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

“Estudo fitoquímico comparativo entre espécimes de *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd.”.

Patrícia Abrão de Oliveira

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

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE
RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**“Estudo fitoquímico comparativo entre espécimes de *Mikania*
cordifolia (L. f.) Willd.”**

Patrícia Abrão de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO - SP

2007

Patrícia Abrão de Oliveira

“Estudo fitoquímico comparativo entre espécimes de *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd.”

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dionéia Camilo
Rodrigues de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO - SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Patricia Abrão de
Estudo fitoquímico comparativo entre espécimes de *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd. Ribeirão Preto, 2007.

126 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Oliveira, Dionéia Camilo Rodrigues de

1. Asteraceae. 2. *Mikania*. 3. Estudo fitoquímico.

Folha de Aprovação

Autora: Patrícia Abrão de Oliveira

Título: Estudo fitoquímico comparativo entre espécimes de *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd.

Trabalho aprovado em ____/____/2007

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ao meu filho Ernesto

Agradecimentos

Ao CNPq, pela bolsa de estudo concedida.

Ao CNPq, à FAPESP e à CAPES, pelos auxílios financeiros.

À Prof^ª Dr^a Dionéia Camilo Rodrigues de Oliveira pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

Ao Prof. Dr. Roberto Lourenço Esteves pela identificação do material vegetal.

À Prof^ª Dr^a Catarina Teixeira e à aluna Neide Galvão do Nascimento pelos ensaios biológicos.

Aos Profs. Drs. João Luis Callegari Lopes, Norberto Peporine Lopes, Diones Aparecida Dias e Hosana Maria Deboni Navickiene pelos ensinamentos.

Aos técnicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Isabel Cristina, Tomaz, Leonardo, Diógenes, Adeguimar e Perpétua pela valiosa ajuda na execução deste trabalho.

À técnica Virgínia Helena Betarello, pela obtenção dos espectros de RMN.

À secretária do Laboratório de Química Orgânica Carla Spangher pela ajuda e amizade.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial, Luis Elídio, Carlos Alexandre e Gobbo, pela ajuda e companheirismo.

Ao meu marido Fábio pelo apoio e paciência.

Aos meus pais, Arlene e Oliveira, pelo constante apoio e carinho em todas as etapas da minha vida.

A todos que colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

“O mais valoroso dentre todos nós raras vezes
tem o valor de afirmar tudo o que sabe.”

Friedrich Nietzsche

Sumário

Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	i
Lista de Tabelas.....	iii
Lista de Figuras.....	V
Resumo.....	Vii
Abstract.....	Ix
Substâncias Identificadas.....	x
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	15
3. Material e Métodos.....	16
3.1. Especificações dos materiais e instrumentos utilizados.....	16
3.2. Coleta e identificação do material vegetal.....	19
3.3. Obtenção dos extratos brutos.....	20
3.4. Fracionamento dos extratos brutos.....	21
3.5. Análise comparativa de triterpenóides por cromatografia em fase gasosa.....	24
3.6. Análise comparativa de lactonas sesquiterpênicas.....	25
3.6.1. Obtenção de padrões de lactonas sesquiterpênicas.....	27
3.6.2. Análise qualitativa das frações diclorometânicas por cromatografia líquida de alta eficiência.....	27
3.7. Análise comparativa de flavonóides.....	28
3.7.1. Fracionamento do extrato 259.....	29
3.7.2. Fracionamento do extrato 261.....	29
3.8. Ensaio de atividade antiofídica.....	30
4. Resultados e Discussão.....	32
4.1. Análise dos extratos brutos.....	32
4.2 Análise das frações obtidas a partir dos extratos brutos.....	32
4.3. Análise comparativa de triterpenóides por cromatografia em fase gasosa.....	34
4.4. Análise comparativa de lactonas sesquiterpênicas.....	40

4.4.1. Obtenção de padrões de lactonas sesquiterpênicas.....	42
4.4.2. Identificação estrutural da substância L1.....	43
4.4.3. Identificação estrutural da substância L2.....	47
4.4.4. Identificação estrutural da substância L3.....	51
4.4.5. Análise qualitativa das frações diclorometânicas por CLAE.....	55
4.5. Análise comparativa de flavonóides.....	59
4.5.1. Fracionamento do extrato 259.....	59
4.5.1.1. Identificação estrutural da substância F1.....	59
4.5.2. Fracionamento do extrato 261.....	62
4.5.2.1. Identificação estrutural da substância F2.....	62
4.5.3. Análise qualitativa das frações em acetato de etila por CLAE.....	65
4.6. Identificação estrutural da substância C1.....	73
4.7. Ensaio de atividade antiofídica.....	75
5. Conclusões.....	80
6. Referências Bibliográficas.....	83
Anexos.....	90

Lista de Símbolos e Abreviaturas

CCC – Cromatografia em Coluna Clássica
CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG – Cromatografia Gasosa
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
DMSO – Dimetilsulfóxido
HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HMQC – *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*
IV – Infravermelho
 J – Constante de acoplamento
min. – Minuto
mult. – Multiplicidade
 n° – Número
PA – Pró-Análise
PND – *Proton Noise Decoupling*
RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
UV – Ultravioleta
 λ – Comprimento de onda
 δ – Deslocamento químico
 d – Dubleto
 dd – Duplo dubleto
 dq – Duplo quadrupletto
 m – Multipletto
 q – Quadrupletto
 s – Singleto
 sl – Singleto largo
 t – Tripletto

tl - Tripleto largo

259 - Extrato preparado a partir de planta coletada em Ribeirão Preto

261 - Extrato preparado a partir de planta coletada em São Carlos

264 - Extrato preparado a partir de planta coletada em Campos do Jordão

266 - Extrato preparado a partir de planta coletada em Monte Verde

M- Metanólico

H- Hexânico

R- Resíduo

D- Diclorometânico

Ac - Acetato de etila

Aq - Aquoso

Lista de Tabelas

Tabela 1-	Usos populares da espécie <i>Mikania cordifolia</i> (planta total).....	9
Tabela 2-	Estudos biológicos realizados sobre a espécie <i>Mikania cordifolia</i>	10
Tabela 3-	Estudos fitoquímicos realizados com <i>Mikania cordifolia</i>	11
Tabela 4-	Dados de coletas de <i>Mikania cordifolia</i> (L. f.) Willd.....	19
Tabela 5-	Extratos brutos preparados com as partes aéreas de <i>M. cordifolia</i> coletadas em quatro locais diferentes.....	20
Tabela 6-	Frações obtidas a partir das extrações líquido-líquido dos extratos brutos de espécimes de <i>M. cordifolia</i>	22
Tabela 7-	Condições utilizadas para a análise de triterpenos em CG.....	25
Tabela 8-	Extratos aquosos preparados com partes aéreas de <i>Mikania</i> <i>cordifolia</i>	26
Tabela 9-	Extratos obtidos após maceração do material vegetal com água e extração líquido-líquido com diclorometano e acetato de etila.....	40
Tabela 10-	Dados de RMN de ^1H da substância L1 (400 MHz, CDCl_3 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).....	45
Tabela 11-	Dados de RMN ^{13}C da substância L1 (100 MHz; CDCl_3 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).....	46
Tabela 12-	Dados de RMN de ^1H da substância L2 (400 MHz, CDCl_3 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).....	49
Tabela 13-	Dados de RMN ^{13}C da substância L2 (100 MHz; CDCl_3 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).....	50
Tabela 14-	Dados de RMN de ^1H da substância L3 (400 MHz, CDCl_3 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).....	53
Tabela 15-	Dados de RMN ^{13}C da substância L3 (100 MHz; CDCl_3 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).....	54
Tabela 16-	Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância F1 ($\text{DMSO}-d_6$, TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).....	61
Tabela 17-	Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância F2 ($\text{DMSO}-d_6$, TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).....	64
Tabela 18-	Dados de RMN de ^1H da substância C1 (400 MHz, CDCl_3 , TMS, δ , mult.).....	74

Tabela 19-	Dados do espectro de absorção na região do UV/ Vis da substância C1	74
Tabela 20-	Composição de triterpenóides de frações obtidas a partir de <i>Mikania cordifolia</i> coletada em Ribeirão Preto (coluna HP-50).....	99
Tabela 21	Composição de triterpenóides de frações obtidas a partir de <i>Mikania cordifolia</i> coletada em São Carlos (coluna HP-50).....	100
Tabela 22-	Composição de triterpenóides de frações obtidas a partir de <i>Mikania cordifolia</i> coletada em Campos do Jordão (coluna HP-50).....	101
Tabela 23-	Composição de triterpenóides de frações obtidas a partir de <i>Mikania cordifolia</i> coletada em Monte Verde (coluna HP-50).....	102

Lista de Figuras

Figura 1-	<i>M. cordifolia</i> nativa do campus da USP de Ribeirão Preto.....	6
Figura 2-	Foto de <i>M. cordifolia</i> (LORENZI, 1982).....	6
Figura 3-	Classificação taxonômica da espécie <i>Mikania cordifolia</i> (L. f.) Willd.....	7
Figura 4-	Mapa de distribuição de <i>M. cordifolia</i> no Brasil (LORENZI, 1982).....	7
Figura 5-	Protocolo de extração líquido-líquido dos extratos brutos com diferentes solventes.....	23
Figura 6-	Protocolo de extração líquido-líquido dos extratos aquosos de <i>M. cordifolia</i>	26
Figura 7-	Protocolo do fracionamento de 261M e D para obtenção de padrões.....	30
Figura 8-	Triterpenóides identificados nos resíduos e nas frações hexânicas dos extratos 259M, 259D, 261M e 261D com padrões para enriquecimento da amostra.....	37
Figura 9-	Composição de triterpenóides de extratos obtidos a partir de <i>Mikania cordifolia</i> coletada em Ribeirão Preto.....	38
Figura 10-	Composição de triterpenóides de extratos obtidos a partir de <i>Mikania cordifolia</i> coletada em São Carlos.....	38
Figura 11-	Composição de triterpenóides de extratos obtidos a partir de <i>Mikania cordifolia</i> coletada em Campos do Jordão.....	39
Figura 12-	Composição de triterpenóides de extratos obtidos a partir de <i>Mikania cordifolia</i> coletada em Monte Verde.....	39
Figura 13-	Perfil cromatográfico da fração 259AqD.....	57
Figura 14-	Perfil cromatográfico da fração 261AqD.....	57
Figura 15-	Perfil cromatográfico da fração 264AqD.....	58
Figura 16-	Perfil cromatográfico da fração 259DAc.....	67
Figura 17-	Perfil cromatográfico da fração 259MAc.....	67
Figura 18-	Perfil cromatográfico da fração 261DAc.....	68
Figura 19-	Perfil cromatográfico da fração 261MAc.....	68
Figura 20-	Perfil cromatográfico da fração 264DAc.....	69
Figura 21-	Perfil cromatográfico da fração 264MAc.....	69
Figura 22-	Perfil cromatográfico da fração 266DAc.....	70
Figura 23-	Perfil cromatográfico da fração 266MAc.....	70

Figura 24-	Perfil cromatográfico da fração 259MAc juntamente com espectros na região do UV-Vis das substâncias identificadas.....	71
Figura 25-	Perfil cromatográfico da fração 261MAc juntamente com espectros na região do UV-Vis das substâncias identificadas.....	71
Figura 26-	Perfil cromatográfico da fração 264MAc juntamente com espectros na região do UV-Vis das substâncias identificadas.....	72
Figura 27-	Perfil cromatográfico da fração 266MAc juntamente com espectros na região do UV-Vis das substâncias identificadas.....	72
Figura 28-	Efeito da administração intraperitoneal de extrato aquoso de <i>Mikania cordifolia</i> 20% (2g/ animal, 1 hora antes) sobre o edema de pata de camundongo induzido pela injeção intraplantar de veneno de <i>Bothrops moojen</i> (1,0 µg/ pata).....	78
Figura 29-	Efeito da administração intraperitoneal de extrato aquoso de <i>Mikania cordifolia</i> 20% (0,2 g/ animal, 1 hora antes) sobre o edema de pata de camundongo induzido pela injeção intraplantar de veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (1,0 µg/ pata).....	79
Figura 30-	Efeito da administração intraperitoneal de extrato aquoso de <i>Mikania cordifolia</i> 20% (0,1 g/ animal, 30 minutos antes) sobre o edema de pata de camundongo induzido pela injeção intraplantar de veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (1,0 µg/ pata).....	80
Figura 31-	Espectro de absorção na região do IV dos extratos 259D e 259M.....	91
Figura 32-	Espectro de absorção na região do IV dos extratos 261D e 261M.....	92
Figura 33-	Espectro de absorção na região do IV dos extratos 264D e 264M.....	93
Figura 34-	Espectro de absorção na região do IV dos extratos 266D e 266M.....	94
Figura 35-	Espectros de absorção na região do IV das frações 261DR e 261DH.....	95
Figura 36-	Espectros de absorção na região do IV das frações 261DD e 261DAc.....	96
Figura 37-	Espectros de absorção na região do IV das frações 261MR e 261MH.....	97
Figura 38-	Espectros de absorção na região do IV das frações 261MD e 261MAc.....	98
Figura 39-	Espectros de absorção na região do IV das frações 259AqD e 261AqD.....	103
Figura 40-	Espectro de absorção na região do IV da fração 264AqD.....	104
Figura 41-	Espectro de RMN de ¹ H da substância L1 (400 MHz, CDCl ₃).....	105
Figura 42-	Espectro de RMN de ¹³ C da substância L1 (100 MHz, CDCl ₃).....	106
Figura 43	Espectro de RMN de ¹³ C, DEPT 135° da substância L1 (100 MHz, CDCl ₃).....	107

Figura 44	Mapa de contorno da substância L1 , HMQC (100 MHz, CDCl ₃).....	108
Figura 45	Espectro de RMN de ¹ H da substância L2 (400 MHz, CDCl ₃).....	109
Figura 46	Espectro de RMN de ¹³ C da substância L2 (100 MHz, CDCl ₃).....	110
Figura 47	Espectro de RMN de ¹³ C, DEPT 135° da substância L2 (100 MHz, CDCl ₃).....	111
Figura 48	Mapa de contorno da substância L2 , HMQC (100 MHz, CDCl ₃).....	112
Figura 49-	Espectro de RMN de ¹ H da substância L3 (400 MHz, CDCl ₃).....	113
Figura 50-	Espectro de RMN de ¹³ C da substância L3 (100 MHz, CDCl ₃).....	114
Figura 51-	Espectro de RMN de ¹³ C, DEPT 135° da substância L3 (100 MHz, CDCl ₃).....	115
Figura 52-	Mapa de contorno da substância L3 , HMQC (100 MHz, CDCl ₃).....	116
Figura 53-	Espectro de RMN de ¹ H da substância F1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	117
Figura 54-	Espectro de RMN de ¹³ C da substância F1 (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	118
Figura 55-	Mapa de contorno da substância F1 , HMBC (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	119
Figura 56-	Mapa de contorno da substância F1 , HMQC (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	120
Figura 57-	Espectro de RMN de ¹ H da substância F2 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	121
Figura 58-	Espectro de RMN de ¹³ C da substância F2 (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	122
Figura 59-	Mapa de contorno da substância F2 , HMBC (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	123
Figura 60-	Mapa de contorno da substância F2 , HMQC (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	124
Figura 61-	Espectro de RMN de ¹ H da substância C1 (400 MHz, CDCl ₃).....	125
Figura 62-	Espectro de absorção na região do UV da substância C1	126

Resumo

OLIVEIRA, P. A. **Estudo fitoquímico comparativo entre espécimes de *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd.** 2007. 126 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

No presente trabalho, espécimes de *Mikania cordifolia* coletados em Ribeirão Preto, São Carlos, Campos do Jordão e Monte Verde são analisados comparativamente por métodos cromatográficos (CG e CLAE) para a pesquisa de triterpenóides, lactonas sesquiterpênicas e flavonóides.

Todos os espécimes de *M. cordifolia* avaliados apresentaram os triterpenóides α -Amirina, β -Amirina, Lupeol, Lupenona, Taraxasterol, Pseudotaraxasterol, Acetato de α -Amirina, Acetato de β -Amirina, Acetato de Lupeol, Acetato de Taraxasterol, Campesterol, Estigmasterol e β -Sitosterol, as lactonas sesquiterpênicas 14-hidroxi-15[2'-hidroximetilacrilóiloxi]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo, 14-hidroxi-15[2'-hidroxi,2'-metilpropanoiloxi]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo e 14-hidroxi-15[2',3'-epoxi,2'-metilpropanoiloxi]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo, os flavonóides Quercetina-3-O- β -galactosídeo e Rhamnazina e o ácido 3,4-diidroxi-benzóico. Apenas os espécimes de Ribeirão Preto e São Carlos apresentaram Friedelina.

O extrato aquoso de *M. cordifolia* foi avaliado para atividade antiofídica, mostrando-se efetivo na diminuição do edema de pata de camundongo induzido por veneno de *Bothrops moojeni*.

Palavras-chave: Asteraceae; *Mikania*; Estudo fitoquímico

Abstract

OLIVEIRA, P. A. **Comparative phytochemical study among specimens of *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd.** 2007. 126 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

In the present work, specimens of *Mikania cordifolia* collected at Ribeirão Preto, São Carlos, Campos do Jordão and Monte Verde were analyzed comparatively for triterpenoids, sesquiterpene lactones and flavonoids by chromatographic methods (GC and HPLC).

All *M. cordifolia* specimens analyzed showed the triterpenoids α -Amyrin, β -Amyrin, Lupeol, Lupenone, Taraxasterol, Pseudotaraxasterol, α -Amyrin Acetate, β -Amyrin Acetate, Lupeol Acetate, Taraxasterol Acetate, Campesterol, Stigmasterol e β -Sitosterol, the sesquiterpene lactones 14-hydroxy-15[2'-hydroxymethylacryloyloxy]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olide, 14-hydroxy-15[2'-hydroxy,2'-methylpropanoyloxy]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olide e 14-hydroxy-15[2',3'-epoxy,2'-methylpropanoyloxy]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olide, the flavonoids Quercetin-3-O- β -galactoside and Rhamnazyn and the compound 3,4-dihydroxy-benzoic acid. Only specimens collected at Ribeirão Preto and São Carlos showed Friedelin.

The aqueous extract of *M. cordifolia* was evaluated for antiofidic activity and was found effective in reducing mice paw edema induced by venom of *Bothrops moojeni*.

Keywords: Asteraceae; *Mikania*; Phytochemical study

Substâncias Identificadas

T1 **T2** **T3** **T4** **T5** **T6** **T7** **T8**

T9 **T10** **T11** **T12** **T13** **T14** **L1** **L2** **L3**

1. Introdução

A pesquisa de produtos naturais mostra a sua relevância ao se considerar que mais da metade da população mundial faz uso de plantas medicinais por serem estas seus únicos recursos terapêuticos (HARVEY, 2000; PINTO *et al.*, 2002) e que aproximadamente um terço das drogas mais vendidas no mundo são de origem natural (STROHL, 2002).

No período de 1981 a 2002, mais de 60% dos medicamentos introduzidos no mercado possuía origem natural (isolada de célula ou planta), era proveniente de modificação através de síntese química de um produto natural ou era um composto sintético que mimetizava uma substância natural, sendo que apenas 33% destes medicamentos eram drogas totalmente sintéticas (NEWMAN *et al.*, 2003).

Apesar dos fatos expostos, nos últimos anos, as indústrias farmacêuticas têm negligenciado o estudo de produtos naturais em favor de uma busca sistematizada de novas drogas através da síntese química ou química combinatória (STROHL, 2002; TREVISAN *et al.*, 2003)

Atualmente, avanço de técnicas analíticas que possibilitem a análise de extratos vegetais sem fracionamento prévio (PINTO *et al.*, 2002) e a constatação de que moléculas de origem natural possuem maior especificidade e potência quando comparadas com aquelas produzidas através de química combinatória fazem ressurgir um grande interesse pela química de produtos naturais (PATERSON, & ANDERSON, 2005).

A co-evolução das plantas com agentes agressores, tais como microrganismos e insetos, possibilitou a formação de metabólitos secundários que são de interesse para

a ciência. Entre estas, as angiospermas, que possuem pelo menos 25000 espécies, formam o grupo de maior destaque para a pesquisa de produtos naturais, pois apresenta metabolismo distinto e mais complexo (MONTANARI & BOLZANI, 2001)

A família Asteraceae, também conhecida como Compositae ou das compostas, é uma das famílias botânicas com maior número de espécies entre as angiospermas, possui cerca 1535 gêneros e 23.000 espécies, distribuídas em 3 subfamílias (Barnadesioideae, Cichorioideae, Asteroideae) e 17 tribos. Estes números podem sofrer variações, pois, a cada ano, mais de 10 gêneros são descritos e muitos já existentes são reclassificados ou reduzidos a sinonímias (BREMER, 1994).

As plantas da família Asteraceae estão dispersas por todo o mundo, mas são particularmente abundantes no sudoeste dos EUA, México, Brasil, ao longo dos Andes, na área mediterrânea, no sul, sudoeste e parte central da Ásia e Austrália (KING & ROBINSON, 1987).

O estudo químico das espécies de Asteraceae se justifica pela busca de substâncias bioativas, pelo uso popular destas plantas como medicamento, pela importância alimentar e também pela contribuição para a quimiotaxonomia nesta família.

Os vegetais pertencentes à Asteraceae caracterizam-se quimicamente pela diversidade de metabólitos secundários, tais como terpenóides, compostos acetilênicos, fitomelaninas, ácido caféico, flavonóides e, com menor frequência, os alcalóides (BREMER, 1994). Dentre os terpenóides, destacam-se as lactonas sesquiterpênicas que são importantes marcadores quimiotaxonômicos para as espécies desta família e são amplamente encontradas entre suas tribos (SEAMAN,

1984; SPRING, 1989; ZDERO & BOHLMANN, 1990). As lactonas sesquiterpênicas destas diversas tribos apresentam-se com determinado predomínio de tipo de esqueleto, de lactonização e estereoquímica dos substituintes (ZDERO & BOHLMANN, 1990).

Na região neotropical, a tribo Eupatorieae constitui a maior parte da família Asteraceae e tem alguns elementos ocorrendo naturalmente entre o Norte da América, Canadá e parte nordeste do hemisfério norte. As espécies da tribo Eupatorieae, a qual pertence o gênero *Mikania*, caracterizam-se quimicamente pela concentração de flavonóides, terpenóides (sesquiterpenóides e diterpenóides) e cumarinas (BREMER, 1994).

Taxonomicamente, os membros desta tribo carecem de características marcantes. Tal fato levou os taxonomistas KING & ROBINSON (1987) a considerarem subdivisões geográficas, características citológicas e químicas no estudo das espécies desta tribo.

Porém, o gênero *Mikania* (subtribo Mikaniinae) constitui um dos mais facilmente reconhecidos e uniformes da tribo, embora dificuldades sejam encontradas na delimitação das espécies devido à existência de vários complexos de espécies altamente polimórficas, dos quais muitos foram reduzidos a sinônimas (HERZ, 1986; KING & ROBINSON, 1987). Devido a este fato, existem várias propostas de classificação para as espécies deste gênero:

- BARROSO (1958) propõe uma divisão em cinco seções utilizando como caracteres a forma da folha, hábito das espécies (ereto, volúvel ou decumbente) e o tipo de inflorescência.

- HOLMES (1996) propõe uma divisão em duas seções (*Summikania* e *Mikania*) baseando-se no padrão de maturação do capítulo e na localização das brácteas subinvolucrais.
- HERZ (1986), com base nos constituintes químicos, propõe uma divisão do gênero em dois grupos: Complexo *Mikania scandens* e um grupo das outras *Mikantias* e sugere que as dilactonas sesquiterpênicas do tipo mikanolídeo sejam marcadores químicos do complexo *M. scandens*. Porém em 1998, em sua nova revisão sobre o gênero, mostra que as dilactonas do tipo mikanolídeo não podem ser marcadores químicos, pois não se restringem apenas a espécies do complexo *M. scandens* e que existem espécies dentro deste complexo que produzem exclusivamente outros tipos de lactonas, não sendo possível afirmar que a química reflete sobre a filogenia, pois apenas cerca de 10% das espécies conhecidas foram estudadas quimicamente (HERZ, 1998).

Existem cerca de 430 espécies de *Mikania* conhecidas nas Américas, sendo que no Brasil, são encontradas 142 espécies endêmicas e 27 cosmopolitas, que ocorrem de Norte a Sul, tendo sua maior área de dispersão nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro (BARROSO, 1958; BREMER, 1994; KING & ROBINSON, 1987).

Até o momento, aproximadamente 10 % das espécies conhecidas do gênero *Mikania* foram estudadas quimicamente e a maioria destes estudos envolveram extratos de baixa e média polaridade. Este número diminui quando se trata de estudos biológicos, pois, até o momento, há poucos trabalhos publicados sobre atividades biológicas de espécies deste gênero e não existe nenhum trabalho sobre a

variação do perfil químico da mesma espécie coletada em diferentes locais, “variação intra-espécie”.

Entre as espécies com algum estudo químico realizado, verifica-se, após a análise dos dados da literatura, a presença de lactonas sesquiterpênicas e diterpenos, sendo que, entre as lactonas sesquiterpênicas, existe uma predominância do esqueleto germacranolídeo do tipo lactonizado no C-8.

A espécie *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd. (Figuras 1 e 2), objeto deste estudo, pertence à família Asteraceae, tribo Eupatorieae, subtribo Mikaniinae. Na Figura 3, são apresentados mais detalhes de sua classificação taxonômica.

Esta espécie se encontra amplamente distribuída pelas Américas, abrangendo o sudoeste dos EUA, México, América Central e América do Sul e também parte ocidental da Índia (KING & ROBINSON, 1987). No Brasil, ela pode ser encontrada por quase todo o território, como pode ser observado na Figura 4.

Figura 1: *M. cordifolia* nativa do campus da USP de Ribeirão Preto.

Figura 2: Foto de *M. cordifolia* (LORENZI, 1982).

Reino: Plantae

Sub-reino: Tracheobionta

Superdivisão: Spermatophyta

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Asteridae

Ordem: Asterales

Família: Asteraceae

Subfamília: Asteroideae

Tribo: Eupatorieae

Subtribo: Mikaniinae

Gênero: *Mikania* Willd.

Espécie: *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd.

Figura 3: Classificação taxonômica da espécie *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd

Figura 4: Mapa de distribuição de *M. cordifolia* no Brasil (LORENZI, 1982).

Segundo KING & ROBINSON (1987), em sua revisão sobre a tribo Eupatorieae, 12 espécies de *Mikania* foram reduzidas para a espécie *Mikania cordifolia*, são elas: *M. amara*, *M. biformis*, *M. carnulosa*, *M. assampelina*, *M. cocalensis*, *M. convolvulacea*, *M. cordiformes*, *M. denticulata*, *M. fimbriata*, *M. hostmanii*, *M. huitzensis*, *M. loxensis*.

A *Mikania cordifolia* é vulgarmente conhecida como erva de cobra, cipó-catinga, cipó-sucuriçu, erva das serpentes, guaco, uaco, coração de Jesus, erva cobre, cacália, guaco-trepador, guaco-liso e erva de sapo e utilizada na medicina popular para diversos fins (Tabela 1), sendo o seu uso popular como antiofídico o de maior importância, apesar de ainda não existir estudo relacionando tal atividade com esta planta.

Poucos estudos foram realizados a respeito das propriedades farmacológicas desta espécie, como demonstrado na Tabela 2. Deve ser mencionado que os derivados do ácido caféico (estruturas 4a e 4b, Tabela 3), isolados de *M. cordifolia*, foram avaliados quanto às suas propriedades antiinflamatórias, mostrando-se ativos (PELLUZO *et al.*, 1995).

Estudos químicos com vegetais desta espécie revelam a presença de lactonas sesquiterpênicas com três tipos de esqueletos (melampolídeos, germacrolídeos e elemanolídeo). Tal fato pode ser visto na Tabela 3, podendo ser mencionado que não há descrição na literatura de estudos químicos envolvendo espécies coletadas no Brasil.

Tabela 1: Usos populares da espécie *Mikania cordifolia* (planta total)

Propriedades Terapêuticas	Forma de preparo	Uso	Referências
Antiofídica	Suco da planta fresca; chá por infusão ou decocção, aplicação da planta fresca no local da picada.	Interno Externo	CARIBE, 1991; FEIJÓ, 1803; ALZUGARAY & ALZUGARAY, 1973; BALBACH, 1968; LORENZI, 1982; KISSMANN <i>et al.</i> , 1992.
Antireumática, Antiinflamatório (gota)	Suco da planta fresca	Externo	CARIBE, 1991; LORENZI, 1982; KISSMANN <i>et al.</i> , 1992.
Expectorante	Xarope do suco fresco	Interno	CARIBE, 1991; ALZUGARAY & ALZUGARAY, 1973.
Antipiral	Chá	Interno	CARIBE, 1991; ALZUGARAY & ALZUGARAY, 1973.
Diurético	Chá	Interno	CARIBE, 1991.
Antibiótico (sífilis)	Chá	Interno	CARIBE, 1991; FEIJÓ, 1803; ALZUGARAY & ALZUGARAY, 1973.

Tabela 2: Estudos biológicos realizados sobre a espécie *Mikania cordifolia*.

Ensaio	Extrato ou Fração	Local de Coleta	Referência
Atividade tripanocida	Etanólico (estames)	Paraguai	ARIAS <i>et al.</i> , 1995.
Inseticida (<i>triatoma infestans</i>)	Etanólico (estames)	Paraguai	ARIAS <i>et al.</i> , 1995.
Atividade tripanocida	Aquoso Orgânica da parte solúvel em metanol	Guatemala, Panamá, Equador e Argentina	SERRANO <i>et al.</i> , 2000.
Atividade contra o <i>Tricomonas vaginalis</i>	Butanólica	Guatemala, Panamá, Equador e Argentina	SERRANO <i>et al.</i> , 2000.

Tabela 3: Estudos fitoquímicos realizados com *Mikania cordifolia*.

Estrutura	Parte da Planta	Tipo de Extrato	Local de Coleta	Referências
1a: R₁ = H, R₂ = H 1b: R₁ = H, R₂ = isobutirato 1c: R₁ = H, R₂ = metacrilato 1d: R₁ = H, R₂ = 3'-hidroxi-metacrilato 1e: R₁ = H, R₂ = 2', 3'-isobutirato 1f: R₁ = H, R₂ = 2'-hidroxi-isobutirato	Partes aéreas	Metanol/ éter etílico/ petróleo (1:1:1)	San Ramon (Costa Rica)	CASTRO <i>et al.</i> , 1989.
2a: R₁ = isobutirato 2b: R₁ = metacrilato 2c: R₁ = epoxi-metacrilato 2e: R₁ = 2'-hidroxi-isobutirato 2f: R₁ = 3'-hidroxi-metacrilato 2g: R₁ =	Partes aéreas	CHCl ₃	Salta e Catamarca (Argentina)	GUTIERREZ <i>et al.</i> , 1987; BOEKER <i>et al.</i> , 1986.

2',3'- diidrox-
isobutirato

2h: R₁ = H

2i: R₁ = 3'-hidroxi,
2'metil- isobutirato

2j: R₁ = 3' - hidroxi-
metacrilato;

Acetato no C-14.

3

Planta total

CHCl₃

Mayaguez
(Porto Rico)

HERZ *et al.*,
1977.

Partes aéreas

MeOH

Abayaca
(Peru)

PELLUZO *et al.*, 1995.

4a: R₁ = H; R₂ e R₃
= cafeoil

4b: R₁ = cafeoil; R₂
= H; R₃ = cafeoil

5

Partes aéreas

Não consta

Cuzco
(Peru)

D'AGOSTINO
et al., 1991.

6

Partes aéreas

Não consta

Cuzco
(Peru)

D'AGOSTINO
et al., 1991.

Partes aéreas

Éter etílico/
éter de
petróleo (1:1)

Equador

BOHLMANN
et al., 1978.

5a: R₁ = epoxi-
isobutirato

5b: R₁ = 3'-hidroxi-

---

metacrilato

5c: $R_1 = 3'$ -hidroxi-

isobutirato

5d: $R_1 = 2', 3'$ -

diidroxido-

isobutirato

Como já mencionado, até o momento, cerca de apenas 10% das espécies conhecidas do gênero *Mikania* foram estudadas quimicamente e a maioria destes estudos envolveram somente os extratos de baixa e média polaridade. Este número diminui quando se trata de estudos biológicos, pois existem poucos trabalhos científicos sobre as atividades biológicas de espécies do gênero publicados até o momento e não existe nenhum trabalho sobre a variação do perfil químico da mesma espécie coletada em diferentes locais (variação intra-espécie).

De acordo com o exposto na introdução, pode-se afirmar que a realização de estudo fitoquímico da espécie *Mikania cordifolia* desperta interesse devido aos aspectos taxonômicos, químicos e biológicos.

Especificamente, com relação à espécie *Mikania cordifolia*, é possível a existência de variação na constituição de metabólitos em espécies coletadas em diferentes locais. Porém, não foram realizados até o momento, estudos com materiais vegetais coletados no Brasil (Tabela 3), embora esta planta seja utilizada com inúmeros fins terapêuticos, inclusive como antiofídico.

2. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho são:

- Isolamento e purificação de substâncias presentes nos extratos brutos por métodos cromatográficos;
- Identificação estrutural das substâncias isoladas através de métodos espectroscópicos de análise orgânica;
- Comparação entre os perfis químicos de triterpenóides, lactonas sesquiterpênicas e flavonóides dos espécimes de *M. cordifolia* em estudo, utilizando-se processos cromatográficos para estabelecer a identidade entre as substâncias químicas (amostra e padrão);
- Avaliação preliminar da atividade antiofídica do extrato aquoso de *Mikania cordifolia*.

3. Material e Métodos

3.1. Especificações dos materiais e instrumentos utilizados

- Para as CCC foram utilizadas colunas de vidro de diferentes diâmetros e, como fase estacionária, sílica gel 60 (Merck – 0,063 a 0,200 mm – 70 a 230 mesh).
- As placas para CCDC foram preparadas com suspensão de sílica gel GF₃₆₆ (Merck) em água destilada, na proporção de 1:2 (p/ v), aplicada com um espalhador sobre placas de vidro de dimensões variadas de modo a se obter o adsorvente na espessura de 0,25mm. Posteriormente, as placas foram deixadas em repouso até completa secagem (6 a 8 horas) e depois ativadas em estufa a 120°C por cerca de trinta minutos.
- As placas para CCDP foram preparadas com suspensão de sílica gel PF₂₅₄ (Merck) em água destilada, na proporção de 1:3 (p/ v), aplicada com o auxílio de um espalhador sobre placas de vidro de 20 x 20 cm de modo a se obter o adsorvente na espessura de 1 mm. Posteriormente, as placas foram deixadas em repouso até completa secagem (6 a 8 horas) e depois ativadas em estufa a 120°C por cerca de trinta minutos.

- Como reveladores para as placas cromatográficas foram utilizados: radiação UV (λ = 254 e 366 nm, lâmpada Mineralight, modelo UVGL-25), nebulização com reagente de produto natural/ polietilenoglicol (NP/ PEG), nebulizações com sulfato cérico, com anisaldeído e com ácido sulfúrico concentrado, sendo todas estas seguidas de aquecimento a 100°C .
- Os solventes utilizados no trabalho são de grau PA ou de grau técnico purificados no próprio laboratório.
- Os solventes de frações e extratos foram evaporados sob pressão reduzida em evaporadores rotatórios Tecnal (TE-120) ou Büchi (R-124).
- Os resíduos de solventes produzidos nos experimentos foram encaminhados para tratamento adequado de acordo com as recomendações do Laboratório de Recuperações de Solventes do campus da USP de Ribeirão Preto.
- Os espectros de absorção de IV foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1420 ou no FT-IR Nicolet-Protégé 460 utilizando-se pastilha de KBr anidro para substâncias sólidas ou filme em clorofórmio depositado em cela de NaCl para extratos brutos e frações.
- Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos em espectrofotômetro U-3501 Hitachi com a mostras solubilizadas em metanol.

- Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em equipamento DRX-400 (Brucker) operando em 400 MHz para o ^1H e 100 MHz para o ^{13}C utilizando-se solventes deuterados (Cambridge Isotope Laboratory Inc.).
- As análises por CG foram realizadas em equipamento HP 5890 série II equipado com detector de ionização em chama.
- As análises por CLAE foram realizadas em equipamentos Shimadzu com detector UV-Visível SPD-6A, bombas LC-6AD, controlador SCL-6B e Software Class-VP e com detector com arranjo de diodos SPD-M10A, bombas LC-6AD, controlador SCL-10A e software Class-VP.

3.2. Coleta e identificação do material vegetal

Para a realização do presente trabalho, quatro espécimes de *M. cordifolia* foram coletados em seu habitat natural durante o período de floração pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes. Na Tabela 4 estão apresentados os locais e datas de coleta do material vegetal que foi identificado pelo Prof. Dr. Roberto Lourenço Esteves, do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual do Rio de Janeiro. As exsicatas foram depositadas no Herbarium Bradeanum da Universidade Estadual do Rio de Janeiro e no Herbário da FFCLRP-USP.

Tabela 4: Dados de coletas de *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd.

Local da Coleta	Altitude (m)	Localização	Nº do Coletor *	Número de depósito **	Data
Ribeirão Preto - SP	595	S 21° 10.163'/W 50° 835' Estrada São Carlos - Ribeirão Preto (sentido Rib. Preto, 5km do trevo de Araraquara)	NPL- 259	SPFR- 05313	27/05/200 0
São Carlos - SP	854		NPL- 261	SPFR- 05315	27/05/200 0
Campos do Jordão -SP	1030	S 22° 48907'/W 45° 43817'	NPL- 264	SPFR- 05314	29/05/200 0
Monte Verde - MG	947	S 22° 46 508'/W 46° 09598'	NPL- 266	SPFR- 05316	29/05/200 0

*Herbário FFCLRP; ** Herbarium Bradeanum

3.3. Obtenção dos extratos brutos

O material vegetal coletado, constituído de partes aéreas, foi seco em estufa de ar circulante à temperatura de 40°C e pulverizado em moinho de faca. O pó seco obtido de cada material coletado (600g) foram macerados, com a mesma relação massa/ volume, primeiramente com água, depois com metanol e, por último, com diclorometano. Os solventes metanol e diclorometano foram evaporados sob pressão reduzida, obtendo-se os extratos brutos (Tabela 5) que foram analisados por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho.

Tabela 5: Extratos brutos preparados com as partes aéreas de *M. cordifolia* coletadas em quatro locais diferentes.

Local de coleta	Solvente utilizado na extração	Identificação do extrato bruto	Massa (g)	Rendimento da extração (%)
Ribeirão Preto - SP	Metanol	259M	37,33	6,22
	Diclorometano	259D	11,86	1,98
São Carlos - SP	Metanol	261M	37,13	6,19
	Diclorometano	261D	12,51	2,09
Campos do Jordão - SP	Metanol	264M	36,54	6,09
	Diclorometano	264D	5,07	0,85
Monte Verde - MG	Metanol	266M	19,12	3,19
	Diclorometano	266D	2,63	0,44

3.4. Fracionamento dos extratos brutos

Os extratos brutos 259, 261, 264 e 266 diclorometânicos (D) e metanólicos (M) foram submetidos à extração líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades de acordo com o protocolo apresentado na Figura 5. As frações resultantes foram concentradas sob pressão reduzida e submetidas à análise espectrofotométrica na região do infravermelho.

Os extratos foram nomeados com o número do coletor (259, 261, 264 e 266) adicionados de uma letra referente ao solvente de extração (Aq para água, M para metanol e D para diclorometano) e uma letra referente ao solvente de extração líquido-líquido (H para hexano, D para diclorometano, Ac para acetato de etila e R de resíduo). Desta forma, o código 261Mac refere-se à fração acetato de etila do extrato metanólico de *M. cordifolia* coletada em São Carlos. Na Tabela 6, estão apresentadas as frações devidamente identificadas de acordo com o solvente de origem e as respectivas massas obtidas.

Tabela 6: Frações obtidas a partir das extrações líquido-líquido dos extratos brutos de espécimes de *M. cordifolia*.

Extrato bruto	Resíduo	Fração hexânica	Fração diclorometânica	Fração em acetato de etila
259M	259MR	259MH	259MD	259MAc
	m= 10,07 g	m= 4,34 g	m= 5,53	m= 0,68 g
259D	259DR	259DH	259DD	259Dac
	m= 11,28 g	m= 1,42 g	m= 1,69	m= 0,20
261M	261MR	261MH	261MD	261MAc
	m= 15,31 g	m= 2,52 g	m= 5,28 g	m= 2,65 g
261D	261DR	261DH	261DD	261MAc
	m= 10,72 g	m= 0,75 g	m= 1,64 g	m= 0,13 g
264M	264MR	264MH	264MD	264MAc
	m= 12,88 g	m= 3,03 g	m= 4,81 g	m= 0,38 g
264D	264DR	264DH	264DD	264Dac
	m= 3,48 g	m= 0,42 g	m= 1,09 g	m= 0,08 g
266M	266MR	266MH	266MD	266MAc
	m= 9,55 g	m= 2,26 g	m= 3,76 g	m= 0,58 g
266D	266DR	266DH	266DD	266Dac
	m= 1,82 g	m= 0,23 g	m= 0,48 g	m= 0,03 g

Figura 5: Protocolo de extração líquido-líquido dos extratos brutos com diferentes solventes.

3.5. Análise comparativa de triterpenóides por cromatografia em fase gasosa

Os resíduos e as frações hexânicas dos extratos brutos 259, 261, 264 e 266 diclorometânicos e metanólicos obtidos conforme o protocolo apresentado na Figura 5 foram submetidos à análise por CG com coluna capilar para pesquisa de triterpenos e esteróides.

Os resíduos obtidos após a filtração de todos os extratos brutos diclorometânicos e metanólicos (259, 261, 264 e 266) foram macerados com metanol sob aquecimento. A porção solúvel em metanol sob aquecimento foi submetida ao procedimento de limpeza para análise em CG.

As frações hexânicas e os resíduos extraídos com metanol foram separados em frações com solventes de diferentes polaridades. Para tal finalidade, foi preparada uma pastilha com 10 mg da amostra e sílica gel 60 que foi aplicada em mini-coluna de sílica gel Bakerbond spe 7086-03. Para a eluição, utilizou-se 10 mL de hexano, 10 mL de clorofórmio e 10 mL de clorofórmio/ metanol 1:1. A fração de média polaridade foi ressuspensa em 0,5 mL de hexano/ acetato de etila 8:2 e injetada no cromatógrafo sob as condições descritas na Tabela 7 (SCHINOR *et al.*, 2004)

Tabela 7: Condições utilizadas para a análise de triterpenos em CG.

	<i>Coluna HP-1</i>	<i>Coluna HP-50</i>
Características da coluna		
(comprimento x diâmetro interno x espessura do filme)	30 m x 0,25 mm x 0,25 μm	30 m x 0,25 mm x 0,25 μm
Programação da temperatura	Início em 250 °C 250°C – 12 min Aumento de 6°C/min até 280°C 280°C – 30 min	Início – 50°C Aumento de 20°C/min até 250° 250° – 4 min Aumento de 15°C/min até 280°C 280°C – 18 min Aumento de 10°C/min até 290°C 290°C – 30 min
Temperatura do FID	330° C	330° C
Temperatura do injetor	260° C	260° C
Modo de injeção	Split, razão 1:50	Split, razão 1:50

3.6. Análise comparativa de lactonas sesquiterpênicas

Os extratos diclorometânicos e metanólicos são objetos de estudo no presente trabalho, mas, para a pesquisa de lactonas sesquiterpênicas, foram preparados novos extratos com o material seco e moído dos espécimes de Ribeirão Preto, São Carlos e Campos do Jordão por maceração a frio com água utilizando-se uma relação massa/volume de 1:10 (Tabela 8, Figura 6). A presença de fungos no material vegetal

restante proveniente de Monte Verde inviabilizou o uso deste espécime para a comparação do seu perfil de químico com os outros.

Estes extratos foram submetidos à extração líquido-líquido com diclorometano, concentrados sob pressão reduzida e encaminhados para análise por espectroscopia na região do infravermelho e análise dos constituintes por CCDC e CLAE.

Tabela 8. Extratos aquosos preparados com partes aéreas de *Mikania cordifolia*.

Local de coleta	Identificação do extrato	Massa utilizada para preparação do extrato aquoso (g)
Ribeirão Preto	259Aq	35,9
São Carlos	261Aq	111,9
Campos do Jordão	264Aq	122,5

Figura 6: Protocolo de extração líquido-líquido dos extratos aquosos de *M. cordifolia*.

3.6.1. Obtenção de padrões de lactonas sesquiterpênicas

Para a obtenção de padrões de lactonas sesquiterpênicas, foi realizada uma nova coleta de *M. cordifolia* no campus da USP em Ribeirão Preto, no dia 22 de maio de 2005, no mesmo local em que o espécime 259 (Ribeirão Preto) foi coletado. Com esse material coletado fresco, foi preparado um extrato diclorometânico através da lavagem de 353,6g de folhas em 1,3L de diclorometano por 15 segundos.

O extrato resultante foi concentrado sob pressão reduzida e, após secagem, foi encaminhado para obtenção do espectro na região de infravermelho e analisado por CCDC com a fase móvel diclorometano/metanol 95:5. Após confirmação da presença de lactonas sesquiterpênicas, este extrato diclorometânico teve seus compostos em mistura separados por CCDC utilizando-se a mesma fase móvel. Após este procedimento, as faixas obtidas foram submetidas à limpeza em coluna Sepack C-18 com metanol, acetato de etila e hexano.

3.6.2. Análise qualitativa das frações diclorometânicas por cromatografia líquida de alta eficiência

Com o objetivo de se traçar o perfil químico das frações diclorometânicas obtidas dos extratos aquosos de *M. cordifolia*, 1 mg de cada fração foi ressuspenso em 1mL de metanol e, após a filtragem desta solução, 20 µL de cada amostra foram injetados em cromatógrafo sob as seguintes condições:

- Coluna Spherisorb ODS-2, 5µm, 4,6 mm x 250 mm

- Pré-coluna Pelliguard LC-18
- Fase móvel composta de água (A) e acetonitrila (B) em gradiente de 15-40% de B em 20 min, 40% de B durante 5 min, 40-15% de B de 25 a 30 min e 5 minutos de B a 15%
- Fluxo de 1,0 mL/min.
- Padrões L1, L2 e L3.

3.7. Análise comparativa de flavonóides

Para a comparação entre os perfis de flavonóides das frações em acetato de etila dos extratos metanólicos e diclorometânicos dos espécimes de *M. cordifolia* 259, 261, 264 e 266, foi necessária a obtenção de substâncias puras para serem utilizadas como padrões nas análises por CLAE. Desta forma, foram obtidos dois flavonóides em quantidade suficiente para as análises através do fracionamento do extrato 261Mac por CCC e do extrato 259Mac por CLAE em escala preparativa.

As frações em acetato de etila dos extratos metanólicos e diclorometânicos de *M. cordifolia* foram analisadas por CLAE para a pesquisa de flavonóides sob as seguintes condições:

- Coluna PREP-ODS (H) .Kit Shimadzu, 5 μ m, 4,6 mm x 250 mm
- Pré-coluna Pelliguard LC-18
- Fase móvel composta de água (A) e acetonitrila (B) em gradiente de 10-100% de B em 30 min, 100% de B durante 5 min, 100-50% de B de 35 a 40 min e 5 minutos de B a 50%

- Fluxo de 0,8 mL/min.
- Padrões F1, F2 e A1.

3.7.1. Fracionamento do extrato 259

A fração 259 MAc foi submetida á análise por CLAE em escala preparativa para o isolamento de substâncias puras sob as seguintes condições:

- Coluna PREP-ODS (H).Kit Shimadzu, 5µm, 20mm x 250 mm
- Fase móvel composta de água (A) e metanol (B) em gradiente de 10-100% de B em 60 min, 100% de B durante 5 min, 100-10% de B de 65 a 70 min e 5 minutos de B a 10%
- Fluxo de 9,5 mL/min.

3.7.2. Fracionamento do extrato 261

Os extratos de *M. cordifolia* coletada em São Carlos foram fracionados a fim de se obter padrões para posteriores análises comparativas entre os extratos polares dos outros espécimes conforme protocolo da Figura 7.

Figura 7: Protocolo do fracionamento de 261M e D para obtenção de padrões.

3.8. Ensaio de atividade antiofídica

Para a realização de um estudo preliminar do efeito do extrato de *Mikania cordifolia* no desenvolvimento de edema de pata e de hemorragia induzidos pelo veneno de serpente *Bothrops moojeni*, foi preparado um extrato aquoso a partir de 80 g de planta fresca macerada com 400 mL de água destilada. O extrato resultante foi liofilizado e encaminhado para o Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan.

Para o estudo da atividade antiinflamatória *in vivo* do extrato aquoso de *Mikania cordifolia*, foram utilizados camundongos Swiss machos, com peso entre 18 à 20g

provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan. Os camundongos foram mantidos sob condições padronizadas em sala com temperatura entre 23 a 25°C, ciclo de luz claro/ escuro de 12h e alimentação e água *ad libitum*. Cada animal foi utilizado apenas uma vez. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan.

Para o experimento, os animais foram previamente tratados (30 minutos) com 1mL, 100µL e 50µL via intra-peritonial de extrato de *Mikania cordifolia* liofilizado ressuspendido em solução salina (NaCl 0.9%) na concentração de 20%.

Como agente inflamatório, foi utilizado veneno de *B. moojeni* diluído em solução salina apirogênica nas concentração de 1 µg/pata em volume constante de 50µL/pata que foram injetadas no coxim plantar (injeção intraplantar) da pata posterior direita de cada camundongo. Na pata posterior esquerda, foi injetado o mesmo volume de solução salina apirogênica como controle.

O aumento do volume podal foi determinado em pletismômetro conectado a um transdutor de pressão, acoplado a um registrador digital (Ugo Basile). Portanto, cada pata foi imersa até a articulação tíbio-társica, em uma solução eletrolítica de lauril sulfato de sódio e cloreto de sódio, para maximizar a adsorção do líquido à pata.

As medidas dos volumes das patas posteriores foram realizadas no tempo zero, aos 15, 30, 60 e 180 minutos após a injeção do veneno de *Bothrops moojeni* (VBm) nos camundongos pré-tratados com extrato de *M. cordifolia*.

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise dos extratos brutos

Os extratos brutos 259, 261, 264 e 266 diclorometânicos e metanólicos foram submetidos à análise espectroscópica na região do IV para detecção preliminar de algumas funções orgânicas. No Anexo 1, estão apresentadas as Figuras 31, 32, 33 e 34, contendo os espectros no IV dos extratos de São Carlos, para exemplificar.

Foi encontrado um ombro em 1750 cm^{-1} para alguns extratos (259D, 261D e M, 264 D e M), podendo desta forma, inferir na presença de lactonas sesquiterpênicas, mas, em pequena quantidade.

Através da análise dos espectros, foram observadas bandas que inferem na presença de hidroxilas, CH_2 e CH_3 , $=\text{CH}$, outras carbonilas (ésteres de cadeia aberta, ácidos carboxílicos), possíveis substâncias aromáticas e estiramento C-O.

4.2 Análise das frações obtidas a partir dos extratos brutos

Os extratos brutos 259, 261, 264 e 266 (metanólicos e diclorometânicos) foram submetidos à extração líquido-líquido com hexano, diclorometano e acetato de etila, com o objetivo de se separar os compostos das *M. cordifolia* quanto à solubilidade em solventes de diferentes polaridades.

Os espectros no IV dos extratos obtidos após a extração líquido-líquido apresentaram bandas características de funções ésteres e ácidos carboxílicos, porém

não foram observadas bandas em/ ou acima de 1750 cm^{-1} características de lactonas sesquiterpênicas. No Anexo 2 (Figuras 35 a 38), estão apresentados os espectros dos extratos do espécime 261 para exemplificar.

Ao se comparar os espectros das frações obtidas com os diferentes solventes (hexano, diclorometano e acetato de etila), pode-se afirmar que através do processo de extração líquido-líquido foi possível separar a maior parte das substâncias de natureza graxa e os triterpenos e esteróides para os resíduos e fases hexânicas, respectivamente, embora tenha sido observada a presença de pequena quantidade de triterpenos em frações diclorometânicas através da análise dos espectros de RMN de ^1H . É importante ressaltar que nas frações diclorometânicas e metanólicas, estão concentradas as substâncias de média e alta polaridade.

4.3. Análise comparativa de triterpenóides por cromatografia em fase gasosa

As frações hexânicas e os resíduos dos extratos 259, 261, 264 e 266 (diclorometânicos e metanólicos) foram analisados por CG para a pesquisa de triterpenos. A análise de triterpenos é de grande importância na espécie *Mikania cordifolia* em especial, pois esta planta possui uso popular para o tratamento de picada de serpente e este grupo de substâncias pode apresentar atividade antiinflamatória e ser efetivo na neutralização de venenos ofídicos (MORS *et al.*, 1998; MORS *et al.*, 2000).

De um modo geral, os extratos analisados apresentaram o mesmo perfil triterpênico, considerando-se apenas os picos cromatográficos que puderam ser identificados com a ajuda dos padrões disponíveis no laboratório. Os triterpenos identificados e confirmados através do enriquecimento da amostra com padrões estão apresentados na Figura 8.

As diferenças entre o perfil triterpênico dos extratos hexânicos e resíduos das amostras 259, 261, 264 e 266 podem ser visualizadas nos gráficos apresentados nas Figuras 9, 10, 11 e 12. Através da comparação entre estes gráficos elaborados a partir da porcentagem de área de cada pico cromatográfico separado na coluna HP-50 (Anexo 3, Tabelas 20, 21, 22 e 23), pode-se perceber variações quantitativas na composição de triterpenos destes espécimes de *M. cordifolia*. Apesar deste estudo não ter caráter quantitativo, foi mantida a proporcionalidade na preparação de extratos,

tomando-se o mesmo cuidado nas etapas de pesagem, procedimentos de limpeza e solubilização de amostra para injeção.

Na planta 259, coletada em Ribeirão Preto, foram encontrados α -Amirina, β -Amirina, Lupeol, Lupenona, Taraxasterol, Pseudotaraxasterol, Acetato de α -Amirina, Acetato de β -Amirina, Acetato de Lupeol, Acetato de Taraxasterol, Campesterol, Estigmasterol e β -Sitosterol; já na planta 261, coletada em São Carlos, foram encontradas as mesmas substâncias e o triterpeno 11-oxours-12-eno. O triterpeno Friedelina foi encontrado apenas nestes dois espécimes, ambos originárias do cerrado.

Os espécimes coletados em Campos do Jordão (264) e Monte Verde (266) apresentaram o mesmo perfil triterpênico: α -Amirina, β -Amirina, Lupeol, Lupenona, Taraxasterol, Pseudotaraxasterol, Acetato de α -Amirina, Acetato de β -Amirina, Acetato de Lupeol, Acetato de Taraxasterol, Campesterol, Estigmasterol e β -Sitosterol, além destes, apresentaram Acetato de Taraxerol. Os extratos obtidos do espécime de Monte Verde apresentaram maiores quantidades de triterpenos que as outras populações.

Através da comparação dos perfis de triterpenóides dos extratos de *M. cordifolia*, pode-se afirmar que, qualitativamente, não há diferenças significativas entre os espécimes em estudo, embora apenas os espécimes de São Carlos e Ribeirão Preto tenham apresentado o triterpeno friedelina.

Em relação aos teores destas substâncias, foram observadas maiores quantidades dos triterpenóides identificados no espécime coletado em Monte Verde, mas não há uma variação em relação ao número de triterpenóides neste espécime. De acordo

com KAPLAN (1994), plantas de florestas tropicais tendem a ser mais homogêneas quando comparadas a plantas de terras secas (cerrado), isto é, apresentam menor número e maiores quantidades de substâncias do que as plantas do cerrado. No caso do espécime de Monte Verde (266), foi notada esta tendência, mas o espécime de Campos do Jordão (264) apresentou quantidades comparáveis aos espécimes do cerrado.

Desta forma, em relação ao perfil de triterpenóides, pode-se afirmar que o metabolismo destas substâncias expressa-se da mesma forma, uma vez que não há diferenças significativas em relação aos tipos de triterpenos encontrados. Portanto, comparando-se apenas esta classe de substâncias, pode-se afirmar que os espécimes de *M. cordifolia* estudados não se tratam de quimiotipos diferentes.

Figura 8: Triterpenóides identificados nos resíduos e nas frações hexânicas dos extratos 259M, 259D, 261M e 261D com padrões para enriquecimento da amostra.

Figura 9: Composição de triterpenóides de extratos obtidos a partir de *Mikania cordifolia* coletada em Ribeirão Preto. Legenda: Cp, Campesterol; Et, Estigmasterol; Bs, β -Sitosterol; Ep, Epitaraxerol; Ba, β -Amirina; Aa/Lo, α -Amirina/Lupenona; Lu, Lupeol; At, Acetato de taraxerol; Fr, Friedelina; Pt, Pseudotaraxerol; Ta, Taraxasterol; Ou, 11-oxours-12-eno; On, 11-oxolean-12-eno; Aba, Acetato de β -amirina; Aaa, Acetato de α -amirina; Alu, Acetato de lupeol; Ax, Acetato de taraxasterol.

Figura 10: Composição de triterpenóides de extratos obtidos a partir de *Mikania cordifolia* coletada em São Carlos. Legenda: idem a Figura 8.

Figura 11: Composição de triterpenóides de extratos obtidos a partir de *Mikania cordifolia* coletada em Campos do Jordão. Legenda: idem a Figura 8.

Figura 12: Composição de triterpenóides de extratos obtidos a partir de *Mikania cordifolia* coletada em Monte Verde. Legenda: idem a Figura 8.

4.4. Análise comparativa de lactonas sesquiterpênicas

A partir dos extratos aquosos de *M. cordifolia* coletada em Ribeirão Preto, São Carlos e Campos do Jordão, foram preparados extratos aquosos que foram submetidos à extração líquido-líquido com diclorometano e acetato de etila para melhor separação das classes de substâncias. Após a evaporação dos solventes, as massas de cada um dos extratos foram pesadas e o rendimento de cada extração foi calculado a partir das massas iniciais do material seco (Tabela 9).

Tabela 9: Extratos obtidos após maceração do material vegetal com água e extração líquido-líquido com diclorometano e acetato de etila.

Espécime	Extrato aquoso Volume Final (L)	Fração	Fração Acetato de
		Diclorometânica	Etila
		Massa (mg)/ Rendimento (%)	Massa (mg)/ Rendimento (%)
259	0,6	48,8/ 0,14	123,3/ 0,34
261	1,8	468,7/ 0,42	364,3/ 0,33
264	2,0	186,9 / 0,15	248,6/ 0,20

As análises das frações diclorometânicas dos extratos aquosos de *M. cordifolia* de Ribeirão Preto (259), São Carlos (261) e Campos do Jordão (264) por CCDC mostraram que estas possuem misturas complexas de lactonas sesquiterpênicas que se apresentam com coloração rosa após revelação com sulfato cérico seguida de aquecimento. Porém, devido a obtenção de pouca massa e à complexidade destas frações, não foi possível o isolamento de padrões a partir deste material.

A presença de lactonas sesquiterpênicas em extratos aquosos deve-se ao fato de, em Asteraceae, ocorrer a compartimentalização destas substâncias, ou seja, estas podem se encontrar armazenadas nos tricomas glandulares. Portanto, a extração com água não deve ter ocorrido através de solubilização destas substâncias em solvente polar, mas por um fenômeno mecânico (SPRING, 1989, 1991).

A análise dos espectros de absorção na região do infravermelho das frações diclorometânicas (Anexo 4, Figuras 39 e 40) mostrou que todas apresentaram bandas intensas em 1760 cm^{-1} que são características de lactonas sesquiterpênicas (SILVERSTEIN *et al.*, 1994).

4.4.1. Obtenção de padrões de lactonas sesquiterpênicas

Para a obtenção de padrões de lactonas sesquiterpênicas necessários para a análise comparativa dos extratos 259AqD, 261AqD e 264AqD, foi realizada uma nova coleta de *M. cordifolia* no campus da USP em Ribeirão Preto, mesmo local do material 259. Essa coleta foi feita no dia 22 de maio de 2005, ou seja, na mesma época em que os espécimes analisados foram coletados.

As folhas frescas (353,6g) do material coletado foram lavadas com diclorometano por 15 segundos e obteve-se 3,8 g de extrato contendo material graxo e lactonas sesquiterpênicas que ficam armazenadas nos tricomas glandulares.

A partir de 300 mg deste extrato fracionados por CCDP (10 placas de 30 mg de amostra cada), foram obtidas quatro faixas principais que foram denominadas de **L1** (16,2 mg), **L2** (15,1 mg), **L3** (14,5 mg) e **L4** (14,4 mg), partindo-se da linha de aplicação. Estas substâncias foram analisadas por CLAE utilizando-se metodologia já descrita e foi possível a confirmação de que as substâncias **L1**, **L2** e **L3** se encontravam puras e que a amostra L4 se tratava de uma mistura complexa de lactonas sesquiterpênicas. As três substâncias isoladas foram identificadas através das análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

4.4.2. Identificação estrutural da substância L1

L1: 14-hidroxi-15[2'-hidroximetilacrililoiloxy]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo

RMN de ^1H : Tabela 10; Figura 41 (Anexo 5)

RMN de ^{13}C : Tabela 11; Figuras 42 e 43 (Anexo 5)

HMQC: Figura 44 (Anexo5)

No espectro de RMN de ^1H da substância **L1**, são observados sinais típicos de esqueletos do tipo melampolídeo que são os dubletos dos H-13 em δ 6,26 e δ 5,58 ($J=3,3$ Hz) ou em valores próximos a estes para as outras lactonas. Também foi observada a presença dos sinais dos hidrogênios vinílicos H-1 e H-5 sobrepostos ao sinal do H-13b que são típicos deste grupo de lactonas sesquiterpênicas.

Os sinais referentes ao sistema AB dos dois hidrogênios H-15 podem ser observados em δ 4,67 e δ 4,57 ($J=12$ Hz). Para os hidrogênios H-14, observa-se um singlete com intensidade de dois hidrogênios em δ 4,32. O hidrogênio oximetínico H-8 foi observado em δ 3,81 como um singlete largo, mas, de acordo com GUTIERREZ

et al. (1987), ele pode se apresentar como um multipeto largo ou duplo tripeto, de acordo com as condições de aquisição do espectro.

A presença de um singeto em δ 4,10 com a intensidade de 2 hidrogênios sugere a presença do grupo hidroxila desblindando estes hidrogênios. Os sinais δ 6,24 e δ 5,88 inferem na presença de hidrogênios olefínicos sendo atribuídos aos hidrogênios H-3'a e H-3'b, em posição β ao sistema carbonílico α,β -insaturado.

A substância **L1** apresenta 19 átomos de carbono, 9 CH₂, 4 CH e 6 C, e nos seus espectros de RMN de ¹³C, há a presença de deslocamentos e multiplicidades (DEPT 135°) que confirmam a estrutura deduzida pelo espectro de RMN de ¹H.

Para completar a atribuição dos sinais dos átomos de carbono da substância **L1**, visto que alguns sinais se apresentam com pouca intensidade, foram utilizadas as correlações ¹H-¹³C presentes nos mapas de contorno do HMQC.

Esta substância já foi isolada anteriormente de *M. cordifolia* por GUTIERREZ *et al.* (1987) e, devido a este fato, propusemos o éster no C-15 e não no C-14 da mesma forma que as estruturas de lactonas sesquiterpênicas elucidadas neste artigo. Tal afirmação feita pelos autores vem de observações provenientes das análises dos espectros de RMN de ¹H das lactonas sesquiterpênicas oxidadas a aldeídos por dióxido de manganês.

A análise em conjunto dos dados espectrais de ¹H e ¹³C bem como as correlações presentes nos mapas de contorno do HMQC confirmam que a substância **L1** se trata da lactona 14-hidroxi-15[2'-hidroximetilacrilóiloxi]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo, substância isolada anteriormente de *M. cordifolia* por GUTIERREZ *et al.* (1987).

Tabela 10: Dados de RMN de ^1H da substância **L1** (400 MHz, CDCl_3 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).

(GUTIERREZ <i>et al.</i> , 1987)		
H	δ_{H}	δ_{H} 270 MHz, CDCl_3
1	5,56 <i>s l</i>	5,55
5	5,59 <i>m</i>	5,59 <i>dd l</i> (11, 5,5)
6a	2,79 <i>m</i>	
7	2,86 <i>m</i>	2,82 <i>m</i>
8	3,81 <i>s l</i>	3,87 <i>dt</i>
9a	2,77 <i>m</i>	2,72 <i>dd</i>
9b	2,40 <i>m</i>	2,46 <i>dd l</i>
13a	6,26 <i>d</i> (3,3)	6,22 <i>d</i> (3)
13b	5,58 <i>d</i> (3,3)	5,50 <i>d</i>
14a, b	4,32 <i>s</i>	4,12 <i>l</i>
15a	4,67 <i>d</i> (12,0)	4,69 <i>d l</i>
15b	4,57 <i>d</i> (12,0)	4,58 <i>d</i>
3'a	6,24 <i>s l</i>	6,32 <i>l</i>
3'b	5,88 <i>d l</i>	5,86 <i>q l</i>
4'	4,10 <i>s</i>	4,13 <i>l</i>

Legenda: *, intensidade de três hidrogênios.

Tabela 11: Dados de RMN ^{13}C da substância **L1** (100 MHz; CDCl_3 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).

C	δ_{c}	(GUTIERREZ et al., 1987)
	(PND, DEPT 135°, HMQC)	δ_{c} 67,89 MHz, CDCl_3
1	125,0 CH	125,03 <i>d</i>
2	28,43 CH_2	29,20 <i>t</i> *
3	29,99 CH_2	29,86 <i>t</i> *
4	139,43 C	139,43 <i>s</i>
5	127,95 CH	127,95 <i>d</i>
6	30,92 CH_2	30,91 <i>t</i> *
7	46,63CH	46,63 <i>d</i>
8	84,36 CH	84,28 <i>d</i>
9	35,0 CH_2	35,09 <i>t</i>
10	139,16 C	138,44 <i>s</i>
11	-	135,54 <i>s</i>
12	169,84 C	169,80 <i>s</i>
13	121,11 CH_2	120,91 <i>t</i>
14	66,25 CH_2	66,11 <i>t</i>
15	63,42 CH_2	63,37 <i>t</i>
1'	166,10 C	166,10 <i>s</i>
2'	139,34 C	139,19 <i>s</i>
3'	126,52 CH_2	126,22 <i>t</i>
4'	62,24 CH_2	61,99 <i>t</i>

Legenda: *, podem estar trocados

4.4.3. Identificação estrutural da substância L2

**L2: 14-hidroxi-15[2'-hidroxi,2'-metilpropanoiloxy]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-
11(13)-trien-12,8 α -olídeo**

RMN de ^1H : Tabela 12; Figura 45 (Anexo 6)

RMN de ^{13}C : Tabela 13; Figuras 46 e 47 (Anexo 6)

HMQC: Figura 48 (Anexo 6)

O espectro de RMN de ^1H da substância **L2** apresenta sinais muito semelhantes aos apresentados pela substância **L1**, sugerindo o mesmo esqueleto melampolídeo. A presença de singletos em δ 1,41 e δ 1,45 com intensidade de 3 hidrogênios cada indica que o grupo acil ligado ao C-15 possui a estrutura apresentada acima. Os espectros de RMN de ^{13}C mostram a presença de 19 átomos de carbono, sendo que dois destes são metilênicos, o que confirma a estrutura proposta. A análise em conjunto dos dados espectrais de ^1H e ^{13}C juntamente com a análise das correlações presentes nos mapas de contorno do HMQC sugerem que a substância **L2** trata-se da

lactona sesquiterpênica 14-hidroxi-15[2'-hidroxi, 2'-metilpropanoiloxi]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo. Estes dados estão de acordo com os obtidos por GUTIERREZ *et al.* (1987).

Tabela 12: Dados de RMN de ^1H da substância **L2** (400 MHz, CDCl_3 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).

(GUTIERREZ <i>et al.</i> , 1987)		
H	δ_{H}	δ_{H} 270 MHz, CDCl_3
1	5,61 <i>m l</i>	5,60 <i>t l</i>
5	5,61 <i>m l</i>	5,55
6a	2,80 <i>m</i>	2,80 <i>m</i>
7	2,82 <i>m</i>	2,82 <i>m</i>
8	3,82 <i>s l</i>	3,87 <i>dt</i> (9, 3,5)
9a	2,88 <i>m</i>	2,72 <i>dd</i> (15, 3,5)
9b	2,40 <i>m</i>	2,44 <i>dd</i> (15, 3,5)
13a	6,26 <i>d</i> (3,3)	6,22 <i>d</i> (3,5)
13b	5,59 <i>d</i> (3,3)	5,55 <i>d</i>
14a, b	4,13 <i>s l</i>	4,12 <i>l</i>
15a	4,63 <i>d</i> (11,5)	4,66 <i>d</i> (12,5)
15b	4,51 <i>d</i> (11,5)	4,50 <i>d</i> (12,5)
3'	1,41 <i>s</i> *	1,41 <i>s</i> *
4'	1,45 <i>s</i> *	1,43 <i>s</i> *

Legenda: *, intensidade de três hidrogênios.

Tabela 13: Dados de RMN ^{13}C da substância **L2** (100 MHz; CDCl_3 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).

C	δ_{C}	(GUTIERREZ <i>et al.</i> , 1987)
	(PND, DEPT 135°, HMQC)	δ_{C} 67,89 MHz, CDCl_3
1	124,97 CH	125,0 <i>d</i>
2	28,37 CH_2	28,3 <i>t</i> *
3	29,71 CH_2	29,6 <i>t</i> *
4	139,16 C	139,1 <i>s</i>
5	128,21 CH	128,1 <i>d</i>
6	30,67 CH_2	30,6 <i>t</i> *
7	46,66 CH	46,5 <i>d</i>
8	84,30 CH	84,1 <i>d</i>
9	35,10 CH_2	35,2 <i>t</i>
10	138,25 C	138,1 <i>s</i>
11	135,44 C	135,5 <i>s</i>
12	169,75 C	169,6 <i>s</i>
13	121,09 CH_2	120,8 <i>t</i>
14	66,26 CH_2	66,0 <i>t</i>
15	64,18 CH_2	64,0 <i>t</i>
1'	177,09 C	179,6 <i>s</i>
2'	72,30 C	72,1 <i>s</i>
3'	27,36 CH_3	27,1 <i>q</i>
4'	27,04 CH_3	26,9 <i>q</i>

Legenda: *, podem estar trocados

4.4.4. Identificação estrutural da substância L3

L3: 14-hidroxi-15[2',3'-epoxi, 2'-metilpropanoiloxy]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo

RMN de ^1H : Tabela 14; Figura 49 (Anexo 7)

RMN de ^{13}C : Tabela 15; Figuras 50 e 51 (Anexo 7)

HMQC: Figura 52 (Anexo7)

A substância **L3** apresentou um espectro de RMN de ^1H muito semelhante ao da substância **L1**, sugerindo o mesmo esqueleto do tipo melampolídeo já discutido. A presença dos dubletos em δ 3,09 ($J = 6$ Hz) e δ 2,78 ($J = 6$ Hz) e do singlete em δ 1,57 com intensidade de 3 hidrogênios são compatíveis com o esqueleto do éster ligado ao C-15. As análises dos espectros de RMN de ^{13}C e do mapa de contorno do HMQC confirmam a estrutura do éster com os hidrogênios H-3' ligados ao carbono C-3' δ 53,15, com os hidrogênios H-4' ligado ao C-4' em δ 17,45. O carbono C-2' aparece em δ 53,85. A análise em conjunto dos dados espectrais de ^1H e ^{13}C juntamente com a

análise das correlações presentes nos mapas de contorno de HMQC indicam que a substância L3 é 14-hidroxi-15[2',3'-epoxi, 2'-metilpropanoiloxi]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo. Estes dados estão de acordo com os obtidos por GUTIERREZ *et al.* (1987).

Tabela 14: Dados de RMN de ^1H da substância **L3** (400 MHz, CDCl_3 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).

(GUTIERREZ <i>et al.</i> , 1987)		
H	δ_{H}	δ_{H} 270 MHz, CDCl_3
1	5,59 <i>d l</i>	5,62 <i>tl</i>
5	5,57 <i>d l</i>	5,50 <i>dd l</i>
6a	2,81 <i>m</i>	2,80 <i>m</i>
7	2,81 <i>m</i>	2,82 <i>m</i>
8	3,78 <i>m</i>	3,80 <i>dt</i> (8, 3)
9a	2,84 <i>m</i>	2,89 <i>dd</i> (14, 3)
9b	2,33 <i>m</i>	2,47 <i>dd</i> (14, 3)
13a	6,25 <i>d</i> (3)	6,25 <i>d</i>
13b	5,58 <i>d</i> (3)	5,55 <i>d</i>
14a, b	4,13 <i>s l</i>	4,12 <i>l</i>
15a	4,67 <i>d</i>	4,64 <i>d</i>
15b	4,48 <i>d</i>	4,48 <i>d</i>
3'a	3,09 <i>d</i> (6)	3,08 <i>d</i> (6)
3'b	2,78 <i>d</i> (6)	2,86 <i>d</i> (6)
4'	1,57 <i>s</i> *	1,58 <i>s</i> *

Legenda: *, intensidade de três hidrogênios.

Tabela 15: Dados de RMN ^{13}C da substância **L3** (100 MHz; CDCl_3 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$).

C	δ_{C}	(GUTIERREZ <i>et al.</i> , 1987)
	(PND, DEPT 135°, HMQC)	δ_{C} 67,89 MHz, CDCl_3
1	125,17 CH	121,1 <i>d</i>
2	28,40 CH_2	28,4 <i>t</i> *
3	29,91 CH_2	29,7 <i>t</i> *
4	139,18 C	139,0 <i>s</i>
5	128,26 CH	128,1 <i>d</i>
6	31,27 CH_2	30,9 <i>t</i> *
7	46,70 CH	46,5 <i>d</i>
8	84,18 CH	84,1 <i>d</i>
9	35,27 CH_2	34,8 <i>t</i>
10	138,60 C	138,1 <i>s</i>
11	135,23 C	134,9 <i>s</i>
12	169,73 C	169,6 <i>s</i>
13	121,03 CH_2	120,8 <i>t</i>
14	66,34 CH_2	66,1 <i>t</i>
15	64,28 CH_2	64,2 <i>t</i>
1'	170,73 C	
2'	53,85 C	61,9 <i>s</i>
3'	53,15 CH_2	63,2 <i>t</i>
4'	17,45 CH_3	17,3 <i>q</i>

Legenda: *,podem estar trocados

4.4.5. Análise qualitativa das frações diclorometânicas por CLAE

As análises por CLAE dos extratos 259AqD, 261AqD e 264AqD foram realizadas em cromatógrafo com detector UV-Vis, utilizando-se os padrões **L1**, **L2** e **L3** isolados de *M. cordifolia* coletada em Ribeirão Preto. Através da análise dos cromatogramas (Figuras 13, 14 e 15), conclui-se que a lactona padrão **L1** com tempo de retenção 18,9 min está presente em todos os espécimes, sendo esta majoritária no cromatograma de São Carlos. Nos espécimes de Ribeirão Preto (259) e Campos do Jordão (261), esta lactona está presente em menores proporções. Convém destacar que os espécimes de Ribeirão Preto e Campos do Jordão, embora não tenham apresentado a substância **L1** como majoritária, elas apresentaram perfis mais complexos em relação à mistura de lactonas sesquiterpênicas. As substâncias **L2** e **L3** também estão presentes em todos os espécimes e são majoritárias nos extratos de Ribeirão Preto e Campos do Jordão.

Conforme GOTTLIEB *et al.* (1998), existe uma predominância de derivados do ácido chiquímico em plantas de florestas tropicais próximas da linha do equador (Floresta Amazônica) e de derivados do ácido acético em locais mais distantes da linha do equador (cerrado). As diferenças observadas entre os perfis cromatográficos de triterpenóides e de lactonas sesquiterpênicas dos espécimes estudados não poderão ser relacionadas com o fator latitude, pois estes foram coletados aproximadamente na mesma e, portanto as variações encontradas se devem a outros fatores.

Como já comentado anteriormente, de acordo com KAPLAN (1994), plantas do cerrado tendem a apresentar maior número de substâncias, mas em menores quantidades do que plantas de floresta tropical. Neste estudo, não se observou esta

tendência para triterpenóides, bem como para lactonas sesquiterpênicas. Tal fato pode ser constatado comparando-se os perfis obtidos por CLAE dos espécimes de Ribeirão Preto (259) e São Carlos (261), os quais mostram maior número e menores quantidades para a planta de Ribeirão Preto e apenas duas lactonas majoritárias na planta de São Carlos, ambas coletadas no cerrado.

Após a análise destes três espécimes de *Mikania cordifolia*, em relação às lactonas sesquiterpênicas, pode-se ainda afirmar que, mesmo estes sendo provenientes de regiões com vegetação e clima distintos, não se tratam de quimiotipos diferentes, pois foram encontradas as mesmas lactonas, apesar de estarem em quantidades diferentes. As diferenças encontradas, provavelmente, não possuem relação com o tipo de vegetação e com fatores que se relacionam com este, como a temperatura e altitude, mas às condições de solo ou de irrigação.

Figura 13: Perfil cromatográfico da fração 259AqD (λ , 215 nm). Tempos de retenção: L1, 18,8 min; L2, 19,5 min; L3, 12,0 min; NI1 (não identificado), 16,6 min; NI2, 31,8min.

Figura 14: Perfil cromatográfico da fração 261AqD (λ , 215 nm). Tempos de retenção: L1, 18,9 min; L2, 19,6 min; L3, 12,0 min.

Figura 15: Perfil cromatográfico da fração 264AqD (λ , 215 nm). Tempos de retenção: L1, 18,9 min; L2, 19,6 min; L3, 12,0 min.

4.5. Análise comparativa de flavonóides

Para a comparação entre os perfis cromatográficos de flavonóides das frações em acetato de etila oriundos da partição dos extratos metanólicos e diclorometânicos dos espécimes de *M. cordifolia* 259, 261, 264 e 266, foi necessária a obtenção de substâncias puras para serem utilizadas como padrões nas análises por CLAE. Desta forma, foram obtidos dois flavonóides em quantidade suficiente para as análises através do fracionamento do extrato 261Mac por CCC e do extrato 259Mac por CLAE em escala preparativa.

4.5.1. Fracionamento do extrato 259

O extrato 259Mac (80mg) foi fracionado por CLAE em escala preparativa, sendo obtida uma substância pura denominada de **F1** (12,3 mg)

4.5.1.1. Identificação estrutural da substância F1

F1: Rhamnazina

RMN de ^1H : Tabela 16; Figura 53 (Anexo 8)

RMN de ^{13}C : Tabela 16; Figuras 54 (Anexo 8)

HMBC: Figura 55 (Anexo 8)

HMQC: Figura 56 (Anexo 8)

Através da análise dos dados presentes no espectro de RMN ^1H da substância **F1**, pode-se constatar a presença de sinais característicos de um flavonóide metoxilado. Foi observado um singleto em δ 6,36 referente ao H-6 e um outro em δ 6,80 referente ao H-8 do anel A com constante de acoplamento 2,3. Neste espectro, também estão presentes um dubleto em δ 7,78 e 6,95 e um duplo dubleto em δ 7,75 referentes aos hidrogênios 2', 5' e 6' do anel B do flavonol. Além destes sinais, há os singletos em δ 3,88 e 3,86 referentes aos três hidrogênio das duas metoxilas do flavonóide e a presença de um sinal em δ 11,86 atribuído ao hidrogênio do grupamento hidroxila da posição 5 do anel A.

Os dados obtidos no espectro de RMN ^{13}C juntamente com os mapas de contorno HMQC e HMBC permitiram a confirmação do flavonóide como rhamnazina, também chamada de 7,3'-dimetoxi-quercetina, sendo esta a primeira vez que esta substância é descrita para esta espécie.

Tabela 16: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância 259.1 (DMSO- d_6 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz}$.)

SUBHADHIRASAKUL				AGRAWAL (1986)	
<i>Carbono</i>	ΔH	<i>et al.</i> (2003) <i>Rhamnazina</i> δH 500 MHz, CDCl ₃	δC	<i>Rhamnazina</i> δC 15,04 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆	
2	-	-	146,3	146,9	
3	-	-	135,4	136,2	
4	-	-	175,2	175,8	
5	12,47 <i>s</i> (OH)	11,75 <i>s</i> (OH)	155,3	156,0	
6	6,36 <i>d</i> (2,3)	6,40 <i>d</i> (2,3)	96,7	97,3	
7	-	-	164,2	164,8	
8	6,80 <i>d</i> (2,3)	6,52 <i>d</i> (2,3)	91,3	91,8	
9	-	-	159,6	160,4	
10	-	-	103,3	104,0	
1'	-	-	121,6	122,1	
2'	7,78 <i>d</i> (2,1)	7,83 <i>d</i> (2,1)	110,9	111,8	
3'	-	-	146,6	147,4	
4'	-	-	148,2	149,0	
5'	6,95 <i>d</i> (8,5)	7,08 <i>d</i> (8,5)	114,8	115,6	
6'	7,75 <i>dd</i> (2,1; 8,5)	7,79 <i>dd</i> (2,1; 8,5)	121,1	121,8	
-OMe 7	3,88 <i>s</i>	3,92 <i>s</i>	55,3	55,8	
-OMe 3'	3,86 <i>s</i>	3,92 <i>s</i>	55,0	55,8	

4.5.2. Fracionamento do extrato 261

4.5.2.1. Identificação estrutural da substância F2

F2: Quercetina-3-O- β -galactosídeo

RMN de ^1H : Tabela 17; Figura 57 (Anexo 9)

RMN de ^{13}C : Tabela 17; Figura 58 (Anexo 9)

HMBC: Figura 59 (Anexo 9)

HMQC: Figura 60 (Anexo 9)

O espectro de RMN ^1H da substância **F2** em $\text{DMSO-}d_6$ deuterado apresenta sinais típicos de uma quercetina glicosilada. Foi observado um singlete em δ 6,21 referente ao H-6 e um outro em δ 6,41 referente ao H-8 do anel A, como descrito na Tabela 10. Também estão presentes no espectro os sinais em δ 7,54, 6,82 e 7,67 referentes aos hidrogênios 2', 5' e 6' do anel B do flavonóide.

No espectro de RMN de ^1H , há a presença de um sinal em δ 12,64 atribuído ao hidrogênio do grupamento hidroxila da posição 5 do anel A. Neste espectro, é possível observar um dubleto em δ 5,38 ($J = 7,4$ Hz) que se refere ao H anomérico do açúcar e vários sinais entre δ 3,0 e 4,0 também atribuídos aos outros hidrogênios do açúcar ligado ao flavonóide.

Os dados obtidos por RMN ^{13}C juntamente com os presentes nos mapas de contorno do HMQC e do HMBC permitiram a confirmação da porção flavonoídica como a quercetina e a identificação do açúcar como a galactose. Através da análise dos dados espectrais obtidos e da comparação dos mesmos com os da literatura, o flavonóide em questão foi identificado como quercetina-3-O- β -galactosídeo, sendo este encontrado pela primeira vez nesta espécie.

Tabela 17: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da substância **F2** (DMSO- d_6 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz.}$)

<i>Carbono</i>	δH	MARKHAN & GEIGER (1994) <i>Quercetina</i> δH	δC	AGRAWAL(1986) <i>Quercetina-3-O-</i> <i>galactosídeo</i> δC
2	-	-	156,1	156,3
3	-	-	133,4	133,8
4	-	-	177,4	177,5
5	(-OH) 12,64	12,45	161,1	161,2
6	6,21 <i>d</i>	6,20 <i>d</i> (2,1)	98,6	98,6
7	-	-	164,1	164,0
8	6,41 <i>d</i>	6,42 <i>d</i> (2,1)	93,4	93,4
9	-	-	156,1	156,3
10	-	-	103,8	104,0
1'	-	-	121,9	121,3
2'	7,54 <i>s</i>	7,69 <i>d</i> (2,1)	115,1	115,2
3'	-	-	144,7	144,7
4'	-	-	148,3	148,5
5'	6,82 <i>d</i> (8,5)	6,90 <i>d</i> (8,5)	115,8	116,2
6'	7,67 <i>d</i> (8,5)	7,55 <i>dd</i> (2,1; 8,5)	121,0	121,8
1''	5,38 (7,44)		101,7	102,3
2''			71,1	71,3
3''			73,1	73,4
4''			67,8	68,0
5''			75,7	75,0
6''			60,0	60,8

4.5.3. Análise qualitativa das frações em acetato de etila por CLAE

As frações obtidas após extração líquido-líquido dos extratos brutos metanólicos e diclorometânicos foram analisadas por CLAE comparativamente para a pesquisa de flavonóides em cromatógrafo equipado com detector UV-Vis (Figuras 16 a 23). Todas as frações, com exceção daquelas obtidas de *M. cordifolia* coletada em Monte Verde (266), apresentaram majoritariamente a substância **A1**, ácido 3,4-diidroxibenzóico, com tempo de retenção em 11,8 minutos, em proporções entre 30 e 35%. Esta substância foi identificada com o uso de padrão disponível no laboratório.

A substância **F1** isolada do espécime de Ribeirão Preto, rhamnazina, foi encontrada nas frações dos espécimes coletados em Ribeirão Preto (259), São Carlos (261), Campos de Jordão (264) e Monte Verde (266). Este flavonóide foi observado na *M. cordifolia* coletada em São Carlos (261) apenas no cromatograma obtido nas análises confirmatórias realizadas no equipamento com detector de arranjo de diodos.

A substância **F2**, Quercetina-3-O- β -galactosídeo, foi encontrada em todas as frações, mas é observada em grande quantidade apenas na fração 261 MAc (23,5%) de onde foi isolada, nas outras frações ela é observada em proporções entre 1,7 e 7,6%. Através das análises das frações no cromatógrafo com detector de arranjo de diodos, foi possível identificar a presença dos flavonóides **F1** e **F2** e identificar a substância **A1** (Figuras 24 a 27).

A análise comparativa destas frações indica que as vias metabólicas para a produção de flavonóides nos espécimes coletados estão semelhantes, uma vez que os

perfis cromatográficos se apresentaram sem grandes variações qualitativas, excluindo-se o espécime 266. O perfil deste espécime, apesar de ser proveniente da mesma vegetação do vegetal 264 (floresta ombrófila mista), ele não apresentou a substância **NI** como majoritária em nenhum dos extratos.

A comparação entre os perfis de flavonóides mostra que, assim como nas análises de triterpenóides e de lactonas sesquiterpênicas, os extratos são semelhantes qualitativamente. Quanto à variação quantitativa, elas possuem algumas diferenças que não podem ser relacionadas com a vegetação ou clima, mas, provavelmente a fatores como solo ou irrigação, como já sugerido.

Figura 16: Perfil cromatográfico da fração 259DAC (λ , 280 nm). Tempos de retenção: **F1**, 31,8 min; **F2**, 21,8 min; **A1**, 11,8 min.

Figura 17: Perfil cromatográfico da fração 259MAc (λ , 280 nm). Tempos de retenção: **F1**, 31,7 min; **F2**, 21,8 min; **A1**, 11,7 min.

Figura 18: Perfil cromatográfico da fração 261DAC (λ , 280 nm). Tempos de retenção: F2, 21,7 min; A1, 11,8 min.

Figura 19: Perfil cromatográfico da fração 261MAc (λ , 280 nm). Tempos de retenção: F2, 21,9 min; A1, 11,9 min.

Figura 20: Perfil cromatográfico da fração 264DAC (λ , 280 nm). Tempos de retenção: **F1**, 31,7 min; **F2**, 21,7 min; **A1**, 11,8 min.

Figura 21: Perfil cromatográfico da fração 264MAc (λ , 280 nm). Tempos de retenção: **F1**, 31,7 min; **F2**, 21,6 min; **A1**, 11,7 min.

Figura 22: Perfil cromatográfico da fração 266DAC (λ , 280 nm). Tempos de retenção:

F2. 21.6 min; **A1.** 11.8 min.

Figura 23: Perfil cromatográfico da fração 266MAc (λ , 280 nm). Tempos de retenção:

F1, 31,4 min; **F2,** 21,4 min; **A1,** 11,6 min.

Figura 24: Perfil cromatográfico da fração 259Mac juntamente com espectros na região do UV-Vis das substâncias identificadas. Tempos de retenção: **F1**, 26,4 min; **F2**, 14,9 min; **A1**, 9,8 min.

Figura 25: Perfil cromatográfico da fração 261Mac juntamente com espectros na região do UV-Vis das substâncias identificadas. Tempos de retenção: **F1**, 26,1 min; **F2**, 13,6 min; **A1**, 8,9 min.

Figura 26: Perfil cromatográfico da fração 264Mac juntamente com espectros na região do UV-Vis das substâncias identificadas. Tempos de retenção: **F1**, 26,2 min; **F2**, 13,9 min; **A1**, 7,8 min.

Figura 27: Perfil cromatográfico da fração 266Mac juntamente com espectros na região do UV-Vis das substâncias identificadas. Tempos de retenção: **F1**, 26,4 min; **F2**, 14,6 min.

4.6. Identificação estrutural da substância C1

C1: isoescopoletina

6-hidroxi-7-metoxicumarina (Isoescopoletina)

RMN de ^1H : Tabela 18; Figura 61 (Anexo 10)

UV-Vis: Tabela 19; Figura 62 (Anexo 10)

A análise dos dados do espectro de RMN de ^1H indica a que **C1**, isolada do extrato diclorometânico do espécime coletado em São Carlos, trata-se de uma substância pertencente ao grupo das cumarinas. No espectro de RMN de ^1H , pode-se observar dois dubletos com $J = 9,4$, δ 6,27 e 7,60, que se referem aos hidrogênios H-3 e H-4. Também nota-se a presença de dois singletos em δ 6,92 e 6,84 que se referem aos hidrogênios H-5 e H-8 e um singlete em δ 3,96 referente aos hidrogênios de uma metoxila. Esses dados sugerem as substâncias: escopoletina ou isoescopoletina.

Como a massa obtida não foi suficiente para a aquisição de um espectro de RMN de ^{13}C , a diferenciação entre as duas substâncias foi realizada feita através de obtenção do espectro na região do UV/ Vis e os dados apresentados na Tabela 20. Foi confirmada a estrutura da isoescopoletina para **C1**, também denominada 6-hidroxi-7-metoxicumarina.

A substância **C1** foi isolada a partir do extrato diclorometânico do espécime de *M. cordifolia* coletado em São Carlos e não foi pesquisada nos outros espécimes, porém esta é a primeira vez que a isoescopoletina é descrita nesta planta.

Tabela 18: Dados de RMN de ^1H da substância **C1** (400 MHz, CDCl_3 , TMS, δ , mult., $J=\text{Hz.}$)

H	Escopoletina - δ_{H} (RAZDAN <i>et al</i> , 1987)	Isoescopoletina- δ_{H} (RAZDAN <i>et al</i> , 1987)	C1- δ_{H}
3	6,18 <i>d</i> (9,6)	6,12 <i>d</i> (9,3)	6,27 <i>d</i> (9,4)
4	7,87 <i>d</i> (9,6)	7,82 <i>d</i> (9,3)	7,60 <i>d</i> (9,4)
5	7,18 <i>s</i>	7,12 <i>s</i>	6,92 <i>s</i>
8	6,73 <i>s</i>	6,72 <i>s</i>	6,84 <i>s</i>
-OCH ₃	3,80 <i>s</i>	3,80 <i>s</i>	3,96 <i>s</i>
-OH	10,2 <i>s</i>	10,9 <i>s</i>	-

Legenda: -, sinal não observado; *s*, singlete; *d*, dubleto.

Tabela 19: Dados do espectro de absorção na região do UV/Vis da substância **C1**.

Substância	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
C1	225, 246, 288, 346
Isoescopoletina (RAZDAN <i>et al</i> , 1987)	230, 254, 260, 298, 346
Escopoletina (RAZDAN <i>et al</i> , 1987)	225, 240, 245, 346

4.7. Ensaio de atividade antiofídica

O uso de extratos de plantas como antídoto para venenos de serpentes é uma antiga opção utilizada em muitas comunidades que não têm acesso à soroterapia, podendo ser um tratamento alternativo ou complementar (PIERINI *et al.*, 1996 RIZZINI *et al.*, 1988). Acidentes com animais peçonhentos constituem um problema de saúde pública, tanto pela frequência com que ocorrem, quanto pela gravidade de muitos deles (RIBEIRO, 1990). No Brasil ocorrem entre 19 a 22 mil casos de acidentes ofídicos por ano, dos quais 90,5% são causados por serpentes do gênero *Bothrops* (PINHO & PEREIRA, 2001). Diversas espécies vegetais têm sido descritas como antiofídicas (BATINA *et al.*, 1997, 200; PACHECO *et al.*, 1995; PEREIRA *et al.*, 1992, 1994;) e alguns princípios ativos foram isolados e caracterizados (MORS *et al.*, 1988; MORS *et al.* 2000).

O estudo de extratos de plantas com propriedades antiofídicas pode resultar na descoberta de substâncias que possam ser utilizadas como complemento na soroterapia e até resultar na descoberta de futuros fármacos.

O modelo de indução de edema na pata de camundongo é muito utilizado nos estudos experimentais farmacológicos, pois este permite avaliar os mecanismos envolvidos na gênese da resposta inflamatória (edema) induzido por um agente lesivo e na atividade antiinflamatória de novos fármacos.

O edema foi representado como aumento percentual do volume podal após injeção de veneno ou solução salina. Para a determinação do aumento de volume, foi calculada a porcentagem de aumento podal, considerando os volumes final e inicial

(tempo zero) para cada pata. Em seguida, foi efetuada a diferença entre os percentuais de aumento obtidos nas patas esquerda e direita de cada animal.

O cálculo do volume da pata de cada animal para determinar o aumento percentual das patas foi realizado com a seguinte equação:

Volume (%) da pata direita (VBm) ou da pata esquerda (salina)=

$$\frac{\text{Vol. Final} - \text{Vol. Inicial}}{\text{Vol. inicial}} \times 100$$

Para o experimento, foi escolhida a concentração submaximal de 1 µg/ pata, pois, nesta dose, o veneno de *B. moojeni* não é hemorrágico e não sendo maximal, o aumento do volume das patas pode ser quantificado, quando houver incremento do edema.

Através da análise dos gráficos apresentados nas Figuras 28, 29 e 30, é possível constatar que a administração do extrato de *M. cordifolia* foi eficiente na inibição da formação do edema induzido pelo veneno de serpente. O extrato de *M. cordifolia* mostrou maior eficiência na inibição do edema na dose mais elevada, como mostra a Figura 23. Nas concentrações menores, também foi notada uma diminuição no efeito do extrato de *M. cordifolia*, mas mesmo nas menores doses, o extrato se mostrou eficiente na diminuição do edema. Desta forma, estes resultados confirmam as propriedades antiofídicas desta planta já explorada popularmente.

Figura 28: Efeito da administração intraperitoneal de extrato aquoso de *Mikania cordifolia* 20% (2g/animal, 1 hora antes) sobre o edema de pata de camundongo induzido pela injeção intraplantar de veneno de *Bothrops moojeni* (1,0 µg/ pata). Cada valor representa a média entre cinco animais. *A diferença entre os valores médios é estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 29: Efeito da administração intraperitoneal de extrato aquoso de *Mikania cordifolia* 20% (0,2 g/animal, 1 hora antes) sobre o edema de pata de camundongo induzido pela injeção intraplantar de veneno de *Bothrops moojeni* (1,0 µg/ pata). Cada valor representa a média entre cinco animais. *A diferença entre os valores médios é estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 30: Efeito da administração intraperitoneal de extrato aquoso de *Mikania cordifolia* 20% (0,1 g/animal, 30 minutos antes) sobre o edema de pata de camundongo induzido pela injeção intraplantar de veneno de *Bothrops moojeni* (1,0 µg/ pata). Cada valor representa a média entre cinco animais.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi realizado um estudo comparativo entre quatro espécimes de *M. cordifolia* coletados em locais diferentes. Para este fim foram isolados os flavonóides Rhamnazina e Quercetina-3-O- β -galactosídeo dos extratos dos vegetais coletados em Ribeirão Preto e São Carlos, respectivamente, as lactonas sesquiterpênicas 14-hidroxi-15[2'-hidroximetilacrilóiloxi]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo, 14-hidroxi-15[2'-hidroxi,2'-metilpropanoiloxi]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo e 14-hidroxi-15[2',3'-epoxi, 2'-metilpropanoiloxi]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo do material vegetal de Ribeirão Preto e a cumarina Isoescopoletina do material vegetal coletado em São Carlos.

Através das análises comparativas dos extratos por métodos cromatográficos, foi possível identificar triterpenóides, lactonas sesquiterpênicas e flavonóides em todos os espécimes coletados.

Os espécimes de Ribeirão Preto e São Carlos, ambos coletados no cerrado e em latitudes semelhantes, apresentaram o mesmo perfil de triterpenóides, sendo os únicos a apresentar Friedelina. Os espécimes de Monte Verde e Campos do Jordão também apresentaram perfis semelhantes, mas, embora ambos sejam de floresta ombrófila mista, apenas o primeiro apresentou quantidades maiores destas substâncias. Desta forma, não se pode relacionar as diferenças nos teores destas substâncias à vegetação de origem e aos fatores a ela relacionados.

As análises cromatográficas para a pesquisa de lactonas sesquiterpênicas possibilitaram a comparação entre dois espécimes do cerrado (Ribeirão Preto e São

Carlos) e um de floresta ombrófila mista (Campos do Jordão). Todos os extratos apresentaram as substâncias 14-hidroxi-15[2'-hidroximetilacrilóiloxi]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo, 14-hidroxi-15[2'-hidroxi,2'-metilpropanoiloxi]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo e 14-hidroxi-15[2',3'-epoxi,2'-metilpropanoiloxi]-germacra-1(10)*E*,4*Z*-11(13)-trien-12,8 α -olídeo, já isoladas anteriormente de *M. cordifolia* (GUTIERREZ *et al.*, 1987), mas os espécimes de Ribeirão Preto e Campos de Jordão se mostraram mais complexos em relação à mistura de lactonas sesquiterpênicas. O espécime coletados em São Carlos apresentou um perfil simples com duas substâncias majoritárias.

Desta forma, pode-se afirmar que a complexidade do perfil de lactonas sesquiterpênicas do espécime de Ribeirão Preto não se relaciona com a vegetação de origem, embora tenha sido proposto por KAPLAN (1994) que plantas do cerrado tendem a apresentar perfis mais complexos, mas com menores concentrações de substâncias.

A pesquisa de flavonóides nos extratos de alta polaridade mostrou que os quatro espécimes possuem perfis complexos destas substâncias. Todos os espécimes apresentaram os flavonóides Quercetina-3-O- β -galactosídeo, majoritário no extrato metanólico de São Carlos, e o flavonóide Rhamnazina. Da mesma forma que na análise dos perfis das outras classes de substâncias, não foi possível efetuar uma relação das diferenças qualitativas e quantitativas com a vegetação de origem, indicando que dentro de uma mesma espécie fatores como condições do solo e hídricas podem influenciar no metabolismo dos compostos estudados.

A espécie *M. cordifolia* já havia sido estudada em ensaios de atividades tripanocida e inseticida, porém, apesar do uso popular para picadas de serpente, esta é a primeira vez que é realizado um trabalho sobre a atividade antiofídica do seu extrato aquoso. Através destes ensaios preliminares, foi constatada uma atividade de diminuição do edema de pata provocado por veneno de *B. moojeni* relacionada com a dose do extrato administrada nos camundongos. Estudos de atividade antiofídica já foram realizados com *Mikania glomerata* (MAIORANO *et al.*, 2005), o que favorece um aprofundamento no estudo de plantas do gênero *Mikania* para a pesquisa de tratamentos para picadas de serpente.

A espécie *Mikania cordifolia* já foi estudada em outros países da América Latina, mas este é o primeiro a ser realizado com vegetais desta espécie coletados em nossa flora. Os espécimes avaliados quimicamente apresentaram dados consistentes com a literatura em relação aos perfis de lactonas sesquiterpênicas, uma vez que são muito semelhantes aos encontrados por GUTIERREZ *et al.* (1987) no seu trabalho sobre a comparação entre dois espécimes de *M. cordifolia* coletados na Argentina.

Pela primeira vez, a espécie *M. cordifolia* teve extratos de baixa polaridade estudados e se mostrou qualitativamente rica em triterpenóides, que são substâncias já estudadas em relação às atividades antiinflamatória e antiofídica (MORS, *et al.*, 2000; DELLA LOGGIA *et al.*, 1994).

Conclusivamente, podemos afirmar que todos os espécimes, independente do local da coleta, apresentaram a mesma expressão do metabolismo, produzindo terpenóides das classes dos triterpenos, das lactonas sesquiterpênicas e dos flavonóides.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Elsevier, New York, 1986
- ALZUGARAY, D. & ALZUGARAY, C. **Flora Brasileira**, v.2, 1973.
- ARIAS, A. R. ; FERRO, E.; INCHAUSTI, A.; ASCURRA, M.; ACOSTA, N.; RODRIGUEZ, E. & FOURNET, A. Mutagenicity, insecticidal and trypanomicidal activity of some Paraguayan Asteraceae. **Journal Ethnopharmacology**, v. 45, p. 35 - 41, 1995.
- BALBACH, A. **As Plantas Curam**. 24ª Edição, 1968.
- BATINA, M. F. C.; CINTRA, A. C. O; LAVRADOR, M. A S.; GIGLIO, J. R.; PEREIRA, P. S.; DIAS, D. A.; FRANÇA, S.C.; SAMPAIO, S.V. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis* A. D. C. (Apocynaceae). Identification of one the active components. **Planta Médica**, v. 66, p. 424, 2000.
- BATINA, M. F. C.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S.V. Methodological care in the evaluation of the LD₅₀ and the neutralization of the lethal effect of *Crotalus durissus terrificus* venom by the plant *Peschiera fuchsiaefolia* (Apocynaceae). **The Journal of Venomous Animal and Toxins**, v.3, p. 23 - 29, 1997.
- BARROSO, G. M. **Mikaniae do Brasil**. Rio de Janeiro, Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v.16, 1958.
- BOEKER, P.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F. & SCHMEDA-HIRSCHMANN G. Germacra-1,10Z, 4E-dien-12, 8 α -olides from *Mikania micrantha*. **Planta Medica**, v. 53, p.105-106, 1986.

- BOHLMANN, F.; NATU, A. A. & MAHANTA, P. K. Neue Diterpene und Germacranolide aus *Mikania* -Arten. **Phytochemistry**, v. 17, n.3, p. 483 - 485, 1978.
- BREMER, K. **Asteraceae: Cladistics and Classification**. Portland, Timber Press, Inc. 1994.
- CARIBE, J. & CAMPOS, J. M. **Plantas que Ajudam o Homem**, 5º edição, São Paulo, 1991.
- CASTRO, V.; JAKUPOVIC, J. & BOHLMANN, F. Germacranolides from *Mikania* species. **Phytochemistry**, v. 28, p. 527-530, 1989.
- COX, P. A. & BALICK, M. J. **Plants, People, and Culture - The Science of Ethnobotany**, Scientific American Library, 1997.
- D'AGOSTINO, M.; DE SIMONE, F.; ZOLLO, F.; PIZZA, C. Constituents of *Mikania cordifolia*. **Fitoterapia**, v. 62, n. 5, p.461, 1990.
- DELLA LOGGIA, R.;TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, S.; ISAAC,O. The role of triterpenoids in the tropical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta medica**, v. 60, n. 6, p. 516-520, 1994.
- FEIJÓ, J. S. **Coleção Descritiva das Plantas da Capitania do Ceará**. 1803-1805.
- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B.; PAGOTTO, C. L. A. C.; ZOCHER, D. H. T. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 3, n. 2, p. 97-102, 1998.
- GUTIERREZ, A. B.; OBERTI, J. C.; SOSA, V. E. & HERZ, W. Melampolides from *Mikania cordifolia*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2315-2320, 1987.

- HERZ, W.; SUBRAMANIAM, P. S.; MURARI, R.; DENNIS, N. & BLOUNT, J. F. Micordilin, a Complex Elemanolide from *Mikania cordifolia*. **Journal Organic Chemistry**, v. 42, p.1720-1725, 1977.
- HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v.5, n.7, 2000.
- 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 of the Chemical Society**, v.75, n. 10 - 12, p. 559-564, 1998.
- HOLMES, W. C. A proposed sectional classification for *Mikania* (EUPATORIEAE). In: Compositae: Systematics. **Proceedings of the International Compositae Conference**, v. 1, p. 621 - 626, Royal Botanic Gardens, 1996.
- 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, n. 1, p. 49-54, 1994.
- KING, R. M. & ROBINSON, H. **The Genera of the Eupatorieae (Asteraceae)**. Lawrence, Allen Press, Inc., v.22, 1987.
- KISSMANN, K. G. & GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. São Paulo, BASF Brasileira S.A., 1992.
- LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil**. Nova Odessa - SP, Edição do Autor, 1982.
- MARKHAN, K. R.; GEIGER, H. ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In: HARBONE, J. C. **The Flavonoids :Advances in Research Since 1986**. Chapman & Hall, 1994.

- 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, p. 364-370, 2005.
- MONTANARI, C. A & BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- MOERMAN, D. R. An Analysis of the food plants and drug plants of native North America. **Journal of Ethnopharmacology**, v.52, p. 1-22, 1994.
- MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active agaist snake bite – the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p. 627-642, 2000.
- MORS, W.B.; NASCIMENTO, M.C.; PARENTE, J.P.; & SILVA, M.H. Neutralização de venenos ofídicos por extratos e substâncias isoladas de uma planta da medicina popular, *Eclipta prostata* L. Asteraceae. **Annais da Academia Brasileira de Ciências.**, v. 60, p. 262 - 263, 1988.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.
- PACHECO, B. M. R.; SILVA, N. F. DA & FRANCO, P. F. Atividade antibotrópica do chá de quiabo, *Hibiscus esculentus*. **Revista Brasileira de Farmácia.**, v. 76, p. 61 - 62, 1995.
- PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. The renaissance of natural products as drug candidates. **Science**, v. 310, 2005.

- PELUZZO, G.; DE 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 - 646, 1995.
- PEREIRA, B. M. R.; GONÇALVES, L.C. & PEREIRA, N.A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III - atividade antiedematogênica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.73, p.85 - 86, 1992.
- PEREIRA, N. A.; PEREIRA, B. M. R.; NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P. & MORS, W. B. Pharmacological screening of plants recommendably folk medicine as snake venom antidotes. IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Médica**, v. 60, p. 99 - 100, 1994.
- PIERINI, S.V.; WARREL, D. A.; PAULO, A. de.; THEAKSTON, R. D. G. High incidence of bites and stings by snakes and other animals among rubber tapers and amazonian indians of the Juruá Valley, Acre State, Brazil. *Toxicon* v.34, p. 225-236, 1996.
- PINHO, F.M.O., PEREIRA, I.D. Ofidismo. *Ass. Med. Bras.*, v. 47, n.1, p. 24-29, **2001**
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45 -61, 2002.
- RAZDAN, T. K.; QADRI, B.; HARKAR, S.; WRIGHT, E. S. Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 2063-2068, 1987.

- RIBEIRO, L.A. Epidemiology of ophidic accidents. *Memórias do Instituto Butantan*, v. 52, p. 15-16, 1990.
- RIZZINI, C.T.; MORS, W.B.; PEREIRA, N.A. Plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonhas animais, especialmente venenos de cobras. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.69, p. 82 - 86, 1988.
- SCHINOR, E. C., SALVADOR, M. J., TURATTI, I. C. C., ZUCCHI, O. L. A. D., DIAS, D. A. Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta spp.* **Utrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 6, p. 415-421, 2004.
- SELVANAYAGAM, Z.E.; GNANAVENDHAN, S.G.; CHANDRASEKHARAN, P.; BALAKRISHNA, K. & BHIMA RAO, R. Plants with antisnake venom activity - a review on pharmacological and clinical studies. **Fitoterapia**, v. 65, p. 99 - 11, 1994.
- SERRANO, S. M.; NOGAL, J. J.; DIAZ, M., R. A.; ESCARIO, J.A.; FERNÁNDEZ, A.R. & BARRIO, A.G. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 101 - 107, 2000.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- SPRING, O. Microsampling: An Alternative Approach Using Sesquiterpene Lactones for Systematics. **Biochemical Systematica and Ecology**, v. 17, n. 7/ 8, p. 50-517, 1989.

- SPRING, O. Trichome Microsampling od Sesquiterpene Lactones for the Use of Systematic Studies. *In: Modern Phytochemival Methods* v. 25, Plenum Press, New York, 1991.
- STROHL, W. R. The role of natural products in modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v.5, n. 2, 2000.
- SUBHADHIRASAKUL, S.; JANKEAW, B.; MALINEE, A. Chemical constituents and antioxidative activity of the extracts from *Dyera costulata* leaves. **Journal of Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 351-357.
- TREVISAN, M.T. S.; MACEDO, F. V. V.; VAN DE MEENT, M.; RHEEE, I. K.; VERPOORTE, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.
- ZDERO, C. & BOHLMANN, F. Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. **Plants Systematics and Evolution**, v. 171, p. 1 - 14, 1990.

Anexos

Anexo 1: Figuras 31, 32, 33 e 34

Figura 31: Espectro de absorção na região do IV dos extratos 259D e 259M.

Figura 32: Espectro de absorção na região do IV dos extratos 261D e 261M.

Figura 33: Espectro de absorção na região do IV dos extratos 264D e 264M.

Figura 34: Espectro de absorção na região do IV dos extratos 266D e 266M.

Anexo 2: Figuras 35, 36, 37 e 38

Figura 35: Espectros de absorção na região do IV das frações 261DR e 261DH.

Figura 36: Espectros de absorção na região do IV das frações 261DD e 261DAc.

Figura 37: Espectros de absorção na região do IV das frações 261MR e 261MH.

Figura 38: Espectros de absorção na região do IV das frações 261MD e 261MAc.

Anexo 3: Tabelas 20, 21, 22 e 23

Tabela 20: Composição de triterpenóides de frações obtidas a partir de *Mikania cordifolia* coletada em Ribeirão Preto (coluna HP-50).

Triterpenóides	DR (%) área)	DH (%) área)	MR (%) área)	MH (%) área)	Retenção relativa*
Campesterol	0,37	0,97	-	-	1,104
Estigmasterol	2,15	5,85	-	0,33	1,135
β -Sitosterol	2,21	4,55	0,85	1,07	1,197
Epitaraxerol p	-	-	-	-	1,277
β -Amirina	2,31	5,04	-	0,31	1,321
α -Amirina/Lupenona	1,59	4,85	2,45	2,75	1,414
Lupeol	2,93	9,96	2,10	1,87	1,441
Acetato de taraxerol	-	-	-	-	1,372
Friedelina	3,17	2,10	3,53	3,07	1,687
Pseudotaraxerol	0,38	0,27	4,21	2,67	1,614
Taraxasterol	2,60	3,34	-	1,66	1,643
11-oxours-12-eno	-	-	-	-	1,793
11-oxolean-12-eno	-	-	-	-	1,893
Acetato de β -amirina	8,24	7,36	5,70	5,00	1,396
Acetato de α -amirina	0,88	0,68	1,26	1,39	1,489
Acetato de lupeol	15,72	16,38	8,93	7,51	1,524
Acetato de taraxasterol	28,01	2,12	4,78	4,14	1,726

Legenda: -, não detectado; *tempo de retenção relativa ao colesterol.

Tabela 21: Composição de triterpenóides de frações obtidas a partir de *Mikania cordifolia* coletada em São Carlos (coluna HP-50).

Triterpenóides	DR (%) área)	DH (%) área)	MR (%) área)	MH (%) área)	Retenção relativa*
Campesterol	0,93	0,68	0,47	0,25	1,104
Stigmasterol	1,68	4,97	3,06	6,66	1,135
β -Sitosterol	2,18	3,58	2,55	4,44	1,197
Epitaraxerol p	-	-	-	-	1,277
β -Amirina	2,18	3,72	3,60	5,93	1,321
α -Amirina/Lupenona	0,83	2,01	1,69	2,48	1,414
Lupeol	2,95	5,87	4,64	8,42	1,441
Acetato de taraxerol	-	-	-	-	1,372
Friedelina	1,43	5,03	2,10	-	1,687
Pseudotaraxerol	1,30	1,79	0,83	1,00	1,614
Taraxasterol	3,03	4,44	4,09	4,25	1,643
11-oxours-12-eno	-	-	-	-	1,793
11-oxolean-12-eno	-	-	-	-	1,893
Acetato de β -amirina	13,06	14,30	13,79	11,39	1,396
Acetato de α -amirina	1,26	1,62	1,80	1,90	1,489
Acetato de lupeol	13,94	12,41	19,60	16,04	1,524
Acetato de taraxasterol	22,54	17,92	25,65	10,79	1,726

Legenda: -, não detectado; *tempo de retenção relativa ao colesterol.

Tabela 22: Composição de triterpenóides de frações obtidas a partir de *Mikania cordifolia* coletada em Campos do Jordão (coluna HP-50).

Triterpenóides	DR (%) área)	DH (%) área)	MR (%) área)	MH (%) área)	Retenção relativa*
Campesterol	0,87	0,32	0,41	0,27	1,104
Estigmasterol	2,47	2,96	3,36	2,57	1,135
β -Sitosterol	3,09	3,82	3,70	3,14	1,197
Epitaraxerol p	-	-	-	-	1,277
β -Amirina	5,66	7,95	10,45	10,35	1,321
α -Amirina/Lupenona	1,63	2,61	2,19	3,02	1,414
Lupeol	2,49	4,62	2,55	4,48	1,441
Acetato de taraxerol	-	0,47	0,42	0,79	1,372
Friedelina	-	-	-	-	1,687
Pseudotaraxerol	-	0,62	-	0,45	1,614
Taraxasterol	2,57	2,30	4,63	3,04	1,643
11-oxours-12-eno	-	-	-	0,03	1,793
11-oxolean-12-eno	-	-	-	0,03	1,893
Acetato de β -amirina	4,52	10,25	11,04	7,81	1,396
Acetato de α -amirina	0,31	1,71	1,91	1,00	1,489
Acetato de lupeol	1,44	2,94	1,64	1,27	1,524
Acetato de taraxasterol	15,68	20,67	23,18	15,72	1,726

Legenda: -, não detectado; *tempo de retenção relativa ao colesterol.

Tabela 23: Composição de triterpenóides de frações obtidas a partir de *Mikania cordifolia* coletada em Monte Verde (coluna HP-50).

Compostos	DR (%) área)	DH (%) área)	MR (%) área)	MH (%) área)	Retenção relativa*
Campesterol	0,14	-	0,50	0,43	1,104
Estigmasterol	0,89	0,35	2,61	1,70	1,135
β -Sitosterol	2,47	-	6,96	4,00	1,197
Epitaraxerol p	-	-	0,24	-	1,277
β -Amirina	3,64	14,55	10,47	22,70	1,321
α -Amirina/Lupenona	5,64	8,93	14,15	13,05	1,414
Lupeol	5,39	19,40	13,40	29,39	1,441
Acetato de taraxerol	-	-	0,11	-	1,372
Friedelina	-	-	-	-	1,687
Pseudotaraxerol	0,50		0,15	0,067	1,614
Taraxasterol	0,35	0,14	0,42	0,71	1,643
11-oxours-12-eno	-	-	-	-	1,793
11-oxolean-12-eno	-	-	-	-	1,893
Acetato de β -amirina	19,09	18,84	11,56	0,85	1,396
Acetato de α -amirina	0,67	0,67	-	-	1,489
Acetato de lupeol	15,71	6,62	16,79	1,05	1,524
Acetato de taraxasterol	1,09	0,22	1,17	0,92	1,726

Legenda: -, não detectado; *tempo de retenção relativa ao colesterol.

Anexo 4: Figuras 39 e 40

Figura 39: Espectros de absorção na região do IV das frações 259AqD e 261AqD.

Figura 40: Espectro de absorção na região do IV da fração 264AqD.

Anexo 5: Figuras 41, 42, 43 e 44

Figura 41: Espectro de RMN de ^1H da substância **L1** (400 MHz, CDCl_3).

Figura 42: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **L1** (100 MHz, CDCl_3).

Figura 43: Espectro de RMN de ¹³C, DEPT 135° da substância **L1** (100 MHz, CDCl₃).

Anexo 6: Figuras 45, 46, 47 e 48

Figura 45: Espectro de RMN de ^1H da substância **L2** (400 MHz, CDCl_3).

Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **L2** (100 MHz, CDCl_3).

Figura 47: Espectro de RMN de ¹³C, DEPT 135° da substância **L2** (100 MHz, CDCl₃).

Figura 48: Mapa de contorno da substância L2, HMQC (100 MHz, CDCl₃).

Anexo 7: Figuras 49, 50, 51 e 52

Figura 49: Espectro de RMN de ^1H da substância **L3** (400 MHz, CDCl_3).

Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C da substância L3 (100 MHz, CDCl_3).

Anexo 8: Figuras 53, 54, 55 e 56

Figura 54: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **F1** (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

Figura 56: Mapa de contorno da substância **F1**, HMQC (100 MHz, DMSO- d_6).

Anexo 9: Figuras 57, 58, 59 e 60

Figura 57: Espectro de RMN de ^1H da substância F2 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

Figura 58: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **F2** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

Figura 59: Mapa de contorno da substância **F2**, HMBC (100 MHz, DMSO- d_6).

Figura 60: Mapa de contorno da substância F2, HMQC (100 MHz, DMSO- d_6).

Anexo 10: Figuras 61e 62

Figura 61: Espectro de RMN de ^1H da substância C1 (400 MHz, CDCl_3).

Figura 62: Espectro de absorção na região do UV da substância C1.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.