UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análises químicas qualitativas e quantitativas de duas espécies de
Mikania: *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip

Fernanda Peres Ferreira

**Ribeirão Preto
2008**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análises químicas qualitativas e quantitativas de duas espécies de
Mikania: *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para obtenção do
Título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientada: Fernanda Peres Ferreira

**Orientadora: Prof. Dra. Dionéia Camilo
Rodrigues de Oliveira**

Ribeirão Preto
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ferreira, Fernanda Peres

Análises químicas qualitativas e quantitativas de duas espécies de *Mikania*: *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ribeirão Preto, 2008.

191 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Oliveira, Dionéia Camilo Rodrigues

1. *Mikania glomerata*. 2. *Mikania laevigata*. 3. Guaco

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Peres Ferreira

**Análises químicas qualitativas e quantitativas de duas espécies de *Mikania*:
Mikania glomerata Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientadora: Prof. Dra. Dionéia Camilo
Rodrigues de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Aos meus pais, *Mauro e Jane*, às minhas irmãs,
Daniela e Maíra, à minha avó *Maria*, e ao *Ricardo*,**

Pelo carinho, apoio, incentivo, e confiança. Por
mais belas que sejam as palavras ditas, sempre
serão insuficientes para traduzir meus sentimentos
em relação a vocês...

*“A glória da amizade não é a mão estendida, nem o
sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da
companhia. É a inspiração espiritual que vem quando
você descobre que alguém acredita e confia em você”.*

Ralph Waldo Emerson

*“A mente que se abre para uma nova idéia jamais voltará
ao seu tamanho original”*
Albert Einstein.

À Profa. Dra. Dionéia

Pela amizade, paciência, orientação, pelos
ensinamentos transmitidos, e principalmente pela
confiança em mim depositada durante a
realização deste trabalho.

*“O sábio não é o homem que fornece as respostas
verdadeiras; é o que formula as perguntas verdadeiras”.*
Lévi-Strauss

A Deus,

Por ter me dado as condições físicas e espirituais
para que eu chegasse até aqui.

*“Nunca diga a Deus que você tem um grande
problema. Diga a seu problema que você tem um
grande Deus, que tudo fará por você”.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela oportunidade e acolhida.

Aos professores do Laboratório de Química Orgânica, pelos conselhos, amizade e conhecimentos transmitidos no decorrer desse trabalho.

À Izabel Cristina Casanova Turatti e ao José Carlos Tomáz, pela ajuda, sugestões e discussões, imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Química Orgânica, pela prontidão em ajudar.

Aos atenciosos funcionários da pós-graduação.

À Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Vieira, pelo material vegetal fornecido.

Ao Prof. Dr. Roberto Lourenço Esteves, pela identificação botânica.

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

A todos os amigos da Q.O., que fizeram do laboratório um lugar tão especial. Agradeço pela ajuda e pelos bons momentos...

"O sorriso enriquece os recebedores sem empobrecer os doadores". Mário Quintana.

A toda a minha família, pelo apoio e confiança.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Àqueles que aqui não citei, mas que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

A todos, o meu muito obrigada!

*“Vencer não é não cometer erros e falhas,
mas reconhecer nossos limites e corrigir
nossas rotas. Vencer é não desistir.”*

Augusto Cury

RESUMO

FERREIRA, F.P. **Análises químicas qualitativas e quantitativas de duas espécies de *Mikania*: *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip.** 2008. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Mikania glomerata Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip, (Asteraceae, Eupatorieae, Mikaniinae), popularmente conhecidas como “guaco”, têm sido muito estudadas devido aos empregos medicinais das mesmas. São usadas para o tratamento da febre, reumatismo, gripe e doenças do trato respiratório. As monografias de ambas espécies encontram-se na Farmacopéia Brasileira. *M. laevigata* muitas vezes é confundida com *M. glomerata*, sendo comercializada como tal, ocorrendo principalmente no sul do país, onde este vegetal tem sua maior área de dispersão. Apesar de seu grande uso medicinal, sua fitoquímica clássica ainda tem se mostrado pouco estudada. Foi proposto neste trabalho o estudo fitoquímico das folhas secas de *M. laevigata*, sendo isoladas e identificadas por técnicas espectroscópicas as substâncias lupeol, taraxerol, cumarina, ácido *orto*-[(5'-hidroxi)-*cis*-cinamoila]-*trans*-cinâmico, siringaldeído, *trans*-melilotosido, *cis*-melilotosido, 3,5-dicafeoilquinato de metila, 3,3',5 - triidroxí - 4',6,7- trimetoxiflavona, 3-O- β -D-glicosil-patuletina, 3-O- β -D-glicosil-quercetina, 3-O- β -D-glicosil-caempferol, adenosina, *ent*-3 α -O- β -D-glicopiranosídeo, 16 α ,17-diidroxicaurano, e ácido 2 β -[[3-O-(3-hidroxi-1-oxo-3-fenilpropil)-2-(3- metil-1- butiriloxi) - 4- O-(α -L-ramnopiranosil)- β - D-glicopiranosil] oxi]-13,15 α -diidroxí-19-*nor*caur-16-*en*-18-óico. Além desses, identificou-se por GC-MS as substâncias ácido beierenóico, ácido caurenóico, óxido do cariofileno, espatulenol, diidrocumarina, e o acetato de lupeol. Foi proposta também a avaliação química dos extratos da lavagem foliar de *M. glomerata* e *M. laevigata*. A análise qualitativa desses extratos nos permitiu identificar como substâncias majoritárias, cumarina e lupeol, em *M. laevigata*, e lupeol e uma substância não identificada em *M. glomerata*. A padronização do método analítico em GC-MS permitiu a diferenciação das duas espécies, sendo utilizadas amostras de folhas de “guaco” de diversas regiões do país, e proposta suas identidades.

Palavras-chave: *Mikania glomerata*, *Mikania laevigata*, guaco.

ABSTRACT

FERREIRA, F.P. **Qualitative and quantitative chemical analysis of two species of *Mikania*: *Mikania glomerata* Sprengel and *Mikania laevigata* Schultz Bip.** 2008. Dissertacion (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Mikania glomerata Sprengel and *Mikania laevigata* Schultz Bip, (Asteraceae, Eupatorieae, Mikaniinae), commonly known as “guaco”, have been studied because of their medicinal activities. They are used to treat fever, rheumatism, flu and respiratory tract diseases. The monographies of both species are found in Brazilian Pharmacopoeia. For many times, *M. laevigata* is confused with *M. glomerata*, and it has been sold as the last. This occurs mainly at the south of this country, where this plant has been found. In spite of the important medicinal uses from *M. laevigata*, the literature has few studies about its phytochemistry. In this work, the phytochemical study from the dried leaves of *M. laevigata* was proposed and the compounds lupeol, taraxerol, coumarin, *orto*-[(5'-hydroxy)-*cis*-cinnamoyl]-*trans*-cinnamic acid, syringaldehyde, *trans*-melilotoside, *cis*-melilotoside, methyl 3,5-di-*O*-caffeoyl quinate, 3,3',5-trihydroxy-4',6,7-trimethoxyflavone, patuletin 3-*O*- β -D-glucopyranoside, quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside, kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside, adenosine, *ent*-kaurane-3 α ,16 β ,17 triol 3-*O*- β -D-glucopyranoside and 19-*norkaur*-16-ene-18-oic acid, 2 β -[[3-*O*-(3-hydroxy -1-oxo -3 -phenylpropyl) - 2 - (3- methyl - 1- oxobutyl - 4 - O - (α - L-ramnopyranosyl) - β - D-glucopyranosyl]oxy]-13,15 α -hidroxy were isolated and identified by spectroscopic methods. The compounds beyerenoic acid, kaurenoic acid, caryophyllene oxide, spathulenol dihydrocoumarin, and lupeol acetate were also identified, by GC-MS. It was proposed the chemical evaluation from the leaves rinse extracts of *M. glomerata* and *M. laevigata* too. In the quantitative analysis of these extracts, coumarin and lupeol were identified as the main compounds of *M. laevigata* and lupeol and an unidentified compound of *M. glomerata*. The standardization of the analytical method by GC-MS allowed to differentiate one species from the other. Thus, leaves of “guaco” from many places of this country were used, and their identities were proposed.

Keywords: *Mikania glomerata*, *Mikania laevigata*, guaco.

SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM *M. laevigata*.

TRITERPENOS

Substância 1

Substância 9

Substância 2

DITERPENOS

Substância 4

Substância 5

Substância 20

Substância 21

SESQUITERPENOS

Substância 6

Substância 7

CUMARINAS

Substância 3

Substância 8

FLAVONÓIDES

Substância 15

Substância 16

Substância 17

Substância 18

DERIVADOS FENILPROPANÓICOS

Substância 10

Substância 12

Substância 13

Substância 14

DERIVADO FENÓLICO

Substância 11

BASE NITROGENADA

Substância 19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ramo com inflorescência de <i>M. glomerata</i> . (Fonte: Plantas Medicinales Iberoamericanas, 1995)	07
Figura 2.	Ramo com inflorescência de <i>M. laevigata</i> . (Fonte: Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul, 1989.).....	09
Figura 3.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3/TMS) em 400MHz do extrato da lavagem foliar de <i>M. laevigata</i>	29
Figura 4.	Cromatograma da análise em GC-MS do extrato da lavagem foliar de <i>M. laevigata</i> . Condições de análise C7, item 3.2.2.4.	31
Figura 5.	Cromatograma da análise em GC-MS da fração hexânica do extrato etanólico-95% de <i>M. laevigata</i> . Condições de análise C6, item 3.2.2.4.	
Figura 6.	(a) Espectro de Massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 11,00\text{min}$ (b) MS obtido da biblioteca Willey (diidrocurmarina).....	33
Figura 7.	(a) Espectro de massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 13,16\text{min}$ (b) MS obtido da biblioteca Willey (espatulenol).....	33
Figura 8.	(a) Espectro de massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 13,26\text{min}$ (b) MS obtido da biblioteca Willey (óxido do cariofileno)	34
Figura 9.	(a) Espectro de massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 27,72\text{min}$ (b) MS obtido de padrão do laboratório(ácido beierenóico).....	34
Figura 10.	(a) Espectro de massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 29,69\text{min}$ (b) MS obtido de padrão do laboratório (ácido caurenóico).	34
Figura 11.	(a) Espectro de massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 46,13\text{min}$ (b) MS obtido de padrão do laboratório (lupeol).....	35
Figura 12.	(a) Espectro de massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 48,96\text{min}$ (b) MS obtido de padrão do laboratório (acetato de lupeol).....	35
Figura 13.	Espectro de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$) em 400MHz da fração DCM do extrato etanólico-95% de <i>M. laevigata</i>	36
Figura 14.	Cromatograma em HPLC (270nm) da fração DCM do extrato etanólico de <i>M. laevigata</i> . O pico majoritário com $t_R 11,9\text{min}$. refere-se a cumarina, confirmado pela injeção de padrão sob as mesmas condições de análise (C1, item 3.2.2.3).	36
Figura 15.	Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6/\text{TMS}$) em 400MHz da fração AcOEt do extrato etanólico-95% de <i>M. laevigata</i>	38

Figura 16. (a) Cromatograma em HPLC (255nm) da fração 50-53 proveniente da fração AcOEt do extrato etanólico de <i>M. laevigata</i> , obtido utilizando coluna ODS preparativa, condição C3, item 3.2.2.3. O pico com $t_R=9,9\text{min.}$ refere-se à substância 19 , o pico com $t_R=33,6\text{min.}$ refere-se à substância 16 e o pico com $t_R=39,3\text{min.}$ refere-se à substância 17 . (b) Cromatograma em HPLC (318nm) da fração 54-57 proveniente da fração AcOEt do extrato etanólico de <i>M. laevigata</i> , obtido utilizando coluna ODS preparativa, condição C5, item 3.2.2.3. O pico com $t_R=32,9\text{min.}$ refere-se à mistura contendo as substâncias 16 e 18 e o pico com $t_R=34,6\text{min.}$ refere-se à substância 14 .	40
Figura 17. Espectro de Massas obtido por GC-MS ($t_R = 27,91\text{min}$) e comparação com o Espectro de Massas obtido por GC-MS de um padrão do laboratório, apresentando 94% de similaridade.	41
Figura 18. Espectro de RMN DE ^1H da substância 1 – Lupeol (400MHz; $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$)	42
Figura 19. Espectro de Massas obtido por GC-MS ($t_R = 26,67\text{min}$) e comparação com o Espectro de Massas obtido por GC-MS de um padrão do laboratório, apresentando 91% de similaridade.	43
Figura 20. Espectro de RMN DE ^1H da substância 2 – Taraxerol (400MHz; $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$)	44
Figura 21. Padrão de substituição do anel aromático da substância 3 .	45
Figura 22. Presença de dupla ligação com configuração <i>cis</i> , na substância 3 .	45
Figura 23. Espectro de Massas obtido por GC-MS ($t_R = 6,48\text{min}$) e comparação com o Espectro de Massas obtido por GC-MS da biblioteca Willey, apresentando 97% de similaridade.	46
Figura 24. Espectro de RMN DE ^1H da substância 3 – Cumarina (400MHz; $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$)	47
Figura 25. Proposta descartada, devido a correlação dos hidrogênios H_3 e H_4 , os quais possuem configuração <i>cis</i> , com um carbono $\delta 160,3$, característico de função éster.	49
Figura 26. Estrutura do ácido <i>trans</i> -o-cumárico.	49
Figura 27. Estrutura da cumarina.	49
Figura 28. Espectro de RMN DE ^1H da substância 10 – ácido <i>orto</i> -[(5'-hidroxi)- <i>cis</i> -cinamoila]- <i>trans</i> -cinâmico (400MHz; $\text{DMSO-d}_6\text{-TMS}$)	51
Figura 29. Espectros de RMN DE $^{13}\text{C}/\text{DEPT } 135^\circ$ da substância 10 – ácido <i>orto</i> -[(5'-hidroxi)- <i>cis</i> -cinamoila]- <i>trans</i> -cinâmico (100MHz; $\text{DMSO-d}_6\text{-TMS}$)	52
Figura 30. Mapa de contorno do HMQC da substância 10 - ácido <i>orto</i> -[(5'-hidroxi)- <i>cis</i> -cinamoila]- <i>trans</i> -cinâmico (100MHz/400MHz; $\text{DMSO-d}_6\text{-TMS}$)	53
Figura 31. Mapa de contorno do HMBC da substância 10 - ácido <i>orto</i> -[(5'-hidroxi)- <i>cis</i> -cinamoila]- <i>trans</i> -cinâmico (100MHz/400MHz; $\text{DMSO-d}_6\text{-TMS}$)	54
Figura 32. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo da substância 10 - ácido <i>orto</i> -[(5'-hidroxi)- <i>cis</i> -cinamoila]- <i>trans</i> -cinâmico	55
Figura 33. Espectro de RMN DE ^1H da substância 11 – 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído (400MHz; $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$)	57
Figura 34. Espectro de RMN DE ^1H da substância 12 – <i>trans</i> -melilotosido (400MHz, $\text{DMSO-d}_6\text{-TMS}$)	60
Figura 35. Expansão do espectro de RMN DE ^1H da substância 12 - <i>trans</i> -melilotosido (400MHz, $\text{DMSO-d}_6\text{-TMS}$)	61
Figura 36. Espectros de RMN DE $^{13}\text{C}/\text{DEPT } 135^\circ$ da substância 12 - <i>trans</i> -melilotosido (100MHz, $\text{DMSO-d}_6\text{-TMS}$)	62

Figura 37. Mapa de contorno do HMQC da substância 12 - <i>trans</i> -melilotosido (100MHz/400MHz, DMSO-d ₆ -TMS).....	63
Figura 38. Mapa de contorno do HMBC da substância 12 - <i>trans</i> -melilotosido (100MHz/400MHz, DMSO-d ₆ -TMS).....	64
Figura 39. Espectro de RMN DE ¹ H das substâncias 12 e 13 – <i>trans</i> -melilotosido e <i>cis</i> -melilotosido (400MHz, DMSO-d ₆ -TMS).....	67
Figura 40. Expansão do espectro de RMN DE ¹ H das substâncias 12 e 13 – <i>trans</i> -melilotosido e <i>cis</i> -melilotosido (400MHz, DMSO-d ₆ -TMS).....	68
Figura 41. Mapa de contorno do HMBC das substâncias 12 e 13 – <i>trans</i> -melilotosido e <i>cis</i> -melilotosido. (125/500MHz, DMSO-d ₆ -TMS).....	69
Figura 42. Espectro de RMN DE ¹ H da substância 14 – 3,5-dicafeoilquinato de metila. (500MHz; CD ₃ OD-TMS).....	72
Figura 43. Expansões do espectro de RMN DE ¹ H da substância 14 – 3,5-dicafeoilquinato de metila (500MHz; CD ₃ OD-TMS).....	73
Figura 44. Mapa de contorno do HMBC da substância 14 – 3,5-dicafeoilquinato de metila (500/125MHz; CD ₃ OD-TMS).....	74
Figura 45. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo (ESI-MS) da substância 14 – 3,5-dicafeoilquinato de metila.....	75
Figura 46. Proposta descartada, devido a correlação observada, nos mapas de contorno do HMBC, entre o hidrogênio δ6,89, s; e a carbonila em δ176,3.....	77
Figura 47. Propostas estruturais para o anel A.....	77
Figura 48. Padrão de substituição do anel B.....	78
Figura 49. Propostas estruturais para o anel B.....	78
Figura 50. Proposta 1, descartada devido a existência da correlação entre H-6' e o carbono metoxilado δ149,6.....	78
Figura 51. Espectro de RMN DE ¹ H da substância 15 – 3,3',5 – triidroxi – 4',6,7-trimetoxiflavona (300MHz, DMSO-d ₆ -TMS).....	80
Figura 52. Espectros de RMN DE ¹³ C/DEPT 135° da substância 15 – 3,3',5 – triidroxi – 4',6,7- trimetoxiflavona (75MHz, DMSO-d ₆ -TMS).....	81
Figura 53. Mapa de contorno do HMQC da substância 15 – 3,3',5 – triidroxi – 4',6,7-trimetoxiflavona (75MHz/300MHz, DMSO-d ₆ -TMS).....	82
Figura 54. Mapa de contorno do HMBC da substância 15 – 3,3',5 – triidroxi – 4',6,7-trimetoxiflavona (75MHz/300MHz, DMSO-d ₆ -TMS).....	83
Figura 55. (a) Substituição na posição 6 e (b) Substituição na posição 8.	85
Figura 56. (a) Deslocamentos químicos dos carbonos do anel A de um flavonóide metoxilado na posição 6; (b) Deslocamentos químicos dos carbonos do anel A de um flavonóide metoxilado na posição 8 (AGRAWAL, 1989); (c) Deslocamentos químicos dos carbonos do anel A da amostra, e suas correlações nos mapas de contorno do HMBC, nas quais os inícios das setas indicam os hidrogênios, e as pontas das setas indicam os carbonos.....	85
Figura 57. Padrão de substituição proposto para o anel B.....	86
Figura 58. Deslocamentos químicos dos carbonos do anel B da amostra, e suas correlações nos mapas de contorno do HMBC, nas quais os inícios das setas indicam os hidrogênios, e as pontas das setas indicam os carbonos.....	86
Figura 59. Espectro de RMN de ¹ H da substância 16 – 3-O-β-D-glicosil-patuletina (CD ₃ OD-TMS – 500MHz).....	88
Figura 60. Espectros de RMN de ¹³ C/ DEPT 135° da substância 16 –3-O-β-D-glicosil-patuletina (CD ₃ OD-TMS – 125MHz).....	89
Figura 61. Mapa de contorno do HMQC da substância 16 –3-O-β-D-glicosil-patuletina. (125/500MHz, CD ₃ OD-TMS).....	90

Figura 62. Mapa de contorno do HMBC da substância 16 –3-O-β-D-glicosil-patuletina. (125/500MHz, CD ₃ OD-TMS).	91
Figura 63. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo (ESI-MS) da substância 16 –3-O-β-D-glicosil-patuletina.	92
Figura 64. Espectro de RMN de ¹ H das substâncias 16 e 17 –3-O-β-D-glicosil-quercetina (CD ₃ OD-TMS – 500MHz).	95
Figura 65. Mapa de contorno do HMBC das substâncias 16 e 17 –3-O-β-D-quercetina glicosil (125/500MHz, CD ₃ OD-TMS).	96
Figura 66. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo (ESI-MS) das substâncias 16 e 17 –3-O-β-D-glicosil-patuletina e 3-O-β-D-glicosil-quercetina.	97
Figura 67. Espectro de RMN DE ¹ H da substância 18 –3-O-β-D-glicosil-caempferol (500MHz; CD ₃ OD-TMS).	100
Figura 68. Espectro de RMN de ¹³ C da substância 18 - 3-O-β-D-glicosil-caempferol (CD ₃ OD-TMS – 125MHz).	101
Figura 69. Mapas de contorno do HMBC da substância 18 - 3-O-β-D-glicosil-caempferol (125/500MHz, CD ₃ OD-TMS).	102
Figura 70. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo (ESI-MS) da substância 18 –3-O-β-D-glicosil-caempferol.	103
Figura 71. Espectro de RMN DE ¹ H da substância 19 – adenosina (500MHz; CD ₃ OD/D ₂ O-TMS).	105
Figura 72. Expansões do espectro de RMN DE ¹ H da substância 19 – adenosina (500MHz; CD ₃ OD/D ₂ O-TMS).	106
Figura 73. Espectro de RMN DE ¹³ C/DEPT 135° da substância 19 – adenosina (125MHz; CD ₃ OD/D ₂ O-TMS).	107
Figura 74. Mapa de contorno do HMQC da substância 19 – adenosina. (125/500MHz, CD ₃ OD/D ₂ O-TMS).	108
Figura 75. Mapa de contorno do HMBC da substância 19 – adenosina. (125/500MHz, CD ₃ OD/D ₂ O-TMS).	109
Figura 76. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Positivo (ESI-MS) da substância 19 – adenosina.	110
Figura 77. Proposta da estrutura parcial da substância 20 .	112
Figura 78. Espectro de RMN DE ¹ H da substância 20 – <i>ent</i> -3α-O-β-D-glicopiranosídeo,16α,17-diidroxicaurano (500MHz, PIRIDINA-d ₅).	115
Figura 79. Expansões do RMN DE ¹ H da substância 20 – <i>ent</i> -3α-O-β-D-glicopiranosídeo,16α,17-diidroxicaurano (500MHz, PIRIDINA-d ₅).	116
Figura 80. Espectros de RMN DE ¹³ C/DEPT 135° da substância 20 – <i>ent</i> -3α-O-β-D-glicopiranosídeo,16α,17-diidroxicaurano (125MHz, PIRIDINA-d ₅).	117
Figura 81. Mapas de contorno do HMQC da substância 20 – <i>ent</i> -3α-O-β-D-glicopiranosídeo,16α,17-diidroxicaurano (125/500MHz, PIRIDINA-d ₅).	118
Figura 82. Mapa de contorno do HMBC da substância 20 – <i>ent</i> -3α-O-β-D-glicopiranosídeo, 16 α, 17- diidroxicaurano (125MHz/ 500MHz, PIRIDINA-d ₅).	119
Figura 83. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo (ESI-MS) da substância 20 - <i>ent</i> -3α-O-β-D-glicopiranosídeo,16α,17-diidroxicaurano.	120
Figura 84. Proposta estrutural para a esterificação do carbono δ75,7; pertencente à glicose, a partir de correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC.	123

Figura 85. Proposta estrutural para a esterificação do carbono $\delta 73,4$; pertencente à glicose, a partir de correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC.....	123
Figura 86. Proposta estrutural para a subunidade glicosídica, a partir de correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC e HMQC.....	124
Figura 87. Deslocamentos químicos dos carbonos de um diterpeno com esqueleto caurano pouco funcionalizado.....	124
Figura 88. Proposta estrutural para o anel D do diterpeno, a partir de correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC. Os inícios das setas representam os hidrogênios, e as pontas das setas representam os carbonos.....	125
Figura 89. Representação do anel A, do esqueleto diterpênico proposto, no qual as setas indicam as constantes de acoplamento observadas no espectro de RMN de ^1H	126
Figura 90. Espectro de RMN de ^1H da substância 21 . (CD_3OD -TMS, 500MHz).....	130
Figura 91. Expansão I do espectro de RMN de ^1H da substância 21 . (500MHz, CD_3OD -TMS).....	131
Figura 92. Expansão II do espectro de RMN de ^1H da substância 21 . (500MHz, CD_3OD -TMS).....	132
Figura 93. Espectros de TOCSY unidimensional, da substância 21 , sendo irradiados os hidrogênios $\delta 4,7$ e $\delta 1,25$, respectivamente (500MHz - CD_3OD -TMS).....	133
Figura 94. Espectros de RMN de ^{13}C /DEPT 135° da substância 21 . (CD_3OD -TMS, 125MHz).....	134
Figura 95. Mapa de contorno do HMQC da substância 21 . (125/500MHz, CD_3OD -TMS).....	135
Figura 96. Mapa de contorno do HMBC da substância 21 . (125/500MHz, CD_3OD -TMS).....	136
Figura 97. Expansões dos mapas de contorno do HMBC da substância 21 . (125/500MHz, CD_3OD -TMS).....	137
Figura 98. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo (ESI-MS) da substância 21	138
Figura 99. Cromatograma obtido em GC-MS, mostrando a substância com t_R 20,5min (condição C7, item 3.2.2.4), obtida do extrato da lavagem foliar de <i>M. glomerata</i> , isolada.....	139
Figura 100. Cromatograma I obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de <i>M. glomerata</i> (Condição C8, item 3.2.2.4) a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Dourados.....	140
Figura 101. Cromatograma II obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de <i>M. glomerata</i> (Condição C8) a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Dourados.....	140
Figura 102. Cromatograma III obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de <i>M. glomerata</i> (Condição C8, item 3.2.2.4) a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Dourados.....	140
Figura 103. Cromatograma I obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de <i>M. laevigata</i> (Condição C8, item 3.2.2.4) a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Dourados.....	141
Figura 104. Cromatograma II obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de <i>M. laevigata</i> (Condição C8, item 3.2.2.4) a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Dourados.....	141

Figura 105. Cromatograma III obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de <i>M. laevigata</i> (Condição C8, item 3.2.2.4) a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Dourados.....	141
Figura 106. Cromatograma obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de <i>M. laevigata</i> (Condição C8, item 3.2.2.4), a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Ribeirão Preto.....	142
Figura 107. Cromatograma obtido por GC-MS da solução padrão de lupeol (Condição 7, item 3.2.2.4).....	143
Figura 108. Curva de calibração do lupeol.....	143
Figura 109. Cromatograma obtido por GC-MS da solução padrão de cumarina (Condição C7, item 3.2.2.4.....	144
Figura 110. Curva de calibração da cumarina.....	144
Figura 111. <i>M. laevigata</i> coletada em janeiro de 2006.....	147
Figura 112. <i>M. laevigata</i> coletada em julho de 2006.....	148
Figura 113. <i>M. glomerata</i> coletada em janeiro de 2007.....	148
Figura 114. <i>M. glomerata</i> coletada em julho de 2006.....	148
Figura 115. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 1 (Paraná).....	150
Figura 116. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 2 (Santa Catarina).	150
Figura 117. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 3 (São Paulo).....	151
Figura 118. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 4 (São Paulo).....	151
Figura 119. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 5 (Mato Grosso do Sul).....	151
Figura 120. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 6 (Mato Grosso do Sul).	152
Figura 121. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 7 (Minas Gerais).....	152
Figura 122. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 8 (Minas Gerais).....	152
Figura 123. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 9 (Minas Gerais).....	153
Figura 124. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 10 (Minas Gerais).	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Mikania</i> endêmicas no Brasil e classes de metabólitos secundários isolados.....	06
Tabela 2. Metabólitos secundários isolados de <i>M. glomerata</i> Sprengel.....	07
Tabela 3. Metabólitos secundários isolados de <i>M. laevigata</i> Schultz Bip.....	10
Tabela 4. Parâmetros utilizados na padronização do método de extração das folhas de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i>	27
Tabela 5. Frações obtidas de CC do extrato da lavagem foliar de <i>M. laevigata</i>	
Tabela 6. Frações obtidas de CC (Sephadex LH-20) da fração DCM.....	37
Tabela 7. Frações obtidas de CC da fração em AcOEt de <i>M. laevigata</i>	38
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 -TMS, 400MHz) da substância 2 e comparação com dados obtidos da literatura.....	43
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 -TMS, 400MHz) da substância 3 e comparação com dados obtidos da literatura.....	46
Tabela 10. Dados de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6 -TMS, 100MHz) de parte da substância 10 e comparação com ácido <i>trans</i> -o-cumárico obtido da literatura.....	49
Tabela 11. Dados de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6 -TMS, 100MHz) de parte da substância 10 e comparação com cumarina obtido da literatura.....	49
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO-d_6 -TMS, 400MHz e 100MHz) e dos mapas de contorno do HMQC e HMBC da substância 10	50
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 -TMS, 400MHz) da substância 11 e comparação com dados de RMN de ^1H (CDCl_3 -TMS) de 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído obtidos da literatura.....	56
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 -TMS, 400MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância 12 , comparados com dados obtidos da literatura.....	59
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 -TMS, 400MHz) da substância 13 , comparados com dados obtidos da literatura.....	66
Tabela 16. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD -TMS, 500MHz - $\delta(\text{ppm})$; mult; $J(\text{Hz})$) da substância 14 , e comparação com substâncias similares, da literatura.....	71
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H (300MHz), e de ^{13}C (75MHz), e as correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC (DMSO-d_6 -TMS) obtidos para a substância 15 , e comparação com dados obtidos da literatura....	79
Tabela 18. Correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC, relacionadas ao anel A.	85
Tabela 19. Correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC, relacionadas ao anel B.....	86
Tabela 20. Dados de RMN de ^1H (500MHz), e de ^{13}C (125MHz), e as correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC (CD_3OD -TMS) obtidos para a substância 16 , e comparação com dados obtidos da literatura....	87
Tabela 21. Dados de RMN de ^1H (500MHz), e de ^{13}C (125MHz), e as correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC (CD_3OD -TMS) obtidos para a substância 17 , e comparação com dados obtidos da literatura....	94

Tabela 22. Dados de RMN de ^1H (500MHz), e de ^{13}C (125MHz), e as correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$) obtidos para a substância 18 , e comparação com dados obtidos da literatura...	99
Tabela 23. Dados de RMN de ^1H (500MHz), e de ^{13}C (125MHz), e as correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC ($\text{CD}_3\text{OD/D}_2\text{O-TMS}$) obtidos para a substância 19 , e comparação com dados obtidos da literatura...	104
Tabela 24. Dados espectroscópicos obtidos da substância 20 .	113
Tabela 25. Comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos da estrutura 20 proposta e algumas estruturas similares encontradas na literatura.	114
Tabela 26. Comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos dos diterpenos $15\alpha\text{-OH}$ e $15\beta\text{-OH}$, obtidos da literatura, e os dados da amostra.	127
Tabela 27. Dados espectroscópicos obtidos da substância 21 .	128
Tabela 28. Comparação dos δC da substância 21 e substâncias relacionadas da literatura.	129
Tabela 29. Soluções padrão de lupeol utilizadas na curva de calibração	143
Tabela 30. Soluções padrão de cumarina utilizadas na curva de calibração	145
Tabela 31. Dados obtidos na recuperação de cumarina e lupeol.	145
Tabela 32. Concentrações de cumarina e lupeol obtidas nos extratos da lavagem foliar de <i>M. laevigata</i> intradia.	146
Tabela 33. Concentrações de cumarina e lupeol obtidas nos extratos da lavagem foliar de <i>M. laevigata</i> intradia.	146
Tabela 34. Concentrações de cumarina e lupeol obtidas nos extratos da lavagem foliar de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> interdida.	147
Tabela 35. Concentrações de cumarina e lupeol obtidas nos extratos da lavagem foliar de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> em diferentes épocas do ano.	149
Tabela 36. Quantificação de cumarina e lupeol em amostras de “guaco” de diferentes regiões do Brasil.	150

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt: Acetato de Etila
CC: Cromatografia em coluna
CCDC: Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl₃: Clorofórmio deuterado
CD₃OD: Metanol deuterado
HMBC: “Heteronuclear multiple bond coherence”
HMQC: “Heteronuclear multiple quantum coherence”
HPLC: “High performance liquid chromatography”
HPLC-MS: “High performance liquid chromatography – Mass spectrometry”
GC-FID: “Gas chromatography-flame ionization detector”
GC-MS: “Gas chromatography-mass spectrometry”
DCM: Diclorometano
DMSO-d₆: dimetilsulfóxido deuterado
d: dubleto
dd: duplo-dubleto
ESI-MS: “Electrospray ionization – Mass spectrometry”
FM: Fase móvel
IK: Índice de Kovats’
J: Constante de acoplamento (Hertz)
m: multipletto
mult: multiplicidade
MGLF: Extrato da lavagem foliar de *M. glomerata*
MLLF: Extrato da lavagem foliar de *M. laevigata*
MeOH: Metanol
NP-PEG: Reagente Natural Product – polietilenoglicol
RMN de ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
t: tripleto
td: triplo-dubleto
TMS: tetrametilsilano
TOCSY: “Totally correlated spectroscopy”
t_R: Tempo de Retenção
UV: Ultravioleta
δ: Deslocamento químico (ppm)

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Substâncias identificadas em *M. laevigata*

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 FAMÍLIA ASTERACEAE	03
1.2 TRIBO, SUBTRIBO E GÊNERO	
(Eupatorieae, Mikaniinae, <i>Mikania</i>)	03
1.2.1 ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE ESPÉCIES DE	
<i>Mikania</i> sp ENDÊMICAS NO BRASIL	04
1.2.2 ESPÉCIES <i>Mikania glomerata</i> Sprengel	
<i>e Mikania laevigata</i> Schultz Bip	07
1.2.2.1 Atividades biológicas	10
1.2.2.2 Aspectos analíticos	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 MATERIAIS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS	17
3.2 METODOLOGIA	20
3.2.1 EXTRAÇÕES	20
3.2.1.1 Lavagem foliar com diclorometano	20
3.2.1.2 Percolação	21
3.2.1.3 Extração líquido-líquido	21
3.2.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	23
3.2.2.1 Cromatografia em camada delgada	23

3.2.2.2	Cromatografia em coluna.....	24
3.2.2.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	24
3.2.2.4	Cromatografia gasosa acoplada a	
	Espectrômetro de Massas (GC-MS).....	25
3.2.3	ESPECTROMETRIA DE MASSAS – IONIZAÇÃO POR	
	“ELECTROSPRAY”.....	27
3.2.4	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA	
	MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1	FITOQUÍMICA DE <i>M. laevigata</i> :.....	29
4.1.1	VISÃO GERAL DOS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	
	E/OU IDENTIFICADOS DE <i>M. laevigata</i> NESTE ESTUDO.....	29
4.1.2	ANÁLISE E PURIFICAÇÃO DO EXTRATO DA	
	LAVAGEM FOLIAR.....	29
4.1.3	FRAÇÃO HEXÂNICA PROVENIENTE DO	
	EXTRATO ETANÓLICO.....	32
4.1.4	FRAÇÃO DICLOROMETÂNICA	
	PROVENIENTE DO EXTRATO ETANÓLICO.....	35
4.1.4.1	Fração 13-14.....	37
4.1.5	FRAÇÃO EM ACETATO DE ETILA	
	PROVENIENTE DO EXTRATO ETANÓLICO.....	37
4.1.6	ANÁLISES ESPECTRAIS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	41
4.1.6.1	Substância 1.....	41
4.1.6.2	Substância 2.....	43
4.1.6.3	Substância 3.....	45
4.1.6.4	Substância 10.....	48
4.1.6.5	Substância 11.....	56
4.1.6.6	Substância 12.....	58
4.1.6.7	Substâncias 12 e 13.....	65
4.1.6.8	Substância 14.....	70
4.1.6.9	Substância 15.....	76
4.1.6.10	Substância 16.....	84
4.1.6.11	Substância 16 e 17.....	93

4.1.6.12 Substância 18	98
4.1.6.13 Substância 19	104
4.1.6.14 Substância 20	111
4.1.6.15 Substância 21	121
4.2 ANÁLISES DOS EXTRATOS DA LAVAGEM FOLIAR DE <i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i> POR GC-MS	139
4.2.1 ANÁLISES QUALITATIVAS	139
4.2.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS	142
4.2.2.1 Linearidade	142
4.2.2.2 Recuperação	145
4.2.2.3 Repetibilidade	146
4.2.2.4 Sazonalidade	147
4.2.2.5 Diferenciação entre as espécies	149
5. CONCLUSÕES	154
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156

1 INTRODUÇÃO

A OMS (Organização Mundial de Saúde) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (JUNIOR & PINTO, 2005).

O comércio de plantas medicinais e fitoterápicos vêm crescendo em todo o mundo. Vários fatores têm contribuído para tal expansão, como o alto custo dos medicamentos industrializados ou o próprio modismo (BRANDÃO, FREIRE & SOARES, 1998). O mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de 14 bilhões de dólares, representando cerca de 5% do mercado mundial de produtos farmacêuticos (CARVALHO et al, 2007) sendo que mais de 80% da população em países desenvolvidos fazem uso da fitoterapia para os cuidados primários com a saúde (HOSTETTMANN & MARSTON, 2002).

No Brasil, esse mercado tem crescido numa taxa de 15% ao ano, valor este elevado quando comparado ao crescimento anual do mercado de medicamentos sintéticos (3-4% ao ano) (SIMÕES et al, 2004). Isso pode ser explicado por vários fatores: *a*) a magnitude da biodiversidade brasileira, possuindo a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES et al, 2004); *b*) a histórica utilização popular de plantas medicinais, com fins terapêuticos e rituais religiosos, herança cultural de índios brasileiros e seitas afro-brasileiras; *c*) o fácil acesso da população mais carente às plantas medicinais, que muitas vezes são tidas como única opção de tratamento.

Apesar desse crescimento considerável no Brasil, o mercado mundial de fitoterápicos vem mostrando um crescimento maior em países desenvolvidos. Tal fato pode ser atribuído a tecnologia farmacêutica empregada na área de fitoterápicos, mostrando-se muito mais eficaz em países desenvolvidos. O controle de qualidade está embasado em modernas tecnologias de identificação, determinação e quantificação de constituintes químicos, o que contribui para a comercialização de um produto seguro e com efeito reprodutível. Ainda, são realizados estudos farmacológicos e toxicológicos, evidenciando o possível mecanismo de ação envolvido. Os estudos de farmacologia pré-clínica e clínica,

assim como a avaliação toxicológica são feitos de acordo com as normas que regem os processos de validação de fármacos puros (YUNES, PEDROSA & FILHO, 2001).

Preocupados com tais aspectos, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) formulou várias regulamentações, estando em vigor a Resolução RDC ANVISA 48/2004, a qual dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. A partir desta regulamentação, os fitoterápicos apenas são registrados após a verificação de vários aspectos, entre eles a comprovação de suas atividades farmacológicas, com ensaios pré-clínicos e clínicos, avaliação de sua toxicidade, comprovando-se a ausência de grupos ou substâncias químicas tóxicas, ou presença em níveis comprovadamente seguros (ANVISA, 2004). Atualmente há cerca de 400 fitoterápicos registrados, sendo estes provenientes de 60 plantas medicinais. Destas, apenas 10 são nativas, a saber: aroeira (*Schinus terebinthifolius*), cactus (*Cereus brasiliensis*), carqueja (*Baccharis trimera*), catuaba (*Amenopaegma arvense*), espinheira-santa (*Maytenus illicifolia*), erva-baleeira (*Cordia verbenácea*), ginseng brasileiro (*Pffafia glomerata*), guaco (*Mikania glomerata*), guaraná (*Paullinia cupana*), hortelã (*Mentha crispa*) (ANVISA, 2007).

Porém, no Brasil, a maioria das plantas medicinais da flora nativa é consumida com embasamento somente em seu uso popular, cujas propriedades farmacológicas são propagadas por usuários ou comerciantes (JUNIOR & PINTO, 2005). Aproximadamente 70% da população utiliza produtos de venda não registrada para corrigir distúrbios de fácil percepção (SIMÕES et al, 2004). Além disso, vários estudos têm demonstrado que 50% dos fitoterápicos comercializados em nosso país apresentam irregularidades, entre elas, presença de matéria orgânica estranha, sujidades, e insetos, problemas de identificação botânica, teores de fitosubstâncias abaixo do especificado. Tudo isso contribui para a formação de um mercado não competitivo internacionalmente (SIMÕES et al, 2004).

O uso milenar das plantas medicinais tem revelado a importância da realização tanto do controle de qualidade para a comercialização de fitoterápicos, quanto do detalhado conhecimento científico dos seus constituintes químicos. Pesquisas têm mostrado que muitas dessas plantas, consagradas popularmente por suas ações terapêuticas, possuem substâncias potencialmente agressivas, devendo ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (JUNIOR & PINTO, 2005).

Asteraceae é uma das famílias de vegetais que contribuem com espécies valiosas como fitoterápicos, tais como *Calendula officinalis* (calêndula), *Cynara scolymus* (alcachofra), *Echinacea purpurea* (equinácea), *Matricaria recutita* (camomila), *Tanacetum parthenium* (tanaceto), *Mikania glomerata* (guaco), *Arnica montana* (arnica), presentes na

lista de registro simplificado de fitoterápicos (Resolução RE nº 89, ANVISA, 2004). Os vegetais objetos deste presente estudo pertencem a esta família.

1.1 FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae ou Compositae está amplamente distribuída por todo o mundo, contendo cerca de 1535 gêneros (NAKAJIMA & SEMIR, 2001) e 25.000 espécies (ALVARENGA et al, 2001). Representa cerca de 10% de toda a flora mundial (NAKAJIMA & SEMIR, 2001). Espécies dessa família podem ser encontradas tanto ao nível do mar quanto em regiões de elevada altitude, apesar de serem mais abundantes em regiões áridas do que nas florestas tropicais (BARROSO et al, 1991).

A família Asteraceae está representada, em sua maioria, por espécies herbáceas, anuais ou perenes, subarbustivas ou arbustivas e raramente por espécies arbóreas (BARROSO et al, 1991).

É conhecida por produzir metabólitos secundários como sesquiterpenos, monoterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonóides, cumarinas, benzofuranos, fenilpropanos, acetofenonas e poliacetilenos (EMERENCIANO et al, 1998).

Quanto ao local de origem das Compostas, muitos autores concordam ser a América do Sul, ao norte da região Andina, em épocas muito antigas (BARROSO et al, 1991).

Segundo a classificação de Bremer, está dividida em 4 subfamílias e 17 tribos. (ALVARENGA et al, 2001; EMERENCIANO et al, 2001).

1.2 TRIBO, SUBTRIBO E GÊNERO (Eupatorieae, Mikaniinae, *Mikania*)

A tribo Eupatorieae pertence a família Asteraceae, subfamília Asteroideae (ALVARENGA et al, 2001; EMERENCIANO et al, 2001). Possui cerca de 159 gêneros e 2000 espécies pantropicais (BARROSO et al, 1991).

O gênero *Mikania* Willdenow é o único pertencente à subtribo Mikaniinae, sendo recentemente subdividido em duas seções, baseado na natureza de suas inflorescências (HOLMES, 1995, 1996).

Este gênero possui aproximadamente 415 espécies (KING & ROBINSON, 1987) com distribuição tropical (MAFFEI et al, 1999). Está melhor representado na América do Sul, sendo amplamente distribuído no Brasil, onde aproximadamente 200 espécies têm sido descritas (RUAS & AGUIAR-PERECIN, 1997).

Muitas espécies de *Mikania* são empregadas na terapêutica popular. Entre elas estão aquelas conhecidas como “guaco”, cujos empregos medicinais referem-se a ações expectorantes, antirreumáticas, diaforéticas, antiespasmódicas e antiinflamatórias (ROQUE et al, 1988).

A análise fitoquímica de algumas espécies do gênero revelou a presença de monoterpenos, sesquiterpenos, tal como as lactonas sesquiterpênicas, diterpenos, triterpenos, cumarinas, derivados fenilpropanóides, flavonóides, benzenóides e esteróides.

1.2.1 ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE ESPÉCIES DE *Mikania* ENDÊMICAS NO BRASIL

Segundo King & Robinson, 1987, há 415 espécies de *Mikania* identificadas, sendo 143 espécies endêmicas no Brasil, ou seja, aproximadamente 34% das espécies de *Mikania* encontram-se exclusivamente no território nacional.

Uma busca no *Chemical Abstracts* (2008) revelou que dessas 143 espécies, apenas 25 têm algum estudo químico ou biológico, sendo essas: *Mikania additicia*, *M. alvimii*, *M. arrojadoi*, *M. belemii*, *M. campanulata*¹, *M. camporum*, *M. goyazensis*, *M. grazielae*, *M. hastato-cordata*, *M. hoehnei*, *M. involucrata*, *M. laevigata*, *M. lasiandrae*, *M. lindbergii*, *M. luetzelburgii*, *M. oblongifolia*, *M. obtusata*, *M. pohlii*, *M. pseudohoffmanniana*, *M. purpurascens*, *M. sericea*, *M. smilacina*, *M. stipulacea*, *M. triangularis*, *M. sessifolia*.

Os diterpenos ácido *ent*-caur-15-en-19-óico, isolado de *M. obtusata* (ALVES et al, 1995), e ácido *ent*-9 α -hidroxi-15 β -*E*-cinamoiloxi-16-cauren-19-óico, isolado de *M. stipulacea* e a lactona sesquiterpênica 8 β -hidroxizaluzanina D, com esqueleto guaianolido, isolada de *M. hoehnei*, foram ativos, *in vitro*, contra *Trypanosoma cruzi* (NASCIMENTO et al, 2004). Além disso, extratos de *M. hoehnei*, *M. stipulacea*, *M. camporum* e *M. lasiandrae* também mostraram-se ativos contra esse parasita (CHAVES et al, 2007).

Os decoctos de *M. laevigata* e *M. involucrata* apresentaram atividade anti-inflamatória contra edemas em patas de rato induzido por carragenina, sendo que *M.*

¹ Segundo King & Robinson, 1987, esta espécie é endêmica do Brasil, porém no estudo fitoquímico aqui mencionado, trata-se de um espécime coletado na Argentina.

involuta apresentou maior atividade que *M. laevigata*. Além disso, as frações mais apolares não apresentaram atividade, sugerindo que os diterpenos, que são substâncias de baixa polaridade, comuns nas espécies testadas, não são os responsáveis por essa atividade (SUYENAGA et al, 2002).

A fração hexânica ácida de *M. triangularis* apresentou atividade antibacteriana, porém nenhuma atividade anti-fúngica. Nessa fração encontrou-se diterpenos pimaradienólicos, apresentando um ácido carboxílico em sua estrutura, que quando metilado, observou-se perda da atividade antibacteriana (CRUZ et al, 1996).

Quanto aos estudos químicos realizados nessas espécies, observou-se uma maior incidência de trabalhos referentes ao isolamento de substâncias de baixa polaridade. De maneira geral, foram encontrados **triterpenos** (lupeol, α -amirina, β -amirina e seus acetatos, friedelina, esqualano), **sesquiterpenos** (germacreno D, γ -humuleno, α -humuleno, cariofileno, espatulenol, isocomeno), **esteróides** (stigmasterol, sitosterol e seus glicosídeos, campesterol), **monoterpenos** (derivados do timol), **lactonas sesquiterpênicas** do tipo germacrolido, eudesmanolido e guaianolido, **diterpenos** do tipo caurano, pimarano, abietano, labdano e acíclico; **cumarinas** (escopoletina, isoescopoletina e cumarina), **flavonóides** (naringenina e 5,7-diidroxi-4'-metoxiflavanona), **cromona**, **derivados benzenóides** e **derivados do ácido quínico** (KNUDSEN et al, 1986; CRUZ & ROQUE, 1992; NASCIMENTO & OLIVEIRA, 2001; SOUZA, TALEB-CONTINI & OLIVEIRA, 2006; SOARES et al, 2007, ALVES et al, 1995; VICHNEWSKI, et al, 1977; FABBRI et al, 1997; KRAUTMANN et al, 2007; CHAVES & OLIVEIRA, 2003; BOHLMANN et al, 1982a; BOHLMANN et al, 1982b; BOHLMANN et al, 1982c; BOHLMANN et al, 1982d; BOHLMANN et al, 1981; SARG & EL-DAHMY, 1990; OLIVEIRA et al, 1984).

A tabela 1 correlaciona as espécies de *Mikania* endêmicas no Brasil e as classes de metabólitos secundários isolados encontrados na literatura.

Tabela 1. Espécies de *Mikania* endêmicas no Brasil e classes de metabólitos secundários isolados.

Espécies	Metabólitos isolados	Referências
<i>M. alvimii</i>	Sesquiterpenos; diterpenos (pimaranos, labdanos e acíclico); norsesquiterpeno, norditerpeno; cromona	BOHLMANN et al, 1982a; SARG & EL-DAHMY, 1990
<i>M. arrojadoi</i>	Sesquiterpenos; diterpeno (caurano).	BOHLMANN et al, 1982b
<i>M. belemii</i>	Sesquiterpeno; diterpeno (caurano).	BOHLMANN et al, 1981
<i>M. campanulata</i>	Lactonas sesquiterpênicas (eudesmanolido)	KRAUTMANN et al, 2007
<i>M. goyazensis</i>	Monoterpenos, sesquiterpenos; lactonas sesquiterpênicas (germacrolido e eudesmanolido); diterpeno (acíclico); triterpeno; esteróides.	BOHLMANN et al, 1982c
<i>M. hoehnei</i>	Lactonas sesquiterpênicas (guaianolido), triterpenos; esteróides, flavonol, flavona; benzenóide.	CHAVES & OLIVEIRA, 2003
<i>M. laevigata</i>	Diterpenos (caurano), esteróide, cumarina.	OLIVEIRA et al, 1984
<i>M. lasiandrae</i>	Diterpenos (caurano), triterpenos, derivado do ácido quínico	SOARES et al, 2007
<i>M. lindbergii</i>	Diterpenos (caurano); triterpenos	FABBRI et al, 1997
<i>M. luetzelburgii</i>	Sesquiterpeno; diterpenos (caurano); triterpeno.	BOHLMANN et al, 1981
<i>M. oblongifolia</i>	Diterpeno (caurano)	VICHNEWSKI et al, 1977
<i>M. obtusata</i>	Diterpenos (caurano)	ALVES et al, 1995
<i>M. pohlii</i>	Monoterpenos; sesquiterpenos; lactonas sesquiterpenos (germacrolido); diterpeno (acíclico); triterpenos; esteróide.	BOHLMANN et al, 1982c
<i>M. pseudohoffmanianna</i>	Diterpenos (caurano); triterpenos; esteróides; flavonol; derivado do ácido quínico; cumarina.	SOUZA, TALEB-CONTINI & OLIVEIRA, 2006
<i>M. purpurascens</i>	Monoterpeno; sesquiterpenos; lactona sesquiterpênica (germacrolido); flavanona.	BOLHMANN et al, 1982b
<i>M. smilacina</i>	Cumarina.	OLIVEIRA & FERRO, 1985
<i>M. stipulacea</i>	Diterpenos (caurano), triterpenos; esteróides; benzenóide; cumarina.	NASCIMENTO & OLIVEIRA, 2001
<i>M. triangularis</i>	Diterpenos (caurano, pimarano, abietano); triterpeno; esteróide.	KNUDSEN et al, 1986; CRUZ & ROQUE, 1992
<i>M. sessifolia</i>	Sesquiterpenos; diterpenos (caurano, acíclico), triterpeno.	BOHLMANN et al, 1981

1.2.2 ESPÉCIES *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip

M. glomerata Sprengel (figura 1) pertence a seção Globosae Robinson do gênero *Mikania* Willdenow (OLIVEIRA, SAITO & GARCIA, 1993). É um subarbusto trepador, provido de caule cilíndrico bastante ramificado (OLIVEIRA et al, 1986/1987), encontrada na Argentina, Brasil e Paraguai (KING & ROBINSON, 1987).

Popularmente conhecida como “guaco”, esta espécie tem sido usada para o tratamento de febre, reumatismo, gripe e doenças respiratórias, tais como asma e bronquite, além do uso contra envenenamento por picada de cobra (VENEZIANI & OLIVEIRA, 1999; RUPPELT et al, 1991). A Farmacopéia Brasileira, edição de 1929, oficializa seu emprego.

Vários são os estudos fitoquímicos realizados com a espécie, sendo isolados as substâncias relacionadas na tabela a seguir (tabela 2).

Tabela 2. Metabólitos secundários isolados de *M. glomerata* Sprengel.

Substância	Classe química	Parte vegetal	do Referências
ácido <i>ent</i> -beier-15(16)-en-19-óico	diterpeno	galhos	VENEZIANI & OLIVEIRA, 1999
campesterol	esteróide	callus	SANTOS et al, 1999
ácido <i>orto</i> -hidroxicinâmico	fenilpropanóide	folhas	VENEZIANI & OLIVEIRA, 1999
cumarina	cumarina	folhas	VILEGAS, DE MARCHI, LANÇAS, 1997a
		callus	SANTOS et al, 1999
		partes aéreas	SANTOS, TOMASSINI, CABRAL, 1998

Continua

Continuação

Substância	Classe química	Parte do vegetal	Referências
friedelina	triterpeno	galhos	VENEZIANI & OLIVEIRA, 1999
ácido grandiflórico	diterpeno	galhos	VENEZIANI & OLIVEIRA, 1999
ácido cinamoil grandiflórico	diterpeno	partes aéreas	OLIVEIRA et al, 1984
ácido 15 β -hidroxi-caur-16(17)-en-19-óico	diterpeno	galhos	VENEZIANI & OLIVEIRA, 1999
ácido 15 β -benzoiloxi-caur-16(17)-en-19-óico	diterpeno	folhas	VENEZIANI & OLIVEIRA, 1999
ácido 17-hidroxi-caur-15(16)-en-19-óico	diterpeno	galhos	VENEZIANI & OLIVEIRA, 1999
ácido 15 β -isobutiriloxi-caur-16(17)-en-19-óico	diterpeno	galhos	VENEZIANI & OLIVEIRA, 1999
ácido 15 α -isobutiriloxi-caur-16-en-19-óico	diterpeno	partes aéreas	SANTOS, TOMASSINI, CABRAL, 1998
ácido <i>ent</i> -caurenóico	diterpeno	partes aéreas	OLIVEIRA et al, 1984
ácido <i>ent</i> -caurenóico (metilado)	diterpeno	folhas	VILEGAS, DE MARCHI, LANCAS, 1997a
lupeol	triterpeno	folhas	VILEGAS, DE MARCHI, LANCAS, 1997a
		partes aéreas	SANTOS, TOMASSINI, CABRAL, 1998
acetato de lupeol	triterpeno	folhas	VILEGAS, DE MARCHI, LANCAS, 1997a
β -sitosterol	esteróide	callus	SANTOS et al, 1999
estigmast-22-en-3-ol	esteróide	partes aéreas	OLIVEIRA et al, 1984
estigmasterol	esteróide	callus	SANTOS et al, 1999
		folhas	VENEZIANI & OLIVEIRA, 1999
siringaldeído	benzenóide	-	FRANCHI et al, 2005
ácido <i>orto</i> -acilofla- <i>trans</i> -cinâmico	fenilpropanóide		FRANCHI et al, 2005

Numa análise do óleo essencial de *M. glomerata* por GC-MS, foi detectado que este é rico em sesquiterpenos oxigenados, sendo destacadas as substâncias espatulenol e o óxido do cariofileno (LIMBERGER et al, 2001).

M. laevigata Schultz Bip, (figura 2) espécie endêmica no Brasil (KING & ROBINSON, 1987), é popularmente conhecida como “guaco” ou “guaco cheiroso”. Assemelha-se a *M. glomerata* Sprengel, sendo frequentemente comercializado como tal, principalmente no sul do país, onde sua incidência é maior em relação à primeira. (DESLIN, 2004, SIMÕES et al, 1995, KISSMANN & GROTH, 1999). No entanto, difere de *Mikania glomerata* pelo forte odor a cumarina e pela forma das folhas. A lâmina foliar de *Mikania laevigata* possui maior comprimento do que largura, a base não é hastada e os dentes laterais, quando presentes, são pouco evidentes, enquanto que em *Mikania glomerata* as medidas de comprimento e largura são muito próximas, a base da lâmina é hastada e os dentes laterais são muito evidentes. Convém ressaltar que ambas espécies apresentam tricomas glandulares na superfície de suas folhas, estando esses localizados principalmente na face abaxial.

Na medicina popular, as folhas de *M. laevigata* são utilizadas sob a forma de xarope contra resfriados, bronquites e tosses crônicas (SIMÕES et al, 1995).

Apesar de se tratar de uma espécie farmacopéica, e de sua grande importância para a medicina tradicional, sua fitoquímica clássica tem se mostrado ainda pouco estudada. A tabela abaixo mostra os metabólitos secundários isolados de *Mikania laevigata*, descritos na literatura (tabela 3).

Tabela 3. Metabólitos secundários isolados de *M. laevigata* Schultz Bip.

Substância	Classe química	Parte do vegetal	Referências
cumarina	cumarina	partes aéreas	OLIVEIRA et al, 1984
ácido cinamoil grandiflórico	diterpeno	partes aéreas	DAVINO, GIESBRECHT, ROQUE, 1989 OLIVEIRA et al, 1984
ácido <i>ent</i> -caurenóico	diterpeno	partes aéreas	DAVINO, GIESBRECHT, ROQUE, 1989
stigmast-22-en-ol	esteróide	partes aéreas	OLIVEIRA et al, 1984

Foram detectados, no extrato diclorometânico de *M. laevigata*, por GC-MS as substâncias α -cariofileno, germacreno-D, α -cubebeno, biclicogermacreno, α -cadineno, nonilfenol, isômero nonilfenol, 3-eicoseno e eicosano (DESLIN, 2004).

Além desses estudos, numa análise por GC-MS do óleo essencial de *M. laevigata*, foi detectado que este é constituído principalmente por sesquiterpenos, dentre eles β -cariofileno, germacreno-D e biciclogermacreno (LIMBERGER et al, 1998).

1.2.2.1 Atividades biológicas

Vários estudos farmacológicos têm sido realizados a fim de justificar a ampla utilização popular do “guaco”.

Pesquisas evidenciam que a ação do “guaco” em doenças respiratórias se deve às suas propriedades broncodilatadoras e antiinflamatórias (visto que a asma é uma doença inflamatória).

Num estudo realizado por Moura et al (2002), utilizando traquéias de cobaias, foi observado atividade broncodilatadora, do extrato hidroalcoólico de *M. glomerata*, e uma menor atividade do extrato aquoso. A partição do extrato hidroalcoólico com diclorometano forneceu uma fração orgânica 105 vezes mais ativa que o extrato de origem, e a cumarina era seu constituinte majoritário. Porém, concluíram que outros constituintes ativos estavam presentes nesta fração, visto que esta apresentou um IC₅₀ menor que a cumarina pura (1,9 μ g/mL e 3,6 μ g/mL respectivamente). Esta fração também apresentou um efeito inibitório do edema em patas de rato induzidas pelo veneno de *Bothrops jararaca*, o que demonstra a

atividade antiinflamatória de *M. glomerata*. Neste estudo também foi sugerido que um efeito bloqueador dos canais de Ca^{2+} poderia ter um importante papel na atividade broncodilatadora de *M. glomerata*.

Oliveira et al (1985) constataram a atividade antiinflamatória de *M. glomerata* através do teste da atividade antiedema da pata de rato induzida por carragenina, obtendo inibições ligeiramente inferiores às produzidas por fenilbutazona. Também avaliaram a toxicidade aguda de seu extrato fluido, quando administrados em ratos, em dose única. Apenas em doses muito altas (40mL/kg), o extrato apresentou efeito letal em 40% dos animais, o que indica sua baixa toxicidade.

Fierro et al (1999), estudaram a atividade anti-alérgica da fração diclorometânica de *M. glomerata* (proveniente da partição do extrato etanólico), em ratos com pleurite alérgica. Os resultados sugerem que a fração testada foi efetiva na inibição da inflamação imunológica, mas não na inflamação aguda.

Santos et al (2006), também avaliaram as propriedades anti-alérgicas de *M. laevigata* em um modelo de pneumonite alérgica utilizando ratos isogênicos. Como a asma é caracterizada por edema e infiltração de leucócitos, o tratamento com extrato hidroalcoólico, cumarina e ácido *o*-cumárico (presentes nos extratos), mostraram importante atividade anti-inflamatória na inflamação alérgica. Porém, cortes histológicos mostraram um perfil hemorrágico no tecido pulmonar dos animais tratados com os marcadores acima citados, fato este não observado nos grupos tratados com extrato hidroalcoólico. Isso provavelmente significa que algum efeito protetor do extrato hidroalcoólico está bloqueando os efeitos indesejáveis dos marcadores isolados.

Ruppelt et al (1991), estudaram as atividades antiinflamatórias e analgésicas de algumas plantas conhecidas popularmente por sua ação antiofídica, entre elas, *M. glomerata*. Neste experimento, ratos previamente tratados com chá de guaco foram submetidos a uma injeção com ácido acético 0,1N. A atividade analgésica foi avaliada pela porcentagem de inibição do número de contorções apresentadas (63,1%), e a atividade antiinflamatória foi avaliada pela porcentagem de inibição da difusão de Azul de Evans na cavidade peritoneal (48,9%), ambas em comparação a um grupo controle. Esses resultados indicam suas atividades analgésicas e antiinflamatórias.

A atividade antiofídica de *M. glomerata* foi confirmada por Maiorano et al (2005). Neste estudo, o extrato aquoso foi capaz de inibir muitos efeitos provocados por venenos de cobras dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*, justificando seu uso popular.

É relevante mencionar a existência das espécies vegetais *Torresea cearensis* (cumarú), *Justicia pectorali* (chambá), *Eclipta alba* (agrião), *Pterodon polygaliflorus* (sucupira), *Hybanthus ipecacuanha* (falsa ipeca), encontradas no nordeste brasileiro, que são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças respiratórias. Em todas elas a cumarina está presente em seu metabolismo secundário. Leal et al, 2000, avaliaram suas propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva e broncodilatadora, sendo que todas elas mostraram-se ativas. Esses dados podem ser mais um indicativo da importância da cumarina, presente em *M. glomerata* e *M. laevigata*, frente suas atividades farmacológicas.

Quanto à atividade antimicrobiana, Duarte et al, 2005, constataram que o óleo essencial de *M. glomerata* apresentou grande atividade contra *Candida albicans*, enquanto o óleo essencial de *M. laevigata* não apresentou atividade. Yatsuda et al (2005), verificaram que o extrato etanólico de ambas espécies, e principalmente suas frações mais apolares, mostraram-se ativos contra o crescimento e aderência de patógenos orais (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*).

Davino et al (1989), descreveram a atividade antifúngica e antibacteriana dos diterpenos ácido caurenóico e ácido cinamoil grandiflórico, sendo ambas, substâncias de baixa polaridade, encontrados em *M. glomerata* e *M. laevigata*. Tais dados podem justificar suas atividades antimicrobianas.

O extrato hidroalcoólico de *M. laevigata* foi avaliado quanto a atividade antiulcerogênica, em ratos. Apesar de ser utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças respiratórias, demonstrou melhor inibição das lesões ulcerativas quando comparado aos extratos de *Maytenus ilicifolium* (espíndula), conhecido como agente antiulcerogênico. Frente aos diversos modelos experimentais testados, os resultados obtidos sugerem que tanto o extrato hidroalcoólico quanto a cumarina podem influenciar o controle da secreção gástrica mediada pelo sistema parassimpático (BIGHETTI et al, 2005).

Quanto à toxicidade, Silveira e Sá et al (2003) e Graça et al (2007a) avaliaram a possibilidade das espécies afetarem a fertilidade em ratos Wistar machos. Não foram encontrados nenhuma atividade antifertilidade ou efeitos tóxicos, mesmo numa exposição a longo prazo.

Em experimentos utilizando ratos Wistar, foi constatada a segurança da utilização de *Mikania laevigata* para fins terapêuticos, tanto em administração subcrônica quanto em crônica, através da administração de xarope de guaco contendo quantidades controladas de cumarina (GRAÇA et al, 2007b).

1.2.2.2 Aspectos analíticos

Diante da grande importância farmacológica da cumarina e do ácido caurenóico para as espécies em estudo, há vários relatos na literatura de quantificação e otimização de processos de extração para essas substâncias, principalmente em se tratando de *M. glomerata*.

Celeghini et al (2001), compararam as diferenças entre vários métodos de extração de *M. glomerata*, em relação à concentração de cumarina, sendo sua quantificação realizada em HPLC-UV/DAD. O método mais eficiente foi a maceração por 20min, sob sonicação, utilizando EtOH:H₂O (1:1) como solvente extrator.

Vilegas et al (1997a), compararam diferentes métodos de extração de *M. glomerata*, tendo como parâmetros as concentrações de cumarina e ácido caurenóico, nas folhas. As quantificações foram realizadas por GC-MS e GC-FID. Em relação à cumarina, o melhor método foi a extração com hexano em estado supercrítico, enquanto que para o ácido caurenóico, o melhor método foi a maceração sob sonicação utilizando hexano como solvente extrator.

Vilegas et al (1997b) também quantificaram a cumarina e o ácido caurenóico, por GC-FID, nas folhas de *M. glomerata*, obtendo 4,4mg_{cumarina}/g_{planta} e 2,00mg_{ácido caurenóico}/g_{planta}.

Num estudo comparativo dos teores de cumarina e ácido *o*-cumárico entre *M. laevigata* e *M. glomerata*, Santos et al (2006), realizaram a quantificação dessas substâncias em extratos hidroalcoólicos, extratos aquosos frescos e extratos aquosos liofilizados. Os resultados obtidos indicaram que as folhas de *M. glomerata* apresentaram maiores teores de cumarina e ácido *o*-cumárico quando comparadas às folhas de *M. laevigata*. O estudo também mostrou maiores concentrações das substâncias em questão nos extratos hidroalcoólicos. No extrato aquoso liofilizado, houve uma diminuição de aproximadamente 60% de ácido *o*-cumárico e 50% da cumarina, em relação ao extrato aquoso fresco.

Atualmente, existem grandes avanços da química de produtos naturais, na busca de formas para facilitar a extração dos princípios ativos. Para tais pesquisas voltam a atenção para as estruturas foliares que armazenam os metabólitos secundários. Como exemplo podemos citar os tricomas glandulares (SCHORR & DA COSTA, 2005).

Dentre os metabólitos secretados pelos tricomas glandulares, os mais comuns são os terpenóides (monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides e triterpenóides), sendo também encontrados derivados de fenilpropanóides (e compostos fenólicos relacionados) e flavonóides. Os últimos são geralmente agliconas devido sua maior lipofilicidade, necessária

para a solubilização numa mistura de terpenóides. Aparentemente os alcalóides não são comuns nos exsudatos tricomais (WAGNER, WANG & SHEPHERD, 2004).

A localização superficial dos tricomas glandulares permite um acesso mais fácil a seus metabólitos do que aos encontrados em células de tecidos mais internos. Vários métodos de remoção do exsudato tricomal têm sido descritos, sendo estes geralmente denominados microamostragem. Entre os exemplos dessas técnicas, pode-se citar:

a) toque na cabeça do tricoma com um microcapilar contendo um solvente capaz de dissolver facilmente o exsudato, obtendo-se um material potencialmente puro.

b) remoção da glândula contendo o exsudato com auxílio de uma pinça.

c) lavagem da superfície com solvente orgânico.

A técnica da microamostragem em tricomas glandulares tem sido muito utilizada em espécies de Asteraceae, como ferramenta útil nas investigações fitoquímica e quimiotaxonômica, sendo principalmente encontrados em seus exsudatos, lactonas sesquiterpênicas, que comprovadamente são produzidas e estocadas em seu interior (SPRING, 2000; SCHORR & DA COSTA, 2005).

A relativa facilidade dos processos de extração se seus constituintes, conforme os métodos descritos acima, aliado a obtenção de uma mistura de metabólitos menos complexa que as obtidas em métodos extrativos convencionais, explica a importância biotecnológica do estudo do exsudato tricomal. Ainda, há futuras perspectivas relacionadas a esses estudos, em que com auxílio da engenharia genética, as fitotoxinas presentes nos tricomas, comercialmente úteis, poderão ser produzidas pelos vegetais de maneira mais eficiente (WAGNER, WANG & SHEPHERD, 2004).

2 OBJETIVOS

De acordo com os dados apresentados no item anterior, pode-se perceber a importância do conhecimento dos metabólitos secundários produzidos por uma determinada planta, principalmente em se tratando de espécies farmacopéicas. De acordo com a literatura, poucas substâncias de *M. laevigata* foram isoladas e identificadas.

A extração de metabólitos presentes na superfície foliar utilizando diclorometano como solvente extrator tem se mostrado um método mais seletivo quando comparado a extrações convencionais. Tal fato leva à obtenção de um material com menor complexidade, e conseqüentemente, de análises mais simples. Tendo em vista a seletividade dos constituintes tricômicos, a análise química comparativa dos extratos das lavagens foliares de ambas espécies pode ser uma ferramenta útil na diferenciação entre as duas plantas e entre demais espécies do gênero.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram divididos da seguinte maneira:

✓ ***M. laevigata:***

- Isolamento e identificação de substâncias presentes nas folhas secas;
- Análise química qualitativa e quantitativa dos extratos da lavagem foliar com diclorometano, das folhas secas, coletadas em duas épocas do ano*, através de técnica hifenada (GC-MS);

✓ ***M. glomerata:***

- Análise química qualitativa e quantitativa dos extratos da lavagem foliar com diclorometano, das folhas secas, coletadas em duas épocas do ano*, através de técnica hifenada (GC-MS).

² A opção por estudos em duas épocas do ano deve-se ao já conhecido aumento da produção de cumarina em *M. glomerata*, nos meses de janeiro e julho (PEREIRA et al, 2000).

✓ **Amostras de uso popular:**

- Após a padronização das análises químicas dos extratos da lavagem foliar com diclorometano, das folhas secas de *M. glomerata* e *M. laevigata*, foram analisadas amostras de uso popular de “guacos”, de algumas regiões do país. O perfil químico obtido de cada amostra comercial foi comparado aos obtidos pelas plantas deste estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS

- *Quanto aos materiais vegetais em estudo:*

Coleta e identificação de *Mikania laevigata* para a realização de trabalho fitoquímico.

O material vegetal foi coletado na cidade de Ribeirão Preto – SP, em novembro de 2005. Sua identificação botânica foi realizada pelo Prof. Roberto Lourenço Esteves, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, e sua excicata está depositada no Herbarium Bradeanum da UERJ, sob o nº CAC02.

Coleta de *Mikania laevigata* para a realização da padronização do extrato da lavagem foliar.

O material vegetal foi fornecido pela Profª. Drª. Maria do Carmo Vieira da Faculdade de Agronomia da UFMS – Dourados, em julho de 2007.

Coleta de *Mikania laevigata* para a realização da análise comparativa dos extratos da lavagem foliar em duas épocas do ano.

O material vegetal foi coletado na cidade de Ribeirão Preto – SP, em janeiro de 2006 e em julho de 2006, sendo as folhas adquiridas do mesmo espécime utilizado para o estudo fitoquímico.

Coleta de *Mikania glomerata* para a realização da padronização do extrato da lavagem foliar.

O material vegetal foi fornecido pela Profª. Drª. Maria do Carmo Vieira da Faculdade de Agronomia da UFMS – Dourados, em julho de 2007.

Coleta de *Mikania glomerata* para a realização da análise comparativa dos extratos da lavagem foliar em duas épocas do ano.

O material vegetal foi fornecido pela Profª. Drª. Maria do Carmo Vieira da Faculdade de Agronomia da UFMS – Dourados, em julho de 2006 e em janeiro de 2007.

Amostras de “guaco” para avaliação do perfil químico.

As amostras, com utilização popular, foram obtidas dos estados: Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina.

- *Quanto aos materiais utilizados:*
 - ✓ Os solventes utilizados foram de grau técnico, purificados no laboratório, e de grau P.A.
 - ✓ As placas cromatográficas CCDC e CCDP foram preparadas a partir da suspensão de gel de sílica 60 (GF254 – Merck) em água destilada, sendo a espessura de 0,25mm para as placas comparativas e 1,00mm para as placas preparativas.
 - ✓ Os reveladores utilizados na cromatografia em camada delgada foram: irradiação UV de 254 e 366 nm (método físico), NP-PEG, sulfato cérico, anisaldeído sulfúrico e KOH-5% em etanol (métodos químicos).
 - ✓ Utilizou-se o ultrassom da marca Odontobrás, modelo 1440D.
 - ✓ Utilizou-se centrífuga da marca Fanem[®], modelo 206.
 - ✓ Utilizaram-se filtros Millipore LCR – 0,45µm da marca MillexTM.
 - ✓ Utilizou-se padrão de cumarina da marca Sigma-Aldrich.
 - ✓ Foram utilizados gel de sílica (230 – 280 Mesh – 0.060 – 0.200mm, diâmetro de poro: 6mm) e Sephadex LH-20 para a realização das colunas cromatográficas clássicas.
 - ✓ Para efetuar a secagem de algumas frações foi utilizado o evaporador rotatório, sob pressão reduzida, da marca TECNAL, modelo TE-120.
 - ✓ Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C foram obtidos através dos espectrofotômetros BRUKER DPX 300; BRUKER DRX 400 e BRUKER DRX 500, com a utilização de solventes deuterados da marca Aldrich.
 - ✓ As obtenções dos α_D foram realizadas em Polarímetro digital, marca Jasco, modelo DIP-370. As leituras foram realizadas em 589nm.
 - ✓ As análises em HPLC foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu, modelo SCL-10AVP, equipado com três bombas Shimadzu, modelo LC-6AD, detector de arranjo de diodos UV-Vis DAD Shimadzu, modelo SPD-M10AVP, injetores manual e automático e sistema de integração computadorizada com software CLASS-VP. Foram utilizadas coluna analítica C18 (4,6 x 250mm; 5µm) e coluna semipreparativa C18 (20 x 250mm, 15µm) modelo SHIM-PACK PREP. ODS(H) KIT, Shimadzu. Foi utilizada também a pré-coluna ODS-8, Shimadzu.

- ✓ Para as análises no Espectrômetro de Massas, utilizou-se o aparelho da marca Bruker Daltonics, modelo: ultrOTOFG - ESI-TOF Mass Spectrometer.
- ✓ As análises por GC-MS foram realizadas em Cromatógrafo gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas com modo de ionização por Impacto eletrônico, marca Shimadzu, modelo GC-MS-QP2010. As análises foram realizadas utilizando-se as colunas DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) ou DB-1MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) e hélio como gás de arraste.

3.2 METODOLOGIA

Neste tópico serão apresentados os métodos utilizados no processo de obtenção de extratos, isolamento, purificação, elucidação estrutural e análises em GC-MS.

3.2.1 EXTRAÇÕES

As extrações foram realizadas após separação das folhas e secagem das mesmas em estufa a 40°C.

3.2.1.1 Lavagem foliar com diclorometano

Neste trabalho, utilizou-se essa extração:

- ✓ Na fitoquímica de *M. laevigata*, no intuito de isolar as substâncias presentes nesse extrato, e posteriormente utilizá-los como padrões em análises por GC-MS. (procedimento P1).
- ✓ Nas análises químicas qualitativas e quantitativas, em GC-MS, dos constituintes presentes na superfície foliar de *M. laevigata* e *M. glomerata* (procedimento P2).
- ✓ Nas análises químicas, em GC-MS, dos constituintes presentes na superfície foliar de amostras de uso popular de “guaco” provenientes de diferentes regiões do Brasil (procedimento P2).

Procedimento (P1): Folhas secas e íntegras de *M. laevigata* foram submetidas a extração, por 30 segundos, com diclorometano. O extrato foi filtrado em lã de vidro, e rotaevaporado em banho a 25°C.

Procedimento (P2): Pesou-se aproximadamente 5,0g de folhas secas e íntegras, sendo essas submetidas a extração, por 30 segundos, com 150mL de diclorometano. O extrato foi homogeneizado, sendo 20mL filtrados em membrana Millipore - 0,45µm, e seco em ar comprimido. O extrato seco obtido foi então pesado, diluído em 1mL de diclorometano, e injetado no cromatógrafo.

3.2.1.2 Percolação

Consiste num método de extração exaustiva, no qual o pó do material vegetal é acondicionado em percolador, e o solvente extrator é submetido a um fluxo lento e constante. Neste trabalho, este processo extrativo foi utilizado na obtenção do extrato etanólico bruto de *M. laevigata*, para posteriores estudos fitoquímicos da espécie.

A obtenção dos extratos utilizados na fitoquímica de *M. laevigata* está ilustrado no fluxograma 1.

Fluxograma 1. Preparação dos extratos para estudo fitoquímico de *M. laevigata*.

3.2.1.3 Extração líquido-líquido

Consiste na separação dos componentes de uma mistura baseado nos coeficientes de partição entre dois solventes imiscíveis. Foi utilizada para tornar as misturas

das substâncias químicas presentes no extrato etanólico bruto de *M. laevigata*, mais simples, de acordo com a polaridade, conforme o procedimento P3.

Procedimento (P3): A 100g de extrato etanólico foram adicionados 1,6L de metanol, e solubilizado com a ajuda de ultrasom. Filtrou-se em buchner, e ao filtrado foi adicionado 0,4L de água destilada. Um novo precipitado se formou, sendo a amostra novamente filtrada em buchner. Este procedimento foi realizado com o intuito de se retirar da amostra, graxa e sais, cuja presença no extrato prejudicaria as purificações posteriores. O filtrado foi então submetido a particionamento com hexano, diclorometano e acetato de etila (fluxograma 2).

Fluxograma 2. Partições do extrato etanólico – 95%

3.2.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

3.2.2.1 Cromatografia em camada delgada

É uma técnica amplamente utilizada em análises fitoquímicas, sendo utilizado neste trabalho cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), apenas para fins analíticos qualitativos, e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), com finalidade de isolamento e purificação das substâncias em misturas presentes na amostra.

Os reveladores utilizados foram luz UV a 254 e 366nm (método físico), sulfato cérico e anisaldeído sulfúrico seguidos de aquecimento, KOH-5% em etanol, NP-PEG (métodos químicos).

Reveladores utilizados:

Anisaldeído sulfúrico:

Revelador utilizado para detecção de terpenóides, levando a coloração intensa após aquecimento em chapa a 100°C.

Preparação: Em banho de gelo, a 0,5mL de anisaldeído, adiciona-se 10mL de ácido acético glacial, 85mL de metanol e 5mL de ácido sulfúrico concentrado.

NP-PEG/UV

Revelador utilizado para detecção de vários flavonóides (agliconas e heterosídeos), assim como derivados do ácido fenilpropanóico, (WAGNER, 1984). Sua detecção se dá por cores com fluorescência intensa, estruturas dependentes, quando visualizadas em 366nm. A adição de polietilenoglicol aumenta o limite de detecção.

Preparação: *Reagente A:* solução metanólica a 1% de difenilboriloxietilamina (NP)

Reagente B: solução etanólica a 5% de polietilenoglicol 4000 (PEG)

Sulfato cérico:

Esse revelador evidencia vários tipos de substâncias, tais como terpenóides, flavonóides, ácidos fenólicos e seus derivados, entre outros. Sua detecção se dá após aquecimento da placa em chapa a 100°C.

Preparação: A 128mL de H₂O destilada, adiciona-se aos poucos 72mL de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, adiciona-se sulfato cérico, até se observar precipitação. Filtra-se para retirar o precipitado, obtendo-se assim a solução.

KOH-5% em etanol:

Esse revelador é utilizado para a detecção de cumarinas, as quais adquirem coloração verde-azulada quando visualizadas sob luz UV.

3.2.2.2 Cromatografia em coluna

✓ *Sílica (fase normal)*

Foi utilizada para a separação de substâncias de polaridade baixa a intermediária.

✓ *Sephadex LH-20*

Conhecida como cromatografia por exclusão, esta coluna efetua a separação de acordo com o tamanho das moléculas. Foi utilizada na separação de substâncias provenientes de frações polares. Neste trabalho, utilizou-se metanol como fase móvel. As amostras foram submetidas a um “clean-up”, o qual consiste na sua solubilização em metanol, e posterior centrifugação a 3000rpm, por 20min, sendo o sobrenadante eluído na coluna.

3.2.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Neste trabalho, utilizou-se esta técnica com fins analíticos e de purificação. As amostras foram previamente solubilizadas em solvente apropriado, seguido de filtragem em membrana Millipore (0,45µm).

Condições de análise (C1): Utilizou-se coluna analítica ODS (4,6 x 250mm); FM MeOH:H₂O em gradiente (0,01 a 25min – 40% a 100% de MeOH; 25 a 30min – 100% de MeOH; 30 a 35min – 100% a 40% de MeOH; 35 a 40min – 40% de MeOH. O fluxo foi de 0,8mL/min, e o volume injetado de 20µL.

Condições de análise (C2): Utilizou-se coluna analítica ODS (4,6 x 250mm); FM MeOH:H₂O em gradiente (0,01 a 15min – 25% a 50% de MeOH; 15 a 20min – 50% de MeOH; 20 a 22min – 50% a 100% de MeOH; 22 a 25min – 100% de MeOH; 25 a 27min –

100% a 25% de MeOH; 27 a 30min – 25% de MeOH. O fluxo foi de 0,9mL/min, e o volume injetado de 20µL.

Condições de análise (C3): Utilizou-se coluna preparativa ODS (20 x 250mm); FM MeOH:H₂O em gradiente (0,01 a 30min – 25% a 50% de MeOH; 30 a 40min – 50% de MeOH; 40 a 44min – 50% a 100% de MeOH; 44 a 50min – 100% de MeOH; 50 a 54min – 100% a 25% de MeOH; 54 a 60min – 25% de MeOH. O fluxo foi de 9,0mL/min, e o volume injetado de 1,0mL.

Condições de análise (C4): Utilizou-se coluna analítica ODS (4,6 x 250mm); FM MeOH:H₂O em gradiente (0,01 a 11min – 25% a 42% de MeOH; 11 a 12min – 42% a 50% de MeOH; 12 a 25min – 50% a 57% de MeOH; 25 a 27min – 57% a 100% de MeOH; 27 a 32min – 100% a 25% de MeOH. O fluxo foi de 0,9mL/min, e o volume injetado de 20µL.

Condições de análise (C5): Utilizou-se coluna preparativa ODS (20 x 250mm); FM MeOH:H₂O em gradiente (0,01 a 22min – 25% a 42% de MeOH; 22 a 24min – 42% a 50% de MeOH; 24 a 50min – 50% a 57% de MeOH; 50 a 54min – 57% a 100% de MeOH; 54 a 64min – 100% a 25% de MeOH. O fluxo foi de 9,0mL/min, e o volume injetado de 1,0mL.

3.2.2.4 Cromatografia gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (GC-MS)

A cromatografia gasosa é utilizada na separação de substâncias apolares, tais como misturas de substâncias voláteis. Nas aplicações analíticas, é possível o acoplamento com o Espectrômetro de Massas (GC-MS), permitindo tanto a identificação quanto a quantificação de componentes de baixo peso molecular, mesmo em misturas complexas. Neste trabalho, utilizou-se o impacto eletrônico como modo de ionização das substâncias.

Esta técnica foi empregada na identificação estrutural de substâncias presentes em frações de baixa polaridade, baseado na comparação dos espectros de massas da biblioteca Willey e padrões do laboratório, além dos índices de retenção de Kovats' (IK), sendo que para a determinação dos IK foi necessária a injeção de hidrocarbonetos *n*-alcanos (C₉-C₂₂). (ADANS,1995).

Algumas amostras foram previamente submetidas a um “clean-up”, em coluna Sepack – sílica (fase normal). Neste procedimento, as amostras, após adsorção em sílica –fase normal, foram eluídas sequencialmente, com hexano, diclorometano e metanol. As frações analisadas foram provenientes da eluição em diclorometano.

Condições de análise (C6): foi realizada em um sistema operando em impacto eletrônico (70 eV) equipado com injetor split (250°C) e com proporção split 1/50. A coluna utilizada foi do tipo sílica fundida com fase estacionária DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), utilizando hélio como gás carreador. O fluxo na coluna foi 2,00 mL/min, pressão de 131,6 kPa e aquecimento com a programação de temperatura de 75°C por 6,0min, de 75°C a 170°C a 20°C/min; 170°C por 5,0min; de 170°C a 260°C a 5°C/min, 260°C por 1,0min; de 260°C a 280°C a 10°C/min; 280°C por 15,0min; de 280°C a 300°C a 10°C/min; e 300°C por 3,0min.

Condições de análise (C7): foi realizada em um sistema operando em impacto eletrônico (70 eV) equipado com injetor split (250°C) e com proporção split 1/50. A coluna utilizada foi do tipo sílica fundida com fase estacionária DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), utilizando hélio como gás carreador. O fluxo na coluna foi 1,78 mL/min, pressão de 131,4 kPa e aquecimento com a programação de temperatura de 100°C por 2,0min, de 100°C a 200°C a 15°C/min; de 200°C a 230°C a 6°C/min, 230°C por 2,0min; de 230°C a 280°C a 15°C/min; e 280°C por 15,0min.

Condições de análise (C8): foi realizada em um sistema operando em impacto eletrônico (70 eV) equipado com injetor split (250°C) e com proporção split 1/50. A coluna utilizada foi do tipo sílica fundida com fase estacionária DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), utilizando hélio como gás carreador. O fluxo na coluna foi 1,78 mL/min, pressão de 131,4 kPa e aquecimento com a programação de temperatura de 100°C por 2,0min, de 100°C a 200°C a 15°C/min; de 200°C a 230°C a 6°C/min, 230°C por 2,0min; de 230°C a 280°C a 15°C/min; e 280°C por 15,0min.

✓ **Análises quantitativas em GC-MS:**

A padronização do método de extração da lavagem foliar de *M. laevigata* e *M. glomerata* foi baseado na linearidade, seletividade, precisão, exatidão e limite de detecção (ANVISA, 2003).

Tabela 4. Parâmetros utilizados na padronização do método de extração das folhas de *M. laevigata* e *M. glomerata*.

Parâmetros	
Seletividade	Garante que o pico da substância a ser quantificada seja exclusivamente da substância de interesse. Como o método utilizou detecção por espectrometria de massas, a comparação com os espectros dos picos obtidos na separação com o de um padrão, indicou a presença de picos das substâncias puras, nas condições experimentais C8.
Linearidade	É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Neste trabalho, as soluções padrão utilizadas na construção da curva de calibração foram injetadas no cromatógrafo em triplicata, sob as condições de análise C8, da solução menos concentrada para a solução mais concentrada. Foi obtido um valor médio para as áreas dos picos para cada concentração, e plotado um gráfico área do pico x concentração.
Precisão	<u>Intra-dia:</u> foram realizadas 3 extrações para as folhas de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> (procedimento P2), e analisadas sob as condições C8. Os resultados foram expressos através da estimativa do coeficiente de variação (%CV). <u>Inter-dia:</u> foram realizadas 3 extrações para as folhas de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> (procedimento P2), em três dias consecutivos, e as amostras analisadas sob as condições C8. Os resultados foram expressos através da estimativa do coeficiente de variação (%CV).
Exatidão	Foi estimado a partir de ensaios de recuperação, no qual concentrações conhecidas do padrão das substâncias a serem quantificadas foram adicionadas ao solvente extrator, seguindo-se a mesma metodologia de extração/quantificação empregada com a amostra (Procedimento P2, Condições C8). A recuperação é expressa em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz, em um determinado número de ensaios.
Limite de detecção	É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção foi estimado com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base.

3.2.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS – IONIZAÇÃO POR “ELECTROSPRAY”

Utilizou-se esta técnica como auxílio na identificação de algumas substâncias. Foi realizada injeção direta no aparelho, após a solubilização da amostra em solvente apropriado, seguido de filtragem em membrana Millipore (0,45µm).

Condições de análise (C9): Utilizou-se bomba de infusão, fluxo 300µl/h, e o modo de detecção negativo e positivo, dependendo das características químicas da amostra. As amostras foram solubilizadas em H₂O:MeOH(20:80). O aparelho é de alta resolução,

necessitando de calibração interna e externa antes de realizar as análises. Usou-se para calibração interna uma solução de Na-TFA a 10mg/ml e na calibração externa uma solução de formiato de sódio, a 10mM.

3.2.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Utilizou-se esta técnica para a análise de extratos brutos e frações em mistura, bem como para a elucidação estrutural de substâncias isoladas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FITOQUÍMICA DE *M. laevigata*

4.1.1 VISÃO GERAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E/OU IDENTIFICADAS DE *M. laevigata* NESTE ESTUDO

No fluxograma 3 estão apresentadas as substâncias isoladas e/ou identificadas neste estudo, que serão descritos detalhadamente nos itens a seguir.

4.1.2 ANÁLISE E PURIFICAÇÃO DO EXTRATO DA LAVAGEM FOLIAR

A análise do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 /TMS; figura 3) deste extrato permitiu observar a presença predominante de cumarina (Substância 3), cujos deslocamentos químicos encontram-se na região característica de hidrogênios aromáticos ($\delta 7,0$ a $8,0$). A descrição da análise do espectro de RMN de ^1H da cumarina encontra-se no item 4.1.6.3. Além da cumarina, é possível observar a presença de sinais referentes a hidrogênios mais blindados, cujos deslocamentos químicos se encontram na região $\delta 0,7 - 2,4$, que são sinais típicos de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 , comumente encontrados em terpenóides.

Figura 3. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 /TMS) em 400MHz do extrato da lavagem foliar de *M. laevigata*.

Fluxograma 3. Visão geral das substâncias isoladas e/ou identificadas de *M. laevigata*.

O extrato da lavagem foliar também foi analisado em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas, após prévia purificação em coluna Sepack- sílica de fase normal (item 3.2.2.4).

Nesta análise, obteve-se o cromatograma abaixo (figura 4), utilizando as condições experimentais C7, descritas no item 3.2.2.4.

Figura 4. Cromatograma da análise em GC-MS do extrato da lavagem foliar de *M. laevigata*. Condições de análise C7, item 3.2.2.4.

Observa-se que a amostra constitui-se basicamente de 3 picos majoritários, referentes aos tempos 6,48min, 26,67min e 27,91min. Através da comparação dos Espectros de Massas dos picos obtidos com os das bibliotecas Willey e padrões do laboratório, conclui-se tratar respectivamente das substâncias: cumarina, taraxerol e lupeol, cujos Espectros de Massas encontram-se nos itens 4.1.6.3; 4.1.6.2 e 4.1.6.1 respectivamente.

Na tentativa de isolamento de tais substâncias, o extrato, após separação de um precipitado branco, foi submetido a um fracionamento em Coluna Clássica (sílica - fase normal). O precipitado branco foi identificado por GC-MS, e por análise de espectros de RMN de ^1H , como o triterpeno taraxerol (Substância 2 - 4mg), cuja análise espectral encontra-se no item 4.1.6.2.

A coluna cromatográfica foi eluída com os solventes hexano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 84 frações, analisadas e reunidas por CCDC, sendo utilizada como fase móvel DCM:MeOH 95:5.

Tabela 5. Frações obtidas de CC do extrato da lavagem foliar de *M. laevigata*.

Frações reunidas	Massa (mg)	Frações reunidas	Massa (mg)
1-10	21,9	55-59	50,8
11	24,0	60	8,7
12-13	11,3	61	38,8
14-15	36,4	62-63	11,2
16-19	134,7	64-68	6,6
20-23	53,9	69	11,8
24	5,9	70-71	14,8
25-30	26,4	72-76	37,0
31-36	20,9	77	3,3
37	5,2	78-81	8,2
38-43	45,6	82	1,8
44-48	40,0	83	4,5
49-51	14,9	84	21,0
52-54	19,5		

Das frações 16-19, obteve-se a cumarina (Substância **3**), identificada por análise do espectro de RMN de ^1H (item 4.1.6.3).

As frações 11, 12-13 forneceram o triterpeno lupeol (Substância **1** - 30mg), purificado por CCDP (FM: Hexano, AcOEt 9:1, eluída 2 vezes consecutivas). Essa substância foi identificada por Cromatografia Gasosa com detecção por Espectrometria de Massas (Condição C7) e por análise do espectro de RMN de ^1H . A análise espectral encontra-se no item 4.1.6.1.

4.1.3 FRAÇÃO HEXÂNICA PROVENIENTE DO EXTRATO ETANÓLICO

A fração hexânica foi analisada por GC-MS, sob as condições experimentais C6, após “clean-up”, descritos no item 3.2.2.4 e o cromatograma obtido encontra-se na figura 5.

Tal análise nos forneceu como sendo as substâncias majoritárias nesta fração: cumarina (substância **3**; t_R 11,53), diidroocumarina (substância **8**; t_R 11,00), espatulenol (substância **7**, t_R 13,16), óxido do cariofileno (substância **6**; t_R 13,26), ácido beierenóico (substância **4**; t_R 27,72), ácido caurenóico (substância **5**; t_R 29,69), lupeol (substância **1**; t_R 46,13) e acetato de lupeol (substância **9**; t_R 48,96), sendo identificadas por comparação dos MS dos picos obtidos, com MS de compostos das bibliotecas Willey e padrões do laboratório, sendo que todas elas apresentaram similaridade igual ou superior a 94%. Também foi obtido o

IK, o qual permitiu confirmar a presença das substâncias cumarina, diidroscumarina e espatulenol. Os Espectros de Massas das substâncias identificadas estão apresentadas nas figuras 6-12. Os Espectros de Massas do lupeol e cumarina encontram-se nos itens 4.1.6.1 e 4.1.6.3 respectivamente.

Tal análise nos dispensou trabalhar a fração através da fitoquímica clássica.

Figura 5. Cromatograma da análise em GC-MS da fração hexânica do extrato etanólico-95% de *M. laevigata*. Condições de análise C6, item 3.2.2.4.

Figura 6. (a) Espectro de Massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 11,00\text{min}$, (b) MS obtido da biblioteca Willey (diidroscumarina).

Figura 7. (a) Espectro de massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 13,16\text{min}$, (b) MS obtido da biblioteca Willey (espatulenol).

Figura 8. (a) Espectro de massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 13,26$ min, (b) MS obtido da biblioteca Willey (óxido do cariofileno)

Figura 9. (a) Espectro de massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 27,72$ min, (b) MS obtido de padrão do laboratório (ácido beierenóico).

Figura 10. (a) Espectro de massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 29,69$ min, (b) MS obtido de padrão do laboratório (ácido caurenóico).

Figura 11. (a) Espectro de massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 46,13$ min, (b) MS obtido de padrão do laboratório (lupeol).

Figura 12. (a) Espectro de massas obtido por GC-MS (impacto eletrônico), da fração hexânica referente ao pico com $t_R = 48,96$ min, (b) MS obtido de padrão do laboratório (acetato de lupeol).

4.1.4 FRAÇÃO DICLOROMETÂNICA PROVENIENTE DO EXTRATO ETANÓLICO

Após a análise do espectro de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{TMS} - 400\text{MHz}$, figura 13) e obtenção do cromatograma em HPLC (figura 14, condições de análise C1, descrita no item 3.2.2.3) pode-se perceber a predominância de cumarina presente nesta fração.

Figura 13. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 -TMS) em 400MHz da fração DCM do extrato etanólico-95% de *M. laevigata*.

Figura 14. Cromatograma em HPLC (270nm) da fração DCM do extrato etanólico de *M. laevigata*. O pico majoritário com $t_R = 11,9\text{min.}$ refere-se a cumarina, confirmado pela injeção de padrão sob as mesmas condições de análise (C1, item 3.2.2.3).

Optou-se pela separação em coluna cromatográfica por exclusão, utilizando Sephadex LH-20, eluído com metanol. 3,0g de amostra foram separadas em 25 frações, analisadas por CCDC (FM: DCM:MeOH 95:5), e assim reunidas por similaridade (tabela 6).

Tabela 6. Frações obtidas de CC (Sephadex LH-20) da fração DCM.

Frações reunidas	Massa (mg)
1-4	159,1
5-6	442,3
7-10	1072,2
11	192,2
12	314,3
13-14	237,1
15	14,9
16	7,5
17	2,3
18	5,6
19-20	6,9
21-25	6,4

4.1.4.1 Fração 13-14

Devido ao perfil cromatográfico em CCDC apresentar-se com menor complexidade, optou-se pela realização de CCDC dessa fração como método de isolamento. Foi utilizado como fase móvel DCM:MeOH (95:5). Tornou-se possível isolar as substâncias **3** (20mg), **10** (7,8mg) e **11** (3,5mg), sendo estas identificadas por técnicas espectroscópicas, descritas nos itens 4.1.6.3, 4.1.6.4 e 4.1.6.5, respectivamente.

Várias tentativas de purificação das demais frações foram realizadas, tais como CCDC e CC (sílica-fase normal e Sephadex LH-20). Porém a grande quantidade de cumarina presente nas frações dificultou o processo de isolamento de outras substâncias.

4.1.5 FRAÇÃO EM ACETATO DE ETILA PROVENIENTE DO EXTRATO ETANÓLICO

A análise do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 /TMS – 400MHz) permitiu inferir na presença de compostos aromáticos, devido aos deslocamentos químicos entre $\delta 6,5$ – $8,0$, além da presença de açúcares, evidenciado pelos dubletos com deslocamentos químicos nas regiões de $\delta 4,5$ - $5,2$, característicos de hidrogênios ligados a carbonos anoméricos, e $\delta 3,0$ - $4,0$, referentes a hidrogênios oximetínicos, aliado a polaridade relativamente alta da fração (figura 15).

No processo de purificação, optou-se pela separação em coluna cromatográfica por exclusão, utilizando Sephadex LH-20, eluído com metanol. Foram eluídas duas colunas cromatográficas com 4g de amostra, sendo as frações obtidas, reunidas por CCDC (FM:

AcOEt: MeOH: ác.fórmico: ác.acético 100:27:11:11 , reveladores NP e UV, tabela 7). A presença de manchas amarelas, laranjas e azuis devido a utilização de revelador NP/UV, específico para flavonóides e derivados ácidos de fenilpropanóides justifica a presença dos deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos observados no espectro de RMN de ^1H acima citado.

Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 /TMS) em 400MHz da fração AcOEt do extrato etanólico-95% de *M. laevigata*.

Tabela 7. Frações obtidas de CC da fração em AcOEt de *M. laevigata*.

Frações reunidas	Massa (mg)	Frações reunidas	Massa (mg)
1-12	340,0	54-57	81,8
13-16	400,0	58-61	132,1
17-19	213,2	62-66	87,0
20-21	268,0	67-68	25,3
22-24	457,6	69-78	63,0
25-26	313,9	79-80	24,2
27-35	2328,1	81-82	33,1
36-39	191,3	83-89	45,7
40-46	332,9	90-92	17,4
47-49	49,4	93-110	1,3
50-53	158,5		

A cristalização em metanol da fração 27-35, e posterior lavagem com MeOH gelado, forneceu a substância **12** (135mg), cuja análise espectral está apresentada no item 4.1.6.6.

A fração 36-39 foi submetida a CCDP (fase móvel: DCM:MeOH:H₂O 70:30:3), sendo isolado uma mistura constituída das substâncias **12** e **13** (3mg). Sua análise espectral se encontra no item 4.1.6.7.

As frações 50-53 e 54-57 foram analisadas em HPLC-UV-DAD (condições C2, C4, item 3.2.2.3), e submetidas à purificação em coluna C-18 preparativa (figura 16, condições C3, C5, item 3.2.2.3). Deste processo de purificação foram isoladas as substâncias **14** (2,3mg); **16** (33,5mg); a mistura das substâncias **16** e **17** (9,5mg), **18** (3,5mg) e **19** (6,0mg). Suas análises espectrais encontram-se nos itens 4.1.6.8, 4.1.6.10, 4.1.6.11, 4.1.6.12; e 4.1.6.13, respectivamente.

As frações 58-61 forneceram um precipitado amarelado, em metanol. Este foi separado, e lavado com MeOH gelado, fornecendo 7mg da substância **15**. A elucidação estrutural desta substância está descrita no item 4.1.6.9.

Observou-se a formação de um precipitado branco nas frações 22 e 23, estando essas em metanol. Este precipitado foi separado, e lavado com MeOH gelado, obtendo-se 10mg do diterpeno **20**. A elucidação estrutural desta substância está descrita no item 4.1.6.14.

A fração 17, antes de ser reunida às frações 18 e 19, foi submetida a precipitação e lavagem com água, devido a observação da formação de finos cristais. O precipitado forneceu 20mg do *nor*-diterpeno **21**, e sua elucidação estrutural está descrita no item 4.1.6.15.

Figura 16. (a) Cromatograma em HPLC (255nm) da fração 50-53 proveniente da fração AcOEt do extrato etanólico de *M. laevigata*, obtido utilizando coluna ODS preparativa, condição C3, item 3.2.2.3. O pico com $t_R=9,9$ min. refere-se à substância **19**, o pico com $t_R=33,6$ min. refere-se à substância **16** e o pico com $t_R=39,3$ min. refere-se à substância **18**. (b) Cromatograma em HPLC (318nm) da fração 54-57 proveniente da fração AcOEt do extrato etanólico de *M. laevigata*, obtido utilizando coluna ODS preparativa, condição C5, item 3.2.2.3. O pico com $t_R=32,9$ min. refere-se à mistura contendo as substâncias **16** e **17** e o pico com $t_R=34,3$ min. refere-se à substância **14**.

4.1.6 ANÁLISES ESPECTRAIS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

4.1.6.1 Substância 1

O espectro de RMN de ^1H apresenta sinais na região de δ 0,5 a 1,7, entre estes, 7 singletos, integrando para 3H (δ 0,76; 0,79; 0,83; 0,94; 0,97; 1,03; 1,68; figura 18). O Espectro de Massas obtido por GC-MS e sua alta similaridade com o Espectro de Massas de um padrão do laboratório (figura 17), permitiu identificar a substância **1** como o triterpeno lupeol.

Figura 17. Espectro de Massas obtido por GC-MS (t_R = 27,91min) e comparação com o Espectro de Massas obtido por GC-MS de um padrão do laboratório, apresentando 94% de similaridade.

Figura 18. Espectro de RMN DE ^1H da substância **1** – Lupeol (400MHz; CDCl_3 -TMS)

4.1.6.2 Substância 2

O espectro de RMN de ^1H apresenta sinais na região de $\delta 0,5$ a $2,2$, entre estes, 8 singletos, integrando para 3H (figura 20). Apresenta também hidrogênios oximetínicos em $\delta 3,5$ (*dd*, 4,7 e 10,9 Hz) e olefínicos em $\delta 5,52$ (*dd*, 3,2 e 8,2 Hz). A comparação desses dados obtidos com os dados da literatura (tabela 8), aliado ao Espectro de Massas obtido por GC-MS e sua alta similaridade com o Espectro de Massas de um padrão do laboratório (figura 19), tornou possível a identificação da substância **2** como o triterpeno taraxerol.

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 -TMS, 400MHz) da substância **2** e comparação com dados obtidos da literatura.

	Amostra ^1H $\delta(\text{ppm})$; <i>mult</i> , J(Hz)	Literatura* H $\delta(\text{ppm})$; <i>mult</i>
CH_3	0,80; s; 3H	0,80; s; 3H
CH_3	0,82; s; 3H	0,82; s; 3H
CH_3	0,90; s; 6H	0,91; s; 3H
CH_3	0,93; s; 3H	0,95; s; 6H
CH_3	0,95; s; 3H	0,96; s; 3H
CH_3	0,97; s; 3H	0,97; s; 3H
CH_3	1,09; s; 3H	1,09; s; 3H
CH-OH	3,50; <i>dd</i> ;4,7;10,9	3,50; <i>m</i> ; 1H
CH=C	5,52; <i>dd</i> ;3,2;8,2	5,52; <i>m</i> ;1H

ZHI-DA et al, 1989.

Figura 19. Espectro de Massas obtido por GC-MS ($t_R = 26,67\text{min}$) e comparação com o Espectro de Massas obtido por GC-MS de um padrão do laboratório, apresentando 91% de similaridade.

Figura 20. Espectro de RMN DE ^1H da substância **2** – Taraxerol (400MHz; CDCl_3 -TMS)

4.1.6.3 Substância 3

Cumarina

A análise do espectro de RMN de ^1H (figura 24) permite identificar a presença de quatro sinais de hidrogênios aromáticos (δ 7,50; 7,29; 7,54; 7,35), indicando um anel dissustituído. A presença de dois *td* (δ 7,29 e 7,54) contendo constante de acoplamento *orto* e *meta* ($J=7,8$ e $1,3\text{Hz}$) já são um indicativo da substituição abaixo (figura 21), sendo confirmada pela presença dos sinais δ 7,50; *dd*; 7,8 e $1,3\text{Hz}$ e δ 7,35; *d*; 7,8Hz.

Figura 21. Padrão de substituição do anel aromático da substância 3.

Além desses hidrogênios, a presença de dois dubletos com $J=9,5\text{Hz}$ (δ 6,44 e 7,72), indica a presença de hidrogênios olefínicos com configuração *cis*, e devido a seus deslocamentos químicos próximos a região de aromáticos, conclui-se tratar de uma dupla ligação conjugada ao anel aromático (figura 22).

Figura 22. Presença de dupla ligação com configuração *cis*, na substância 3.

A ausência de outros hidrogênios no espectro de RMN de ^1H , aliado a comparação com dados obtidos na literatura acerca dos deslocamentos químicos da cumarina, e ao isolamento dessa substância em *M. laevigata*, já descrito na literatura (OLIVEIRA et al, 1984), nos levou à identificação da mesma. Os dados de RMN de ^1H (CDCl_3 -TMS, 400MHz) da substância 3 e comparação com dados obtidos da literatura estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 -TMS, 400MHz) da substância **3** e comparação com dados obtidos da literatura.

Posição	Amostra ^1H $\delta(\text{ppm})$; <i>mult</i> , <i>J</i> (Hz)	Literatura* ^1H $\delta(\text{ppm})$; <i>mult</i>
H ₃	6,44; <i>d</i> ; 9,5	6,3, <i>d</i>
H ₄	7,72; <i>d</i> ; 9,5	7,65, <i>d</i>
H ₅	7,50; <i>dd</i> ; 7,8; 1,3	7,52, <i>m</i>
H ₆	7,29; <i>td</i> ; 7,8; 1,3	7,02, <i>m</i>
H ₇	7,54; <i>td</i> ; 7,8; 1,3	7,52, <i>m</i>
H ₈	7,35; <i>d</i> ; 7,8	7,02, <i>m</i>

*OLIVEIRA et al, 1984.

Foi obtido também o Espectro de Massas da substância, por GC-MS e comparado com Espectros de Massas da biblioteca Willey, apresentando 97% de similaridade com a cumarina (figura 23).

Figura 23. Espectro de Massas obtido por GC-MS ($t_r = 6,48\text{min}$) e comparação com o Espectro de Massas obtido por GC-MS da biblioteca Willey, apresentando 97% de similaridade.

Figura 24. Espectro de RMN DE ^1H da substância **3** – Cumarina (400MHz; CDCl_3 -TMS)

4.1.6.4 Substância 10

Ácido *orto*-[(5'-hidroxi)-*cis*-cinamoila]-*trans*-cinâmico

O espectro de RMN de ^1H (400MHz, DMSO- d_6 -TMS) evidencia a presença de uma substância contendo hidrogênios aromáticos e olefínicos, devido a sinais com deslocamentos químicos na região de $\delta 6,0$ a $8,0$ (figura 28). Tal fato, aliado a intensa revelação com KOH-UV após CCDC, permite propor uma substância altamente conjugada.

Os dubletos $\delta 6,50$; $J=9,5\text{Hz}$ e $\delta 8,08$; $J=9,5\text{Hz}$ inferem na presença de dupla ligação com configuração *cis*, conjugada ao anel aromático, o que é similar aos deslocamentos e constantes de acoplamento dos hidrogênios H_3 e H_4 da cumarina (tabela 9). Além desses sinais, observou-se a presença dos dubletos $\delta 6,47$; $J=15,1\text{Hz}$ e $\delta 7,76$; $J=15,1\text{Hz}$, cujas constantes de acoplamento revelam a presença de hidrogênios olefínicos com configuração *trans*, também conjugado a um anel aromático. Os oito sinais restantes apresentaram deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos e constantes de acoplamento *orto* ($J=7,0\text{Hz}$ a $8,0\text{Hz}$).

A observação no RMN de ^{13}C de carbonos quaternários, com deslocamentos químicos em $\delta 153,7$ e $156,8$, infere na presença de carbonos aromáticos oxigenados. Os sinais de ^{13}C em $\delta 160,2$ e $169,2$, evidenciam a presença de carbonilas das funções éster e ácido, respectivamente (figura 29).

A análise comparativa dos espectros de RMN de ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6 -TMS) com as substâncias ácido *trans*-*o*-cumárico e cumarina (tabelas 10 e 11), obtidos da literatura, nos possibilitou inferir na presença das duas subunidades na amostra, confirmados pela análise dos mapas de contorno do HMQC e HMBC, cujas correlações estão especificadas na tabela 12. A possibilidade de haver as duas substâncias em mistura na proporção de 1:1 foi descartada após a análise por Espectrometria de Massas (“electrospray”, modo negativo,

figura 32). A obtenção dos íons 309m/z e 327m/z propõe uma estrutura de massa molecular 310u.m.a. e formação de um aduto com H₂O, respectivamente (m/z [M – H][–] 309,0785, calculado para C₁₈H₁₃O₅, 309,0757).

A proposta abaixo foi descartada devido as correlações de H₂ e H₃ (hidrogênios com constante de acoplamento *cis*) com a carbonila da função éster (δ160,3). Na figura 25, esses hidrogênios se correlacionariam com a carbonila da função ácido (δ169,2).

Figura 25. Proposta descartada, devido a correlação dos hidrogênios H₂' e H₃', os quais possuem configuração *cis*, com um carbono δ160,3, característico de função éster.

Tabela 10. Dados de RMN de ¹³C (DMSO-d₆-TMS, 100MHz) de parte da substância **10** e comparação com ácido *trans*-o-cumárico obtido da literatura.

Posição	δ ¹³ C-ppm Amostra	Literatura*
1	169,2	167,8
2	120,6	118,1
3	138,1	139,4
4	121,6	120,7
5	156,8	156,4
6	116	115,9
7	131,1	131,2
8	119,4	119,2
9	128,7	128,4

Figura 26. Estrutura do ácido *trans*-o-cumárico.

* Dado obtido no site <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html>

Tabela 11. Dados de RMN de ¹³C (DMSO-d₆-TMS, 100MHz) de parte da substância **10** e comparação com cumarina obtido da literatura.

Posição	δ ¹³ C-ppm Amostra	Literatura*
1'	160,2	160,6
2'	116	116,6
3'	144,5	143,5
4'	119,0	118,8
5'	153,7	154,0
6'	116	116,7
7'	132,2	131,8
8'	124,8	124,4
9'	128,5	127,9

* Dado obtido no site <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html>

Figura 27. Estrutura da cumarina.

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 -TMS, 400MHz e 100MHz) e dos mapas de contorno do HMQC e HMBC da substância **10**.

Posição	^1H (δ -ppm; mult.; J -Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ -ppm	DEPT	HMBC
1	-	169,2	C	-
2	6,47; <i>d</i> ; 15,1	120,6	CH	-
3	7,76; <i>d</i> ; 15,1	138,1	CH	C ₉
4	-	121,6	C	-
5	-	156,8	C	-
6	6,91; <i>d</i> ; 8,1	116,5*	CH	C ₈ ; C ₄ ; C ₅
7	7,18; <i>t</i> ; 7,5	131,1	CH	C ₆ ; C ₉ ; C ₅
8	6,80; <i>t</i> ; 7,3	119,4	CH	C ₆
9	7,52; <i>d</i> ; 7,5	128,7	CH	C ₇ ; C ₃ ; C ₅
1'	-	160,2	C	-
2'	6,50; <i>d</i> ; 9,5	116,3*	CH	C ₄ '; C ₁ '
3'	8,08; <i>d</i> ; 9,5	144,5	CH	C ₂ '; C ₄ '; C ₉ '; C ₅ '; C ₁ '
4'	-	119,0	C	-
5'	-	153,7	C	-
6'	7,41; <i>d</i> ; 8,3	116,5*	CH	C ₄ '; C ₅ '; C ₈ '; C ₇ '
7'	7,63; <i>td</i> ; 1,3; 7,2	132,2	CH	C ₆ '; C ₈ '; C ₉ '; C ₅ '
8'	7,36; <i>t</i> ; 7,4	124,8	CH	C ₆ '; C ₉ '
9'	7,73; <i>d</i> ; 7,9	128,5	CH	C ₇ '; C ₃ '; C ₅ '

* podem ser trocados.

Figura 28. Espectro de RMN DE ^1H da substância **10** – ácido *orto*-[(5'-hidroxi)-*cis*-cinamofila]-*trans*-cinâmico (400MHz; DMSO- d_6 -TMS)

Figura 29. Espectros de RMN DE ^{13}C /DEPT 135° da substância **10** – ácido *orto*-[(5'-hidroxi)-*cis*-cinamoila]-*trans*-cinâmico (100MHz; DMSO- d_6 -TMS)

Figura 30. Mapa de contorno do HMQC da substância **10** - ácido *orto*-[(5'-hidroxi)-*cis*-cinamoila]-*trans*-cinâmico (100MHz/400MHz; DMSO- d_6 -TMS)

Figura 31. Mapa de contorno do HMBC da substância **10** - ácido *orto*-(5'-hidroxi)-*cis*-cinamoila]-*trans*-cinâmico (100MHz/400MHz; DMSO-d₆-TMS)

Figura 32. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo da substância **10** - ácido *orto*-[(5'-hidroxi)-*cis*-cinamoíla]-*trans*-cinâmico

4.1.6.5 Substância 11

3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído

O espectro de RMN de ^1H (figura 33) revelou a presença de 3 singletos. O sinal em $\delta 9,8$; 1H, é característico de hidrogênio aldeídico tendo como vizinho um carbono quaternário. O sinal em $\delta 7,1$; 2H, é característico de hidrogênios aromáticos de anéis tetrassubstituídos, com plano de simetria. O sinal em $\delta 3,9$, 6H; revela a presença de duas metoxilas, estando essas em ambientes químicos similares. Com base nessas informações espectrais e comparação com dados da literatura (tabela 13), aliado a ampla ocorrência no reino vegetal, propomos tratar-se da substância 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído, também conhecido como siringaldeído.

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 -TMS, 400MHz) da substância 11 e comparação com dados de RMN de ^1H (CDCl_3 -TMS) de 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ -ppm; <i>mult</i>)	Literatura* (δ -ppm; <i>mult</i>)
$\text{H}_{2,6}$	7,1; <i>s</i>	7,16; <i>s</i>
OMe	3,9; <i>s</i>	3,96; <i>s</i>
CHO	9,8; <i>s</i>	9,8; <i>s</i>

* GUTIERREZ & HERZ, 1988

Figura 33. Espectro de RMN DE ¹H da substância **11** –3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído (400MHz; CDCl₃-TMS)

4.1.6.6 Substância 12

***trans*-melilotosido**

Analisando o espectro de RMN de ^1H da substância (figuras 34 e 35), observa-se uma semelhança ao espectro de RMN de ^1H da substância **10** (figura 28). A presença dos dois dubletos em $\delta 6,53$ e $\delta 7,91$, com constantes de acoplamento $J=16,2\text{Hz}$, indicam a dupla ligação com configuração *trans*, em ressonância com o anel aromático. Os sinais em $\delta 7,91$; $7,19$; $7,37$ e $7,03$ referem-se aos hidrogênios do anel aromático 1,2-dissubstituído. O sinal $\delta 5,01$; d ; $7,3\text{Hz}$, é característico de hidrogênio ligado a carbono anomérico de um *O*- β -D-glicosídeo (HARBORNE, 1994).

O espectro de RMN de ^{13}C (figura 36) apresentou 15 sinais, dentre eles, os quaternários $\delta 168,2$; indicativo de ácido carboxílico, e $\delta 155,9$, indicativo de carbono sp^2 oxigenado, o sinal em $\delta 100,3$, referente ao carbono anomérico, e os 5 sinais entre $\delta 69 - 77$, referentes aos demais carbonos do açúcar.

O espectro de HMBC permitiu identificar a posição do açúcar no oxigênio ligado a C_5 , devido a correlação entre o hidrogênio anomérico $\text{H}_{1'}$ ($\delta 5,01$) e C_5 ($\delta 155,9$) (tabela 14; figura 38).

A comparação dos dados espectrais com os dados da literatura permitiu propor tratar-se do ácido *orto*- β -D-glicopiranosídeo-*trans*-cinâmico, também conhecido como *trans*-melilotosido.

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 -TMS, 400MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **12**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ -ppm; mult.; J -Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ -ppm	DEPT	HMBC	Literatura*
1	-	168,2	C	-	167,8
2	6,53; <i>d</i> ; 16,2	119,9	CH	C_3 ; C_1 ; C_4	119,6
3	7,91; <i>d</i> ; 16,2	139,2	CH	C_1 ; C_9 ; C_2 ; C_4 ; C_5	138,6
4	-	123,6	C	-	121,8
5	-	155,9	C	-	155,5
6	7,19; <i>d</i> ; 8,08	115,4	CH	C_5 ; C_4 ; C_8	115,0
7	7,37; <i>td</i> ; 1,4; 7,76	131,9	CH	C_5 ; C_9 ; C_6	131,4
8	7,03; <i>t</i> ; 7,44	122,3	CH	C_9	123,3
9	7,70; <i>dd</i> ; 1,4; 7,72	128,4	CH	C_3 ; C_7 ; C_5	128,0
1'	5,01; <i>d</i> ; 7,32	100,3	CH	C_5	94,9
2'	3,3; <i>m</i>	73,6	CH	-	73,2
3'	3,3; <i>m</i>	77,1	CH	-	76,7
4'	3,20; <i>t</i> ; 8,8	69,9	CH	-	69,5
5'	3,3; <i>m</i>	77,4	CH	-	77,0
6'	3,69; <i>d</i> ; 11,3 e 3,5; <i>m</i>	60,9	CH_2	-	60,5

*PUROHIT et al, 1993; dados obtidos em DMSO- d_6 , referentes à substância metilada.

Figura 34. Espectro de RMN DE ^1H da substância **12** –*trans*-melilotosido (400MHz, DMSO- d_6 -TMS)

Figura 35. Expansão do espectro de RMN DE ^1H da substância **12- trans-melilotosido** (400MHz, DMSO- d_6 -TMS)

Figura 36. Espectros de RMN DE ^{13}C /DEPT 135° da substância **12** - *trans*-melilotosido (100MHz, DMSO- d_6 -TMS)

Figura 37. Mapa de contorno do HMQC da substância **12** - *trans*-melilotosido (100MHz/400MHz, DMSO- d_6 -TMS)

Figura 38. Mapa de contorno do HMBC da substância **12** - *trans*-melilotosido (100MHz/400MHz, DMSO-d₆-TMS)

4.1.6.7 Substâncias 12 e 13

trans-melilotosido *cis*-melilotosido

A análise do espectro de RMN de ^1H desta amostra (figuras 39 e 40) revelou tratar-se de uma mistura de dois compostos, no qual um deles trata-se do *trans*-melilotosido, baseado na comparação dos dados obtidos deste espectro àqueles dessa substância previamente descrita (item 4.1.6.6).

Foi observado que os hidrogênios do outro componente da mistura apresentaram as mesmas multiplicidades do *trans*-melilotosido, porém com algumas diferenças nos deslocamentos químicos e algumas constantes de acoplamento, indicando tratar-se uma substância similar. Os hidrogênios $\delta 5,8$; d ; 12,7Hz e $\delta 6,4$; d ; 12,7Hz; que representam uma dupla ligação com configuração *cis*, permite identificar o ácido *cis*-O-cumárico. O sinal $\delta 4,82$; d ; 7,0Hz, referente ao hidrogênio anomérico, indica uma glicosilação, estando esta localizada em C5, baseado na correlação entre esse hidrogênio e o carbono $\delta 155$, observada nos mapas de contorno do HMBC (figura 41).

Os dados de RMN de ^1H do componente *cis* dessa mistura (*cis*-melilotosido) estão apresentados na tabela 15, juntamente com aqueles obtidos da literatura.

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 -TMS, 400MHz) da substância **13**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ -ppm; mult.; J -Hz)	Literatura*
1	-	-
2	5,87; <i>d</i> ; 12,7	5,97; <i>d</i> ; 12,7
3	6,41; <i>d</i> ; 12,7	7,28; <i>d</i> ; 12,7
4	-	-
5	-	-
6	7,03; <i>d</i> ; 8,1	7,18; <i>d</i> ; 8,4
7	7,10; <i>t</i> ; 7,3	7,30; <i>dd</i> ; 8,4; 7,5
8	6,84; <i>t</i> ; 7,2	6,97; <i>dd</i> ; 7,8; 7,5
9	7,79; <i>d</i> ; 7,3	7,54; <i>d</i> ; 7,8
1'	4,82; <i>d</i> ; 7,0	4,93; <i>d</i> ; 7,3

*VASANGE et al, 1997; dados obtidos em CD_3OD .

Figura 39. Espectro de RMN DE ^1H das substâncias **12** e **13** – *trans*-melilotosido e *cis*-melilotosido (400MHz, DMSO- d_6 -TMS)

Figura 40. Expansão do espectro de RMN DE ^1H das substâncias **12** e **13** – *trans*-melilotosido e *cis*-melilotosido (400MHz, DMSO- d_6 -TMS)

Figura 41. Mapa de contorno do HMBC das substâncias **12** e **13** – *trans*-melilotosido e *cis*-melilotosido. (125/500MHz, DMSO-d₆-TMS)

4.1.6.8 Substância 14

3,5-dicafeoilquinato de metila

O espectro de RMN de ^1H apresentou 4 dupletos com constantes de acoplamento 15,9 e 15,8 Hz (δ 7,62; 7,55; 6,34; 6,22), o que indica hidrogênios de duplas ligações com configuração *trans*, além de 6 hidrogênios aromáticos (δ 7,06, *s*, 2H; δ 6,79, *d*, 8,1 Hz; δ 6,78, *d*, 8,1 Hz; δ 6,96, *d*, 8,1 Hz, 2H). Também foi observada a presença de uma metila em δ 3,69, *s*, 3H, além de multipletos na região de hidrogênios oximetínicos, em δ 3,9; δ 5,3-5,4 (figuras 42 e 43). Tais dados permitiram propor tratar-se de um derivado do ácido quínico, por comparação a dados da literatura, sendo este dissubstituído por derivados do ácido caféico, devido a presença dos 6 hidrogênios aromáticos e dos 4 hidrogênios de duplas ligações *trans*, acima citados. A partir das análises nos mapas de contorno do HMBC (figura 44), tornou-se possível inferir na esterificação do ácido carboxílico, localizado na posição 1 do ácido quínico, devido a correlação observada entre a metila em δ 3,69 e o carbono δ 174,4 (carbonila do éster metílico). Tal fato descarta a possibilidade de umas das substituições ser a feruloíla, e portanto, trata-se de um derivado dicafeoilquínico.

As posições dos grupos cafeoíla foram determinadas com base nos valores de deslocamentos químicos de H-3; H-4 e H-5, do ácido quínico, e comparação destes com os da literatura para os isômeros 3,4-; 3,5- e 4,5-O-dicafeoilquínico (tabela 16). Estes dados confirmaram a identidade da estrutura da substância isolada como sendo 3,5-dicafeoilquinato de metila.

Tais proposições foram confirmadas pelos dados obtidos em ESI-MS (modo negativo, figura 45). A obtenção do íon 529 m/z propõe uma estrutura de massa molecular 530 u.m.a.

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD -TMS, 500MHz - $\delta(\text{ppm})$; mult; $J(\text{Hz})$) da substância **14**, e comparação com substâncias similares, da literatura.

Posição	Amostra	Ácido 3,5-O-dicafeoilquínico*	Ácido 4,5-O-dicafeoilquínico*	Ácido 3,4-O-dicafeoilquínico*
2	2,1-2,3; <i>m</i>	2,20-2,35, <i>m</i>	2,12-2,37; <i>m</i>	2,11-2,29; <i>m</i>
3	5,31; <i>m</i>	5,38; <i>m</i>	4,35; <i>m</i>	5,63; <i>m</i>
4	3,98, <i>m</i>	3,97; <i>dd</i> ; 3,0; 9,0	5,00; <i>dd</i> ; 3,0; 9,0	5,12; <i>d br</i> ; 3,0
5	5,40; <i>m</i>	5,43; <i>s br</i> ;	5,63; <i>s br</i>	4,36; <i>s br</i>
6	2,1-2,3; <i>m</i>	2,20-2,35, <i>m</i>	2,12-2,37; <i>m</i>	2,11-2,29; <i>m</i>
2'/2''	7,06; <i>s</i>; 2H	7,07; <i>s br</i>	7,01; <i>s br</i> 7,03; <i>s br</i>	7,00; <i>d</i> ; 2,0 7,03; <i>d</i> ; 2,0
5'/5''	6,79; <i>d</i>; 8,1Hz; 1H 6,78; <i>d</i>; 8,1Hz; 1H	6,78; <i>d</i> ; 8,0	6,72; <i>d</i> ; 8,0 6,77; <i>d</i> ; 8,0	6,73; <i>d</i> ; 8,0 6,74; <i>d</i> ; 8,0
6'/6''	6,96; <i>d</i>; 8,1Hz; 2H	6,97; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,96; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	6,86; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,91; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	6,88; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,90; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0
7'/7''	7,62; <i>d</i>; 15,8Hz 1H 7,55; <i>d</i>; 15,9Hz; 1H	7,60; <i>d</i> ; 16,0 7,51; <i>d</i> ; 16,0	7,54; <i>d</i> ; 16,0 7,57; <i>d</i> ; 16,0	7,60; <i>d</i> ; 16,0
8'/8''	6,34; <i>d</i>; 15,9Hz; 1H 6,22; <i>d</i>; 15,8Hz; 1H	6,36; <i>d</i> ; 16,0 6,26; <i>d</i> ; 16,0	6,25; <i>d</i> ; 16,0 6,28; <i>d</i> ; 16,0	6,27; <i>d</i> ; 16,0 6,18; <i>d</i> ; 16,0
MeO-	3,69; <i>s</i>; 3H			

*ISLAM et al; 2002, obtidos em CD_3OD .

Figura 42. Espectro de RMN DE ^1H da substância **14** – 3,5-dicafeoilquinato de metila. (500MHz; $\text{CD}_3\text{OD}-\text{TMS}$).

Figura 43. Expansões do espectro de RMN DE ^1H da substância **14** – 3,5-dicafeoilquinato de metila (500MHz; $\text{CD}_3\text{OD-TMS}$).

Figura 44. Mapa de contorno do HMBC da substância **14** – 3,5-dicafeoilquinato de metila (500/125MHz; CD₃OD-TMS).

Figura 45. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo (ESI-MS) da substância **14** – 3,5-dicafeoilquinato de metila

4.1.6.9 Substância 15

3,3',5 – triidroxi – 4',6,7- trimetoxiflavona

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 18 carbonos, sendo 11 carbonos quaternários, entre $\delta 104,4$ e $176,3$; 3 carbonos metoxílicos ($\delta 60,2$; $56,5$ e $55,7$) e 4 metínicos na região de aromáticos ($\delta 91,2$; $114,8$; $111,8$ e $120,0$). Esses dados, aliado a presença de 4 hidrogênios em $\delta 6,89$; $7,71$; $7,12$ e $7,75$ e 3 oximetínicos em $\delta 3,76$; $3,95$; $3,88$ observados no espectro de RMN de ^1H , são condizentes com a estrutura de uma aglicona de um flavonóide trimetoxilado (figuras 51 e 52).

Um flavonóide não substituído apresenta 10 posições possíveis de serem hidrogenadas. O espectro de RMN de ^1H apresentou 4 hidrogênios aromáticos e 3 metoxilas, indicando a presença de 3 hidroxilas.

Análise do anel A:

A observação de um singlete largo em $\delta 12,43$ no espectro de RMN de ^1H indica a presença de uma hidroxila ácida na posição 5 da estrutura de um flavonóide.

A presença de um singlete em $\delta 6,89$ e suas correlações com os carbonos $\delta 176,3$ (referente a carbonila) e $\delta 131,3$ e $158,7$ (que se correlacionam com as metoxilas em $\delta 60,2$ e $56,5$ nos mapas de contorno de HMBC), indica que o anel A apresenta-se trissubstituído, por duas metoxilas e uma hidroxila na posição 5. A correlação entre o hidrogênio $\delta 6,89$ e o carbono $\delta 176,3$ descarta a possibilidade de uma estrutura com duas metoxilas nas posições 6 e 8, devido a grande distância desse acoplamento (5 ligações).

Figura 46. Proposta descartada, devido a correlação observada, nos mapas de contorno do HMBC, entre o hidrogênio $\delta 6,89$, *s*; e a carbonila em $\delta 176,3$.

Diante do exposto, há duas propostas referentes ao anel A, apresentadas a seguir:

Proposta 1

Proposta 2

Figura 47. Propostas estruturais para o anel A.

A comparação dessas duas possibilidades com valores obtidos da literatura (AGRAWAL, 1980), descarta a proposta 2, visto que os valores dos carbonos metoxilados ($\delta 131,3$ e $158,7$) e o carbono metínico ($\delta 91,2$), encontrados no espectro de RMN de ^{13}C apresentam-se similares aos dados de RMN de ^{13}C para a proposta 1. Na proposta 2, o carbono da posição 6 apresenta-se em regiões mais desblindadas no espectro de RMN de ^{13}C (aproximadamente em $\delta 98$).

As análises discutidas acima, as correlações observadas no espectro de HMBC e HMQC, e a comparação com a literatura (AGRAWAL, 1980) permite selecionar para o anel A os carbonos $151,1^*$ (C-5); $131,3$ (C-6); $158,7$ (C-7); $91,2$ (C-8); $151,7^*$ (C-9) e $104,4$ (C-10) (*podem ser trocados).

Análise do anel B:

A presença de 3 hidrogênios aromáticos no espectro de RMN de ^1H ($\delta 7,71$, *d*, $2,25\text{Hz}$; $\delta 7,12$, *d*, $8,49\text{Hz}$ e $\delta 7,75$, *m*) com constantes de acoplamento *meta* ($\delta 7,71$) e *orto* ($\delta 7,12$); indicam a presença de um anel dissustituído, apresentando como padrão de substituição o esqueleto a seguir (figura 48), com base nas constantes de acoplamento (*orto* e *meta*) e multiplicidade, obtidos no espectro de RMN de ^1H .

Figura 48. Padrão de substituição do anel B

Com base na análise dos mapas de contorno do HMQC, e nas constantes de acoplamento, observados no espectro de RMN de ^1H , pode-se concluir que:

Posição	δ_{H}, J	δ_{C}
2'	7,71, <i>meta</i>	114,8
5'	7,12, <i>orto</i>	111,8
6'	7,75	120,0

As correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC, entre os hidrogênios H2', H5' e H6', e o carbono metoxilado em $\delta_{149,6}$, indica a presença da metoxila neste anel, tornando possível as duas possibilidades estruturais abaixo.

Figura 49. Propostas estruturais para o anel B.

A correlação existente nos mapas de contorno do HMBC, entre o hidrogênio H6' ($\delta_{7,75}$) e o carbono metoxilado em $\delta_{149,6}$, descarta a proposta 1 (figura 50), devido a grande distância desse acoplamento (4 ligações).

Figura 50. Proposta 1, descartada devido a existência da correlação entre H-6' e o carbono metoxilado $\delta_{149,6}$.

Análise do anel C:

A ausência de outro singlete em $\delta 6,7 - 7,1$ ou sinais em $\delta 3,2 - 4,5$, no espectro de RMN de ^1H , descarta a possibilidade de ser flavona, flavanona ou diidroflavonol, respectivamente (HARBORNE, 1994). Tal fato indica uma substituição na posição 3, revelando tratar-se de um flavonol.

Portanto, a estrutura proposta é o flavonóide 3,3',5 – triidroxi – 4',6,7-trimetoxiflavona e os dados espectroscópicos obtidos, assim como a comparação com dados obtidos da literatura estão apresentados na tabela a seguir.

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H (300MHz), e de ^{13}C (75MHz), e as correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC (DMSO- d_6 -TMS) obtidos para a substância **15**, e comparação com dados obtidos da literatura.

Posição	H (δ -ppm; <i>mult.;J-Hz</i>)	$\delta^{13}\text{C}$ -ppm	DEPT	HMBC	Literatura*
2	—	147,0	C	—	151,9
3	—	136,3	C	—	140,0
4	—	176,3	C	—	180,5
5	—	151,1**	C	—	151,3
6	—	131,3	C	—	131,2
7	—	158,7	C	—	158,0
8	6,89; <i>s</i>	91,2	CH	C10; C6; C9; C7; C4	91,8
9	—	151,7**	C	—	156,2
10	—	104,4	C	—	107,4
1'	—	123,4	C	—	124,5
2'	7,71; <i>d</i> ; 2,25	114,8	CH	C6'; C2; C4'	116,4
3'	—	146,3	C	—	147,2
4'	—	149,6	C	—	147,8
5'	7,12; <i>d</i> ; 8,49	111,8	CH	C1'; C3'; C4'	112,5
6'	7,75; <i>m</i>	120,0	CH	C2'; C4'; C2	122,3
OMe – 6	3,76; <i>s</i>	60,2	CH ₃	C6	60,8
OMe – 7	3,95; <i>s</i>	56,5	CH ₃	C7	57,2
OMe – 4'	3,88; <i>s</i>	55,7	CH ₃	C4'	56,6

* Dados obtidos de BAI et al, 2005, usando CD₃OD como solvente.

** Podem ser trocados.

Figura 51. Espectro de RMN DE ^1H da substância **15** – 3,3',5 – triidroxi – 4',6,7- trimetoxiflavona (300MHz, DMSO-d_6 -TMS)

Figura 52. Espectros de RMN DE ^{13}C /DEPT 135° da substância **15** – 3,3',5 – triidroxi – 4',6,7- trimetoxiflavona (75MHz, DMSO- d_6 -TMS)

Figura 53. Mapa de contorno do HMBC da substância **15** – 3,3',5 – triidroxi – 4',6,7- trimetoxiflavona (75MHz/300MHz, DMSO-d₆-TMS)

HMBCGP

Figura 54. Mapa de contorno do HMBC da substância **15** – 3,3',5 – triidroxi – 4',6,7- trimetoxiflavona (75MHz/300MHz, DMSO-d₆-TMS)

4.1.6.10 Substância 16

3-O- β -D-glicosil-patuletina

A partir da análise dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (figuras 59 e 60), chegou-se à conclusão de que se trata de um flavonóide glicosilado.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 22 carbonos, sendo 11 quaternários; 9CH; 1CH₂ e 1CH₃. Os carbonos δ 104,5; 75,8; 78,3; 71,2; 78,1 e 62,6 foram atribuídos à glicose, a partir de análises dos mapas de contorno do HMQC, e comparação com valores de deslocamentos químicos obtidos na literatura (AGRAWAL, 1989).

A identificação da aglicona do flavonóide foi realizada a partir dos deslocamentos químicos dos carbonos restantes.

Análise do anel A:

O singlete em δ 6,50, no espectro de RMN de ^1H , foi atribuído a um hidrogênio do anel A, podendo caracterizar o H-6 ou H-8, dependendo do padrão de substituição do anel A. A partir desta informação, pode-se propor duas possibilidades para o anel A (ver figura 55).

Figura 55. (a) Substituição na posição 6 e (b) Substituição na posição 8.

Somando às informações apresentadas acima, observamos nos mapas de contorno do HMBC e HMQC as seguintes correlações (ver tabela 18).

Tabela 18. Correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC, relacionadas ao anel A.

δH – ppm, mult, integração	HMQC	HMBC
6,44; s; 1H	95,1	106,1; 132,7; 153,5
3,86; s; 3H	61,0	132,7

A partir desses dados, pode-se propor a presença de uma metoxila (δ 61,0) no anel A, estando esta ligada ao carbono δ 132,7. Desta forma a metoxila poderia estar localizada no C-6 ou C-8, dependendo de onde está a oxigenação. Após comparação dos dados observados para a amostra em análise e os da literatura (AGRAWAL, 1989), conclui-se tratar de um anel metoxilado na posição 6 (figura 56).

Figura 56. (a) Deslocamentos químicos dos carbonos do anel A de um flavonóide metoxilado na posição 6; (b) Deslocamentos químicos dos carbonos do anel A de um flavonóide metoxilado na posição 8 (AGRAWAL, 1989); (c) Deslocamentos químicos dos carbonos do anel A da amostra, e suas correlações nos mapas de contorno do HMBC, nas quais os inícios das setas indicam os hidrogênios, e as pontas das setas indicam os carbonos.

Análise do anel B:

Os sinais de RMN em δ 7,71; s; 6,86; s; e 7,55; d; 6,7Hz foram atribuídos aos hidrogênios do anel B, tornando possível propor o seguinte padrão de substituição para este anel (figura 57):

Figura 57. Padrão de substituição proposto para o anel B.

Nos mapas de contorno do HMBC e do HMQC observou-se as seguintes correlações (ver tabela 19):

Tabela 19. Correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC, relacionadas ao anel B

δH – ppm, <i>mult</i> , integração	HMQC	HMBC
6,86; <i>sl</i>	116,0	123,3; 145,9
7,55; <i>d</i> ; 6,7Hz	123,1	117,7; 149,9; 159,2
7,71; <i>s</i>	117,7	123,3; 145,9; 149,9; 159,2

Reunindo todas as informações espectrais confirmamos o padrão de substituição proposto, sendo assim determinadas as posições dos carbonos (figura 58):

Figura 58. Deslocamentos químicos dos carbonos do anel B da amostra, e suas correlações nos mapas de contorno do HMBC, nas quais os inícios das setas indicam os hidrogênios, e as pontas das setas indicam os carbonos.

Tornou-se possível atribuir a posição 3 como sendo glicosilada, a partir da correlação entre o hidrogênio anomérico e o carbono $\delta 135,4$, nos mapas de contorno do HMBC. Tal dado é compatível com aquele encontrado na literatura (tabela 20).

A substância foi então identificada como sendo 3-O- β -D-glicosil-patuletina, e sua massa molecular (m/z 493) é compatível com a fórmula molecular $C_{22}H_{22}O_{13}$, por ESI-MS (modo negativo, figura 63).

Tabela 20. Dados de RMN de 1H (500MHz), e de ^{13}C (125MHz), e as correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC (CD_3OD -TMS) obtidos para a substância **16**, e comparação com dados obtidos da literatura.

Posição	H (δ -ppm; <i>mult</i> ; J(Hz))	$\delta^{13}C$	DEPT	HMBC	Literatura*
2		159,2	C		159,2
3		135,4	C		135,4
4		179,7	C		179,8
5		153,7	C		154,0
6		132,7	C		132,8
7		159,0	C		159,1
8	6,44; <i>s</i>	95,1	CH	C10; C6; C9	94,9
9		153,5	C		153,9
10		106,1	C		106,3
1'		123,3	C		123,3
2'	7,71; <i>s</i>	117,7	CH	C1'; C3'; C4'; C2	117,7
3'		145,9	C		145,9
4'		149,9	C		149,9
5'	6,86; <i>sl</i>	116,0	CH	C1'; C3'	116,1
6'	7,55; <i>d</i> ; 6,7	123,1	CH	C2'; C4'; C2	123,2
1''	5,23; <i>d</i> ; 7,0	104,5	CH	C2''; C3	104,5
2''	3,2-3,8; <i>m</i>	75,8	CH		75,8
3''	3,2-3,8; <i>m</i>	78,3	CH		78,4
4''	3,2-3,8; <i>m</i>	71,2	CH		71,3
5''	3,2-3,8; <i>m</i>	78,1	CH		78,1
6''	3,2-3,8; <i>m</i>	62,6	CH ₂		62,7
Me	3,86; <i>s</i>	61,0	CH ₃	C6	

*AGRAWAL, 1989, dados obtidos em CD_3OD .

Figura 59. Espectro de RMN de ¹H da substância **16** –3-O-β-D-glicosil-patuletina (CD₃OD-TMS – 500MHz)

Figura 60. Espectros de RMN de ^{13}C / DEPT 135° da substância **16** –3-O- β -D-glicosil-patuletina ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$ – 125MHz)

Figura 61. Mapa de contorno do HMQC da substância **16** – 3-O-β-D-glicosil-patuletina. (125/500MHz, CD₃OD-TMS).

Figura 62. Mapa de contorno do HMBC da substância **16** –3-O-β-D-glicosil-patuletina. (125/500MHz, CD₃OD-TMS).

Figura 63. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo (ESI-MS) da substância **16** –3-O-β-D-glicosil-patuletina.

4.1.6.11 Substâncias 16 e 17

3-O- β -D-glicosil-patuletina

3-O- β -D-glicosil-quercetina

Alguns sinais apresentaram deslocamentos químicos semelhantes aos observados no espectro de RMN de ^1H da substância 3-O- β -D-glicosil-patuletina, descrita no item anterior (figuras 59 e 64), o que, aliado a massa m/z 493 encontrada, indica a presença dessa substância como parte dessa mistura (figura 66).

Após a análise dos sinais de RMN de ^1H restantes, foi possível concluir que a diferença entre as duas substâncias estava no anel A, onde foram encontrados os hidrogênios em δ 6,38 e 6,20, sendo atribuídos aos H-6 e H-8, respectivamente.

Com esses dados, aliado a diferença de 30u.m.a. entre as duas substâncias (m/z 493 e m/z 463), correspondendo a uma metoxila, permitiu a identificação do outro componente da mistura como sendo 3-O- β -D-glicosil-quercetina. Os dados dos deslocamentos químicos dos carbonos, obtidos através dos mapas de contorno do HMBC (figura 65), confirmam a proposta, através de comparação com a literatura (AGRAWAL; 1989), além de fornecer informações a respeito do C-3 como sendo a posição da glicosilação em ambas substâncias (tabela 21). Convém ressaltar que os deslocamentos químicos dos carbonos pertencentes ao anel B foram considerados similares para os dois flavonóides, tendo em vista os deslocamentos químicos dos hidrogênios terem se mostrado coincidentes.

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H (500MHz), e de ^{13}C (125MHz), e as correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$) obtidos para a substância **17**, e comparação com dados obtidos da literatura.

Posição	H (δ -ppm; <i>mult</i> ; J(Hz))	δC (ppm)	DEPT	HMBC	Literatura*
2		158,0	C		156,5
3		134,4	C		133,7
4		178,7	C		177,6
5		162,0	C		161,3
6	6,20; <i>s</i>	98,9	CH	C5; C7; C10; C8	98,8
7		165,1	C		164,2
8	6,38; <i>s</i>	93,6	CH	C6; C7; C9; C10	93,6
9		157,2	C		156,5
10		104,6	C		104,2
1'		122,1	C		121,4
2'	7,71; <i>s</i>	115,0	CH	C6'; C3'; C4'; C2	115,2
3'		144,9	C		144,8
4'		148,9	C		148,5
5'	6,87; <i>d</i> ; 8,2	116,5	CH	C1'; C3'; C4'	116,5
6'	7,58; <i>d</i> ; 8,2	122,4	CH	C5'; C4'; C2	121,6
1''	5,25; <i>d</i> ; 7,0	104,2	CH		101,4
2''	3,2-3,8; <i>m</i>	74,7	CH		74,3
3''	3,2-3,8; <i>m</i>	77,4	CH		76,8
4''	3,2-3,8; <i>m</i>	70,2	CH		70,3
5''	3,2-3,8; <i>m</i>	77,1	CH		77,5
6''	3,2-3,8; <i>m</i>	61,6	CH_2		61,3

*AGRAWAL, 1989, dados obtidos em DMSO-d_6 .

Figura 64. Espectro de RMN de ^1H das substâncias **16** e **17** –3-O-β-D-glicosil-patuletina e 3-O-β-D-glicosil-quercetina. ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$ – 500MHz)

Figura 65. Mapa de contorno do HMBC das substâncias **16** e **17** –3-O- β -D-glicosil-patuletina e 3-O- β -D-glicosil-quercetina. (125/500MHz, CD₃OD-TMS).

Figura 66. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo (ESI-MS) das substâncias **16** e **17** –3-O- β -D-glicosil-patuletina e 3-O- β -D-glicosil-quercetina.

4.1.6.12 Substância 18

3-O- β -D-glicosil-caempferol

O espectro de RMN de ^1H (figura 67) apresentou dois dubletos em $\delta 8,05$; $8,6\text{Hz}$; 2H e $\delta 6,89$; $8,6\text{Hz}$; 2H , cujos deslocamentos químicos são compatíveis com hidrogênios do anel B de um flavonóide, e por apresentarem-se como dubletos integrando para 2H , conclui-se que este anel apresenta uma substituição na posição $4'$. Isso porque a livre rotação desse anel permite colocar os hidrogênios $2'$ e $6'$ num mesmo ambiente químico, assim como os hidrogênios $3'$ e $5'$. Os singletos $\delta 6,20$, 1H e $\delta 6,40$, 1H referem-se aos hidrogênios das posições 6 e 8 do anel A, respectivamente, sendo que o espectro não teve resolução suficiente para apresentar o acoplamento *meta*, existente entre eles. Também foi observada a presença de hidrogênios do grupo glicosil, em que o hidrogênio anomérico foi facilmente identificado em $\delta 5,24$, *d*, $7,0\text{Hz}$, e os demais hidrogênios, entre $\delta 3,18$ e $3,70$. Todas as atribuições de ^1H e ^{13}C foram baseadas em comparação com dados obtidos da literatura, conforme apresentado na tabela 20, sendo a massa molecular encontrada (ESI-MS – modo negativo) coerente com tal proposta $[\text{M}-\text{H}]^-$ $447,1147\text{ m/z}$ (figura 70).

A glicosilação ocorre na posição 3, fato este comprovado a partir dos deslocamentos químicos dos carbonos, obtidos por RMN de ^{13}C (tabela 20), e à correlação nos mapas de contorno do HMBC (figura 69), entre o hidrogênio anomérico $\delta 5,24$ e o carbono $\delta 135,5$, atribuído ao C-3.

Tabela 22. Dados de RMN de ^1H (500MHz), e de ^{13}C (125MHz), e as correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$) obtidos para a substância **18**, e comparação com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ -ppm; <i>mult</i> ; J(Hz))	^{13}C (δ -ppm)	DEPT	HMBC	Literatura*
2		159,1	C		157,3
3		135,5	C		135,0
4		179,5	C		178,7
5		163,1	C		162,8
6	6,20; <i>s</i>	100,0	C	C8; C10; C5; C7; C4	99,9
7		166,2	C		165,9
8	6,40; <i>s</i>	94,8	CH	C6; C10; C9; C7; C4	94,6
9		158,5	C		157,5
10		105,7	C		105,2
1'		122,8	C		121,9
2'	8,05; <i>d</i> ; 8,6	132,3	CH	C3'; C2; C4'	131,8
3'	6,89; <i>d</i> ; 8,6	116,1	CH	C1'; C4'	116,0
4'		161,6	C		161,6
5'	6,89; <i>d</i> ; 8,6	116,1	CH	C1'; C4'	116,0
6'	8,05; <i>d</i> ; 8,6	132,3	CH	C3'; C2; C4'	131,8
1''	5,24; <i>d</i> ; 7,0	104,1	CH	C3; C2''	104,0
2''	3,2-3,7; <i>m</i>	75,8	CH		76,0
3''	3,2-3,7; <i>m</i>	78,4	CH		78,9
4''	3,2-3,7; <i>m</i>	71,4	CH		71,4
5''	3,2-3,7; <i>m</i>	78,1	CH		78,5
6''	3,2-3,7; <i>m</i>	62,6	CH ₂		62,5

*AGRAWAL, 1989.

Figura 67. Espectro de RMN DE ¹H da substância **18-3-O-β-D-glicosil-caempferol** (500MHz; CD₃OD-TMS).

Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **18** - 3-O-β-D-glicosil-caempferol ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$ – 125MHz)

Figura 69. Mapas de contorno do HMBC da substância **18** - 3-O- β -D-glicosil-caempferol (125/500MHz, CD₃OD-TMS)

Figura 70. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo (ESI-MS) da substância **18**– 3-O-β-D-glicosil-caempferol

4.1.6.13 Substância 19

O espectro de RMN de ^1H apresentou poucos sinais, dentre eles, dois singletos em δ 8,31 e 8,21, além de hidrogênios oximetínicos na região de δ 3,8-6,0. Estes últimos correlacionaram com carbonos entre δ 72-91, nos mapas de contorno do HMQC e HMBC, evidenciando a presença de açúcar na molécula. Após compilação dos dados de RMN de ^1H , ^{13}C (PND, DEPT e HMBC e HMQC) e comparação com os existentes na literatura, aliado à massa molecular (m/z $[\text{M} + \text{Na}^+]$ 290,0921 – ESI-MS-modo positivo), podemos propor tratar da base nitrogenada adenosina. Os dados de RMN da amostra e os da literatura (DOMONDON et al, 2004) estão apresentados na tabela 23.

Tabela 23. Dados de RMN de ^1H (500MHz), e de ^{13}C (125MHz), e as correlações observadas nos mapas de contorno do HMQC e HMBC ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ -TMS) obtidos para a substância **19**, e comparação com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ -ppm; <i>mult</i> ; J(Hz))	^{13}C (δ -ppm)	DEPT	HMBC	Literatura*
2	8,21; <i>s</i>	153,6	CH	C2; C6	152,5
4	—	150,0	C		149,1
5	—	120,0	C		119,4
6	—	157,4	C		156,2
8	8,31; <i>s</i>	142,1	CH	C5; C4; C6	140,0
1'	6,00; <i>d</i> ; 6,4	91,1	CH	C2'; C3'; C8; C4	88,1
2'	4,76; <i>m</i>	75,5	CH	C1''	73,6
3'	4,37; <i>dd</i> ; 2,4; 4,9	72,6	CH	C5'; C4'; C1'	70,8
4'	4,23; <i>d</i> ; 2,4	88,1	CH	C3'	86,1
5'	3,78; <i>dd</i> ; 2,4; 12,5 3,90; <i>dd</i> ; 2,1; 12,5	63,4	CH_2	C3'; C4'	61,8

*DOMONDON et al, 2004, dados obtidos em $\text{DMSO}-d_6$.

Figura71. Espectro de RMN DE ^1H da substância **19**– adenosina (500MHz; $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ -TMS).

Figura 72. Expansão do espectro de RMN DE ^1H da substância **19**– adenosina (500MHz; $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ -TMS).

Figura 73. Espectro de RMN DE ^{13}C /DEPT 135° da substância **19**– adenosina (125MHz; $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ -TMS).

Figura 74. Mapa de contorno do HMQC da substância **19** – adenosina. (125/500MHz, CD₃OD/D₂O-TMS)

Figura 75. Mapa de contorno do HMBC da substância **19** – adenosina. (125/500MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ -TMS)

Figura 76. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Positivo (ESI-MS) da substância **19**– adenosina

4.1.6.14 Substância 20

ent-3α-O-β-D-glicopiranosídeo, ent-16α,17-diidroxicaurano

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 26 sinais, sendo 4 carbonos quaternários; 8 CH; 11 CH_2 e 3 CH_3 . O espectro de RMN de ^1H apresentou 3 singletos referentes às 3 metilas (δ 1,20; 0,89; 0,84), hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, entre δ 4,0 e 4,9, além de muitos sinais entre δ 0,6 e 2,0. A presença desses hidrogênios na região δ 4,0 e 4,9, sendo um deles característico de hidrogênio anomérico de açúcar (δ 4,93; *d*; 7,8Hz), aliado a presença dos carbonos oxigenados δ 102,56; 75,83; 78,87; 72,24; 78,56 e 63,37, sugere a presença de uma unidade de açúcar na molécula. Por comparação dos deslocamentos químicos obtidos nos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H , além do valor da constante de acoplamento do hidrogênio anomérico (7,8Hz), com dados obtidos da literatura (HARBORNE, 1994; HE et al, 2005), foi proposto tratar-se de um β -glicopiranosídeo.

Os 20 sinais de carbonos restantes, sugerem a estrutura de um diterpeno, com esqueleto *ent*-caurano ($\alpha_D = -90,4$), tendo em vista a grande incidência de diterpenos com esse esqueleto no gênero *Mikania*, e aliado ao conjunto de informações obtidas a partir das análises espectrais (descritas a seguir). Para a estrutura do diterpeno, restaram 9 CH_2 , sendo um deles oxigenado (δ 66,7), 4 carbonos quaternários, sendo um deles oxigenado (δ 81,9), 4 CH, sendo um deles oxigenado (δ 85,2), e 3 CH_3 . As correlações entre os hidrogênios diastereotópicos em δ 4,09 e 4,15 (δ 66,7) e o carbono quaternário em δ 81,9, observadas nos mapas de contorno do HMBC; a presença das três metilas (δ 28,9; 17,1; 18,1), e a correlação observada nos mapas de contorno do HMBC entre o carbono oxigenado em δ 85,2 e o hidrogênio anomérico em δ 4,93, aliado a comparação com dados de RMN de ^{13}C com a literatura (HE et al, 2005), pode ser proposta a seguinte estrutura parcial:

Figura 77. Proposta da estrutura parcial da substância **20**.

De acordo com os mapas de contorno do HMQC, observou-se que o carbono δ 85,2, se correlaciona com o hidrogênio δ 3,50; *dd*; 4,2Hz e 11,6Hz. Os mapas de contorno do HMBC mostram as correlações entre o carbono δ 85,2 e os hidrogênios referentes às duas metilas localizadas nas posições 18 e 19 (δ 1,20 e 0,89). Analisando esses dados juntamente com a estrutura proposta acima, a substituição na posição 3 é a única possibilidade cujo hidrogênio δ 3,50 (δ 85,2; CH) se apresentaria como um *dd*, e se correlacionaria, no espectro de HMBC, com as metilas C-18 e C-19 simultaneamente. Tendo em vista as constantes de acoplamento de H-3 (δ 3,50; *dd*, 4,2Hz e 11,6Hz), observa-se acoplamento com H-2 axial-equatorial e axial-axial, respectivamente. Tal dado permite inferir na posição α -equatorial do substituinte O-Glc.

Quanto a estereoquímica da hidroxila na posição 16, pode-se concluir estar em α , baseado na comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos C-16 e C-17 obtidos, com aqueles de estruturas de diterpenos similares, obtidos na literatura, com ambas estereoquímicas (tabela 25).

As massas moleculares obtidas por ESI-MS (modo negativo, m/z $[M - H]^-$ 483,2974; calculado para $C_{26}H_{43}O_8$, 483,2952, e m/z $[M + Cl]^-$ 519,2787; calculado para $C_{26}H_{44}O_8Cl$, 519,2719, figura 83), estão de acordo com a estrutura proposta.

Tabela 24. Dados espectroscópicos obtidos da substância **20**.

Posição	H (δ -ppm, <i>mult</i> , <i>J</i> -Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ -ppm	DEPT	HMBC
1	0,72, <i>m</i>	39,3	CH ₂	C3
	1,7, <i>m</i>			
2	1,7, <i>m</i> , 2,0, <i>m</i>	23,9	CH ₂	
3	3,50, <i>dd</i> , 4,2; 11,6	85,2	CH	C4; C18; C19; C1'
4		37,9	C	
5	0,63, <i>d</i> , 11,5	55,8	CH	C3; C4; C6; C7; C18; C19
6	1,3, <i>m</i>	20,7	CH ₂	C7; C18
	1,4, <i>m</i>			
7	1,6, <i>m</i> 1,4, <i>m</i>	42,6	CH ₂	
8		44,9	C	
9	0,92, <i>m</i>	57,0	CH	C8
10		38,7	C	
11	1,6, <i>m</i> 1,5, <i>m</i>	18,9	CH ₂	
12	1,8, <i>m</i> 1,6, <i>m</i>	27,0	CH ₂	
13	2,48, <i>sl</i>	46,1	CH	
14	1,9, <i>m</i> 2,0, <i>m</i>	38,7	CH ₂	C13
15	1,8, <i>m</i> 1,7, <i>m</i>	54,0	CH ₂	C16
16		81,9	C	
17	4,09, <i>d</i> , 10,9 4,15, <i>d</i> , 10,9	66,7	CH ₂	C13; C15; C16
18	1,20, <i>s</i>	28,9	CH ₃	C3; C4; C19
19	0,89, <i>s</i>	17,1	CH ₃	C3; C4; C18
20	0,94, <i>s</i>	18,1	CH ₃	C10
1'	4,93, <i>d</i> , 7,8	102,5	CH	C3; C5'
2'	4,05, <i>t</i> , 8,4	75,4	CH	C1'; C4'
3'	4,33, <i>t</i> , 9,0	78,8	CH	C2'; C4'
4'	4,23, <i>t</i> , 9,2	72,2	CH	C2'; C6'
5'	4,01, <i>m</i>	78,5	CH	C4'; C6'
6'	4,61, <i>dd</i> , 1,7; 11,5 4,39, <i>dd</i> , 5,6; 11,5	63,3	CH ₂	C4'; C5'

Tabela 25. Comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos da estrutura **20** proposta e algumas estruturas similares encontradas na literatura.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ -ppm (amostra)
		(1)	(2)	(3)	(4)
1	39,3	40,3	39,1	38,6	39,8
2	23,9	18,6	28,3	23,8	29,2
3	85,2	41,9	78,2	85,1	78,3
4	37,9	33,2	39,5	38,6	49,1
5	55,8	56,2	55,5	55,7	56,4
6	20,7	20,4	20,7	20,6	22,3
7	42,6	42,0	42,7	42,4	42,3
8	44,9	44,7	44,8	44,7	43,7
9	57,0	56,7	57,1	56,	56,5
10	38,7	39,4	39,5	39,1	39,6
11	18,9	18,3	18,9	18,6	19,5
12	27,0	26,3	26,9	26,9	27,5
13	46,1	45,5	46,1	46,5	41,6
14	38,7	37,3	37,8	37,5	38,4
15	54,0	53,4	54,0	53,2	53,1
16	81,9	81,9	81,7	80,9	79,7
17	66,7	66,4	66,6	75,8	70,4
18	28,9	33,5	29,0	28,8	24,6
19	17,1	21,5	18,2	17,0	181,0
20	18,1	17,8	16,4	18,0	16,0
1'	102,5			106,8	
2'	75,4			75,6	
3'	78,8			78,7	
4'	72,2			71,7	
5'	78,5			78,5	
6'	63,3			62,9	
1''				102,5	
2''				75,3	
3''				78,7	
4''				72,1	
5''				78,8	
6''				63,3	

(1) NASCIMENTO & LOPES, 2003, solvente piridina-d₅.(2) LI et al, 1990, solvente piridina-d₅.(3) LI et al, 1990, solvente piridina-d₅.(4) HARINANTENAINA et al, 2002, solvente piridina-d₅.

Figura 78. Espectro de RMN DE ^1H da substância **20** – *ent*-3 α -O- β -D-glicopiranosídeo, 16 α , 17-diidroxicaurano (500MHz, PIRIDINA- d_5)

Figura 79. Expansões do RMN DE ^1H da substância **20** – *ent*-3 α -O- β -D-glicopiranosídeo, 16 α , 17-diidroxicaurano (500MHz, PIRIDINA- d_5)

Figura 80. Espectros de RMN DE ^{13}C /DEPT 135° da substância **20** – *ent*-3 α -O- β -D-glicopiranosídeo, 16 α , 17-diidroxicaurano (125MHz, PIRIDINA- d_5)

Figura 81. Mapas de contorno do HMQC da substância **20** – *ent*-3 α -O- β -D-glicopiranosídeo, 16 α , 17-diidroxicaurano (125/500MHz, PIRIDINA-d₅)

Figura 82. Mapa de contorno do HMBC da substância **20** – *ent*-3 α -O- β -D-glicopiranosídeo, 16 α , 17-diidroxicaurano (125MHz/500MHz, PIRIDINA- d_5)

Figura 83. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo (ESI-MS) da substância **20** - *ent*-3 α -O- β -D-glicopiranosídeo,16 α ,17-diidroxicaurano

4.1.6.15 Substância 21

Ácido 2β-[[3-O-(3-hidroxi-1-oxo-3-fenilpropil)-2-(3-metil-1-butiloxi)-4-O-(α-L-ramnopiranosil)-β-D-glicopiranosil]oxi]-13,15α-dihidroxi-19-norcaur-16-en-18-óico

Análise geral dos espectros de RMN de hidrogênio e de carbono-13.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais distribuídos entre $\delta 0,7-7,3$, sendo que aqueles encontrados na região $\delta 0,7-2,8$, indicam hidrogênios mais blindados, comumente encontrados em terpenóides; os multipletos entre $\delta 3,3-3,9$, que podem ser atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, os quais, em se tratando de produtos naturais representam geralmente hidrogênios de açúcares. Os sinais de RMN de ^1H centrados em $\delta 7,3$ poderão, por sua vez, serem atribuídos a hidrogênios aromáticos (figuras 90-92).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 45 carbonos, entre $\delta 17-178$. Foi possível observar carbonos oxigenados na região de $\delta 62-102$. A presença de dois carbonos, $\delta 100,6$ e $102,9$, reforçam a idéia preliminar da presença de açúcares na molécula, por serem deslocamentos típicos de carbonos anoméricos. Também pode ser observado carbonos do anel aromático ($\delta 127-145$), além dos carbonos quaternários $\delta 173,7$, $171,7$ e $178,7$, indicando a presença de carbonilas de ácido carboxílico e de éster (figura 94).

A ocorrência de diterpenos com esqueleto caurano em *Mikania laevigata*, aliado a presença dos carbonos olefínicos em $\delta 160,8$ (quaternário) e $\delta 108,8$ (CH_2), da metila em $\delta 17,1$, do carbono em $\delta 178,7$ (carbonila do ácido carboxílico) e demais carbonos entre $\delta 20-53$, carbonos estes muito encontrados em diterpenos com esqueleto caurano com dupla ligação na posição 16, permite inferir na presença desse tipo de esqueleto na substância em análise.

Análise dos açúcares

Os açúcares foram identificados a partir da análise de espectros de TOCSY unidimensional (figura 93), além de análise dos mapas de contorno do HMBC e HMQC (figuras 95, 96).

O espectro de RMN de ^1H apresentou a metila $\delta_{1,25}$, *d*, 6,2Hz; a qual correlacionou nos mapas de contorno do HMQC com o carbono $\delta_{18,1}$. Esta metila correlacionou nos mapas de contorno do HMBC com carbonos na região de δ_{70-74} , tais informações espectrais corroboram com a presença de uma ramnose.

A outra unidade de açúcar trata-se de uma glicose, tendo em vista a similaridade dos deslocamentos químicos dos carbonos observados quando comparados aos valores da literatura, tais como o carbono centrado $\delta_{61,7}$ (CH_2), além dos outros carbonos oximetínicos na faixa entre δ_{73-76} . É importante ressaltar que ambos hidrogênios anoméricos apresentaram-se encobertos tanto pelo sinal da água do solvente (CD_3OD) quanto pelo sinal de outros hidrogênios.

Nos experimentos de TOCSY, foram irradiados os hidrogênios com deslocamentos químicos em $\delta_{1,25}$ e $\delta_{4,7}$, sendo escolhidos esses hidrogênios baseado nas correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC e HMQC, que foram capazes de mostrar que esses sinais pertenciam a unidades de açúcares diferentes (figura 93).

Os dados obtidos revelaram que pertenciam à ramnose, os carbonos $\delta_{102,9}$, 71,9; 72,4; 73,9; 70,8 e 18,1, e pertenciam à glicose, os carbonos $\delta_{100,6}$; 73,4; 75,7; 76,0; 76,6 e 61,7. Também foi possível identificar a ligação entre a ramnose e a glicose (ligação α -1-4) a partir da correlação observada no HMBC do hidrogênio anomérico da ramnose (4,8) com o carbono $\delta_{76,0}$ da glicose.

O hidrogênio anomérico da glicose ($\delta_{4,8}$) correlacionou com o carbono $\delta_{74,2}$, nos mapas de contorno do HMBC, o qual pertence ao esqueleto terpênico, sendo este carbono considerado o local da glicosilação.

Os hidrogênios $\delta_{4,75}$ e $\delta_{5,22}$, pertencentes a glicose, correlacionaram, nos mapas de contorno do HMBC, com os carbonos quaternários $\delta_{173,7}$ e 171,7, respectivamente, indicando que esta unidade de açúcar apresenta-se esterificada. Tal fato é capaz de explicar a maior desblindagem observada nesses hidrogênios, em relação aos demais hidrogênios do açúcar.

Esterificação do carbono $\delta 75,7$, pertencente à glicose

Conforme mencionado anteriormente, o hidrogênio $\delta 5,22$, ligado ao carbono $\delta 75,7$, correlacionou com o carbono quaternário $\delta 171,7$. Este, por sua vez, apresentou correlações nos mapas de contorno do HMBC, que juntamente com dados obtidos nos mapas de contorno do HMQC, tornou-se possível a seguinte proposta:

Figura 84. Proposta estrutural para a esterificação do carbono $\delta 75,7$; pertencente à glicose, a partir de correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC.

Esterificação do carbono $\delta 73,4$, pertencente à glicose

O éster $\delta 173,7$ correlacionou com as metilas em $\delta 0,91$, *d*, 4,9Hz, 6H, sendo também observadas as correlações das metilas com os carbonos $\delta 26,6$ (CH), e $\delta 44,1$ (CH₂). Tais dados permitiram propor tratar-se do éster valérico, de ocorrência muito comum em plantas.

Figura 85. Proposta estrutural para a esterificação do carbono $\delta 73,4$; pertencente à glicose, a partir de correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC.

Proposta final para a “subunidade glicosídica”

A partir das análises discutidas anteriormente, e baseado em comparações dos deslocamentos químicos dos carbonos dos açúcares com valores da literatura, além das correlações complementares obtidas nos mapas de contorno do HMBC (tabela 27), foi possível propor a seguinte estrutura parcial:

Figura 86. Proposta estrutural para a subunidade glicosídica, a partir de correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC e HMQC.

Análise do esqueleto terpênico

Dos 45 carbonos observados no espectro de RMN de ^{13}C , restaram 19 carbonos, o que condiz com a estrutura de um *nor*-diterpeno com esqueleto caurano.

Dentre esses carbonos, estão os quaternários $\delta 178,7$, $41,6$; $46,9$; $79,7$ e $160,8$; e os oximetínicos $\delta 74,2$ e $82,4$.

Para a elucidação estrutural da parte terpênica da molécula, foram utilizados como base os valores de deslocamentos químicos de RMN de carbono 13 de um diterpeno com esqueleto caurano, com pouca funcionalização, mostrado na figura 87 (WEHRLI & NISHIDA, 1978). A partir destas informações passamos a estabelecer comparação com os dados observados.

Figura 87. Deslocamentos químicos dos carbonos de um diterpeno com esqueleto caurano pouco funcionalizado.

Análise do anel D:

Com o posicionamento dos carbonos $\delta 160,8$ e $\delta 108,8$, em 16 e 17, respectivamente, tornou-se possível o início da elucidação estrutural.

Os hidrogênios do carbono $\delta 108,8$ apresentaram correlações com os carbonos $\delta 79,7$ (C), $82,4$ (CH) e $160,8$ (C). O carbono quaternário $\delta 79,7$, provavelmente hidroxilado devido ao seu deslocamento químico, foi atribuído ao carbono da posição 13. Isto porque, esta é a única posição capaz de ter um carbono quaternário que correlacionasse com os hidrogênios do carbono $\delta 108,8$.

O carbono em $\delta 82,4$, também hidroxilado, foi atribuído ao carbono da posição 15, baseado nos deslocamentos químicos encontrados na literatura para esta posição de hidroxilação e nas correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC (tabela 27). O hidrogênio do carbono $\delta 82,4$, apresentou correlações com os carbonos $\delta 44,0$ (CH_2) e $\delta 53,2$ (CH). O carbono $\delta 44,0$ foi então localizado na posição 14, e o carbono $\delta 53,2$, na posição 9.

Obtém-se a seguinte proposta para o anel D:

Figura 88. Proposta estrutural para o anel D do diterpeno, a partir de correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC. Os inícios das setas representam os hidrogênios, e as pontas das setas representam os carbonos.

Análise do anel A:

O posicionamento da glicosilação na posição 2 (anel A), baseou-se na comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos $\delta 48$ (C-1) e $\delta 35,6$ (C-3), ambos metilênicos, com valores da literatura para moléculas semelhantes (tabela 26), quando a posição 2, das mesmas, encontra-se oxigenada.

O carbono da posição 4 foi considerado com um carbono metínico (CH), devido a presença de apenas mais dois carbonos quaternários sp^3 a serem atribuídos, a saber: $\delta 46,9$ e $\delta 41,6$. Vale ressaltar que um diterpeno com esqueleto caurano, pouco funcionalizado, possui 3 carbonos quaternários sp^3 (C-4; C-8 e C-10) (figura 87).

Estudo da estereoquímica:

O diterpeno em questão, com esqueleto caurano, pertence à série *ent*, baseado na rotação óptica obtida ($\alpha_D = -103,1$). O hidrogênio H_{1ax} ($\delta 0,76$) apresentou-se como um tripleto mal formado, o que indica que na verdade, trata-se de um *dd* com constantes de acoplamento similares (aproximadamente 11Hz). Tal fato é compatível com a multiplicidade esperada para esse hidrogênio, pois o mesmo acopla com o H_{1eq} com uma constante de acoplamento geminado (2J) e com o H_{2ax} com um acoplamento *trans*-diaxial (3J), sendo ambos os valores altos e no caso, próximos (figura 89).

A estereoquímica do ácido carboxílico, localizado em C_4 , foi determinada a partir da multiplicidade e constantes de acoplamento de H_{3ax} ($\delta 1,2$; *td*; 5,2Hz, 11,8Hz). Estas constantes de acoplamento referem-se a H_{3ax} - H_{4eq} ; H_{3ax} - H_{3eq} e H_{3ax} - H_{2ax} , respectivamente, o que indica que a função ácido carboxílico está em *axial* (α), conforme indicado na figura 89.

Figura 89. Representação do anel A, do esqueleto diterpênico proposto, no qual as setas indicam as constantes de acoplamento observadas no espectro de RMN de 1H .

A hidroxila localizada na posição 15 foi proposta em α , baseada na comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos de ambos isômeros (15α -OH e 15β -OH), obtidos da literatura, conforme mostrado na tabela 26. A diferença do deslocamento químico do carbono hidroxilado (C-15) não é muito significativa, o que não é decisivo para a indicação da estereoquímica da estrutura em questão. Porém o carbono γ (C-9) apresenta-se blindado (7 a 10ppm) quando a hidroxila do carbono 15 está em β , devido ao efeito γ -gauche, quando são comparados com os deslocamentos químicos de um diterpeno não substituído (figura 87 e tabela 26). A hidroxilação em C-13 tem pouca influência, visto que este substituinte encontra-se em posição *pseudo-equatorial*. (HUTCHISON, LEWER & MACMILLAN, 1984).

Finalizando, as correlações dos mapas de contorno do HMBC e HMQC, apresentadas na tabela 27, a comparação desses dados com os presentes na literatura para estruturas similares (tabela 28) e a massa molecular obtida por ESI-MS (modo negativo, m/z $[M - H]^-$ 875,4059; calculado para $C_{45}H_{63}O_7$, 875,4059, figura 98), dão embasamento para esta proposta estrutural.

Convém ressaltar a existência de substâncias estruturalmente relacionadas ao diterpeno **21**, tais como as apresentadas na tabela 26, conhecidas como wedelosido, atractilosido e carboxiatractilosido, as quais foram isoladas de plantas pertencentes à família Asteraceae (*Wedelia glauca*, *Xanthium pungens*, *Wedelia asperima*). São conhecidas por sua atividade extremamente tóxica, responsáveis pela morte de gados em suas pastagens, com mecanismo de ação relacionado ao da estricnina, inibindo o transporte de ADP/ATP através da membrana mitocondrial (SCHTEINGART & POMILIO, 1984; MACLEOD & MOELLER, 1990, LEWIS & MACLEOD, 1981; MACLEOD, LEWIS, MOELLER, 1990, CALANASAN & MACLEOD, 1998, GHISALERTI, 1997).

Tabela 26. Comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos dos diterpenos 15α -OH e 15β -OH, obtidos da literatura, e os dados da amostra.

Posição	δC -ppm (amostra)
		(1)*	(2)*
1	48	40,9	40,9
2	74,2	19,6	19,6
3	35,6	38,3	38,3
4	44,6	44,0	44,0
5	50,3	56,7	57,1
6	26,5	22,2	21,7
7	35,9	36,8	36,6
8	46,9	46,3	48,2
9	53,2	46,0	54,0
10	41,6	39,4	39,9
11	20,9	18,3	18,7
12	40,1	33,9	33,1
13	79,7	40,7	42,8
14	44,0	39,4	36,2
15	82,4	82,2	82,6
16	160,8	159,6	161,1
17	108,8	104,4	107,8
18	-	28,7	28,7
19	178,7	177,7	177,7
20	17,1	15,8	15,9

WEHRLI & NISHIDA, 1978.

Tabela 27. Dados espectroscópicos obtidos da substância **21**.

Posição	H (δ -ppm, <i>mult</i> , J-Hz)	δ C-ppm	DEPT	HMBC
1	0,76; <i>t</i> *, 11,8 2,28, <i>m</i>	48	CH ₂	C3; C10; C5; C9; C2
2	4,24, <i>m</i>	74,2	CH	C1'
3	1,2; <i>td</i> ; 5,2; 11,8 2,39; <i>d</i> ; 11,8	35,6	CH ₂	C4; C1; C5; C19; C2
4	2,6; <i>m</i> 1,9; <i>m</i>	44,6	CH	C3; C10; C5; C19; C2
5	1,4; <i>m</i>	50,3	CH	
6	1,6; <i>m</i> 2,6; <i>m</i>	26,5	CH ₂	
7	1,6; <i>m</i> 1,4; <i>m</i>	35,9	CH ₂	
8	-	46,9	C	
9	0,9; <i>m</i>	53,2	CH	C20; C11; C12; C14; C8; C15
10	-	41,6	C	
11	1,4; <i>m</i> 1,7; <i>m</i>	20,9	CH ₂	
12	1,4; <i>m</i> 1,7; <i>m</i>	40,1	CH ₂	
13	-	79,7	C	
14	1,5; <i>m</i> 1,9; <i>m</i>	44,0	CH ₂	C13; C15
15	3,76; <i>sl</i>	82,4	CH	C14; C9; C16; C17
16	-	160,8	C	
17	5,23; <i>sl</i> 5,20; <i>sl</i>	108,8	CH ₂	C8; C16; C13; C15
18	-	-	-	
19	-	178,7	C	
20	0,98; <i>s</i>	17,1	CH ₃	C10; C1; C5; C9
1'	4,78; <i>m</i>	100,0	CH	C2
2'	4,75; <i>m</i>	73,4	CH	C1'; C7'; C4'
3'	5,22; <i>m</i>	75,7	CH	C12'; C2'; C4'
4'	3,8; <i>m</i>	76,0	CH	C6'
5'	3,50; <i>dl</i> ; 9,6	76,6	CH	C2'
6'	3,8; <i>m</i> 3,71; <i>dd</i> ; 2,8; 12,2	61,7	CH ₂	
7'	-	173,7	C	
8'	1,9; <i>m</i>	44,1	CH ₂	C9'; C7'
9'	1,9; <i>m</i>	26,6	CH	C8'; C7'
10'	0,91; <i>dl</i> ; 4,9	22,9	CH ₃	C7'; C8'; C9'
11'	0,91; <i>dl</i> ; 4,9	22,9	CH ₃	
12'	-	171,7	C	
13'	2,79; <i>dd</i> ; 8,0; 16,0 2,72; <i>dd</i> ; 5,3; 16,0	45,3	CH ₂	C15'; C12'; C14'
14'	5,03; <i>dd</i> ; 5,3; 8,0	71,3	CH	C16'; C20'; C15'; C12'; C13'
15'	-	145,2	C	
16'	7,3; <i>m</i>	127,2	CH	
17'	7,3; <i>m</i>	129,5	CH	C15'
18'	7,2; <i>m</i>	128,8	CH	
19'	7,3; <i>m</i>	129,5	CH	C15'
20'	7,3; <i>m</i>	127,2	CH	
1''	4,8; <i>m</i>	102	CH	C5''; C2''; C4'
2''	3,59; <i>dd</i> ; 2,9; 9,3	71,9	CH	C4''
3''	3,80; <i>m</i>	72,4	CH	C4''
4''	3,34; <i>m</i>	73,9	CH	C6''; C5''; C2''
5''	3,65; <i>dd</i> ; 6,2; 9,0	70,8	CH	C4''
6''	1,25; <i>d</i> ; 6,2	18,1	CH ₃	C5''; C4''

Tabela 28. Comparação dos δC da substância **21** e substâncias relacionadas da literatura.

Posição	δC-ppm (amostra)	(1)*	(2)*
1	48	46,4	50,7
2	74,2	73,3	63,9
3	35,6	41,2	39,1
4	44,6	59,1	44,7
5	50,3	51,7	49,7
6	26,5	24,0	26,6
7	35,9	35,9	36,0
8	46,9	46,9	46,3
9	53,2	53,8	52,7
10	41,6	41,2	40,9
11	20,9	21,0	20,5
12	40,1	40,2	40,5
13	79,7	79,7	79,0
14	44,0	45,4	44,3
15	82,4	82,4	81,9
16	160,8	160,9	163,1
17	108,8	108,8	107,3
18	-	175,8	-
19	178,7	173,3	178,0
20	17,1	17,7	17,1
1'	100,0	101,0	
2'	73,4	55,7	
3'	75,7	76,7	
4'	76,0	76,3	
5'	76,6	75,9	
6'	61,7	62,0	
7'	173,7	175,3	
8'	44,1	46,7	
9'	26,6	27,2	
10'	22,9	23,0	
11'	22,9	23,0	
12'	171,7	172,1	
13'	45,3	48,2	
14'	71,3	71,2	
15'	145,2	145,2	
16'	127,2	127,1	
17'	129,5	129,4	
18'	128,8	128,6	
19'	129,5	129,4	
20'	127,2	127,1	
1''	102	102,8	
2''	71,9	72,0	
3''	72,4	72,4	
4''	73,9	73,9	
5''	70,8	70,8	
6''	18,1	18,1	

(1)* MACLEOD, LEWIS & MOELLER, 1990.

(2)*LEWIS & MACLEOD, 1981.

Figura 90. Espectro de RMN de ^1H da substância **21**. (CD_3OD -TMS, 500MHz).

Figura 91. Expansão I do espectro de RMN de ^1H da substância **21**. (500MHz, CD_3OD -TMS).

Figura 93. Espectros de TOCSY unidimensional, da substância **21**, sendo irradiados os hidrogênios $\delta 4,7$ e $\delta 1,25$, respectivamente (500MHz - CD_3OD -TMS).

Figura 95. Mapa de contorno do HMQC da substância **21**. (125/500MHz, CD₃OD-TMS).

Figura 96. Mapa de contorno do HMBC da substância **21**. (125/500MHz, $\text{CD}_3\text{OD-TMS}$).

Figura 97. Expansões dos mapas de contorno do HMBC da substância **21**. (125/500MHz, CD₃OD-TMS).

Figura 98. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” Modo Negativo (ESI-MS) da substância **21**.

4.2 ANÁLISES DOS EXTRATOS DA LAVAGEM FOLIAR DE *M. glomerata* e *M. laevigata* POR GC-MS

Os extratos da lavagem foliar foram obtidos segundo o método de extração P2 (item 3.2.1.1), sendo analisados por GC-MS (condição C8, item 3.2.2.4).

4.2.1 ANÁLISES QUALITATIVAS

Os extratos da lavagem foliar de *M. laevigata* e *M. glomerata* apresentaram-se pouco complexos, conforme pode ser observado nos cromatogramas em questão. Para *M. laevigata*, as substâncias majoritárias foram cumarina ($t_r=6,7\text{min,}$) e lupeol ($t_r=28,9\text{min,}$), enquanto que em *M. glomerata*, as substâncias majoritárias foram o lupeol e a substância ainda não identificada com tempo de retenção $t_r=20,0\text{min}$ (condição C8, item 3.2.2.4), sendo observada a presença de cumarina, porém em concentração bastante inferior àquela encontrada na outra planta em estudo. Convém ressaltar que essa substância com $t_r=20,0\text{min}$ não foi encontrada em *M. laevigata*, podendo ser considerada um marcador para *M. glomerata*, o que implica na possibilidade de distinção das espécies. Com a finalidade de se conhecer a identidade dessa substância, o extrato da lavagem foliar de *M. glomerata* foi submetido a uma CCDP (FM: hexano:AcOEt 1:1), o que culminou em seu isolamento, conforme mostra o cromatograma abaixo (figura 99), porém não pode ser identificada devido a pequena quantidade isolada.

Figura 99. Cromatograma obtido em GC-MS, mostrando a substância com t_r 20,5min (condição C7, item 3.2.2.4), obtida do extrato da lavagem foliar de *M. glomerata*, isolada.

Foram obtidos 3 extratos de cada planta, de uma mesma coleta, a fim de verificar uma possível alteração no perfil químico. Porém, foi observado que sob o ponto de vista qualitativo, houve reprodutibilidade. Para *M. laevigata*, foi realizado a comparação de extratos de folhas de dois espécimes diferentes (Ribeirão Preto e Dourados) coletados na mesma época do ano, sendo observados perfis químicos similares (figuras 100 a 106).

Figura 100. Cromatograma I obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de *M. glomerata* (Condição C8, item 3.2.2.4) a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Dourados.

Figura 101. Cromatograma II obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de *M. glomerata* (Condição C8) a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Dourados.

Figura 102. Cromatograma III obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de *M. glomerata* (Condição C8, item 3.2.2.4) a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Dourados.

Figura 103. Cromatograma I obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de *M. laevigata* (Condição C8, item 3.2.2.4) a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Dourados.

Figura 104. Cromatograma II obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de *M. laevigata* (Condição C8, item 3.2.2.4) a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Dourados.

Figura 105. Cromatograma III obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de *M. laevigata* (Condição C8, item 3.2.2.4) a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Dourados.

Figura 106. Cromatograma obtido por GC-MS do extrato da lavagem foliar de *M. laevigata* (Condição C8, item 3.2.2.4), a partir de material vegetal coletado em julho/2007, Ribeirão Preto.

4.2.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS

Para se conhecer as variações que o método de extração pode estar submetido, foi necessária a realização da padronização do método.

Como mostrado no item anterior, as substâncias majoritárias desses extratos foram a cumarina e o lupeol. Por este motivo, optou-se pela construção da curva de calibração de ambas substâncias, de acordo com o procedimento especificado no item 3.2.2.4, para posterior quantificação destes, nos extratos.

4.2.2.1 Linearidade

Lupeol

A curva de calibração do lupeol foi construída a partir da substância isolada e purificada no laboratório (item 4.1.2). Abaixo está indicada a injeção da substância na concentração 0,750mg/mL, sob as condições de análise C7 (item 3.2.2.4), o que comprova sua pureza (figura 107).

Foram realizadas diluições do padrão, a partir de solução-mãe a 5mg/mL, em metanol. As soluções foram injetadas no cromatógrafo sob as condições de análise C8 (item 3.2.2.4), em triplicata, em ordem crescente de concentração, indicadas na tabela 29, sendo obtida uma curva com boa linearidade (0,995). O limite de detecção foi calculado ser 0,015mg/mL, sendo três vezes o ruído.

Figura 107. Cromatograma obtido por GC-MS da solução padrão de lupeol (Condição C7, item 3.2.2.4).

Figura 108. Curva de calibração do lupeol.

Tabela 29. Soluções padrão de lupeol utilizadas na curva de calibração

Amostra	Concentração (mg/mL)
1	0,0300
2	0,0375
3	0,050
4	0,060
5	0,075
6	0,100

Cumarina:

A curva de calibração da cumarina foi construída a partir do padrão comercial (Sigma-Aldrich). Abaixo está indicada a injeção da substância na concentração 0,150mg/mL, sob as condições de análise C7 (item 3.2.2.4), o que comprova sua pureza (figura 109).

Foram realizadas diluições do padrão, a partir de solução-mãe a 6mg/mL, em metanol. As soluções foram injetadas no cromatógrafo sob as condições de análise C8 (item 3.2.2.4), em triplicata, em ordem crescente de concentração, indicadas na tabela 30. A obtenção de R^2 elevado ($R^2=0,997$), é um indicativo de alta linearidade. O limite de detecção foi calculado ser 0,001mg/mL, sendo três vezes o ruído.

Figura 109. Solução padrão de cumarina.

Figura 110. Cromatograma obtido por GC-MS da solução padrão de cumarina (Condição C7, item 3.2.2.4).

Tabela 30. Soluções padrão de cumarina utilizadas na curva de calibração

Amostra	Concentração (mg/mL)
1	0,002
2	0,012
3	0,025
4	0,050
5	0,075
6	0,100
7	0,125

4.2.2.2 Recuperação

Foram adicionadas concentrações conhecidas de padrão (cumarina e lupeol) a 150mL de diclorometano, sendo então devidamente homogeneizado, seguido de retirada de 20mL da solução, filtração em filtros Millex, secagem em ar comprimido e ressuspensão em 1mL para análise em GC-MS.

As análises foram realizadas em quintuplicata e cada amostra injetada três vezes no cromatógrafo. Foram analisadas duas diferentes concentrações para cada padrão. Os resultados estão discriminados na tabela 31.

Tabela 31. Dados obtidos na recuperação de cumarina e lupeol.

	Cumarina 0,12mg/mL	Cumarina 0,09mg/mL	Lupeol 0,05mg/mL	Lupeol 0,03mg/mL
1	61,5	40,9	88,9	99,2
2	79,3	52,1	89,8	92,0
3	26,7	37,3	80,2	98,2
4	74,6	75,9	86,5	101,4
5	81,8	54,0	89,2	112,1
Média	64,8	52,0	86,9	100,1
Desv Pad.	22,7	15,1	3,9	7,3
%CV	35,0	29,1	4,5	7,3

Como pode ser notado, foram observadas altas %CV para a cumarina. Isso se deve provavelmente a alta volatilidade dessa substância, que acaba se perdendo durante o processo de secagem em ar comprimido. Deve ser mencionado que em experimentos

anteriores, utilizando o método de extração P1, foi observado grande variação na recuperação da cumarina (0-100%), processo este que utilizou rotaevaporação como maneira de concentração do extrato. Também, nesses experimentos, cujos extratos eram aproximadamente 10 vezes mais concentrados, de quatro extratos de *M. glomerata*, foi detectada cumarina em apenas um deles.

4.2.2.3 Repetibilidade

As folhas de *M. laevigata* e *M. glomerata* coletadas em Dourados (julho/2007), foram submetidas a análises interdia e intradia. As extrações foram realizadas em triplicata, a cada dia, para cada planta, sendo cada extrato injetado três vezes no cromatógrafo. Os resultados encontram-se nas tabelas 32-34. Convém ressaltar que todas as concentrações apresentadas são expressas em mg/5g_{Folha}.

Tabela 32. Concentrações de cumarina e lupeol obtidas nos extratos da lavagem foliar de *M. laevigata* intradia.

	DIA 1		DIA 2		DIA 3	
	LUPEOL	CUMARINA	LUPEOL	CUMARINA	LUPEOL	CUMARINA
1	0,5127	0,4927	0,5158	0,6552	0,5258	0,5221
2	0,7295	0,6487	0,5604	0,6080	0,4806	0,3584
3	0,6841	0,7078	0,7077	0,5606	0,3863	0,3661
Média	0,641	0,6264	0,7077	0,6080	0,4642	0,4156
Desv Pad	0,1143	0,1112	0,1004	0,0473	0,0712	0,0924
%CV	17,8	18,0	14,2	7,8	15,3	22,2

Tabela 33. Concentrações de cumarina e lupeol obtidas nos extratos da lavagem foliar de *M. glomerata* intradia.

	DIA 1		DIA 2		DIA 3	
	LUPEOL	CUMARINA	LUPEOL	CUMARINA	LUPEOL	CUMARINA
1	0,3975	0,0354	0,3788	0,0344	0,3122	0,0230
2	0,4675	0,0311	0,3780	0,0284	0,3092	0,0280
3	0,3541	0,0388	0,3293	0,0269	0,3283	0,0260
Média	0,4064	0,0350	0,3293	0,0299	0,3283	0,0257
Desv Pad	0,0572	0,0038	0,0283	0,0040	0,0103	0,0025
%CV	14,1	11,0	8,6	13,3	3,2	9,9

Tabela 34. Concentrações de cumarina e lupeol obtidas nos extratos da lavagem foliar de *M. laevigata* e *M. glomerata* interdita.

	<i>M. laevigata</i>		<i>M. glomerata</i>	
	LUPEOL	CUMARINA	LUPEOL	CUMARINA
Média	0,60	0,55	0,35	0,03
Desv Pad	0,1260	0,1136	0,0448	0,0046
%CV	20,8	20,8	11,6	15,4

Como pode ser observado, *M. laevigata* apresentou concentração de cumarina mais de 10 vezes maior que *M. glomerata*, para esta extração. Quanto ao lupeol, não houve grandes variações nas concentrações para essas duas plantas.

Devido a grande diferença entre as concentrações de cumarina, as altas %CV encontradas não interferem no método, cujo objetivo é a diferenciação entre as espécies.

4.2.2.4 Sazonalidade

Os extratos da lavagem foliar das plantas coletadas em diferentes épocas do ano (janeiro e julho), apresentaram grande similaridade para as duas épocas em questão. Esse fato é bastante interessante, tendo em vista que a baixa variação reflete na eficiência do método, pois amostras coletadas em diferentes épocas do ano possuem o mesmo perfil químico, e então a data da coleta não se torna um fator importante para fins de identificação entre as espécies. Os cromatogramas das figuras 111 a 114 apresentam a similaridade sob aspectos qualitativos, enquanto que a tabela 35 discrimina os valores das concentrações de cumarina e lupeol encontrados.

Figura 111. *M. laevigata* coletada em janeiro de 2006.

Figura 112. *M. laevigata* coletada em julho de 2006.

Figura 113. *M. glomerata* coletada em janeiro de 2007.

Figura 114. *M. glomerata* coletada em julho de 2006.

Tabela 35. Concentrações de cumarina e lupeol obtidas nos extratos da lavagem foliar de *M. laevigata* e *M. glomerata* em diferentes épocas do ano.

	Época do ano	CUMARINA	LUPEOL
<i>M. laevigata</i>	Janeiro	0,3261	0,2945
	Julho	0,5325	0,5640
<i>M. glomerata</i>	Janeiro	0,0390	0,3504
	Julho	—	0,6330

Como se pode observar, *M. glomerata* apresentou cumarina apenas em janeiro, e mesmo assim, em concentração muito inferior à encontrada nas folhas de *M. laevigata*. A não detecção de cumarina nas folhas coletadas em julho pode ser devido a perdas no processo de secagem do extrato no ar comprimido. *M. laevigata*, por sua vez, apresentou maior teor de cumarina nos extratos das folhas coletadas em julho, quando comparada às folhas coletadas em janeiro. Porém a diferença encontra-se dentro do desvio padrão do método.

Quanto ao lupeol, ambas espécies apresentaram concentrações relativamente elevadas, e similares, sendo maior a concentração nos extratos das folhas coletadas em julho para ambas espécies.

4.2.2.5 Diferenciação entre as espécies

Tendo em vista a confusão entre a identidade das duas espécies de “guaco” deste estudo, foram realizadas análises de extratos da lavagem foliar de “guacos” obtidos de diversas regiões do Brasil, a fim de identificá-los como *M. laevigata* ou *M. glomerata*. Suas diferenciações foram relacionadas a presença da substância com $t_R = 20,0\text{min.}$, aliado a concentração de cumarina. Quanto ao lupeol, sua concentração se mostrou bastante similar para as duas espécies, não apresentando informação relevante na identificação entre elas.

Das 10 amostras analisadas, nenhuma delas apresentou a substância com $t_R = 20,0\text{ min.}$, e 7 apresentaram a concentração de cumarina semelhante àquela obtida na padronização do método, para *M. laevigata*, sendo que as amostras 2, 4 e 6 apresentaram concentrações relativamente menores (tabela 36, figuras 115-124).. De acordo com esses aspectos analisados, as amostras 1, 3, 5, 7, 8, 9 e 10 foram consideradas serem *M. laevigata*. As identificações das amostras 2, 4 e 6, foram duvidosas, pois foi observada ausência da substância com $t_R = 20,0\text{min.}$, porém, as concentrações de cumarina foram inferiores àquelas observadas em *M. laevigata*. Não podem ser descartadas as possibilidades das variações das concentrações de cumarina terem ocorrido devido a fatores ambientais, tais como condições

do solo, umidade, temperatura e luminosidade, ou fatores genéticos, e até mesmo de tratarem-se de outras espécies de “guaco”. Também deve ser mencionada a importância da avaliação da presença da substância com $t_R = 20,0\text{min.}$ nas folhas de outros espécimes de *M. glomerata*, assim como sua ausência em outros espécimes de *M. laevigata*.

Tabela 36. Quantificação de cumarina e lupeol em amostras de “guaco” de diferentes regiões do Brasil.

	REGIÃO	CUMARINA	LUPEOL
1	PARANÁ	0,4679	0,4854
2	SANTA CATARINA	0,0456	0,2354
3	SÃO PAULO	0,3657	1,2540
4	SÃO PAULO	0,0568	0,1230
5	MATO GROSSO DO SUL	0,3370	0,6341
6	MATO GROSSO DO SUL	0,0379	0,7143
7	MINAS GERAIS	0,5606	0,5959
8	MINAS GERAIS	0,0869	0,7797
9	MINAS GERAIS	0,1686	1,0071
10	MINAS GERAIS	0,2293	0,2905

Figura 115. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 1 (Paraná).

Figura 116. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 2 (Santa Catarina).

Figura 117. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 3 (São Paulo).

Figura 118. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 4 (São Paulo).

Figura 119. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 5 (Mato Grosso do Sul).

Figura 120. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 6 (Mato Grosso do Sul).

Figura 121. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 7 (Minas Gerais).

Figura 122. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 8 (Minas Gerais).

Figura 123. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 9 (Minas Gerais).

Figura 124. Cromatograma obtido em GC-MS referente a amostra 10 (Minas Gerais).

5 CONCLUSÕES:

Quanto a fitoquímica de M. laevigata:

No estudo fitoquímico de *M. laevigata* foi possível o isolamento e identificação por técnicas espectroscópicas do lupeol (**1**), taraxerol (**2**), cumarina (**3**), ácido *orto*-[(5'-hidroxi)-*cis*-cinamoila]-*trans*-cinâmico (**10**), siringaldeído (**11**), *trans*-melilotosido (**12**), *cis*-melilotosido (**13**), 3,5-dicafeoilquinado de metila (**14**), 3,3',5 - triidroxí - 4',6,7-trimetoxiflavona (**15**), 3-O- β -D-glicosil-patuletina (**16**), 3-O- β -D-glicosil-quercetina (**17**), 3-O- β -D-glicosil-caempferol (**18**), adenosina (**19**), *ent*-3 α -O- β -D-glicopiranosídeo, 16 α , 17-diidroxicaurano (**20**), e o ácido 2 β -[[3-O-(3-hidroxi-1-oxo-3-fenilpropil)-2-(3-metil-1-butiloxi)-4-O-(α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosil]oxi]- 13, 15 α -diidroxí- 19- *nor*caur-16-*en*-18-óico (**21**). Convém ressaltar que ainda não encontramos relatos na literatura das substâncias (**10**); (**20**) e (**21**), sendo estes até o momento, considerados inéditas, baseado no "Chemical Abstracts". Além desses, identificou-se por GC-MS as substâncias ácido beierenóico (**4**), ácido caurenóico (**5**), óxido do cariofileno (**6**), espatulenol (**7**), diidrocumarina (**8**), e acetato de lupeol (**9**).

Há relatos na literatura da identificação das substâncias ácido beierenóico, ácido caurenóico, cumarina, lupeol, acetato de lupeol, siringaldeído e o ácido *trans*-o-cumárico em *M. glomerata* e das substâncias cumarina, ácido *trans*-o-cumárico e ácido caurenóico em *M. laevigata*. Como se pode observar, muitos constituintes identificados em *M. laevigata*, neste estudo, já havia sido isolado em *M. glomerata* em estudos anteriores, ou substâncias com estruturas químicas relacionadas. Tal fato é importante ser mencionado, tendo em vista que ambas as espécies têm utilização popular para os mesmos fins terapêuticos.

As substâncias (**12**); (**13**); (**14**); (**15**); (**16**); (**18**) e (**19**), nunca haviam sido identificadas no gênero *Mikania*.

Quanto às análises dos extratos da lavagem foliar de M. laevigata e M. glomerata:

Neste estudo, não foram consideradas as influências das variações ambientais, tais como condições de solo, umidade, temperatura e luminosidade, além de fatores genéticos, nas concentrações das substâncias analisadas.

A análise qualitativa dos extratos da lavagem foliar de *M. laevigata* permitiu a identificação de cumarina e lupeol como sendo as substâncias majoritárias. Não houve diferenças qualitativas significativas nos extratos obtidos de folhas coletadas em janeiro e julho. Quanto a análise qualitativa dos extratos da lavagem foliar de *M. glomerata*, a substância majoritária é o lupeol e a substância com $t_R = 20,0\text{min.}$, sendo que a cumarina foi identificada em concentrações muito pequenas. Também foi observada grande similaridade nos extratos das folhas coletadas em janeiro e julho.

É possível afirmar que nos espécimes em estudo, o extrato da lavagem foliar de *M. laevigata* apresentou maiores teores de cumarina que os de *M. glomerata*. Os teores de lupeol apresentaram concentrações relativamente similares para as duas espécies.

Quanto às análises das folhas de “guaco” obtidas de diferentes regiões do país, nenhuma delas apresentou a substância com $t_R = 20,0\text{min.}$, sendo que 7 delas, pertencentes aos estados Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, e Minas Gerais, apresentaram concentrações de cumarina similares àqueles observados nos espécimes de *M. laevigata* deste estudo, e portanto, podem ser consideradas *M. laevigata*. As identificações daquelas outras 3 amostras, obtidas dos estados São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, as quais apresentaram menores concentrações de cumarina, não puderam ser realizadas.

Embora a metodologia empregada neste trabalho tenha sido descrita na literatura como método de extração dos constituintes compartimentalizados no interior de tricomas glandulares, não se pode afirmar que as substâncias encontradas nos extratos em estudo sejam metabólitos tricomais. Uma maneira de se garantir quais substâncias integra os tricomas, é a coleta manual individual das glândulas em questão, com auxílio de pinça e lupa, e posterior análise, por exemplo, em HPLC-MS. Porém, pode-se afirmar que o método de extração foi mais seletivo que as extrações convencionais, devido a pequena complexidade dos extratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. In:___*Identification of Essential Oil Components by Gás Chromatography/Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Flinois, USA, 1995.

AGRAWAL, P.K. In:___*Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Ed. Elsevier, Amsterdam, 1980.

ALVARENGA, S. A. V.; FERREIRA, M. J. P.; EMERENCIANO, V. P.; CABROL-BASS, D. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 56:27-37, 2001.

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

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **A realidade e o futuro do controle de qualidade de alimentos e de fitoterápicos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 05 de março de 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 25 de maio de 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 89 de 16 de março de 2004**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 25 de maio de 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899 de maio de 2003**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 26 de maio de 2007.

BAI, N.;ZHOU,Z.; ZHANG, L.; QUAN,Z.; HE, K.; ZHENG, QY. Antioxidative flavonoids from the flower of *Inula britannica*. **Journal of Food Lipids**, 12:141-149, 2005.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. Ordem 9 – Asterales. In:___ **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, Minas Gerais, Brasil: Imprensa Universitária, v. 3:237-310, 1991.

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

BOHLMANN, F.; ADLER, A.; KING, R.M.; ROBINSON, H. *ent*-Labdanes from *Mikania alvimii*. **Phytochemistry**. 21(1), 173-176, 1982a.

BOHLMANN, F.; SINGH, P.; JAKUPOVIC, J.; ROBINSON, H.; KING, R.M. An epoxygermacranolide and further constituents from *Mikania* species. **Phytochemistry**. 21(3), 705-707, 1982b.

BOHLMANN, F.; ADLER, A.; JAKUPOVIC, J.; KING, R.M.; ROBINSON, H. A dimeric germacranolide and other sesquiterpene lactones from *Mikania* species. **Phytochemistry**. 21(6), 1349-1355, 1982c.

BOHLMANN, F.; ADLER, A.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Germacranolies from *Mikania grazielae*. **Phytochemistry**. 21(5), 1169-1170, 1982d.

BOHLMANN, F.; ALER, A.; SCHUSTER, A.; GUPTA, R.K.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Diterpenes from *Mikania* species. **Phytochemistry**. 20(8), 1899-1902, 1981.

BRANDÃO, M.G.L.; FREIRE, N.; SOARES, C.D.V. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais. Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Caderno de Saúde Pública**, 14(3):613-616, 1998.

CALANASAN, C.L. & MACLEOD, J.K. A diterpenoid sulphate and flavonoids from *Wedelia asperima*. **Phytochemistry**, 47(6):1093-1099, 1998.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, N.S.M.S.A.Q.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amazônia*, 11:26-32, 2007.

CELEGHINI, R.M.S.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng. ("guaco") leaves. *Journal of. Brazilian. Chemical. Society*. 1(6), 706-709, 2001.

CHAVES, J.S.; NASCIMENTO, A.M.; SOARES, A.P.; CAMPOS, L.M.P.; OLIVEIRA, PA.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVEIRA, D.C.R. Screening of southeastern brazilian *Mikania* species on *Trypanosoma cruzi*. *Pharmaceutical Biology*, 45(10):749-752 2007.

CHAVES, J.S.; OLIVEIRA, D.C.R. Sesquiterpene lactones and other chemical constituents of *Mikania hoehnei* R. *Journal of. Brazilian. Chemical. Society*. 14(5), 734-737, 2003.

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

CRUZ, F.G.; ROQUE, N.F. Diterpene acids from *Mikania triangularis*. *Phytochemistry*. 31(8), 2793-2796, 1992.

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

DESLIN, A.P.M. Estudo químico e avaliação antiproliferativa de diferentes espécies do gênero *Mikania*. *Dissertação (Mestrado)*, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP, Universidade Estadual de Campinas–UNICAMP, Brasil, 2004.

DOMONDON, D.L.; HE, W.; KIMPE, N.; HÖFTE, M.; POPPE, J. β -Adenosine, a bioactive compound in grass chaff stimulating mushroom production. *Phytochemistry*, 65:181-187, 2004.

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

EMERENCIANO, V. P.; RODRIGUES, G. V.; ALVARENGA, S. A. V.; MACARI, P. A. T. Um novo método para agrupar parâmetros quimiotaxonômicos. *Química Nova*, 21:125-129, 1998.

EMERENCIANO, V. P.; MILITÃO, J. S. L. T.; CAMPOS, C. C.; ROMOFF, P.; KAPLAN, M. A. C.; ZAMBON, M.; BRANT, A. J. C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29:947-957, 2001.

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

FIERRO, I.M.; SILVA, A.C.B.; LOPES, C.S.; MOURA, R.S.; BARJA, FIDALGO, C. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. *Journal of Ethnopharmacology*. 66, 19-24, 1999.

FRANCHI, S.M.; BRWN, R.T.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M. New isolated constituents from *Mikania glomerata* Spreng. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 41(supll I), 339, 2005.

GHISALBERTI, E.L. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia*, 68(4):303-325, 1997.

GRAÇA, C.; FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; DALSENTER, P.R.; MARQUES, M.C.A. *Mikania laevigata* syrup does not induce side effects on reproductive system of male Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 111, 29-32, 2007a.

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

GUTIERREZ, A.B. & HERZ, W. Bisabolones and other constituents of *Mikania shushunensis*. **Phytochemistry**, 27(12):3871-3874, 1988.

HARBORNE, J.B. ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of flavonoids and their glycosides in Hexadeutero-Dimethylsulphoxide. In:___**The Flavonoids: advances in research since 1986**. Ed. Chapman & Hall, Londres, 441-473, 1994.

HARINANTENAINA, L.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. *ent*-Kaurane diterpenoid glycosides from a Malagasy endemic plant, *Cussonia vantsilana*. **Phytochemistry**, 61:367-372, 2002.

HE, D.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; SHINZATO, T.; ARAMOTO, M.; BANDO, M.; TAKEDA, Y. Tricalyosides H-O: *ent*-kaurane glucosides from the leaves of *Tricalysia dubia*. **Phytochemistry**, 66:2857-2864, 2005.

HOLMES, W.C. A review preparatory to an infrageneric classification of *Mikania* (Eupatorieae). In:___Hind, D. J. N., Jeffrey, C.; Pope, G. V, (Eds). **Advances in Compositae Systematics**, Royal Botanical Gardens, Kew. 239-254, 1995.

HOLMES, W.C. A proposed sectional classification for *Mikania* (Eupatorieae). In:___Hinds, D.J.N.; Beentje, H.J. Eds), **Compositae: Systematics. Proc. INT. Compositae Conf** Royal Botanical Gardens, Kew. 1; 621-626, 1996.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Twenty years of research into medicinal plants:Results and perspectives. **Phytochemistry Reviews**, 1: 275-285, 2002.

HUTCHISON, M.; LEWER, P.; MACMILLAN, J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of eighteen derivatives of *ent*-Kaur-16-en-19-oic acid. **Journal of Chem. Soc. Perkin, Trans.** 2363-2366, 1984.

ISLAM, M.; YOSHIMOTO, M.; YAHARA, S.; OKUNO, S.; ISHIGURO, K.; YAMAKAWA, O. Identification and characterization of foliar polyphenolic composition in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50:3718-3722, 2002.

JUNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, 28(3):519-528, 2005.

KRAUTMANN, M.; RISCALA, E.C.; BURGUEÑO-TAPIA, E.; MORA-PÉREZ, Y.; CATALÁN, C.A.N.; JOSEPH-NATHAN, P. C-15-Functionalized eudesmanolides from *Mikania campanulata*. *Journal of Natural Products*, 70:1173-1179, 2007.

KING, R.M.; ROBINSON, H. Subtribe Mikaniinae. In__ King, R.M.; Robinson, H. *The genera of the Eupatorieae (Asteraceae)*. Missouri Botanical Gardens, USA, 418-426, 1987.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. In:___*Plantas Infestantes e Nocivas*. Editora BASF, 2ª ed., v.2, 374-375, 1999.

KNUDSEN, F.S.; VILEGAS, W.; OLIVEIRA, F.; ROQUE, N.F. Pimaradiene diterpenes from *Mikania triangularis*. *Phytochemistry*. 25(5), 1240-1242, 1986.

LEAL, L.K.A.M.; FERREIRA, A.A.G.; BEZERRA, G.A.; MATOS, F.J.A.; VIANA, G.S.B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*. 70, 151-159, 2000.

LEWIS, I.A.S. & MACLEOD, J.K. The toxic extractives from *Wedelia asprima* – II. The structure of edlside, a novel diterpenoid aminoglycoside. *Tetrahedron*, 37(24):4305-431, 1981.

LIMBERGER, R.; SUYENAGA, E.S.; HENRIQUES, A.T.C.; MENUT, C.; VERIN, P.; LAMATY, G.; BESSIERE, J.M.. Aromatic plants from Brazil. Part VI. Chemical composition of essential oils from three southern Brazilian species of *Mikania* (Asteraceae). *Journal of Essential Oil Research*., 10(4):363-367, 1998.

LIMBERGER, R.P.; ABOY, A.L.; BASSANI, V.L.; MORENO, P. R.H.; RITTER, M.R.; HENRIQUES, A.T. Essential oils from four *Mikania* species (Asteraceae). *Journal of Essential Oil Research*.13(4):225-228, 2001.

LI, X.; ZHANG, D.; ONDA, M. *ent*- Kauranoid diterpenes from *Artemisia sacrorum*. *Journal of Natural Products*, 53(3):657-661, 1990.

MACLEOD, J.K.; LEWIS, I.A.S.; MOELLER, P.D.R. The toxic extractives from *Wedelia asperima* –III. Structures of two naturally occurring rhamnosyl analogues of wedeloside. *Journal of Natural Products*, 53(5):1256,1261, 1990.

MACLEOD, J.K.; MOELLER, P.D.R. Two toxic kaurene glycosides from the burrs of *Xanthium pungens*. *Journal of Natural Products*, 53(2):451-455, 1990.

MAFFEI, E.M.D.; MARIN-MORALES,M.A.; RUAS, P.M.; RUAS, C.F. Numerical chromosome polymorphism in *Mikania cordifolia*. *Genetics and Molecular Biology*, 22(4): 609-612, 1999.

MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M.A.F.; OLIVEIRA, C.Z.; COUTO, L.B.; GOMES, O.A.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; PEREIRA, P.S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *Journal of Ethnopharmacology*. 102, 364-370, 2005.

MOURA, R.S.; COSTA, S.S.; JANSEN, J.M.; SILVA, C.A.; LOPES, C.S.; BERNARDO-FILHO, M.; SILVA, N.; CRIDDLE, D.N.; PORTELA, B.N.; RUENICH,L,M.S.; ARAÚJO, R.G.; CARVALHO, L.C.R.M. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 54, 249-256, 2002.

NAKAJIMA, J. N. & SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 24(4):471-478, 2001.

NASCIMENTO, I.R. & LOPES, L.M.X. Diterpene esters of acids from *Aristolochia pubescens*. *Phytochemistry*, 63:953-957, 2003.

NASCIMENTO, A.M.; OLIVEIRA, D.C.R. Kaurene diterpenes and other chemical constituents from *Mikania stipulacea* (M. Vahl) Willd. *Journal of. Brazilian. Chemical. Society*. 12(4), 552-555, 2001.

NASCIMENTO, A.M.; CHAVES, J.S.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVEIRA, D.C.R. Trypanocidal properties of *Mikania stipulacea* and *Mikania hoehnei* isolated terpenoids. *Fitoterapia*. 75, 381-384, 2004.

OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M.A.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Isolation and identification of chemical components of *Mikania glomerata* Sprengel and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, 20(2):169-183, 1984.

OLIVEIRA, F.; SAITO, M.L.; GARCIA, L.O. Thin layer chromatographic characterization of fluid extract of guaco – *Mikania glomerata* Sprengel. *Lecta USF*, 11(1):43-56, 1993.

OLIVEIRA, F.; OGA, S.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Parâmetros físicos e químicos e efeito antiedema dos extratos fluidos de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e de guaco de mato (*Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker). *Anais de. Farmácia e. Química de São Paulo*. 25(1,2), 50-54, 1985.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.; MANCINI, B.; CHUMZUM, M. Morfodiagnose do axofito do guaco – *Mikania glomerata* Sprengel. *Revista de Ciências Farmacêuticas*. 8/9, 11-24, 1986/1987.

OLIVEIRA, F.; FERRO, V.O. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido do guaco-das-sete-sangrias – *Mikania smilacina* DC. *Revista Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*. 21(1), 1-13, 1985.

PEREIRA, A.M.S.; CÂMARA, F.L.A.; CELEGHINE R.M.S.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M.; FRANÇA, S.C. Seasonal variation in coumarin content of *Mikania glomerata* *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 7(2):1-10, 2000.

PUROHIT, M.C.; RAWAT, M.S.M.; PANT, G.; NAUTIYAL, A.K.; SAKAKIBARA, J.; KAIYA, T. A methyl ester of melilotoside from the sapwood of *Prunus cornuta*. *Phytochemistry*, 32(2):431-432, 1993.

ROQUE, N.F.; VILEGAS, W.; GIANELLA, T.L.; KNUDSEN, F.S.; RONDELLA, G.; TORRES, L.M.; FERRO, V.O.; OLIVEIRA, F. Compostas medicinais do Brasil. 2. Estudo

químico de *Solidago microglossa*, *Mikania triangularis*, *M. diversifolia*, *M. smilacina*, *M. microleptis* e *Wedelia paludosa*. **Suplemento Acta Amazônica**. 18(1:2):473-476, 1988.

RUAS, C.F.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; Chromosome evolution in the genus *Mikania* (Compositae). **American Journal of Botany**. 84(8), 1156-1163, 1997.

RUPPELT, B.M.; PEREIRA, E.F.R.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N.A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom – I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 86, Suppl. II, 203-205, 1991.

SANTOS, P.A.; PEREIRA, A.M.S.; FRANCA, S.C.; LOPES, N.P. Steroids and coumarin from callus of *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 35(2):231-235, 1999.

SANTOS, S.C.; KRUEGER, C.L.; STEIL, A.A.; KRUEGER, M.R.; BIAVATTI, M.W.; JUNIOR, A.W. LC characterization of guaco medicinal extracts, *M. laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta Medica**, 72:679-684, 2006.

SANTOS, T.C.; TOMASSINI, T.C.B.; CABRAL, L.M. Preliminary studies of the composition and antimicrobial activity of *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmácia**. 79(3/4):54-55, 1998.

SARG, T.M.; EL-DAHMY, S. A further new ent-labdane from *Mikania alvimii*. **Fitoterapia**. 61(2), 160-161, 1990.

SCHTEINGART, C.D.; POMILIO, A.B. Atractyloside, toxic compound from *Wedelia glauca*. **Journal of Natural Products**, 47(6):1046-1047, 1984.

SHORR, K.; DA COSTA, F.B. Quantitative determination of enhydrin in leaf rinse extracts and in glandular trichomes of *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) by reversed-phase- High-performance Liquid Chromatography. **Phytochemical Analysis**, 16:161-165, 2005.

SILVEIRA E SÁ, R.C.; LEITE, M.N.; REPOREDO, M.M.; ALMEIDA, R.N. Evaluation of long-term exposure to *Mikania glomerata* (Sprengel) extract on male Wistar rats'

reproductive organs, sperm production and testosterone level. *Contraception*. 67, 327-331, 2003.

SIMÕES, C.M.A.; MENSTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. Editora da Universidade UFRGS, 4ª ed., p. 88-89, 1995.

SIMÕES, C.M.O.S.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; PETROVICK, P.R. In: *Farmacognosia – da planta ao medicamento*, Rio Grande do Sul, Brasil, Editora da UFSC, 5ª ed., 2004.

SOARES, A.P., NASCIMENTO, A.M.; TALEB-CONTINI, S.H.; OLIVEIRA, D.C.R. Constituents of *Mikania lasiandrae*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(6):708-709, 2007.

SOUZA, J.M.; TALEB-CONTINI, S.H.; OLIVEIRA, D.C.R. Phytochemical study of *Mikania pseudohoffmanianna* G. M. Barroso ex W. C. Holmes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 42(2), 265-268, 2006.

SPRING, O. Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. *Advances in Botanical Research*. 31:153-174, 2000.

SUYENAGA, E.S.; RECHE, E.; FARIAS, F.M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; CHAVES, C.G.M.; HENRIQUES, A.T. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. *Phytopherapy Research*. 16, 519-523, 2002.

VASÄNGE, M.; LIU, B.; WELCH, C.J.; ROLFSEN, W.; BOHLIN, L. The flavonoid constituents of two *Polypodium* species (Calaguala) and their effect on elastase release in human neutrophils. *Planta Medica*, 63:511-517, 1997.

VENEZIANI, R.C.S.; OLIVEIRA, D.C.R. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel, *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(1):99-102, 1999.

VICHNEWSI, W.; FILHO, H.F.L.; MURARI, R.; HERZ, W. Cinnamoylgrandifloric acid from *Mikania oblongifolia*. *Phytochemistry*. 16: 2028-2029, 1977.

VILEGAS, J.H.Y.; MARCHI, E.; LANÇAS, F.M. Extraction of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ('guaco') leaves. ***Phytochemical. Analysis*** 8: 266-270, 1997a.

VILEGAS, J.H.Y.; MARCHI, E.; LANÇAS, F.M. Determination of coumarin and kaurenoic acid in *Mikania glomerata* ('guaco') leaves by capillary gas chromatography. ***Phytochemical Analysis***. 8: 74-77, 1997b.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; MURATA, R.M.; REHDER, V.L.G.; MELO, L.V.; KOO, H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. ***Journal of Ethnopharmacology***. 97: 183-189, 2005.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos; a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. ***Química Nova***, 24(1):147-152, 2001.

WAGNER, G.J.; WANG, E.; SHEPHERD, R.W. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. ***Annals of Botany***, 93:3-11, 2004.

WAGNER, H.; ZGAINSKI, E.M. In:___ ***Plant Drug Analysis***. Editora Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Alemanha, 1984.

WEHRLI, F.W. & NISHIDA, T. ***The use of carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in natural products chemistry***, 1978

ZHI-DA, M.; MIZUNO, M.; TANAKA, T.; IINUMA, M.; GUANG-YI, X.; QING, H. A diterpene from *Euphorbia antiquorum*. ***Phytochemistry***, 28(2):553-555, 1989.