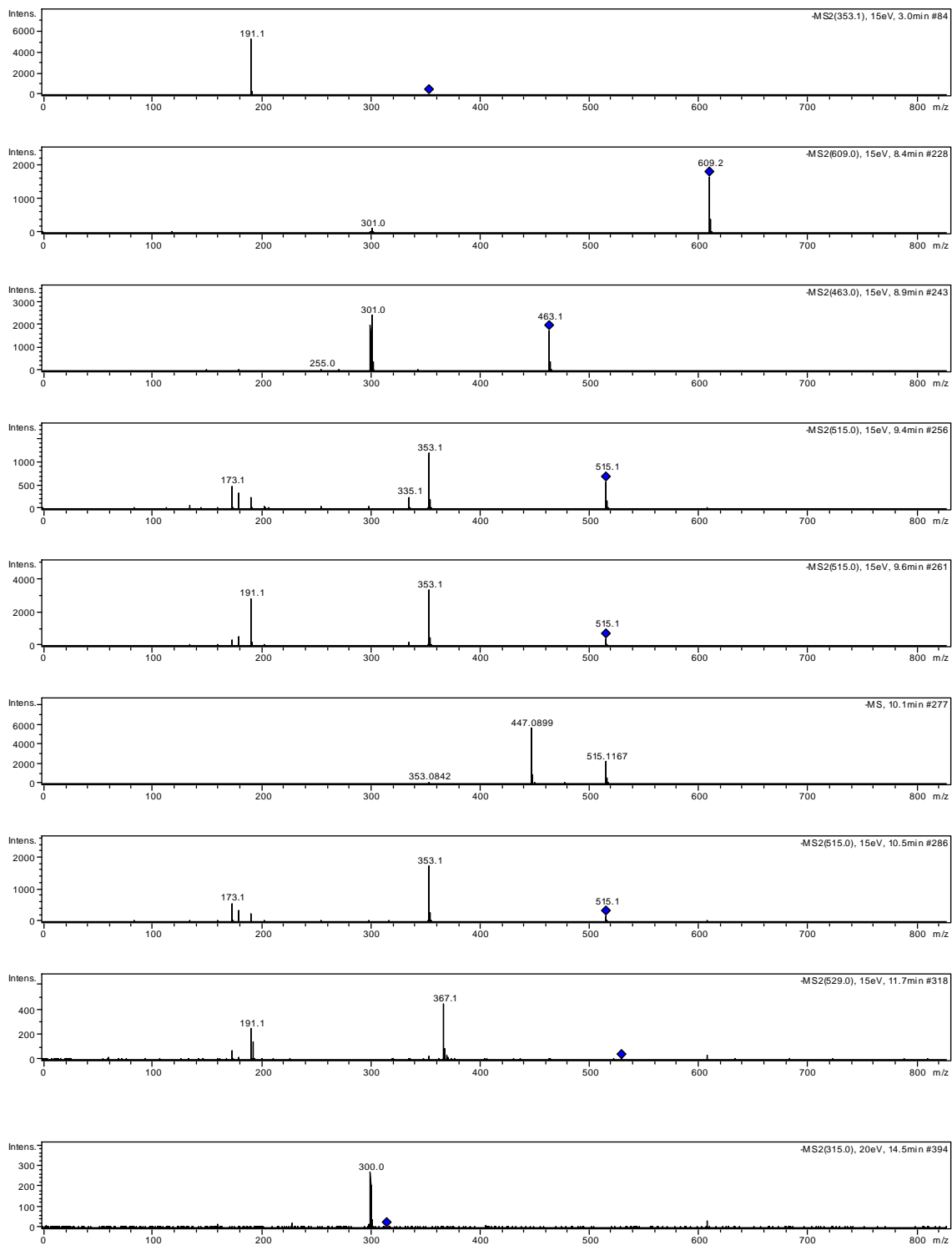
Anexo 45 – Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  PND da substância codificada como PI-01 (75 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



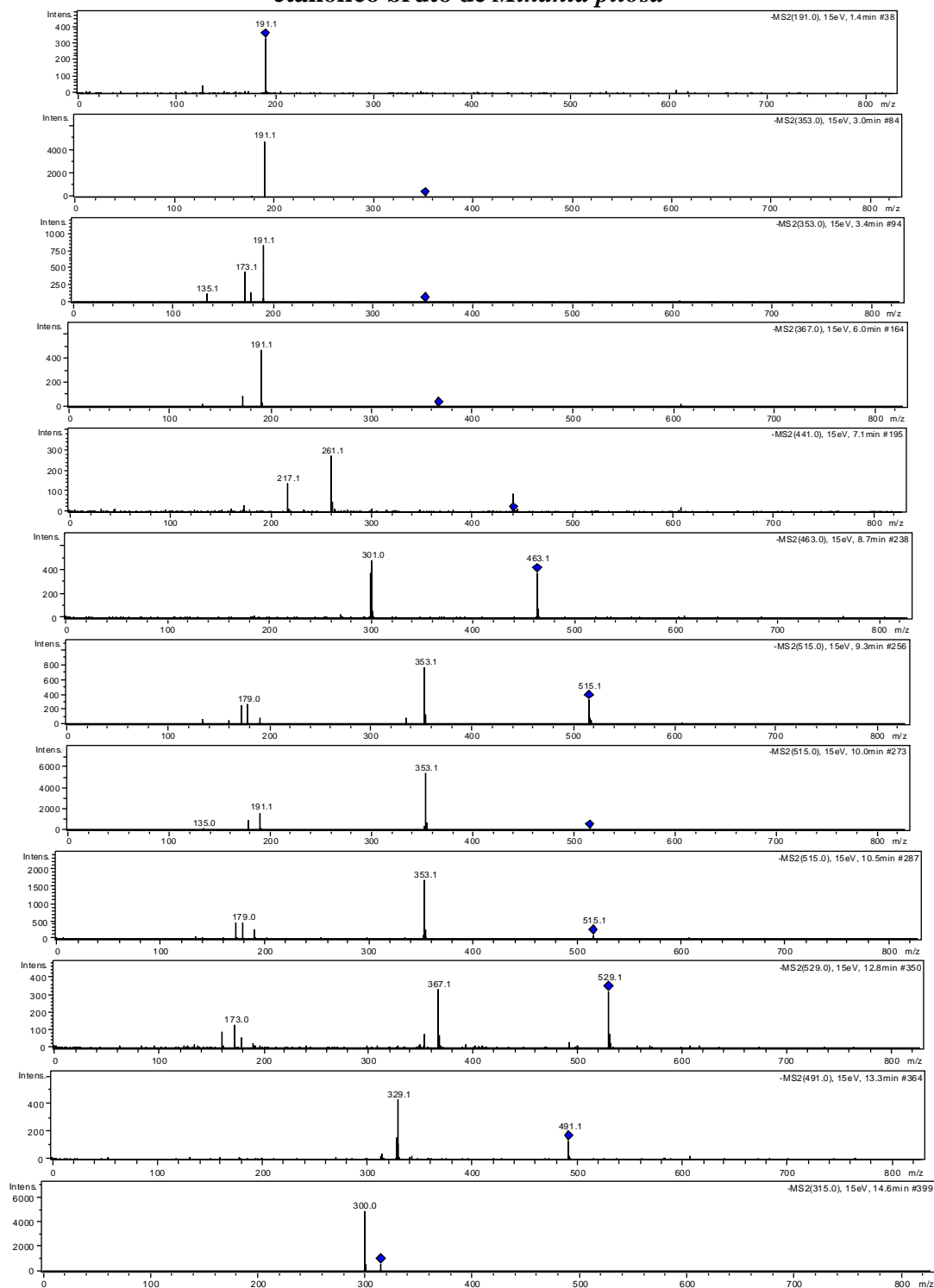
Anexo 46 – Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° da substância codificada como PI-01 (75 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , TMS).



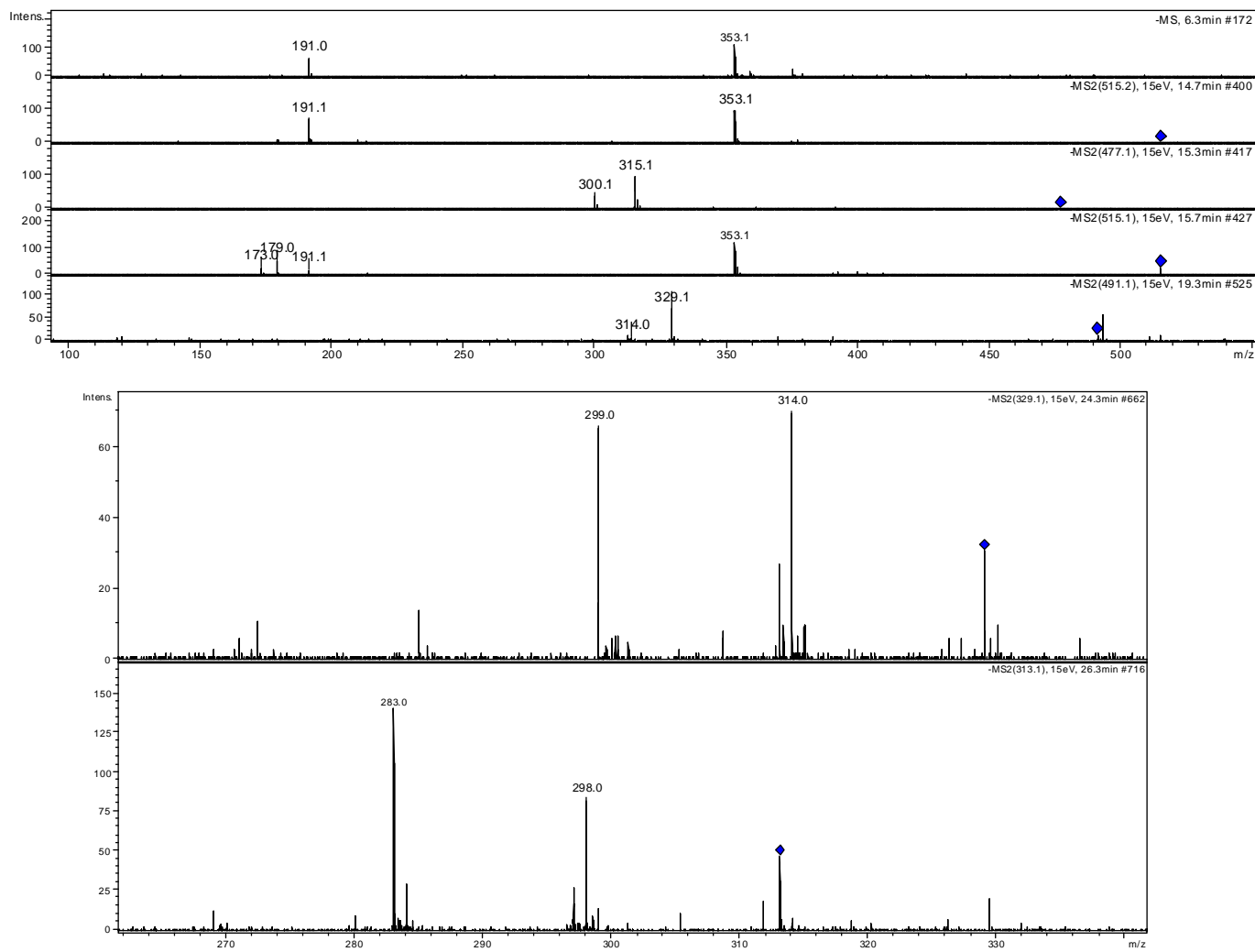
### Anexo 47 – Espectros CLAE-IES-EM/EM (modo negativo) do extrato etanólico de *Mikania parodii*



### Anexo 48 – Espectros CLAE-IES-EM ou EM/EM (modo negativo) do extrato etanólico bruto de *Mikania pilosa*

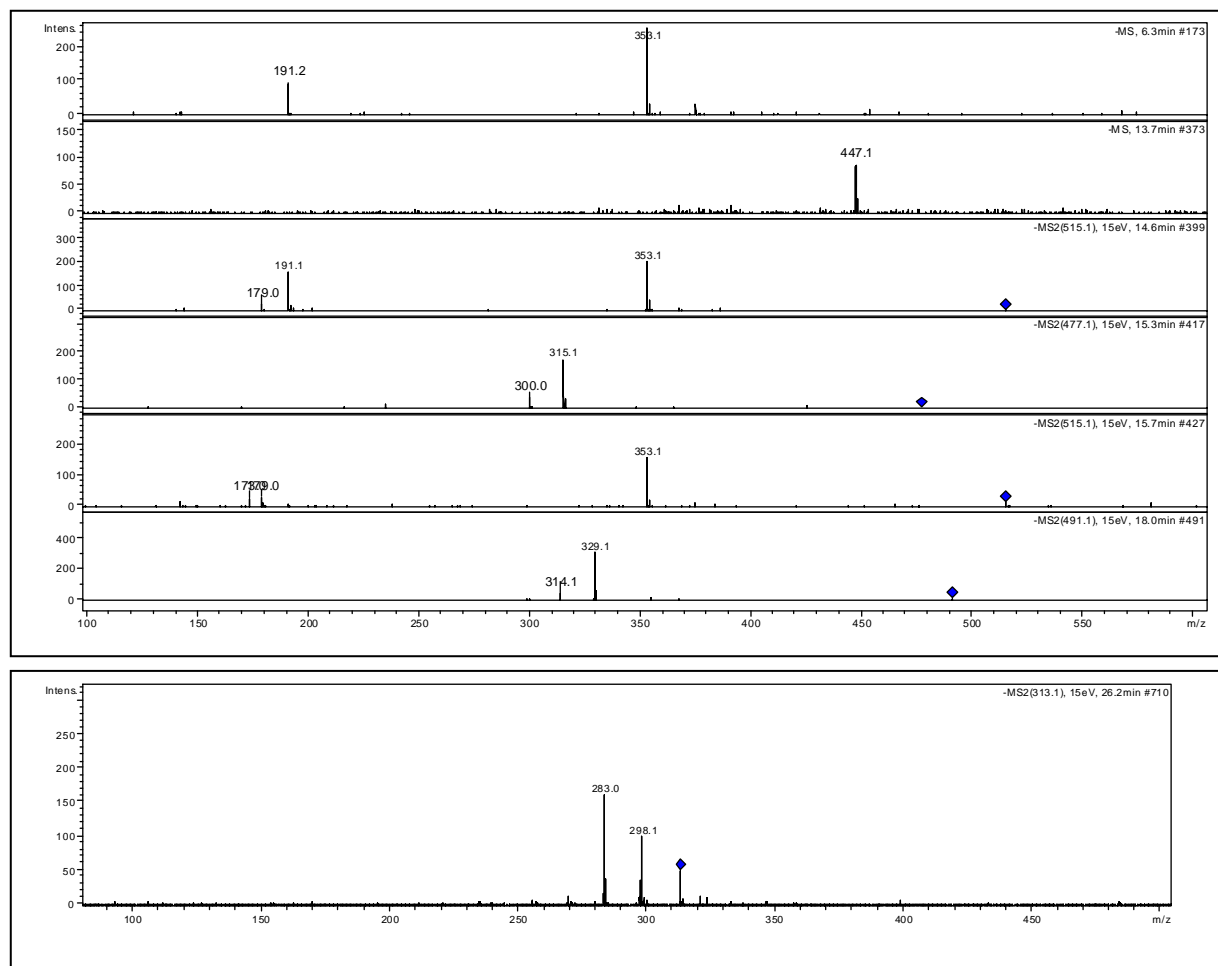


Anexo 49 - Espectros de massas obtidos nas análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato de *M. camporum*



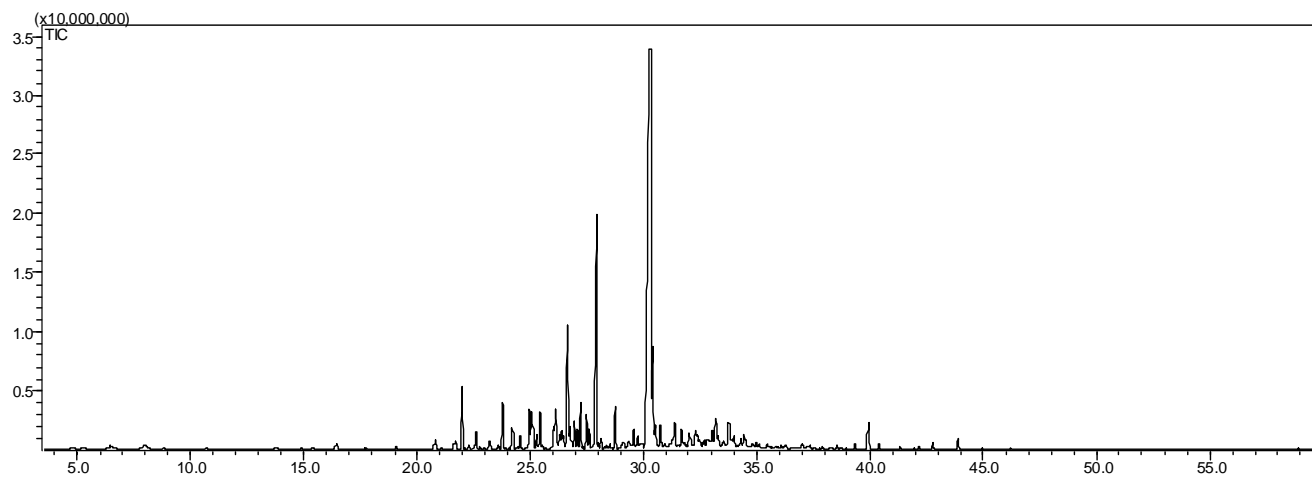
Anexo 50 – Espectros de massas (modo negativo) obtidos nas análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM do extrato de

*M. vitifolia*

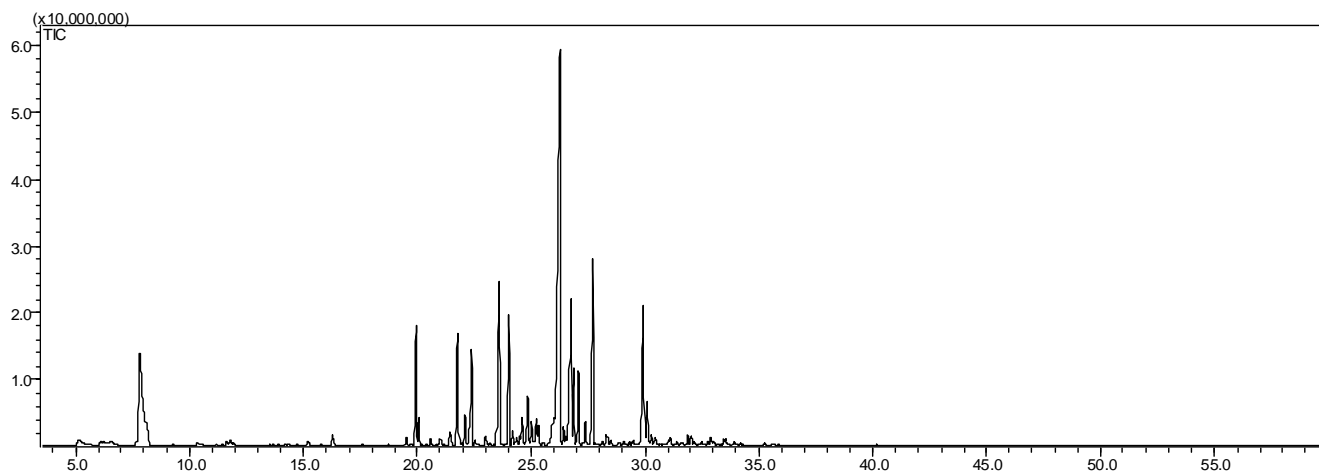




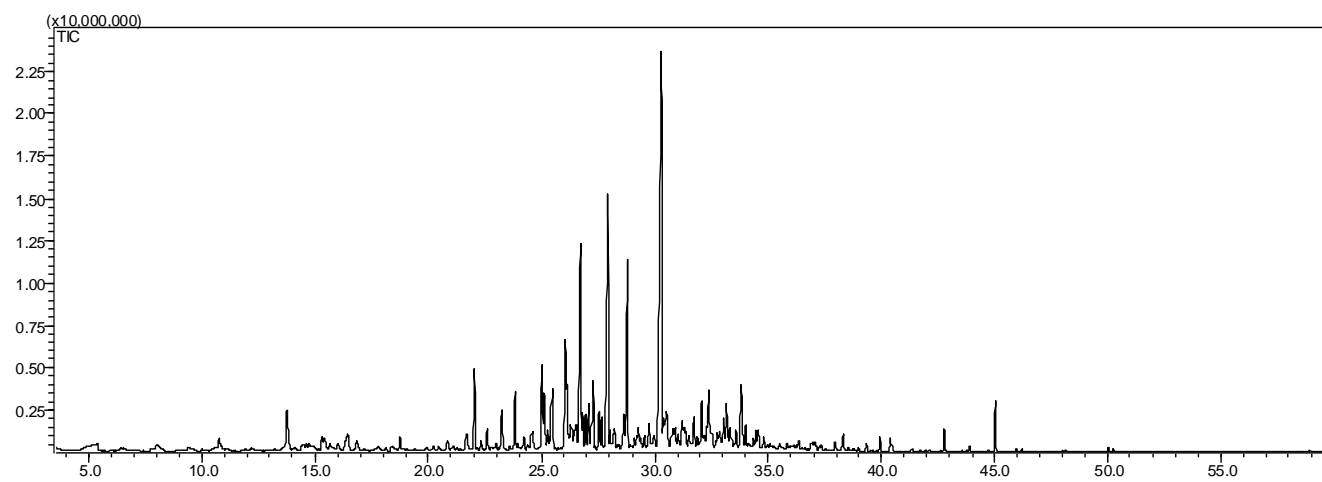
Anexo 51 – Cromatograma da análise em HS-SPME e CG-EM das partes aéreas de *Mikania pilosa* coletadas em Costa Rica – MS



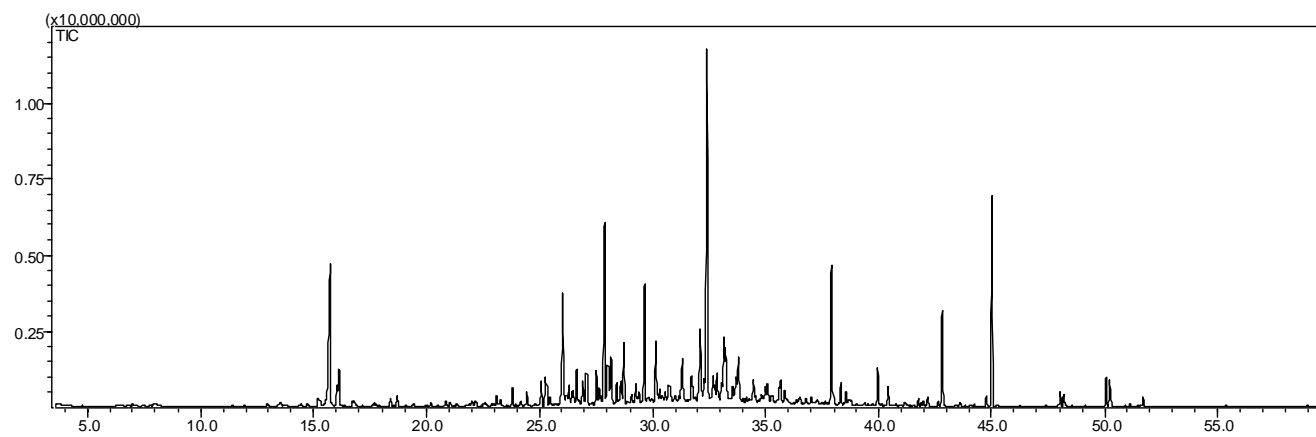
Anexo 52 – Cromatograma da análise em HS-SPME e CG-EM das partes aéreas de *Mikania pilosa* coletadas em Alcinópolis – MS



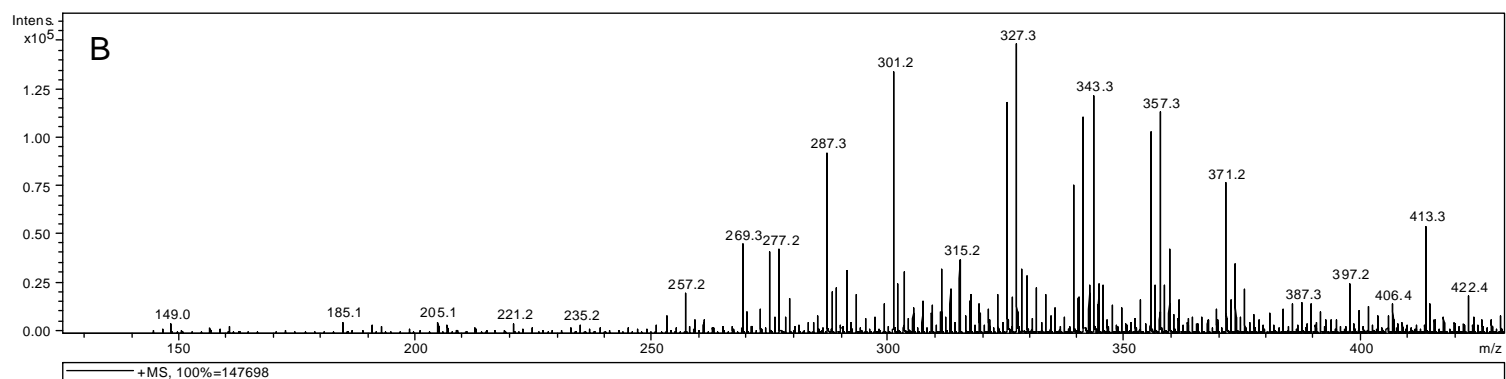
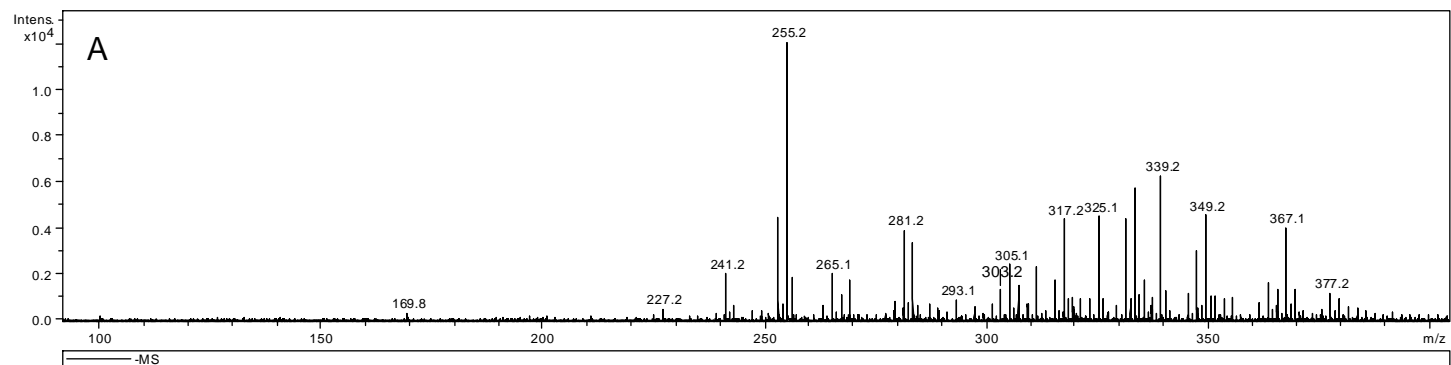
Anexo 53 – Cromatograma da análise em HS-SPME e CG-EM do extrato etanólico bruto de *Mikania pilosa* coletada em Costa Rica – MS



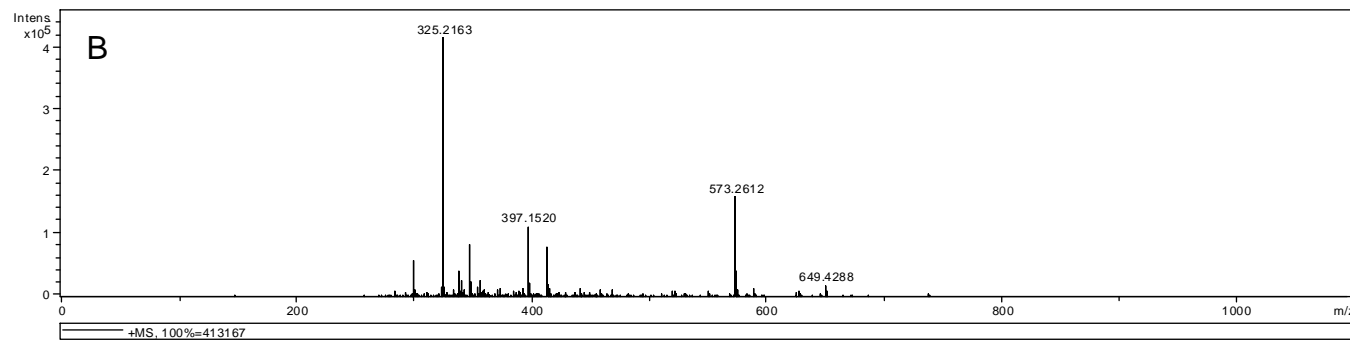
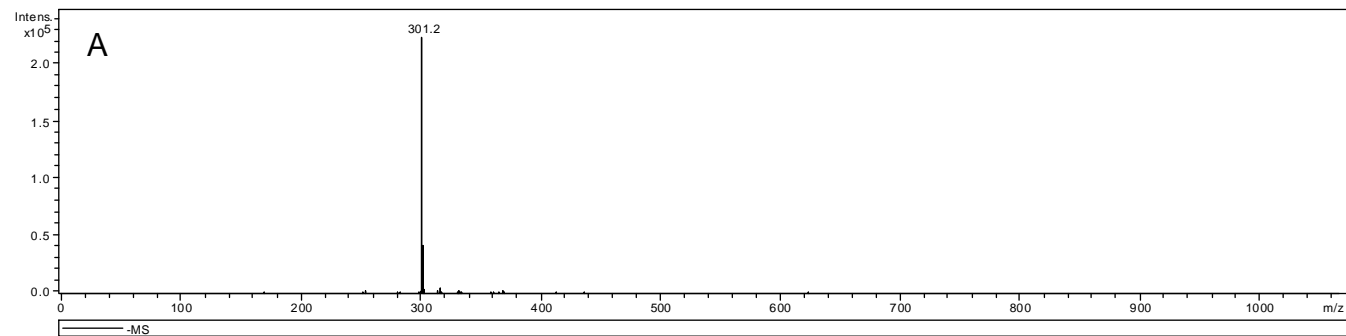
Anexo 54 – Cromatograma da análise em HS-SPME e CG-EM do extrato etanólico bruto de *Mikania parodii* coletada em Aquidauana – MS



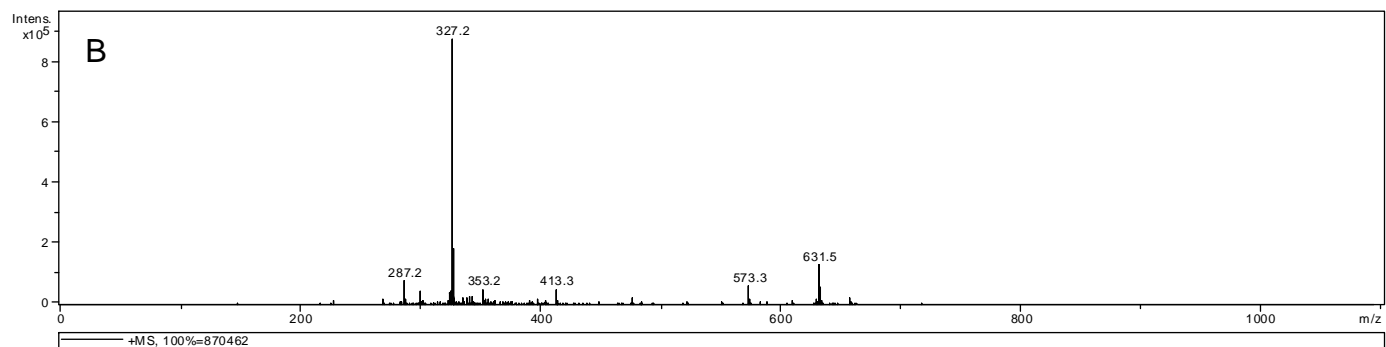
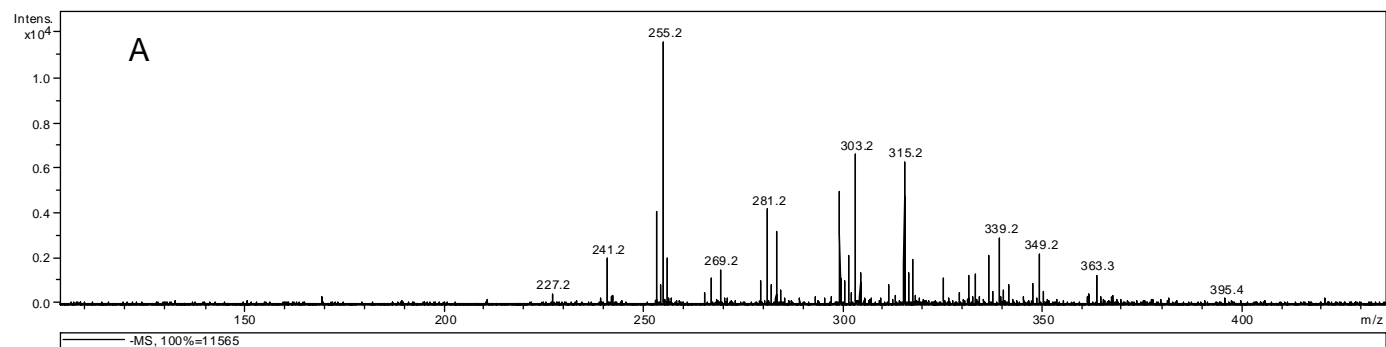
Anexo 55 - Espectros das análises em IES-EM nos modos negativo (A) e positivo (B) do diterpeno D1.



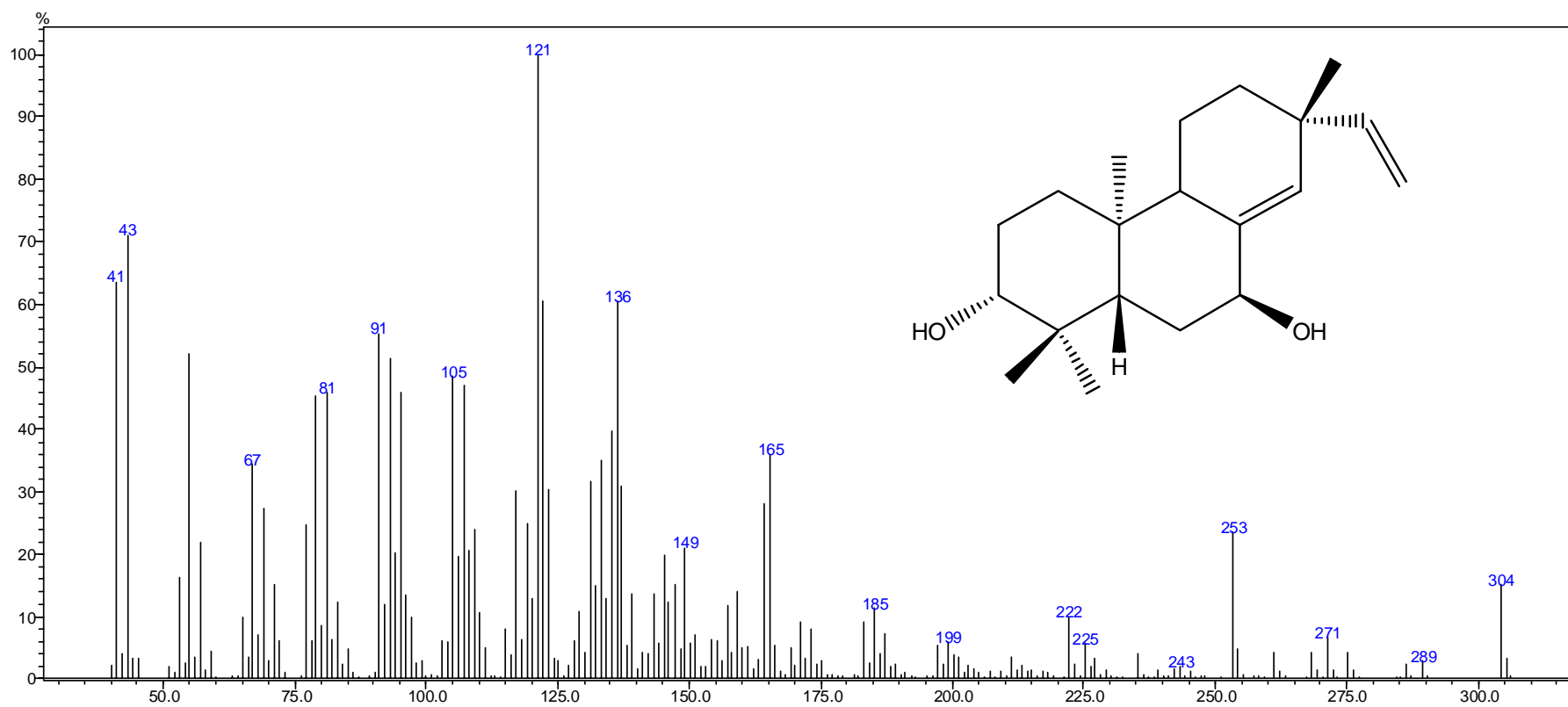
Anexo 56 - Espectros análises em IES-EM nos modos negativo (A) e positivo (B) do diterpeno D2.



Anexo 57 - Espectros das análises em IES-EM nos modos negativo (A) e positivo (B) do diterpeno D4.

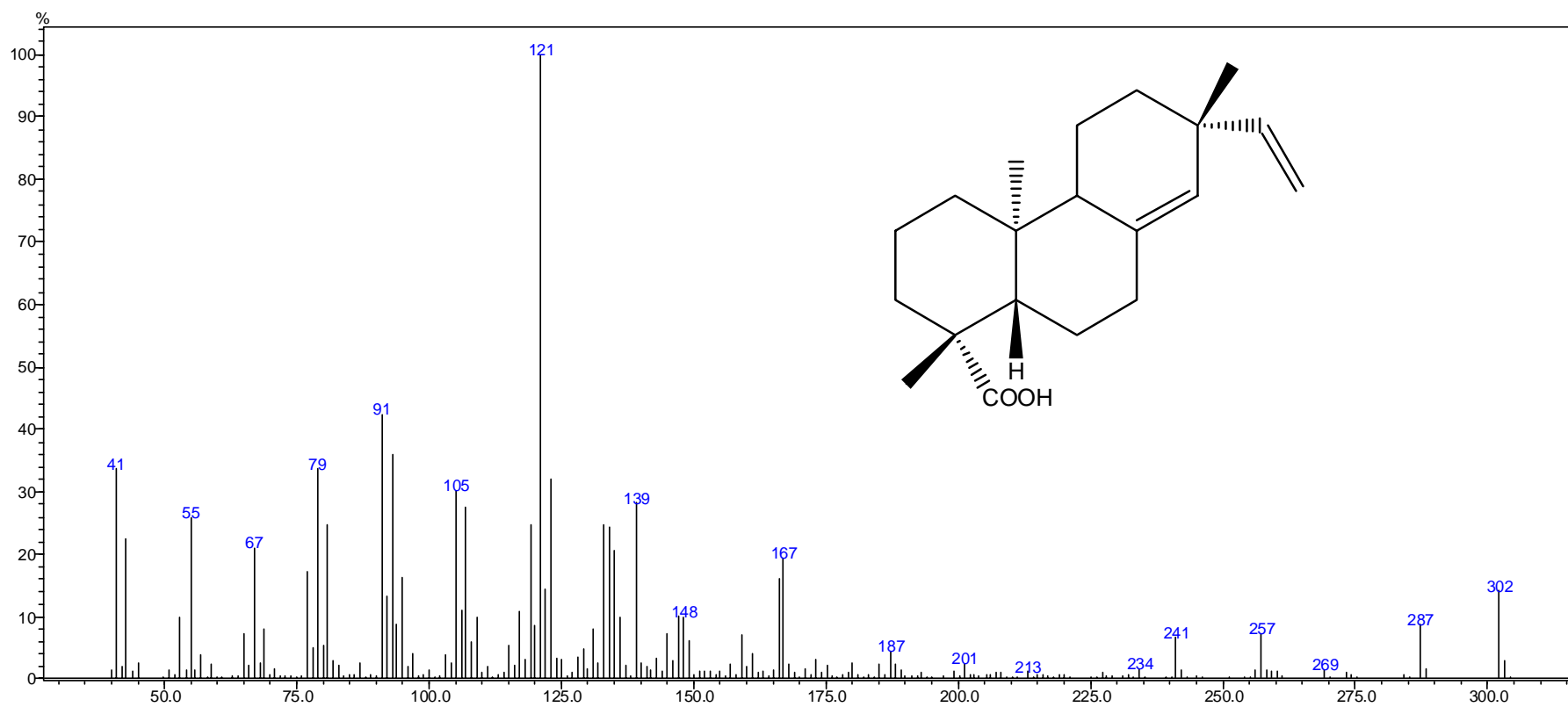


Anexo 58 – Espectro de Massas, IE- 70 eV, do diterpeno codificado como D1.

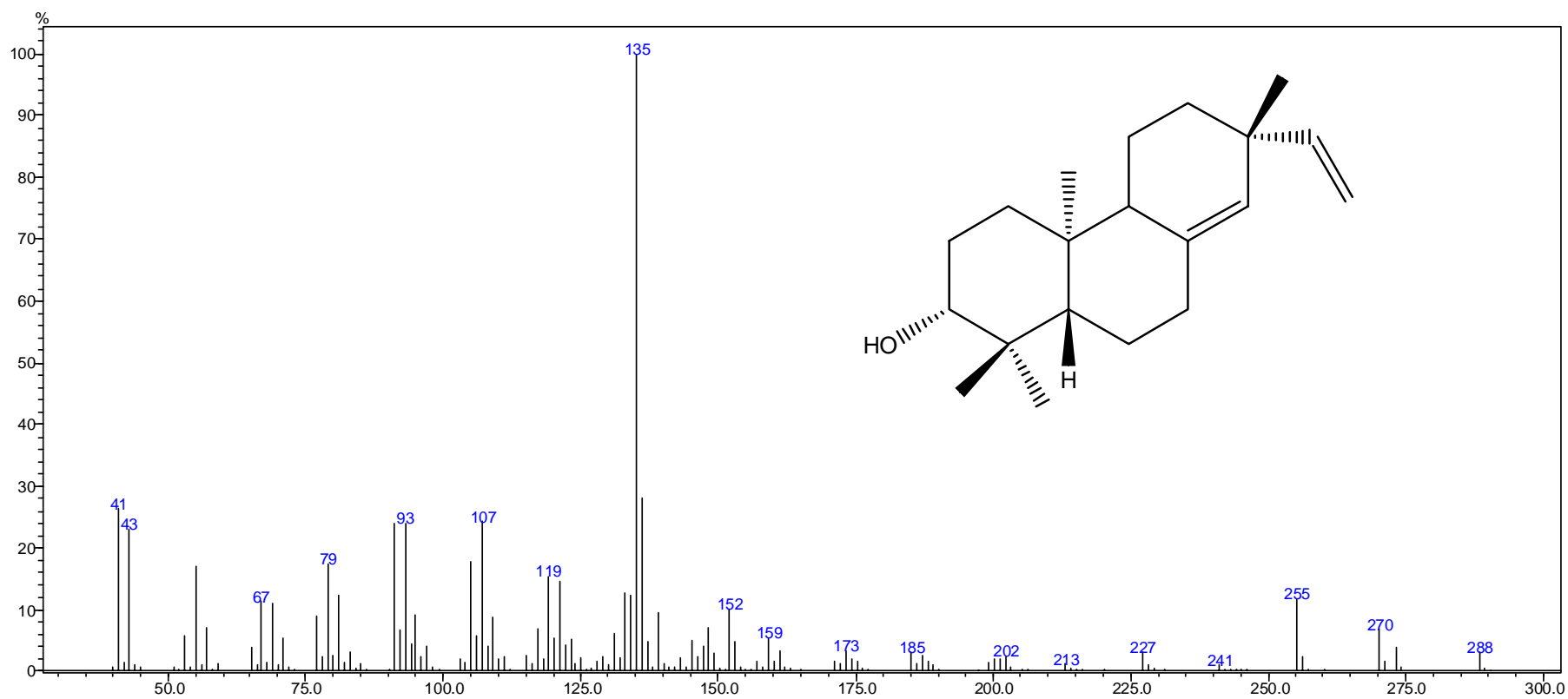




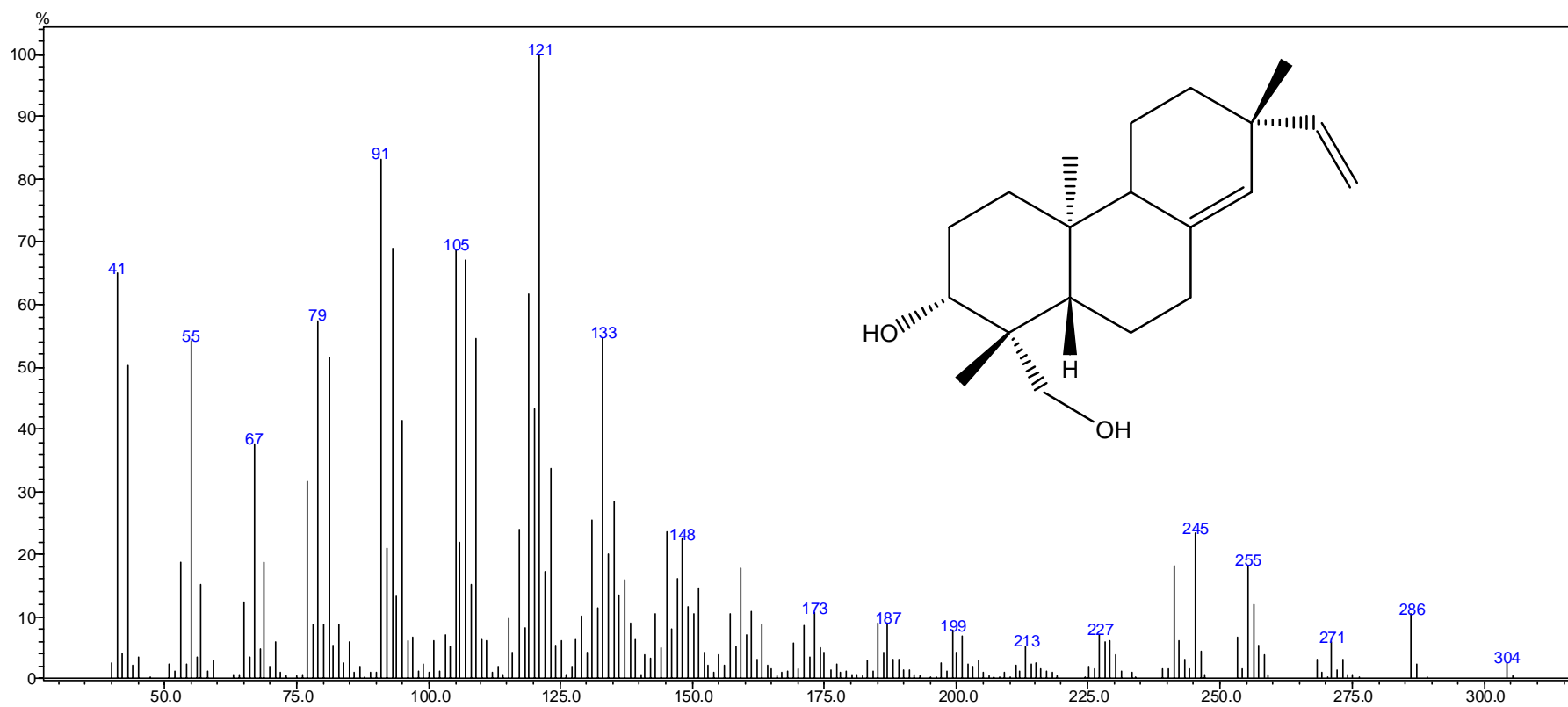
Anexo 59 – Espectro de Massas, IE- 70 eV, do diterpeno codificado como D2.



Anexo 60 – Espectro de Massas, IE- 70 eV, do diterpeno codificado como D3.



Anexo 61 – Espectro de Massas, IE- 70 eV, do diterpeno codificado como D4.



# 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](#)