

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Instituto de Química  
Departamento de Química Orgânica

## Tese de Doutorado

Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: Estudo químico e atividade sobre o sistema gastrointestinal de *Mouriri pusa* Gardner e *Mouriri elliptica* Martius (Melastomataceae).

Marcio Adriano Andréo

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Marcio Adriano Andréo



*Pós-graduação em Química*

**Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: Estudo químico e atividade sobre o sistema gastrintestinal de *Mouriri pusa* Gardner e *Mouriri elliptica* Martius (Melastomataceae).**

Tese apresentada ao Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara – SP  
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

A559p      Andreo, Marcio Adriano  
Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores : estudo químico e atividade sobre o sistema gastrointestinal de *Mouriri pusa* Gardner e *Mouriri elliptica* Martius (Melastomataceae) / Marcio Adriano Andreo. – Araraquara : [s.n], 2008  
106 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Wagner Vilegas

1. Química orgânica. 2. Flavonóides. 3. Produtos naturais.  
4. sssssss. I. Título.

# BANCA EXAMINADORA

MÁRCIO ADRIANO ANDRÉO

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


Araraquara, 06 de junho de 2008.

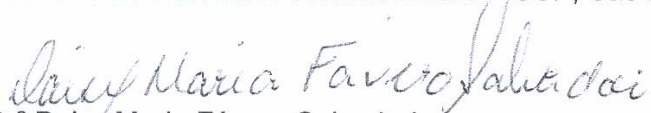
## BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Wagner Vilegas (Orientador)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

  
Profª Drª Isabele Rodrigues Nascimento  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

  
Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto

  
Profª Drª Elfriede Marianne Bacchi  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo

  
Drª Daisy Maria Fávero Salvadori  
Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu

**AUXILIO FINANCEIRO**



# DADOS CURRICULARES

Marcio Adriano Andreo

## Dados Pessoais

Filiação Ricardo Soares Andreo e Aparecida de Jesus Adriano  
Nascimento 28/07/1976 – Ribeirão Preto/SP - Brasil  
Carteira de Identidade 27.336.233-1 SSP - SP - 14/03/1991

2004/2008 Doutorado em Química.  
Instituto de Química de Araraquara-UNESP  
Título: Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores:  
Atividade de *Mouriri* ssp sobre o sistema gastrintestinal.  
Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas  
Bolsista FAPESP

2002/2003 Mestrado em Ciências Farmacêuticas.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP-Araraquara  
Título: Estudo químico-farmacológico de *Ananas ananassoides* Baker  
L.B. Smith (Bromeliaceae) e *Mouriri pusa* Gardner  
(Melastomataceae).  
Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas  
Bolsista CAPES

1997/2002 Graduação em Farmácia e Bioquímica.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP

## Atuação profissional

### **1. Drogaria São Judas Tadeu**

2002/2002 Vínculo: CLT , Enquadramento funcional: Farmacêutico, 44 horas  
Atividade Responsabilidade Técnica (Farmacêutico)

## Produção Bibliográfica

### **Artigos completos publicados em periódicos**

1 SANTOS, F. V.; TUBALDINI, F. R.; CÓLUS, I. M. S.; ANDRÉO, M. A.;  
BAUAB, T. M.; LEITE, C. Q. F.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenicity  
of *Mouriri pusa* Gard. and *Mouriri elliptica* Mart. **Food and Chemical Toxicology**,  
**Aceito** em 24 de abril de 2008.

- 2 VASCONCELOS, P. C. P.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M. A.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R. K.; HIRUMA-LIMA, C. A.; PELLIZZON, C. H. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 293-301, 2008.
- 3 SILVA, J. S.; ANDREO, M. A.; TUBALDINI, F. R.; VARANDA, E.; ROCHA, L. R. M.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Differences in Gastroprotective and Mutagenic actions between polar and apolar extracts of *Ananas ananassoides*. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 160-168, 2008.
- 4 ANDREO, M. A.; BALLESTEROS, K. V. R.; HIRUMA-LIMA, C. A.; Rocha, L. R. M.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Effects of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 431-441, 2006
- 5 RICARDO, M. A. G.; ANDREO, M. A.; CAVALHEIRO, A. J.; GAMBOA, I. C.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. Bioactive pyrones and flavonoids from *Cryptocarya aschersoniana* seedlings. **Arkivoc**, v. 2004, p. 127-136, 2004.

#### **Resumos expandidos publicados em anais de congressos**

- 1 TUBALDINI, F. R.; RODRIGUES, C. M.; ANDREO, M. A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. Avaliação da atividade mutagênica das plantas *Hancornia speciosa* e *Ananas ananassoides* através de ensaios de mutação gênica reversa. In: **52ª Jornada Farmacêutica da UNESP**, 2005, Araraquara. Anais da 52ª Jornada Farmacêutica da UNESP, 2005

#### **Resumos publicados em anais de congressos (artigo)**

- 1 VARANDA, E.; TUBALDINI, F. R.; BISO, F. I.; RODRIGUES, C. M.; ANDREO, M. A.; VILEGAS, W. Mutagenicity of vegetable extracts obtained from brazilian medicinal species.. In: Congresso Italo-Latinoamericano de entomedicina Gonzalo Aguirre Beltran, 2005, México. **Revista Latinoamericana de Química**. México: Maxin, 2005. v. Suplem. p. 207-207

#### **Resumos publicados em anais de congressos**

- 1 VASCONCELOS, P. C. P.; ANDREO, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; PELLIZZON, C. H. Gastric ulcer healing promoted by flavonoids and tannins from the medicinal plant *Mouriri pusa* Gardn. (Melastomataceae). In: **The first collaborative meeting on phytomedicine**, 2007, Ascona. Anais The first collaborative meeting on phytomedicine, 2007.
- 2 MARINI, F. S.; ANDREO, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Estudo fitoquímico do extrato apolar das folhas de *Mouriri elliptica* Mart. (Melastomataceae). In: **I Simpósio Paulista de Farmacognosia**, 2007, Araraquara. Anais do Simpósio Paulista de Farmacognosia, 2007.

- 3 ANDREO, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Isolamento e identificação dos flavonóides presentes nas folhas de *Mouriri pusa* Gard. (Melastomataceae) II. In: **I Simpósio Paulista de Farmacognosia**, 2007, Araraquara. Anais do I Simpósio Paulista de Farmacognosia, 2007.
- 4 MASSUCATO, C. N.; ANDREO, M. A.; FERREIRA, M. L.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Atividade anti-hemorrágica do extrato metanólico e frações das folhas de *Mouriri pusa* Gard. (Melastomataceae) contra o veneno de *Bothrops jararaca* em camundongos. In: **39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental-SBFTE**, 2007, Ribeirão Preto. Anais do 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2007.
- 5 VASCONCELOS, P. C. P.; ANDREO, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; PELLIZZON, C. H. Tannins from *Mouriri pusa* Gardn. (Melastomataceae) promoted cytoprotection in gastric mucosa: an ultrastructural analysis. In: **XVI Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina-SILAE**, 2007, La Plata. Anais do SILAE, 2007.
- 6 VASCONCELOS, P. C. P.; ANDREO, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; PELLIZZON, C. H. Avaliação do efeito gastroprotetor das frações de flavonóides e de taninos do extrato metanólico das folhas de *Mouriri pusa* Gardn. In: **39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental-SBFTE**, 2007, Ribeirão Preto. Anais do 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2007.
- 7 SANTOS, F. V.; COLUS, I. M. S.; ANDREO, M. A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. Mutagenicity of *Mouriri pusa* Gardner extract and enriched fraction. In: **XV Congresso Italo-Latinoamericano di Etnomedicina Ivano Morelli-SILAE**, 2006, Perugia e Roma. Anais do SILAE, 2006.
- 8 BAUAB, T.; ANDREO, M. A.; VARANDA, E.; LEITE, C. Q. F.; VILEGAS, W. Antibacterial activity from *Mouriri pusa*. In: **XV Congresso Italo-Latinoamericano di Etnomedicina Ivano Morelli-SILAE**, 2006, Perugia-Roma. Anais do SILAE, 2006.
- 9 MOLEIRO, F. C.; ANDREO, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. Avaliação da atividade gastroprotetora de *Mouriri elliptica* Mart. (Melastomataceae) em modelos agudos de indução de lesão gástrica. In: **XXI Reunião Anual Da Federação De Sociedades De Biologia Experimental-FESBE**, 2006, Águas de Lindóia. Anais da FESBE, 2006.
- 10 MOLEIRO, F. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; ANDREO, M. A.; VILEGAS, W. Avaliação do óxido nítrico e do grupamento sulfidril no efeito gastroprotetor do extrato metanólico de *Mouriri elliptica* Mart. (Melastomataceae). In: **XXI Reunião Anual Da Federação De Sociedades De Biologia Experimental-FESBE**, 2006, Águas de Lindóia. Anais da FESBE, 2006.
- 11 VASCONCELOS, P. C. P.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; PELLIZZON, C. H. Regeneração da mucosa gástrica induzida pelo extrato metanólico das folhas de *Mouriri pusa* (Melastomataceae). In: **XXI Reunião Anual Da Federação De Sociedades De Biologia Experimental-FESBE**, 2006, Águas de Lindóia. Anais da FESBE, 2006.



- 12 ANDREO, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Isolamento e identificação de flavonóides presentes nas folhas de *Mouriri elliptica* Mart utilizando DCCC. In: **II Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Relacionadas-SIMCRO**, 2006, São Pedro. Anais do SIMCRO, 2006.
- 13 VASCONCELOS, P. C. P.; BALLESTEROS, K. V. R.; LIMA, Z. P.; KUSHIMA, H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; PELLIZZON, C. H.; ANDREO, M. A.; VILEGAS, W. Effect of *Mouriri pusa* extract in the cicatrisation process of gastric ulcers experimental. In: **XX Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise**, 2005, Águas de Lindóia. Anais do XX Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2005.
- 14 BALLESTEROS, K. V. R.; HIRUMA-LIMA, C. A.; Rocha, L. R. M.; ANDREO, M. A.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Avaliação preliminar do efeito antiulcerogênico e toxicidade do extrato metanólico das folhas de *Mouriri pusa* Gardn. In: **XIX Reunião Anual Da Federação De Sociedades De Biologia Experimental-FESBE**, 2004, Águas de Lindóia. Anais da FESBE, 2004.
- 15 BALLESTEROS, K. V. R.; Rocha, L. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; ANDREO, M. A.; VILEGAS, W. Avaliação preliminar da atividade gastroprotetora de *Mouriri pusa*. In: **VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, 2003, São Pedro. VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 2003.
- 16 ANDREO, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Investigação química das folhas de *Mouriri pusa* Gard. (Melastomataceae): atividade antioxidante. In: **VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, 2003, São Pedro. Anais da VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 2003.
- 17 ANDREO, M. A.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato metanólico das folhas de *Mouriri pusa* Gard. (Melastomataceae). In: **VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, 2003, São Pedro. Anais da VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 2003.
- 18 ANDREO, M. A.; SANNOMIYA, M.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. Flavonóides identificados do extrato metanólico das folhas de *Mouriri pusa* Gard. (Melastomataceae). In: **XXV Reunião Anual Sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares-RESEM**, 2003, Campos do Jordão. Anais do RESEM, 2003.
- 19 ANDREO, M. A.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. Avaliação da atividade antiulcerogênica das folhas de *Mouriri pusa* Garder (Melastomataceae). In: **Congresso Ítalo-Latino Americano de Etnomedicina-SILAE**, 2003, Rio de Janeiro. Anais do SILAE, 2003.
- 20 ANDREO, M. A.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. Constituintes apolares de *Ananas ananassooides* (Bromeliaceae). In: **V Workshop de Plantas Mediciniais**, 2002, Botucatu. Anais do V Workshop de Plantas Mediciniais, 2002.
- 21 SILVA, M. A.; ANDREO, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Constituintes apolares de *Strychnos pseudoquina*. In: **V Workshop de Plantas Mediciniais**, 2002, Botucatu. Anais do V Workshop de Plantas Mediciniais, 2002.

- 22 ANDREO, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Fenilpropanóides das folhas de *Ananas ananassoides* (Bromeliaceae). In: **XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, 2002, Cuiabá. Anais do XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2002.
- 23 ANDREO, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W.; MARONA, H. R. N. Investigação da atividade sobre a motilidade intestinal de camundongos com o extrato de *Mouriri pusa* (Melastomataceae). In: **I Congresso Internacional de Atualização Técnico-Científica**, 2002, São José do Rio Preto. I Congresso Internacional de Atualização Técnico-Científica, 2002.
- 24 BASTOS, W. L.; RICARDO, M. A. G.; ANDREO, M. A.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J. Pironas de raízes e folhas de plântulas e de folhas de *Cryptocarya ashersoniana* (Lauraceae). In: **23a. Reunião Anual da SBQ**, 2000, Poços de Caldas. 23a. Reunião Anual da SBQ - Livro de Resumos, 2000.

*É pela bênção do trabalho que podemos esquecer os pensamentos que nos perturbam, olvidar os assuntos amargos, servindo ao próximo, no enriquecimento de nós mesmos.*

*Com o trabalho, melhoramos nossa casa e engrandecemos o trecho de terra onde a Providência Divina nos situou.*

*Ocupando a mente, o coração e os braços nas tarefas do bem, exemplificamos a verdadeira fraternidade e adquirimos o tesouro da simpatia, com o qual angariaremos o respeito e a cooperação dos outros.*

*Quem não sabe ser útil não corresponde à Bondade do Céu, não atende aos seus justos deveres para com a humanidade e nem retribui a dignidade da pátria amorosa que lhe serve de mãe.*

*O trabalho é uma instituição de Deus.*

*Meimei*

*A minha esposa Cristiane e filhos Luana e Guilherme  
Não há meios de mensurar a influência destes seres  
iluminados neste trabalho  
Seria pouco agradecer pelo apoio que me deram  
Pela paciência que tiveram  
Pela luz que irradiaram  
amo vocês*

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, mestre e amigo, pelo estímulo constante, orientação, confiança, paciência, amizade e oportunidade.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lourdes Campaner dos Santos, pela colaboração e amizade.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clélia Akiko Hiruma-Lima e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eliana Varanda pela intensa colaboração.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Claudia Helena Pellizzon, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alba R. M. Souza Brito, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tais Bauab, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Herida R. N. Salgado, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iracilda Zeppone Carlos, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clarice Queico Fujimura Leite e a seus queridos orientados Paulo César de P. Vasconcelos, Fabio C. Moleiro, Kátia V. R. Ballesteros, Helio Kushima, Fábio Vieira dos Santos, Flavio Tubaldini pela colaboração e ensaios farmacológicos realizados.

À Dr<sup>ª</sup>. Miriam Sannomyia, sempre pronta para ajudar.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela infinda ajuda, amizade e espectros de RMN obtidos.

Aos professores do Departamento de Química Orgânica (IQ-UNESP) pela oportunidade e aprendizado.

Aos membros da comissão examinadora pelas valiosas sugestões.

Aos colegas de trabalho, Ana Lucia Nasser, Tâmara Calvo, Juliana Severi, Marcelo Silva, Clenilson Rodrigues, Daniel Rinaldo, Claudia Nehme, Juliana Rodrigues, Juliana Gomes, Danielle Baldo, Ana Carolina Benfatti, Carolina Gomes, Adriana Moura, assim como todos os outros, que não pouparam esforços para tornar mais fácil meu trabalho.

À aluna Flavia S. Marini pela colaboração e paciência.

A todos os funcionários, graduandos e pós-graduandos dos Departamentos de Química Orgânica, Seção de Pós-Graduação, SAEPE e da Biblioteca, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos do programa BIOTA-FAPESP.

À FAPESP pela bolsa concedida.

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento químico
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC-FN	Cromatografia em Coluna – Fase Normal
CC-FR	Cromatografia em Coluna – Fase Reversa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLMP	Cromatografia Líquida de Média Pressão
COSY	Correlate spectroscopy
COX-2	Cicloxigenase-2
CPG	Cromatografia de Permeação em Gel
CXCR4	CXC chemokine receptor 4
<i>d</i>	Dubleto
d.i.	Diâmetro interno
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos
DAINE	Droga antiinflamatória não esteroïdal
DCCC	<i>Droplet Countercurrent Chromatography</i>
Dcm	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DMSO- $d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	1,1-difenil-1-picril-hidrazila
EDcm	Extrato diclorometânico
EM	Espectrometria de Massas
EMeOH	Extrato metanólico
EMeOH 80	Extrato metanol/água (80:20, v/v)
FM	Fase móvel
<i>gHMBC</i>	<i>Gradient heteronuclear multiple bond correlations</i>
<i>gHMQC</i>	<i>Gradient heteronuclear through multiple quantum coherence</i>
HAc	Ácido acético
HSCCC	<i>High Speed Countercurrent Chromatography</i>
HSP 70	Heat shock protein 70
ILU	Índice de Lesão Ulcerativa
IV	Infravermelho

<b>J</b>	Constante de acoplamento
<b>L</b>	Comprimento da coluna
<b>L-NAME</b>	N-nitro-L-arginina-metil-éster
<b>m</b>	Multiplete
<b>Me</b>	<i>Mouriri elliptica</i>
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>Mp</b>	<i>Mouriri pusa</i>
<b>NEM</b>	N-ethylmaleimida
<b>NOESY</b>	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
<b>NP/PEG</b>	<i>Natural product/polietilenoglicol</i>
<b>n-PrOH</b>	n-propanol
<b>PCNA</b>	Proliferation Celular Nuclear Antigen
<b>PVPP</b>	Polivinilpolipirrolidona
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>s</b>	Singleto
<b>sl</b>	Singleto largo
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>TOCSY</b>	<i>Totally Correlated Spectroscopy</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	<i>Mouriri ssp</i> Melastomataceae (Sunshine-Seeds, 2005)	<b>8</b>
<b>Figura 4.1.1</b>	Obtenção dos extratos e frações a partir das folhas de <i>M. pusa</i>	<b>24</b>
<b>Figura 4.1.2</b>	Fracionamento da porção <b>FAcOEt Mp</b> : A - Purificação em coluna de PVPP (10 cm x 1,0 cm d.i.), FM = Metanol; B - Purificação em coluna de CPG - Sephadex LH-20 (70 cm e 3,0 cm d.i.), FM = Metanol; C <sub>1</sub> - Purificação em CLAE – Sílica (C <sub>18</sub> , 25 cm x 1 cm x 10 μm), FM = Metanol/H <sub>2</sub> O 45:55 v/v; C <sub>2</sub> - Purificação em CLAE – Sílica (C <sub>18</sub> , 25 cm x 1 cm x 10 μm), FM = Metanol/H <sub>2</sub> O 35:65 v/v	<b>26</b>
<b>Figura 4.1.3</b>	Curva de calibração de DPPH a 517 nm: Equação ( $A = 0,01801C + 0,01015$ ); R=0,9906	<b>36</b>
<b>Figura 4.1.4</b>	Porcentagens de DPPH restante após reação com os extratos e frações das folhas de <i>M. pusa</i> : Controle positivo = quercetina/ácido gálico	<b>37</b>
<b>Figura 4.1.5</b>	Concentração eficiente (CE <sub>50</sub> ) dos extratos e frações das folhas de <i>M. pusa</i> : Controle positivo = quercetina/ácido gálico	<b>38</b>
<b>Figura 4.1.6</b>	Curva de calibração de fenóis totais a 760 nm: Padrão – Ácido Gálico; Equação ( $A = 0,01257C - 0,2453$ ); R=0,9992	<b>39</b>
<b>Figura 4.1.7</b>	Conteúdo de fenóis totais dos extratos e frações das folhas de <i>M. pusa</i> , expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.	<b>40</b>
<b>Figura 4.1.8</b>	Curva de calibração de flavonóides totais a 415nm: Padrão – Quercetina; Equação ( $A = 0,02396C + 0,07013$ ); R=0,9921	<b>41</b>
<b>Figura 4.1.9</b>	Conteúdo de flavonóides totais nos extratos e frações das folhas de <i>M. pusa</i> , expressos como mg de EQ (equivalentes de quercetina) por g de amostra.	<b>42</b>
<b>Figura 4.1.10</b>	Cromatogramas do extrato <b>EMeOH Mp</b> : 1-Miricetina-3-O-β-galactopiranosose (TR=12,95); 2-Miricetina-3-O-β-glicopiranosose (TR=13,48); 3-Não Identificado (TR=15,10); 4-Rutina (TR=16,93); 5-Miricetina-3-O-β-rhamnopiranosose (TR=18,29); 6-Quercetina-3-O-β-galactopiranosose (TR=19,21); 7-Quercetina-3-O-β-xilopiranosose (TR=20,03); 8-Quercetina-3-O-α-arabinopiranosose (TR=22,68); 9-Kaempferol-3-O-β-glicopiranosose e/ou Kaempferol-3-O-β-galactopiranosose (TR=23,90); 10-Quercetina-3-O-α-arabinofunanosose (TR=25,55); 11-Quercetina-3-O-α-rhamnopiranosose (TR=26,68); 12-Miricetina (TR=31,87) e 13-Quercetina (TR=39,35).	<b>44</b>
<b>Figura 4.2.1</b>	Obtenção dos extratos e frações a partir das folhas de <i>M. elliptica</i>	<b>53</b>
<b>Figura 4.2.2</b>	Purificação da fração de flavonoides ( <b>F2</b> ): A - Purificação em coluna de PVPP (10 cm x 1,0 cm d.i.), FM = Metanol; b - Purificação em coluna de CPG - Sephadex LH-20 (70 cm e 3,0 cm d.i.), FM = Metanol; C <sub>1</sub> - Purificação em CLAE (Sílica C <sub>18</sub> , 25 cm x 1 cm x 10 μm), FM = Metanol/H <sub>2</sub> O 45:55 v/v, Fluxo 2mL/min; C <sub>2</sub> - Purificação em CLAE (Sílica C <sub>18</sub> , 25 cm x 1 cm x 10 μm), FM = Metanol/H <sub>2</sub> O 35:65 v/v, Fluxo = 2mL/min.	<b>55</b>
<b>Figura 4.2.3</b>	Comparação por CCD das amostras <b>Me2</b> , <b>Me3</b> e <b>Me4</b> com os padrões Kaempferol (K), Quercetina (Q) e Miricetina (M): FM= CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O 80:18:2 v/v/v, Revelador=NP/PEG.	<b>56</b>
<b>Figura 4.2.4</b>	Análise por CLAE-UV-DAD da quercetina-3-O-β-xilopiranosose, <b>Me8</b> (TR=20,28 min, λ=360nm). Coluna Phenomenex. Fase móvel: água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificados com 0,05% de TFA. Gradiente: 23-50 %B (40 min), 50-100 %B (10min) e 100 %B (5 min), com tempo total de análise de 55 min, Fluxo = 1mL/min.	<b>58</b>
<b>Figura 4.2.5</b>	Análises por CLAE-UV-DAD da (+)-catequina <b>Me9</b> (TR=14,75 min), miricetina-3-O-α-rhamnopiranosose <b>Me10</b> (TR=23,91 min) e quercetina-3-O-β-galactopiranosose <b>Me11</b> (TR=24,38 min). Coluna Phenomenex; Fase móvel: água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificados com 0,05% de TFA. O gradiente usado foi 10-20 %B (20 min), 20-40 %B (20min), 40-100 %B (10 min) e 100 %B (5 min), com tempo total de análise de 55 min; A- observação em 210 nm; B – observação em 360 nm; Fluxo = 1mL/min.	<b>59</b>



<b>Figura 4.2.6</b>	Analises por CLAE-UV-DAD da miricetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -galactopiranosose <b>Me12</b> (TR=20,29 min, $\lambda$ =360 nm) e (+)-galocatequina <b>Me13</b> (TR=9,85 min, $\lambda$ =210 nm). Coluna Phenomenex. Fase móvel: água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificados com 0,05% de TFA. O gradiente usado foi 10-20 %B (20 min), 20-40 %B (20min), 40-100 %B (10 min) e 100% %B (5 min), com tempo total de análise de 55 min. Fluxo = 1ml/min	<b>60</b>
<b>Figura 4.2.7</b>	Análise por CCD das frações obtidas de <b>F1</b> por DCCC: Sílica; CHCl <sub>3</sub> /MeOH/n-PrOH/H <sub>2</sub> O 5:6:1:4 v/v/v/v; Revelador: Anisaldeído sulfúrico.	<b>61</b>
<b>Figura 4.2.8</b>	Porcentagens de DPPH restante dos extratos e frações das folhas de <i>M. elliptica</i> : Controle positivo = quercetina e ácido gálico	<b>69</b>
<b>Figura 4.2.9</b>	Concentração eficiente (CE <sub>50</sub> ) dos extratos e frações das folhas de <i>M. elliptica</i> : Controle positivo = quercetina e ácido gálico	<b>70</b>
<b>Figura 4.2.10</b>	Teor de fenóis totais dos extratos e frações das folhas de <i>M. elliptica</i> , expressos em mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.	<b>70</b>
<b>Figura 4.2.11</b>	Teor de flavonóides totais nos extratos e frações das folhas de <i>M. elliptica</i> , expressos como mg de EQ (equivalentes de quercetina) por g de amostra.	<b>71</b>
<b>Figura 4.2.12</b>	Cromatogramas do extrato <b>EMeOH Me</b> : 1-Miricetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -galactopiranosose (TR=13,56); 2-Miricetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosose (TR=14,09); 3-Miricetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -rhamnopiranosose (TR=18,74); 4-Quercetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -galactopiranosose (TR=19,61); 5-Quercetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -xilopiranosose (TR=20,38); 6-Kaempferol-3- <i>O</i> - $\beta$ -galactopiranosose e Kaempferol-3- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosose (TR=24,13); 7- Quercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -rhamnopiranosose (TR=26,88); 8-Miricetina (TR=31,93); 9-Quercetina (TR=39,43).	<b>72</b>
<b>Figura 4.3.1</b>	Correlação entre os fenóis totais e a atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas de <i>M. pusa</i> : (A) Todas as amostras. (B) Amostras 1, 2 e 4. Amostras: 1 = EMeOH; 2 = EMeOH80; 3 = FAcOEt; 4 = FTaninos; 5 = FFlavonóides.	<b>80</b>
<b>Figura 4.3.2</b>	Correlação entre os fenóis totais e a atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas de <i>M. elliptica</i> . (A) Todas as amostras. (B) Amostras 1, 2 e 4. Amostras: 1 = EMeOH; 2 = EMeOH80; 3 = FAcOEt; 4 = FTaninos; 5 = FFlavonóides.	<b>80</b>
<b>Figura 4.3.3</b>	Correlação entre os flavonóides totais e a atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas de <i>M. pusa</i> . (A) Todas as amostras. (B) Amostras 1, 3 e 5. Amostras: 1 = EMeOH; 2 = EMeOH80; 3 = FAcOEt; 4 = FTaninos; 5 = FFlavonóides.	<b>81</b>
<b>Figura 4.3.4</b>	Correlação entre os flavonóides totais e a atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas de <i>M. elliptica</i> . (A) Todas as amostras. (B) Amostras 1, 3 e 5. Amostras: 1 = EMeOH; 2 = EMeOH80; 3 = FAcOEt; 4 = FTaninos; 5 = FFlavonóides.	<b>81</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1.1</b>	Massas e rendimentos dos extratos e frações obtidos das folhas de <i>M. pusa</i>	<b>23</b>
<b>Tabela 4.1.2</b>	Resultados obtidos do estudo químico da fração <b>FAcOEt Mp</b> .	<b>27</b>
<b>Tabela 4.1.3</b>	Teor dos flavonoides majoritários de <i>Mouriri pusa</i> .	<b>45</b>
<b>Tabela 4.1.4</b>	Resultados dos ensaios de atividade gastroprotetora de <b>EMeOH Mp</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 4.1.5</b>	Efeito do <b>EMeOH</b> de <i>M. pusa</i> sobre as lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME (bloqueador da NO sintase).	<b>49</b>
<b>Tabela 4.1.6</b>	Efeito do <b>EMeOH Mp</b> sobre os parâmetros do suco gástrico de camundongos submetidos à ligadura de piloro.	<b>49</b>
<b>Tabela 4.1.7</b>	Efeito do <b>EMeOH Mp</b> sobre a motilidade intestinal.	<b>50</b>
<b>Tabela 4.1.8</b>	Atividade mutagênica dos extratos das folhas de <i>M. pusa</i> em linhagens de <i>S. typhimurium</i> em ausência e na presença de metabolização.	<b>51</b>
<b>Tabela 4.2.1</b>	Massas e rendimentos dos extratos e frações obtidos das folhas de <i>M. elliptica</i>	<b>52</b>
<b>Tabela 4.2.2</b>	Fracionamento de <b>F2</b> .	<b>54</b>
<b>Tabela 4.2.3</b>	Fracionamento de <b>F1</b> por DCCC	<b>62</b>
<b>Tabela 4.2.4</b>	Teor dos flavonoides majoritários de <i>Mouriri elliptica</i> .	<b>73</b>
<b>Tabela 4.2.5</b>	Ensaio farmacológico com extratos e frações das folhas de <i>M. elliptica</i>	<b>75</b>
<b>Tabela 4.2.6</b>	Atividade mutagênica dos extratos das folhas de <i>M. elliptica</i> em linhagens de <i>S. typhimurium</i> na ausência e na presença de metabolização.	<b>76</b>
<b>Tabela 4.3.1</b>	Flavonóides encontrados em <i>M. pusa</i> e/ou <i>M. elliptica</i>	<b>77</b>
<b>Tabela 4.3.2</b>	Teor de fenóis totais, teor de flavonóides totais e atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas de <i>M. pusa</i> e <i>M. elliptica</i> .	<b>79</b>

## INFORMAÇÕES GERAIS

**Os estudos químicos foram realizados no Depto. Química Orgânica – IQ – Unesp/Araraquara, pelos alunos:**

*Marcio Adriano Andreo* (Dr, FAPESP).

“Prospecção Químico-farmacológica em plantas superiores: Atividade de *Mouriri ssp* sobre o sistema gastrointestinal”

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

*Flavia Saran Marini* (IC, FAPESP)

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

**Os ensaios de toxicidade aguda, mecanismo de ação gastroprotetora e atividade antiúlcera foram realizados no Depto. de Fisiologia – IB – Unesp/Botucatu, pelos alunos:**

*Fabio Cruz Moleiro* (Ms, CAPES)

Orientadora: Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima

*Kátia Verônica Rodriguez Ballesteros* (IC, PIBIC/CNPq)

Orientadora: Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima

*Paulo Cesar de Paula Vasconcelos* (IC, FAPESP)

Orientadora: Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima

**Os ensaios de mutagenicidade foram realizados no Depto. de Ciências Biológicas – FCF – UNESP/Araraquara, pelos alunos:**

*Flavio Romanini Tubaldini* (IC, FAPESP)

Orientadora: Profa. Dra. Eliana A. Varanda

*Fabio V. Santos* (Dr, CAPES)

Orientadora: Profa. Dra. Eliana A. Varanda

## RESUMO

Neste trabalho foram estudadas folhas de *Mouriri pusa* Gardner e *Mouriri elliptica* Martius, pertencentes à família Melastomataceae. Espécies de *Mouriri* são utilizadas popularmente para problemas gastrointestinais, tais como úlceras. O estudo químico do extrato metanólico das folhas de *M. pusa* permitiu a identificação de uma flavona, dezessete flavonóis e dois flavan-3-óis, além de constatar a presença de taninos e saponinas. O estudo químico do extrato metanólico das folhas de *M. elliptica* permitiu a identificação de uma flavanona, dez flavonóis, dois flavan-3-óis e oito triterpenos pentacíclicos, além de constatar a presença de taninos e derivados de ácido ellágico. As análises por CLAE-UV-DAD de *M. pusa* e *M. elliptica*, usando como padrões os flavonóides isolados, mostraram perfis qualitativamente semelhantes, mas com diferentes teores. Os extratos metanólicos de *M. pusa* e *M. elliptica* apresentaram grande capacidade antioxidante frente ao DPPH, sendo os extratos e frações de *M. pusa* os mais ativos. Ensaio farmacológicos demonstraram que os extratos metanólicos das espécies não apresentaram efeito tóxico agudo, inibindo a formação de úlceras gástricas e reduzindo a severidade das lesões frente a diversos modelos experimentais, confirmando o uso popular. Os estudos sobre o mecanismo de ação indicaram o envolvimento do óxido nítrico (NO) na atividade gastroprotetora de *M. pusa*, assim como indicaram o envolvimento dos grupamentos sulfidríla (SH) na atividade antiulcerogênica das duas espécies. As frações enriquecidas obtidas dos extratos estudados retiveram os compostos secundários ativos ao apresentarem significativo efeito gastroprotetor, mesmo em doses reduzidas. Os extratos metanólicos apresentaram mutagenicidade positiva, sobretudo para *M. pusa*. A composição química das folhas de *M. pusa* e *M. elliptica* parece justificar as atividades encontradas, validando o conhecimento tradicional.

**Palavras-chave:** *Mouriri pusa*, *Mouriri elliptica*, Melastomataceae, flavonóides, anti-úlceras.

## ABSTRACT

In this work, was studied the leaves of *Mouriri pusa* Gardner and *Mouriri elliptica* Martius, belonging to the Melastomataceae family. Species of *Mouriri* are popularly used against gastrointestinal problems, such as ulcers. The chemical study of the methanol extract from the leaves of *M. pusa* allowed the identification of one flavone, seventeen flavonols and two flavan-3-ols (besides the detection of tannins and saponins), whereas the chemical study of the methanol extract from the leaves of *M. elliptica* led to the identification of one flavanone, ten flavonols, two flavan-3-ols and eight pentacyclic triterpenes (besides tannins and acid ellagic derivates). The HPLC-UV-DAD analysis of *M. pusa* and *M. elliptica* extracts using the isolated flavonoids as standards showed similar qualitative profiles, and quantitative differences among the compounds. The methanol extracts of *M. pusa* and *M. elliptica* showed good antioxidant capacity in the DPPH experiment, and extracts and fractions of *M. pusa* were the most active. Pharmacological investigation indicated that the methanol extracts of the species demonstrated no acute toxic effect, reduced the formation and/or severity of gastric ulcers. Studies on the mechanism of action indicated the involvement of nitric oxide (NO) in the gastroprotective activity of *M. pusa*, while endogenous sulfhydryl group (SH) were involved in the gastroprotective action of *M. pusa* and *M. elliptica*. The enriched fractions containing flavonols, catechins and tannins obtained from the extracts were more active than the crude extracts, even in lower doses. The methanol extracts of both plants induced mutagenic activity in the Ames test. The chemical composition of the leaves of *M. pusa* and *M. elliptica* seems to justify the antiulcer activity observed, thus validating the traditional knowledge.

**Keywords:** *Mouriri pusa*, *Mouriri elliptica*, Melastomataceae, flavonoids, anti-ulcers

# SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Plantas medicinais	1
1.2 Úlceras Pépticas	5
1.3 A atividade antioxidante e as úlceras	6
1.4 A terapêutica com produtos naturais	7
1.5 Espécies estudadas	8
<b>2.OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<b>3.MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>12</b>
3.1 Material vegetal	12
3.2 Extração	12
3.3 Métodos cromatográficos	13
3.4 Identificação	15
3.5 Atividade antioxidante	15
3.6 Fenóis totais	16
3.7 Flavonóides totais	16
3.8 Atividade Farmacológica	17
3.9 Mutagenicidade	21
3.10 Análise estatística	22
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>23</b>
4.1 <i>Mouriri pusa</i>	23
4.1.1 ESTUDO QUÍMICO	23
Preparo de extratos e frações	23
Isolamento e Identificação	25
Atividade antioxidante	35
Fenóis totais	38
Flavonóides totais	40
Quantificações por CLAE-UV-DAD	43
4.1.2 ESTUDO BIOLÓGICO	45
Toxicidade Aguda	46
Atividade antiulcerogênica	46
Motilidade Intestinal	50
Mutagenicidade	50
4.2 <i>Mouriri elliptica</i>	<b>52</b>
4.2.1 ESTUDO QUÍMICO	52
Preparo de extratos e frações	52
Isolamento e identificação dos Flavonóides	54
Isolamento e identificação dos Triterpenos	61
Atividade antioxidante	69
Fenóis totais	70
Flavonóides totais	71
Quantificações por CLAE-UV-DAD	72
4.2.2 ESTUDO BIOLÓGICO	74
Toxicidade Aguda	74
Atividade antiulcerogênica	74
Mutagenicidade	76
4.3 ANÁLISE COMPARATIVA DAS ESPÉCIES	77
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>82</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>94</b>
<b>ANEXOS</b>	
Estruturas	
Deslocamentos Químicos ( $\delta$ )	
Espectros de RMN	

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Plantas medicinais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) 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” (WHO, 2008). As plantas medicinais representam a forma mais antiga de tratamento medicinal. Considerado milenar, o uso de plantas medicinais é difundido por todo o mundo, seja no uso em rituais mágicos ou como medicamento (Firenzuoli *et al.*, 2005).

Os primeiros registros da utilização de plantas para fins medicinais provém da China (~3000 a.C.), onde o Imperador Shen Nung compilou o *Pen Tsao* (Compêndio de Matéria Médica Chinesa). Muitas das drogas descritas ainda são utilizadas na China (Langmead *et al.*, 2001). O povo Egípcio também é considerado pioneiro na documentação do uso de drogas vegetais, que ao longo dos anos vem sendo comprovadas cientificamente quanto à sua eficácia (Halberstein, 2005).

Na mitologia hindu, as pessoas acreditavam que o deus Incra pediu a Brahma (o senhor absoluto) que concedesse às plantas o poder de cura, porque com o surgimento do homem na Terra, este poderia gerar desequilíbrio provocando males físicos e doenças. Entretanto na mitologia grega, acreditava-se que Apolo, compadecido ante o sofrimento que as doenças traziam aos homens, dotou as ervas de poderes curativos e transmitiu esses conhecimentos a seu filho Asclépio (deus da medicina) (Bontempo, 1992).

Com o declínio da cultura grega e durante o Império Romano houve um súbito desinteresse pela pesquisa das plantas e os tratamentos medicinais voltaram a ter caráter de magia e religião. Somente nos primórdios da era Cristã (200 d.C.), alguns pesquisadores voltaram a demonstrar interesse na área (Parky, 1996).

Durante a Idade Média (séculos V-XII) os conhecimentos sobre plantas medicinais ficaram em poder da igreja, sendo copiados, traduzidos e preservados nas

bibliotecas de mosteiros (Parky, 1996). Durante esse período, o desenvolvimento da medicina natural restringiu-se aos persas e árabes, que mantiveram as idéias de Hipócrates e Galeno (Teixeira, 1994).

Em um estágio mais avançado do uso de plantas medicinais, foram criadas teorias e observações que contribuíram para a fitoterapia atual. Entre elas, a “Teoria das Assinaturas”, criada pelo botânico Robert B. Turner, no século XVII, “Deus imprimiu nas plantas, ervas, flores e frutas hieróglifos, que são a própria assinatura de suas virtudes”, que relaciona as formas das partes das plantas com sua utilização (Miguel e Miguel, 2004).

A partir do século XIX, a humanidade deparou-se com inesgotável arsenal terapêutico, presente nas ditas plantas medicinais. A descoberta de substâncias ativas, que em estado natural ou após sofrerem processos de transformação química possuíam atividade farmacológica, muitas vezes já confirmadas pelo uso popular e comprovados cientificamente, passaram a gerar interesse e incentivo institucionais e governamentais (Miguel e Miguel, 2004).

No Brasil, os pajés das tribos indígenas foram transmitindo o conhecimento dos vegetais locais e seus usos, e estes foram aprimorados de geração em geração. Esses conhecimentos foram absorvidos pelos europeus que passaram a viver no país, fundidos com aqueles trazidos da Europa, muitas vezes de uso popular bastante difundido (Martins *et al.*, 1995).

Ainda no país, os escravos africanos também contribuíram com uso de plantas trazidas da África, muitas utilizadas em rituais religiosos, mas também usadas por suas propriedades farmacológicas empiricamente descobertas, fundindo os principais alicerces de toda a tradição no uso de plantas medicinais no Brasil (Martins *et al.*, 1995).

Na primeira metade do século XX, os produtos de origem vegetal foram esquecidos, temporariamente, em decorrência do grande sucesso dos compostos



químicos obtidos de microrganismos (Vilegas, 1998). Nessa época, houve uma revolução na terapêutica que induziu o desenvolvimento de pesquisas, na indústria químico-farmacêutica, com o objetivo de sintetizar novas substâncias ativas com baixa toxicidade (Tavares, 1996).

A obtenção de novos fármacos, a partir de substâncias totalmente sintéticas, não foi mantida por muito tempo devido aos elevados custos para suas pesquisas e desenvolvimento. Tais fatos vêm proporcionando o renascimento do interesse pelas plantas na busca de protótipos para a produção de novos fármacos (Miguel e Miguel, 2004).

Embora o desenvolvimento da química e da tecnologia tenha permitido o uso de muitas substâncias puras obtidas de plantas em larga escala, com a mesma finalidade, ainda hoje um grande número de cascas, folhas e raízes são usadas em preparação para uso caseiro. No estudo de plantas medicinais de uso tradicional em medicina popular é necessário, numa primeira abordagem, tentar associar as duas formas de conhecimento: o tradicional e o científico (Schenkel *et al.*, 2001).

A fitoterapia, por sua vez, consiste no conjunto das técnicas de utilização dos vegetais no tratamento de doenças e na recuperação da saúde. Faz parte dos recursos da medicina natural e está presente também na tradição da medicina popular e nos rituais de cura indígena (Lorenzi e Matos, 2002).

Os fitoterápicos estão presentes principalmente no mercado informal, o que representa grande perigo à saúde da população, pois neste caso, sua comercialização ocorre desconsiderando aspectos relativos ao controle de identidade e/ou pureza. É indiscutível a necessidade de um maior e melhor controle nesse ramo cosmético e farmacêutico, pois os fitoterápicos representam uma alternativa economicamente viável à população (Bendazzoli, 2000).

Apesar disso, os riscos intrínsecos ao consumo desordenado de produtos derivados de plantas tidas como medicinais não podem ser esquecidos. Muitas das plantas utilizadas tiveram atividades tóxicas descritas e algumas delas utilizadas na dieta ou em tratamentos tradicionais têm mostrado atividades tóxicas (Ames, 1983; Gadano, *et al.*, 2006). Quando comparada com a dos medicamentos utilizados nos tratamentos alopáticos, a toxicidade das plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer leve. Entretanto, os efeitos adversos de plantas medicinais, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) representam um problema muito sério de saúde pública (Veiga Jr. *et al.*, 2005).

É importante ainda ressaltar que o estudo de plantas medicinais tradicionalmente utilizadas é válido em dois aspectos: primeiramente, como uma pesquisa de drogas com potencial quimioterapêutico, e em segundo, como uma medida de segurança para o uso de plantas medicinais (Elgorashi *et al.*, 2003).

Na busca por novos medicamentos oriundos de plantas medicinais, o modelo de purificação e isolamento molecular prevalece no mercado, devido às dificuldades observadas no controle de qualidade de extratos vegetais sob o ponto de vista físico-químico, toxicológico e farmacológico (Lapa *et al.*, 2000).

A seleção da espécie vegetal com base na similaridade dos constituintes ativos torna-se interessante pela possibilidade de se encontrar novos protótipos ou novas estruturas químicas ativas, enquanto a escolha com base no conhecimento popular (etnofarmacologia) traz vantagens devido ao acúmulo milenar de informações empíricas, facilitando a triagem de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos. (Amorozzo, 1996).

Considerando todos estes fatores, enfatizamos a necessidade de estudos fitoquímicos biodirecionados, tornando a busca por princípios ativos realmente interessante e não somente de uma estrutura de um composto inédito. Este tipo de estudo torna-se possível com o intercâmbio profissional de botânicos, químicos, farmacêuticos, farmacólogos e toxicólogos.

## 1.2 Úlceras pépticas

A úlcera, por definição, é uma lesão profunda da mucosa, onde tanto os componentes dos tecidos epitelial e conjuntivo, incluindo células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos (Milani e Calabro, 2001)

As úlceras pépticas são lesões na mucosa gástrica e duodenal resultantes da ruptura do equilíbrio existente entre os fatores agressivos (ácido clorídrico, pepsina,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ , dentre outros) e os de proteção (muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo adequado, prostaglandina e outros). Além destes, fatores externos como o estresse, o consumo excessivo de álcool, tabagismo, uso de drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINE) e presença de *Helicobacter pylori* podem desencadear e/ou agravar as lesões ulcerativas (Maity *et al.*, 2003).

No Brasil não existem números oficiais, mas segundo dados do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, calcula-se que 10% da população têm, tiveram ou terão úlcera péptica (Eisig e Laudanna, 2001).

Os tratamentos utilizados consistem basicamente no controle farmacológico da secreção ácida, assim vários fármacos são utilizados com eficácia. Dentre eles destacam-se os inibidores da bomba de ácido ( $H^+/K^+$ -ATPase), considerados os mais eficazes supressores da secreção ácida gástrica (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, entre outros). Os anti-histamínicos (tais como a cimetidina e a ranitidina) são extensamente utilizados, assim como os antiácidos. Os agentes anticolinérgicos (pirenzepina) e os agentes citoprotetores (Misoprostol) são menos utilizados pela forte incidência de efeito colaterais (Aihara *et al.*, 2003). E nos casos em que a úlcera péptica está relacionada à presença de *H. pylori*, as drogas anti-ulceras são associadas com antibióticos (McQuaid, 2005).

Embora as taxas de cicatrização das úlceras com a utilização dos anti-histamínicos e inibidores da bomba de  $H^+$  sejam de 80-100%, após uma semana de tratamento, a recorrência da úlcera dentro de um ano está entre 40 e 80% na maioria dos estudos (Szabo e Vincze, 2000). Além disso, estudos recentes mostram que o uso prolongado destes fármacos pode aumentar o risco de câncer (La Vecchia *et al.*, 2002).

### 1.3 A atividade antioxidante e as úlceras

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides (Volko *et al.*, 2004; Haslam, 1996). Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo (Atoui *et al.*, 2005).

Recentemente, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, câncer, doenças cardiovasculares, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais. Além de atuarem no processo ulcerogênico (Atoui *et al.*, 2005).

A atividade antioxidante pode estar correlacionada à atividade antiulcerogênica também por interferir na síntese de prostaglandinas e/ou por proteger os grupos sulfidrilas não protéicos presentes no muco do ataque de radicais livres (Mojzis *et al.*, 2001; Dias *et al.*, 2000).

Após série de experimentos, Dias *et al.* (2000) propuseram que o extrato hidroalcolico bruto de *Rosmarinus officinalis* L. possui substâncias ativas que aumentam a proteção aos grupos sulfidrilas não protéicos presentes no muco, atribuindo esta atividade à capacidade antioxidante das substâncias presentes no extrato.

#### 1.4 A terapêutica com produtos naturais

A química de produtos naturais é um ramo do conhecimento bastante diversificado e explorado atualmente. As substâncias isoladas e identificadas de plantas medicinais são classificadas de acordo com suas propriedades físico-químico-estruturais e, dentre as classes de metabólitos secundários, sabe-se que boa parte é de interesse nos estudos envolvendo problemas gastrointestinais por apresentarem efeitos gastroprotetor e cicatrizante, entre outros (Moleiro, 2007).

O efeito gastroprotetor encontrado no extrato das inflorescências de *Senecio brasilienses* foi atribuído à presença de alcalóides pirrolizidínicos, no entanto estes apresentam propriedades hepatotóxica e carcinogênica (Toma *et al.*, 2004).

Dentre os terpenos, alguns também apresentaram atividade gastroprotetora, tais como os triterpenos de *Fabiana imbricata* (Solanaceae) (Rodriguez *et al.*, 2003), lupeol, ácido ursólico, taraxerol e carbenoxolona de *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae) (Lewis e Hanson, 1991), os diterpenos (*trans*-dihidrocrotonina) de *Croton cajucara* (Euphorbiaceae) (Hiruma-Lima *et al.*, 2002), entre outros.

Mas sem dúvida, as substâncias fenólicas (ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, flavonóides e etc) são as mais citadas e estudadas, por apresentarem em geral grande atividade gastroprotetora (Moleiro, 2007).

Os extratos de plantas são uma das mais atraentes fontes de novos fármacos, pois têm mostrado resultados bastante promissores no tratamento de problemas estomacais (Hiruma-Lima *et al.*, 2000; 2001). A medicina popular utiliza um vasto número de plantas e ervas no tratamento de disfunções gástricas assim como, úlceras gástricas (Toma *et al.*, 2002). Assim, esta é uma importante razão para se investigar a atividade antiúlcera de plantas popularmente consumidas a fim de conseguir fármacos mais eficientes e menos nocivos à saúde.

## 1.5 Espécies estudadas

O Cerrado brasileiro, foco deste estudo, é um dos principais biomas do Brasil, pois além da variedade genética de sua flora, sua população retém um amplo conhecimento acerca da utilização terapêutica de sua vegetação local (Felfili e Silva Jr, 1993).

Neste trabalho, o gênero *Mouriri* (**Figura 1.1**), pertencente à família Melastomataceae, foi selecionado a partir de diversas citações na medicina popular como útil no tratamento de distúrbios gastrointestinais, como as úlceras e gastrites. Para tal fim, suas partes aéreas são preparadas na forma de chá (Silva *et al.*, 2000).

Várias espécies do gênero *Mouriri* são conhecidas popularmente como coroa-de-frade, jaboticaba-do-cerrado, pusa, pusa-preta, xiputa e dezenas de outras denominações, de acordo com suas localizações geográficas. Em geral, são arbustos de 2 a 7 m de altura com frutos comestíveis muito apreciados pelos nativos do norte do Brasil (Corrêa, 1984).

Ocorrem em vários estados brasileiros, incluindo o estado de São Paulo. Dentre as espécies que ocorrem no Estado de São Paulo estão o *Mouriri pusa* Garder, conhecida popularmente como pusa-preta, *Mouriri elliptica* Mart., conhecida popularmente como pusa-coroa, *Mouriri glazioviana* Cogn., conhecida popularmente como goiabeira-do-mato e pitanga brava, e *Mouriri chamissoana* Cogn., conhecida popularmente como cafezinho e pau-ripa. Estas espécies possuem importância medicinal e têm forte indicação popular como antiúlcera gástricas.



**Figura 1.1** - *Mouriri* ssp Melastomataceae (Sunshine-Seeds, 2005)

Sobre o gênero *Mouriri* existem poucos artigos científicos publicados e nenhum sobre as espécies em questão. Morley (1998) reporta a descrição botânica de uma nova espécie do gênero: *M. laxiflora*, encontrada no Equador, e a revisão da espécie *M. crassisejala*, encontrada na República Dominicana.

Calderon *et al* (2000) avaliaram 40 espécies do Panamá com relação à atividade citotóxica contra o *Plasmodium falciparum*, anti-HIV e anti-câncer e chegaram à conclusão que uma das espécies ativas para todos os bioensaios é o *M. myrtilloides*. Os mesmos autores lamentam o fato de que não existem quaisquer estudos químicos sobre a espécie, o que poderia levar à descoberta de novos fármacos e sugerem a introdução dessa planta dentro de um programa para avaliação de seu potencial medicinal.

Frankel e Berenbaum (1999) avaliaram a presença de compostos com atividade antioxidante em *M. myrtilloides* e encontraram expressiva atividade antioxidante associada com as condições de luminosidade à qual a planta estaria exposta. Recordando-se que a atividade antioxidante está relacionada à atividade antiúlcera, o conjunto dessas informações estimula a investigação das espécies de *Mouriri*.

Estudos com plantas de outros gêneros da família Melastomataceae também produziram resultados interessantes referentes à atividade antiúlcera, uma vez que reportaram a presença de substâncias que frequentemente têm sido associadas ao sistema gastrointestinal. Como exemplos, Isaza *et al.* (1999 e 2001) verificaram a presença de um complexo éster lignânico-flavonol glicosilado, flavonóides glicosilados e acilados e outros compostos fenólicos em *Monochaetum multiflorum*. Terahara *et al.* (1993) isolaram uma antocianina glicosilada das flores de *Tibouchina urvilleana*. Rath *et al.* (1995) caracterizaram a presença de C-glicosilflavonas em *Dissotis rotundifolia* por métodos cromatográficos. O grupo de Yoshida *et al.* (1991, 1992a, 1992b, 1992 c, 1994, 1995, 1999a, 1999b) investigou quimicamente várias espécies de Melastomatacea, dentre as quais *Tibouchina semidecandra*, *Heterocentron roseum*, *Melastoma malabathricum* e *T. multiflora*, tendo isolado e identificado taninos gálicos e elágicos, que podem estar relacionado à atividade antiúlcera gástricas. Bomfim *et al.* (2001) investigaram, para fins taxonômicos, a presença de flavonóides glicosilados em espécies de *Lavoisiera*, *Microlicia* e *Trembleya*, também pertencentes à família Melastomataceae.

As informações etnofarmacológicas foram comprovadas na investigação químico-farmacológica de *Mouriri pusa*, realizada em conjunto pelos grupos do IQAr-Unesp, IB-Botucatu-Unesp e IB-Unicamp: Em estudos preliminares foi verificada atividade anti-úlceras gástricas no extrato metanólico dessa espécie. Utilizando os modelos HCl/etanol e AINES para indução de lesão ulcerativa o extrato metanólico das folhas de *M. pusa* apresentou, na dose de 250mg/Kg, uma inibição de 57% e 33% das lesões respectivamente (Andreo *et al.*, 2006). Ainda utilizando o modelo HCl/etanol, o extrato diclorometânico das folhas de *M. pusa* apresentou, na dose de 250mg/Kg, uma inibição de 41% (Andreo *et al.*, 2006). Os estudos fitoquímicos realizados com a mesma espécie indicaram a presença de taninos, flavonóides e flavonóides glicosilados como seus principais constituintes (Andreo *et al.*, 2006).

Este conjunto de informações estimulou a investigação química e biológica mais aprofundada do gênero *Mouriri*, o que fornecerá informações químico-farmacológicas relevantes, contribuindo para o conhecimento sobre este gênero utilizado pela população para o alívio de problemas estomacais.



## 2. OBJETIVOS

O presente estudo visa aumentar o conhecimento da composição química e atividades farmacológicas de espécies brasileiras, particularmente aquelas usadas na forma de infusões, contribuindo com o programa BIOTA-FAPESP. Desta forma, foram estabelecidos alguns objetivos:

1 - Isolar e caracterizar os principais metabólitos secundários dos extratos das folhas de *Mouriri pusa* e *Mouriri elliptica*.

2 – Avaliar, através de ensaios químicos, a atividade antioxidante dos extratos brutos e frações enriquecidas das folhas de *M. pusa* e *M. elliptica*

3 - Avaliar toxicidade, mutagenicidade e atividade antiulcerogênica dos extratos brutos e frações enriquecidas das folhas de *M. pusa* e *M. elliptica*, assim como investigar prováveis mecanismos de ação dos extratos e frações ativos.

4 - Relacionar a composição química dos extratos e frações com as atividades farmacológicas encontradas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

As folhas de *Mouriri pusa* foram coletadas em Porto Nacional, Tocantins. A identificação botânica foi realizada pela Prof<sup>a</sup>. Solange de F. Lolis da Universidade Federal do Tocantins. A exsicata foi depositada no Herbário HTINS sob o n° 4548.

As folhas de *Mouriri elliptica* foram coletadas em Ipueiras, Tocantins. A identificação botânica foi realizada pelo Prof. G. F. Arbocz da Universidade Federal do Tocantins. A exsicata foi depositada no Herbário HTINS sob o n° 3341.

#### 3.2 Extração

As folhas de *M. pusa* e *M. elliptica* foram secas em estufa a 60 °C e moídas em moinho de facas. O material moído foi extraído por maceração estática com solventes orgânicos por 48 horas (diclorometano – 3x, em seguida metanol – 3x e, por último, metanol/água 80:20 v/v – 3x). As soluções foram filtradas em filtro de papel e concentradas em evaporador rotatório (Tecnal, modelo TE-210), equipado com bomba a vácuo (Tecnal, modelo TE-058) e banho para controle da temperatura (40 °C). Em seguida, os extratos foram transferidos para vidros tarados e deixados em capela até que a massa fosse constante. Extratos e frações aquosos foram liofilizados em sistema Savant Micromodulyo equipado com bomba Valupump VLP200. Uma balança analítica Libror AEG-45SM (Shimadzu®) foi usada na pesagem dos materiais.

### 3.3 Métodos cromatográficos

O estudo fitoquímico desse trabalho baseou-se na utilização de técnicas cromatográficas usuais, principalmente aquelas para substâncias polares, tais como: CCD, CC-FN, CPG, DCCC, CLMP e CLAE. Nos processos cromatográficos (exceto CLAE) foram usados solventes orgânicos grau PA: hexano, acetato de etila, *n*-butanol, *iso*-propanol, ácido acético, etanol, diclorometano, clorofórmio, metanol (Labsynth). Acetonitrila e metanol (Baker Inc) todos de grau ultra-resíduo foram usados na preparação das amostras e como fase móvel em CLAE. A água para análises cromatográficas foi obtida em sistema Direct-Q.

CCD - Nas análises por cromatografia em camada delgada, as placas usadas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 G (Merck) em água destilada, na proporção de 1:2 (m/v), sobre placas de vidro 5x20 ou 10x20 cm. Após a preparação das placas, estas foram deixadas em repouso por cerca de 8 horas (à temperatura ambiente) e depois colocadas em estufa a 120 °C por cerca de 30 minutos. Foram usadas também placas comerciais de silicagel em suporte de alumínio ou vidro (Merck®, Aldrich®), de diversos tamanhos. Reveladores: Para inspeção as placas foram expostas à luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254-365 nm (Chromatovue). Solução de anisaldeído/ácido sulfúrico (0,5 mL de anisaldeído + 10 mL de ácido sulfúrico + 85 mL de metanol). Solução de NP/PEG, mistura de 1% de difeniletaminoborato em metanol + solução de polietilenoglicol 2000 5%– etanólico (Wagner *et al.*, 1984).

CPG - Nas separações por cromatografia por permeação em gel foram usadas uma bomba peristáltica Pharmacia, modelo P1 18-1110-91, fluxo de 0,5 mL/min, conectada a uma coluna de vidro (70 x 2 cm) preenchida com Sephadex LH-20. As frações eluídas (10 mL cada) foram coletadas automaticamente com coletor de frações Pharmacia, modelo RediFrac, com capacidade para 96 frações. Antes de serem injetadas, as amostras foram dissolvidas em metanol PA na proporção de aproximadamente 200 mg/mL, centrifugadas em centrífuga Celm, modelo Combate, a 2500 rpm por 10 min, sendo que o sobrenadante foi aplicado no topo da coluna de Sephadex com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

DCCC - As separações cromatográficas por Droplet Countercurrent Chromatography (cromatografia de contra corrente por gotejamento) foram realizadas em equipamento EYELA DCC-300 equipado com colunas de vidro de 40 cm x 2,0 mm de d.i., loop para injeção da amostra de 16 mL e coletor automático de frações EYELA DC-1200 com capacidade para 120 frações. A técnica foi realizada no modo descendente onde a fase móvel (mais densa) era constituída pela fase inferior do seguinte sistema de solventes clorofórmio/metanol/água 43:37:20 v/v/v, enquanto a fase estacionária era composta pela fase superior da mistura. Antes de serem injetadas, as amostras foram dissolvidas na fase estacionária na proporção de aproximadamente 200 mg/mL, centrifugadas em centrífuga Celm, modelo Combate, a 2500 rpm por 10 min, sendo que o sobrenadante foi aplicado. Foi utilizado um fluxo de 2 ml/min.

EFS - Cartuchos de extração em fase sólida (EFS) de fase normal (SiO) e fase reversa (C18) com 100 mg (Supelco®), 200 mg (Phenomenex®) e 360 mg (Waters®) foram usados nas etapas de clean up dos extratos, sendo as soluções resultantes filtradas em discos de 0,45µm de poro (Millipore®).

CLAE Preparativo - foi utilizado um cromatógrafo Knauer Chance 330, acoplado com detector de índice de refração Knauer D-14163 e injetor Rheodyne com loop de 100 µL e registrador L250E. A coluna semipreparativa usada foi da marca Phenomenex (C<sub>18</sub>, 25 cm x 1 cm x 10 µm), à temperatura ambiente, com eluição isocrática e fluxo de 2 ml/min. As condições do detector foram: atenuação 16, e; polaridade +. As condições do registrador foram: atenuação 16; velocidade do papel 5 mm/min, e; voltagem 10 mV.

CLAE Analítico - As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2010 (Jasco®) e a um detector de dicroísmo circular modelo CD-2995 (Jasco®), assim como em cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico/preparativo gradiente binário) acoplado a um detector de arranjo de foto diodos modelo ProStar 210/330 (Varian®). A coluna analítica usada foi da marca Phenomenex (C<sub>18</sub>, 250 mm, 4,6 mm, 5µm).

CLMP - Purificações em escala preparativa foram também efetuadas em sistema cromatográfico de média pressão equipado com coluna de vidro de 50 cm de comprimento por 2 cm de di, e bomba para controlar o fluxo de solvente (FMI-Lab, modelo QSY-1), empacotadas com um dos seguintes adsorventes, dependendo do material a ser purificado: Sílica gel 60H (10-40  $\mu\text{m}$ , artigo n° 7736, Merck), e PVPP (Sigma), polivinilpolipirrolidona (Sigma, p-6755).

### 3.4 Identificação

Os experimentos de RMN  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMQC, HMBC e TOCSY-1D) foram realizados em espectrômetros de ressonância magnética nuclear de 200 MHz (Brüker®) e 500 MHz (Varian® Inova) usando dimetilsulfóxido deuterado (Acros®, Aldrich®, Sigma®) e TMS como referência. Miricetina, kaempferol, quercetina e rutina (Sigma Aldrich®) foram usados como padrões de identificação. Demais metabólitos não disponíveis comercialmente foram isolados e caracterizados por RMN.

### 3.5 Atividade antioxidante

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), de coloração púrpura que absorve a 515 nm (Roginsky e Lissi, 2005). Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (Brand-Williams *et al.*, 1995; Sánchez-Moreno *et al.*, 1998).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DDPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE<sub>50</sub>). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante.

### 3.6 Fenóis totais

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos foi realizada por meio do reagente de Folin-Ciocalteu (Volko *et al.*, 2004; Naczk *et al.*, 2004; Roginsky e Lissi, 2005). O reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstúico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (Naczk *et al.*, 2004; Ikawa *et al.*, 2003).

### 3.7 Flavonóides totais

A quantificação espectrométrica de flavonóides é realizada por meio de uma variedade de técnicas. Todavia, a que utiliza cloreto de alumínio está entre as mais extensivamente utilizadas (Woisky, 1996; Farmacopéia, 2001). A quercetina, utilizada como padrão e as demais amostras foram preparadas nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 80 e 160 µg/mL em metanol. A cada 1 mL de amostra adicionou-se 0,5 mL de cloreto de alumínio 2,5%, 0,5 mL de acetato de sódio 0,2 M e 1 mL de água. Após 40 minutos de reação fez-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm. O mesmo procedimento foi realizado para o branco, sendo substituído 1 mL de amostra por 1 mL de metanol.

### 3.8 Atividade Farmacológica

Animais - Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos (25-40 g) e ratos machos albinos Wistar (150-200 g), provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos 7 dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro de 12 horas controlado. Os animais foram tratados com ração Guabi<sup>®</sup> e água *ad libitum*. Para o ensaio de toxicidade aguda, foram utilizados camundongos fêmeas (25-45 g). Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais (n° 017, 019, 019, 020, 021 e 022/04 – CEEA; n° 018 e 019/05 – CEEA) aprovados previamente pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu.

Toxicidade aguda – Foram realizados experimentos paralelos que utilizaram camundongos Swiss fêmeas e machos, divididos aleatoriamente em grupos para os respectivos tratamentos via oral: salina (controle) e extratos na dose única de 5000 mg/kg. Os parâmetros comportamentais observados foram aqueles descritos por Souza Brito (1994). Os parâmetros de toxicidade aguda foram monitorados através do registro do número de mortes de animais por grupo. Como parâmetro adicional de toxicidade, o peso dos animais foi monitorado durante 14 dias após o início do experimento e ao final todos os animais foram sacrificados para análise dos órgãos vitais.

Lesões gástricas por HCl/etanol - foi baseada na descrição de Mizui e Doteuchi (1983), utilizando camundongos machos Swiss. Os grupos receberam lansoprazol 30 mg/Kg (controle positivo), salina (controle negativo) e os extratos nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg (*M. pusa*) ou 125, 250, 500 mg/Kg (*M. elliptica*). A ulcerogênese foi induzida pela administração de 0,2 mL da solução de 0,3M HCl/etanol 60 %.

Lesões gástricas por Etanol absoluto - seguiu a metodologia descrita por Morimoto *et al.* (1991), utilizando ratos Wistar machos. Os grupos receberam lansoprazol 30 mg/Kg (controle positivo), salina (controle negativo) e os extratos nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg (*M. pusa*) ou 125, 250, 500 mg/Kg (*M. elliptica*). A ulcerogênese foi induzida pela administração de etanol 99,5%.

Lesões gástricas por DAINE - foi realizada segundo a metodologia descrita por Puscas *et al.* (1997), utilizando camundongos machos Swiss. Os grupos receberam cimetidina 100 mg/Kg (controle positivo), salina (controle negativo) e os extratos nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg (*M. pusa*) ou 125, 250, 500 mg/Kg (*M. elliptica*). A ulcerogênese foi induzida pela administração de piroxicam 30 mg/Kg.

Lesões gástricas por estresse - foi baseada na descrição de Levine (1971), utilizando camundongos machos Swiss. Os grupos receberam cimetidina 100 mg/Kg (controle positivo), salina (controle negativo) e os extratos nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg (*M. pusa*) ou 125, 250, 500 mg/Kg (*M. elliptica*). A ulcerogênese foi induzida imobilização e submissão dos animais a 4 horas de frio (4°C).

Lesões gástricas por Ligadura de piloro - seguiu o modelo descrito por Shay (1945), utilizando camundongos machos Swiss. Os parâmetros (volume gástrico, pH e concentração do íon H<sup>+</sup>) foram avaliados sob o efeito dos extratos administrados oral ou intraduodenalmente (efeito local e sistêmico). Os grupos receberam cimetidina 100 mg/Kg (controle positivo), salina (controle negativo) e os extratos na dose 500 mg/Kg (dose mais efetiva, segundo experimentos anteriores).

Mecanismo de ação: grupamentos sulfidrílicos – ensaio baseado na descrição de Matsuda *et al.* (1999), utilizando ratos Wistar machos, onde 3 grupos foram pré-tratados com NEM (bloqueador de pontes de dissulfeto) via intraperitoneal, enquanto outros três grupos foram pretratados com salina pela mesma via. Em seguida os grupos receberam carbenoxolona 100 mg/Kg (controle positivo), salina (controle negativo) e o extrato na dose 500 mg/Kg. A ulcerogênese foi induzida pela administração de etanol 99,5%.

Mecanismo de ação: Óxido Nítrico NO - ensaio baseado na descrição de Arrieta *et al.* (2003), utilizando ratos Wistar machos, onde 3 grupos foram pré-tratados com L-NAME (inibidor da enzima NO-sintase) via intraperitoneal, enquanto outros três grupos foram pretratados com salina pela mesma via. Em seguida os grupos receberam carbenoxolona 100 mg/Kg (controle positivo), salina (controle negativo) e o extrato na dose 500 mg/Kg. A ulcerogênese foi induzida pela administração de etanol 99,5%.



Motilidade intestinal - O experimento seguiu a metodologia descrita no artigo de Baggio *et al.* (2003), utilizando camundongos Swiss machos, em jejum de 6 horas e divididos em 5 grupos receberam os respectivos tratamentos via oral salina (controle negativo), atropina (controle positivo) e extratos nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg. Após trinta minutos os animais receberam carvão ativo 10% via oral. Os resultados foram obtidos através da relação da distância percorrida pelo carvão ativo e o comprimento total do intestino.

Atividade cicatrizante - foi realizado conforme a descrição de Okabe e Amagase (2005), utilizando ratos Wistar machos. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos, pesados e anestesiados com éter para a realização de uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide. A parede anterior do estômago foi exposta e um volume de 0,05 mL de ácido acético a 30% foi injetado na camada submucosa da junção do fundo com o antro. Imediatamente houve a formação da lesão hemorrágica profunda. Logo em seguida, foi realizada a sutura e os animais retornaram ao biotério, em caixas de contenção normais com alimento e água *ad libitum* para a sua completa recuperação. Os animais foram tratados durante 14 dias com salina (controle negativo), cimetidina 100 mg/Kg (controle positivo) e os extratos na dose de 500 mg/Kg. Após 14 dias todos os animais foram mortos e tiveram os estômagos retirados, para a avaliação macroscópica da área de cicatrização, realização de análises morfológicas e de toxicidade. O material destinado a microscopia de Luz foi fixado em solução de ALFAC (formalina 30%, álcool 80% e ácido acético) e analisado segundo a metodologia descrita por Behmer *et al.* (1976). A análise morfométrica foi feita e analisador Leica Q-Win Standard Versão 3.1.0 (Reino Unido) acoplado ao microscópio Leica DM, seguindo a metodologia descrita por Ishihara (2002). Foram utilizados anticorpos anti-PCNA, anti-COX2, anti-SOD e anti-CXCR4. Alguns parâmetros adicionais (peso corporal, análise macroscópica de órgãos vitais: coração, pulmões, fígado, baço e rins) foram avaliados para a determinação da toxicidade subaguda. Além disso, o sangue dos animais foi coletado para a análise de parâmetros bioquímicos e enzimáticos, que compreendem a avaliação dos níveis séricos de glicose,  $\gamma$ -GT (gama glutamiltransferase), uréia, creatinina, AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase). Para a quantificação foi utilizado o analisador bioquímico automático Cobas Mira S<sup>®</sup> (Roche) e kits cinéticos e colorimétricos CELM<sup>®</sup>.

O ácido clorídrico e o etanol da Dinâmica (Brasil); a Cimetidina (em pó, frasco de 25 g), a Carbenoxolona (pó, frasco de 5 g), o L-NAME (pó, frasco de 5 g) e o NEM da Sigma (USA); carvão ativo (pó) da Chemco (Brasil); Piroxicam (comprimido de 20 mg cada) da Pfizer (Brasil); o Tween® 80 da Synth (Brasil) e o Lansoprazol manipulado da Farmácia Cruz Vermelha.

Em todos os experimentos de indução de úlcera, as lesões ulcerativas foram classificadas, de acordo com a severidade (Szelenyi e Thiemer, 1978), em lesões nível 1 (pontos hemorrágicos < 1 mm), nível 2 (úlceras de 1 a 3 mm de extensão) e nível 3 (úlceras profundas >3 mm de extensão). Para cada grupo de tratamento foi calculado um índice de lesões ulcerativas (I.L.U.) obtido através da equação:

$$\text{I.L.U.} = (\Sigma \text{ lesões nível 1}) + (2 \times \Sigma \text{ lesões nível 2}) + (3 \times \Sigma \text{ lesões nível 3})$$

Após a obtenção do I.L.U., os resultados foram comparados com os obtidos pelos animais do grupo controle negativo e se obteve uma porcentagem de proteção da mucosa gástrica dos animais submetidos aos diferentes tratamentos que foram muitas vezes expressas neste trabalho.

### 3.9 Mutagenicidade

Todos os extratos foram primeiramente avaliados quanto à toxicidade através da análise do crescimento de fundo, conhecido como “background” e pela diminuição do número de revertentes por placa em relação ao controle negativo. Portanto, após os experimentos preliminares é que foram definidas as concentrações citadas.

Teste de Ames - Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, USA. A cepa TA98 detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA. A cepa TA100 detecta agentes mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente no par G-C. A cepa TA102 detecta eficientemente mutágenos como formaldeído, glioxal, vários hidroperóxidos, bleomicina, fenilidrazina, raios-X, luz UV, estreptonigrina e agentes cross-link, como mitomicina- C. A cepa TA97a também detecta mutações do tipo *frameshift* (Maron e Ames, 1983). Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron e Ames (1983). O controle negativo foi feito com DMSO, o solvente dos extratos vegetais. Foram utilizados como controle positivo em ensaios sem ativação metabólica o 4-nitrofenilenodiamino (NPD) para as linhagens TA98 e TA97a, azida sódica para a linhagem TA100 e mitomicina C para a linhagem TA102. Para os ensaios em presença de metabolização foi utilizado o 2-antramina para as linhagens TA100, TA98 e TA97a e 2-aminofluoreno para a TA102.

### 3.10 Análise estatística

Ensaio biológico - programa Instat®. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett, com nível de significância mínimo de  $p < 0,05$ . Na comparação entre dois grupos apenas foi utilizado o teste t de Student. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros obtidos.

Ensaio químico – Os resultados apresentados neste estudo correspondem à média de três repetições ( $n=3$ )  $\pm$  desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados de atividade antioxidante que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ( $P < 0,05$ ) aplicando-se ANOVA, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Coeficientes de correlação foram determinados entre o conteúdo de fenóis totais e flavonóides totais e a concentração eficiente de cada extrato,  $CE_{50}$ . Todas as análises foram realizadas usando o programa Microcal Origin 7.0.

Mutagenicidade – Os dados de mutagenicidade dos extratos vegetais foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA, por intermédio da Dra. Maria Ines Sato (CETESB). Esse programa permite avaliar o efeito dose-resposta através do cálculo da análise de variância (ANOVA – teste F) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo do programa escolhido para a análise dos dados foi o de Bernstein *et al.* (1982).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 *Mouriri pusa*

#### 4.1.1 ESTUDO QUÍMICO

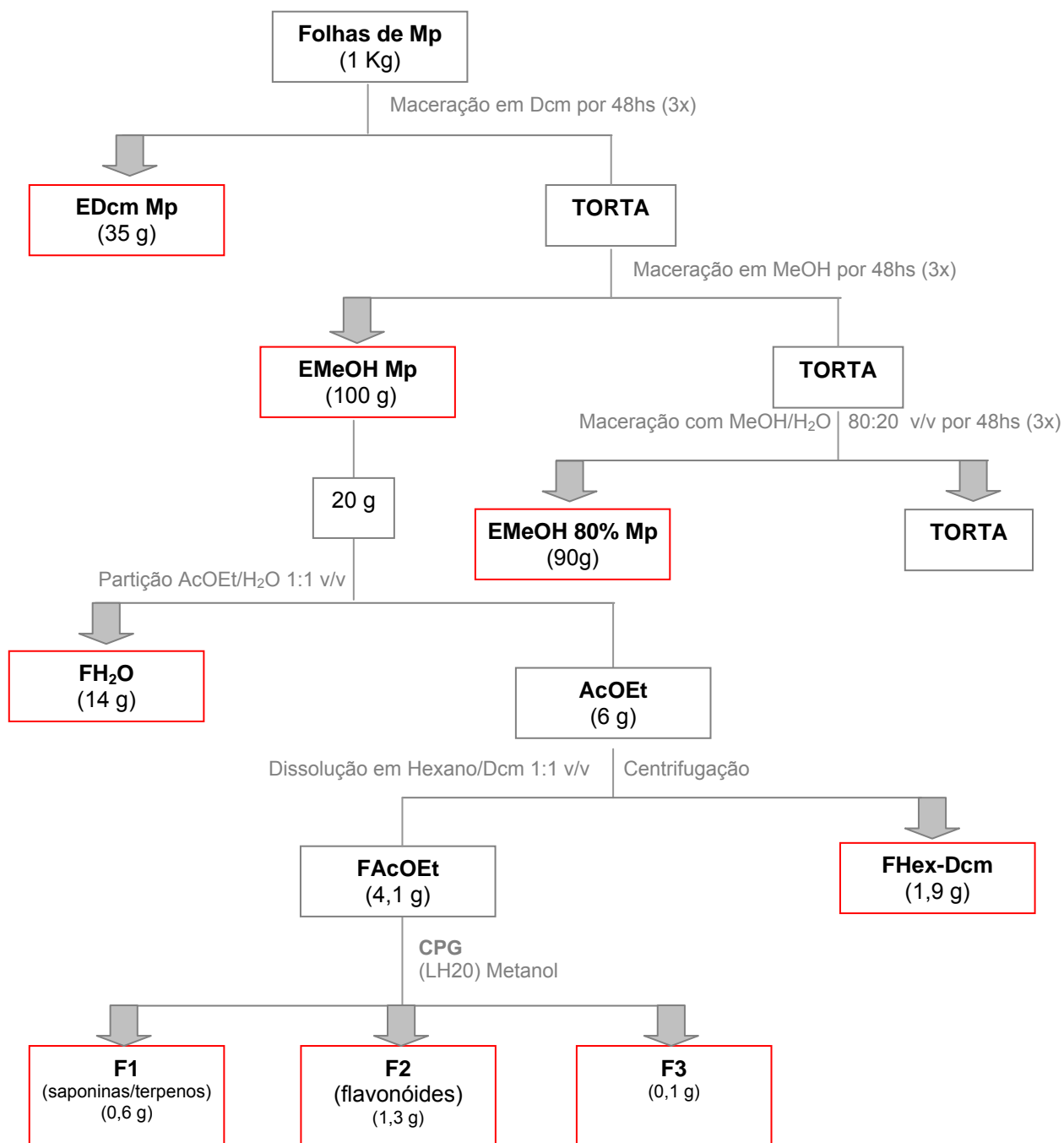
##### Preparo dos Extratos e frações

As folhas (1 Kg) de *Mouriri pusa* foram secas e trituradas em moinho de facas e em seguida, foram submetidas à extrações por maceração em diclorometano (Dcm), metanol (MeOH) e MeOH/H<sub>2</sub>O 80:20, v/v, respectivamente. Após a evaporação dos solventes por destilação à pressão reduzida foram obtidos os extratos diclorometano (**EDcm Mp**), metanólico (**EMeOH Mp**) e hidroalcoólico (**EMeOH 80% Mp**) de *M. pusa* (tabela 4.1.1).

A partir do extrato **EMeOH Mp** foram obtidas frações ricas em taninos e flavonóides por meio de partição entre solvente orgânico e água (**Figura 4.1.1; Tabela 4.1.1**).

**Tabela 4.1.1** – Massas e rendimentos dos extratos e frações obtidos das folhas de *M. pusa*

Extrato/Fração	Massa (g)	Rendimento (%) Partindo de 1 Kg de folhas
EDcm	35	3,5
EMeOH	100	10,0
EMeOH 80%	90	9,0
		Rendimento (%) Partindo de 20 g de EMeOH
FHex/Dcm	1,9	10,0
FAcOEt	4,1	20,0
FH <sub>2</sub> O (taninos)	14,0	70,0
		Rendimento (%) Partindo de 2 g de FAcOEt
F1 (saponinas e terpenos)	0,6	30,0
F2 (flavonóides)	1,3	65,0
F3	0,1	5,0



**Figura 4.1.1** – Obtenção dos extratos e frações a partir das folhas de *M. pusa*

## Isolamento e identificação

A investigação químico-farmacológica preliminar de *M. pusa*, realizada em conjunto pelos grupos do IQAr-Unesp, IB-Botucatu-Unesp e IB-Unicamp verificou a atividade anti-úlceras gástricas do extrato **EMeOH Mp**. Os estudos fitoquímicos realizados com a mesma espécie indicaram a presença de taninos, saponinas, flavonóides e flavonóides glicosilados como seus principais constituintes e ainda um grande número de substâncias a serem isoladas e identificadas (Andreo *et al.*, 2006).

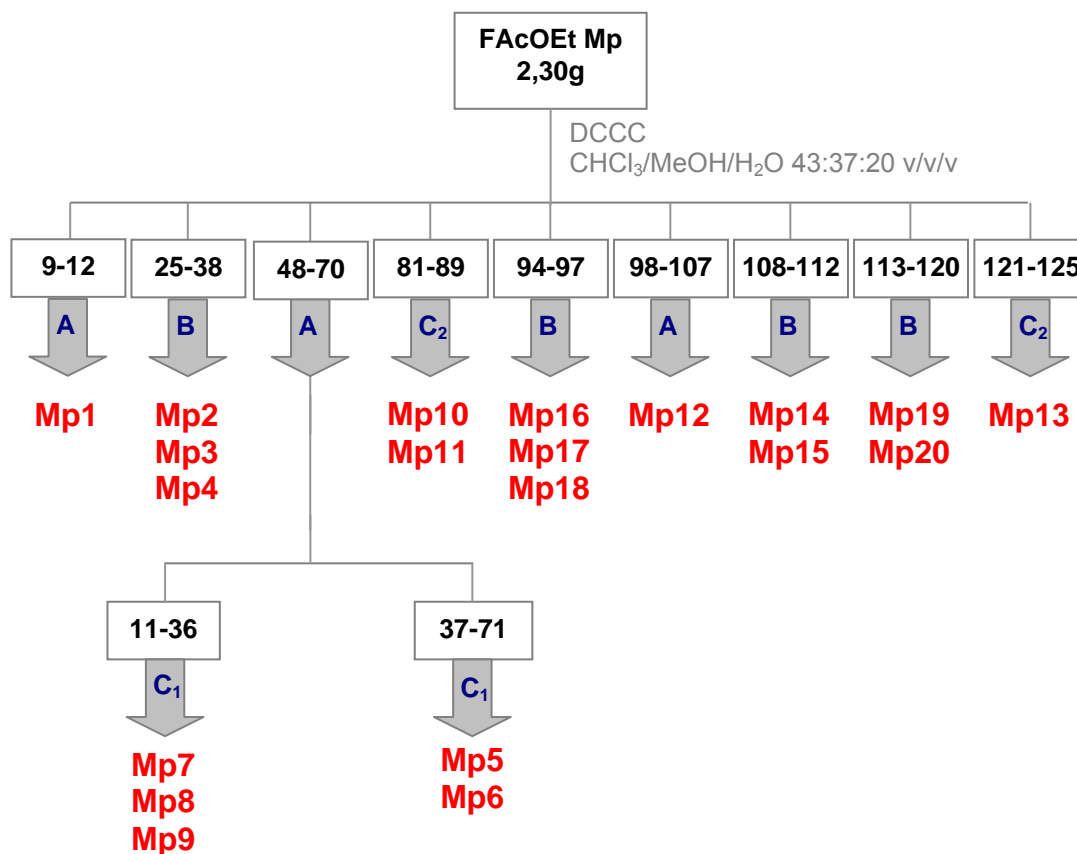
A triagem fitoquímica foi iniciada pela verificação da presença de saponinas no extrato **EMeOH Mp**, pela metodologia de formação de espuma (Simões *et al.*, 1999). Após agitação de uma alíquota do extrato em um tubo de ensaio com água foi observado a formação de espuma persistente, indicando a presença desta classe.

Em seguida, para a verificação de taninos, foi preparado um decocto (15 minutos) com 5 g do **EMeOH Mp** em 100 mL de água destilada. A solução foi filtrada e esfriada. Em seguida, foi adicionado água e gotas de solução de FeCl<sub>3</sub> 1% (metanol). A formação de uma coloração verde indicou a presença de taninos condensados (Harborne, 1973; Santos *et al.*, 1999).

Estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo, mostraram que o fracionamento de misturas complexas, sobretudo com a presença de taninos em grande quantidade, poderia não só danificar a coluna de Sephadex LH-20, mas também interferir no fracionamento por permeação em gel (Andreo, 2003). Dada a impossibilidade de se realizar o clean-up em cartuchos Sep-Pak em escala preparativa, optamos por realizar uma partição líquido-líquido.

O extrato **EMeOH Mp** (20,0 g) foi dissolvido numa mistura de AcOEt e água 1:1 v/v (3x). Análises por CCD mostraram que os flavonóides permaneceram majoritariamente na fase AcOEt enquanto que os derivados catequínicos e taninos permaneceram na fase aquosa. Em seguida, foi iniciado o fracionamento da porção AcOEt, sendo a fase aquosa reservada para investigações posteriores.

A porção AcOEt (6 g) foi suspensa em 200 mL de uma mistura de hexano/diclorometano 1:1 v/v e submetida à centrifugação. Foi obtido 4,1 g de precipitado (**FAcOEt Mp**). Parte da **FAcOEt Mp** (2,3 g) foi fracionada por DCCC (técnica de fracionamento em que tanto a fase estacionária quanto a fase móvel são líquidas). O fracionamento foi realizado de forma que a fase estacionária era composta pela fase superior da mistura de CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 43:37:20 v/v/v, enquanto a fase inferior do sistema de solventes era a fase móvel. Foram obtidas 154 frações de 10 mL cada, as quais foram reunidas em 18 grupos de frações após análises cromatográficas por CCD utilizando como fase móvel a fase inferior da mistura de CHCl<sub>3</sub>/MeOH/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 5:6:1:4 v/v/v/v (**Tabela 4.1.2**). Em seguida, frações foram purificadas conforme mostra a **figura 4.1.2**.



**Figura 4.1.2 - Fracionamento da porção FAcOEt Mp:** A - Purificação em coluna de PVPP (10 cm x 1,0 cm d.i.), FM = Metanol; B - Purificação em coluna de CPG - Sephadex LH-20 (70 cm e 3,0 cm d.i.), FM = Metanol; C<sub>1</sub> - Purificação em CLAE – Sílica C<sub>18</sub> (25 cm x 1 cm x 10 µm), FM = Metanol/H<sub>2</sub>O 45:55 v/v, Fluxo de 2 mL/min; C<sub>2</sub> - Purificação em CLAE – Sílica C<sub>18</sub> (25 cm x 1 cm x 10 µm), FM = Metanol/H<sub>2</sub>O 35:65 v/v, Fluxo de 2 mL/min.



**Tabela 4.1.2** - Resultados obtidos do estudo químico da fração **FAcOEt Mp**.

Frações	Massa (mg)	Substância isolada ou identificada	Massa (mg)
1-8	120	Não Estudado (NE)	
9-12	54	4',5,6-triidroxi-7-metoxiflavona <b>Mp1</b>	5
13-24	45	NE	
25-38	158	Kaempferol <b>Mp2</b> Quercetina <b>Mp3</b> Miricetina <b>Mp4</b>	8 40 10
39-41	70	NE	
48-70	335	Quercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -arabinofuranose <b>Mp5</b> 6,8-diidroxikaempferol-3- <i>O</i> - $\beta$ -galactopiranosose <b>Mp6</b> Kaempferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -arabinopiranosose <b>Mp7</b> Kaempferol-3- <i>O</i> - $\beta$ -xilopiranosose <b>Mp8</b> Kaempferol-3- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosose <b>Mp9</b>	8 8 6 4 4
71-74	142	NE	
75-80	70	NE	
81-89	100	Quercetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -xilopiranosose <b>Mp10</b> Quercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -arabinopiranosose <b>Mp11</b>	15 7
89-93	12	NE	
94-97	62	Miricetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -rhamnopiranosose <b>Mp16</b> (-)-epicatequina <b>Mp17</b> (+)-catequina <b>Mp18</b>	10
98-107	140	Quercetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -galactopiranosose <b>Mp12</b>	90
108-112	35	Miricetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -galactopiranosose <b>Mp14</b> Miricetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosose <b>Mp15</b>	18
113-120	122	Kaempferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -rhamnosil-(6 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -galactopiranosose <b>Mp19</b> Kaempferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -rhamnosil-(6 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -glicopiranosose <b>Mp20</b>	10
121-125	95	Quercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -rhamnosil-(6 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -glicopiranosose <b>Mp13</b>	20
126-130	79	NE	
131-135	54	NE	
136-154	349	NE	

**Identificação de **Mp1****  
(Estruturas 1, Espectros 1 e 2)

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Mp1** mostrou um sinal em  $\delta$  3,91 (s) correspondente aos hidrogênios de um grupo metoxílico. O espectro também mostrou a presença de sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos. O sinal em  $\delta$  7,97 (*d*,  $J=8,0$  Hz) caracterizou os hidrogênios H-2' e H-6', enquanto o sinal em  $\delta$  6,94 (*d*,  $J=8,0$  Hz) caracterizou os hidrogênios H-3' e H-5' do anel B do flavonóide. Ainda na região aromática foi possível observar os sinais em  $\delta$  6,85 (s) e  $\delta$  6,83 (s), os quais foram atribuídos como sendo o H-8 do anel A e H-3 do anel C, respectivamente. As análises dos espectros de NOESY-1D irradiado em  $\delta$  3,91 (s) mostraram que o grupo

metoxílico se correlacionou com o sinal em  $\delta$  6,85 (s) atribuído ao H-8 dando a indicação que este grupo deve estar na posição 7. Comparação com dados da literatura (Harborne, 1996) confirma a proposta estrutural da 4',5,6-triidroxi-7-metoxiflavona (**Mp1**)

Identificação de **Mp2**  
(Estruturas 2, Espectro 3)

Através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **Mp2** foi possível evidenciar a presença de sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos. O sinal em  $\delta$  8,05 (*d*,  $J=9,0$  Hz) caracterizou os hidrogênios H-2' e H-6', enquanto o sinal em  $\delta$  6,93 (*d*,  $J=9,0$  Hz) caracterizou os hidrogênios H-3' e H-5' do anel B do flavonóide. Ainda na região aromática foi possível observar os sinais em  $\delta$  6,41 (*d*,  $J=2,0$  Hz) e  $\delta$  6,17 (*d*,  $J=2,0$  Hz), os quais foram atribuídos como sendo os hidrogenios H-8 e H-6 do anel A, respectivamente. A comparação por CCD utilizando padrão e com os dados da literatura (Harborne, 1996) confirmam a estrutura como sendo o Kaempferol (**Mp2**).

Identificação de **Mp3**  
(Estruturas 2, Espectro 4)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **Mp3** apresentou sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos. Um sinal em  $\delta$  7,65 (*d*,  $J=2,0$  Hz), um sinal em  $\delta$  7,53 (*dd*,  $J=8,5$  e  $2,0$  Hz) e outro sinal em  $\delta$  6,87 (*d*,  $J=8,5$  Hz) que podem ser atribuídos aos hidrogenios H-2', H-6' e H-5' do anel B do flavonóide, respectivamente. Ainda na região aromática foi possível observar os sinais em  $\delta$  6,39 (*d*,  $J=2,0$  Hz) e  $\delta$  6,17 (*d*,  $J=2,0$  Hz), os quais foram atribuídos como sendo os hidrogenios H-8 e H-6 do anel A, respectivamente. A comparação por CCD utilizando padrão e com os dados da literatura (Harborne, 1996) confirmam a estrutura como sendo da Quercetina (**Mp3**).

Identificação de **Mp4**  
(Estruturas 2, Espectros 5 e 6)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Mp4** apresentou sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos. Um sinal em  $\delta$  7,22 (*s*) que pode ser atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6' do anel B do flavonóide. Ainda na região aromática foi possível observar os sinais em  $\delta$  6,35 (*d*,  $J=2,0$  Hz) e  $\delta$  6,17 (*d*,  $J=2,0$  Hz), os quais foram atribuídos como sendo os hidrogênios H-8 e H-6 do anel A, respectivamente. A comparação por CCD utilizando padrão e com os dados da literatura (Harborne, 1996), confirmam a estrutura como sendo da Miricetina (**Mp4**). Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  corroboraram com a estrutura proposta.

Identificação de **Mp5**  
(Estruturas 2, Espectros 7 a 9)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Mp5** apresentou sinal em  $\delta$  7,54 (*dd*,  $J=8,0$  e  $2,0$  Hz), outro sinal em  $\delta$  7,45 (*d*,  $J=2,0$  Hz) e um sinal em  $\delta$  6,84 (*d*,  $J=8,0$  Hz), os quais indicaram a presença de um anel B 3' e 4' substituído. Os sinais em  $\delta$  6,35 (*d*,  $J=2,0$  Hz) e  $\delta$  6,15 (*d*,  $J=2,0$  Hz) evidenciam a presença de um anel A substituído nas posições 5 e 7. Estes sinais auxiliaram a caracterização da aglicona do composto como sendo a quercetina (Harborne, 1996).

Um próton anomérico foi observado em  $\delta$  5,56 (*sl*), além de outro sinal em  $\delta$  4,13 (*d*,  $J=2,5$  Hz). A irradiação destes sinais no experimento TOCSY levou à identificação do sistema de spin da  $\alpha$ -arabinofuranose. Os sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  confirmam a unidade de arabinofuranose (Agrawal, 1989). Este conjunto de dados permitiu identificar o composto como sendo quercetina-3-*O*- $\alpha$ -arabinofuranose (**Mp5**).

Identificação de **Mp6**  
(Estruturas 1, Espectros 10 a 14)

Análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Mp6** apresentou sinais em  $\delta$  8,00 (*d*,  $J=8,0$  Hz), em  $\delta$  6,84 (*d*,  $J=8,0$  Hz) os quais indicaram a presença de um anel B substituído em 4'. Estes sinais auxiliaram a caracterização da aglicona do composto como sendo o 6,8-diidroxikaempferol. Um próton anomérico foi observado em  $\delta$  5,28 (*d*,  $J=6,2$  Hz). Os experimentos TOCSY-1D e COSY levaram à identificação do sistema de spin da  $\beta$ -D-galactopirranose. Os experimentos bidimensionais gHMBC e gHMQC permitiram confirmar a estrutura. Este conjunto de dados comparados aos da literatura (Harborne, 1996; Agrawal, 1989), permitiu identificar o composto como sendo 6,8-diidroxikaempferol-3-*O*- $\beta$ -galactopirranose (**Mp6**)

Identificação de **Mp7** e **Mp8**  
(Estruturas 2, Espectros 15 a 19)

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra seguinte indicou que se tratava de uma mistura. Os compostos apresentaram sinais semelhantes ao composto anteriormente discutido no que diz respeito à região de hidrogênios aromáticos. Desta forma, confirmou-se que as agliconas dos flavonóides tratavam-se de uma unidade de kaempferol. Os prótons anoméricos absorvem em  $\delta$  5,33 (*d*,  $J=7,5$  Hz). Os experimentos TOCSY-1D e COSY evidenciaram os sistemas de spin da arabinopirranose e da xilopirranose, ambos com configuração  $\beta$ . A análise dos espectros de gHMBC e gHMQC, assim como a comparação com os dados da literatura (Harborne, 1996; Agrawal, 1989), permitiu identificar dois flavonóides: kaempferol-3-*O*- $\alpha$ -arabinopirranose (**Mp7**) e o kaempferol-3-*O*- $\beta$ -xilopirranose (**Mp8**).

Identificação de **Mp9**  
(Estruturas 2, Espectros 20 a 23)

Análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **Mp9** apresentou sinais semelhantes ao composto anteriormente discutido no que diz respeito à região de hidrogênios aromáticos. Desta forma, confirmou-se que a aglicona do flavonóide se tratava de uma unidade de kaempferol. Um próton anomérico foi observado em  $\delta$  5,42 (*d*,  $J=8,0$  Hz). A irradiação do anomérico no experimento TOCSY-1D evidenciou o sistema de spin da  $\beta$ -glicopirranose. A análise dos espectros de gHMBC e gHMQC e comparação com dados da literatura (Harborne, 1996; Agrawal, 1989) permitiram identificar o composto como sendo o kaempferol-3-*O*- $\beta$ -glicopirranose (**Mp9**).

Identificação de **Mp10**  
(Estruturas 2, Espectros 24 a 29)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **Mp10** apresentou sinais semelhantes aos compostos anteriormente discutidos no que diz respeito à região de hidrogênios aromáticos. Desta forma, confirmou-se que a aglicona do flavonóide se tratava de uma unidade de quercetina. O próton anomérico absorve em  $\delta$  5,34 (*d*,  $J=7,0$  Hz). Os experimentos TOCSY-1D e COSY evidenciaram o sistema de spin da xilopirranose, com configuração  $\beta$ . A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  juntamente com experimentos bidimensionais de gHMBC e gHMQC comparados aos dados da literatura (Harborne, 1996; Agrawal, 1989), permitiu identificar o composto como sendo quercetina-3-*O*- $\beta$ -xilopirranose (**Mp10**).

Identificação de **Mp11**  
(Estruturas 2, Espectros 30 a 35)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **Mp11** apresentou sinais semelhantes aos compostos anteriormente discutidos no que diz respeito à região de hidrogênios aromáticos. Desta forma, confirmou-se que a aglicona do flavonóide se tratava de uma

unidade de quercetina. O próton anomérico absorve em  $\delta$  5,27 (*d*,  $J=5,0$  Hz). Os experimentos TOCSY-1D e COSY evidenciaram o sistema de spin da  $\alpha$ -arabinopirranose (Bialy *et al.*, 1999). A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  juntamente com experimentos bidimensionais de gHMBC e gHMQC comparados aos dados da literatura (Harborne, 1996; Agrawal, 1989) permitiram identificar o composto como sendo quercetina-3-*O*- $\alpha$ -arabinopirranose (**Mp11**).

Identificação de **Mp12**  
(Estruturas 2, Espectros 36 a 38)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **Mp12** apresentou sinais semelhantes aos compostos anteriormente discutidos no que diz respeito à região de hidrogênios aromáticos. Desta forma, confirmou-se que a aglicona do flavonóide se tratava de uma unidade de quercetina. O próton anomérico absorve em  $\delta$  5,38 (*d*,  $J=8,0$  Hz). O experimento TOCSY-1D evidenciou o sistema de spin da  $\beta$ -D-galactopirranose. A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em comparação com dados da literatura (Harborne, 1996; Agrawal, 1989) permitiram identificar o composto como sendo quercetina-3-*O*- $\beta$ -galactopirranose (**Mp12**).

Identificação de **Mp13**  
(Estruturas 2, Espectro 39)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **Mp13** apresentou sinais semelhantes aos compostos anteriormente discutidos no que diz respeito à região de hidrogênios aromáticos. Desta forma, confirmou-se que a aglicona do flavonóide se tratava de uma unidade de quercetina. Um sinal de próton anomérico absorve em  $\delta$  5,31 (*d*,  $J=8,0$  Hz) e outro sinal de anomérico em  $\delta$  4,40 (*s*). O espectro também apresentou um sinal em  $\delta$  1,06 (*d*,  $J=6,0$  Hz). Este conjunto de dados e a comparação por CCD juntamente com padrões permitiu identificar o composto como sendo quercetina-3-*O*- $\beta$ -rutinosídeo, **Mp13** (rutina) (Harborne, 1996; Agrawal, 1989).

Identificação de **Mp14** e **Mp15**  
(Estruturas 2, Espectros 40 a 46)

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra indicou a presença de dois flavonóides denominados **Mp14** e **Mp15**. O espectro apresentou sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos. Sinais em  $\delta$  7,21 (*s*) e  $\delta$  7,20 (*s*) que podem ser atribuídos aos hidrogenios H-2' e H-6' do anel B dos flavonóides **Mp14** (majoritário) e **Mp15**, respectivamente. Ainda na região aromática foi possível observar os sinais em  $\delta$  6,31 (*sl*) e  $\delta$  6,13 (*sl*), os quais foram atribuídos como sendo os hidrogenios H-8 e H-6 do anel A, respectivamente dos dois flavonóides. Estes dados levaram a proposta estrutural da miricetina como sendo a aglicona dos flavonóides. Dois sinais de prótons anoméricos foram observados em  $\delta$  5,44 (*d*,  $J=7,5$  Hz) e em  $\delta$  5,31 (*d*,  $J=8,0$  Hz) que foram atribuídos pela integração a **Mp15** e **Mp14**, respectivamente. A irradiação destes sinais no experimento TOCSY-1D levou à identificação dos sistemas de spin da  $\beta$ -glicopirranose e da  $\beta$ -galactopirranose, respectivamente. Os sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , juntamente com os experimentos bidimensionais gHMQC e gHMBC e dados da literatura (Harborne, 1996; Agrawal, 1989) corroboram com a proposta estrutural da Miricetina-3-*O*- $\beta$ -galactopirranose (**Mp14**) e Miricetina-3-*O*- $\beta$ -glicopirranose (**Mp15**).

Identificação de **Mp16**, **Mp17** e **Mp18**  
(Estruturas 1 e 2, Espectros 47 a 53)

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra indicou a presença das substâncias denominadas **Mp16**, **Mp17** e **Mp18**. O espectro apresentou sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos. Sinal em  $\delta$  6,89 (*s*) que pode ser atribuído aos hidrogenios H-2' e H-6' do anel B de um flavonóide **Mp16** (majoritário). Ainda na região aromática foi possível observar os sinais em  $\delta$  6,34 (*sl*) e  $\delta$  6,18 (*sl*), os quais foram atribuídos como sendo os hidrogenios H-8 e H-6 do anel A, respectivamente. Estes dados levaram a proposta estrutural da miricetina como sendo a aglicona do flavonóide. O sinal do próton anomérico foi observado em  $\delta$  5,21 (*d*,  $J=1,5$  Hz). Os experimentos TOCSY-1D levaram à identificação do sistema de spin da  $\alpha$ -rhamnopirranose. Os sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , juntamente com os experimentos bidimensionais gHMQC e gHMBC

dados da literatura (Harborne, 1996; Agrawal, 1989) corroboram com a proposta estrutural da Miricetina-3-*O*- $\alpha$ -rhamnopiranosídeo, **Mp16**.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra apresentou ainda outros sinais de menor intensidade na região de absorção de hidrogênios aromáticos, característicos de catequinas:  $\delta$  6,89 *sl* (H2'/Mp18),  $\delta$  6,73 *d* (1,7 Hz, H2'/Mp17),  $\delta$  6,69 *d* (8,0 Hz, H5'/Mp17),  $\delta$  6,66 *m* (H5' e H6'/ Mp18),  $\delta$  6,60 *dd* (1,7 e 8,0 Hz, H6'/Mp17),  $\delta$  5,90 *d* (2,5 Hz, H8/Mp17 e Mp18),  $\delta$  5,72 *d* (2,5 Hz, H6/Mp18),  $\delta$  5,69 *d* (2,5 Hz, H6/Mp17),  $\delta$  4,74 *sl* (H2/Mp18),  $\delta$  4,48 *d* (7,5 Hz, H2/Mp17),  $\delta$  4,02 *m* (H3/Mp18),  $\delta$  3,82 *m* (H3/Mp17),  $\delta$  2,67 *m* (H4<sub>ax</sub>/Mp17 e Mp18),  $\delta$  2,48 *m* (H4<sub>eq</sub>/Mp18) e  $\delta$  2,36 *m* (H4<sub>eq</sub>/Mp17). Somando-se aos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ , juntamente com os experimentos bidimensionais gHMQC e gHMBC e dados da literatura (Harborne, 1996; Agrawal, 1989) podemos propor que na mistura temos a presença de (+)-catequina, **Mp17** e (-)-epicatequina, **Mp18**.

#### Identificação de Mp19 e Mp20 (Estruturas 2, Espectros 54 a 61)

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra indicou a presença de duas substâncias denominadas **Mp19** e **Mp20**. O espectro apresentou sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos. O sinal em  $\delta$  7,98 (*d*,  $J=8,5\text{Hz}$ ) caracterizou os hidrogênios H-2' e H-6' do flavonóide majoritário, enquanto que o sinal em  $\delta$  7,93 (*d*,  $J=9,0\text{Hz}$ ) caracterizou os hidrogênios H-2' e H-6' do flavonóide minoritário. O sinal em  $\delta$  6,82 (*d*,  $J=8,5\text{ Hz}$ ) caracterizou os hidrogênios H-3' e H-5' do anel B do flavonóide majoritário, enquanto o sinal em  $\delta$  6,83 (*d*,  $J=9,0\text{ Hz}$ ) caracterizou os hidrogênios H-3' e H-5' do anel B do flavonóide minoritário. Ainda na região aromática foi possível observar os sinais em  $\delta$  5,96 (*sl*) e  $\delta$  5,81 (*sl*), os quais foram atribuídos como sendo os hidrogenios H-8 e H-6 do anel A, respectivamente, sendo coincidente para os dois flavonóides. A comparação com os dados da literatura confirma a estrutura da aglicona como sendo o Kaempferol (Harborne, 1996).

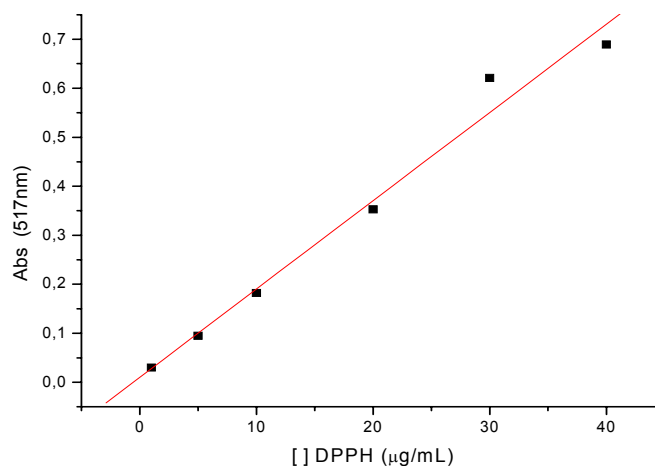


Os sinais dos prótons anoméricos foram observados em  $\delta$  5,13 (*d*,  $J=7,5$  Hz),  $\delta$  5,15 (*d*,  $J=7,5$  Hz),  $\delta$  4,42 (*d*,  $J=1,0$  Hz) e  $\delta$  4,41 (*sl*). Os experimentos TOCSY-1D e COSY levaram à identificação dos seguintes açúcares: duas unidades de rhamnose, uma de galactose e uma de glicose. Com o auxílio dos experimentos bidimensionais gHMQC e gHMBC e dados da literatura (Harborne, 1996; Agrawal, 1989) chegamos à proposta estrutural do Kaempferol-3-*O*- $\alpha$ -rhamnopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -galactopiranosose (**Mp19**) e Kaempferol-3-*O*- $\alpha$ -rhamnopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -glicopiranosose (**Mp20**).

### Atividade anti-oxidante

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura, com pequenas modificações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorvância de soluções de diferentes concentrações. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 517 nm, tendo como controle positivo quercetina e ácido gálico.

Primeiramente, foram preparados 100 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$ , mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições de 30, 20, 10, 5 e 1  $\mu\text{g/mL}$ . A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvância a 517 nm de todas as soluções (1 a 40  $\mu\text{g/mL}$ ), medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm e tendo como "branco" o metanol (**figura 4.1.3**). As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata. A equação da curva de calibração do DPPH foi  $A = 0,01801C + 0,01015$ , onde  $A$  é a absorvância medida no comprimento de onda de 517 nm e  $C$  corresponde à concentração de DPPH no meio, sendo o coeficiente de correlação  $R = 0,9906$ .

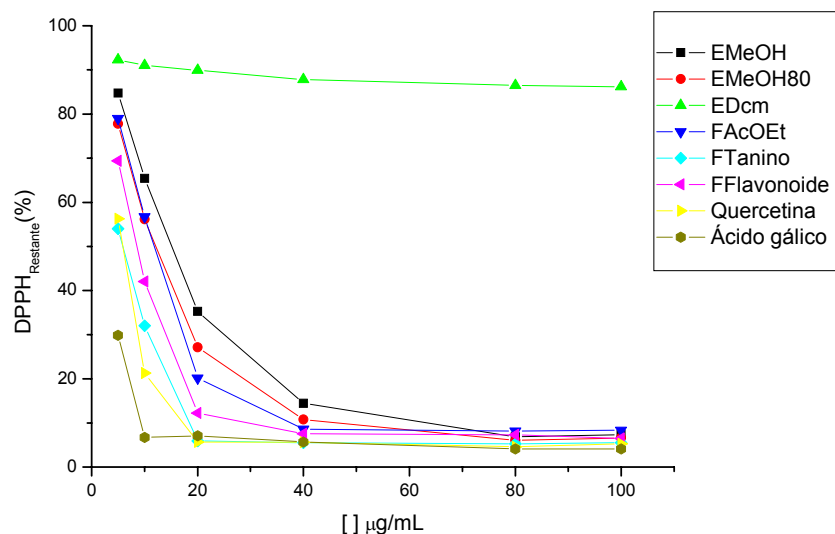


**Figura 4.1.3** – Curva de calibração de DPPH a 517 nm:  
Equação ( $A = 0,01801C + 0,01015$ );  $R=0,9906$

Soluções dos extratos e frações das folhas de *M. pusa* (500 µg/mL) e dos controles positivos em metanol foram diluídas nas concentrações de 100, 80, 40, 20, 10 e 5 µg/mL. As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (1,0 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,0 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40 µg/mL) foram feitas a 517 nm, após 30 min de reação. A mistura de metanol (2,0 mL) e solução metanólica do extrato (1,0 mL) foi utilizada como branco. A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorbância para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH restante (% DPPH<sub>RES</sub>), conforme a equação:

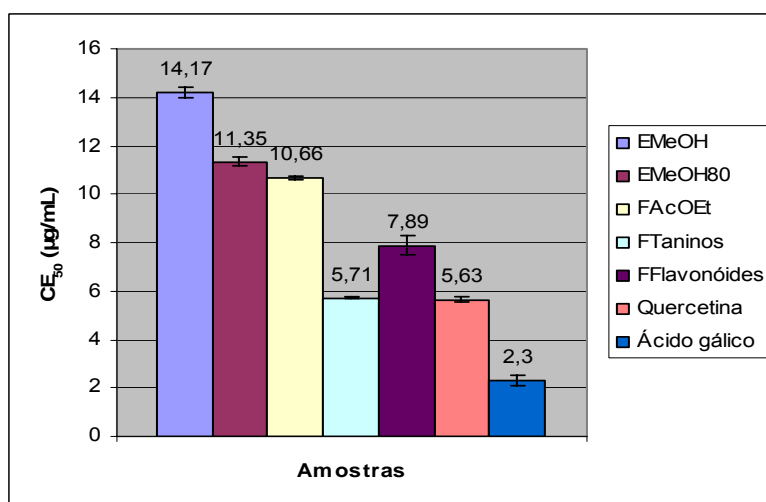
$$\%DPPH_{RES} = [DPPH]_1 / [DPPH]_0 \times 100$$

onde [DPPH]<sub>1</sub> corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com o extrato e [DPPH]<sub>0</sub> é a concentração inicial de DPPH, ou seja, 40 µg/mL (**figura 4.1.4**).



**Figura 4.1.4** – Porcentagens de DPPH restante após reação com os extratos e frações das folhas de *M. pusa*: Controle positivo - quercetina e ácido gálico.

A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% ( $CE_{50}$ ), foi determinada usando o programa Microcal Origin 7.0, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se na abscissa as concentrações da amostra ( $\mu\text{g/mL}$ ) ou do controle positivo e na ordenada a porcentagem de DPPH restante (**figura 4.1.5**).



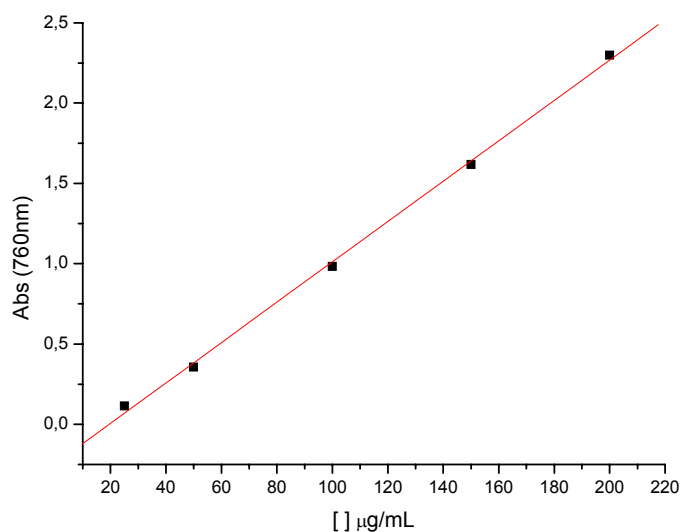
**Figura 4.1.5** – Concentração eficiente ( $CE_{50}$ ) dos extratos e frações das folhas de *M. pusa*: Controle positivo = Quercetina/ácido gálico

## Fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extratos e frações das folhas de *M. pusa* foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com modificações. Os extratos e frações (500 µg) foi dissolvido em metanol, transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 5,0 mL e o volume final foi completado com metanol. Uma alíquota de 1,0 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 5,0 mL; esta segunda solução teve seu volume acertado novamente com metanol. Uma alíquota de 1,0 mL desta última solução foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo 1 mL de uma solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> foram adicionados à mistura e agitada por 30 s. Após 40 min, a absorbância das amostras foi medida a 760 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, menos o extrato.

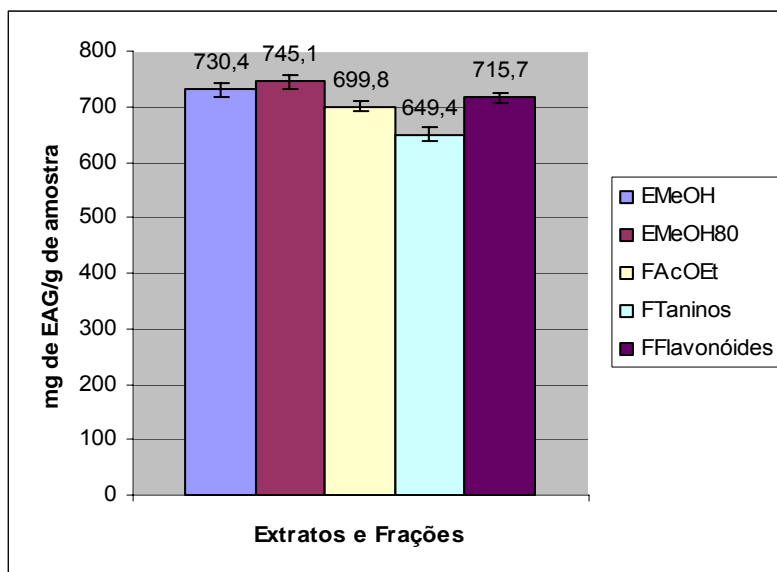
O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 350 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.

Primeiramente, foram preparados 25 mL de solução estoque de ácido gálico em metanol na concentração de 500 µg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições de 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância a 760 nm de todas as soluções (25 a 200 µg/mL), medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm e tendo como "branco" o metanol. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi  $A = 0,01257C - 0,2453$ , onde  $A$  é a absorbância a 760 nm e  $C$  é a concentração do ácido gálico, e o coeficiente de correlação  $R = 0,9992$  (**figura 4.1.6**). Todas as análises foram realizadas em triplicata.



**Figura 4.1.6** – Curva de calibração de fenóis totais a 760 nm: Padrão – Ácido Gálico; Equação ( $A = 0,01257C - 0,2453$ );  $R=0,9992$

Soluções dos extratos e frações das folhas de *M. pusa* foram diluídas na concentração de 100 µg/mL. As medidas das absorbâncias das misturas reacionais foram feitas a 760 nm, após 40 min de reação. A mistura de metanol (2,0 mL) e solução metanólica do extrato (1,0 mL) foi utilizada como branco. A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorbância para cada concentração testada, foram determinados os fenóis totais, conforme a equação:  $FT = [FT]/[Amostra] \times 1000$ , onde [FT] corresponde à concentração de fenóis no meio e [Amostra] é a concentração da amostra, ou seja, 100 µg/mL. Os resultados foram expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato (**figura 4.1.7**).



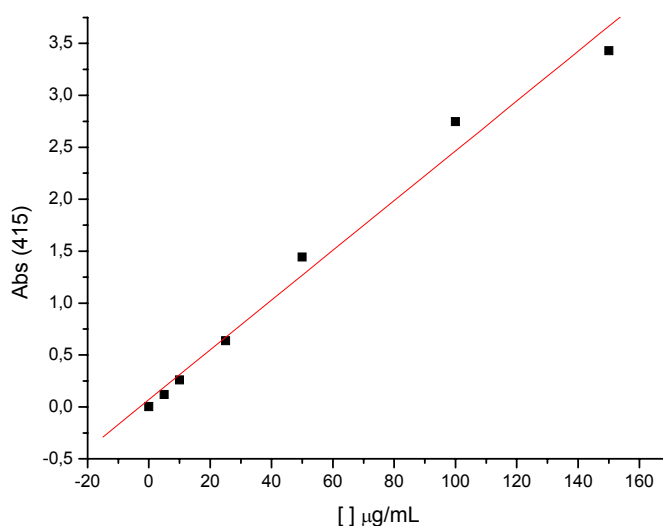
**Figura 4.1.7** – Conteúdo de fenóis totais dos extratos e frações das folhas de *M. pusa*, expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.

### Flavonóides totais

A determinação do teor de flavonóides totais presentes nos extratos e frações das folhas de *M. pusa* foi realizada por meio de método espectrofotométrico utilizando cloreto de alumínio (Farmacopéia, 2001) com algumas modificações. Os extratos e frações (500 µg) foram dissolvidos em metanol, transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 5 mL e o volume final foi completado com metanol. Uma alíquota de 1,0 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL; esta segunda solução teve seu volume acertado novamente com metanol. Uma alíquota de 1,0 mL desta última solução foi agitada com 0,5 mL de cloreto de alumínio 2,5%, 0,5 mL acetato de sódio 0,2 M e 1 mL de água destilada. Após 40 min, a absorbância das amostras foi medida a 415 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, menos a amostra.

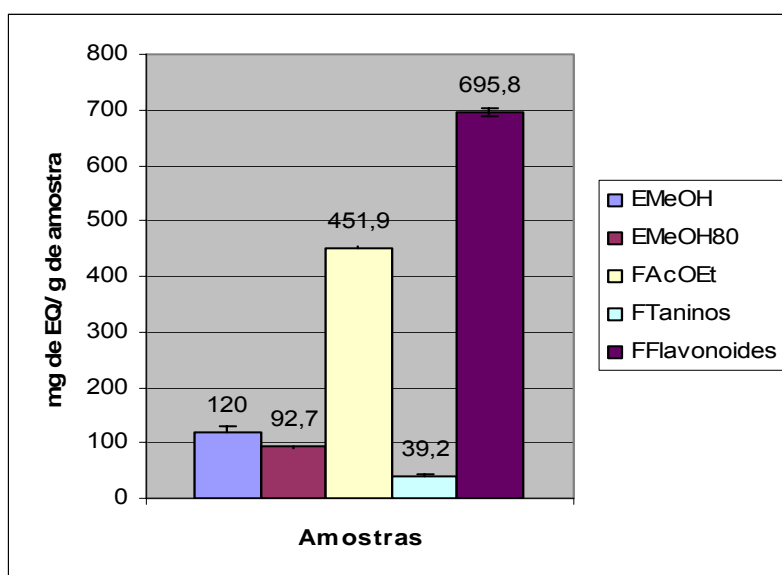
O teor de flavonóides totais (FVT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com soluções de quercetina (5 a 150 µg/mL) e expressos como mg de EQ (equivalentes de quercetina) por g de extrato.

Primeiramente, foram preparados 25 mL de solução estoque de quercetina em metanol na concentração de 500 µg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições de 150, 100, 50, 25, 10 e 5 µg/mL. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância a 415nm de todas as soluções (5 a 150 µg/mL), medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm e tendo como "branco" o metanol. A equação da curva de calibração da quercetina encontrada foi  $A = 0,02396C + 0,07013$ , onde  $A$  é a absorbância a 415 nm e  $C$  é a concentração de quercetina, e o coeficiente de correlação  $R = 0,9921$  (**figura 4.1.8**). Todas as análises foram realizadas em triplicata.



**Figura 4.1.8** – Curva de calibração de flavonóides totais a 415 nm: Padrão – Quercetina; Equação ( $A = 0,02396C + 0,07013$ );  $R=0,9921$

Soluções dos extratos e frações das folhas de *M. pusa* (500 µg/mL) e dos controles positivos em metanol foram diluídas na concentração de 100 µg/mL. As medidas das absorbâncias das misturas reacionais foram feitas a 760 nm, após 40 min de reação. A mistura de metanol (2,0 mL) e solução metanólica do extrato (1,0 mL) foi utilizada como branco. A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorbância para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de fenóis totais, conforme a equação:  $FVT = [FVT]/[Amostra] \times 1000$ , onde  $[FVT]$  corresponde à concentração de flavonoides no meio e  $[Amostra]$  é a concentração da amostra, ou seja, 100 µg/mL (**figura 4.1.9**).



**Figura 4.1.9** – Conteúdo de flavonóides totais nos extratos e frações das folhas de *M. pusa*, expressos como mg de EQ (equivalentes de quercetina) por g de amostra.

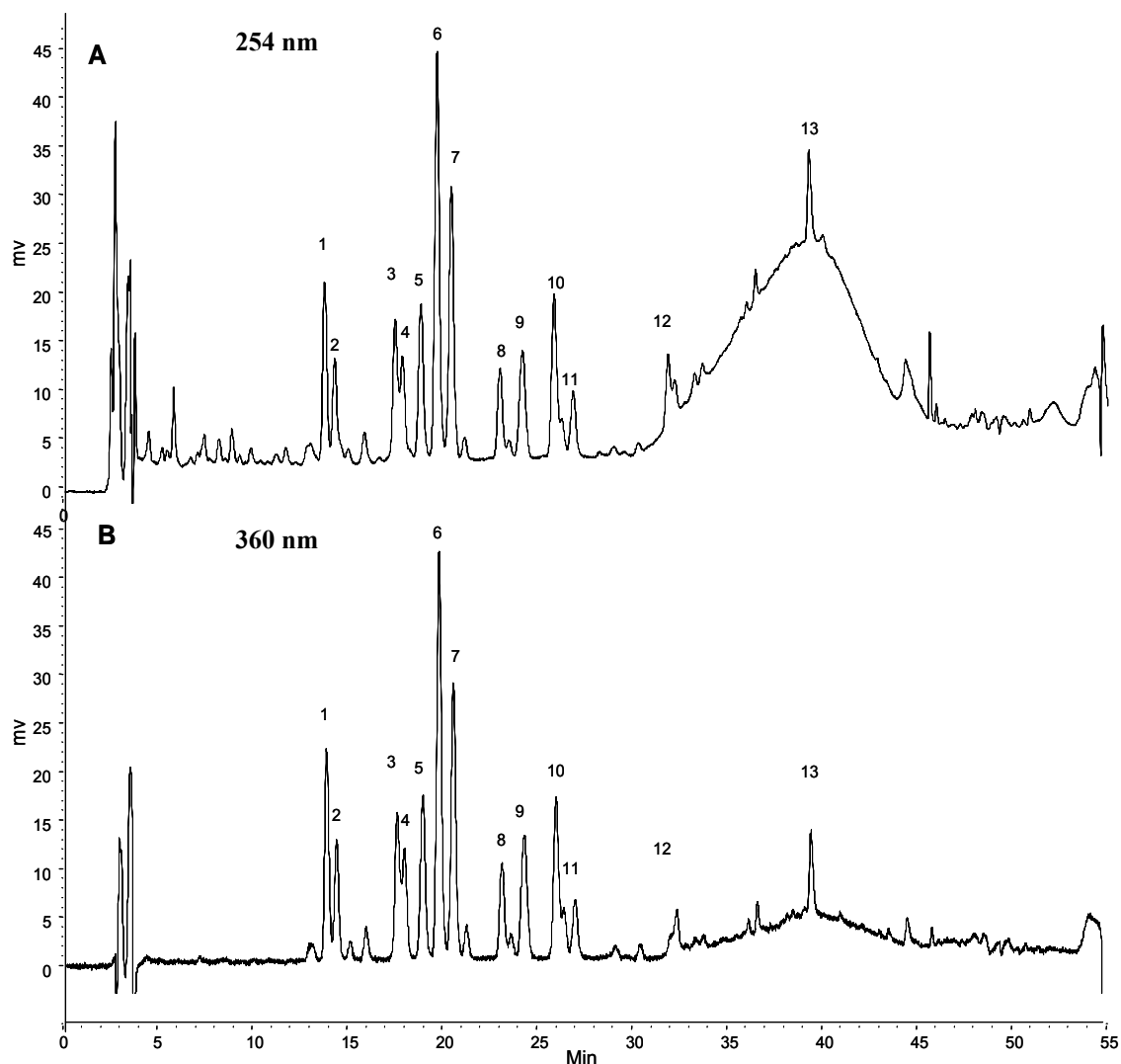


### Quantificações por CLAE-UV-DAD

O extrato **EMeOH Mp** foi analisado por CLAE para a identificação do perfil cromatográfico dos flavonóides isolados anteriormente. Primeiramente o extrato passou por um *clean up* em cartucho de extração em fase sólida (SPE) de fase reversa (C<sub>18</sub>), sendo em seguida preparada uma solução de 2 mg/mL. Para a fase móvel foram utilizados: água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificados com 0,05% de TFA. O gradiente usado foi 23-50 %B (40 min), 50-100 %B (10min) e 100 %B (5 min), com tempo total de análise de 55 min.

A identificação de cada flavonóide no perfil cromatográfico obtido (**figura 4.1.10**) foi realizada por co-injeção. Para tanto, a partir da solução anterior (2 mg/mL) foi preparada uma solução de 500 µg/mL. Também foi preparada uma solução de 500 µg/mL de cada flavonóide e/ou mistura de flavonóides isolados e/ou identificados nos períodos anteriores. Partindo destas soluções foram preparadas misturas na proporção de 4 partes de extrato para 1 de flavonóide e/ou mistura de flavonóides. Outras informações, tais como tempos de retenção e espectros de UV também foram utilizadas para a identificação.

A etapa seguinte foi a quantificação dos flavonóides majoritários do extrato **EMeOH Mp**. As curvas de calibração foram elaboradas utilizando soluções estoque dos padrões comerciais de kaempferol, quercetina e miricetina (1,0 mg/mL) em metanol 75%. Para cada quantificação, as áreas dos picos foram correlacionadas com as concentrações encontradas nas curvas de calibração. O teor de flavonóis heterosídeos e agliconas foram calculados de acordo com suas respectivas agliconas, nos limites de concentrações de 10–500µg/mL ( $y = -3,11 \times 10^4 + 8,11 \times 10^4 x$ ,  $R^2 = 0.9999$ ,  $n=7$ ,  $\lambda = 360$  nm para kaempferol,  $y = -2,17 \times 10^4 + 3,86 \times 10^4 x$ ,  $R^2 = 0.9999$ ,  $n=7$ ,  $\lambda = 360$  nm para quercetina e  $y = -1,77 \times 10^5 + 4,04 \times 10^4 x$ ,  $R^2 = 0.9999$ ,  $n=7$ ,  $\lambda = 360$  nm para miricetina). Os teores encontrados estão mostrados na **tabela 4.1.3** e estão expressos em mg/g das respectivas agliconas.



**Figura 4.1.10 – Cromatogramas do extrato EMeOH Mp:** 1-Miricetina-3-O- $\beta$ -galactopiranosse (TR=12,95); 2-Miricetina-3-O- $\beta$ -glicopiranosse (TR=13,48); 3-Não Identificado (TR=15,10); 4-Rutina (TR=16,93); 5-Miricetina-3-O- $\beta$ -rhamnopiranosse (TR=18,29); 6-Quercetina-3-O- $\beta$ -galactopiranosse (TR=19,21); 7-Quercetina-3-O- $\beta$ -xilopiranosse (TR=20,03); 8-Quercetina-3-O- $\alpha$ -arabinopiranosse (TR=22,68); 9-Kaempferol-3-O- $\beta$ -glicopiranosse e/ou Kaempferol-3-O- $\beta$ -galactopiranosse (TR=23,90); 10-Quercetina-3-O- $\alpha$ -arabinofunanosse (TR=25,55); 11-Quercetina-3-O- $\alpha$ -rhamnopiranosse (TR=26,68); 12-Miricetina (TR=31,87) e 13-Quercetina (TR=39,35).

O cromatograma A (254 nm) evidencia a presença marcante de taninos condensados (derivados de catequina), na forma de elevação (região entre 30 50 min), caracterizados pelos espectros de UV semelhantes aos das catequinas. No mesmo cromatograma foi observado a presença de taninos hidrolizáveis, que eluem praticamente no volume morto da coluna, caracterizados pelos espectros de UV semelhantes aos observados para os ácidos fenólicos (tais como o ácido gálico)

**Tabela 4.1.3** – Teor dos flavonoides majoritários de *Mouriri pusa*.

Flavonoides	Teor (mg/g de EMeOH Mp) <sup>a</sup>
Miricetina-3- <i>O</i> -β-galactopiranoose	5,3
Miricetina-3- <i>O</i> -β-glicopiranoose	4,0
Quercetina-3- <i>O</i> -β-Rhamnosil-glicopiranoose (Rutina)	2,8
NI	2,0
Miricetina-3- <i>O</i> -α-rhamnopiranoose	4,8
Quercetina-3- <i>O</i> -β-galactopiranoose	7,1
Quercetina-3- <i>O</i> -β-xilopiranoose	4,9
Quercetin- <i>O</i> -β-arabinopiranoside	1,9
Kaempferol-3- <i>O</i> -β-galactopiranoose/ Kaempferol-3- <i>O</i> -β-glicopiranoose	1,3
Quercetina-3- <i>O</i> -α-arabinofuranose	3,1
Quercetina-3- <i>O</i> -α-rhamnopiranoose	1,0
Miricetina	0,6
Quercetina	1,8
Total de flavonóides	40,6

<sup>a</sup> Teor de flavonóides determinado por CLAE-UV-DAD.

NI = não identificado

#### 4.1.2 ESTUDO BIOLÓGICO

As espécies de *Mouriri* são utilizadas popularmente para tratar desordens do trato gastrointestinal (Silva *et al.*, 2000) e estudos preliminares comprovaram a atividade gastroprotetora de *M. pusa* (Andreo *et al.*, 2006). Contudo, são poucas as informações sobre eficácia e segurança de uso desta espécie, sendo importante a realização de estudos farmacológicos mais aprofundados.

Assim sendo, foram realizados ensaios de toxicidade aguda, mutagenicidade e atividade antiulcerogênica com extratos e frações enriquecidas de *M. pusa*. Para os ensaios farmacológicos foram utilizados: **EDcm** e **EMeOH** de *M. pusa*, **FH<sub>2</sub>O** (fração rica em taninos, obtida de acordo com o texto, página 22) e **F2** (fração rica em flavonóides, obtida de acordo com o texto, página 22).

### Toxicidade aguda

No teste de toxicidade aguda, de acordo com análises dos valores obtidos com a pesagem dos animais e de seus órgãos vitais (coração, pulmão, fígado, baço e rins) constatou-se que as diferenças não foram significativas entre os diferentes tratamentos. Tampouco foi observada qualquer variação comportamental dos animais. Não foram registrados óbitos durante o período de observação. Nas quantificações bioquímicas (AST, ALT,  $\gamma$ -GT, Creatinina e Uréia) no soro destes animais tratados durante 14 dias, não foi observada nenhuma alteração entre os grupos, indicando ausência de toxicidade por parte dos extratos e frações nesses parâmetros.

### Atividade antiulcerogênica

No ensaio de etanol absoluto (**tabela 4.1.4**), o Lansoprazol Controle positivo) apresentou I.L.U. de  $48,7 \pm 24,9$ , diferindo significativamente ( $p < 0,01$ ) da salina (controle negativo) com I.L.U. de  $130,3 \pm 31,8$ . O **EMeOH Mp** também apresentou diferença significativa ( $p < 0,01$ ) nas suas três doses:  $29,3 \pm 24,7$ ,  $28,3 \pm 23,2$  e  $1,0 \pm 1,0$  nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg, respectivamente.

Quando realizado o ensaio de etanol acidificado (**tabela 4.1.4**), verificamos que o grupo tratado com o veículo (salina) apresentou I.L.U. de  $85,0 \pm 27,8$ ; comparando -se aos demais grupos notou-se redução significativa do índice ( $p < 0,01$ ) em todos os tratamentos: Lansoprazol-  $41,4 \pm 23,1$ ; 250 mg/kg-  $42,3 \pm 24,4$ ; 500 mg/kg-  $43,6 \pm 18,3$  e 1000 mg/kg-  $7,9 \pm 7,1$  de ILU.

Para o modelo experimental de DAINÉ (**tabela 4.1.4**), constatamos que apenas os animais tratados com cimetidina e com do **EMeOH Mp** na dose 500 mg/kg apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Os valores de I.L.U. foram os seguintes: salina  $21,1 \pm 2,4$ ; cimetidina  $6,0 \pm 2,9$  e **EMeOH Mp**  $9,8 \pm 2,9$  (500 mg/kg).

No ensaio antiulcerogênico por estresse (**tabela 4.1.4**), o **EMeOH Mp** apresentou inibição significativa das ulcerações nas doses de 500 mg/Kg ( $4,3 \pm 0,5$ ) e 1000 mg/Kg ( $7,0 \pm 0,6$ ).

**Tabela 4.1.4** – Resultados dos ensaios de atividade gastroprotetora de **EMeOH Mp**

Ensaio	Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU	Inibição (%)
<b>Etanol absoluto</b>	Salina	10 ml/kg	130,3 ± 31,8	---
	Lansoprazol	30	48,7 ± 24,9**	60
	EMeOH Mp	250	29,3 ± 24,7**	78
		500	28,3 ± 23,2**	79
		1000	1,0 ± 1,0**	100
<b>HCl/Etanol</b>	Salina	10 ml/kg	85,0 ± 27,8	---
	Lansoprazol	30	41,4 ± 23,1**	52
	EMeOH Mp	250	42,3 ± 24,4**	51
		500	43,6 ± 18,3**	50
		1000	7,9 ± 7,1**	91
<b>DAINE</b>	Salina	10 ml/kg	21,1 ± 2,4	---
	Cimetidina	100	6,0 ± 2,9**	71
	EMeOH Mp	250	14,3 ± 5,4	32
		500	9,8 ± 2,9*	52
		1000	19,3 ± 4,4	8
<b>Estresse</b>	Salina	10 ml/kg	18,3 ± 1,3	---
	Cimetidina	100	11,6 ± 0,6	37
	EMeOH Mp	250	10,2 ± 1,2	44
		500	4,3 ± 0,5*	76
		1000	7,0 ± 0,6*	62

ANOVA- Teste de Dunnett- \*p<0.05 e \*\*p<0.01

As frações **FH<sub>2</sub>O** e **F2** apresentaram função citoprotetora em lesões de mucosa promovidas por etanol, sendo que a fração de flavonóides (**F2**) de *M. pusa* (50 mg/kg) tem ação eficaz na atividade citoprotetora e não promove a ativação de HSP 70 e COX-2. Já a fração de taninos **FH<sub>2</sub>O** de *M. pusa* (25 mg/kg) tem ação eficaz na atividade citoprotetora e não promove a ativação de HSP 70 e uma leve ativação de COX-2 na porção apical das glândulas estomacais.

Complementando os estudos de gastroproteção, foram realizadas análises morfométricas microscópicas e imuno-histoquímicas nos estômagos dos ratos submetidos a ulceração por ácido acético e tratados por 14 dias com salina, Cimetidina, **FH<sub>2</sub>O** e **F2**. Nas análises morfométricas, observou-se que, tanto para os animais tratados com a fração de taninos quanto com a fração de flavonóides, houve um

significativo aumento na mucosa gástrica regenerativa comparando-se com a salina, o que não ocorreu com a cimetidina. Esse aumento sugere uma maior regeneração das úlceras por parte das frações testadas. Nas análises imuno-histoquímicas: a fração de flavonóides aumentou a expressão de PCNA (indicando aumento na proliferação celular), de CXCR4 (indicando ativação de angiogênese) e diminuiu ativação de COX-2 (devido a seu efeito antiinflamatório, descrito na literatura). A fração de taninos, ao contrário, não promoveu alterações em nenhum dos três parâmetros analisados. Esses resultados reforçam o efeito cicatrizante das frações aproximando-se um pouco dos mecanismos de ação.

O envolvimento com óxido nítrico foi testado e nos grupos de animais pré-tratados com salina, a carbenoxolona e o **EMeOH Mp** apresentaram gastroproteção de 81% e 99%, respectivamente. Porém, quando utilizamos L-NAME (bloqueador da síntese de NO) como pré-tratamento, houve redução da gastroproteção exercida tanto pela carbenoxolona (inibição de 56% das lesões ulcerativas) quanto do extrato, que inibiu 89% das lesões (**tabela 4.1.5**).

Por outro lado, o envolvimento com grupamento sulfidrilado não foi verificado pois, ao utilizarmos como pré-tratamento a salina, verificou-se que a carbenoxolona apresenta 57% de proteção e que o **EMeOH Mp** apresenta 78% de proteção, constatando diferenças significativas em relação aos animais do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ). Com a administração de NEM (bloqueador da formação de grupos sulfidrilado) no pré-tratamento, a carbenoxolona reduziu em 28% e o **EMeOH Mp** em 76% as úlceras em relação ao controle negativo, diferindo significativamente deste (**tabela 4.1.5**).

**Tabela 4.1.5** - Efeito do EMeOH de *M. pusa* sobre as lesões gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME (bloqueador da NO sintase).

Ensaio	Pré-tratamento (i.p.)	Tratamento	Dose (mg/kg)	I.L.U.	Inibição (%)
(NO) Participação de óxido nítrico	Salina	Salina	10 ml/kg	135,5± 46,3	---
		Carbenoxolona	100	25,9± 15,4**	80,9
		EmeOH Mp	500	1,1±1,9**	99,2
	L-NAME (70mg/kg)	Salina	10 ml/kg	183,9± 60,4	---
		Carbenoxolona	100	81,3± 83,6**	55,8
		EmeOH Mp	500	19,6± 16,3**	89,4
(SH) Participação de grupos sulfidrilas	Salina	Salina	10 ml/kg	73,7 ± 17,9	---
		Carbenoxolona	100	31,9 ± 5,9**	56,8
		EMeOH Mp	500	16,3 ± 10,6**	77,9
	NEM (10mg/kg)	Salina	10 ml/kg	148,3 ± 40,6	---
		Carbenoxolona	100	106,3 ± 16,3*	28,3
		EMeOH Mp	500	36,0 ± 12,0**	75,7

ANOVA- Teste de Dunnett- \*p<0,05 e \*\*p<0,01 - representa as diferenças significativas obtidas em relação aos respectivos grupos controle.

No modelo de ligadura de piloro, utilizamos apenas o extrato que apresentou melhores resultados nos ensaios in vivo (EMeOH Mp) em sua dose mais eficaz (500 mg/kg). Após administração dos tratamentos por via oral e da cirurgia para a ligadura de piloro, verificamos que o EMeOH Mp causou aumento do volume gástrico e redução do ILU, como efeito local, com significância de p<0,05 e p<0,01, respectivamente. O controle positivo (cimetidina) diminuiu significativamente a concentração de íons H<sup>+</sup> do suco gástrico dos animais. Já na ligadura de piloro com administração intraduodenal não observamos qualquer variação significativa dos parâmetros avaliados, nenhum efeito sistêmico foi notado.

**Tabela 4.1.6** - Efeito do EMeOH Mp sobre os parâmetros do suco gástrico de camundongos submetidos à ligadura de piloro.

Via de administração	Tratamentos (p.o.)	Dose (mg/kg)	Concentração de H <sup>+</sup> (μEq/mL/4h)	pH	Volume gástrico (mL)
Oral	Salina	-	6,9 ± 1,5	3,3 ± 1,2	0,6 ± 0,2
	Cimetidina	100	4,3 ± 1,4**	3,7 ± 0,9	0,6 ± 0,2
	EMeOH Mp	500	5,6 ± 1,0	2,7 ± 0,5	1,2 ± 0,3*
Intraduodenal	Controle	-	7,5 ± 1,2	2,1 ± 0,7	0,7 ± 0,2
	Cimetidina	100	4,9 ± 2,1*	3,1 ± 0,9	0,6 ± 0,3*
	EmeOH Mp	500	6,7 ± 1,9	2,4 ± 0,5	0,7 ± 0,3

ANOVA- Teste de Dunnett- \*p<0.05 e \*\*p<0.01.

## Motilidade intestinal

Para a motilidade intestinal, verificamos a porcentagem da distância percorrida pelo carvão ativado em animais previamente tratados com salina (70%), atropina (42%) e com extrato **EMeOH Mp**, em relação ao comprimento total do intestino delgado: 77% na dose de 250 mg/kg; 76% na dose de 500 mg/kg e 73% na dose de 1000 mg/kg (**tabela 4.1.7**). O deslocamento causado pela tratamento com atropina foi o único que diferiu significativamente no deslocamento do marcador, reduzindo o trânsito intestinal ( $p < 0,01$ ), sendo assim este extrato não interfere na motilidade intestinal.

**Tabela 4.1.7** - Efeito do **EMeOH Mp** sobre a motilidade intestinal de camundongos.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Transporte (carvão ativo)
Salina	10 ml/Kg	70,0 ± 1,3
Atropina	5	41,9 ± 1,7**
<b>EMeOH Mp</b>	250	77,3 ± 1,7
	500	75,6 ± 1,2
	1000	73,1 ± 0,9

ANOVA- Teste de Dunnett- \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ .

## Mutagenicidade

Por fim, os ensaios de mutagenicidade (**tabela 4.1.8**) em quatro linhagens diferentes de *Salmonella typhimurium*, com e sem metabolização, após o tratamento com os extratos mostraram que o extrato **EMeOH Mp** apresentou mutagenicidade para as linhagens TA98, TA100 e TA97a com e sem metabolização. Para a linhagem TA102 (+S9/-S9), **EMeOH Mp** não foi mutagênico. Na ausência de metabolização, a fração **F2** apresentou mutagenicidade tão significativa quanto o extrato para TA98 e TA100, enquanto **FH<sub>2</sub>O** não apresentou mutagenicidade para estas cepas. Com metabolização, tano **F2**, quanto **FH<sub>2</sub>O** foram mais mutagênicas que o extrato, para TA98 e TA100.



**Tabela 4.1.8** - Atividade mutagênica dos extratos das folhas de *M. pusa* em linhagens de *S. typhimurium* em ausência e na presença de metabolização.

Ensaio	Tratamento (mg/placa)	TA98	TA100	TA97a	TA102	
Ausência de metabolização	<b>EMeOH Mp</b>					
	<b>DMSO</b>	20,3±4,0	134,3 ± 10,6	167,7 ± 11,9	301 ± 8,5	
	<b>2,84</b>	55,7 ± 8,1 (2,7)*	224,0 ± 8,7 (1,7)*	431,3 ± 28,3(2,6)*	239,7 ± 65,7 (0,8)	
	<b>5,7</b>	83,7 ± 17,2 (4,1)*	203,7 ± 10,7(1,5)*	346,3 ± 94,9(2,1)*	293,7 ± 9,4 (0,9)	
	<b>11,3</b>	109,0 ± 12,1(5,4)*	253,0 ± 11,0(1,9)*	435,0 ± 23,1(2,6)*	298,0 ± 11,4 (0,9)	
	<b>17,02</b>	133,0 ± 19,1(6,5)*	282,7 ± 13,0(2,1)*	528,0 ± 9,5(3,1)*	291,0 ± 2,0 (0,9)	
	<b>22,7</b>	148,3 ± 10,4(7,3)*	295,7 ± 12,2(2,2)*	566,0 ± 19,5(3,4)*	285,3 ± 19,1 (0,9)	
	<b>F2 (Flavonóides)</b>					
	<b>DMSO</b>	14,0 ± 1,4	97,0 ± 1,4	na	na	
	<b>1,5</b>	24,0 ± 5,6 (1,7)*	102,5 ± 6,4 (1,0)	na	na	
	<b>3,0</b>	32,0 ± 2,8 (2,3)*	103,0 ± 1,4 (1,1)	na	na	
	<b>6,1</b>	75,5 ± 9,2 (5,4)*	145,0 ± 4,2 (1,5)*	na	na	
	<b>12,1</b>	81,0 ± 2,8 (5,8)*	218,5 ± 14,8 (2,3)*	na	na	
	<b>18,2</b>	77,0 ± 1,4 (5,5)*	198,0 ± 5,7 (2,0)*	na	na	
	<b>24,3</b>	51,0 ± 7,1 (3,6)*	Citotóxico	na	na	
	<b>FH<sub>2</sub>O</b>					
	<b>DMSO</b>	14,0 ± 1,4	97,0 ± 1,4	na	na	
	<b>2,8</b>	15,0 ± 4,2 (1,1)	87,0 ± 2,8 (0,9)	na	na	
	<b>5,6</b>	15,5 ± 2,1 (1,1)	113,5 ± 17,6 (1,2)	na	na	
	<b>11,2</b>	17,5 ± 2,1 (1,2)	100,5 ± 3,5 (1,0)	na	na	
	<b>22,4</b>	22,0 ± 2,8 (1,6)*	120,0 ± 14,1 (1,2)	na	na	
	<b>33,6</b>	26,0 ± 4,2 (1,8)*	130,0 ± 8,5 (1,3)	na	na	
	<b>44,8</b>	32,5 ± 3,4 (2,3)*	131,5 ± 3,5 (1,3)	na	na	
	<b>Ctrol +</b>	767,3 ± 116,3 <sup>a</sup>	1431,7 ± 117,6 <sup>b</sup>	1311,7 ± 143,9 <sup>c</sup>	1656,3 ± 156,2 <sup>d</sup>	
	Presença de metabolização	<b>EMeOH Mp</b>				
		<b>DMSO</b>	26,7 ± 1,5	87,3 ± 5,5	148,0 ± 14,1	212,3 ± 10,6
		<b>2,84</b>	99,0 ± 9,8 (3,7)*	147,0 ± 5,6 (1,7)*	414,0 ± 43,8(2,8)*	247,3 ± 6,5 (1,2)
<b>5,7</b>		112,7 ± 8,33(4,2)*	161,0 ± 5,6 (1,6)*	592,5 ± 34,6(4,0)*	244,3 ± 7,6 (1,1)	
<b>11,3</b>		142,0 ± 3,61(5,3)*	188,0 ± 8,0 (2,1)*	627,0 ± 36,8(4,2)*	263,7 ± 19,7 (1,2)	
<b>17,02</b>		192,7 ± 12,1(7,2)*	194,3 ± 31,8(2,2)*	608,0 ± 21,2(4,1)*	247,0 ± 3,6 (1,2)	
<b>22,7</b>		198,0 ± 15,9(7,4)*	218,0 ± 16,0(2,5)*	623,0 ± 36,7(4,2)*	245,3 ± 8,5 (1,5)*	
<b>F2 (Flavonóides)</b>						
<b>DMSO</b>		18,5 ± 3,5	81,5 ± 10,6	na	na	
<b>1,5</b>		98,5 ± 3,5 (5,3)*	161,5 ± 21,9 (2,0)*	na	na	
<b>3,0</b>		118,0 ± 14,1 (6,4)*	181,0 ± 9,9 (2,2)*	na	na	
<b>6,1</b>		139,5 ± 9,2 (7,5)*	217,5 ± 7,8 (2,7)*	na	na	
<b>12,1</b>		172,0 ± 8,5 (9,3)*	207,5 ± 2,1 (2,5)*	na	na	
<b>18,2</b>		225,5 ± 9,2 (12,2)*	236,5 ± 6,4 (2,9)*	na	na	
<b>24,3</b>		201,5 ± 6,4 (10,9)*	179,0 ± 11,3 (2,2)*	na	na	
<b>FH<sub>2</sub>O (Taninos)</b>						
<b>DMSO</b>		18,5 ± 3,5	81,5 ± 10,6	na	na	
<b>2,8</b>		36,0 ± 5,6 (1,9)*	100,5 ± 2,1 (1,2)	na	na	
<b>5,6</b>		57,5 ± 7,8 (3,1)*	137,0 ± 8,5 (1,7)*	na	na	
<b>11,2</b>		64,5 ± 7,8 (3,5)*	130,0 ± 8,5 (1,6)*	na	na	
<b>22,4</b>		58,0 ± 4,2 (3,1)*	142,0 ± 15,5 (1,7)*	na	na	
<b>33,6</b>		79,5 ± 10,6 (4,3)*	130,5 ± 4,9 (1,6)*	na	na	
<b>44,8</b>		74,5 ± 6,4 (4,0)*	143,0 ± 5,6 (1,7)*	na	na	
<b>Ctrol +</b>		1215,3 ± 93,3 <sup>a</sup>	1714,9 ± 189,1 <sup>b</sup>	1546,7 ± 116,9 <sup>c</sup>	1931,3 ± 1891,1 <sup>d</sup>	

na = não avaliado; M±SD (RM) = média ± desvio padrão; \* = significância a 5 %; \*\* = significância a 1% controle +: <sup>a</sup>TA98 = NDP (10µg/placa); <sup>b</sup>TA100 = azida sódica (5,0µg/placa); <sup>c</sup>TA97a = NPD (10µg/placa); <sup>d</sup>TA102 = mitomicina (0,25µg/placa). Valores entre parênteses representam as razões de mutagenicidade (RM)

## 4.2 *Mouriri elliptica*

### 4.2.1 ESTUDO QUÍMICO

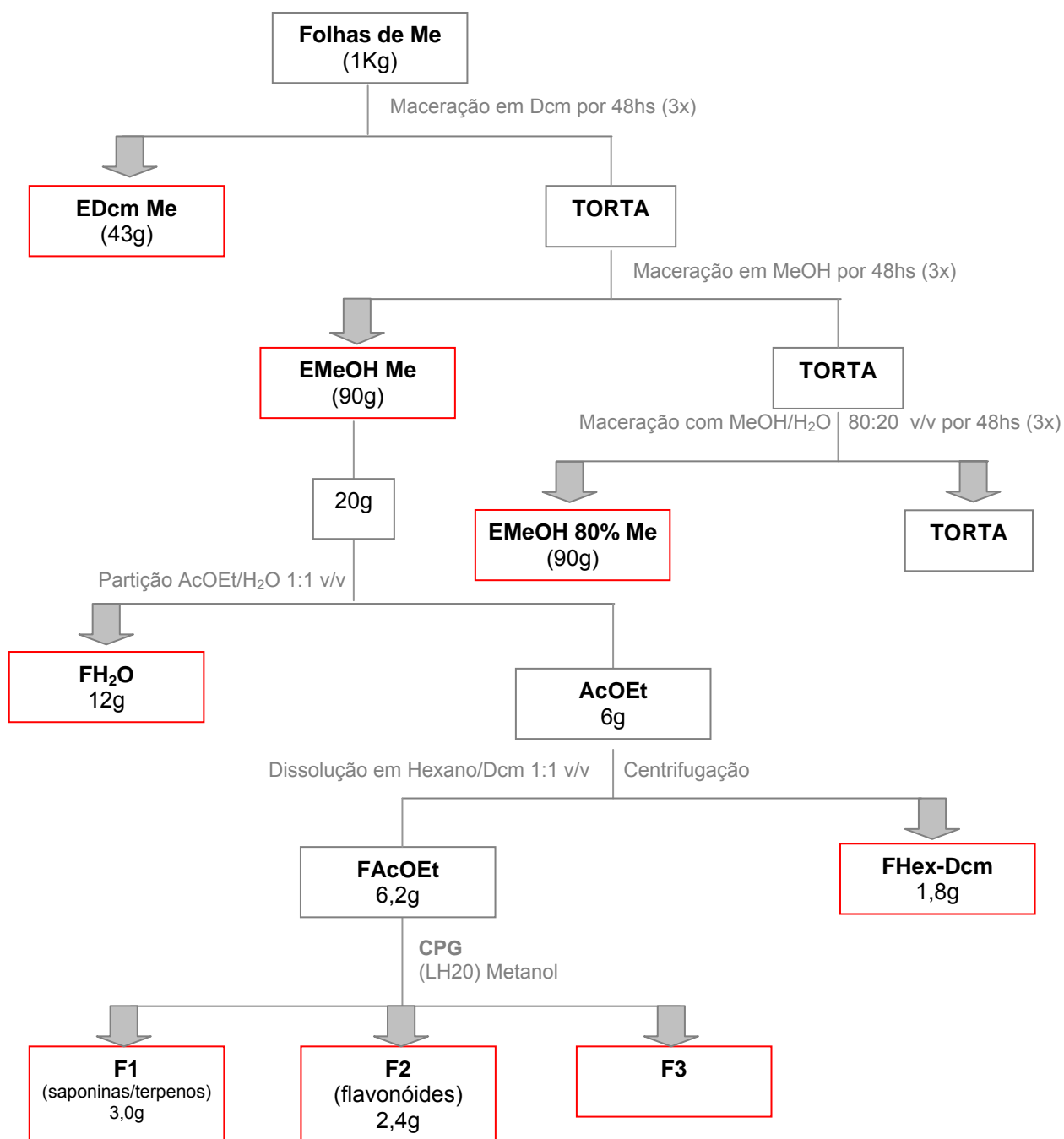
#### Preparo dos Extratos e frações

As folhas (1 Kg) de *Mouriri elliptica* foram secas e trituradas em moinho de facas e em seguida, foram submetidas às extrações por maceração em Dcm, MeOH e MeOH/H<sub>2</sub>O 80:20, v/v, respectivamente. Após a evaporação dos solventes por destilação à pressão reduzida foram obtidos os extratos **EDcm Me**, **EMeOH Me** e **EMeOH 80% Me** (tabela 4.2.1).

Conforme realizado com *M. pusa*, a presença de saponinas e taninos foi verificada no extrato **EMeOH Me**. Em seguida, o extrato **EMeOH Me** (20,0g) foi dissolvido em 100 mL de metanol e adicionado 800mL de Acetato de Etila, ocorrendo precipitação. Análises por CCD mostraram que os flavonóides e terpenos permaneceram majoritariamente dissolvidos enquanto que os derivados ellágicos e taninos precipitaram. O fracionamento foi então, iniciado pela porção **AcOEt Me**, reservando o precipitado para investigações posteriores, de acordo com a **Figura 4.2.1**.

**Tabela 4.2.1** – massas e rendimentos dos extratos e frações obtidos das folhas de *M. elliptica*

Extrato/Fração	Massa (g)	Rendimento (%) Partindo de 1Kg de folhas
EDcm	43	4,3
EMeOH	90	9,0
EMeOH 80%	90	9,0
		Rendimento (%) Partindo de 20g de EMeOH
FHex/Dcm	1,8	9,0
FAcOEt	6,2	31,0
FH <sub>2</sub> O (taninos)	12,0	60,0
		Rendimento (%) Partindo de 2g de FAcOEt
F1 (saponinas e terpenos)	1,0	50,0
F2 (flavonóides)	0,8	40,0
F3	0,2	10,0



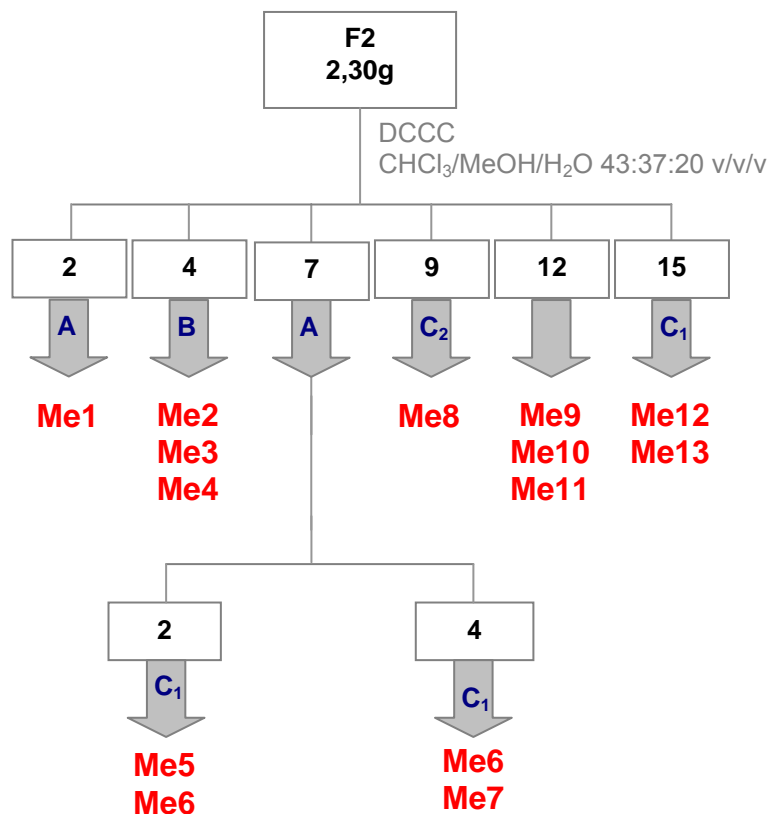
**Figura 4.2.1** – Obtenção dos extratos e frações a partir das folhas de *M. elliptica*

### Isolamento e identificação dos flavonóides

A fração **F2**, obtida de acordo com a **figura 4.2.1**, foi submetida a um fracionamento por DCCC. A técnica foi aplicada de forma que a fase estacionária era composta pela fase superior da mistura de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  43:37:20 v/v/v, enquanto a fase inferior do sistema de solventes era a fase móvel. Foram obtidas 200 frações de 10 mL cada, sendo estas reunidas em 17 grupos de frações após análises cromatográficas por CCD utilizando como fase móvel a fase inferior da mistura de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{n-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$  5:6:1:4 v/v/v/v (**Tabela 4.2.2**). Na seqüência, algumas frações foram purificadas, conforme mostra a **figura 4.2.2**.

**Tabela 4.2.2** - Fracionamento de F2.

<b>Frações</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Substância isolada ou identificada</b>	<b>Massa (mg)</b>
1	267	Não Estudado (NE)	-
2	30	Naringenina <b>Me1</b>	5
3	45	NE	-
4	60	Kaempferol <b>Me2</b> Quercetina <b>Me3</b> Miricetina <b>Me4</b>	8 10 18
5	70	NE	-
6	40	NE	-
7	142	Quercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -rhamnopiranosose <b>Me5</b> Kaempferol-3- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosose <b>Me6</b> Kaempferol-3- <i>O</i> - $\beta$ -galactopiranosose <b>Me7</b>	12 5 5
8	70	NE	
9	100	Quercetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -xilopiranosose <b>Me8</b>	20
10	12	NE	
11	62	NE	
12	140	(+)-catequina <b>Me9</b> Miricetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -rhamnopiranosose <b>Me10</b> Quercetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -galactopiranosose <b>Me11</b>	30
13	35	NE	
14	122	NE	
15	200	Miricetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -galactopiranosose <b>Me12</b> (+)-galocatequina <b>Me13</b>	20 10
16	79	NE	-
17	541	NE	-



**Figura 4.2.2** – Purificação da fração de flavonóides (F2): A - Purificação em coluna de PVPP (10 cm x 1,0 cm d.i.), FM = Metanol; B - Purificação em coluna de CPG - Sephadex LH-20 (70 cm e 3,0 cm d.i.), FM = Metanol; C<sub>1</sub> - Purificação em CLAE (Sílica C<sub>18</sub>, 25 cm x 1 cm x 10 μm), FM = Metanol/H<sub>2</sub>O 45:55 v/v, Fluxo = 2 ml/min; C<sub>2</sub> - Purificação em CLAE (Sílica C<sub>18</sub>, 25 cm x 1 cm x 10 μm), FM = Metanol/H<sub>2</sub>O 35:65 v/v, Fluxo = 2 mL/min.

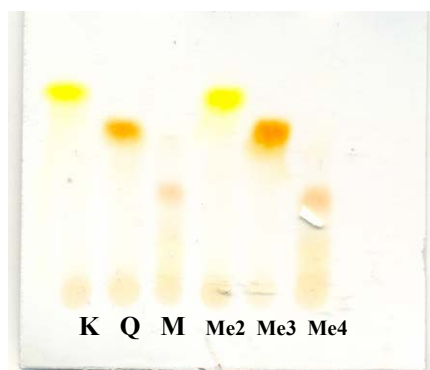
### Identificação de Me1 (Estruturas 1, Espectros 62 a 68)

A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra indicou a presença de um flavonóide denominado **Me1**. O espectro apresentou sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos. O sinal em  $\delta$  7,31 (*d*,  $J=8,5$  Hz) que pode ser atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6' do anel B do flavonóide, outro sinal em  $\delta$  6,79 (*d*,  $J=8,5$  Hz) que pode ser atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5' do anel B do flavonóide. Ainda na região aromática foi possível observar o sinal em  $\delta$  5,85 (*sl*) atribuído aos hidrogênios H-8 e H-6 do anel A. O espectro ainda apresentou sinal em  $\delta$  5,42 (*dd*,  $J=3,0$  e 13,0 Hz) referente a H-2, em  $\delta$  3,23 (*dd*,  $J=13,0$  e 17,0 Hz) referente a H-3<sub>ax</sub>,  $\delta$  2,67 (*dd*,  $J=3,0$  e

17,0 Hz) referente a H-3<sub>eq</sub>. Estes dados levaram à proposta estrutural da Naringenina **Me1**. Os sinais no espectro de RMN de <sup>13</sup>C, juntamente com os experimentos bidimensionais COSY, gHMQC e gHMBC e dados da literatura (Harborne, 1996; Agrawal, 1989) corroboram com a proposta estrutural da Naringenina, **Me1**.

#### Identificação de **Me2**, **Me3** e **Me4** (Estruturas 2)

A purificação de Fr. 4 (60mg) em coluna de Sephadex LH-20 (70cm x 2,0cm d.i.), empregando metanol como fase móvel, resultou no isolamento de três substâncias que apresentaram manchas amareladas quando reveladas com anisaldeído sulfúrico e manchas amarela, alaranjada e avermelhada com NP/PEG. A análise destas substâncias denominadas **Me2**, **Me3** e **Me4** por CCD com CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 80:18:2 v/v/v (**figura 4.2.3**), utilizando padrões permitiu a identificação de Kaempferol **Me2**, Quercetina **Me3** e Miricetina **Me4**, anteriormente isolados de **EMeOH Mp**.



**Figura 4.2.3** - Comparação por CCD das amostras **Me2**, **Me3** e **Me4** com os padrões Kaempferol (K), Quercetina (Q) e Miricetina (M). FM= CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 80:18:2 v/v/v, Revelador=NP/PEG.

### Identificação de Me5 e Me6 (Estruturas 2, Espectro 69)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra indicou a presença de uma substância majoritária, denominada **Me5**. O espectro apresentou sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos, semelhantes aos apresentados pelos derivados de quercetina isolados de *M. pusa*. Adicionalmente, o sinal do próton anomérico foi observado em  $\delta$  5,25 (*d*,  $J=1,0$  Hz), que juntamente com o sinal em  $\delta$  0,82 (*d*,  $J=6,0$  Hz) referente a metila indicam a presença de uma unidade de rhamnose. Análises por CLAE com padrões confirmaram a proposta estrutural da Quercetina-3-*O*- $\alpha$ -rhamnopiranosose, **Me5**.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mesma amostra apresentou ainda, outros sinais de menor intensidade na região de absorção de hidrogênios aromáticos:  $\delta$  8,01 (*d*,  $J=9,0$  Hz, H2' e H6'),  $\delta$  6,85 (*d*,  $J=9,0$  Hz, H3' e H5'),  $\delta$  6,35 (*sl*, H8) e  $\delta$  6,16 (*sl*, H6). Estes dados juntamente com as análises por CLAE confirmaram a proposta estrutural do Kaempferol-3-*O*- $\beta$ -glicopiranosose, **Me6**.

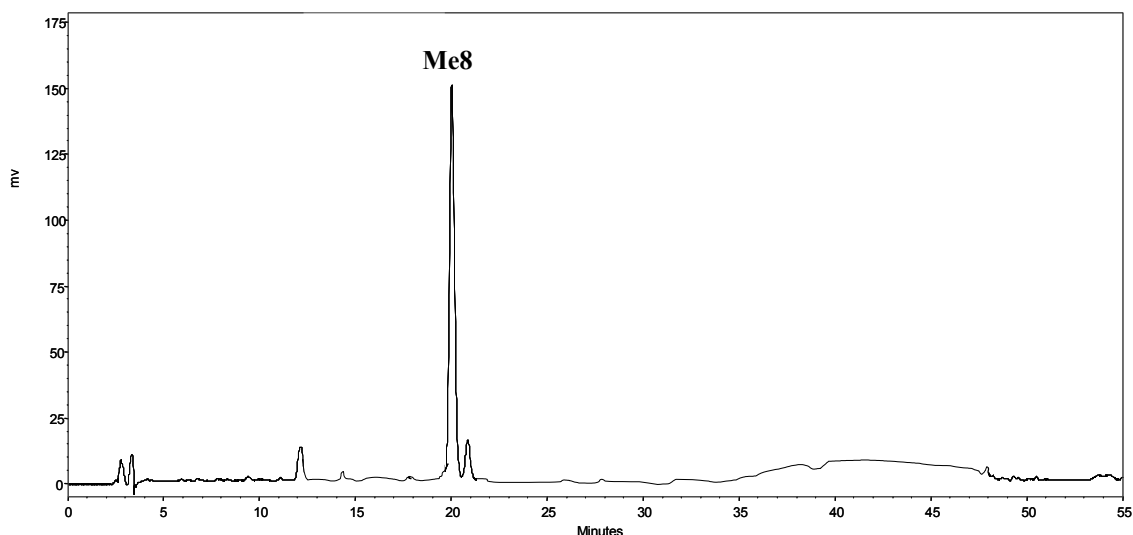
### Identificação de Me7 (Estruturas 2, Espectros 70 e 71)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra indicou a presença de duas substâncias denominadas **Me7** e a já identificada **Me6**. O espectro apresentou sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos característicos do Kaempferol, já descrito anteriormente.

Dois sinais de prótons anoméricos foram observados em  $\delta$  5,40 (*d*,  $J=7,5$  Hz) e  $\delta$  5,32 (*d*,  $J=7,5$  Hz). Um dos protons anoméricos possui deslocamento químico característico da glicose ( $\delta$  5,40) e o outro característico da galactose ( $\delta$  5,30). Estes dados, juntamente com as análises por CLAE, permitiram a identificação do Kaempferol-3-*O*- $\beta$ -glicopiranosose **Me6** e Kaempferol-3-*O*- $\beta$ -galactopiranosose **Me7**.

### Identificação de Me8 (Estruturas 2)

A fração 9 (obtida de **F2**) foi purificada por CLAE, a amostra obtida foi comparada por CLAE-UV-DAD (**Figura 4.2.4**) com flavonóides isolados de *M. pusa*. A análise comparativa permitiu a identificação da Quercetina-3-O- $\beta$ -xilopiranosose **Me8**.

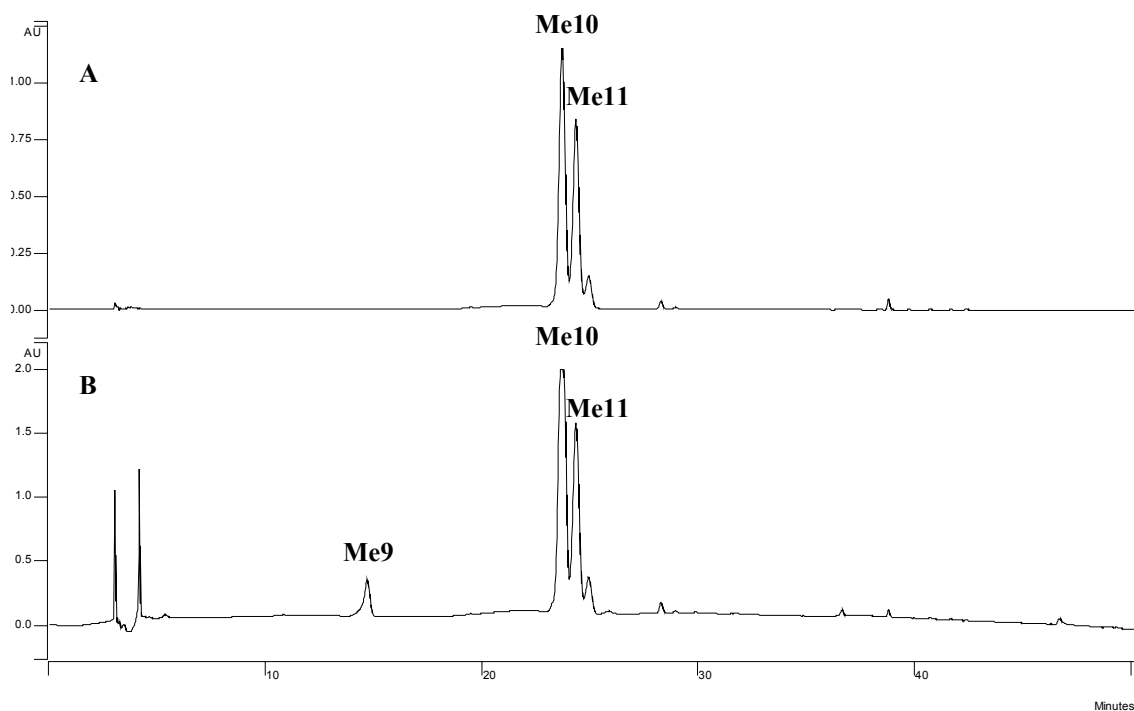


**Figura 4.2.4** – Análise por CLAE-UV-DAD da quercetina-3-O- $\beta$ -xilopiranosose, **Me8** (TR=20,28 min,  $\lambda=360\text{nm}$ ). Coluna Phenomenex. Fase móvel: água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificados com 0,05% de TFA. Gradiente: 23-50 %B (40 min), 50-100 %B (10min) e 100 %B (5 min), com tempo total de análise de 55 min, Fluxo = 1mL/min.

### Identificação de Me9, Me10 e Me11 (Estruturas 2)

A fração 12 (obtida de **F2**) foi comparada por CLAE-UV-DAD (**figura 4.2.5**) com padrões comerciais de catequinas e flavonóides isolados de *M. pusa*. Estas análises levaram a identificação na amostra de (+)-catequina (**Me9**), miricetina-3-O-rhamnopiranosose (**Me10**) e quercetina-3-O-galactopiranosose (**Me11**).





**Figura 4.2.5** – Análises por CLAE-UV-DAD da (+)-catequina **Me9** (TR=14,75 min), miricetina-3-*O*- $\alpha$ -rhamnopyranose **Me10** (TR=23,91 min) e quercetina-3-*O*- $\beta$ -galactopyranose **Me11** (TR=24,38 min). Coluna Phenomenex; Fase móvel: água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificados com 0,05% de TFA. O gradiente usado foi 10-20 %B (20 min), 20-40 %B (20min), 40-100 %B (10 min) e 100 %B (5 min), com tempo total de análise de 55 min; A- observação em 210 nm; B – observação em 360 nm; Fluxo = 1mL/min.

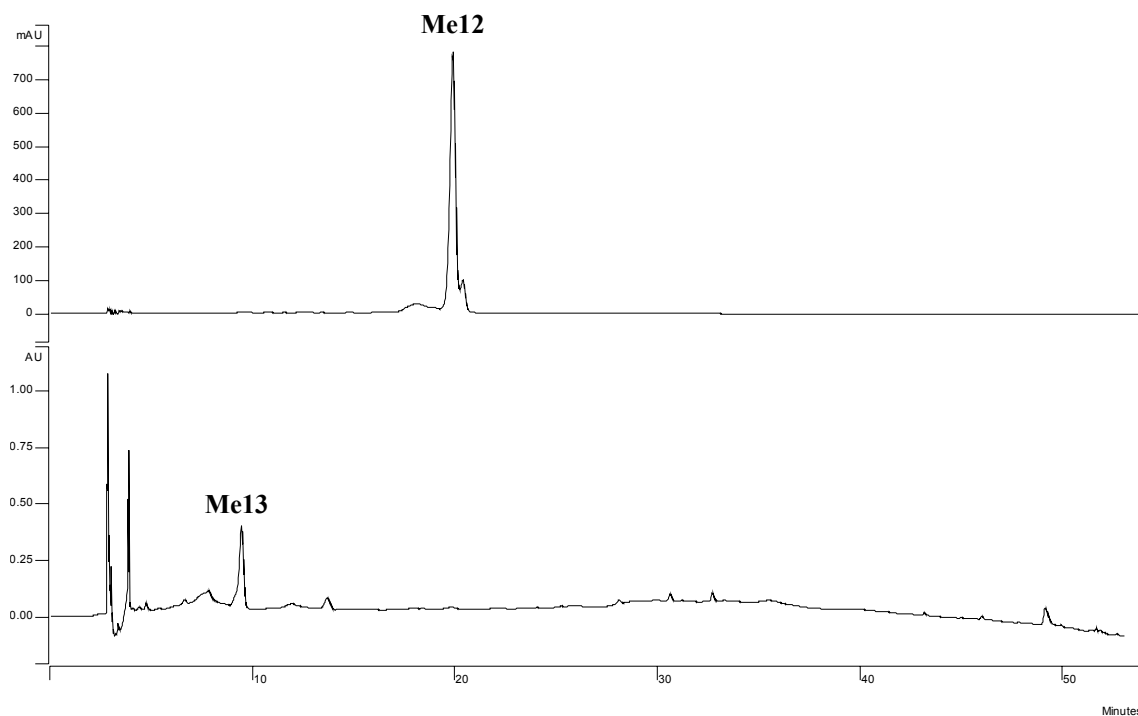
### Identificação de Me12 e Me13 (Estruturas 1 e 2, Espectro 72)

A fração 15 (obtida de **F2**) foi purificada por CLAE, conforme descrito na página 52. Deste processo resultaram duas amostras denominadas **Me12** e **Me13**.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Me13** apresentou sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos, característicos de catequinas:  $\delta$  6,35 *s* (H2' e H6'),  $\delta$  5,87 *d* (2 Hz, H8) e  $\delta$  5,70 *d* (2 Hz, H6). Apresentando também sinais em  $\delta$  4,64 *s* (H2), 3,97 *sl* (H3), 2,67 *dd*, (4 e 16 Hz, H-4<sub>ax</sub>) e 2,48 *dd*, (4 e 16 Hz, H4<sub>eq</sub>). Estes dados comparados aos da literatura (Harborne, 1996) indicaram a identificação da galocatequina.

A amostra **Me13** foi submetida a análise por polarimetria, na concentração de 0,100 p/v, sendo realizadas 3 leituras. Foi obtido  $[\alpha]_d^{25} = +48,3$ , indicando que a amostra temos a (+)-galocatequina.

Em seguida, as amostras **Me12** e **Me13** foram comparadas por CLAE-UV-DAD (figura 4.2.6) com o padrão comercial de (+)-galocatequina e o flavonóide miricetina-3-*O*- $\beta$ -galactopiranosose isolado de *M. pusa*. Estas análises permitiram a confirmação da (+)-galocatequina (**Me13**) e da miricetina-3-*O*- $\beta$ -galactopiranosose (**Me12**).

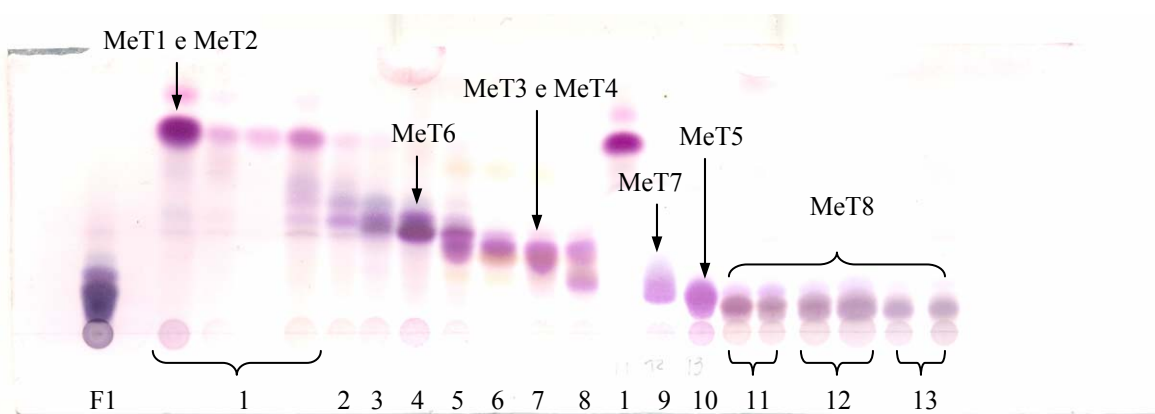


**Figura 4.2.6** – Análises por CLAE-UV-DAD da miricetina-3-*O*- $\beta$ -galactopiranosose **Me12** (TR=20,29 min,  $\lambda$ =360 nm) e (+)-galocatequina **Me13** (TR=9,85 min,  $\lambda$ =210 nm). Coluna Phenomenex. Fase móvel: água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificados com 0,05% de TFA. O gradiente usado foi 10-20 %B (20 min), 20-40 %B (20min), 40-100 %B (10 min) e 100% %B (5 min), com tempo total de análise de 55 min; Fluxo = 1mL/min.

### Isolamento e identificação dos triterpenos

Através da metodologia de obtenção das frações enriquecidas, foi obtida também uma fração rica em terpenos (F1) a partir de **EMeOH Me**, cuja massa mostrou-se bastante significativa ( 1,0 g), representando 50% da **FAcOEt**.

A fração **F1** (1 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico por *DCCC*. O fracionamento foi realizado com fase estacionária composta pela fase superior da mistura de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  43:37:20 v/v/v e fase inferior como fase móvel. Obtiveram-se 200 frações de 10 mL cada, as quais foram reunidas em 13 grupos de frações após análises cromatográficas por CCD, utilizando como fase móvel a fase inferior da mistura de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{n-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$  5:6:1:4 v/v/v/v (**Figura 4.2.7**; **Tabela 4.2.3**).



**Figura 4.2.7** – Análise por CCD das frações obtidas de **F1** por *DCCC*. Silica;  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{n-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$  5:6:1:4 v/v/v/v; Revelador: Anisaldeído sulfúrico.

**Tabela 4.2.3 - Frações obtidas após fracionamento de F1 por DCCC**

Frações	Massa (mg)	Substância isolada ou identificada	Massa (mg)
1	180	MeT1/MeT2	37
2	54	Não Estudado (NE)	-
3	15	NE	-
4	120	MeT6	15
5	70	NE	-
6	5	NE	-
7	145	MeT3/MeT4	25
8	7	NE	-
9	23	MeT7	10
10	86	MeT5	19
11	62	MeT8	15
12	97		
13	29		

**Isolamento e identificação de MeT1 e MeT2**  
(Estruturas 3, Espectros 73 a 80)

A purificação da Fração 1 (obtida de F1, 180 mg) em coluna de Sílica C<sub>18</sub>(15 cm x 1,0 cm d.i.) empregando metanol/água (80:20) como fase móvel resultou no isolamento de uma amostra (37 mg) que apresentou uma única mancha roxa quando revelada com anisaldeído sulfúrico.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H da amostra observaram-se sete sinais referentes a unidades metílicas em  $\delta$ 0,66 s, 0,73 s, 0,80 d (6,5 Hz), 0,85 s, 0,88 s, 0,89 d (6,5 Hz) e 1,02 s, além de outros sinais de menor intensidade nesta região. Também apresentou dois sinais de hidrogênios ligados a carbono sp<sup>2</sup> em  $\delta$ 5,11 (majoritário) e  $\delta$ 5,15 (menor intensidade), indicando assim se tratar de uma mistura de dois compostos.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C da amostra 1 mostrou um total de 30 sinais majoritários (carbonos), além de outros 19 sinais de menor intensidade. Os experimentos de DEPT 135° e 90° permitiram identificar os sinais majoritários como sete grupos metila, nove grupos metilênicos, sete grupos metínicos e sete carbonos quaternários, dois desses carbono sp<sup>2</sup> ( $\delta$ 124,61 e  $\delta$ 138,25). Os sinais minoritários foram identificados como seis grupos metila, oito grupos metilênicos, três grupos metínicos e dois carbonos quaternários, sendo dois de carbono sp<sup>2</sup> ( $\delta$ 121,54 e  $\delta$ 141,72). O conjunto desses

resultados e comparação com dados da literatura sugeriu a presença de um triterpeno com esqueleto  $\Delta^{12}$ -ursano (majoritário), denominado **MeT1**, e um triterpeno com esqueleto  $\Delta^{12}$ -oleanano (minoritário), denominado **MeT2** (Agrawal e Jain, 1991).

Os experimentos *g*HMQC e *g*HMBC permitiram a observação das correlações dos principais grupos das moléculas (posição das metilas, hidroxilas e do grupo ácido carboxílico). Comparação dos deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para os triterpenos com os dados encontrados na literatura (Kojima *et al.*, 1990; Mahato e Kundu, 1994) sugerem que o triterpenóide pentacíclico **MeT1** é o ácido  $3\beta$ -hidroxiursan-12-en-28-óico (ácido ursólico) e **MeT2** é o ácido  $3\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-óico (ácido oleanólico)

#### Isolamento e identificação de MeT3 e MeT4 (Estruturas 3, Espectros 81 a 87)

Purificação da fração 7 (145 mg) em coluna de Sílica C<sub>18</sub>(15 cm x 1,0 cm d.i.) empregando metanol/água (80:20) como fase móvel resultou no isolamento de uma amostra (25 mg) que apresentou uma única mancha roxa quando revelada com anisaldeído sulfúrico.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  da amostra observaram-se seis sinais referentes a unidades metílicas em  $\delta$  0,53 *s*, 0,73 *s*, 0,80 *d* (6,5 Hz), 0,86 *s*, 0,90 *s* e 1,03 *s*, além de outros sinais de menor intensidade nesta região. Também apresentou dois sinais de hidrogênios ligados a carbono  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  5,15 (majoritário) e  $\delta$  5,18 (menor intensidade), indicando assim tratar-se de uma mistura de duas substâncias.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da amostra apresentou um total de 30 sinais majoritários (carbonos), além de outros 20 sinais de menor intensidade. Os experimentos DEPT 135° e 90° permitiram identificar os sinais majoritários como seis grupos metílicos, dez grupos metilênicos, sete grupos metínicos e sete carbonos quaternários, dois desses de carbono  $\text{sp}^2$  ( $\delta$ 124,6 e  $\delta$ 138,3). Os sinais minoritários foram identificados como seis grupos metílicos, oito grupos metilênicos, três grupos metínicos e dois carbonos

quaternários, sendo dois sinais de carbono  $sp^2$  ( $\delta$ 121,5 e  $\delta$ 141,7). O conjunto desse dados e comparação com a literatura sugeriu a presença de um triterpeno- $\Delta^{12}$ -ursano (majoritário) denominado **MeT3** e um triterpeno- $\Delta^{12}$ -oleanano (minoritário) denominado **MeT4** (Agrawal e Jain, 1991).

Os sinais dos carbonos em  $\delta$  64,0,  $\delta$ 67,4 e  $\delta$ 75,6 sugerem a presença de três grupos carbinólicos, com suas multiplicidades definidas pelos experimentos DEPT 90° e 135° como dois grupos metínicos e um grupo carbinólico metilênico. Comparação com dados da literatura permitiu atribuir estes sinais aos carbonos C23, C2 e C3, respectivamente, nas duas moléculas (Kojima, 1989; Mahato e Kundu, 1994).

Os experimentos gHMQC e gHMBC permitiram a observação das correlações dos principais grupos das moléculas (posição das metilas, hidroxilas e do grupo ácido carboxílico). Comparação dos deslocamentos químicos de RMN  $H^1$  e  $^{13}C$  obtidos para os triterpenos com os dados encontrados na literatura (Kojima *et al.*, 1990; Mahato e Kundu, 1994) sugerem que o triterpenóide pentacíclico **MeT3** é o ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-triidroxiursan-12-en-28-óico e **MeT4** é o ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-triidroxiolean-12-en-28-óico.

#### Isolamento e identificação de MeT5 (Estruturas 3, Espectros 88 a 96)

A purificação de fração 10 (86 mg) em coluna de Sílica C<sub>18</sub> (15 cm x 1,0 cm d.i.) empregando metanol/água (70:30) como fase móvel, resultou no isolamento de uma amostra (19 mg) que apresentou uma única mancha roxa quando revelada com anisaldeído sulfúrico.

No espectro de RMN  $^1H$  da amostra observaram-se sete sinais referentes a unidades metílicas em  $\delta$  0,70 s, 0,71 s, 0,85 d (6,5 Hz), 0,91 s, 0,93 s, 1,08 s e 1,29 s, além de outros sinais de menor intensidade nesta região. Também apresentou um sinal majoritário de hidrogênio ligado a carbono  $sp^2$  em  $\delta$  5,18, indicando assim tratar-se de uma substância majoritária em mistura com outros contaminantes.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da amostra evidenciou um total de 30 sinais majoritários. Os experimentos de DEPT  $135^\circ$  e  $90^\circ$  permitiram identificar os sinais majoritários como sete grupos metílicos, oito grupos metilênicos, sete grupos metínicos e oito carbonos quaternários, dois desses carbonos  $\text{sp}^2$  ( $\delta 126,7$  e  $\delta 138,6$ ), sugerindo a presença de um triterpeno com esqueleto  $\Delta^{12}$ -ursano denominado **MeT5** (Agrawal e Jain, 1991).

Os sinais dos carbonos em  $\delta 67,1$ ,  $71,6$  e  $82,3$  sugerem a presença de três grupos carbinólicos, com suas multiplicidades definidas pelos experimentos de DEPT  $90^\circ$  e  $135^\circ$  como sendo dois grupos metínicos e um grupo carbinólico quaternário. Estes sinais foram atribuído aos carbonos C2, C19 e C3, respectivamente (Agrawal e Jain, 1991).

Os experimentos gHMQC e gHMBC permitiram a observação das correlações dos principais grupos das moléculas (posição das metilas, hidroxilas e do grupo ácido carboxílico). Comparação dos deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para o triterpeno com os dados da literatura (Jossang *et al.*, 1996) sugerem que o triterpenóide pentacíclico **MeT5** é o ácido  $2\alpha,3\beta,19$ -trihidroxiursan-12-en-28-óico.

#### Isolamento e identificação de **MeT6** (Estruturas 3, Espectros 97 a 105)

A purificação de fração 4 (120 mg) em coluna de Sílica  $\text{C}_{18}$  (15 cm x 1,0 cm d.i.) empregando metanol/água (80:20) como fase móvel resultou no isolamento de uma amostra (15 mg) que apresentou uma única mancha roxa quando revelada com anisaldeído sulfúrico.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  da amostra foram observados sete sinais referentes a unidades metílicas em  $\delta 0,69$  s,  $0,73$  s,  $\delta 0,80$  d (6,5 Hz),  $0,80$  s,  $0,90$  s,  $0,91$  s e  $1,02$  s, além de outros sinais de menor intensidade nesta região. Também apresentou um sinal de hidrogênio ligado a carbono  $\text{sp}^2$  em  $\delta 5,12$ .

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da fração mostrou um total de 30 sinais majoritários (carbonos). Os experimentos DEPT  $135^\circ$  e  $90^\circ$  permitiram identificar os sinais

majoritários como sete grupos metílicos, oito grupos metilênicos, oito grupos metínicos e sete carbonos quaternários, dois deles de carbono  $sp^2$  ( $\delta$ 124,4 e  $\delta$ 138,3). Estes dados sugeriram a presença de um triterpeno- $\Delta^{12}$ -ursano denominado **MeT6** (Agrawal e Jain, 1991).

Os sinais de carbono em  $\delta$  67,2 e 82,3 sugerem a presença de dois grupos carbinólicos, com suas multiplicidades definidas pelo experimento de DEPT 135° como sendo dois grupos carbinólicos metilênicos. O sinal foi atribuído aos carbonos C2 e C3, respectivamente.

Os experimentos gHMQC e gHMBC permitiram a observação das correlações dos principais grupos das moléculas (posição das metilas, hidroxilas e do grupo ácido carboxílico). A comparação dos deslocamentos químicos de RMN  $H^1$  e  $^{13}C$  obtidos para o triterpeno com os dados da literatura (Kojima, 1989; Mahato e Kundu, 1994) sugerem que o triterpenóide pentacíclico **MeT6** é o ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diidroxursan-12-en-28-óico.

#### Isolamento e identificação de MeT7 (Estruturas 3, Espectros 106 a 114)

A purificação de fração 9 (23 mg) em coluna de Sílica  $C_{18}$ (15 cm x 1,0 cm d.i.) empregando metanol/água (80:20) como fase móvel resultou no isolamento de uma amostra (10 mg) que apresentou uma única mancha roxa quando revelada com anisaldeído sulfúrico

O espectro de RMN  $^1H$  da amostra apresentou seis sinais referentes a unidades metílicas em  $\delta$  0,72 *s*, 0,82 *d* (6,5 Hz), 0,91 *s*, 0,92 *s*, 1,04 *s* e 1.09 *s*, além de outros sinais de menor intensidade nesta região. Também apresentou sinal de hidrogênio ligado a carbono  $sp^2$  em  $\delta$ 5,13.

O espectro de RMN  $^{13}C$  da amostra apresentou um total de 30 sinais majoritários, além de outros sinais de menor intensidade. Os experimentos DEPT 135° e 90° permitiram identificar os sinais majoritários como seis grupos metílicos, nove grupos



metilênicos, oito grupos metínicos e sete carbonos quaternários, dois desses de carbono  $sp^2$  ( $\delta$  124,4 e 138,2), sugerindo a presença de um triterpeno- $\Delta^{12}$ -ursano denominado **MeT7** (Agrawal e Jain, 1991).

Os sinais dos carbonos em  $\delta$  63,8, 66,9 e 83,8 sugerem a presença de três grupos carbinólicos, com suas multiplicidades definidas pelos experimentos DEPT 90° e 135°, como dois grupos metínicos e um grupo carbinólico metilênico. Estes sinais foram atribuído aos carbonos C24, C2 e C3, respectivamente.

Os experimentos gHMQC e gHMBC permitiram a observação das correlações dos principais grupos das moléculas (posição das metilas, hidroxilas e do grupo ácido). A comparação dos deslocamentos químicos de RMN  $H^1$  e  $^{13}C$  obtidos para os triterpenos com os dados da literatura (Kojima *et al.*, 1990; Mahato e Kundu, 1994) sugerem que o triterpenóide pentacíclico **MeT7** é o ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,24-triidroxiursan-12-en-28-óico

#### Isolamento e identificação de **MeT8** (Estruturas 3, Espectros 115 a 126)

As frações 11, 12 e 13 (188 mg) foram reunidas e purificadas em coluna de Sílica C<sub>18</sub>(15 cm x 1,0 cm d.i.) empregando metanol/água (70:30) como fase móvel resultou no isolamento de uma amostra (15 mg) que apresentou uma única mancha roxa quando revelada com anisaldeído sulfúrico.

O espectro de RMN  $^1H$  da amostra apresentou seis sinais referentes a unidades metílicas em  $\delta$  0,55 s, 0,70 s, 0,84 d (7,0 Hz), 0,92 s, 1,08 s e 1,29 s, além de outros sinais de menor intensidade nesta região. Também apresentou um sinal majoritário de hidrogênio ligado a carbono  $sp^2$  em  $\delta$  5,17, indicando assim se tratar de uma substância majoritária em mistura com outros contaminantes.

O espectro de RMN  $^{13}C$  da amostra purificada mostrou um total de 30 sinais majoritários (carbonos), além de outros sinais de menor intensidade, considerados como contaminantes. Os experimentos DEPT 135° e 90° permitiram identificar os sinais

majoritários como seis grupos metílicos, nove grupos metilênicos, sete grupos metínicos e oito carbonos quaternários, dois desses de carbono  $sp^2$  ( $\delta$ 126,7 e 138,6). Sugerindo a presença de um triterpeno- $\Delta^{12}$ -ursano (majoritário) denominado **MeT8** (Agrawal e Jain, 1991).

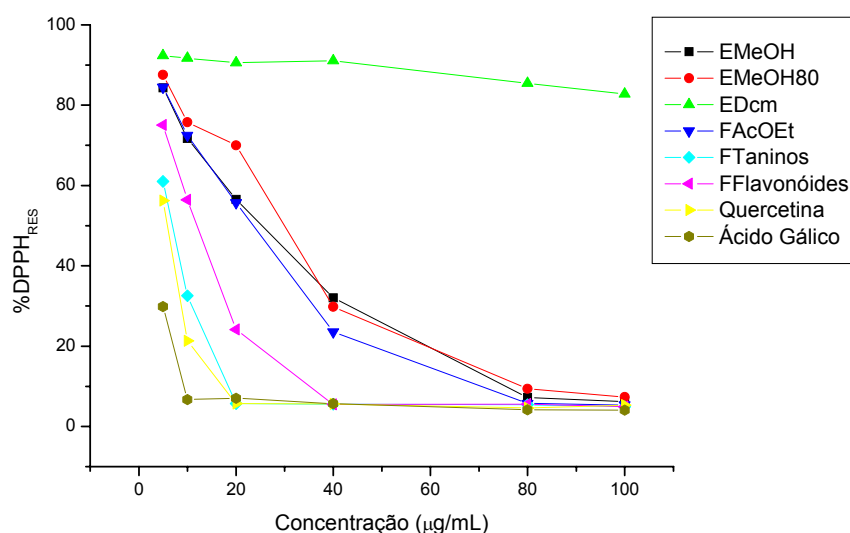
Os sinais dos carbonos em  $\delta$ 63,9, 67,4, 71,6 e 75,6 sugeriram a presença de quatro grupos carbinólicos, com suas multiplicidades definidas pelos experimentos DEPT 90° e 135° como um grupo metilênico, dois grupos metínicos e um grupo carbinólico quaternário. Estes sinais foram atribuídos aos carbonos C23, C2, C19 e C3, respectivamente.

Os experimentos gHMQC e gHMBC permitiram a observação das correlações dos principais grupos das moléculas (posição das metilas, hidroxilas e do grupo ácido carbox). A comparação dos deslocamentos químicos de RMN  $H^1$  e  $^{13}C$  obtidos para o triterpeno com os dados da literatura (Jossang et al., 1996) sugerem que o triterpenóide pentacíclico **MeT8** é o ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19, 23-tetraidroxiursan-12-en-28-óico.

### Atividade anti-oxidante

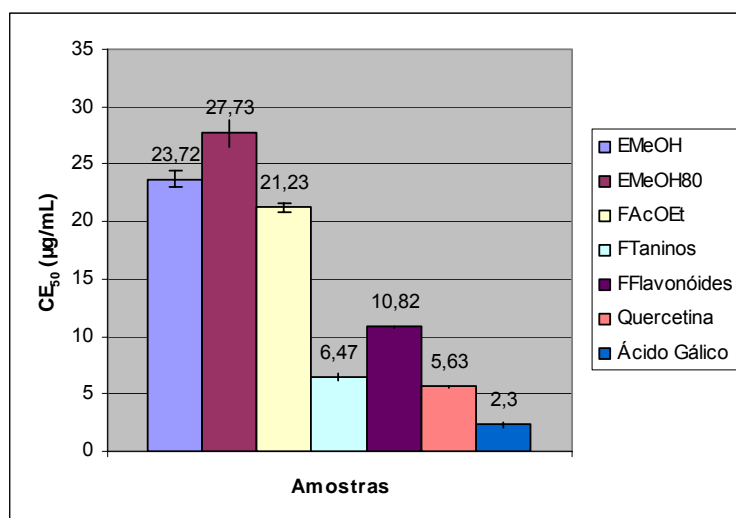
Para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos e frações foi utilizado o ensaio espectrofotométrico utilizando o radical livre DPPH, conforme metodologia descrita anteriormente para *M. pusa*, tendo como controle positivo quercetina e ácido gálico. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata.

A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorbância para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH restante (% DPPH<sub>RES</sub>) (**figura 4.2.8**).



**Figura 4.2.8** – Porcentagens de DPPH restante dos extratos e frações das folhas de *M. elliptica*.

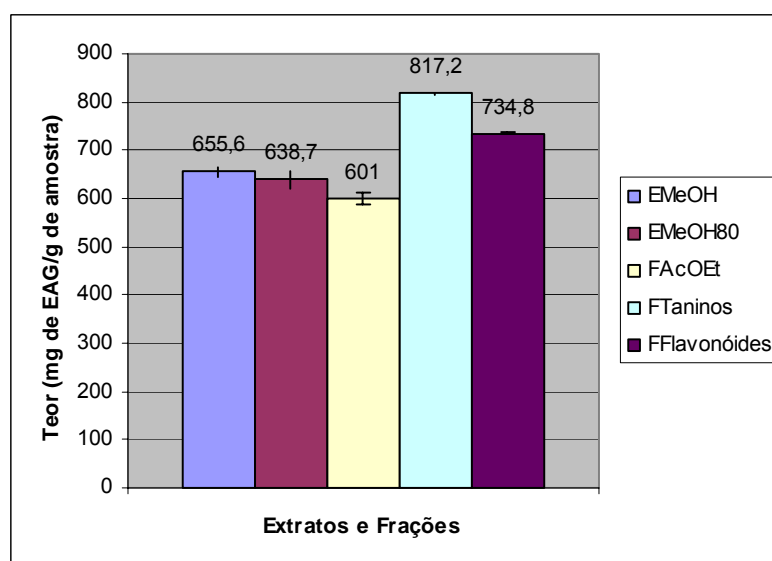
A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE<sub>50</sub>), foi determinada usando o programa Microcal Origin 7.0, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se na abscissa as concentrações da amostra (µg/mL) ou do controle positivo e na ordenada, a porcentagem de DPPH restante (**figura 4.2.9**).



**Figura 4.2.9** – Concentração eficiente (CE<sub>50</sub>) dos extratos e frações das folhas de *M. elliptica*: Controle positivo = quercetina e ácido gálico.

### Fenóis totais

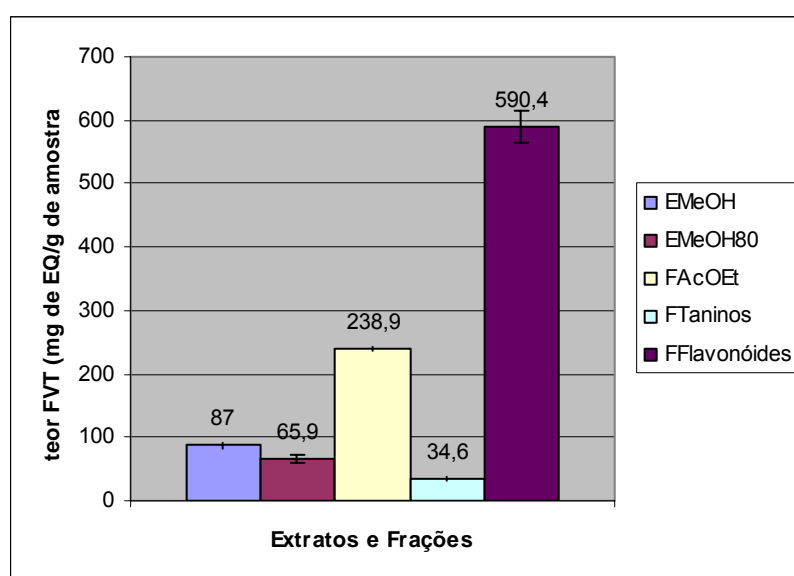
A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extratos e frações das folhas de *M. elliptica* foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu, conforme metodologia usada para *M. pusa*. Todas as análises foram realizadas em triplicata (**figura 4.2.10**).



**Figura 4.2.10** – Teor de fenóis totais dos extratos e frações das folhas de *M. elliptica*, expressos em mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.

## Flavonóides totais

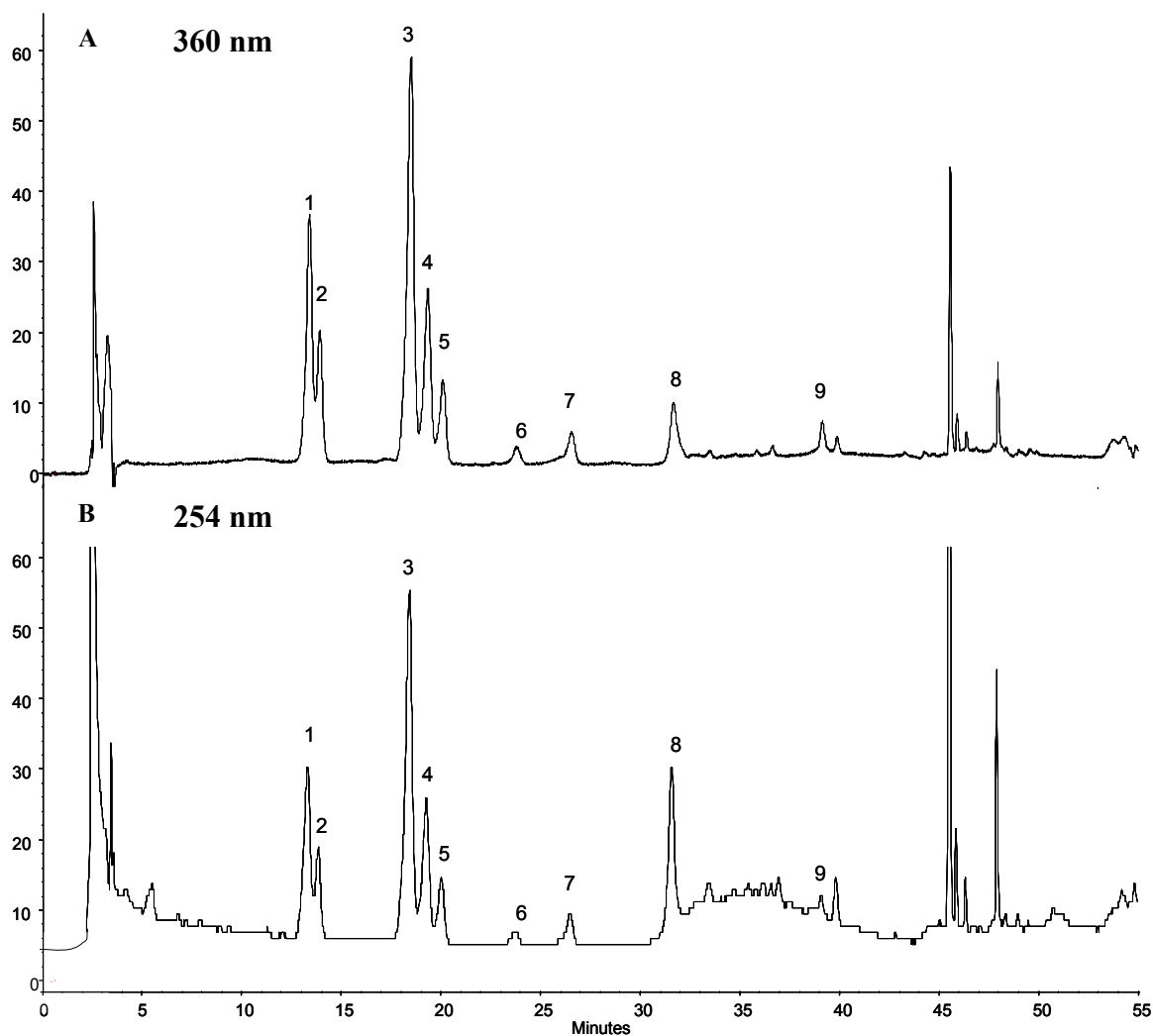
O teor de flavonóides totais presentes nos extratos e frações das folhas de *M. elliptica* foi determinado pela mesma técnica aplicada para as amostras de *M. pusa*. O teor de flavonóides totais (FVT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração construída com soluções de quercetina e expressos como mg de EQ (equivalentes de quercetina) por g de amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata (**figura 4.2.11**).



**Figura 4.2.11** – Teor de flavonóides totais nos extratos e frações das folhas de *M. elliptica*, expressos como mg de EQ (equivalentes de quercetina) por g de amostra.

### Quantificações por CLAE-UV-DAD

O extrato **EMeOH Me** foi analisado por CLAE para a identificação do perfil cromatográfico dos flavonóides isolados anteriormente aplicando-se a mesma metodologia utilizada para *M. pusa*. Os resultados são mostrados na **figura 4.2.12**.



**Figura 4.2.12** – Cromatogramas do extrato **EMeOH Me**: 1-Miricetina-3-O- $\beta$ -galactopiranosse (TR=13,56); 2-Miricetina-3-O- $\beta$ -glicopiranosse (TR=14,09); 3-Miricetina-3-O- $\alpha$ -rhamnopiranosse (TR=18,74); 4-Quercetina-3-O- $\beta$ -galactopiranosse (TR=19,61); 5-Quercetina-3-O- $\beta$ -xilopiranosse (TR=20,38); 6-Kaempferol-3-O- $\beta$ -galactopiranosse e Kaempferol-3-O- $\beta$ -glicopiranosse (TR=24,13); 7- Quercetina-3-O- $\alpha$ -rhamnopiranosse (TR=26,88); 8-Miricetina (TR=31,93); 9- Quercetina (TR=39,43).

No cromatograma B (254 nm) foi observado a presença de taninos hidrolizáveis, que eluem praticamente no volume morto da coluna, caracterizados pelos espectros de UV semelhantes aos observados para o ácido ellágico. Também foi verificada presença de derivados de ácido ellágico, com tempo de retenção acima de 45 min. Os taninos condensados aparecem em menor quantidade quando comparados com os resultados de *M. pusa*.

A etapa seguinte, foi a quantificação dos flavonóides majoritários do extrato **EMeOH Me**, sendo para isso reproduzida a metodologia usada para *M. pusa*. Os teores encontrados estão mostrados na **tabela 4.2.4** e estão expressos em mg/g das respectivas agliconas.

**Tabela 4.2.4** – Teor dos flavonóides majoritários de *Mouriri elliptica*.

<b>Flavonóides</b>	<b>Teor (mg/g de EMeOH Me)<sup>a</sup></b>
Miricetina	1,5
Miricetina-3-O- $\beta$ -galactopiranosose	8,3
Miricetina-3-O- $\beta$ -glicopiranosose	5,2
Miricetina-3-O- $\alpha$ -rhamnopiranosose	14,2
Quercetina-3-O- $\beta$ -galactopiranosose	5,5
Quercetina-3-O- $\beta$ -xilopiranosose	2,6
Quercetina-3-O- $\alpha$ -rhamnopiranosose	0,9
<b>Total de flavonóides</b>	<b>38,2</b>

<sup>a</sup> Teor de flavonóides determinado por CLAE-UV-DAD.

#### 4.2.2 ESTUDO BIOLÓGICO

Assim como realizado com os extratos de *M. pusa*, complementando o estudo químico, foram realizados ensaios de toxicidade aguda, mutagenicidade e atividade antiulcerogênica com extratos e frações enriquecidas de *M. elliptica*. Para os ensaios farmacológicos foram utilizados: **EDcm** e **EMeOH** de *M. elliptica*, **FH<sub>2</sub>O** (fração rica em taninos, obtida de acordo com o texto, página 50) e **F2** (fração rica em flavonóides, obtida de acordo com o texto, página 50).

##### **Toxicidade aguda**

No teste de toxicidade aguda, de acordo com análises estatísticas (teste t de Student) dos valores obtidos com a pesagem dos animais e de seus órgãos vitais (coração, pulmão, fígado, baço e rins) constatou-se que as diferenças não foram significativas entre os animais tratados e não tratados. Tampouco foi observada qualquer variação comportamental dos animais. Não foram registrados óbitos durante o período de observação, indicando ausência de toxicidade por parte dos extratos e frações nesses parâmetros.

##### **Atividade antiulcerogênica**

Através dos ensaios realizados, foi observado que o extrato **EDcm Me** não apresentou atividade antiulcerogênica frente aos modelos utilizados, além disso foi observado o efeito gastroprotetor do **EMeOH Me** em praticamente todos os modelos experimentais utilizados. O **EMeOH Me** apresentou predominantemente envolvimento com grupamentos sulfidrílicos e não existe atuação de NO na sua ação gastroprotetora. Além disso, o **EMeOH Me** não alterou a motilidade intestinal e foi considerada pouco tóxica no ensaio de toxicidade aguda (5 g/Kg).



A fração **F2** foi submetida a ensaios de gastroproteção, já que esta fração concentra os flavonóides e as catequinas, principais substâncias identificadas nesse estudo, além de possuírem conhecida atividade antiúlcera. Sabendo que estas substâncias estão em maior concentração na fração, esperávamos que a atividade encontrada para esta fração fosse mais significativa do que a encontrada para o extrato.

No modelo de indução de úlceras por etanol absoluto, a fração **F2** conferiu gastroproteção de 68% na dose de 50 mg/Kg e 54% na dose de 100 mg/Kg, quando comparada com o **EMeOH Me** essa fração mostrou-se mais ativa.

No modelo de indução de úlcera por drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINE), a fração **F2** conferiu gastroproteção de 57 % na dose de 100 mg/Kg, sendo mais efetiva que o **EMeOH Me**.

**Tabela 4.2.5** – Ensaios farmacológicos com extratos e frações das folhas de *M. elliptica*

MODELO	EXTRATO/FRAÇÃO	DOSES <sup>a</sup> / ESTATÍSTICA	PROTEÇÃO (%)
EtOH absoluto	<b>EDcm Me</b>	250; 500; 1000	13; 21; 20
HCl / Etanol	<b>EDcm Me</b>	250; 500; 1000	07; 09; 14
Piroxicam	<b>EDcm Me</b>	250; 500; 1000	16; 16; 21
EtOH absoluto	<b>EMeOH Me</b>	125; 250**; 500**	41; 58**; 71**
HCl / Etanol	<b>EMeOH Me</b>	125; 250; 500**	17; 10; 54**
Piroxicam	<b>EMeOH Me</b>	125* ; 250; 500*	51*; 39; 52*
NO	<b>EMeOH Me</b>	Ausência de envolvimento com NO	-
Sulfidrila	<b>EMeOH Me</b>	Envolvimento com sulfidrila*	-
Toxicidade	<b>EMeOH Me</b>	Toxicidade ausente (5g/kg)	-
Motilidade	<b>EMeOH Me</b>	Ausência de alteração	-
EtOH absoluto	<b>F2</b>	25; 50**; 100*	33; 68**; 54*
Piroxicam	<b>F2</b>	25; 50; 100*	19; 19; 57*

ANOVA- Teste de Dunnett- \*p<0,05 e \*\*p<0,01 - representa as diferenças significativas obtidas em relação aos respectivos grupos controle.; <sup>a</sup>doses em mg/Kg

## Mutagenicidade

De acordo com a **Tabela 4.2.6**, foi constatado que o **EMeOH Me** apresentou atividade mutagênica na linhagem TA97a na ausência de metabolização. Na linhagem TA98, foram observados apenas potencial mutagenico. Quanto ao extrato **EDcm Me**, observou-se ausência de mutagenicidade. Quando os ensaios foram realizados em presença de metabolização, foi verificado que o **EMeOH Me** apresentou atividade mutagênica positiva nas linhagens TA98 e TA102. Já para **EDcm Me** a mutagenicidade foi negativa em todas as linhagens.

**Tabela 4.2.6** - Atividade mutagênica dos extratos das folhas de *M. elliptica* em linhagens de *S. typhimurium* na ausência e na presença de metabolização.

Ensaio	Tratamento (mg/placa)	TA98	TA100	TA97a	TA102
Ausência de metabolização	<b>EDcm Me</b>				
	<b>DMSO</b>	22 ± 2	145 ± 4	361 ± 15	112 ± 4
	<b>1,7</b>	21 ± 6 (1,0)	141 ± 8 (1,0)	381 ± 10 (1,1)	127 ± 5 (1,1)
	<b>3,4</b>	20 ± 2 (0,9)	136 ± 4 (0,9)	403 ± 15 (1,1)	132 ± 4 (1,2)
	<b>6,9</b>	26 ± 6 (1,2)	139 ± 4 (1,0)	425 ± 10 (1,2)	139 ± 3 (1,2)
	<b>10,3</b>	20 ± 2 (0,9)	148 ± 3 (1,0)	438 ± 8 (1,2)	151 ± 3 (1,3)
	<b>13,8</b>	16 ± 3 (0,7)	124 ± 9 (0,9)	401 ± 8 (1,1)	138 ± 6 (1,2)
	<b>EMeOH Me</b>				
	<b>DMSO</b>	19 ± 1	116 ± 8	321 ± 10	112 ± 4
	<b>2,84</b>	20 ± 2 (1,1)	100 ± 8 (0,9)	434 ± 27(1,4)	156 ± 12 (1,4) **
	<b>5,7</b>	33 ± 4 (1,7) *	103 ± 10 (0,9)	372 ± 13 (1,1)	171 ± 3 (1,5) **
	<b>11,3</b>	35 ± 4 (1,8) **	124 ± 6 (1,1)	353 ± 15 (1,1)	193 ± 6 (1,7) **
	<b>17,02</b>	28 ± 3 (1,5) *	152 ± 7 (1,3)	363 ± 8 (1,1)	222 ± 5 (2,0) **
	<b>22,7</b>	13 ± 7 (0,7)	147 ± 6 (1,3)	351 ± 9 (1,1)	253 ± 6 (2,3) **
	<b>Ctrol +</b>	791 ± 61 <sup>a</sup>	1589 ± 180 <sup>b</sup>	927 ± 82 <sup>c</sup>	1107 ± 82 <sup>d</sup>
	Presença de metabolização	<b>EDcm Me</b>			
<b>DMSO</b>		20 ± 3	116 ± 1	375 ± 12	146 ± 16
<b>1,7</b>		21 ± 3 (1,1)	123 ± 4 (1,1)	468 ± 6 (1,2)	201 ± 11 (1,4)
<b>3,4</b>		18 ± 3 (0,9)	125 ± 5 (1,1)	464 ± 12 (1,2)	191 ± 9 (1,3)
<b>6,9</b>		21 ± 3 (1,1)	129 ± 3 (1,1)	455 ± 20 (1,2)	175 ± 15 (1,2)
<b>10,3</b>		22 ± 3 (1,1)	113 ± 2 (1,0)	487 ± 15 (1,3)	174 ± 12 (1,2)
<b>13,8</b>		22 ± 1 (1,1)	140 ± 6 (1,2)	339 ± 15 (0,9)	172 ± 10 (1,2)
<b>EMeOH Me</b>					
<b>DMSO</b>		20 ± 3	116 ± 1	375 ± 12	146 ± 16
<b>2,84</b>		23 ± 3 (1,2) <sup>a</sup>	138 ± 8 (1,2)	406 ± 3 (1,1)	175 ± 11 (1,2)
<b>5,7</b>		28 ± 4 (1,4)	132 ± 4 (1,1)	476 ± 7 (1,3)	219 ± 12** (1,5)
<b>11,3</b>		30 ± 3 (1,5)	125 ± 3 (1,1)	444 ± 20 (1,2)	212 ± 5** (1,5)
<b>17,02</b>		39 ± 2 (2,0)**	125 ± 6 (1,1)	422 ± 12 (1,1)	252 ± 10** (1,7)
<b>22,7</b>		40 ± 2 (2,0)**	127 ± 2 (1,1)	422 ± 11 (1,1)	290 ± 7** (2,0)
<b>Ctrol +</b>		1616 ± 76 <sup>a</sup>	1079 ± 106 <sup>b</sup>	907 ± 103 <sup>c</sup>	2859 ± 161 <sup>d</sup>

na = não avaliado; M±SD (RM) = média ± desvio padrão; \* = significância a 5 %; \*\* = significância a 1%  
 controle +: <sup>a</sup>TA98 = NDP (10µg/placa); <sup>b</sup>TA100 = azida sódica (5,0µg/placa); <sup>c</sup>TA97a = NPD (10µg/placa); <sup>d</sup>TA102 = mitomicina (0,25µg/placa). Valores entre parênteses representam as razões de mutagenicidade (RM)

### 4.3 ANÁLISE COMPARATIVA DAS ESPÉCIES

Os perfis químicos de *M. pusa* e *M. elliptica* apresentam algumas diferenças que podem ser consideradas marcantes. Considerando primeiramente os flavonóides, foi notado que no **EMeOH Mp** predominam os derivados glicosilados da quercetina, enquanto que no **EMeOH Me** predominam os derivados glicosilados de miricetina. A principal diferença entre as espécies parece estar relacionada com as quantidades de cada flavonóide, e neste ponto merece destaque a informação de que *M. pusa* possui maior quantidade de quercetina. A **tabela 4.3.1** relaciona os flavonóides encontrados em *M. pusa* e *M. elliptica*.

**Tabela 4.3.1:** Flavonóides encontrados em *M. pusa* e/ou *M. elliptica* \*

Flavonóides	<i>M.pusa</i>	<i>M. elliptica</i>
(-)-Epicatequina	X	
(+)-Catequina	X	X
(+)-Galocatequina		X
4',5,6-Trihidroxi-7-metoxiflavona	X	
6,8-Diidroxikaempferol-3-O-β-galactopiranosse	X	
Kaempferol	X	X
Kaempferol-3-O-α-arabinopiranosse	X	
Kaempferol-3-O-β-galactopiranosse		X
Kaempferol-3-O-β-glicopiranosse	X (1,3)	X
Kaempferol-3-O-β-xilopiranosse	X	
Kaempferol-3-O-α-rhamnosil-(6→1)-β-galactopiranosse	X	
Kaempferol-3-O-α-rhamnosil-(6→1)-β-glicopiranosse	X	
Miricetina	X (0,6)	X (1,5)
Miricetina-3-O-β-galactopiranosse	X (5,3)	X (8,3)
Miricetina-3-O-β-glicopiranosse	X (4,0)	X (5,2)
Miricetina-3-O-α-rhamnopiranosse	X (4,8)	X (14,2)
Naringenina		X
Quercetina	X (1,8)	X
Quercetina-3-O-β-galactopiranosse	X (7,1)	X (5,5)
Quercetina-3-O-α-rhamnosil-(6→1)-β-glicopiranosse (Rutina)	X (2,8)	
Quercetina-3-O-β-xilopiranosse	X (4,9)	X (2,6)
Quercetina-3-O-α-arabinofuranose	X (3,1)	
Quercetina-3-O-α-arabinopiranosse	X (1,9)	
Quercetina-3-O-α-rhamnopiranosse	X (1,0)	X (0,9)

\* valores entre parênteses = teor determinado por CLAE-UV-DAD expressos em mg/g de extrato

Por fim, os perfis químicos destas espécies ainda diferem pelas quantidades de taninos hidrolizáveis e derivados do ácido elágico (não estudados). Estas classes de substâncias estão presentes em maiores quantidades no **EMeOH Me**. Em contrapartida, as quantidades de taninos condensados e derivados de catequina são maiores no **EMeOH Mp**.

Nas análises por CLAE-UV-DAD, observamos uma pequena diferença entre a quantidade de flavonóides totais das espécies (40,6 mg/g para *M. pusa* e 38,2 mg/g para *M. elliptica*). Contudo, alguns flavonóides identificados em *M. pusa* não puderam ser quantificados, pois estão presentes em baixas concentrações, mas somados podem tornar esta diferença mais significativa.

Por outro lado, as análises quantitativas dos flavonóides corroboraram com os estudos de isolamento e identificação. Em *M. pusa* predominam os derivados de quercetina (~ 60% do total), enquanto que os derivados de miricetina somam 35% e apenas 5% são derivados de kaempferol. Em *M. elliptica* predominam os derivados de miricetina (~ 75%), sendo ~ 25% de derivados da quercetina.

Tendo em vista que a quercetina (e derivados) são substâncias com maior capacidade antioxidante do que a miricetina (e derivados) (Cai *et al.*, 2006), nossos resultados podem justificar a maior capacidade antioxidante encontrada para *M. pusa*.

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais (FT) pelo método Folin-Ciocalteu e na determinação do teor de flavonóides totais (FVT) pelo método de Cloreto de Alumínio são comparados na **tabela 4.3.2**. Todos os extratos e frações avaliadas apresentaram altos teores de compostos fenólicos, sendo que os extratos e frações de *M. pusa* apresentaram maiores quantidades de fenóis e flavonóides.

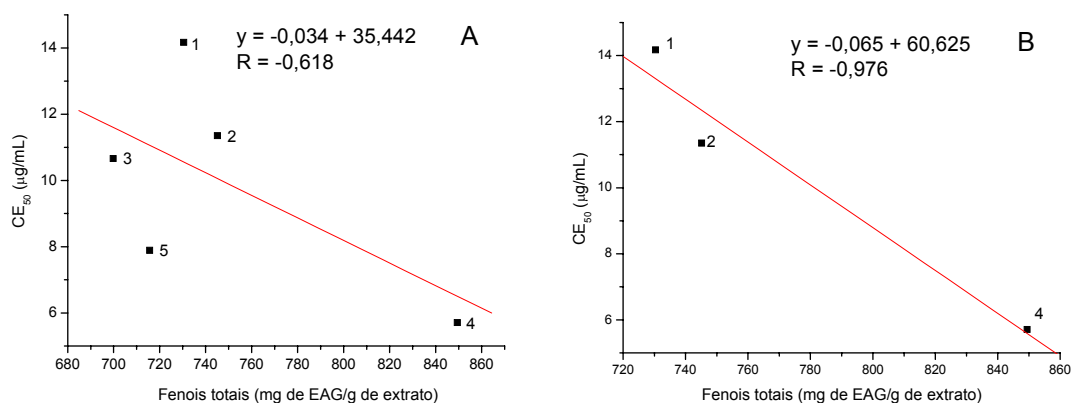
**Tabela 4.3.2** – Teor de fenóis totais, teor de flavonóides totais e atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas de *M. pusa* e *M. elliptica*.

Espécies	Amostras	FT	FVT	CE <sub>50</sub>
<i>M. pusa</i>	EMeOH	730,40 ± 11,84	120,00 ± 10,63	14,17 ± 0,21
	EMeOH80	745,14 ± 12,72	92,73 ± 1,73	11,35 ± 0,18
	FAcOEt	699,83 ± 8,40	451,94 ± 0,41	10,66 ± 0,10
	FH <sub>2</sub> O (Taninos)	849,43 ± 12,36	39,17 ± 3,63	5,71 ± 0,04
	F2 (Flavonóides)	715,66 ± 8,24	695,82 ± 7,32	7,89 ± 0,38
<i>M. elliptica</i>	EMeOH	655,60 ± 9,31	87,03 ± 4,83	23,72 ± 0,64
	EMeOH80	638,67 ± 17,96	65,88 ± 6,87	27,73 ± 1,21
	FAcOEt	601,00 ± 12,51	238,95 ± 2,93	21,23 ± 0,40
	FH <sub>2</sub> O (Taninos)	817,22 ± 2,50	34,58 ± 2,32	6,47 ± 0,28
	F2 (Flavonóides)	734,77 ± 1,63	590,37 ± 24,62	10,82 ± 0,12
----	Ácido gálico	---	---	5,63 ± 0,10
	Quercetina	---	---	2,33 ± 0,23

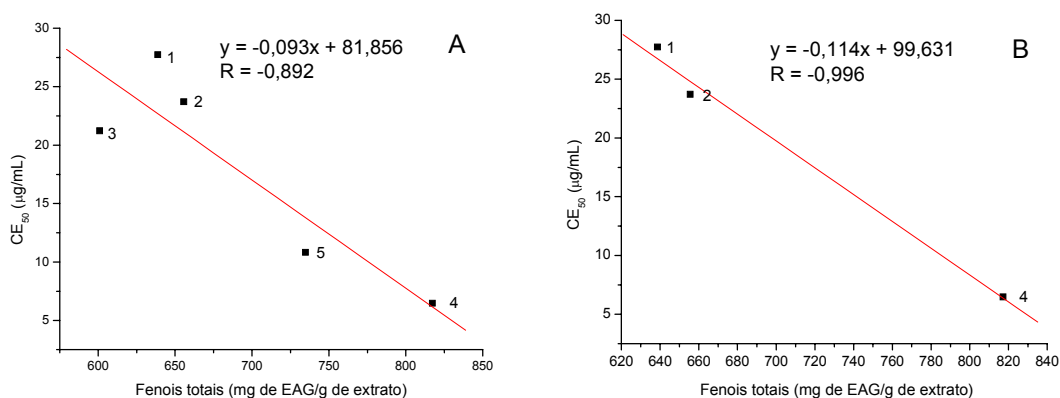
Os resultados foram expressos na forma de média ± desvio padrão. FT=fenóis totais, em mg de EAG (equivalente de ácido gálico)/g de extrato; FVT=flavonóides totais, em mg de EQ (equivalente de quercetina) /g de extrato; CE<sub>50</sub>=concentração eficiente.

Para as duas espécies foi encontrada uma correlação semelhante entre o teor de fenóis totais e a CE<sub>50</sub> das amostras. Pode-se observar nos gráficos da **figura 4.3.1** que houve uma correlação positiva entre o teor de fenóis totais e a CE<sub>50</sub> das amostras 1 (**EMeOH**), 2 (**EMeOH 80**) e 4 (**FH<sub>2</sub>O**) de *M. pusa*, ou seja, quanto maior a quantidade de fenóis totais maior a atividade antioxidante. As amostras 3 (**FAcOEt**) e 5 (F2) tiveram atividade antioxidante marcante, apesar de uma quantidade menor de fenóis em relação às amostras 1, 2 e 4. Este resultado pode ser explicado por se tratarem de frações mais ricas em flavonóides (compostos conhecidamente anti-oxidantes), sendo estes os responsáveis pela atividade antioxidante destas frações.

A mesma análise pode ser feita para *M. elliptica* através do gráfico da **figura 4.3.2**.

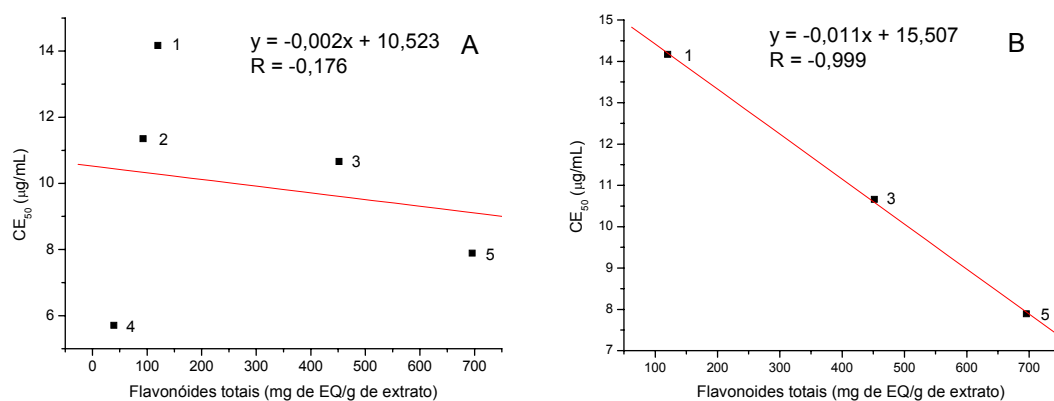


**Figura 4.3.1** – Correlação entre os fenóis totais e a atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas de *M. pusa*. (A) Todas as amostras. (B) Amostras 1, 2 e 4. Amostras: 1 = EMeOH; 2 = EMeOH80; 3 = FAcOEt; 4 = FTaninos; 5 = FFlavonóides.

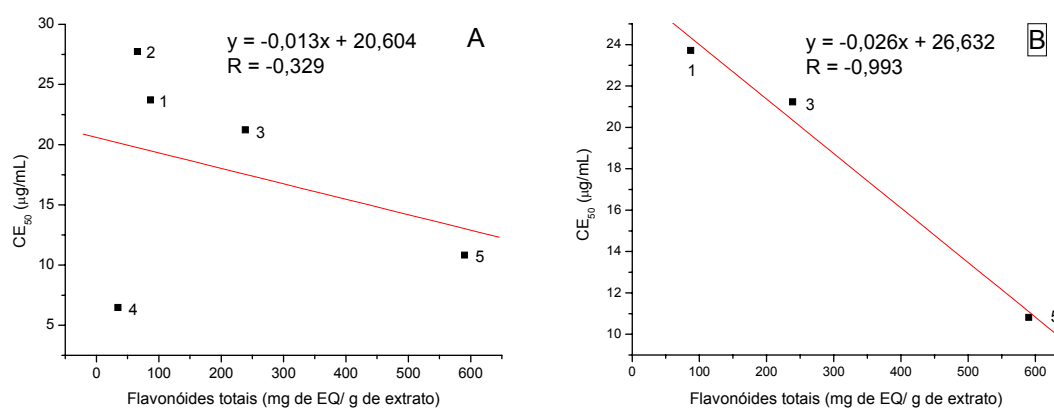


**Figura 4.3.2** – Correlação entre os fenóis totais e a atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas de *M. elliptica*. (A) Todas as amostras. (B) Amostras 1, 2 e 4. Amostras: 1 = EMeOH; 2 = EMeOH80; 3 = FAcOEt; 4 = FTaninos; 5 = FFlavonóides.

Conclusão semelhante pode ser tirada observando os gráficos das **figuras 4.3.3 e 4.3.4**, referente à correlação entre o teor de flavonóides totais e a CE<sub>50</sub> das amostras das duas espécies. A correlação positiva mostra que quanto maior a quantidade de flavonóides maior a atividade antioxidante. A amostra 4 (**FH<sub>2</sub>O**) apresentou atividade antioxidante marcante, apesar uma quantidade menor de flavonóides, demonstrando que os taninos são as substâncias responsáveis pela atividade antioxidante desta fração.



**Figura 4.3.3** – Correlação entre os flavonóides totais e a atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas de *M. pusa*. (A) Todas as amostras. (B) Amostras 1, 3 e 5. Amostras: 1 = EMeOH; 2 = EMeOH80; 3 = FAcOEt; 4 = FTaninos; 5 = FFlavonóides.



**Figura 4.3.4** – Correlação entre os flavonóides totais e a atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas de *M. elliptica*. (A) Todas as amostras. (B) Amostras 1, 3 e 5. Amostras: 1 = EMeOH; 2 = EMeOH80; 3 = FAcOEt; 4 = FTaninos; 5 = FFlavonóides.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises fitoquímicas preliminares permitiram a detecção de taninos, de saponinas no **EMeOH Mp** e no **EMeOH Me**. As saponinas foram detectadas, mas por estarem em pequenas quantidades não foram estudadas.

Análises por CLAE-UV-DAD permitiram confirmar que os principais componentes encontrados no **EMeOH Mp** são taninos condensados e detectar a presença de traços de taninos hidrolizáveis. Ainda, foi detectada uma grande variedade de flavonóides. Os resultados mostram que o **EMeOH Me** é mais pobre em metabólitos secundários, cujos componentes majoritários são derivados do ácido elágico, tais como taninos hidrolizáveis, além de flavonóides e menor quantidade de taninos condensados e catequinas.

A análise dos cromatogramas dos extratos e frações obtidos de ambas as espécies permitiu verificar que o processo de obtenção das frações foi bastante eficiente no que concerne à eliminação dos taninos, pois aparentemente flavonóides e catequinas permaneceram nas frações **AcOEt**, enquanto que os taninos migraram para a fase  $H_2O$ . Isso permitiu isolar substâncias em baixos teores, tais como alguns dos flavonóides.

O estudo fitoquímico do **EMeOH Mp** resultou no isolamento e/ou identificação de uma flavona, dois flavanóis, três flavonóis, doze flavonóis mono-glicosídeos e três flavonóis di-glicosilados. O fracionamento do **EMeOH Me** resultou no isolamento e/ou identificação de uma flavanona, dois flavanóis, três flavonóis e oito flavonóis mono-glicosilados. O estudo fitoquímico de **EMeOH Me** permitiu ainda o isolamento e/ou identificação de oito triterpenos pentacíclicos derivados dos ácidos ursólico e oleanólico.

Foram realizados ensaios para a avaliação da atividade seqüestradora do radical DPPH com extratos e frações, e dos controles positivos (ácido gálico e quercetina). Essa atividade foi comprovada em ambos os **EMeOH Mp** e **EmeOH Me**, sendo que a espécie *M. pusa* proporcionou os melhores resultados. Essa atividade pode ser explicada em termos da presença marcante de substâncias fenólicas, sobretudo (flavonóides e taninos), o que torna as espécies estudadas potenciais agentes antioxidantes.



De maneira geral, as frações contendo taninos foram mais ativas, seguidas pelas frações de flavonóides, frações AcOEt e extratos, respectivamente.

Estes resultados corroboram com os dados registrados na literatura, que indicam que catequinas, taninos condensados e taninos hidrolisáveis possuem a propriedade de capturar os radicais livres do oxigênio, que são importantes no processo antiinflamatório (Hatano *et al.*, 1989), e que esta capacidade antioxidante aumenta à medida que aumenta o peso molecular (Cai *et al.*, 2006).

A fim de avaliar a informação popular a respeito da atividade gastroprotetora dessas espécies, foram realizados ensaios farmacológicos usando diversos modelos. Antes porém, foram também avaliadas a toxicidade e mutagenicidade das espécies, a fim de verificar se as mesmas podem [ou não] ser usadas como fitoterápicos.

O teste de toxicidade aguda foi realizado a fim de verificar possíveis alterações de comportamento e peso corporal dos animais, bem como a ação letal devido ao uso exacerbado do extrato. Foi observado que, para ambos os extratos, não houve alteração significativa no comportamento, no peso de órgãos ou no peso corporal dos animais tratados em comparação aos animais do grupo controle.

Com relação à mutagenicidade, o **EMeOH Mp** foi mutagênico para as linhagens TA98, TA100 e TA97a, com e sem ativação metabólica. Este extrato apresentou maior índice mutagênico para a linhagem TA98. Por outro lado, não foi mutagênico para a linhagem TA102. O **EMeOH Me** apresentou indícios de mutagenicidade para as linhagens TA98 (com ativação metabólica) e TA102 (com e sem ativação metabólica). A fração contendo flavonóides (**F2**) e a fração contendo taninos (**FH<sub>2</sub>O**) de *M. pusa* também foram avaliadas. A fração **F2** apresentou os maiores índices de mutagenicidade (linhagem TA98). A fração **FH<sub>2</sub>O** também apresentou mutagenicidade. Estes resultados direcionam para um estudo mais aprofundado, para melhor estabelecer parâmetros para a utilização segura de plantas medicinais

Para a verificação do efeito sugerido pela população (problemas digestivos), os ensaios farmacológicos foram iniciados pelo modelo que utiliza o etanol como agente lesivo. O etanol, como agente ulcerogênico, atua sobre a secreção, motilidade e

permeabilidade gástrica (Mincis *et al.*, 1995). O efeito do etanol na mucosa gástrica inclui danos cáusticos, ocasionando estase, ruptura da parede dos vasos sanguíneos, favorecendo a hemorragia e necrose da mucosa. Além disso, há dano por retrodifusão de íons  $H^+$ , que podem causar esfoliação das células epiteliais da superfície (Szabo, 1987). Ocorre então, fundamentalmente, no dano do etanol, rompimento da barreira mucosa do estômago e conseqüente retrodifusão de  $H^+$ . A droga padrão Lansoprazol, utilizada em alguns de nossos modelos, inibe a bomba protônica ( $H^+/K^+ATPase$ ), causando diminuição da secreção ácida. No tratamento de ratos com **EMeOH Mp** e **EMeOH Me**, doses acima de 250 mg/Kg exerceram gastroproteção significativa (superiores a 60%).

Com a finalidade de avaliar o efeito gastroprotetor de *M. pusa* e *M. elliptica* frente a indutores mais moderados e avaliar seu efeito sob a variação interespecífica (ratos e camundongos), optamos por utilizar etanol acidificado como agente de indução de úlceras em camundongos (Mizui e Doteuchi, 1983). Nesse modelo experimental, observamos novamente que os três níveis de dose do **EMeOH Mp** e a dose de 500 mg/Kg do **EMeOH Me** promoveram efeito gastroprotetor, variando entre 50% e 91%.

As drogas antiinflamatórias não-esteroidais inibem a via de síntese de prostaglandinas através da inibição da enzima ciclooxigenase 1 (COX-1). Isto representa a base de sua ação antiinflamatória, mas é também responsável por ações prejudiciais às mucosas gástrica e duodenal e nos rins, bem como a inibição da agregação plaquetária (Halter *et al.*, 2001). A inibição da COX-1 implica na diminuição da secreção de muco e bicarbonato e na redução do fluxo sanguíneo da mucosa, causando dano vascular, acúmulo de leucócitos, e redução da proliferação celular, todos os fatores que contribuem para a gênese da lesão na mucosa (Rainsford, 1997). O **EMeOH Me** conferiu gastroproteção significativa na dose de 125 mg/Kg, enquanto que o **EMeOH Mp** apresentou atividade apenas na dose de 500 mg/Kg.

No intuito de caracterizar alguns parâmetros do suco gástrico e de elucidar os prováveis mecanismos de ação envolvidos com a atividade antiulcerogênica de *M. pusa* e *M. elliptica* foi, então, selecionada a dose mais efetiva (500 mg/Kg) para as duas espécies.

É sabido que a ligadura do piloro causa aumento da secreção ácida por mecanismos ainda não completamente esclarecidos. O tratamento por via oral permite avaliar seu efeito local sobre o estômago dos animais. Foi observado que a cimetidina (controle positivo) apresentou redução da concentração de íons hidrogênio, como esperado, com diferença significativa em relação ao controle negativo. O extrato **EMeOH Mp** não interferiu nesse parâmetro, tampouco no pH do suco gástrico. Porém, aumentou significativamente o volume gástrico ( $p < 0,05$ ) e diminuiu o índice de lesão ulcerativa no estômago ( $p < 0,01$ ). É provável que o aumento do volume do suco gástrico esteja relacionado a uma maior produção de muco gastroprotetor por parte do extrato, o que favoreceu seu efeito antiúlcera, evidenciado pela redução do I.L.U. Em contrapartida, o modelo de ligadura de piloro com administração de drogas pela via intraduodenal fornece evidências sobre os possíveis efeitos sistêmicos do **EMeOH**, pois sua absorção ocorre nesse segmento do intestino. De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que somente a droga padrão (cimetidina) alterou os parâmetros do suco gástrico. Portanto, podemos inferir que o efeito do extrato depende da via selecionada para sua administração, sendo que sua ação local é mais efetiva.

Com relação ao estudo do mecanismo de ação, foi avaliada a participação do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do extrato. O NO participa dos mecanismos de defesa gástrica regulando o fluxo sanguíneo da mucosa. Ele promove vasodilatação na microcirculação gástrica durante a secreção ácida (Pique *et al.*, 1992). O NO endógeno contribui também para a inibição dessa secreção ácida (Esplugues *et al.*, 1994). Além disso, o NO regula a secreção de muco das células epiteliais gástricas. Foram utilizados dois pré-tratamentos no intuito de verificar se o mecanismo de ação do extrato MeOH está relacionado ao NO: salina e L-NAME, o primeiro um veículo e o segundo uma droga que inibe a NO-sintase. Posteriormente foram realizados os tratamentos com salina, carbenoxolona (100 mg/kg) e **EMeOH** (500 mg/kg) de *M. pusa* e *M. elliptica*. A carbenoxolona (controle positivo) exerceu efeito protetor independentemente do pré-tratamento (salina ou L-NAME). Quando os animais foram tratados com EMeOH de *M. pusa*, verificamos gastroproteção efetiva com ambos os pré-tratamentos. Porém, a diferença entre os valores de porcentagem de inibição (99% com a salina e 89% com L-NAME) foi significativamente diferente. Isso nos permite concluir que o bloqueador de NO-sintetase foi capaz de reduzir de maneira significativa

o efeito antiulcerogênico do **EMeOH Mp**, sugerindo, portanto, que o NO participa da ação gastroprotetora desse extrato.

Ademais, considerando que danos gástricos induzidos por etanol provêm de agentes multifatoriais, inclusive aqueles associados à depleção de grupamentos sulfidril endógenos, optamos por avaliar a participação destes no efeito antiulcerogênico dos extratos. A ação desses grupamentos na proteção da mucosa gástrica ainda não está totalmente elucidada. Porém, sabe-se que a glutathione ( $\gamma$ -glutamylcysteinyl glycine - GSH), um composto sulfidril, exerce importante papel como antioxidante: protege contra o estresse oxidativo, pela redução de pontes dissulfeto de proteínas e outras moléculas celulares ou pela destruição de espécies reativas de oxigênio, detoxificação de vários eletrófilos e regulação da atividade transcriptora dos genes (Meister, 1985). Essa ação pode ser comum aos grupamentos sulfidrilas em geral. Os compostos SH protegem o muco ao unir suas subunidades por pontes dissulfeto. Se essas pontes são reduzidas, o muco torna-se mais solúvel, ficando mais susceptível a agentes nocivos (Avila *et al.*, 1996). A proteção gástrica de certos compostos tem mostrado ser mediada por processos sulfidril-sensíveis, indicando a importância das sulfidrilas na manutenção da integridade da mucosa (Szelenyi e Brune, 1986). Acredita-se que o pré-tratamento com bloqueadores de sulfidril (NEM) impeça a gastroproteção de substâncias envolvidas com sulfidril (Szabo *et al.*, 1981). Tanto os animais pré-tratados com salina quanto os pré-tratados com NEM promoveram efeito gastroprotetor após tratamento com **EMeOH Mp**. Porém, a proteção foi significativamente maior com o primeiro pré-tratamento (salina), ou seja, sem o bloqueio dos grupamentos sulfidril. Isso demonstra que o extrato de *M. pusa* deve atuar por meio desses compostos para exercer sua atividade antiulcerogênica.

A partir de todos estes dados pode-se concluir que *M. pusa* e *M. elliptica* possuem atividade antiulcerogênica, principalmente os extratos polares (**EMeOH**), os quais concentraram metabólitos secundários tais como flavonóides, taninos e saponinas. A ação protetora de *M. pusa* provavelmente envolve a participação do óxido nítrico e de grupamentos sulfidril, fato que também pode ser relacionado com a presença de substâncias fenólicas, já que estas possuem atividade antioxidante. Por outro lado, a ação protetora de **EMeOH Me** parece estar relacionada predominantemente com o

envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos, e não existe atuação de NO na sua ação gastroprotetora.

Os resultados farmacológicos também mostraram que as frações testadas têm uma função citoprotetora em lesões de mucosa promovidas por etanol, sendo que **F2** de *M. pusa* (50 mg/kg) tem ação eficaz na atividade citoprotetora e não promove a ativação de HSP 70 e COX-2. Já a fração **FH<sub>2</sub>O** de *M. pusa* (25 mg/kg) tem ação eficaz na atividade citoprotetora e não promove a ativação de HSP 70 e uma leve ativação de COX-2 na porção apical das glândulas estomacais. Ambas promovem também efeito cicatrizante em tratamento prolongado de úlceras gástricas induzidas por ácido acético por aumentarem a altura da mucosa regenerativa, sendo que a fração de flavonóides também aumenta a expressão de PCNA e induz angiogênese, mas não ativa COX-2. A fração de taninos não ativa PCNA, CXCR4, nem COX-2, mas apresenta área interna das úlceras menor em relação aos outros grupos. Nenhuma das drogas promoveu efeito tóxico nos parâmetros testados.

Estudos de ação gastroprotetora com a fração **F2** obtida de *M. elliptica* indicou que esta fração manteve a ação protetora com doses 5 vezes menores do que aquelas utilizadas pelo extrato, indicando a provável atuação dos constituintes, que são majoritariamente flavonóides e catequinas.

Outra consideração importante é que muitas drogas podem interferir no trânsito intestinal e, conseqüentemente, na sua absorção pelo trato digestório do organismo, portanto decidiu-se avaliar o efeito do **EMeOH Mp** e **EMeOH Me** sobre o peristaltismo intestinal dos animais tratados, utilizando-se carvão ativado como marcador. O controle positivo foi exercido pela Atropina, antagonista de receptor muscarínico, que tem ação sobre a região antral do estômago, podendo reduzir a contratilidade e o esvaziamento gástrico (Parkman *et al.*, 1999). A atropina, como esperado, apresentou redução significativa da motilidade intestinal, verificada pela menor distância percorrida pelo carvão ativo no intestino dos animais. Porém, os tratamentos com as três doses dos extratos não promoveram variação no deslocamento do marcador quando comparado à salina, o que permite concluir que o extrato não apresenta efeito sobre o peristaltismo intestinal dos animais ou qualquer outro efeito inespecífico que altere a biodistribuição de drogas.

Estes resultados permitem relacionar a composição química encontrada para as espécies com suas respectivas atividades, e permite justificar eventuais diferenças encontradas, tanto pelos seus perfis qualitativos quanto pelos quantitativos de *M. pusa* e *M. elliptica*.

A presença de taninos pode auxiliar no entendimento da relação entre a composição química e as atividades verificadas. Taninos condensados, também chamados de proantocianidinas ou leucoantocianidinas (Haslam *et al.*, 1975) são formados por cadeias de unidades de catequinas (Porter, 1989). Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, dentre elas problemas estomacais e processos inflamatórios (Haslan, 1996).

Os taninos condensados constituem uma classe de polifenóis extensamente distribuída por todo o reino vegetal. Fazem parte da dieta de muitas pessoas através de alimentos tais com suco de uva e vinho vermelho. Embora a atividade antioxidante destas substâncias seja maior que a da vitamina C ou da vitamina E, suas propriedades funcionais são pouco compreendidas. Os mecanismos para esta atividade envolvem a inativação de radicais e ações inibitórias sobre enzimas. Além disso, os radicais livres (principalmente as espécies reativas do oxigênio) estão relacionados ao surgimento e/ou progressão de úlceras gástricas (Ariga, 2004)

Foi observado ainda que catequinas, taninos condensados e taninos hidrolisáveis possuem a propriedade de capturar os radicais livres do oxigênio, que são importantes no processo antiinflamatório (Hatano *et al.*, 1989). Yoshida *et al.* (2000) associaram a atividade contra *H. pylori* à ocorrência de taninos.

Os taninos condensados também são substâncias com atividade gastroprotetoras em ulcerações causadas por estresse. Esta proteção está relacionada com a inibição da secreção ácida via células G, diminuição da secreção de PGE2 e diminuição da atividade da superóxido desmutase. Estes fatores parecem inibir lesões da mucosa gástrica causadas por estresse (Iwasaki *et al.*, 2004).

Adicionalmente, os taninos podem ainda promover a precipitação de proteínas, o que pode auxiliar na prevenção do desenvolvimento de úlceras. Essas substâncias têm a

capacidade de precipitar microproteínas no local da ulceração formando uma película protetora que evita a absorção de substâncias tóxicas e resiste ao ataque de enzimas proteolíticas (John e Onabanjo, 1990; Nwafor *et al.*, 1996).

Dentre as substâncias encontradas podemos destacar também as catequinas, classe que possui a propriedade de capturar os radicais livres do oxigênio, importantes no processo antiinflamatório (Hatano *et al.*, 1989). As catequinas e flavonóides exibem atividade antioxidante semelhante a da Vitamina C e E, que também reduzem o risco de certos tipos de câncer (Manfredini *et al.*, 2004). Segundo Palermo *et al.* (2003), constatou-se que a epigallocatequina galato (EGCG) e a epigallocatequina (EGC) têm efeito preventivo do câncer, pois impedem a ação de hidrocarbonetos de arila, produzidos por fumaças e tabaco.

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende do número e da posição de grupos hidroxílicos (-OH) e dos substituintes metoxílicos (-OCH<sub>3</sub>) nas moléculas (Cai *et al.*, 2006). Entre todos os ácidos fenólicos, o ácido gálico (composto com o maior número de grupos hidroxílicos) teve a atividade mais forte por causa da vantagem estrutural e da potente habilidade de doar H. O ácido benzóico e o ácido cinâmico, sem grupos hidroxílicos, possuem baixa ou nenhuma atividade (Cai *et al.*, 2006).

De acordo com os resultados apresentados, podemos notar que, além de taninos, flavonóides também contribuem para a atividade antioxidante dos extratos e frações testados. Os flavonóis, tais como a quercetina, miricetin, rutina e quercetrina (presentes nas folhas de *M. pusa* e *M. elliptica*) são bem conhecidos por sua potente atividade antioxidantes. Estes possuem na estrutura, além do grupo hidroxílico em 3 e o grupo *orto*-(3',4')-di-hidroxi, também uma ligação dupla entre as posições 2 e 3 em conjugação com a carbonila em 4, o que é um elemento estrutural essencial para atividade antioxidante destas substâncias, pois favorece a delocalização do elétron entre os anéis A e B e estabilizar o radical ariloxil depois da oxidação (Cai *et al.*, 2006). Os mesmos autores verificaram que quanto mais grupos hidroxílicos (sobretudo grupo catecol), maior é a atividade.

Os flavanois exibem a atividade antioxidante mais elevada, pois apesar de não possuírem a dupla ligação entre 2 e 3, contêm mais grupos hidroxilicos (cinco a oito), especialmente grupos *orto*-(3', 4')-di-hidroxi no anel B e um grupo hidroxilico em 3 e/ou um grupo galoil em 3 no anel C, quando comparados aos flavonóis. A (-)-Epigallocatequina-galato foi a substância mais ativa, com três grupos orto-di-hidroxi (Cai *et al.*, 2006).

Os flavanois, como dito anteriormente foram os mais ativos. Contudo, a quercetina mostrou-se ainda mais ativa que alguns flavanois, tais como a epigallocatequina, a epicatequina e a catequina. Este resultado foi explicado pela presença da dupla ligação entre 2 e 3, conjugada com a carbonila em 4.

O estudo realizado por Cai *et al.* (2006) mostra ainda que a atividade antioxidante é afetada pela adição de unidades glicosídicas ou grupos metílicos em qualquer hidroxila, pois todos os flavonóides glicosilados e/ou metoxilados tiveram menor atividade quando comparados com as suas respectivas agliconas.

A atividade antioxidante pode estar correlacionada à atividade antiulcerogênica por interferir na síntese de prostaglandinas e/ou por proteger os grupos sulfidrilas não protéicos presentes no muco do ataque de radicais livres (Mojzis *et al.*, 2001; Dias *et al.*, 2000). Após uma série de experimentos, Dias *et al.* (2000) propuseram que o extrato hidroalcolico bruto de *Rosmarinus officinalis* L (Lamiaceae) possui substâncias ativas que aumentam a proteção aos grupos sulfidrilas não protéicos presentes no muco, atribuindo esta atividade à capacidade antioxidante das substâncias presentes no extrato.

Nos extratos estudados, também foi encontrada a miricetina e seus derivados glicosilados. A literatura reporta que pré-tratamento com extratos ricos em derivados glicosilados de miricetina reduz a produção de úlceras gástricas induzidas pela administração oral do etanol absoluto (Reyes *et al.*, 1996).

Outro conjunto importante de substâncias isoladas e identificadas engloba o kaempferol e seus derivados glicosilados. Os flavonóides derivados do Kaempferol também são frequentemente relacionados com a atividade antioxidante, antiinflamatória



e antiulcerogênica de extratos vegetais. Wei *et al.* (2001) demonstrou a atividade antiinflamatória *in vitro* do kaempferol.

A naringenina (encontrada em *M. elliptica*) possui também algumas atividades antioxidantes, embora esta atividade seja mais pobre comparada com muitos outros compostos fenólicos (Cai *et al.*, 2006).

A maioria dos flavonóides ocorre na natureza como glicosídeos. Contudo, acredita-se que as agliconas é que são geralmente absorvidas no trato gastrointestinal devido à hidrofobicidade mais elevada. A literatura reporta que os glicosídeos são hidrolisados pelas glicosídeses presentes nas células da mucosa gastrointestinal ou secretadas pela microflora local (Zhang and Morris, 2005). Adicionalmente, a quercetina, mas não seus glicosídeos, foram detectados no líquido do íleo de pacientes que ingeriram uma refeição contendo de 10,9 a 51,6mg de glicosídeos de quercetina, indicando que os glicosídes foram eficientemente hidrolizados à aglicona no intestino (Walle *et al.*, 2000).

A atividade antioxidante é, entretanto, somente um de muitos mecanismos através de quais os flavonóides poderiam exercer suas ações (Erlund, 2004). Podemos ainda, destacar o papel da *Helicobacter pylori*. Esse microorganismo leva a uma das infecções microbianas mais comuns no mundo, infectando 50% da população mundial, e tem sido associada por muito tempo à patogênese de úlceras duodenais, úlceras gástricas, gastrites crônicas e carcinoma gástrico (Coticchia *et al.*, 2006). Alguns flavonóides, tais como a quercetina-3-metil-éter (isorhamnetina) apresentam atividade significativa contra *H. pylori* (Ustün *et al.*, 2006)

Desta maneira, os melhores resultados obtidos com a espécie *M. pusa* em relação a *M. elliptica* podem estar relacionados às maiores quantidades de flavonóides, catequinas e taninos condensados, assim como à presença de maiores quantidades de quercetina e derivados.

Por outro lado, comparação da mutagenicidade observada *Mouriri elliptica* e *M. pusa* permite inferir que a principal substância responsável pelo efeito observado é a quercetina. O perfil químico das duas espécies é semelhante, mas a quantidade de

quercetina difere significativamente, sendo maior em *M. pusa*, que também apresenta mais alta mutagenicidade. Esse resultado é compatível com a literatura, que reporta a mutagenicidade da quercetina. (Okamoto, 2005).

Por fim, destacamos a presença de triterpenos pentacíclicos derivados dos ácidos ursólico e oleanólico no extrato metanólico de *M. elliptica*. Dados da literatura mostram que a atividade biológica de triterpenóides continua sendo de grande interesse. O ácido oleanólico, um produto natural precursor dos triterpenos anteriormente descritos, tem sido relatado por apresentar inúmeras atividades farmacológicas. Lewis e Hanson (1991), Otuki *et al.* (2005) e Giner-Larza *et al.* (2001) destacam a atividade anti-inflamatória; Hsu *et al.* (1997) e Kaneda *et al.* (1992) relatam a atividade anti-câncer; Zhu *et al.* (2001) descrevem a atividade anti-HIV; Joeng (1999) e Adnyana *et al.* (2001) descrevem o efeito hepatoprotetor e Zhang e Morris (2005) destacam o potencial do ácido oleanólico no combate à osteoporose. No entanto, através dos estudos realizados não foi possível estabelecer nenhuma correlação entre a presença dos triterpenos e as atividades observadas.

## 6. CONCLUSÕES

O principal objetivo deste projeto de pesquisa foi o de estudar quimicamente e avaliar a atividade de espécies de *Mouriri* sobre o sistema gastrointestinal.

A composição química dos extratos *M. pusa* e *M. elliptica* das espécies foi amplamente estudada revelando, sobretudo a presença de flavonóides e taninos em *M. pusa* e flavonóides, taninos e triterpenos em *M. elliptica*.

Os extratos apresentaram grande potencial antioxidante em ensaio químico com DPPH, sendo vastamente justificável pela grande quantidade de compostos fenólicos. Os extratos não apresentaram qualquer efeito tóxico agudo, assim como inibiram a formação ou reduziram a severidade de úlceras gástricas frente a diversos modelos experimentais, confirmando o uso popular. Em contrapartida, os extratos apresentaram mutagenicidade, sendo fundamental um aprofundamento nestes estudos.

As espécies estudadas apresentaram em suas composições químicas compostos capazes de justificar as atividades encontradas, especialmente pela presença de compostos fenólicos (taninos e flavonóides).

Sendo assim, este trabalho representa uma importante contribuição para o estudo do conhecimento dessas espécies presentes no Cerrado do Estado de São Paulo, à medida que apresenta os dados farmacológicos fundamentados pelo estudo fitoquímico. Além da grande importância à população, não só sob o ponto de vista de valorização do conhecimento tradicional, mas também sob o aspecto econômico.

Finalmente, a abordagem interdisciplinar possibilitou uma visão mais ampla e real da temática das plantas medicinais, de suas potencialidades, tanto para a ampliação do saber acadêmico quanto para a validação dos conhecimentos tradicionais.

## REFERÊNCIAS

- ADNYANA, I. K.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A. H.; TRAN, K. Q.; KADOTA, S. Three new triterpenes from the seeds of *Combretum quadrangulare* and their hepatoprotective activity. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 360-363, 2001.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon 13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564p.
- AGRAWAL, P. K.; JAIN, D. C. <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids. **Progress in NMR Spectroscopy**, v. 24, p. 1-90, 1992.
- AIHARA, T.; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K.; TOMITA, K.; FUJISHITA, T.; FURUTANI, K.; OKABE, S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present and future. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 98, p. 109-127, 2003.
- AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v. 221, n. 4617, p. 1256-1264, 1983.
- AMOROZZO, M. C. M. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estado interdisciplinar. São Paulo: Ed. UNESP, 1996. p. 46-68.
- ANDREO, M. A. **Estudo químico-farmacológico de *Ananas ananassoides* Baker L. B. Smith (Bromeliaceae) e *Mouriri pusa* Gard. (Melastomataceae)**. 2003. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- ANDREO, M. A.; BALLESTEROS, K. V. R.; HIRUMA-LIMA, C. A.; ROCHA, L. R. M.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulphhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 431-441, 2006.
- ARIGA, T. The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. **Biofactors**, v. 21, p. 197-201, 2004.

ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILLO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Medica**, v. 69, p. 905–909, 2003.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, p. 27, 2005.

AVILA, J. R.; LASTRA, A. D. L.; MARTÍN, M. J.; MOTILVA, V.; LUQUE, I.; DELGADO, D.; ESTEBAN, J.; HERRERIAS, J. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflammation Research**, v. 45, p. 83-88, 1996.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 93-98, 2003.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G.. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Ed. USP, 1976. 235p.

BENDAZZOLI, W. S. Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica. **Mundo Saúde**, v. 24, n. 2, p. 123-126, 2000.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, p. 267-281, 1982.

BIALY, Z.; JURZYSTA, M.; OLESZEK, W.; PIACENTE, S.; PIZZA, C. Saponins in alfalfa (*Medicago sativa* L.) root and their structural elucidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3185-3192, 1999.

BOMFIN, M. C.; SALATINO, A.; MARTINS, A. B.; WURDACK, J. J.; SALATINO, M. L. F. Flavonoids of *Lavoisiera*, *Microlicia* and *Trembleya* (Melastomataceae) and their taxonomic meaning. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 711-726, 2001.

BONTEMPO, M. **Medicina natural: sabedoria popular**. São Paulo: Nova Cultural, 1992. 62p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25, 1995.

BRITO, A. R. M. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. Campinas: Ed. UNICAMP, 1994. 122p.

CAI, Y.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 2872 - 2888, 2006.

CALDERON, A. I.; ANGEHOFER, C. K.; PEZZUTO, J. M.; FARNSWORTH, N. R.; FOSTER, R.; CONDIT, R.; GUPTA, M. P.; SOEJARTO, D. D. Forest plot as a tool to demonstrate the pharmaceutical potential of plants in tropical forest os Parana. **Economic Botany**, v. 54, p. 278-294, 2000.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF, 1984. 6v.

COTICCHIA, M. D.; CHOICHI SUGAWA, M. D.; VIVIAN, R. ; TRAN, B. S.; GURROLA, J. S.; KOWALSKI, E.; MICHAEL, A. C.; ARRON, M. D. Presence and density of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa in patients with peptic ulcer disease. **Journal of Gastrointestology and Surgery**, v. 10, p. 883-889, 2006.

DIAS, P. C.; FOGLIO, M. A.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J. E. de. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 57-62, 2000.

EISIG, J. N.; LAUDANNA, A. A. **Úlcera péptica**. Programa de Saúde da Família. Disponível em: <[http://ids-saude.uol.com.br/psf/med/tema5/texto81\\_definição.asp](http://ids-saude.uol.com.br/psf/med/tema5/texto81_definição.asp)> Acesso em: 25 jan. 2007.

ELGORASHI, E. E.; TAYLOR, J. L. S.; MAES A.; VAN STADEN, J.; DE KIMPE, N.; VERSCHAEVE, L. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicology Letters**. v. 143, p. 195-207, 2003.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, v. 24, p. 851-874, 2004.

FARMACOPÉIA brasileira. São Paulo: Ateneu, 2001. Parte 4, 134p.

FELFILI, J. A.; SILVA JUNIOR, M. C. A comparative study of Cerrado (*stricto sensu*) vegetation in central Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 9, p. 277-289, 1993.

FIRENZUOLI, F.; GORI, I.; NERI, D. Clinical phytotherapy: opportunities and problematics. **Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita**, v. 41, n. 1, p. 27-33, 2005.

FRANKEL, S.; BERENBAUM, M. Effects of light on antioxidant content of foliage in a tropical forest community. **Biotropica**, v. 31, p. 422-429, 1999.

GADANO, A. B.; GURNI, A. A.; CARBALLO, M. A. Argentine folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae family. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p. 246-251, 2006.

GINER-LARZA, E. M.; MANEZ, S.; RECIO, M. C.; GINER, R.; RIOS, J. L. Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from Pistacia, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 428, p. 137-143, 2001.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, p. 686–699, 2005.

HALTER, F.; SCHMASSMANN, A.; PESKAR, B. M. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut**, v. 49, p. 443-453, 2001.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. London: Chapman and Hall, 1973. 676p.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids**: advances in research since 1986. New York: Chapman and Hall, 1996. 676p.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HASLAM, E.; HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1975. 214p.

HATANO, T.; EDAMATSU, R.; HIRAMATSU, M.; MORI, A.; FUJITA, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances .6. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, p. 2016-2021, 1989.

HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; NUNES, D. S.; GRACIOSO, J. S.; RODRIGUEZ, J. C.; HAUN, M. Gastroprotected effect of essential oil from *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 3, p. 229-234, 2000.

HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; TOMA, W.; ALMEIDA, A. B.; PAULA, A. C. B.; BRASIL, D. D. B.; MULLER, A. H.; BRITO, A. R. M. S. Gastroprotective effect of aparisthman, a diterpene isolated from *Aparisthmium cordatum*, on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 94-100, 2001.

HIRUMA-LIMA, C. A.; TOMA, W.; GRACIOSO, J. S.; ALMEIDA, A. B. A. de.; BATISTA, L. M.; MAGRI, L.; DE PAULA, A. C. B.; SOARES, F. R.; NUNES, D. S.; SOUZA BRITO, A. R. M. Natural trans-crotonin: the antiulcerogenic affect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 452-456, 2002.

HSU, H. Y.; YANG, J. J.; LIN, C. C. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. **Cancer Letters**. v. 11, p. 7, 1997.

IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Science of Food and Agricultural**, v. 51, p. 1811, 2003.

ISAZA, J. H.; ITO, H.; YOSHIDA, T. Monochaetin, di-hyperin ester of tetrahydroxy-um-truxinic acid from *Monochaetum multiflorum*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, p. 1510-1511, 1999.

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

ISHIHARA, M.; ITO, M. Influence of aging on gastric ulcer healing activities of cimetidine and omeprazole. **European Journal of Pharmacology**, v. 444, p. 209-215, 2002.



IWASAKI, Y.; MATSUI, T.; ARAKAWA, Y. The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in Wistar rats. **Journal of Gastroenterology**, v. 39, p. 831–837, 2004.

JELLER, A. H. **Ocorrência e biossíntese de triterpenos quinonametídeos em *Cheiloclinium cognatum***. 2003. 159 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

JOENG, H. G. Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. **Toxicology Letters**, v. 105, n. 3, p. 215-222, 1999.

JOHN, T. A.; ONABANJO, A. O. Gastroprotective effects of an aqueous extract of *Entandrophragma utile* bark in experimental ethanol-induced peptic ulceration in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p. 87-93, 1990.

JOSSANG, A.; SEULEIMAN, M.; MAIDOU, E.; BOODO, B. Pentacyclic triterpenes from *Combretum nigricans*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 591, 1996.

KANEDA, N.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Plant anticancer agents, L. Cytotoxic triterpenes from *Sandoricum koetjape* stems. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 5, p. 654-659, 1992.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2351-2355, 1990.

LA VECCHIA, C.; TAVANI, A. A review of epidemiological studies on cancer in relation to the use of antiulcer drugs. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 11, p. 117-123, 2002.

LANGMEAD, L.; RAMPTON, D. S. Review Article: herbal treatment in gastrointestinal and liver disease – benefits and dangers. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 15, p. 1239-1252, 2001.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; LIMA, T. C. M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2000. 821p.

LEVINE, R. J. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: PFEIFFER, C. J. **Peptic Ulcer**. Copenhagen: Munksgaard, 1971. p. 92–97.

LEWIS, D. A.; HANSON, D. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 201-231, 1991.

LI, X.; ELSOHLY, H. N.; HUFFORD, C. D.; CLARK, A. M. NMR assignments of ellagic acid derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 37, p. 856-859, 1999.

LORENZI, H.; MATOS, A. F. J. **Plantas medicinais no brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 512 p.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C RNM spectra of pentacyclic triterpenoids: a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanism. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, p. 329-338, 2003.

MANFREDINI, V.; MARTINS, V. D.; BENFATO, M. S. Chá verde: benefícios para a saúde humana. **Infarma**, v.16, n. 9-10, 2004.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**. v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**. Viçosa: Ed. UFV, 1995. 220p.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by Mormodin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol- induced gastric mucosal lesions in rat. **Life Sciences**, v. 65, p. 27-32, 1999.

McQUAID, K. R. Fármacos utilizados no tratamento das doenças gastrointestinais. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2005. p. 867-891.

MEISTER, A. Methods for the selective modification of glutathione metabolism and study of glutathione trans- sidered statistically significant. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 571–585. 1985.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. São Paulo: Tecmedd, 2004. 15p.

MILANI, S.; CALABRÓ, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, p. 360-371, 2001.

MINCIS, M.; CHEBLI, J. M. F.; KHOURI, S. T.; MINCIS, R. Etanol e o trato gastrointestinal. **Archives of Gastroenterology**, v. 32, p. 131-139, 1995.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 934-945, 1983.

MOJZIS, J.; HVISCOVA, K.; GERMANOVA, D.; BUKOVICOVA, D.; MIROSSAY, L. Protective effect of quercetin on ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. **Physiology Research**, v. 50, p. 501-506, 2001.

MOLEIRO, F. C. **Avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos e frações das folhas de *Mouriri elliptica* Mart. (Melastomataceae) e *Byrsonima basiloba* A. Juss. (Malpighiaceae)**. 2007. 100 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 57, p. 495-505, 1991.

MORLEY, T. A new and emended species of *Mouriri* (Melastomataceae). **Novon**, v. 8, p. 41-44, 1998.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95, 2004.

NWAFOR, P. A.; EFFRAIM, K. D.; JACKS, T.W. Gastroprotective effects of aqueous extract of *Khaya senegalensis* bark on indomethacin-induced ulceration in rats. **West African Journal of Pharmacology and Drug Research**, v. 12, p. 46-50, 1996.

OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acetic acid ulcer models-the history and state of the art of peptic ulcer research. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 1321-1341, 2005.

OKAMOTO, T. Safety of quercetin for clinical application (Review). **Internacional Journal of Molecular Medicine**, v. 16, p. 275-278, 2005.

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and a-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253-259, 2005.

PALERMO, C. M.; HERNANDO, J. I.; DERTINGER, S. D.; KENDE, A. S.; GASIEWICZ, T. A. Identification of potential aryl hydrocarbon receptor antagonists in green tea. **Chemical Research Toxicology**, v. 7, p. 865-872, 2003.

PARKMAN, H. P.; TRATE, D. M.; KNIGHT, L. C.; BROWN, K. L.; MAURER, A. H.; FISHER, R. S. Cholinergic effects on human gastric motility. **Gut**, v. 45, p. 346-354, 1999.

PARKY, D. C. **Great moments in pharmacy**. Detroit: Northwood Institute Press, 1996. 238p.

PIQUE, J. M.; ESPLUGUES, J. V.; WHITTLE, B. J. Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilatation during acid secretion. **Gastroenterology**, v. 102, p. 168- 174, 1992.

PORTER, L. J. Tannins. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Method in plants biochemistry**. London: Academic Press, 1989. 389p.

PUSCAS, I.; PUSCAS, C.; COLTAU, M.; PASCA, R.; TORRES, J.; MARQUEZ, M.; HERRERO, E.; FILLAT, O.; ORTIZ, J. A. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. **Arzneimittelforschung**, v. 47, p. 568-572, 1997.

RAINSFORD, K. D. Gastrointestinal adaptation, gastrointestinal injury by NSAIDs. Regulation of eicosanoids and mucosal protection from NSAIDs. In: RAINSFORD, K. D. **Side effects of anti-inflammatory drugs**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 197-205.

RATH, G. ; TOURE, A. ; NIANGA, M. ; WOLFENDER, J. L. ; HOSTETTMANN, K. Characterization of C-glycosilflavones from *Dissotis rotundifolia* by liquid-chromatography-UV-diode array detection-tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 41, p. 332-342, 1995.

REYES, M.; MARTIN, C.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; TRUJILLO, J.; TORO, M. V.; AYUSO, M. J. Antiulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera. **Zeitschrift fur Naturforschung (C): Journal of Biosciences**, v.51, p.563-569, 1996.

RODRIGUEZ, J. A.; ASTUDILLO, L.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 291-294, 2003.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235, 2005.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of Science of Food and Agricultural**, v. 76, p. 270, 1998.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed. UFSC, 1999. Cap. 25, p. 517-544.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHEKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Florianópolis: Ed. UFSC, 2001. Cap.15, p. 301-332.

SHAY, H. A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.

SILVA, E. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LÓLIS, S. F. Etnobotânica no município de Porto Nacional. In: SYMPOSIUM OF BRAZILIAN MEDICINAL PLANTS, 16th., 2000, Cuiabá. **Abstract...** Cuiabá, 2000. 106p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: Ed. UFSC, 1999. 821p .

SUNSHINE SEEDS. **Shop Sunshine Seeds** . Disponível em: <<https://ssl.kundenserver.de/shop.sunshine-seeds.de/>>. Acesso em: 04 jul. 2006.

SZABO, S. Mechanism of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional biochemical and histochemical studies. **Scandinavian Journal Gastroenterology**, v. 22, p. 21-28, 1987.

SZABO, S.; VINCZE, A. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. **Journal of Physiology**, v. 94, p. 77-81, 2000.

SZABO, S.; TRIER, J. S.; FRANKEL, P. W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, v. 214, p. 2000-2002, 1981.

SZELENYI, I.; BRUNE, K. Possible role of sulfhydryls in mucosal protection induced by aluminum hydroxide. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 31, p. 1207-1210, 1986.

SZELENYI, I.; THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Archives of Toxicology**, v. 41, p. 99-105, 1978.

TAVARES, W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. In: TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 3-13.

TEIXEIRA, P. C. **Do herbalismo tribal aos remédios florais do Dr. Bach**. São José do Rio Preto: São José, 1994. 33p.

TERAHARA, N. ; SUZUKI, H.; TOKI, K.; KUWANO, H.; SAITO, N.; HONDA, T. A. Diacylated anthocyanin from *Tibouchina urvilleana* flowers. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 335-340, 1993.

TOMA, W.; GRACIOSO, J. D.; ANDRADE, F. D. P.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1151-1155, 2002.

TOMA, W.; TRIGO, J. R.; PAULA, A. C. B. de; SOUZA-BRITO A. R. M. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal ulcer on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 345-351, 2004.

USTUN, O.; OZCELIK, B.; AKYON, Y.; ABBASOGLU, U.; YESILADA, E. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 108, n. 3, p. 457-461, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VILEGAS, W. **Fitoquímica de plantas brasileiras**. 1998. 109 f. Tese (Livre-Docência em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1998.

VOLKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37, 2004.

WAGNER, W.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984. 320 p.

WALLE, T.; OTAKE, Y.; WALLE, U. K.; WILSON, F. A. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2658–2661, 2000.

WEI, B. L.; LU, C. M.; TSAO, L. T.; WANG, J. P.; LIN, C. N. *In vitro* anti-inflammatory effects of quercetin 3-O-methyl ether and other constituents from *Rhamnus* species. **Planta Medica**, v. 67, p. 745-747, 2001.

WOISKY, R. G. **Métodos de controle de qualidade de amostras de própolis**. 1996. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Bulletin of World Health Organization**: Regulatory situation of herbal medicines. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO\\_TRM\\_98.1.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_TRM_98.1.pdf)> Acesso em: 26 mar. 2008.

YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H. Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights. **Biofactors**, v. 13, p. 121-125, 2000.

YOSHIDA, T.; NAKATA, F.; OKUDA, T. Tannins and related polyphenols of melastomataceous plants. VIII Nobotanins L, M and N, trimeric hydrolyzable tannins from *Tibouchina semidecandra*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, p. 824-827, 1999.

YOSHIDA, T.; OHBAYASHI, H.; ISHIHARA, K.; OHWASHI, W.; HABA, K.; OKANO, Y.; SHINGU, T.; OKUDA, T. Tannins and related polyphenols of melastomataceous plants: Hydrolyzable tannins from *Tibouchina semidecandra* Cogn. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 2233-2240, 1991.

YOSHIDA, T.; HABA, K.; NAKATA, F.; OKANO, Y.; SHINGU, T.; OKUDA, T. Tannins and related polyphenols of melastomataceous plants .3. Nobotanin-G, nobotanin-H and nobotanin-I, dimeric hydrolyzable tannins from *Heterocentron roseum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, p. 66-71, 1992a.

YOSHIDA, T.; NAKATA, F.; HOSOTANI, K.; NITTA, A.; OKUDA, T. Tannins and related polyphenols of melastomataceous plants 5 3 new complex tannins from *Melastoma malabathricum* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, p. 1727-1732, 1992b.

YOSHIDA, T.; NAKATA, F.; HOSOTANI, K.; NITTA, A.; OKUDA, T. Tannins and related polyphenols of melastomataceous plants .4. Dimeric hydrolyzable tannins from *Melastoma malabathricum*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 2829-2833, 1992c.

YOSHIDA, T.; ARIOKA, H.; FJITA, T.; CHEN, X. M.; OKUDA, T. Monomeric and dimeric hydrolyzable tannins from 2 melastomataceous species. **Phytochemistry**, v. 37, p. 863-866, 1994.

YOSHIDA, T.; HABA, K.; ARATA, R.; NAKATA, F.; SHINGU, T.; OKUDA, T. Tannins and related polyphenols of melastomataceous plants .7. Nobotanin-J and nobotanin-K, trimeric and tetrameric hydrolyzable tannins from *Heterocentron roseum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, p. 1101-1106, 1995.

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

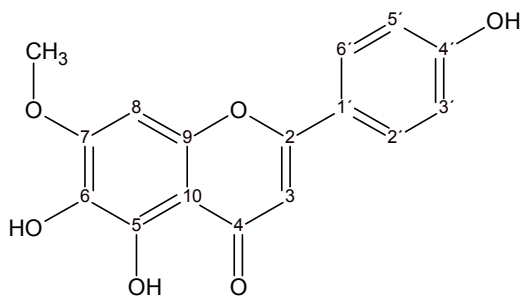
ZHANG, S.; MORRIS, M. E. Flavonoid–drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. **Life Sciences**, v. 78, p. 2116–2130, 2005.

ZHU, Y. M.; SHEN, J. K.; WANG, H. K.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. H. Synthesis and anti-HIV activity of oleanolic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 3115, 2001.

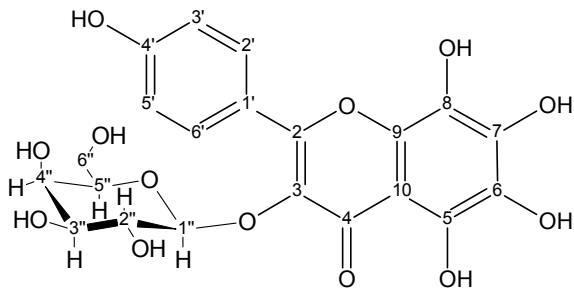


# **Anexos**

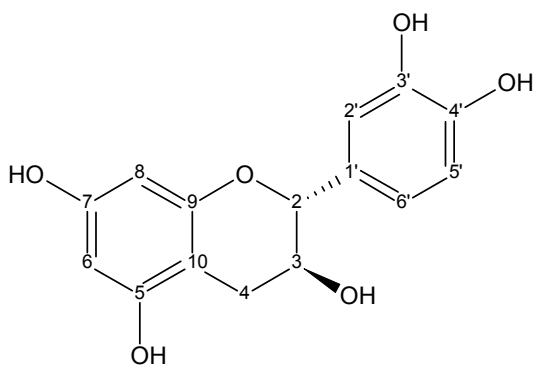
**Estruturas**



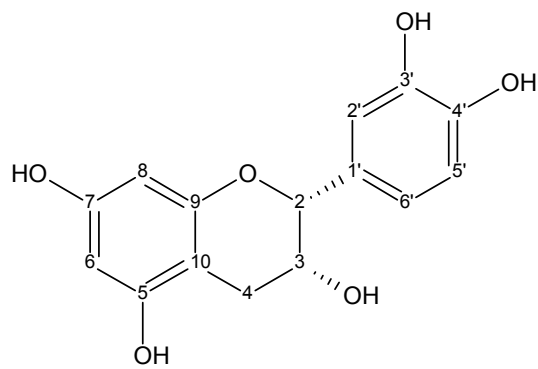
4',5,6-trihidroxi-7-metoxiflavona (**Mp1**)



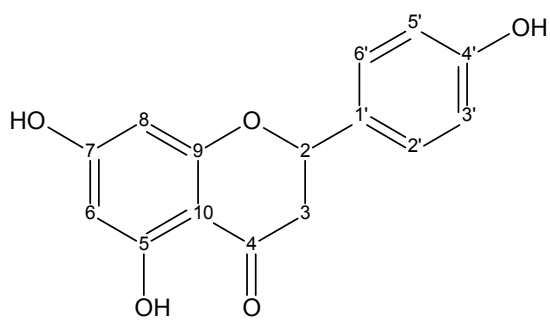
6,8-diidroxi-kaempferol-3-O-β-galactopiranosse (**Mp6**)



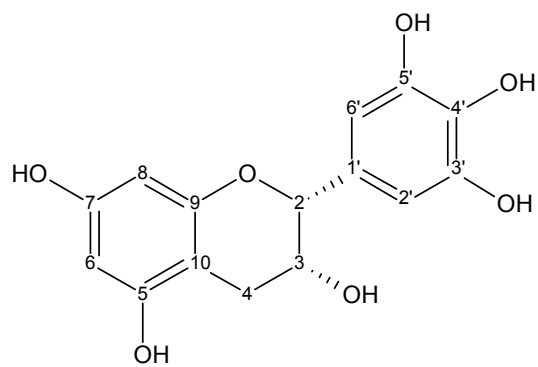
(-)-epicatequina (**Mp17**)



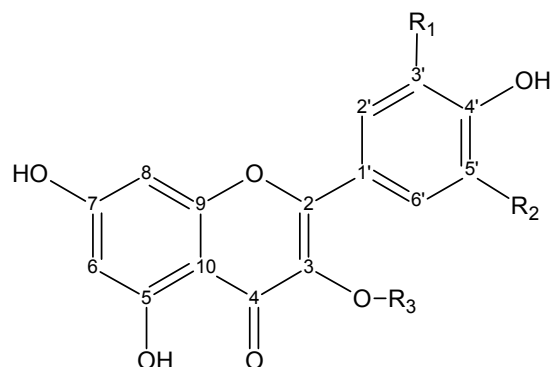
(+)-catequina (**Mp18 e Me9**)

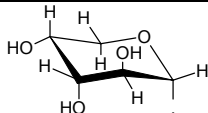
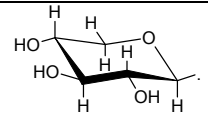
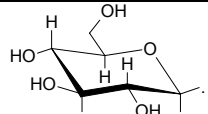
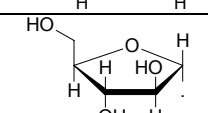
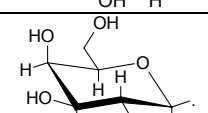
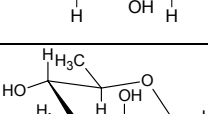
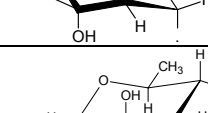
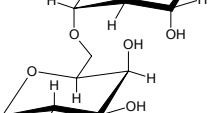


Naringenina (**Me1**)

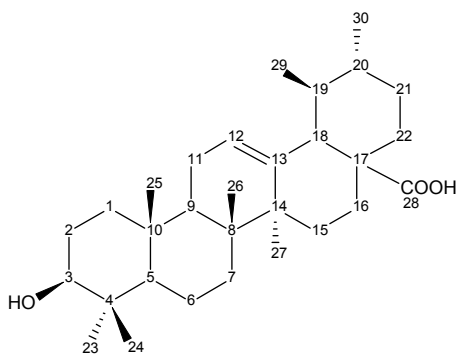


(+)-galocatequina (**Me13**)

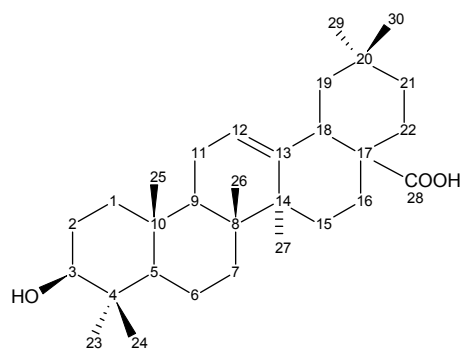


<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>Flavonóide</b>	<b>Identificação</b>
H	H	H	Kaempferol	<b>Mp2 e Me2</b>
OH	H	H	Quercetina	<b>Mp3 e Me3</b>
OH	OH	H	Miricetina	<b>Mp4 e Me4</b>
H	H		Kaempferol-3- <i>O</i> -α-arabinopiranoose	<b>Mp7</b>
OH	H		Quercetina-3- <i>O</i> -α-arabinopiranoose	<b>Mp11</b>
H	H		Kaempferol-3- <i>O</i> -β-xilopiranoose	<b>Mp8</b>
OH	H		Quercetina-3- <i>O</i> -β-xilopiranoose	<b>Mp10 e Me8</b>
H	H		Kaempferol-3- <i>O</i> -β-glicopiranoose	<b>Mp9 e Me6</b>
OH	OH		Miricetina-3- <i>O</i> -β-glicopiranoose	<b>Mp15</b>
OH	H		Quercetina-3- <i>O</i> -α-arabinofuranose	<b>Mp5</b>
H	H		Kaempferol-3- <i>O</i> -β-galactopiranoose	<b>Me7</b>
OH	H		Quercetina-3- <i>O</i> -β-galactopiranoose	<b>Mp12 e Me11</b>
OH	OH		Miricetina-3- <i>O</i> -β-galactopiranoose	<b>Mp14 e Me12</b>
OH	OH		Miricetina-3- <i>O</i> -α-rhamnopiranoose	<b>Mp16 e Me10</b>
OH	H		Quercetina-3- <i>O</i> -α-rhamnopiranoose	<b>Me5</b>
H	H		Kaempferol-3- <i>O</i> -α-L-rhamnopiranosil-(6→1)-β-D-galactopiranoose	<b>Mp19</b>
H	H		Kaempferol-3- <i>O</i> -α-L-rhamnopiranosil-(6→1)-β-D-glicopiranoose	<b>Mp20</b>
OH	H		Quercetina-3- <i>O</i> -α-L-rhamnopiranosil-(6→1)-β-D-glicopiranoose	<b>Mp13</b>

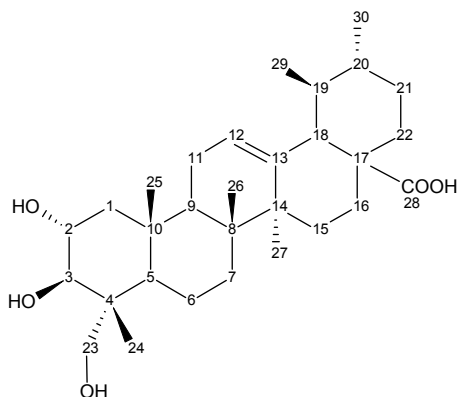
**Estruturas 2** - Flavonóides e catequinas isolados de *M. pusa* e/ou *M. elliptica* (Continuação)



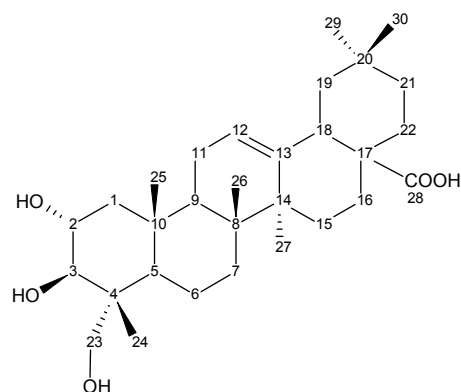
Ácido 3 $\beta$ -hidroxiursan-12-en-28-óico (MeT1)



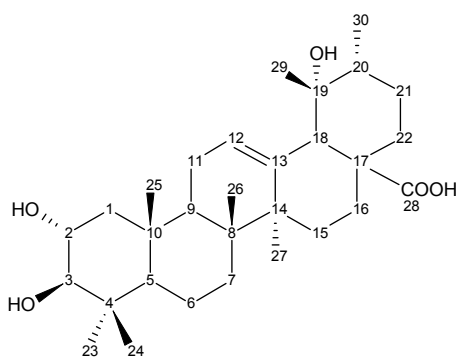
Ácido 3 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-óico (MeT2)



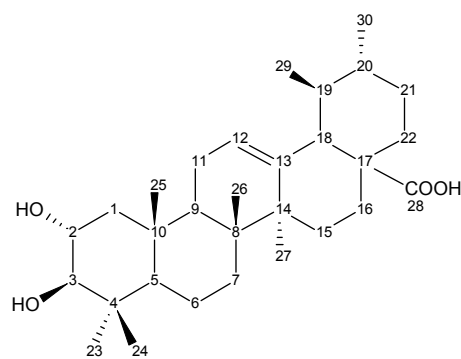
Ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-triidroxiursan-12-en-28-óico (MeT3)



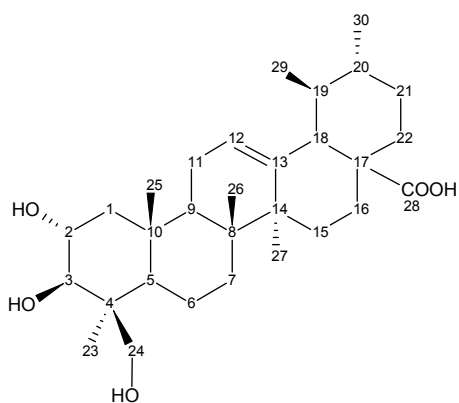
Ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-triidroxiolean-12-en-28-óico (MeT4)



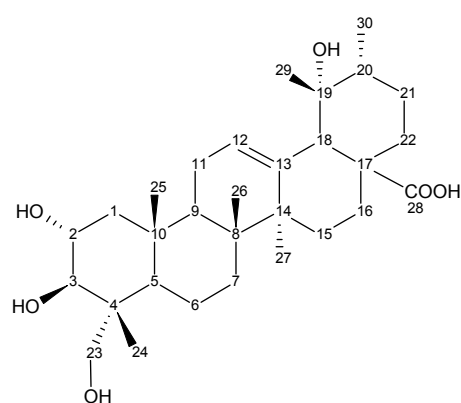
Ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19-triidroxiursan-12-en-28-óico (MeT5)



Ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diidroxiursan-12-en-28-óico (MeT6)



2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,24-triidroxiursan-12-en-28-óico (MeT7)



2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19,23-tetraidroxiursan-12-en-28-óico (MeT8)

### Estruturas 3 – Triterpenos isolados de *M. elliptica*

# **Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) - RMN**

---

Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN dos flavonoides identificados em *M. pusa* e/ou *M. elliptica*

Posição	Mp1	Me1		Mp2	Mp3	Mp4		Mp5		Me5	Mp6	Mp7	Mp8	Mp9	Mp10	
	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	Me2	Me3	Me4	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H	Me6	Me8
1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	---	5,42 <i>dd</i> (3,0; 13)	78,4	---	---	---	147,2	---	156,5	---	---	---	---	---	---	156,3
3	6,83 <i>s</i>	6,83 <i>s</i> <i>eq</i> 2,67 <i>dd</i> (3,0; 17) <i>ax</i> 3,23 <i>dd</i> (13; 17)	42,0	---	---	---	136,3	---	137,6	---	---	---	---	---	---	133,1
4	---	---	196,2	---	---	---	176,2	---	177,6	---	---	---	---	---	---	177,3
5	---	---	162,0	---	---	---	161,1	---	161,2	---	---	---	---	---	---	161,2
6	---	5,85 <i>sl</i>	95,9	6,17 <i>d</i> (2,0)	6,17 <i>d</i> (2,0)	6,17 <i>d</i> (2,0)	98,6	6,15 <i>d</i> (2,0)	98,9	6,16 <i>d</i> (1,5)	---	6,18 <i>d</i> (2,0)	6,18 <i>d</i> (2,0)	6,04 <i>d</i> (1,9)	6,17 <i>d</i> (2,0)	98,8
7	---	---	167,0	---	---	---	164,4	---	164,9	---	---	---	---	---	---	164,7
8	6,85 <i>s</i>	5,85 <i>sl</i>	95,1	6,41 <i>d</i> (2,0)	6,39 <i>d</i> (2,0)	6,35 <i>d</i> (2,0)	93,6	6,35 <i>d</i> (2,0)	93,7	6,34 <i>d</i> (1,5)	---	6,41 <i>d</i> (2,0)	6,41 <i>d</i> (2,0)	6,24 <i>d</i> (1,9)	6,37 <i>d</i> (2,0)	93,1
9	---	---	162,0	---	---	---	156,5	---	156,9	---	---	---	---	---	---	156,1
10	---	---	102,3	---	---	---	103,3	---	104,2	---	---	---	---	---	---	103,7
1'	---	---	129,0	---	---	---	121,2	---	120,9	---	---	---	---	---	---	120,9
2'	7,97 <i>d</i> (8,0)	7,31 <i>d</i> (8,5)	128,3	8,03 <i>d</i> (9,0)	7,65 <i>d</i> (2,0)	7,22 <i>s</i>	107,6	7,65 <i>d</i> (2,0)	115,5	7,29 <i>d</i> (2,5)	8,00 <i>d</i> (8,0)	8,00 <i>d</i> (8,8)	8,05 <i>d</i> (8,8)	8,01 <i>d</i> (8,8)	7,55 <i>d</i> (2,0)	116,1
3'	6,94 <i>d</i> (8,0)	6,79 <i>d</i> (8,5)	115,0	6,91 <i>d</i> (8,0)	---	---	146,1	---	145,3	---	6,83 <i>d</i> (8,0)	6,88 <i>d</i> (8,8)	6,87 <i>d</i> (8,8)	6,87 <i>d</i> (8,8)	---	144,9
4'	---	---	158,0	---	---	---	136,7	---	148,6	---	---	---	---	---	---	148,7
5'	6,94 <i>d</i> (8,0)	6,79 <i>d</i> (8,5)	115,0	6,91 <i>d</i> (8,0)	6,87 <i>d</i> (8,5)	---	146,1	6,84 <i>d</i> (8,0)	115,6	6,85 <i>d</i> (8,5)	6,83 <i>d</i> (8,0)	6,88 <i>d</i> (8,8)	6,87 <i>d</i> (8,8)	6,87 <i>d</i> (8,8)	6,83 <i>d</i> (8,5)	115,3
6'	7,97 <i>d</i> (8,0)	7,31 <i>d</i> (8,5)	128,3	8,03 <i>d</i> (9,0)	7,53 <i>dd</i> (8,5; 2,0)	7,22 <i>s</i>	107,6	7,54 <i>dd</i> (8,0; 2,0)	121,7	7,24 <i>dd</i> (2,5; 8,5)	8,00 <i>d</i> (8,0)	8,00 <i>d</i> (8,8)	8,05 <i>d</i> (8,8)	8,05 <i>d</i> (8,8)	7,52 <i>dd</i> (8,5; 2,0)	121,4
1''	---	---	---	---	---	---	---	5,56 <i>sl</i>	107,8	5,25 <i>d</i> (1,0)	5,28 <i>d</i> (7,5)	5,31 <i>d</i> (7,5)	5,31 <i>d</i> (7,5)	5,40 <i>d</i> (8,0)	5,32 <i>d</i> (7,0)	101,8
2''	---	---	---	---	---	---	---	3,57 <i>m</i>	82,1	3,98 <i>m</i>	3,52 <i>m</i>	3,72 <i>m</i>	3,23 <i>m</i>	3,54 <i>m</i>	3,29 <i>dd</i> (7,0; 8,5)	73,6
3''	---	---	---	---	---	---	---	3,25-3,33 <i>m</i>	77,0	3,52 <i>m</i>	3,35 <i>m</i>	3,51 <i>m</i>	3,18 <i>m</i>	3,20 <i>m</i>	3,18 <i>dd</i> (8,5; 8,5)	75,9
4''	---	---	---	---	---	---	---	3,71 <i>m</i>	85,9	3,16 <i>m</i>	3,64 <i>s</i>	3,64 <i>m</i>	3,27 <i>m</i>	3,10 <i>m</i>	3,33 <i>m</i>	68,4
5''	---	---	---	---	---	---	---	4,13 <i>m</i>	60,7	3,22 <i>m</i>	no	3,21 <i>m</i> 3,59 <i>m</i>	2,94 <i>m</i> 3,60 <i>m</i>	3,10 <i>m</i> 3,64 <i>m</i>	6,87 <i>dd</i> (5,0; 11,5) <i>ax</i> 2,95 <i>dd</i> (11,5; 9,5)	66,0
6''	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,82 <i>d</i> (6,0)	no	---	---	---	---	---
O-CH <sub>3</sub>	3,91 ( <i>s</i> )	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Deslocamento Químico ( $\delta$ =ppm); Constante de acoplamento ( $J$ =Hz); Solvente: DMSO-d<sub>6</sub>; no=não observado

Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN dos flavonoides identificados em *M. pusa* e/ou *M. elliptica* (Continuação)

Posição	Mp11		Mp12 Me11		Mp13		Mp14 Me12		Mp15		Mp16 Me10		Mp17		Mp18 Me9		Mp19		Mp20	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	---	156,3	---	156,4	---	---	---	155,9	---	155,9	---	157,3	4,48 d (7,5)	81,2	4,74 sl	78,0	---	155,1	---	155,1
3	---	133,8	---	133,2	---	---	---	133,6	---	133,3	---	134,2	3,82 m	67,0	4,02 m	64,9	---	133,8	---	133,8
4	---	177,6	---	177,3	---	---	---	177,1	---	177,1	---	177,6	ax 2,67 m eq 2,36 m	28,1	ax 2,67 m eq 2,48 m	28,1	---	177,5	---	177,5
5	---	161,2	---	161,2	---	---	---	161,1	---	161,1	---	161,3	---	156,3	---	156,3	---	161,3	---	161,3
6	6,18 d (2,0)	98,7	6,18 d (2,0)	98,9	6,17 d (2,0)	6,12 d (2,0)	99,1	6,12 d (2,0)	99,1	6,16 sl	98,8	5,69 d (2,5)	93,8	5,72 d (2,5)	94,1	5,81 sl	101,1	5,81 sl	101,1	
7	---	164,3	---	164,9	---	---	---	165,0	---	165,0	---	165,0	---	156,6	---	156,6	---	164,3	---	164,3
8	6,39 d (2,0)	93,6	6,38 d (2,0)	93,7	6,37 d (2,0)	6,29 d (2,0)	93,6	6,29 d (2,0)	93,6	6,32 sl	93,6	5,90 d (2,5)	95,5	5,90 d (2,5)	95,1	5,96sl	94,8	5,96sl	94,8	
9	---	156,3	---	156,2	---	---	---	156,4	---	156,4	---	156,4	---	155,5	---	155,5	---	156,6	---	156,6
10	---	103,9	---	no	---	---	---	103,1	---	103,1	---	103,8	---	99,4	---	98,5	---	104,3	---	104,3
1'	---	120,9	---	121,0	---	---	---	119,8	---	119,8	---	119,5	---	130,6	---	130,6	---	121,5	---	121,5
2'	7,49 d (2,5)	115,8	7,52 d (2,5)	116,1	7,51 d (2,0)	7,21 s	108,4	7,20 s	108,4	6,88 s	107,9	6,73 d (1,7)	114,9	6,89 sl	114,9	7,98 d (8,5)	130,4	7,93 d (9,0)	130,4	
3'	---	145,0	---	145,0	---	---	---	145,4	---	145,4	---	145,7	---	145,0	---	144,5	6,82 d (8,5)	114,8	6,83 d (9,0)	114,8
4'	---	148,6	---	148,8	---	---	---	137,0	---	137,0	---	134,2	---	145,0	---	144,4	---	160,0	---	160,0
5'	6,83 d (8,5)	115,4	6,81 d (8,5)	115,4	6,82 d (8,0)	---	---	145,4	---	145,4	---	145,7	6,69 d (8,0)	115,1	6,66 m	114,7	6,82 d (8,5)	114,8	6,83 d (9,0)	114,8
6'	7,63 dd (8,5; 2,5)	122,1	7,63 dd (8,5; 2,5)	121,5	7,65 dd (8,0; 2,0)	7,21 s	108,4	7,20 s	108,4	6,88 s	107,9	6,60 dd (1,7; 8,0)	118,3	6,66 m	118,1	7,98 d (8,5)	130,4	7,93 d (9,0)	130,4	
1''	5,25 d (5,0)	101,4	5,34 d (7,5)	101,8	5,31 d (8,0)	5,30 d (8,0)	102,3	5,44 d (7,5)	101,1	5,20 d (2,5)	101,9	---	---	---	---	5,13 d (7,5)	103,4	5,15 d (7,5)	102,9	
2''	3,74 dd (7,0; 5,5)	66,1	3,55 dd (9,5; 8,0)	72,3	no	3,60 m	71,2	3,30 m	73,9	3,99 sl	70,0	---	---	---	---	3,54 m	71,1	3,10-3,54 m	74,5	
3''	3,50 dd (7,0; 3,5)	71,7	3,36 dd (9,5; 3,5)	73,7	no	3,38 m	73,3	3,20 m	76,6	3,56 dd (3,0; 9,0)	70,4	---	---	---	---	3,40 m	73,0	3,10-3,54 m	76,5	
4''	3,64 m	70,7	3,64 m	69,4	no	3,65 m	67,9	3,10 m	69,9	3,16 dd (9,0; 9,0)	71,3	---	---	---	---	3,60 m	68,0	3,10-3,54 m	no	
5''	eq 3,58 dd (4,5; 11,5) ax 3,20 m	64,3	3,31 m	76,1	no	3,32 m	75,9	3,10 m	77,5	3,38 m	70,5	---	---	---	---	3,30 m	no	3,10-3,54 m	75,7	
6''	---	---	3,31 m	60,3	no	3,32 m	60,0	3,59 dl (10,5)	61,1	0,85 d (6Hz)	17,5	---	---	---	---	3,30 m	no	3,70 d (10)	66,9	
1'''	---	---	---	---	4,40 s	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	4,42 d (1,0)	100,4	4,41 sl	100,4	
2'''	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	3,42 m	70,4	3,45 m	70,4	
3'''	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	3,31-3,40 m	70,7	3,30 m	70,7	
4'''	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	3,11 m	71,8	3,11 m	71,8	
5'''	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	3,31-3,40 m	68,4	3,30 m	68,2	
6'''	---	---	---	---	1,00 d (6,0)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,08 d (6,0)	17,4	1,03 d (6,0)	17,4	

Deslocamento Químico ( $\delta$ =ppm); Constante de acoplamento ( $J$ =Hz); Solvente: DMSO-d<sub>6</sub>; no=não observado



Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN dos triterpenos identificados em *M. elliptica*

Posição	MeT1			MeT2			MeT3			MeT4		
	$^1H$	$^{13}C$	DEPT 90° DEPT 135°	$^1H$	$^{13}C$	DEPT 90° DEPT 135°	$^1H$	$^{13}C$	DEPT 90° DEPT 135°	$^1H$	$^{13}C$	DEPT 90° DEPT 135°
<b>1</b>	1,50 <i>m</i>	38,3	CH <sub>2</sub>	1,50 <i>m</i>	38,1	CH <sub>2</sub>	0,70 <i>m</i> 1,80 <i>m</i>	46,8	CH <sub>2</sub>	0,70 <i>m</i> 1,80 <i>m</i>	46,6	CH <sub>2</sub>
<b>2</b>	1,42 <i>m</i>	27,0	CH <sub>2</sub>	1,42 <i>m</i>	27,0	CH <sub>2</sub>	3,50 <i>m</i>	67,4	CH-OH	3,50 <i>m</i>	67,4	CH-OH
<b>3</b>	2,99 <i>dd</i> (10,5; 5,5)	76,9	CH-OH	2,99 <i>dd</i> (10,5; 5,5)	76,9	CH-OH	3,18 <i>d</i> (11)	75,6	CH-OH	3,18 <i>d</i> (11)	75,6	CH-OH
<b>4</b>	---	38,4	C	---	38,4	C	---	42,4	C	---	42,4	
<b>5</b>	0,65 <i>m</i>	54,8	CH	0,65 <i>m</i>	54,8	CH	1,20 <i>m</i>	46,0	CH	1,20 <i>m</i>	46,0	
<b>6</b>	0,88 <i>m</i>	18,0	CH <sub>2</sub>	0,88 <i>m</i>	18,0	CH <sub>2</sub>	1,36 <i>m</i>	17,4	CH <sub>2</sub>	1,36 <i>m</i>	17,4	CH <sub>2</sub>
<b>7</b>	1,26 <i>m</i>	32,7	CH <sub>2</sub>	1,26 <i>m</i>	32,5	CH <sub>2</sub>	1,18 <i>m</i> 1,48 <i>m</i>	32,1	CH <sub>2</sub>	1,18 <i>m</i> 1,48 <i>m</i>	31,9	CH <sub>2</sub>
<b>8</b>	---	36,6	C	---	36,7	C	---	41,7	C	---	41,7	C
<b>9</b>	1,44 <i>m</i>	47,1	CH	1,44 <i>m</i>	47,2	CH	1,50 <i>m</i>	46,9	CH	NO	NO	
<b>10</b>	---	36,6	C	---	36,7	C	---	37,3	C	---	37,3	C
<b>11</b>	1,78 <i>m</i>	22,9	CH <sub>2</sub>	1,78 <i>m</i>	23,0	CH <sub>2</sub>	1,84 <i>m</i>	22,9	CH <sub>2</sub>	1,84 <i>m</i>	22,9	CH <sub>2</sub>
<b>12</b>	5,11 <i>m</i>	124,6	CH (DUPLA)	5,15 <i>m</i>	121,5	CH (DUPLA)	5,16 <i>m</i>	124,4	CH (dupla)	5,18 <i>m</i>	121,4	CH (dupla)
<b>13</b>	---	138,2	C (DUPLA)	---	141,7	C (DUPLA)	---	138,2	C (dupla)	---	143,8	C (dupla)
<b>14</b>	---	41,7	C	---	41,4	C	---	37,2	C	NO	NO	
<b>15</b>	1,44 <i>m</i>	27,6	CH <sub>2</sub>	1,44 <i>m</i>	27,3	CH <sub>2</sub>	0,96 <i>m</i>	27,5	CH <sub>2</sub>	0,96 <i>m</i>	27,2	CH <sub>2</sub>
<b>16</b>	1,49 <i>m</i>	23,9	CH <sub>2</sub>	1,49 <i>m</i>	23,9	CH <sub>2</sub>	1,52 <i>m</i>	23,8	CH <sub>2</sub>	1,52 <i>m</i>	23,8	CH <sub>2</sub>
<b>17</b>	---	46,9	C	---	46,9	C	---	46,7	C	---	46,7	C
<b>18</b>	2,09 <i>d</i> (11,5)	52,4	CH	2,72 <i>m</i>	40,9	CH	2,09 <i>d</i> (3,5)	52,3	CH	2,73 <i>dd</i> (4,0; 13,5)	40,7	CH
<b>19</b>	NO	38,6	CH	NO	45,7	CH <sub>2</sub>	0,90 <i>m</i>	38,5	CH	NO	NO	
<b>20</b>	NO	38,5	CH	NO	39,0	C	0,90 <i>m</i>	38,4	CH	NO	NO	
<b>21</b>	1,22 <i>m</i>	30,2	CH <sub>2</sub>	1,22 <i>m</i>	31,1	CH <sub>2</sub>	1,42 <i>m</i>	30,1	CH <sub>2</sub>	NO	NO	
<b>22</b>	1,60 <i>m</i>	36,3	CH <sub>2</sub>	1,60 <i>m</i>	33,4	CH <sub>2</sub>	1,55 <i>m</i>	36,3	CH <sub>2</sub>	1,55 <i>m</i>	36,3	CH <sub>2</sub>
<b>23</b>	0,88 <i>s</i>	21,1	CH <sub>3</sub>	0,88 <i>s</i>	21,1	CH <sub>3</sub>	3,05 <i>d</i> (3,5) 3,30 <i>d</i> (11)	64,0	CH <sub>2</sub> -OH	3,05 <i>d</i> (3,5) 3,30 <i>d</i> (11)	64,0	CH <sub>2</sub> -OH
<b>24</b>	0,66 <i>s</i>	16,1	CH <sub>3</sub>	0,70 <i>s</i>	16,0	CH <sub>3</sub>	0,53 <i>s</i>	13,7	CH <sub>3</sub>	0,53 <i>s</i>	13,6	CH <sub>3</sub>
<b>25</b>	0,85 <i>s</i>	15,2	CH <sub>3</sub>	0,84 <i>s</i>	16,0	CH <sub>3</sub>	0,86 <i>s</i>	32,7	CH <sub>3</sub>	NO	NO	
<b>26</b>	0,73 <i>s</i>	16,9	CH <sub>3</sub>	0,73 <i>s</i>	16,9	CH <sub>3</sub>	0,73 <i>s</i>	16,8	CH <sub>3</sub>	0,70 <i>s</i>	16,7	CH <sub>3</sub>
<b>27</b>	1,02 <i>s</i>	23,3	CH <sub>3</sub>	1,07 <i>s</i>	25,6	CH <sub>3</sub>	1,03 <i>s</i>	23,2	CH <sub>3</sub>	1,08 <i>s</i>	25,6	CH <sub>3</sub>
<b>28</b>	---	178,3	COOH	---	181,8	COOH	---	178,2	COOH	---	178,5	COOH
<b>29</b>	0,80 <i>d</i> (6,5)	17,0	CH <sub>3</sub>	0,86 <i>s</i>	32,9	CH <sub>3</sub>	0,80 <i>d</i> (6,5)	16,9	CH <sub>3</sub>	NO	NO	
<b>30</b>	0,89 <i>d</i> (6,5)	28,3	CH <sub>3</sub>	0,88 <i>s</i>	23,4	CH <sub>3</sub>	0,90 <i>m</i>	21,0	CH <sub>3</sub>	0,90 <i>m</i>	21,0	CH <sub>3</sub>

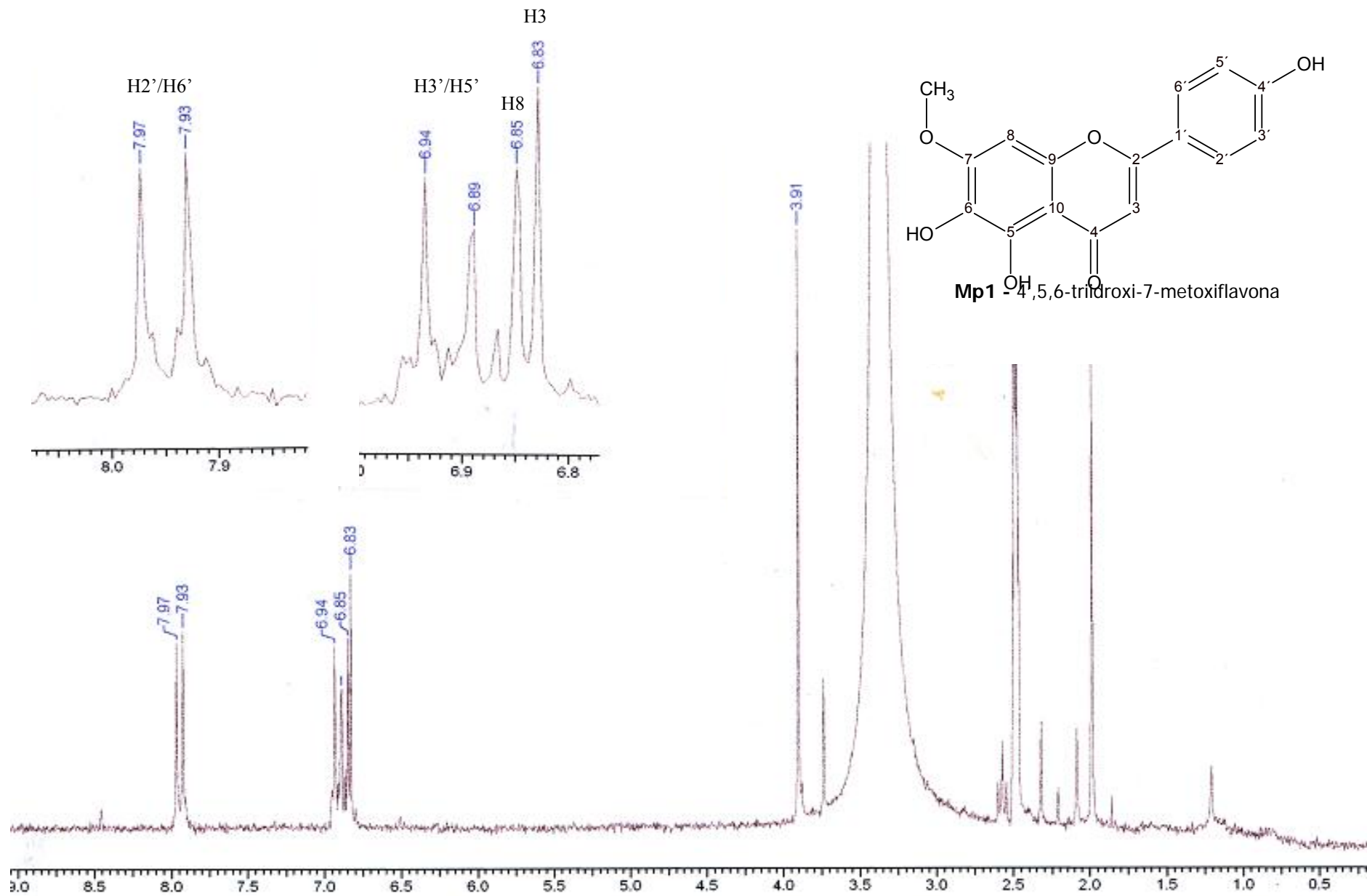
Deslocamento Químico ( $\delta$ =ppm); Constante de acoplamento ( $J$ =Hz); Solvente: DMSO-d<sub>6</sub>; no=não observado

Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN dos triterpenos identificados em *M. elliptica* (Continuação)

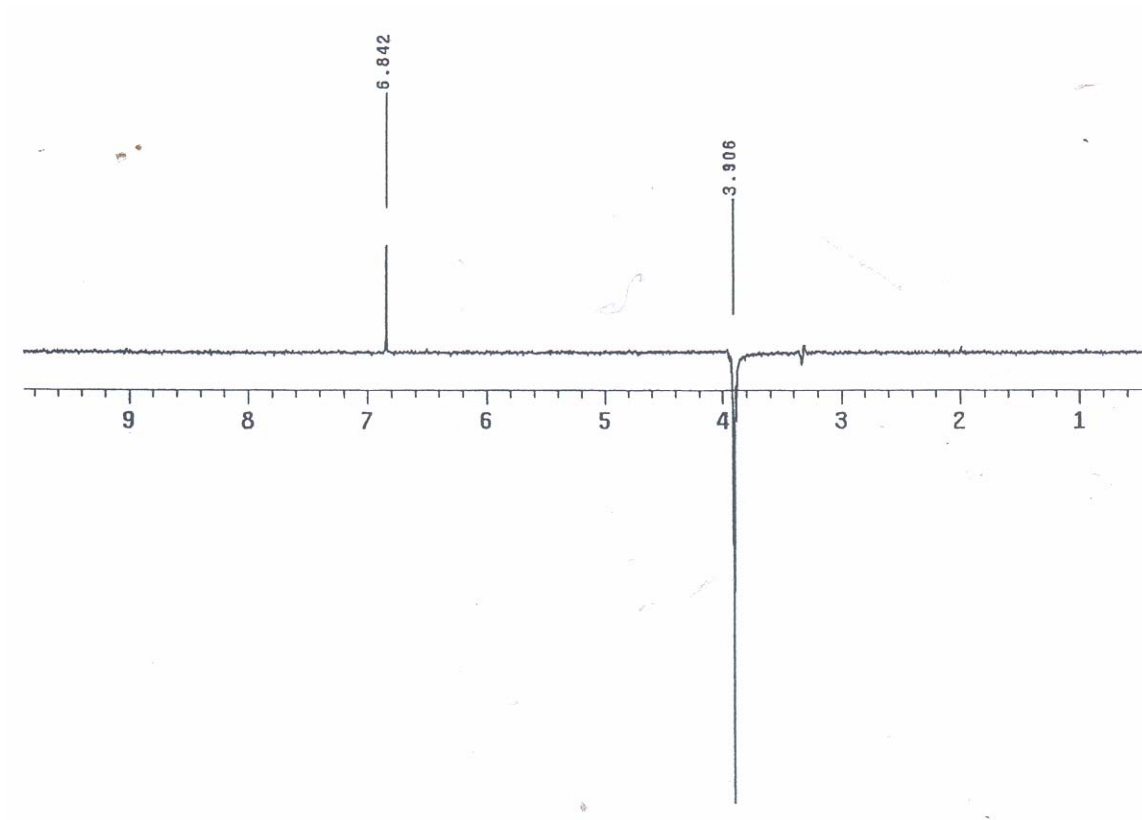
Posição	MeT5			MeT6			MeT7			MeT8		
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	DEPT 90° DEPT 135°	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	DEPT 90° DEPT 135°	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	DEPT 90° DEPT 135°	
<b>1</b>	0,78 <i>m</i> 1,78 <i>m</i>	46,9	CH <sub>2</sub>	0,76 <i>m</i> 1,78 <i>m</i>	47,1	NO	47,1	CH <sub>2</sub>	1,66 <i>m</i> 1,78 <i>m</i>	46,8	CH <sub>2</sub>	
<b>2</b>	3,42 <i>m</i>	67,1	CH-OH	3,42 <i>m</i>	67,2	3,57 <i>m</i>	66,8	CH-OH	3,50 <i>m</i>	67,4	CH-OH	
<b>3</b>	2,75 <i>d</i> (9,5)	82,3	CH-OH	2,75 <i>d</i> (9,5)	82,3	2,86 <i>d</i> (9,5)	83,8	CH-OH	3,18 <i>d</i> (9,5)	75,6	CH-OH	
<b>4</b>	---	38,8	C	---	38,9	---	42,9	C	---	42,4	C	
<b>5</b>	0,78 <i>m</i>	54,8	CH	0,74 <i>m</i>	54,7	0,82 <i>m</i>	55,3	CH	1,23 <i>m</i>	46,0	CH	
<b>6</b>	1,36 <i>m</i>	18,1	CH <sub>2</sub>	1,42 <i>m</i>	18,0	1,36 <i>m</i>	18,7	CH <sub>2</sub>	0,80 <i>m</i>	17,5	CH <sub>2</sub>	
<b>7</b>	1,24 <i>m</i> 1,46 <i>m</i>	32,6	CH <sub>2</sub>	0,86 <i>m</i> 1,26 <i>m</i>	32,6	NO	33,0	CH <sub>2</sub>	1,18 <i>m</i>	32,2	CH <sub>2</sub>	
<b>8</b>	---	37,6	C	---	39,2	---	39,0	C	---	39,0	C	
<b>9</b>	1,60 <i>m</i>	46,6	CH	1,48 <i>m</i>	46,8	NO	47,0	CH	0,74 <i>m</i>	46,6	CH	
<b>10</b>	---	37,6	C	---	37,5	---	37,4	C	---	37,3	C	
<b>11</b>	1,84 <i>m</i>	23,1	CH <sub>2</sub>	1,85 <i>m</i>	22,9	1,85 <i>m</i>	23,1	CH <sub>2</sub>	1,90 <i>m</i>	23,2	CH <sub>2</sub>	
<b>12</b>	5,18 <i>m</i>	126,7	CH (dupla)	5,12 <i>m</i>	124,4	5,13 <i>m</i>	124,4	CH (dupla)	5,17 <i>m</i>	126,7	CH (dupla)	
<b>13</b>	---	138,6	C (dupla)	---	138,3	---	138,2	C (dupla)	---	138,6	C (dupla)	
<b>14</b>	---	41,1	C	---	41,7	---	41,6	C	---	41,1	C	
<b>15</b>	0,84 <i>m</i>	28,0	CH <sub>2</sub>	NO	27,5	0,98 <i>m</i>	27,4	CH <sub>2</sub>	0,88 <i>m</i>	28,0	CH <sub>2</sub>	
<b>16</b>	1,40 <i>m</i>	25,1	CH <sub>2</sub>	1,50 <i>m</i>	23,8	0,88 <i>m</i>	23,8	CH <sub>2</sub>	1,40 <i>m</i>	25,1	CH <sub>2</sub>	
<b>17</b>	---	46,9	C	---	47,0	---	46,8	C	---	46,9	C	
<b>18</b>	2,38 <i>s</i>	53,1	CH	2,11 <i>d</i> (10,0)	52,4	2,11 <i>d</i> (11,5)	52,3	CH	2,38 <i>sl</i>	53,1	CH	
<b>19</b>	---	71,6	C-OH	1,28 <i>m</i>	38,5	NO	38,5	CH	---	71,6	C-OH	
<b>20</b>	1,26 <i>m</i>	41,3	CH	0,75 <i>m</i>	38,4	NO	38,4	CH	1,27 <i>m</i>	41,3	CH	
<b>21</b>	1,42 <i>m</i>	25,9	CH <sub>2</sub>	1,41 <i>m</i>	30,2	NO	30,1	CH <sub>2</sub>	1,16 <i>m</i>	25,9	CH <sub>2</sub>	
<b>22</b>	1,60 <i>m</i>	37,2	CH <sub>2</sub>	1,56 <i>m</i>	36,3	1,58 <i>m</i>	36,3	CH <sub>2</sub>	1,62 <i>m</i>	37,2	CH <sub>2</sub>	
<b>23</b>	0,93 <i>s</i>	28,7	CH <sub>3</sub>	0,91 <i>s</i>	28,8	1,09 <i>s</i>	23,4	CH <sub>3</sub>	3,05 <i>d</i> (10,5) 3,31 <i>m</i>	63,9	CH <sub>2</sub> -OH	
<b>24</b>	0,71 <i>s</i>	17,0	CH <sub>3</sub>	0,69 <i>s</i>	17,1	3,28 <i>m</i> 3,74 <i>d</i> (11,0)	63,8	CH <sub>2</sub> -OH	0,55 <i>s</i>	13,6	CH <sub>3</sub>	
<b>25</b>	0,91 <i>s</i>	16,2	CH <sub>3</sub>	0,90 <i>s</i>	16,4	0,92 <i>s</i>	16,9	CH <sub>3</sub>	0,92 <i>s</i>	16,7	CH <sub>3</sub>	
<b>26</b>	0,70 <i>s</i>	16,6	CH <sub>3</sub>	0,73 <i>s</i>	17,0	0,72 <i>s</i>	16,6	CH <sub>3</sub>	0,70 <i>s</i>	16,2	CH <sub>3</sub>	
<b>27</b>	1,29 <i>s</i>	23,9	CH <sub>3</sub>	1,02 <i>s</i>	23,3	1,04 <i>s</i>	23,2	CH <sub>3</sub>	1,29 <i>s</i>	24,0	CH <sub>3</sub>	
<b>28</b>	---	178,8	COOH	---	178,2	---	178,2	COOH	---	178,9	COOH	
<b>29</b>	0,85 <i>d</i> (6,5)	16,2	CH <sub>3</sub>	0,80 <i>d</i> (6,5)	17,0	0,82 <i>d</i> (6,5)	16,7	CH <sub>3</sub>	1,08 <i>s</i>	26,4	CH <sub>3</sub>	
<b>30</b>	1,08 <i>s</i>	26,3	CH <sub>3</sub>	0,89 <i>m</i>	21,0	0,91 <i>m</i>	21,0	CH <sub>3</sub>	0,84 <i>d</i> (7,0)	16,6	CH <sub>3</sub>	

Deslocamento Químico ( $\delta$ =ppm); Constante de acoplamento ( $J$ =Hz); Solvente: DMSO-d<sub>6</sub>; no=não observado

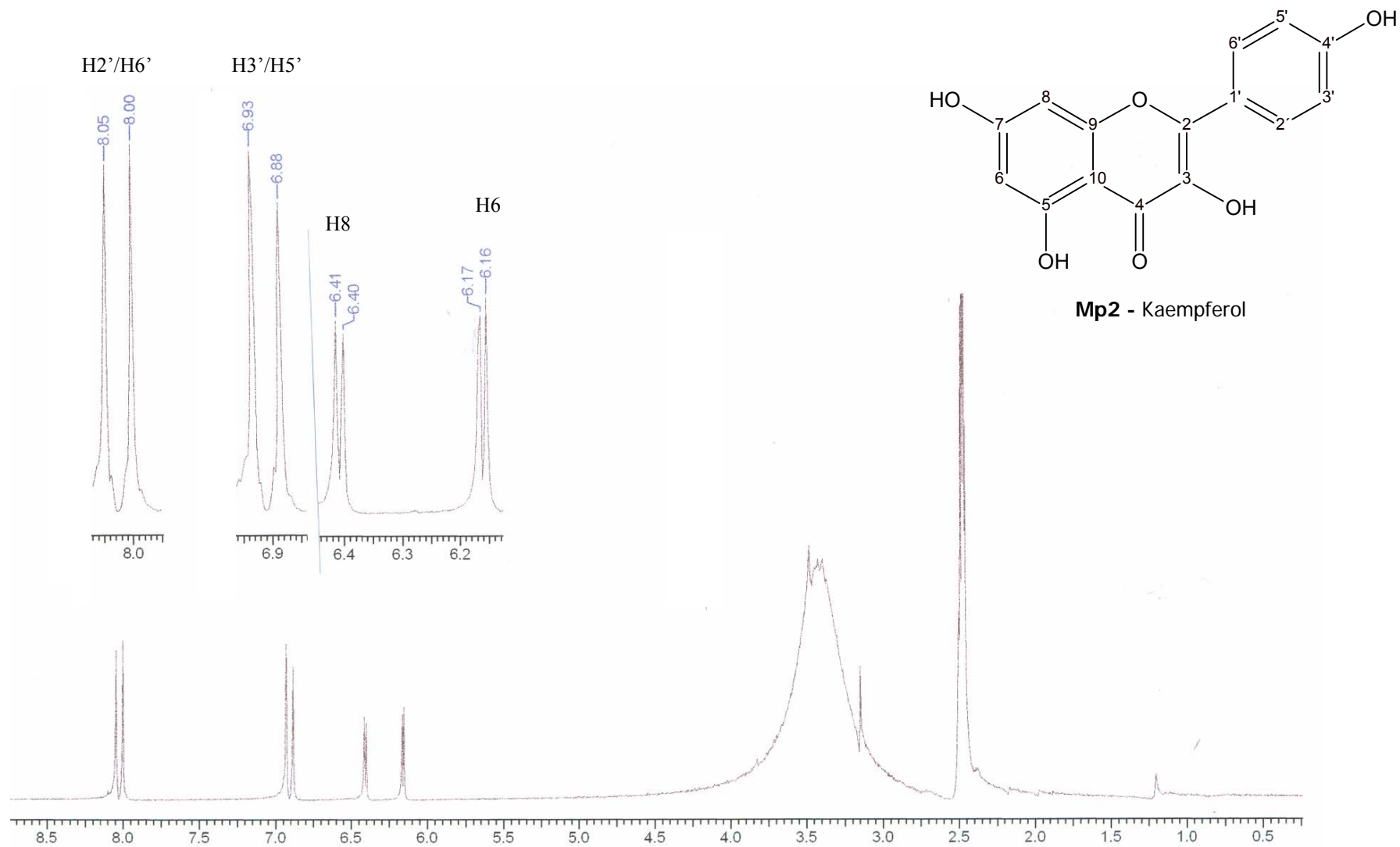
**Espectros - RMN**



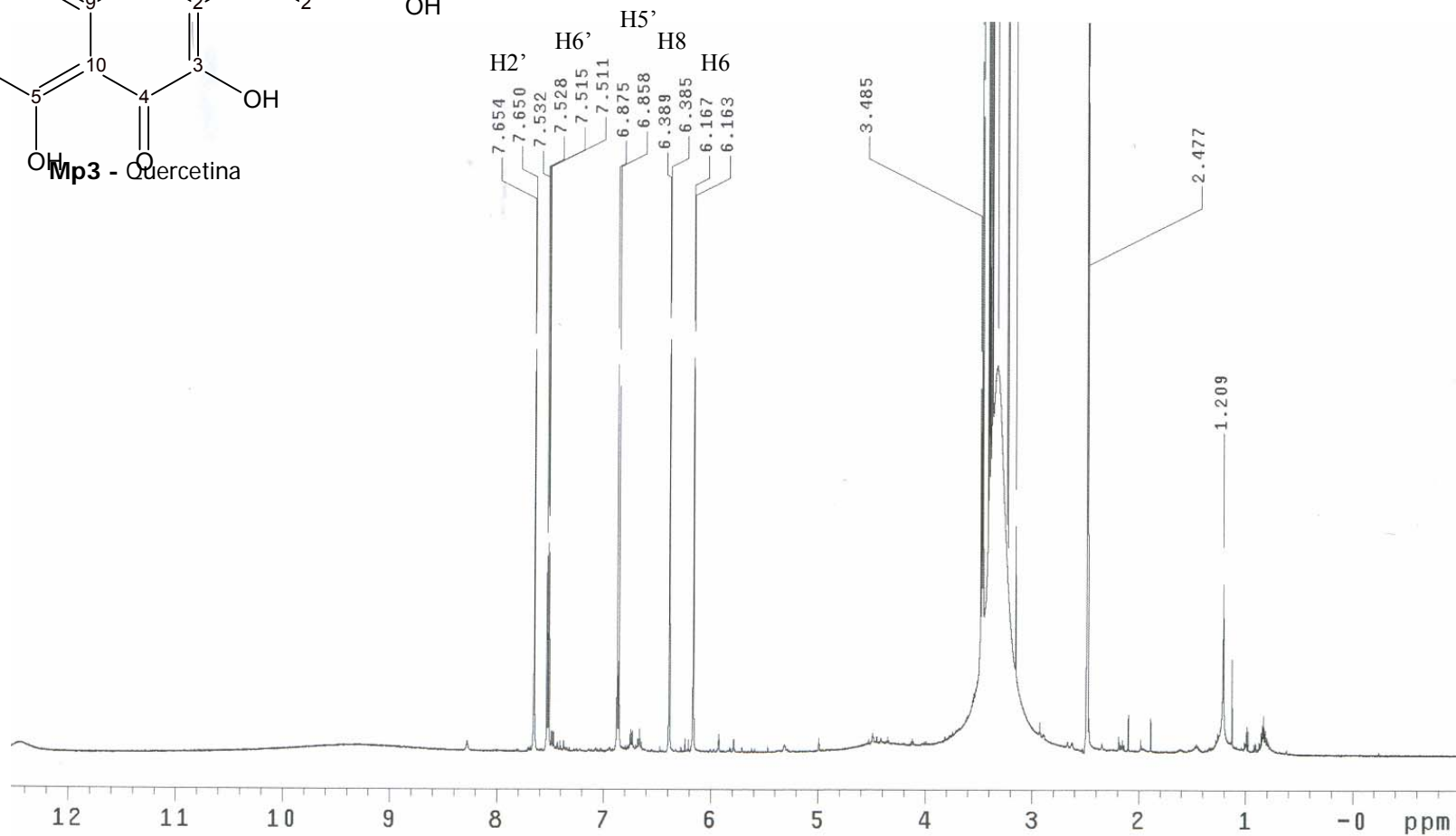
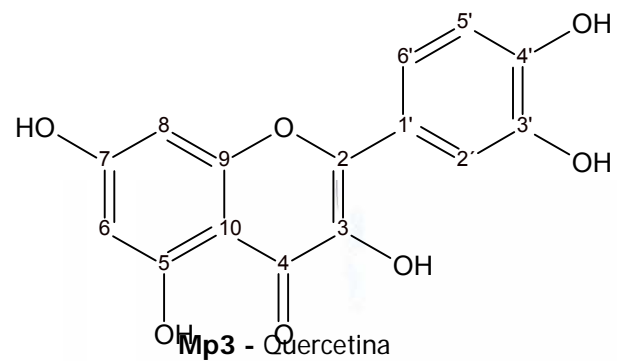
**Espectro 1:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **Mp1** (200MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , TMS).



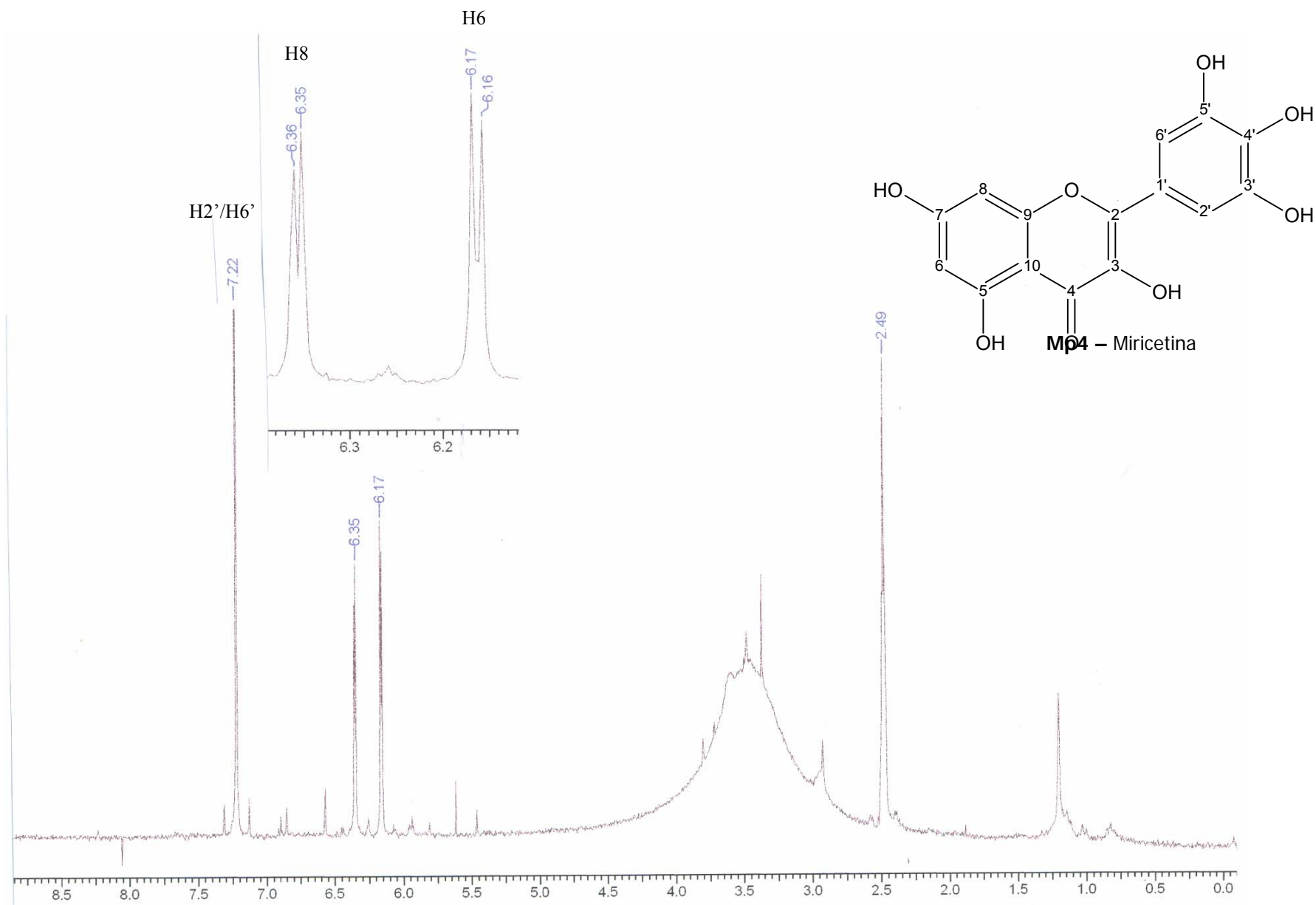
**Espectro 2:** Experimento NOESY-1D de **Mp1** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



**Espectro 3:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **Mp2** (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , TMS).

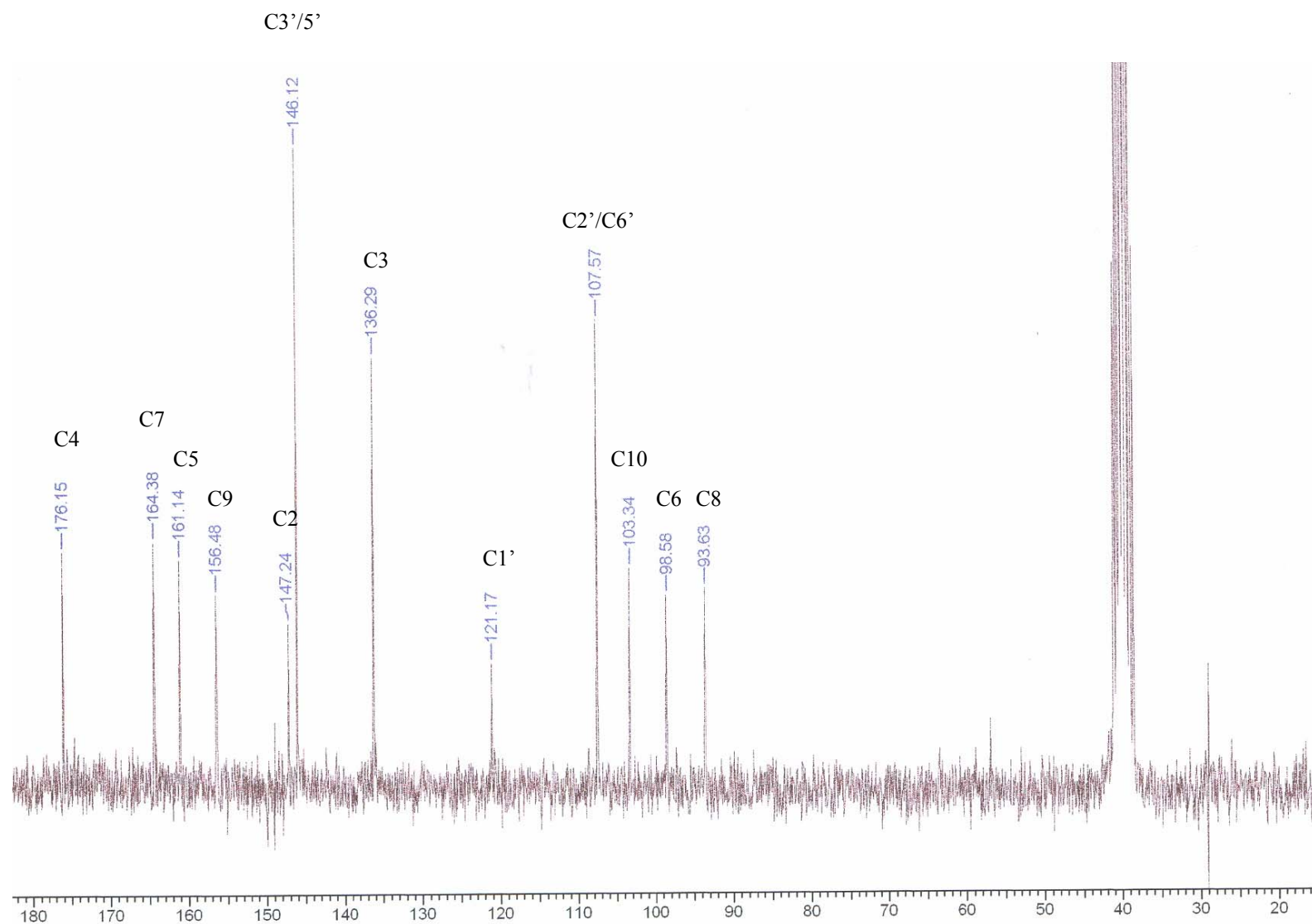


**Espectro 4:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **Mp3** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).

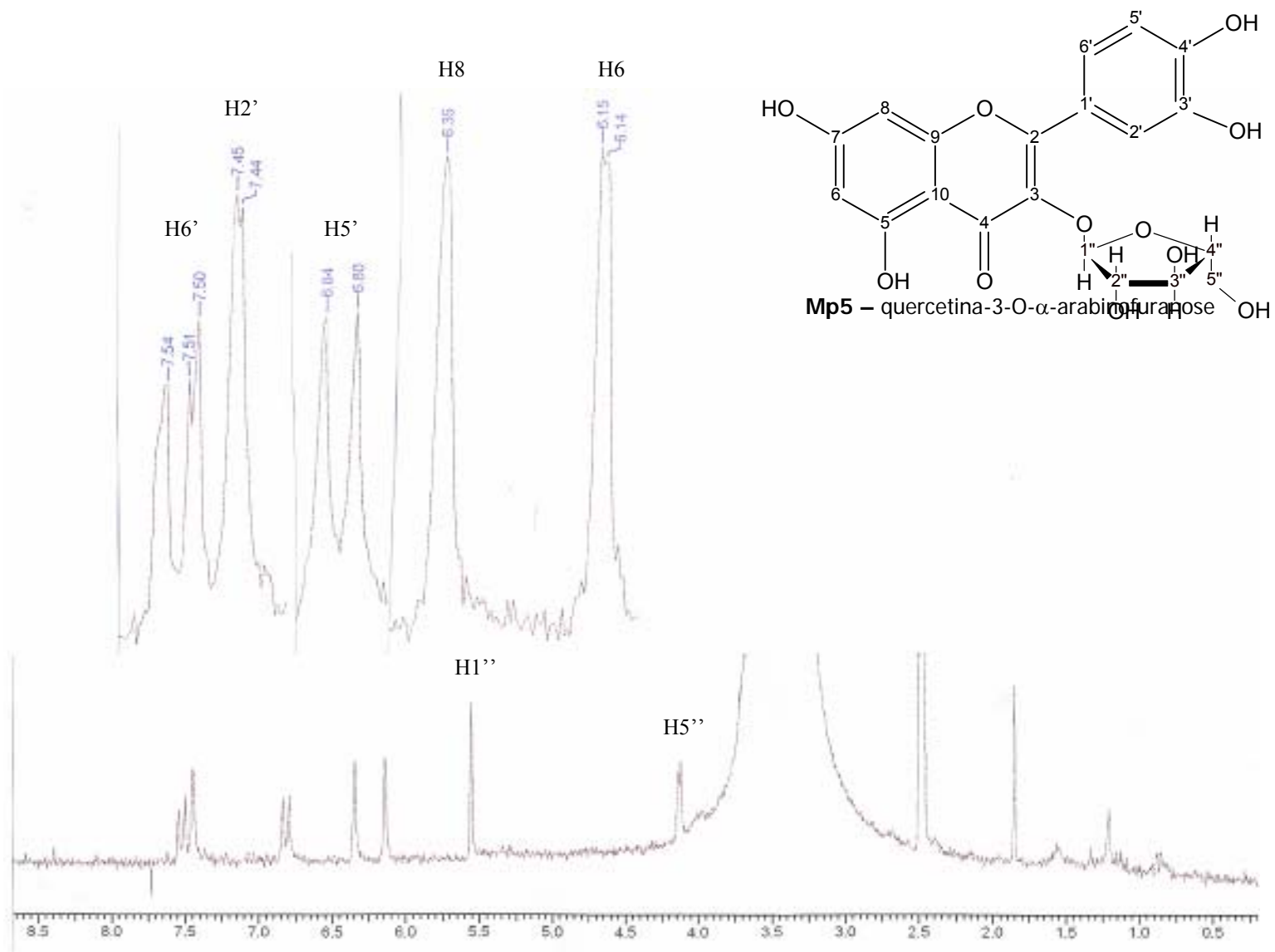


**Espectro 5:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **Mp4** (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

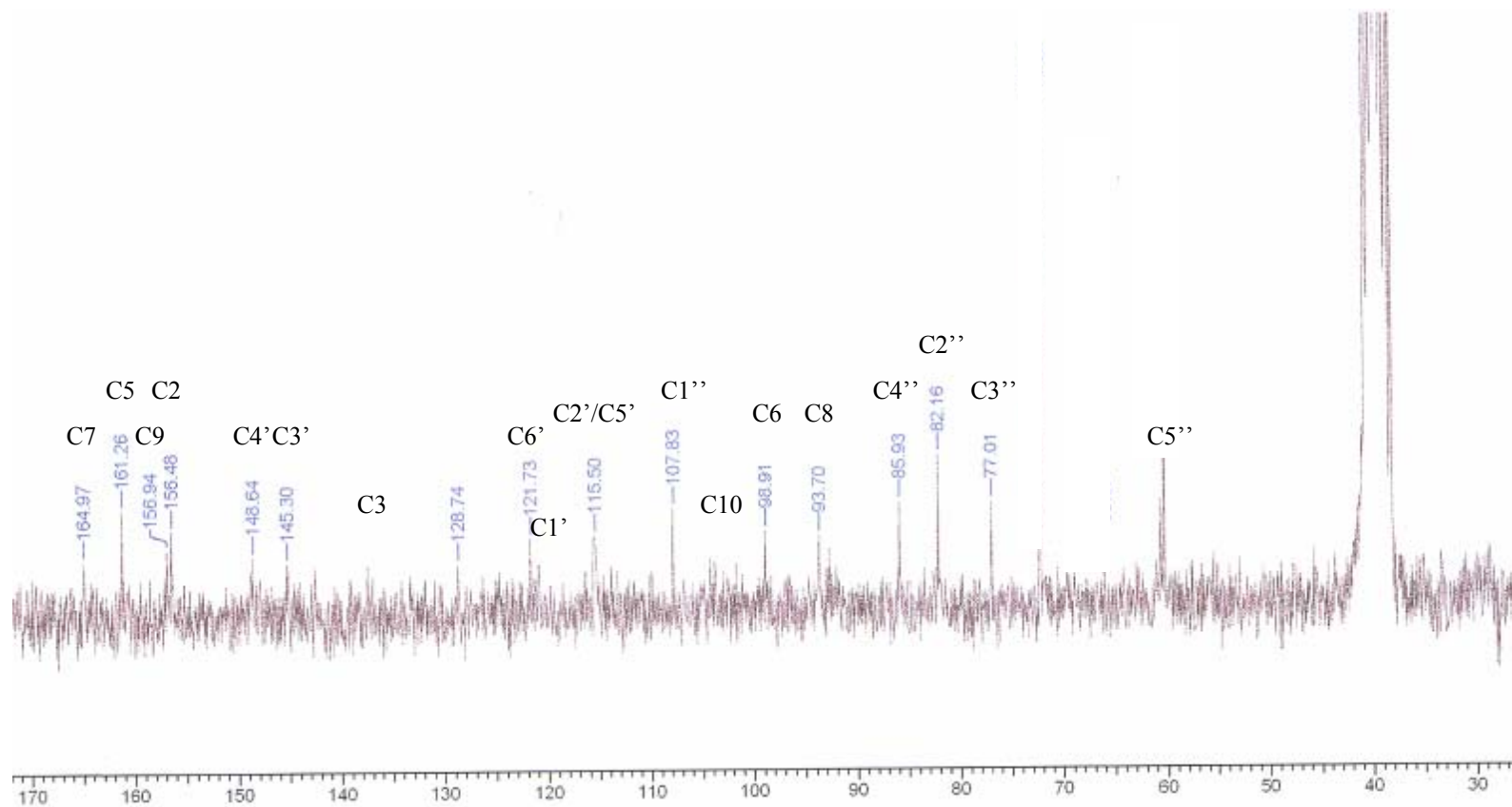




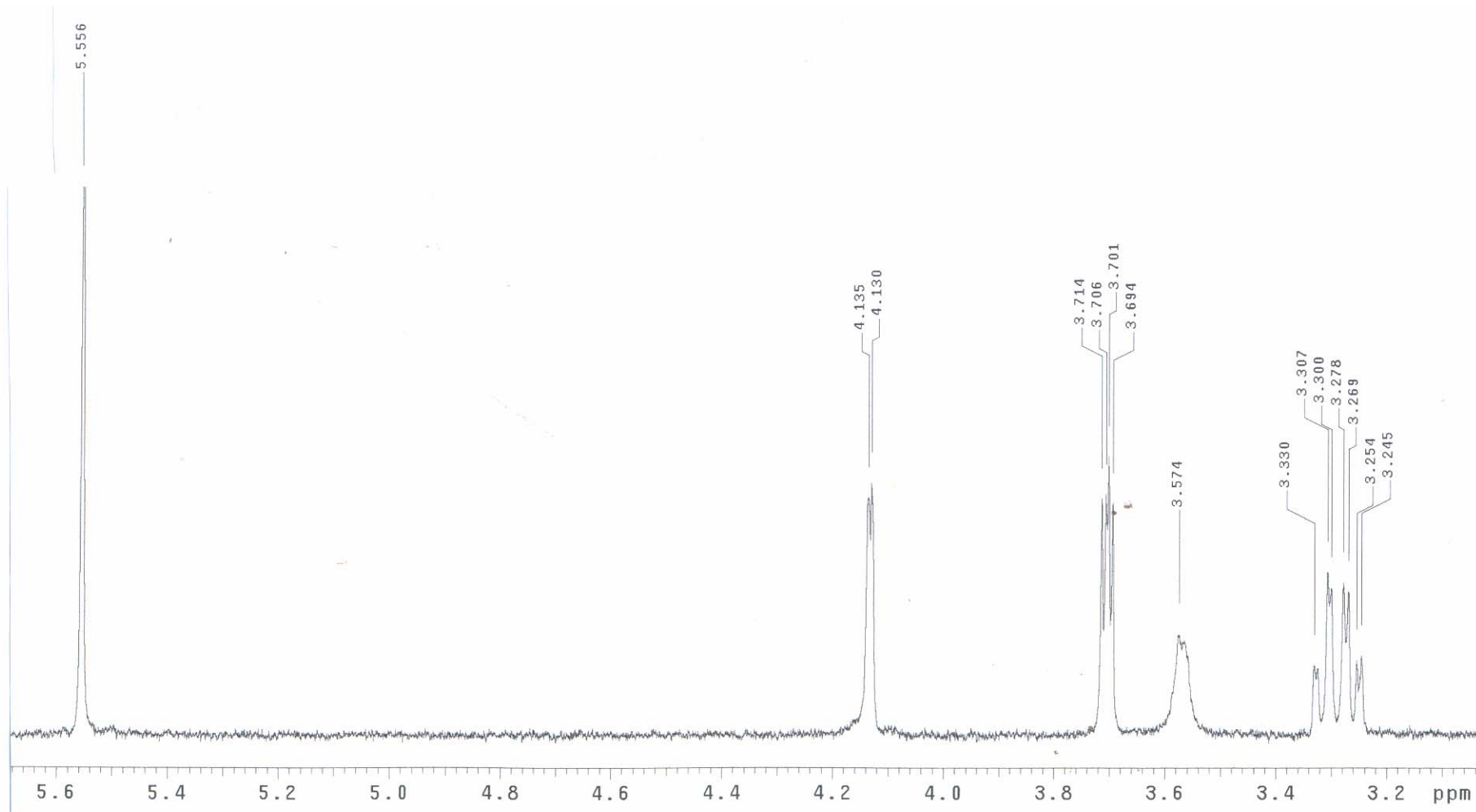
**Espectro 6:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de **Mp4** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



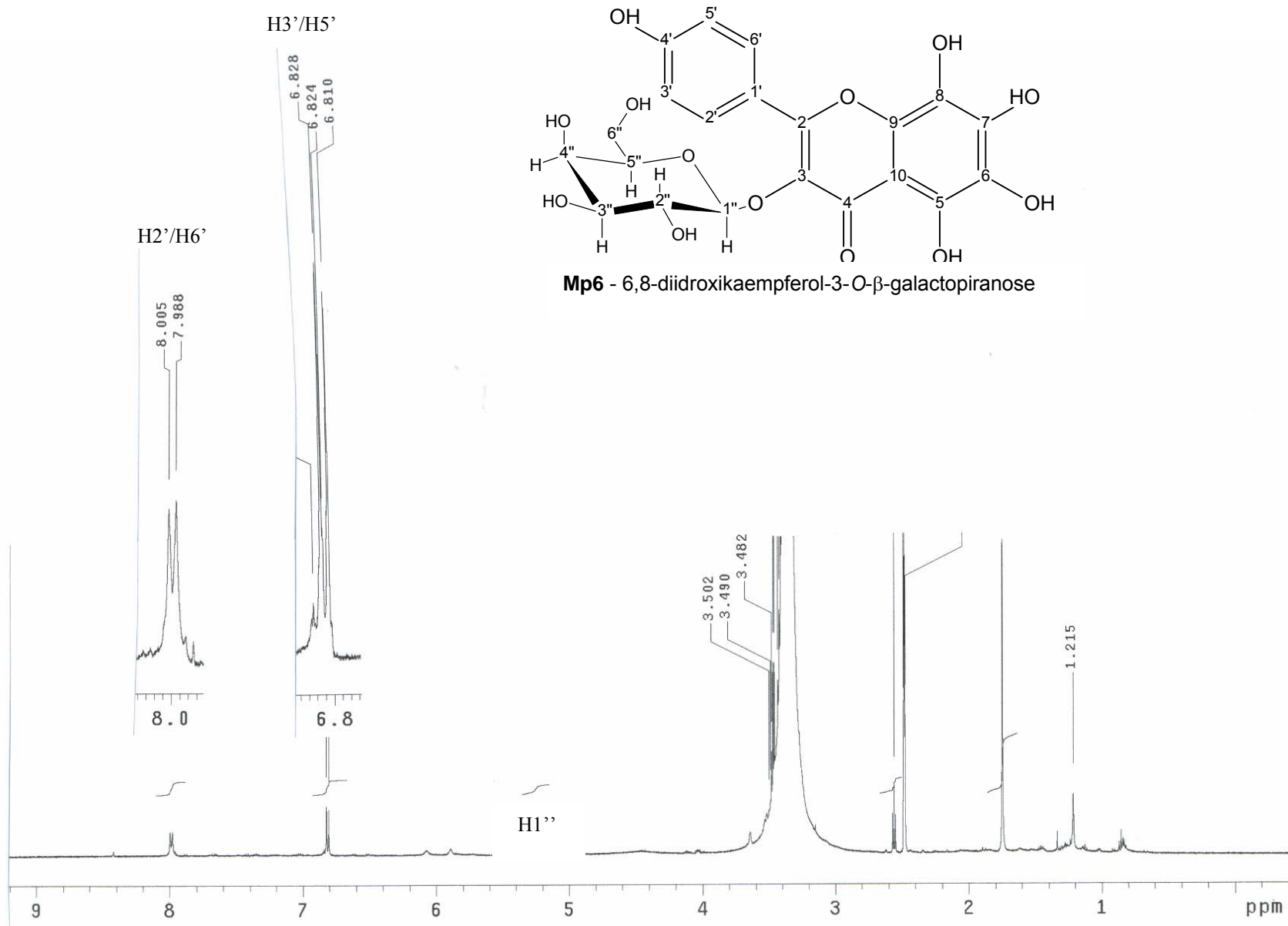
**Espectro 7:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **Mp5** (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , TMS).



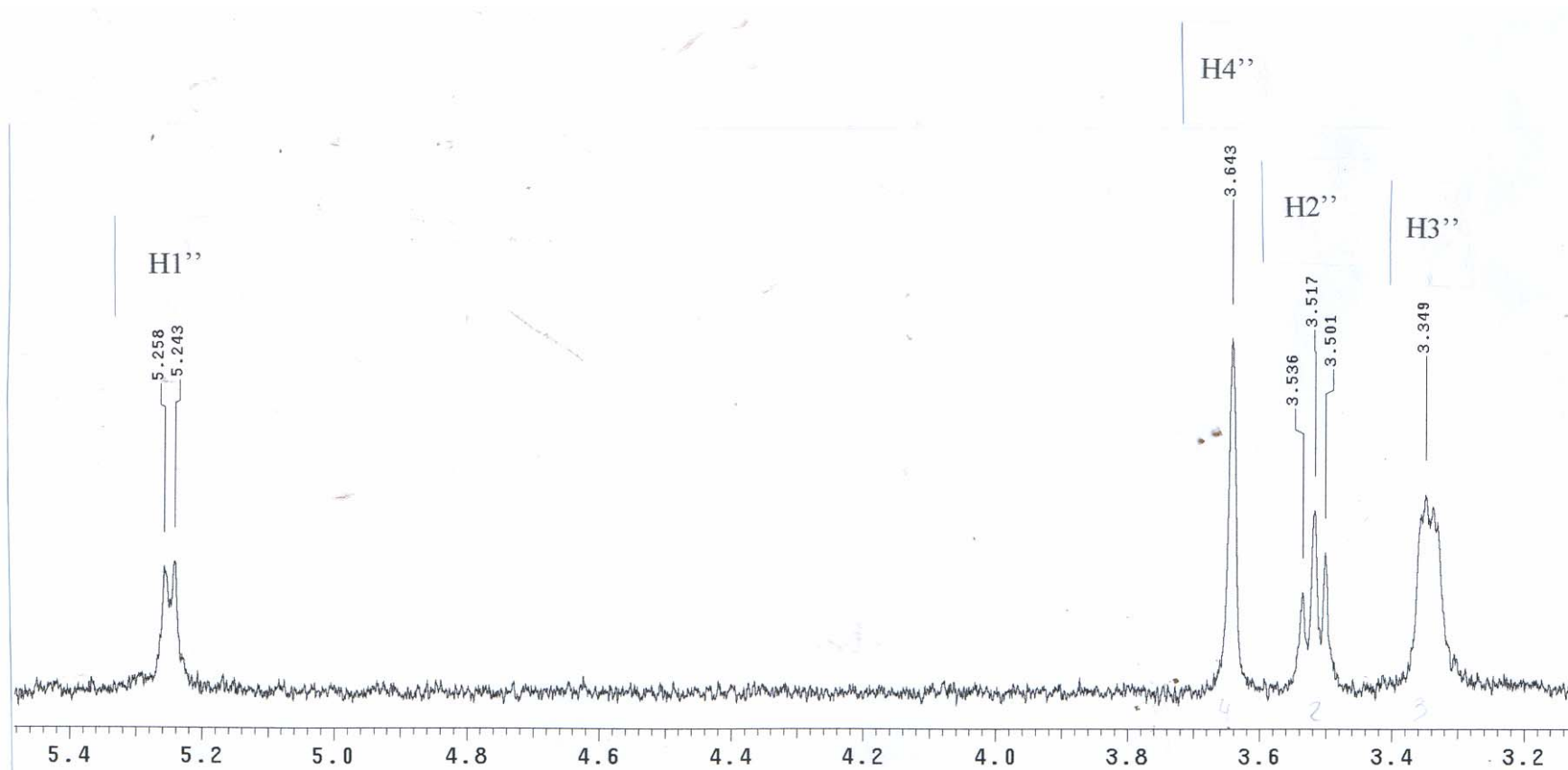
**Espectro 8:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **Mp5** (125 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



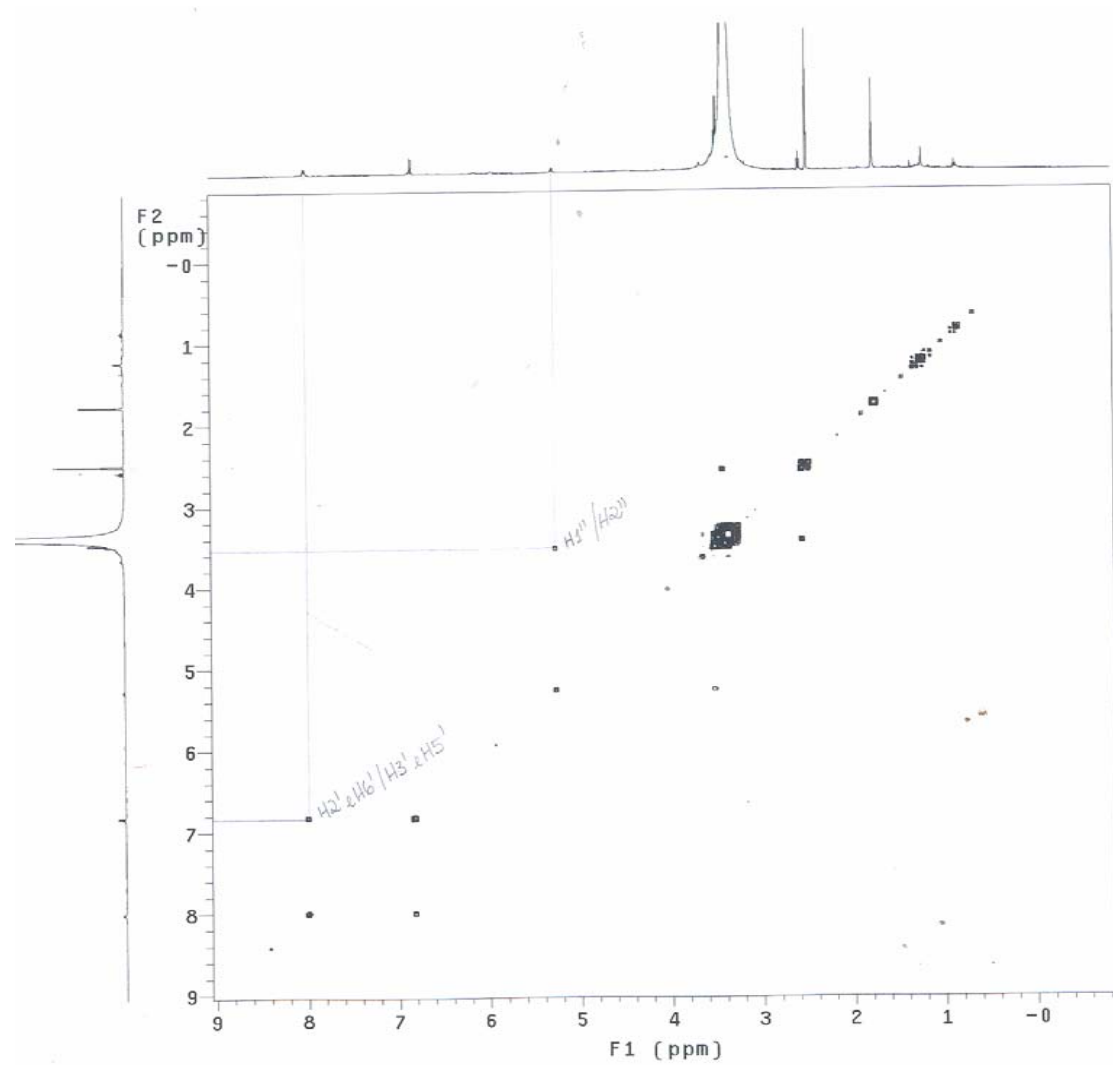
**Espectro 9:** Experimento TOCSY-1D de **Mp5** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, irradiado em  $\delta$  5,56 ppm).



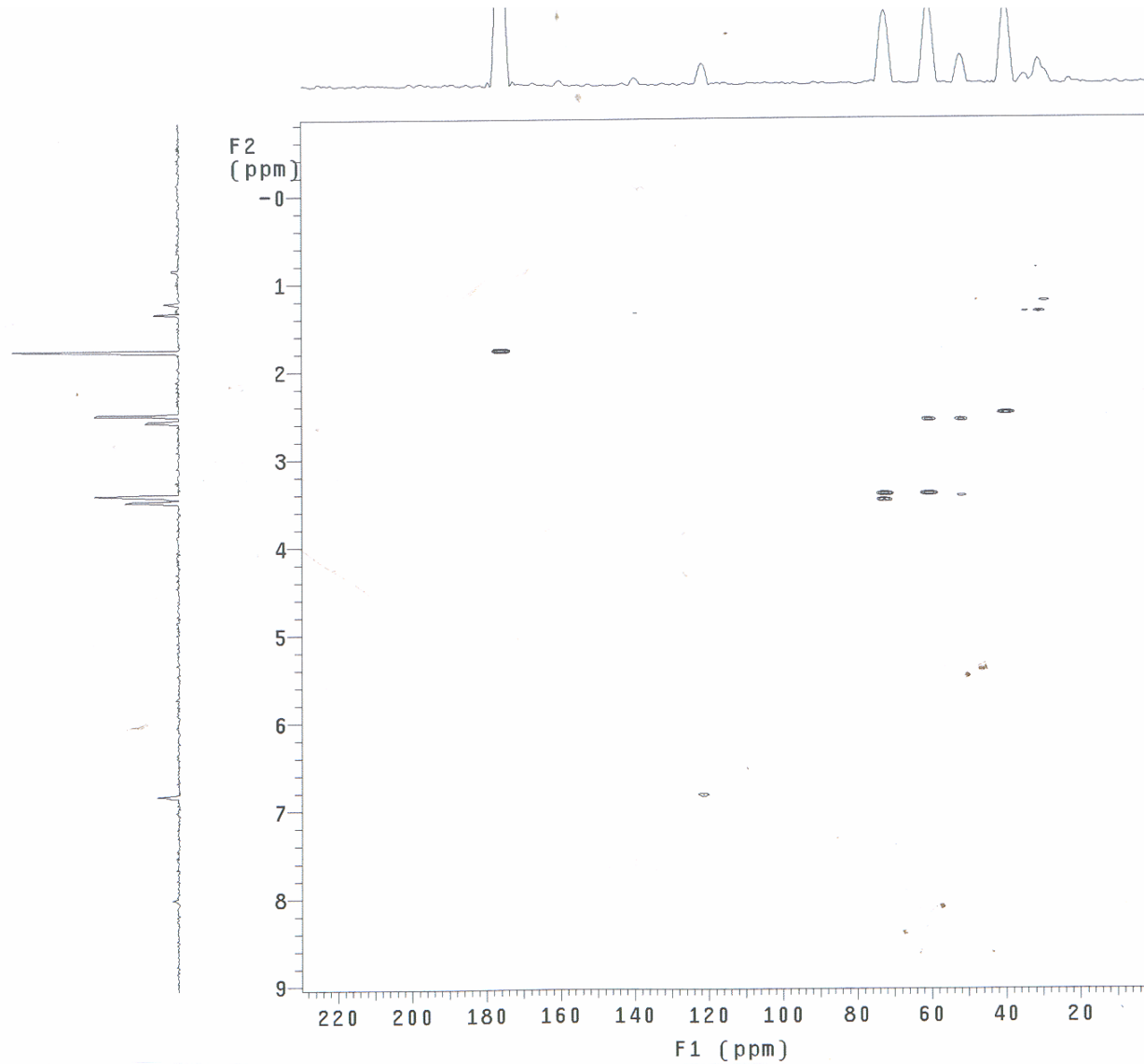
**Espectro 10:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de Mp6 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



**Espectro 11:** Experimento TOCSY-1D de **Mp6** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, irradiado em  $\delta$ 5,25 ppm).

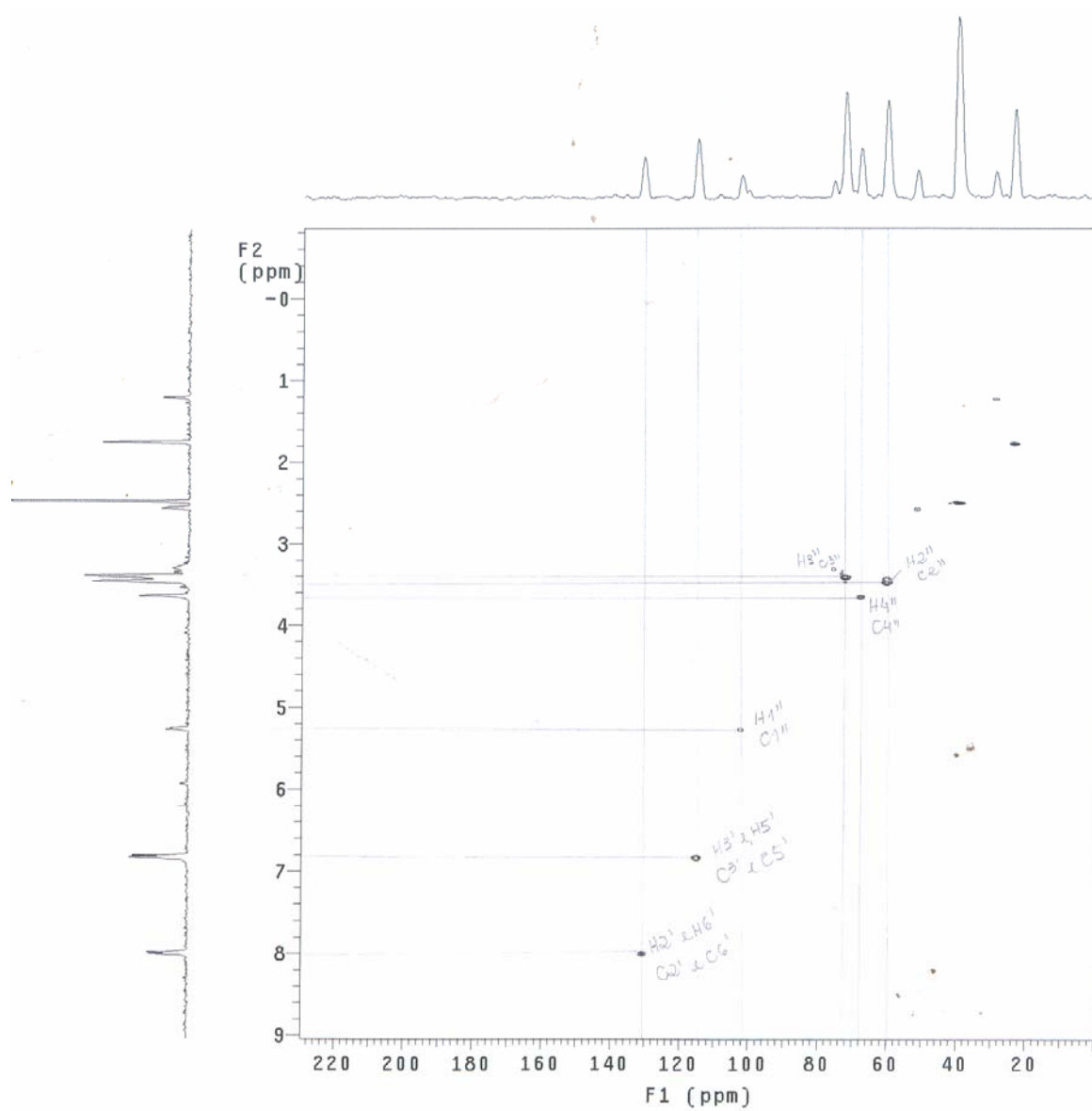


**Espectro 12:** Experimento COSY-  $^1\text{H}/^1\text{H}$  de **Mp6** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).

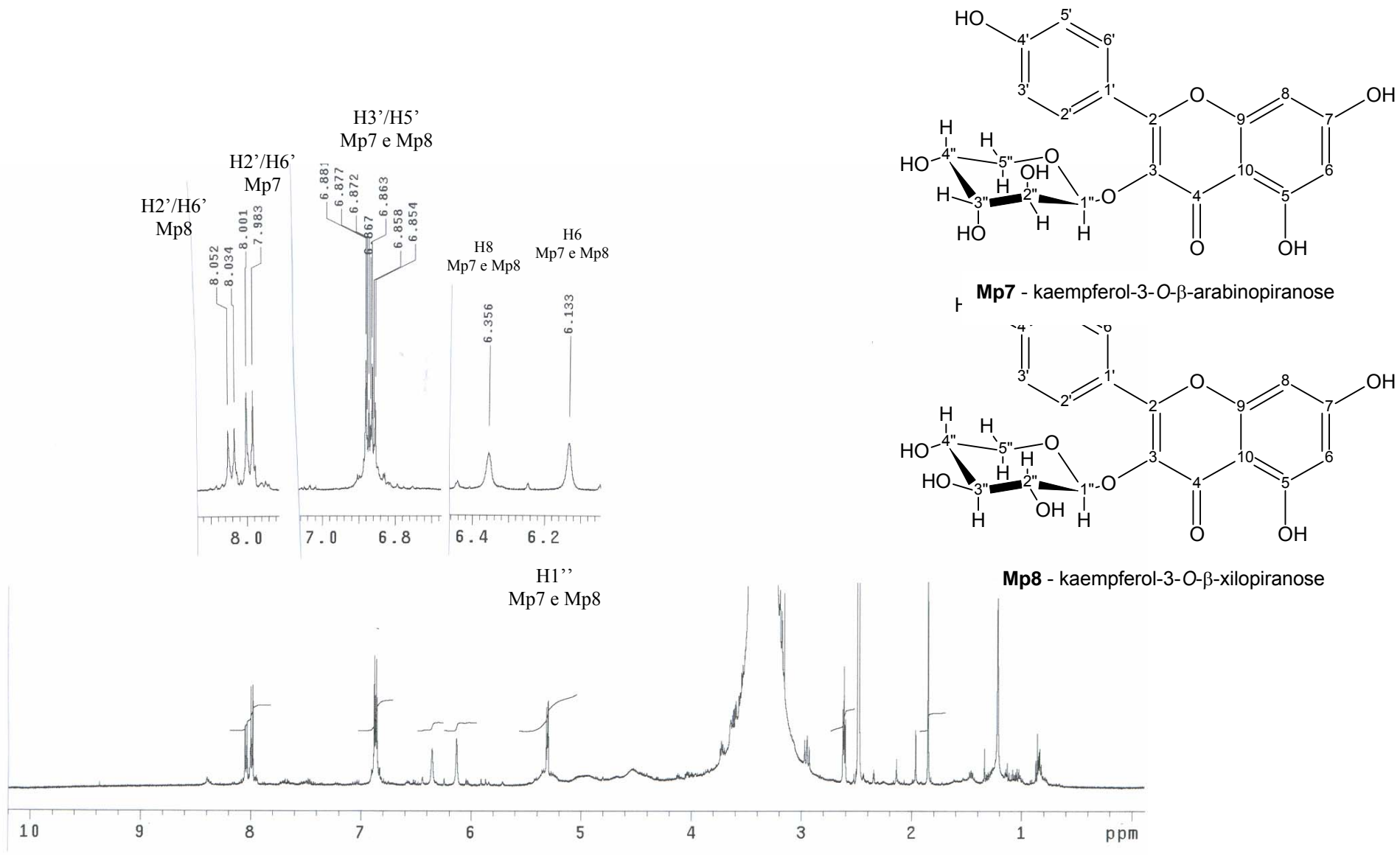


**Espectro 13:** Experimento gHMBC de **Mp6** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

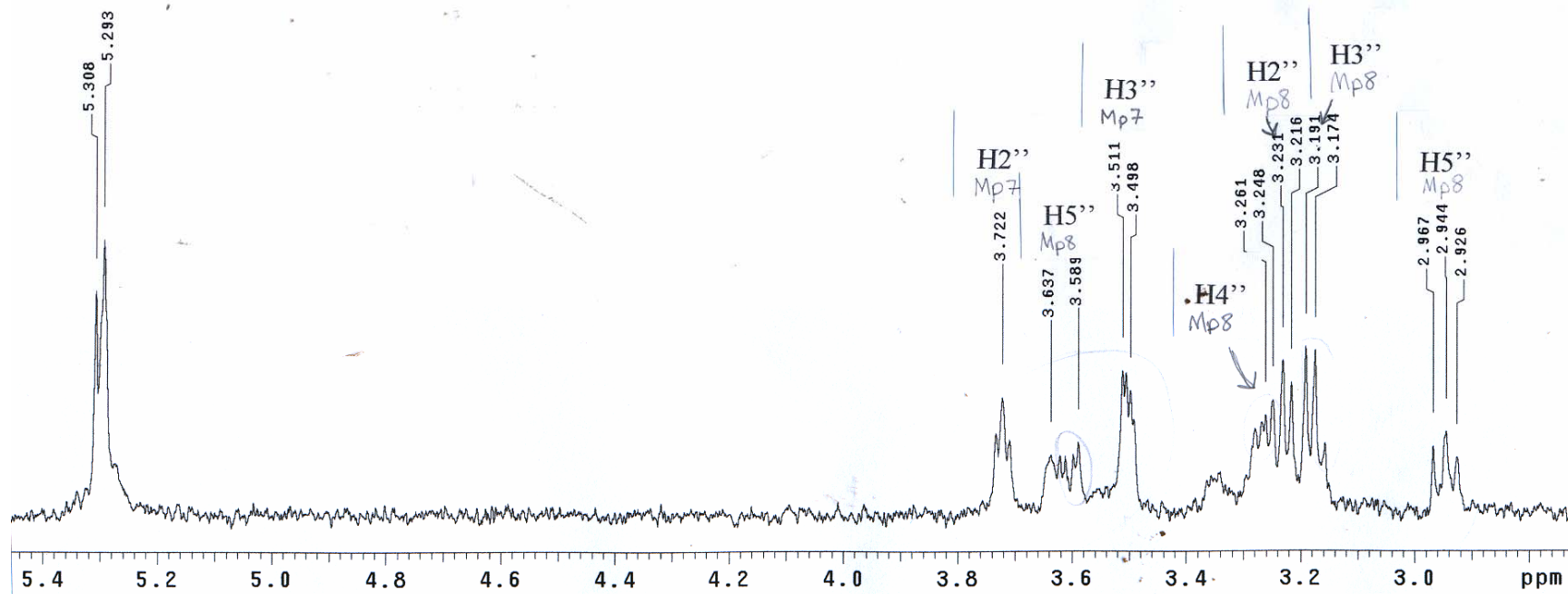




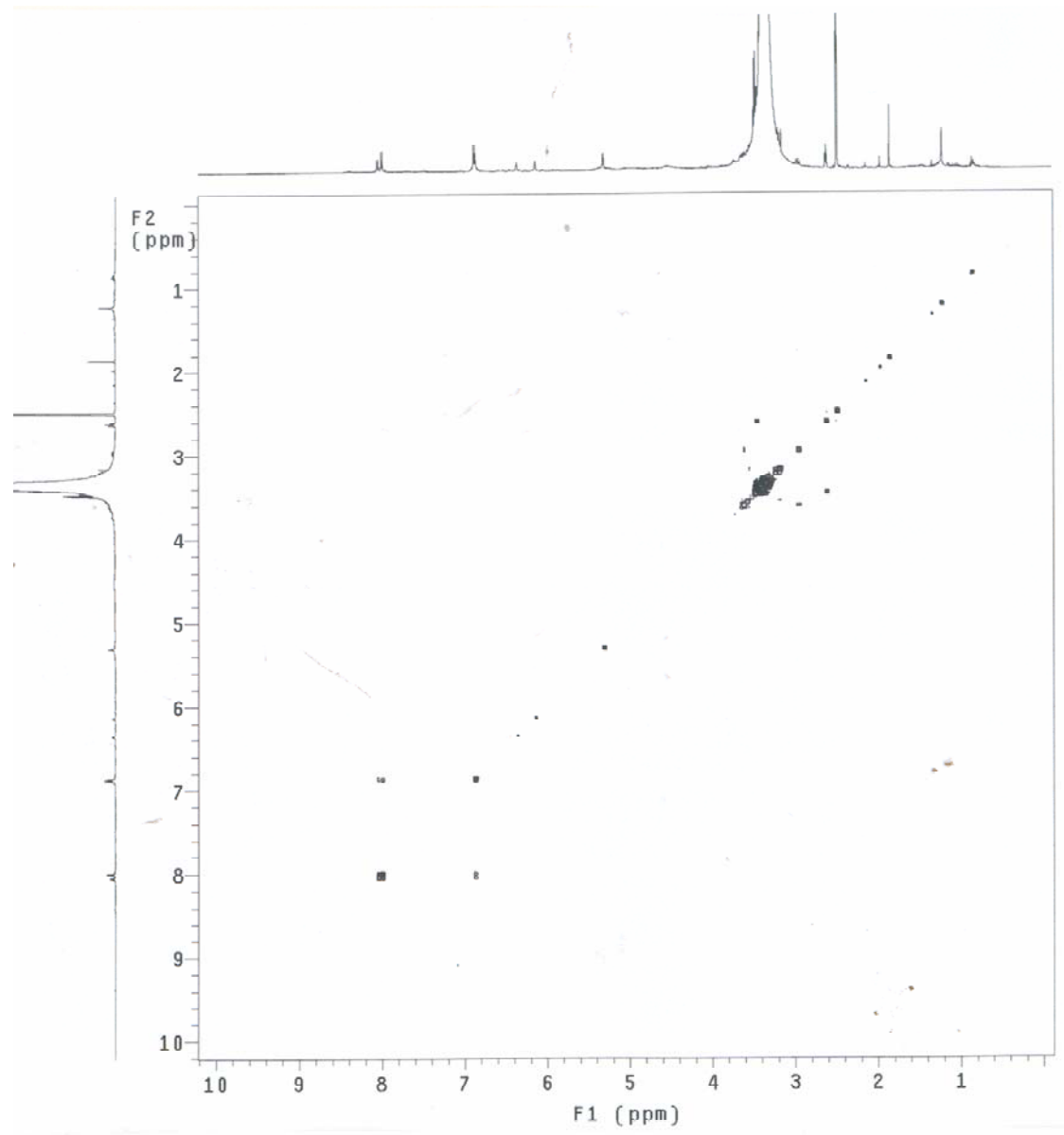
**Espectro 14:** Experimento gHMBC de **Mp6** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



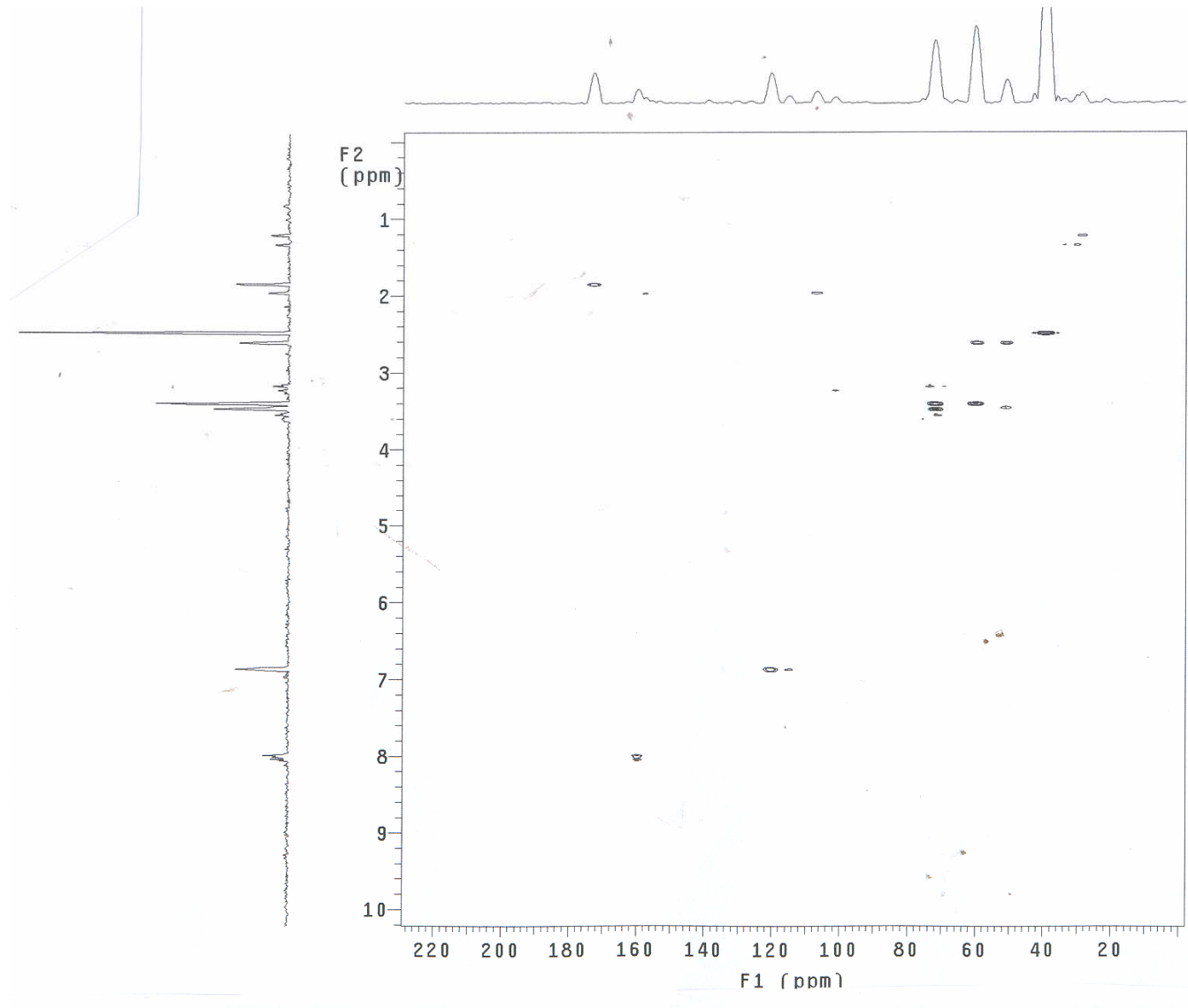
**Espectro 15:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **Mp7** e **Mp8** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



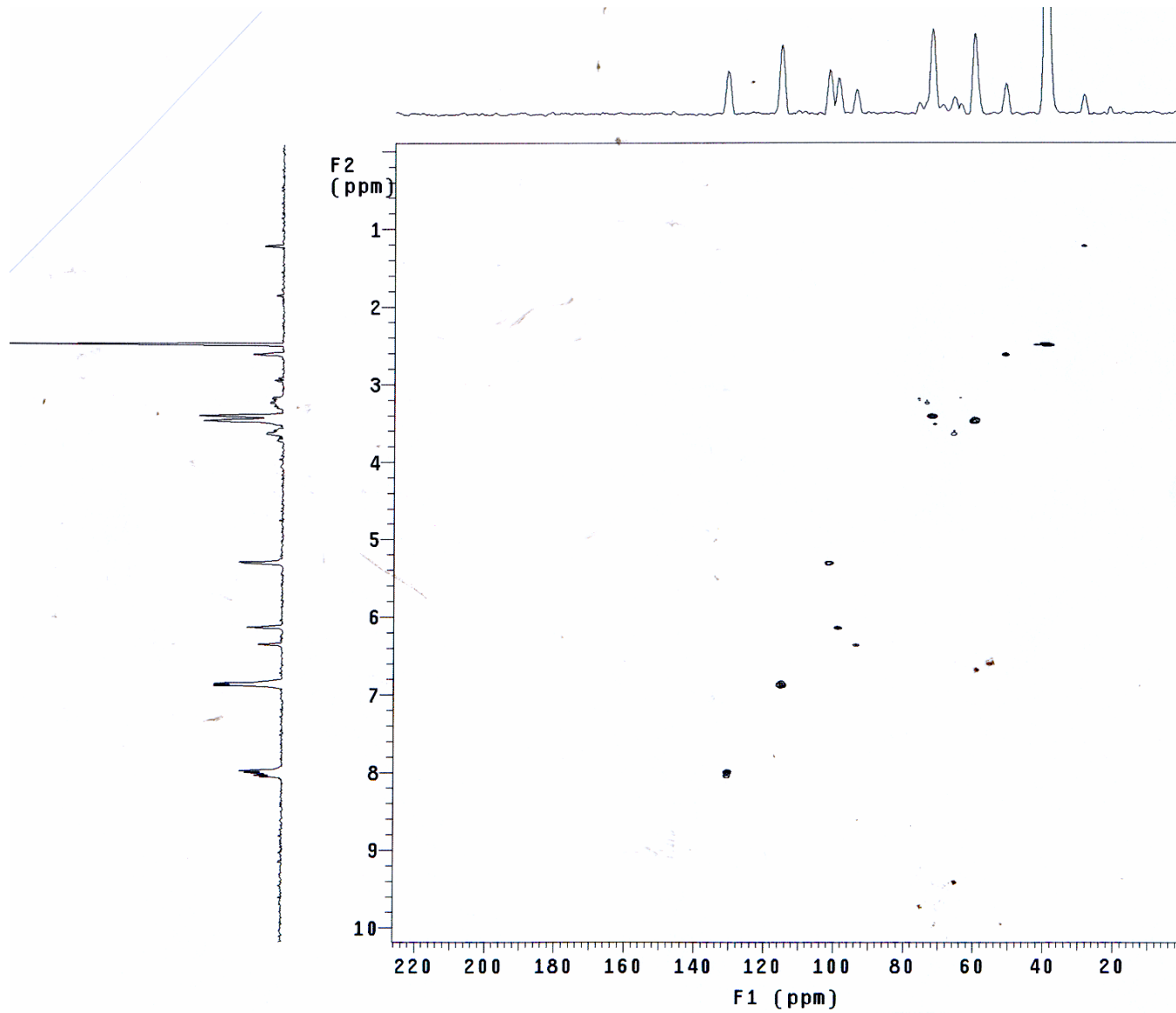
**Espectro 16:** Experimento TOCSY-1D de **Mp7** e **Mp8** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, irradiado em  $\delta$ 5,30 ppm).



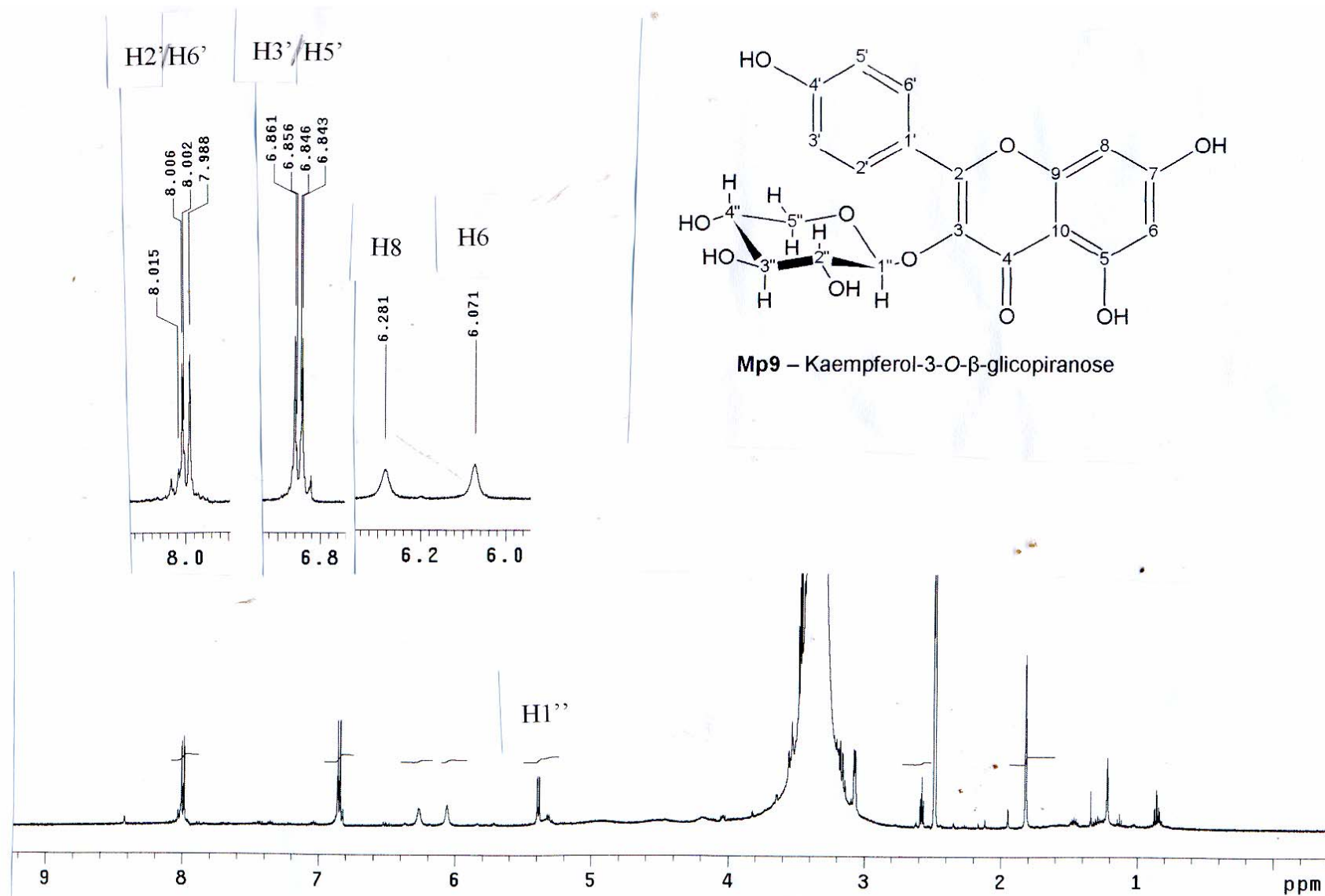
**Espectro 17:** Experimento COSY-<sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H de **Mp7** e **Mp8** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



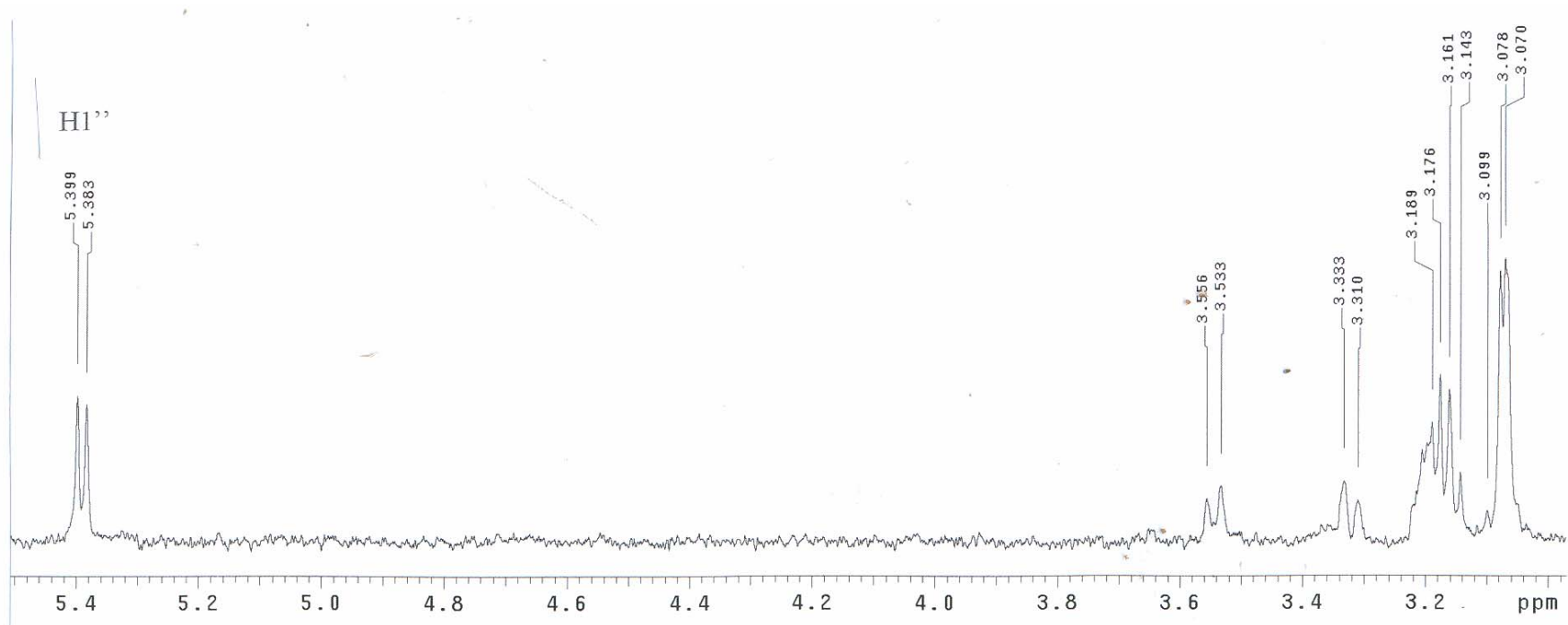
**Espectro 18:** Experimento gHMBC de **Mp7** e **Mp8** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



**Espectro 19:** Experimento gHMBC de **Mp7** e **Mp8** (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , TMS).

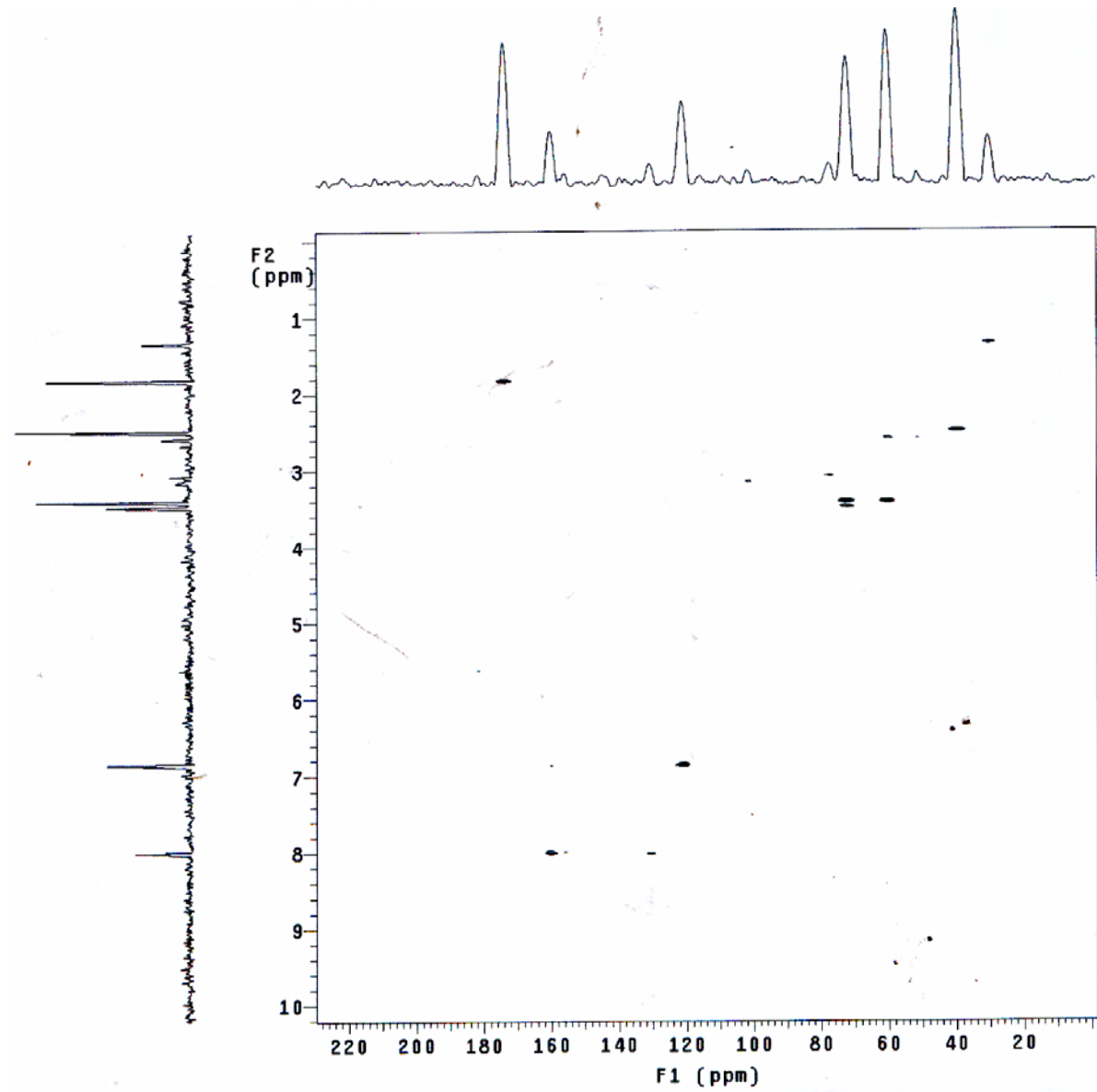


**Espectro 20:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **Mp9** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

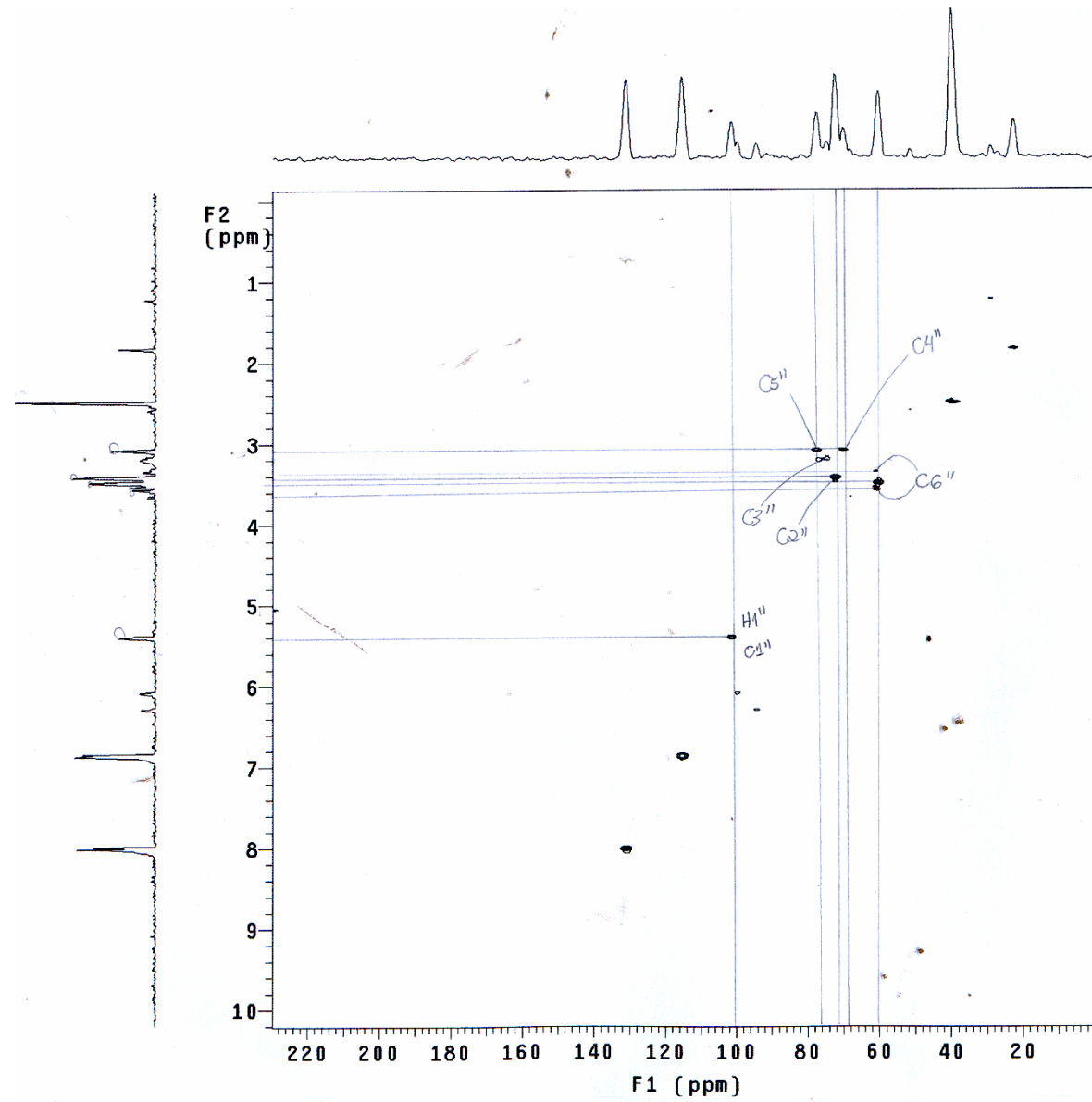


**Espectro 21:** Experimento TOCSY-1D de **Mp9** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, irradiado em  $\delta$ 5,39 ppm).

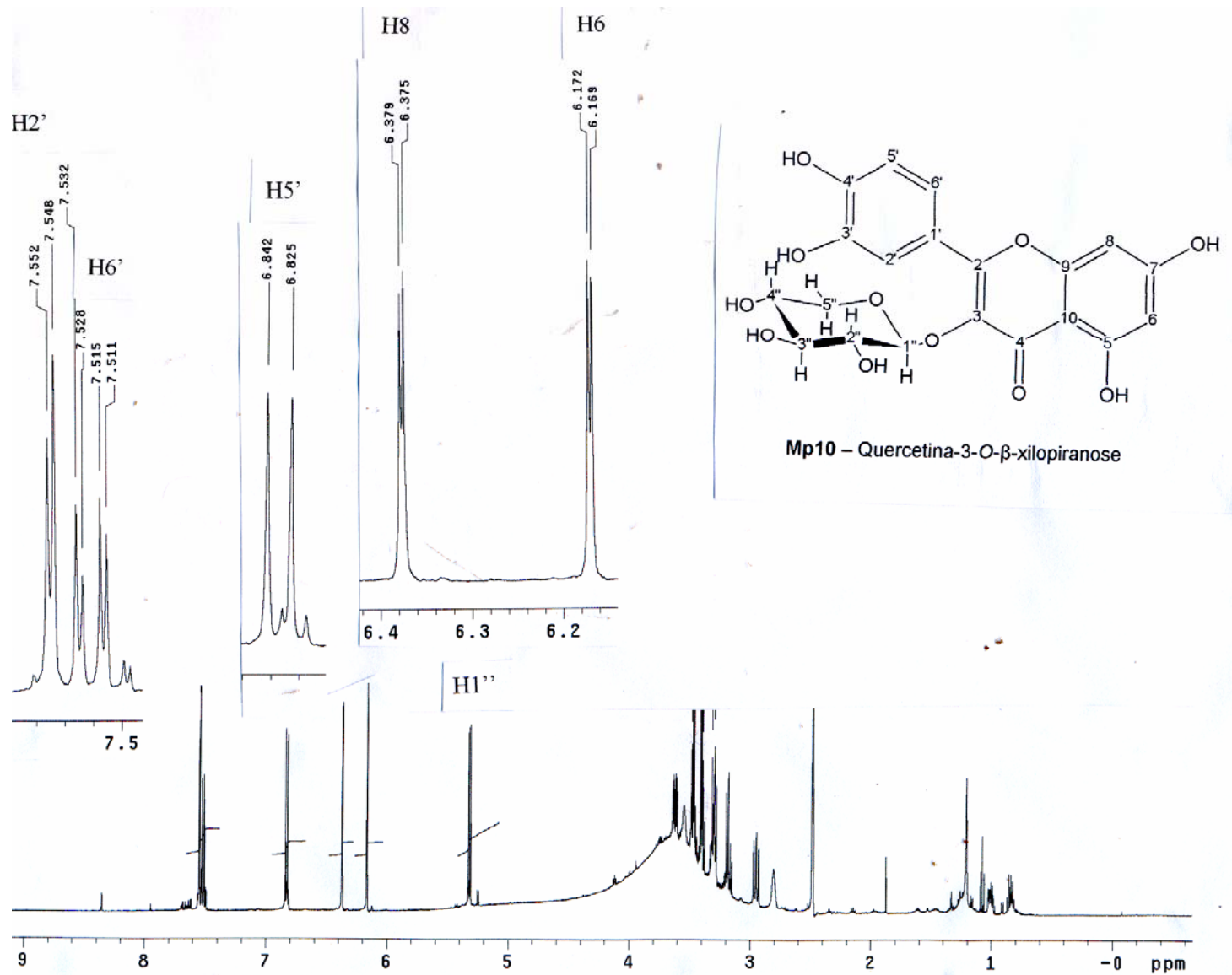




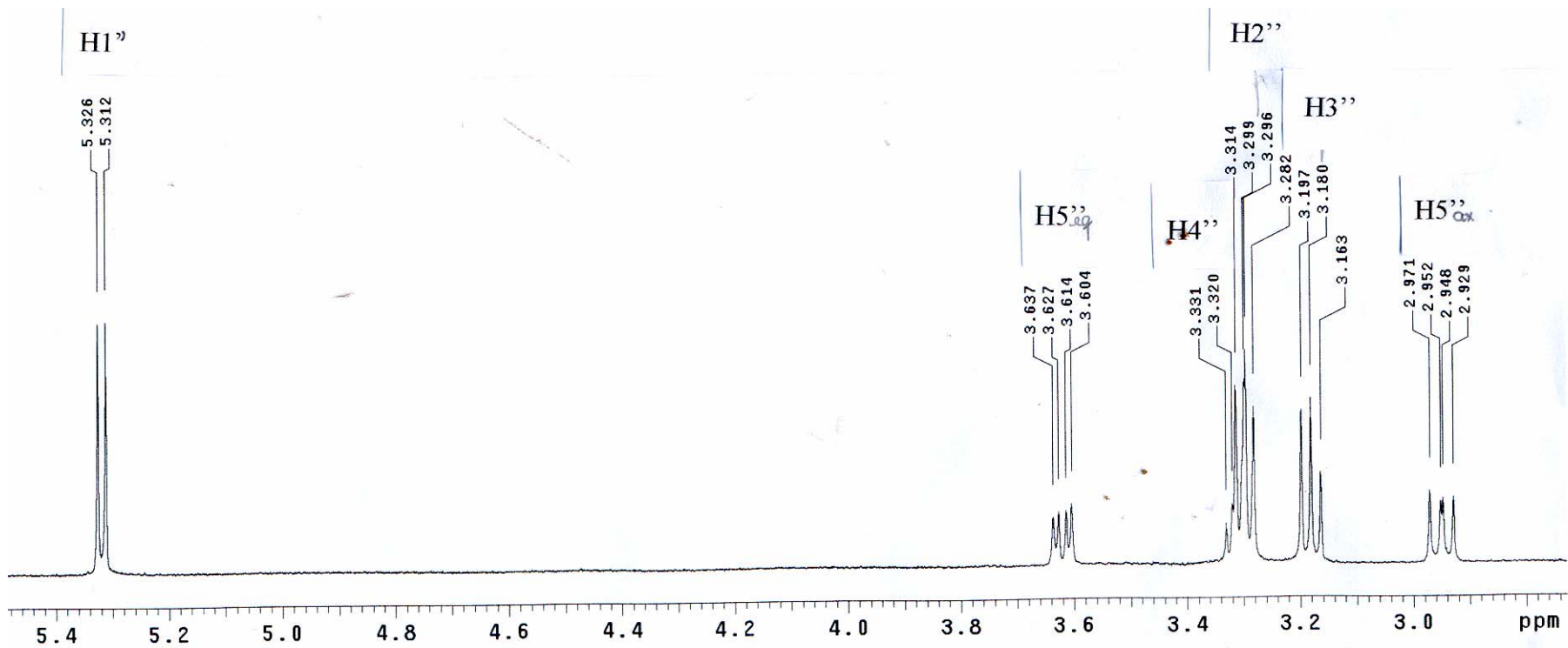
**Espectro 22:** Experimento gHMBC de **Mp9** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



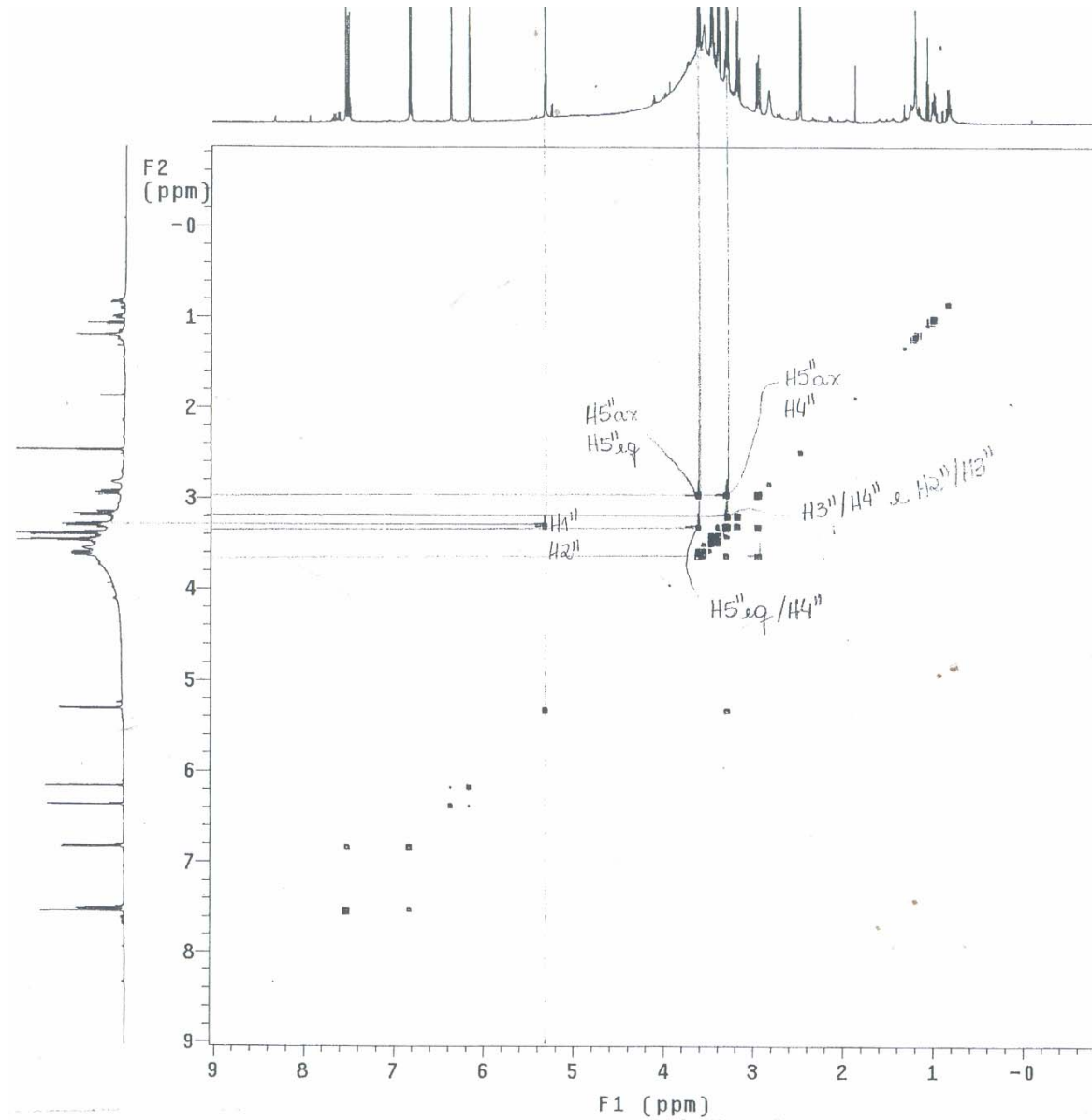
**Espectro 23:** Experimento gHMQC de **Mp9** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



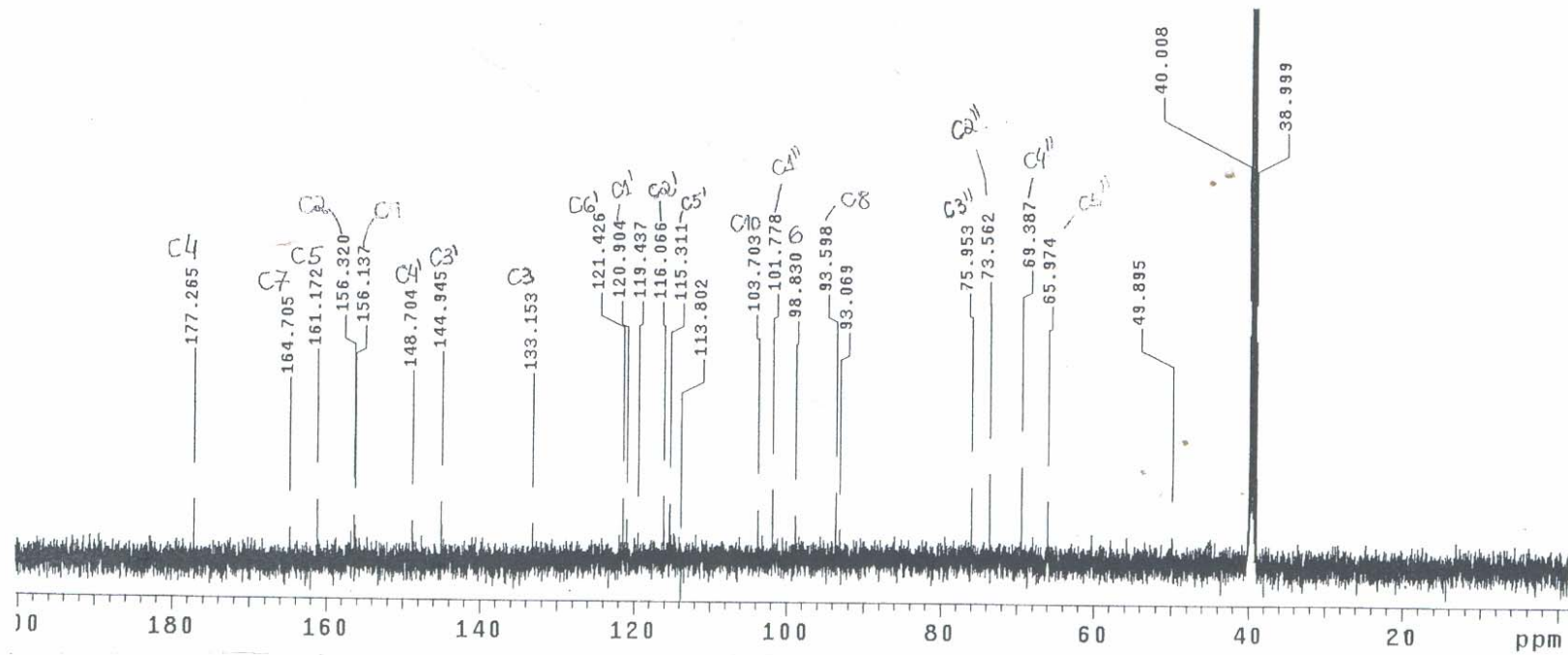
**Espectro 24:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Mp10** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



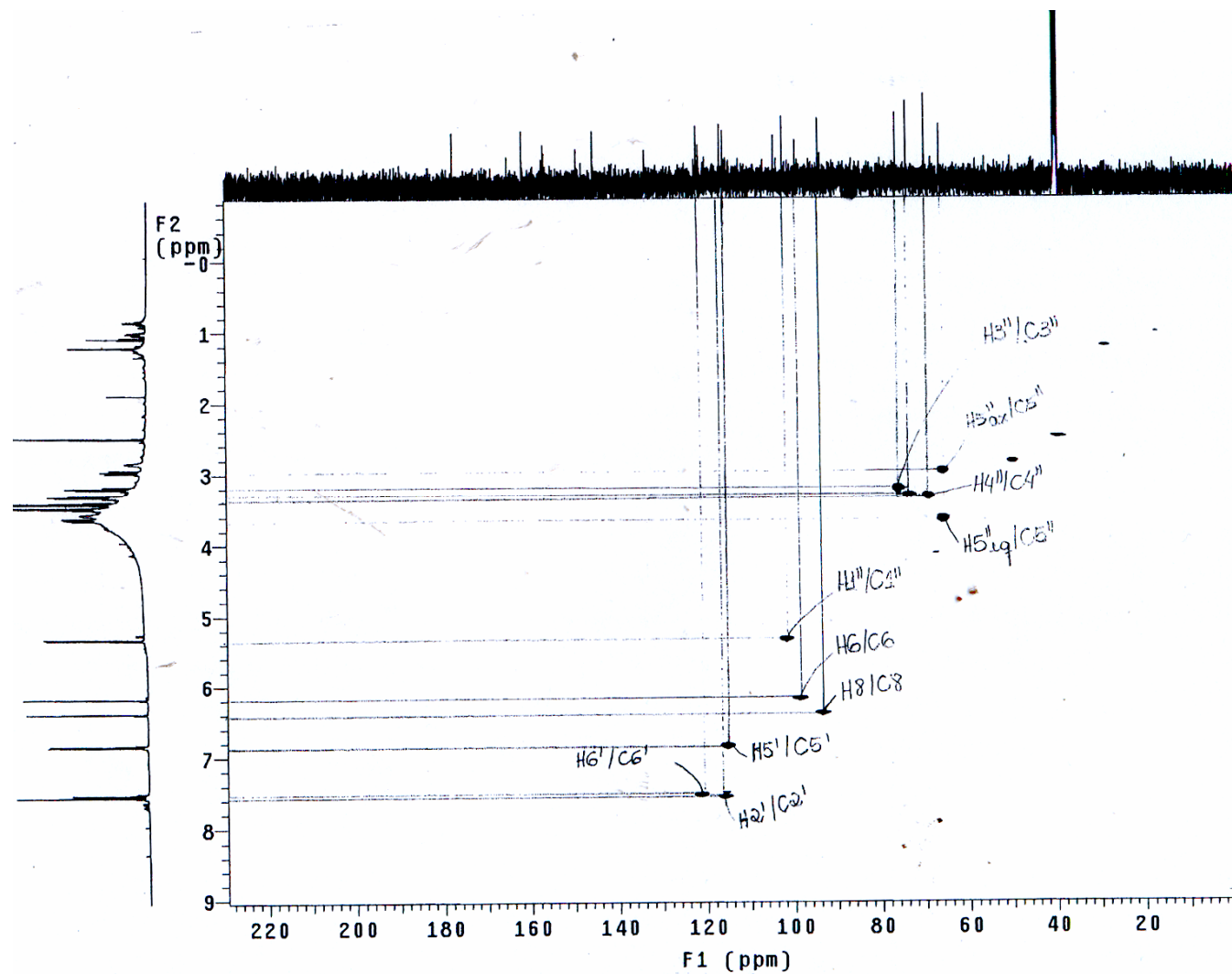
**Espectro 25:** Experimento TOCSY-1D de **Mp10** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS. Irradiado em  $\delta$ 5,31 ppm).



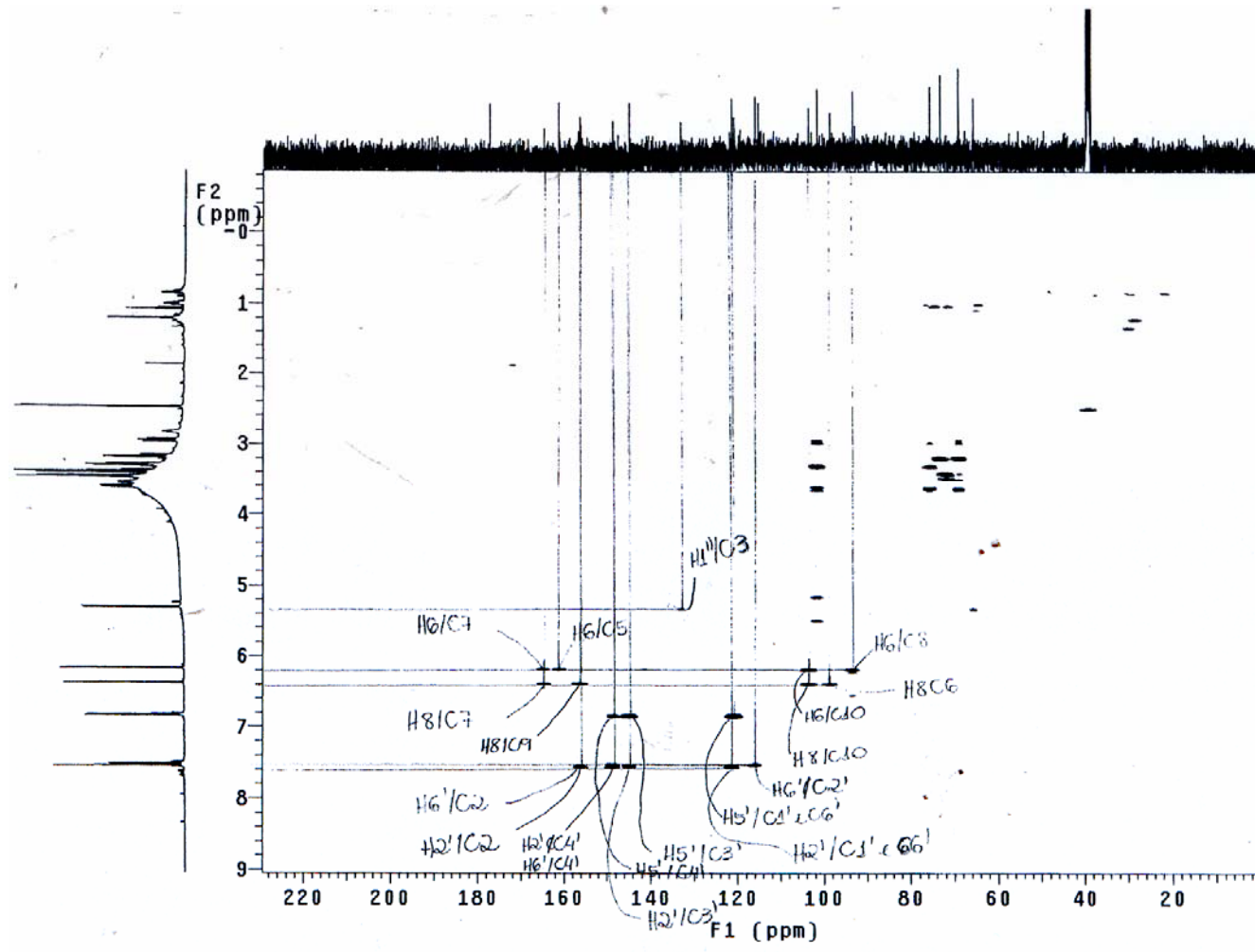
**Espectro 26:** Experimento COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  de **Mp10** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



**Espectro 27:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **Mp10** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

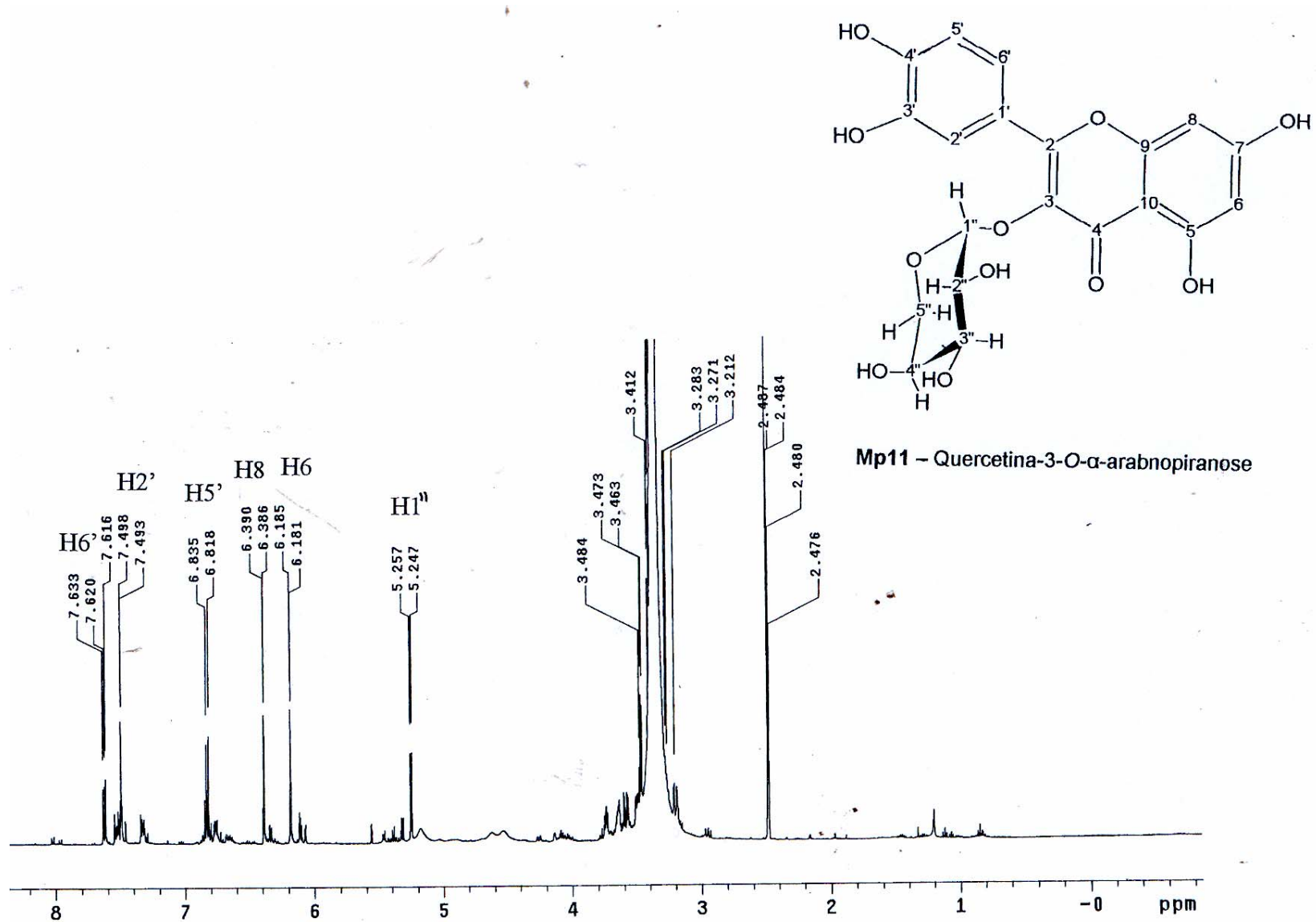


**Espectro 28:** Experimento gHMQC de **Mp10** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

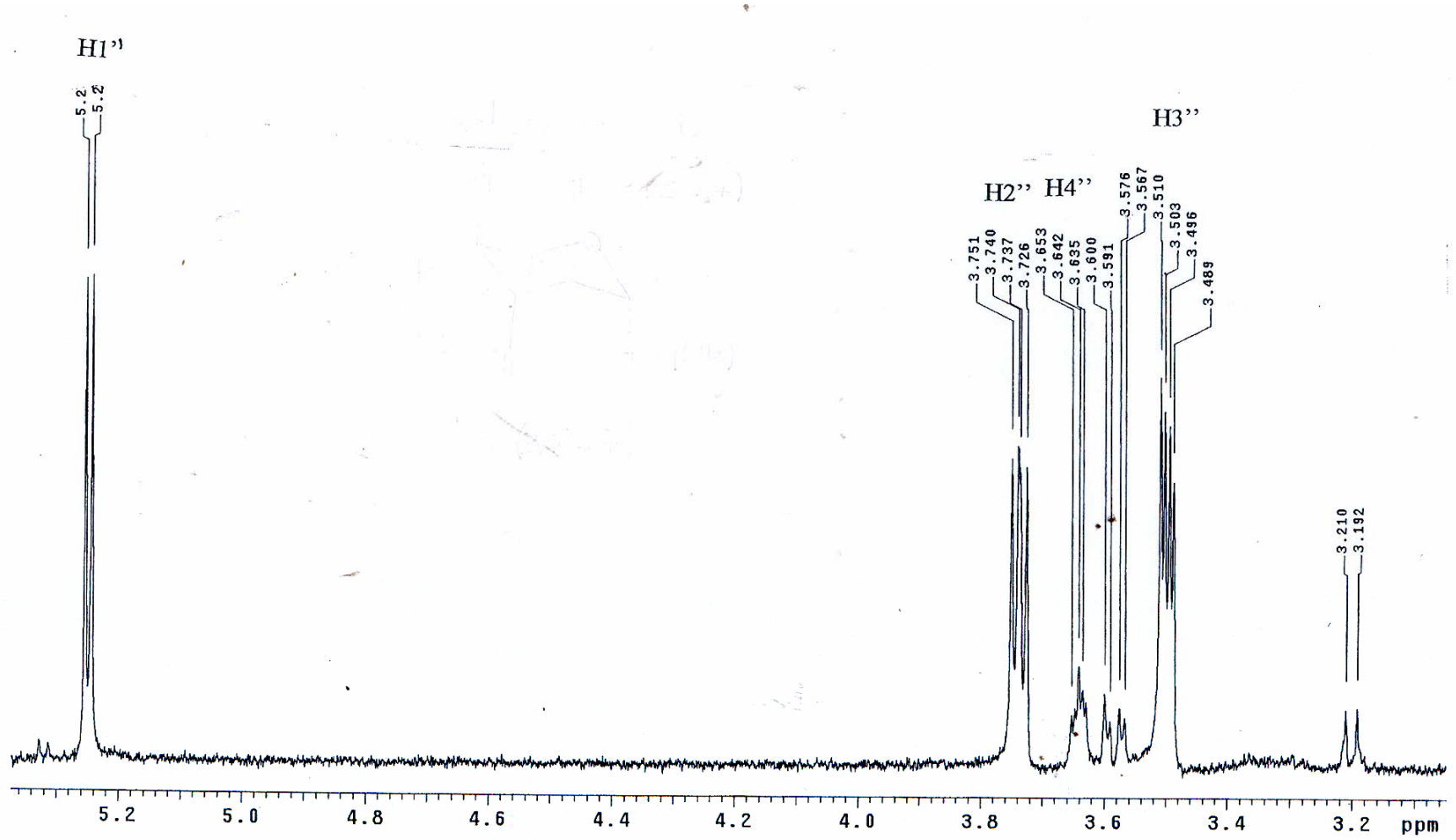


**Espectro 29:** Experimento gHMQC de **Mp10** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

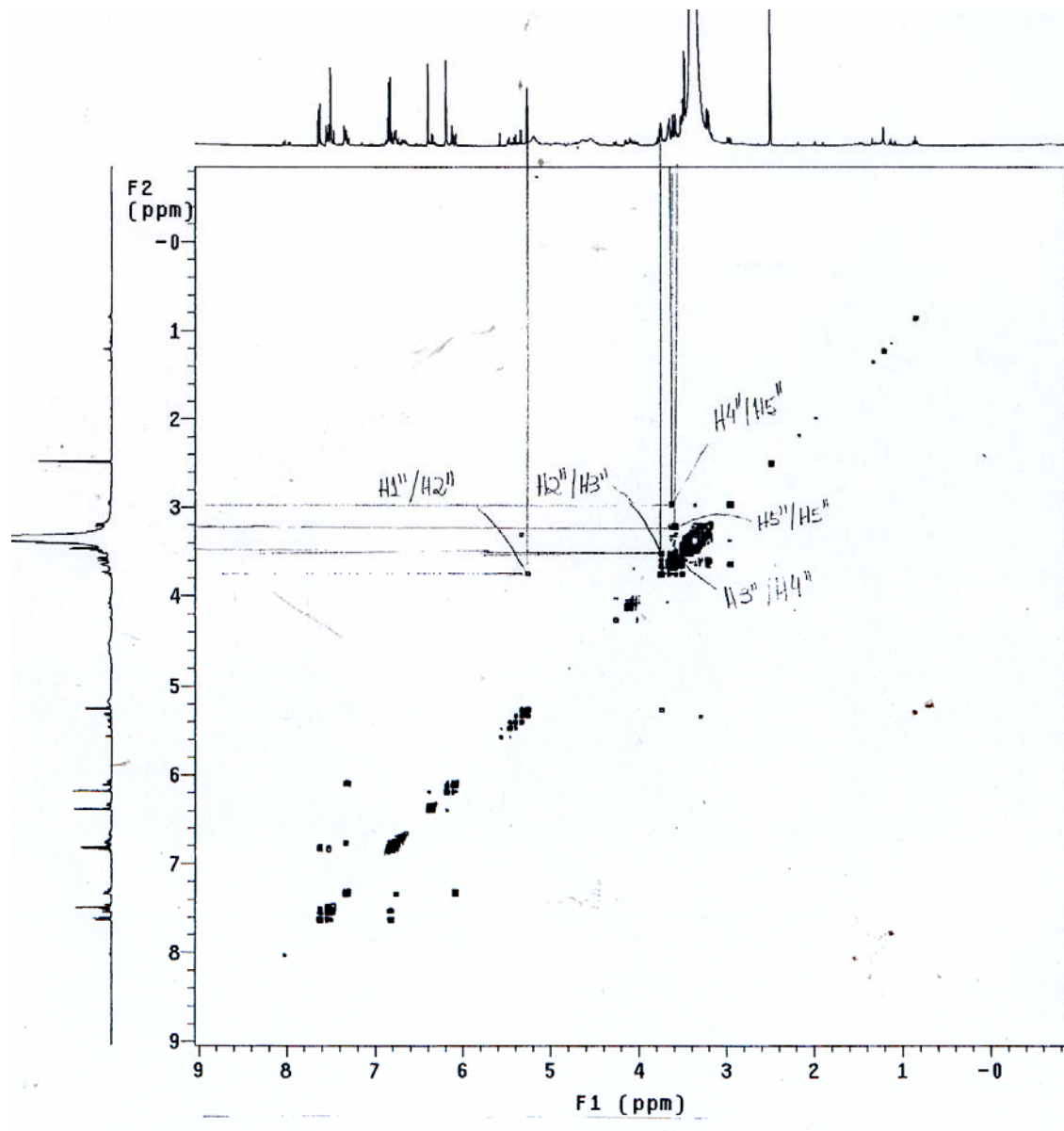




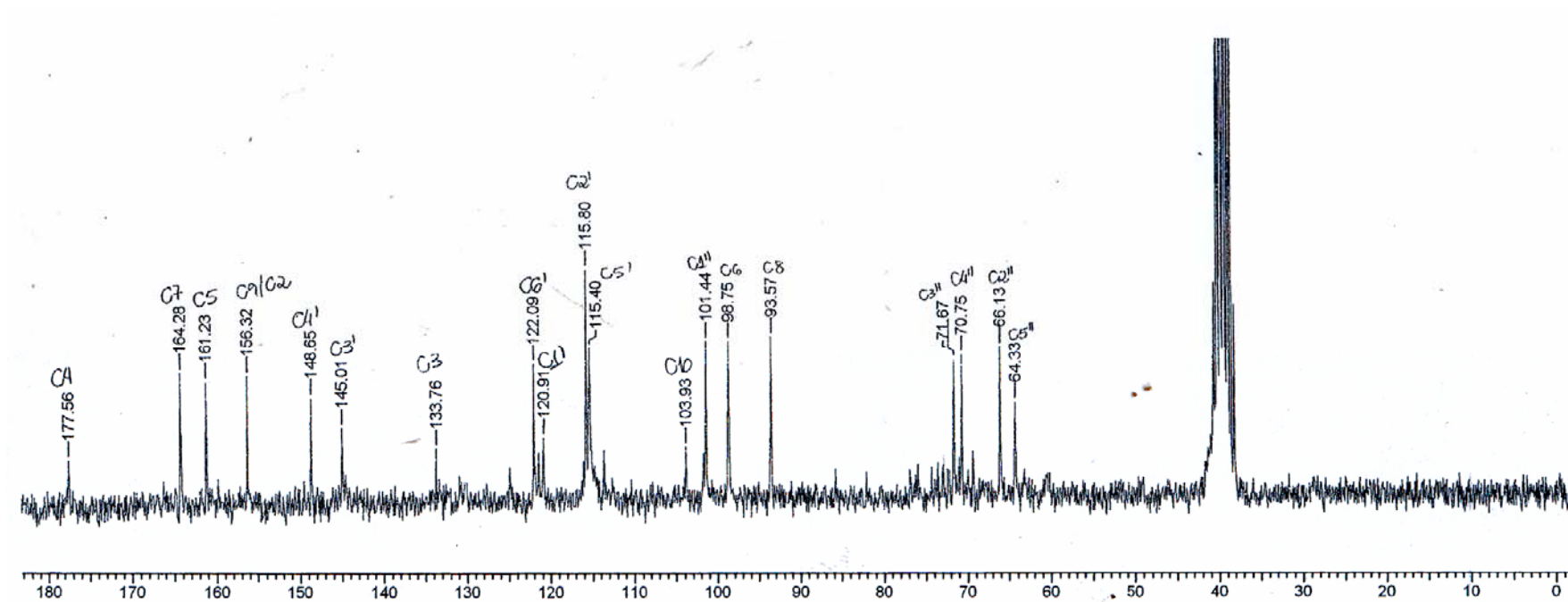
**Espectro 30:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Mp11** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



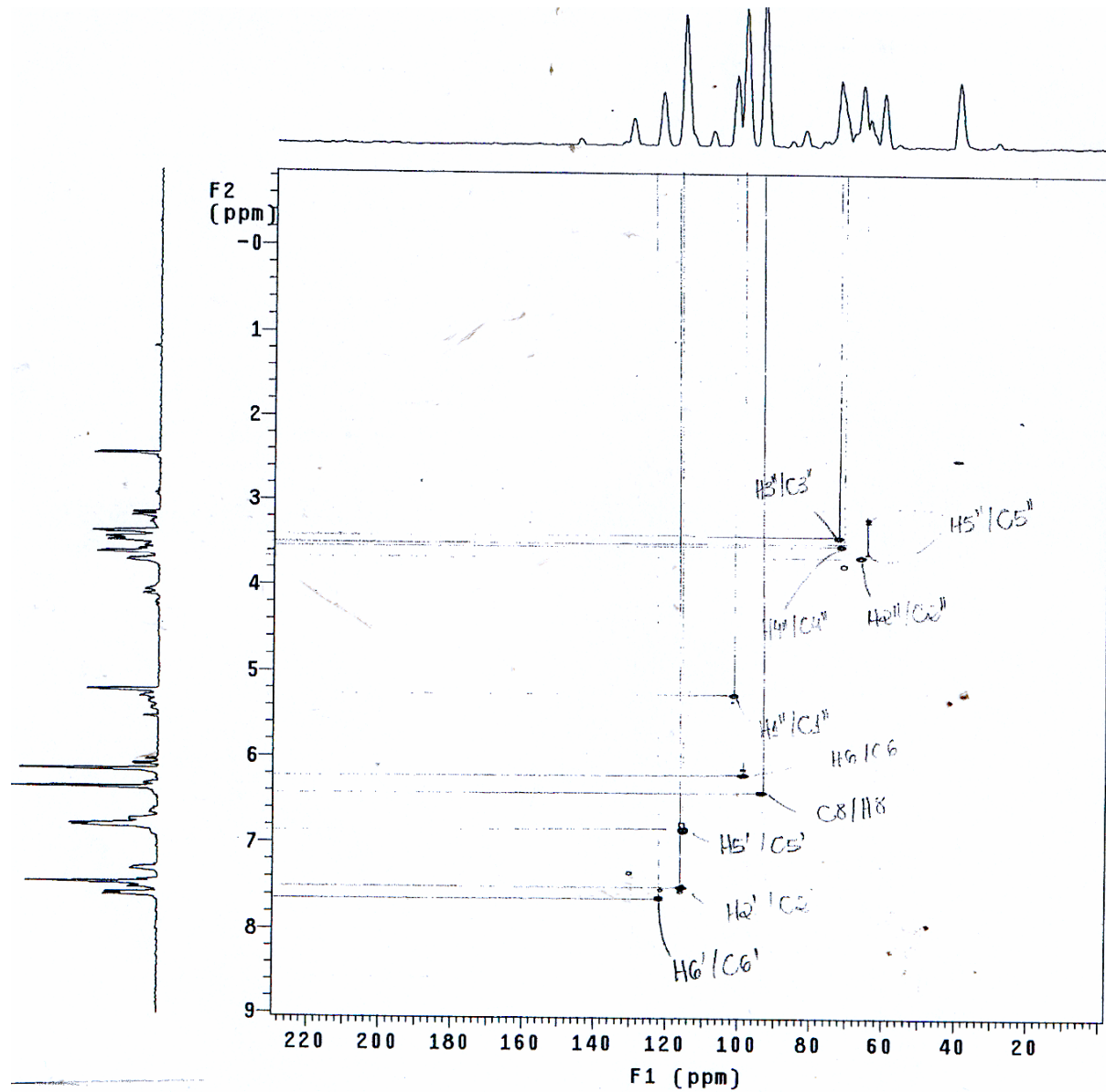
**Espectro 31:** Experimento TOCSY-1D de **Mp11** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS, irradiado em  $\delta 5,27$  ppm).



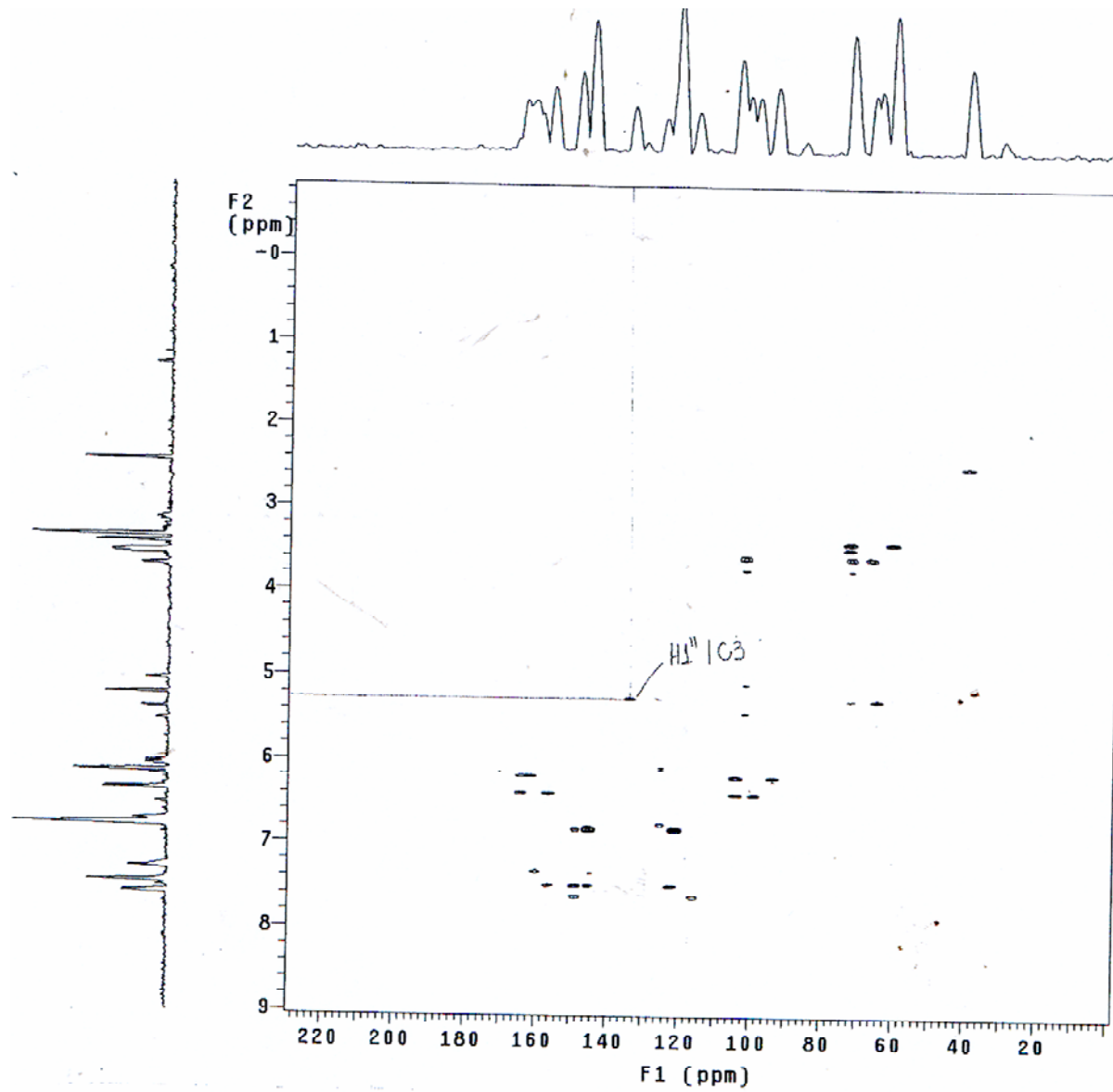
**Espectro 32:** Experimento COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  de **Mp11** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



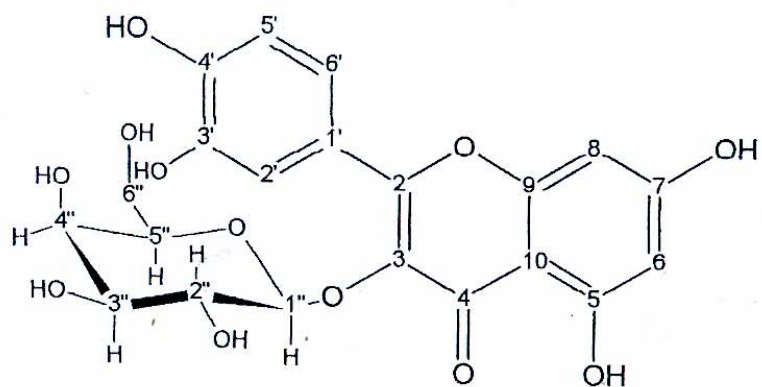
**Espectro 33:** Espectro de RMN <sup>13</sup>C de **Mp11** (125MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



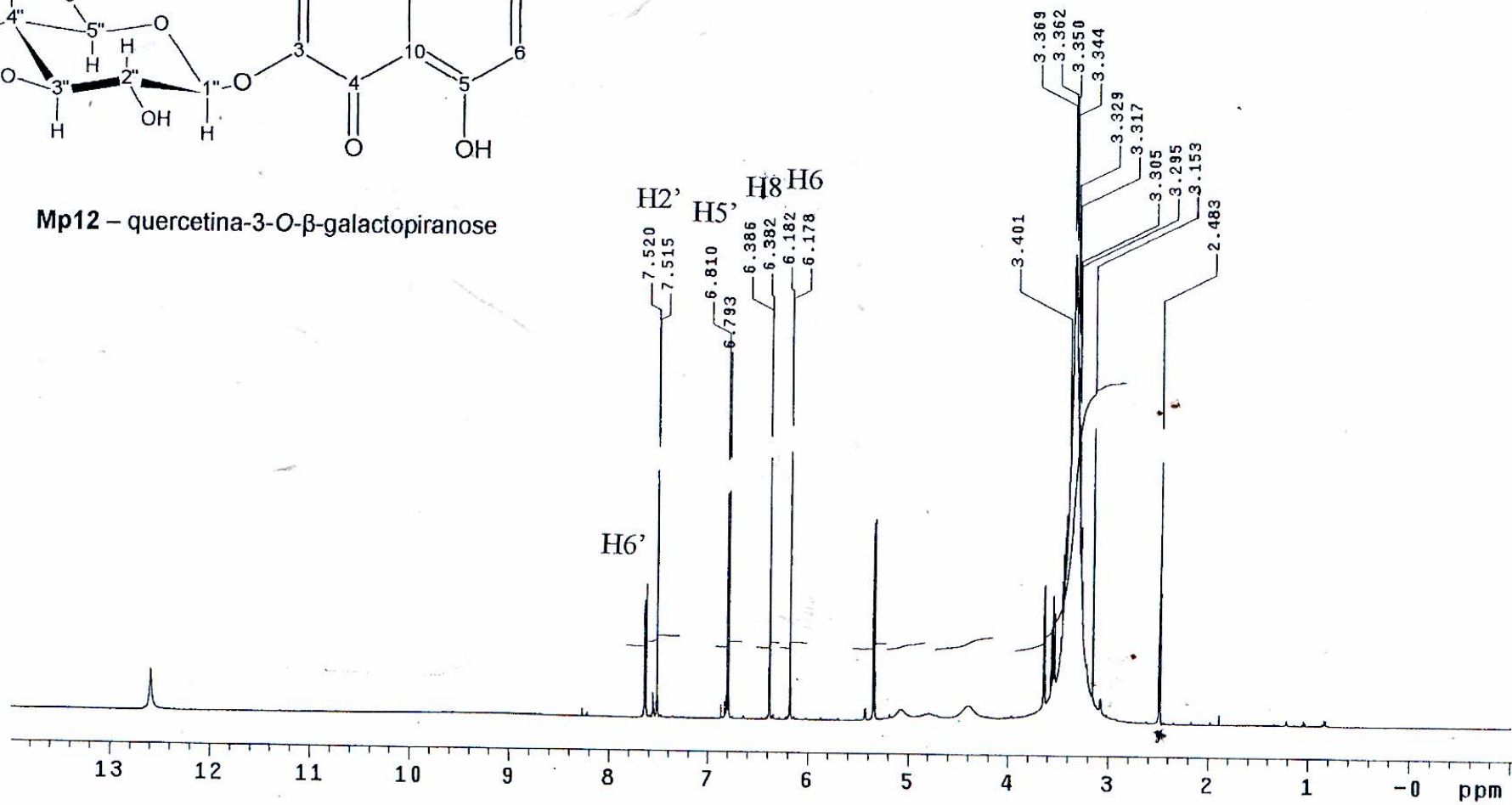
Espectro 34: Experimento gHMQC de **Mp 11** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



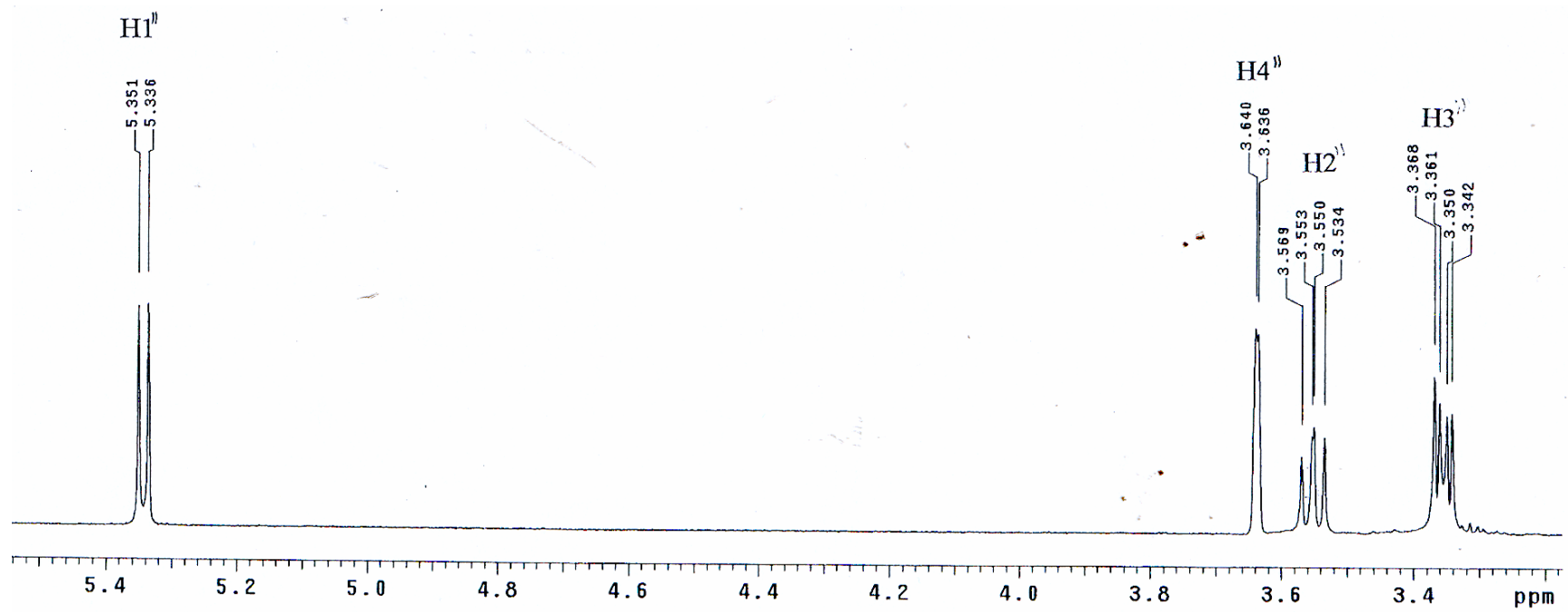
**Espectro 35:** Experimento gHMBC de **Mp11** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



Mp12 – quercetina-3-O-β-galactopiranoose

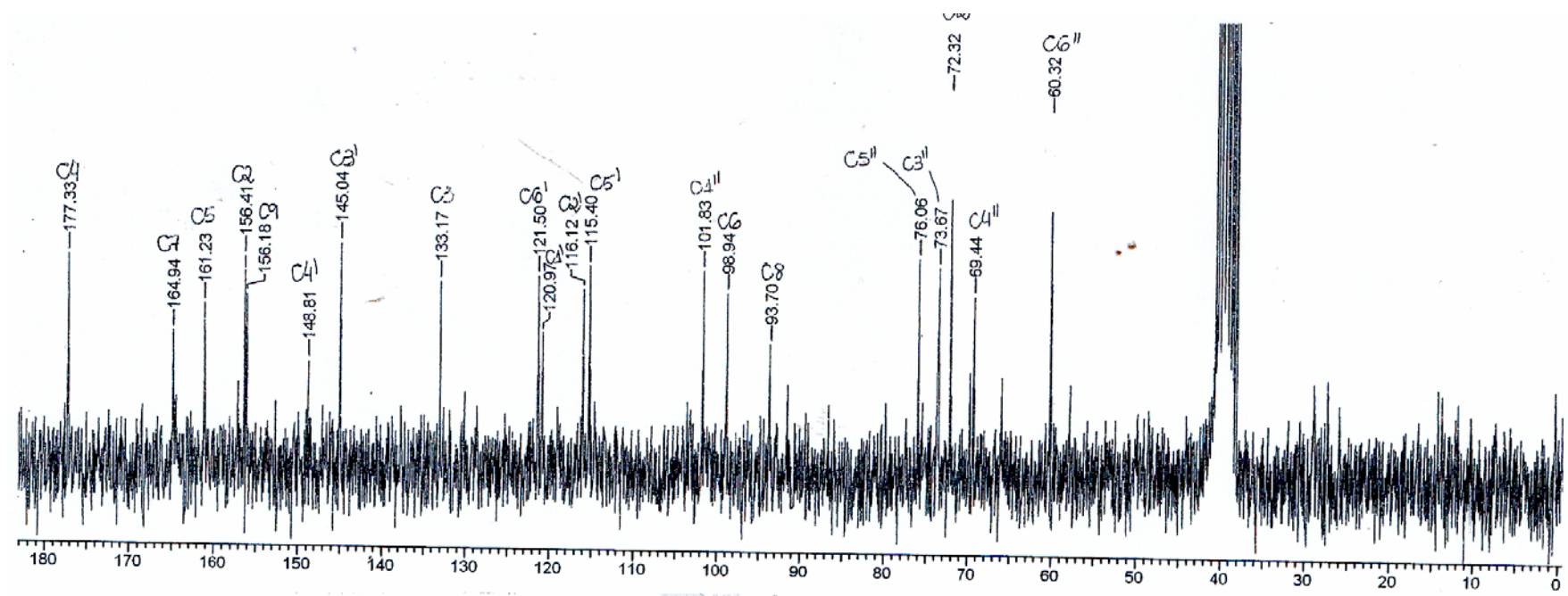


Espectro 36: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de Mp12 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).

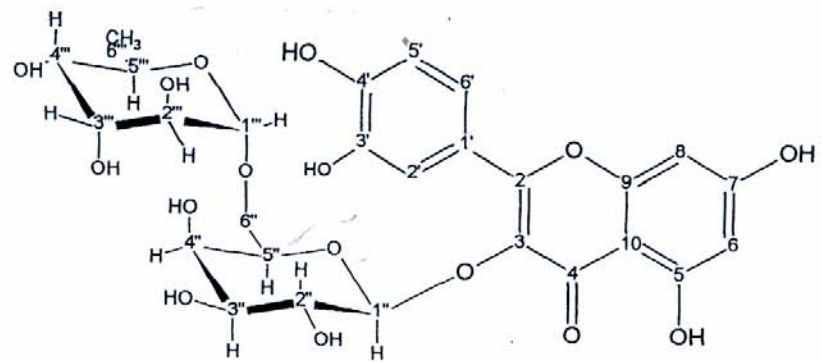


**Espectro 37:** Experimento TOCSY-1D de **Mp12** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, irradiado em  $\delta$ 5,34 ppm).

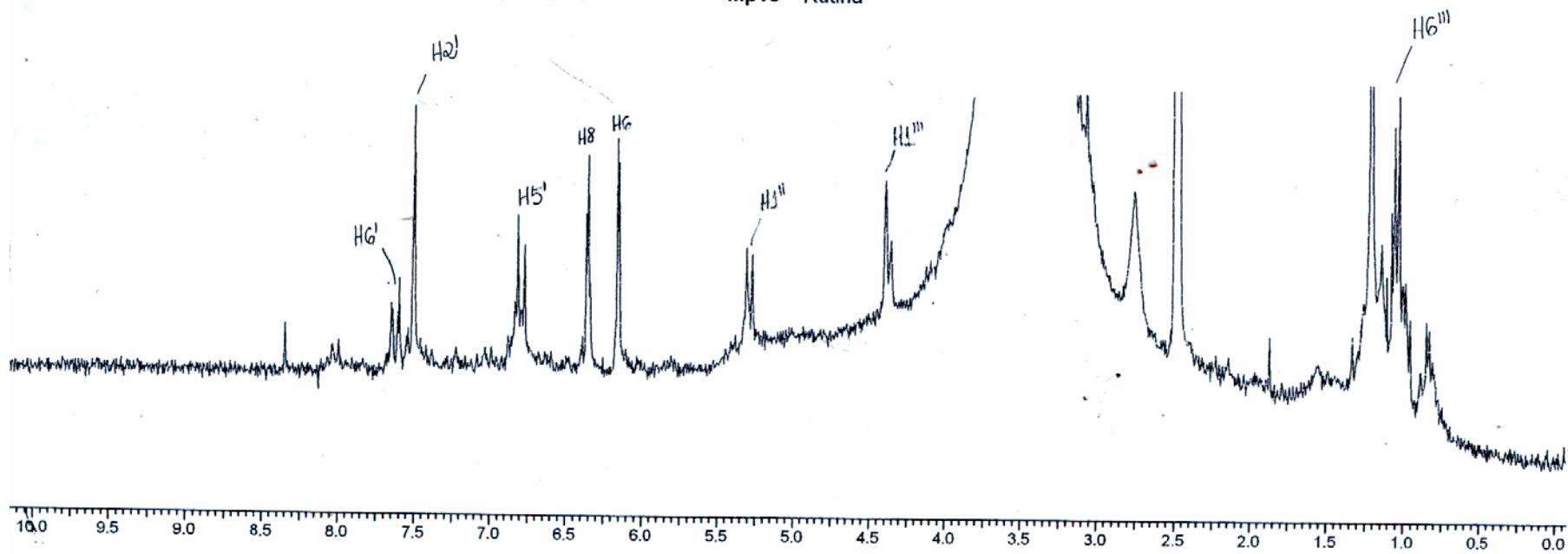




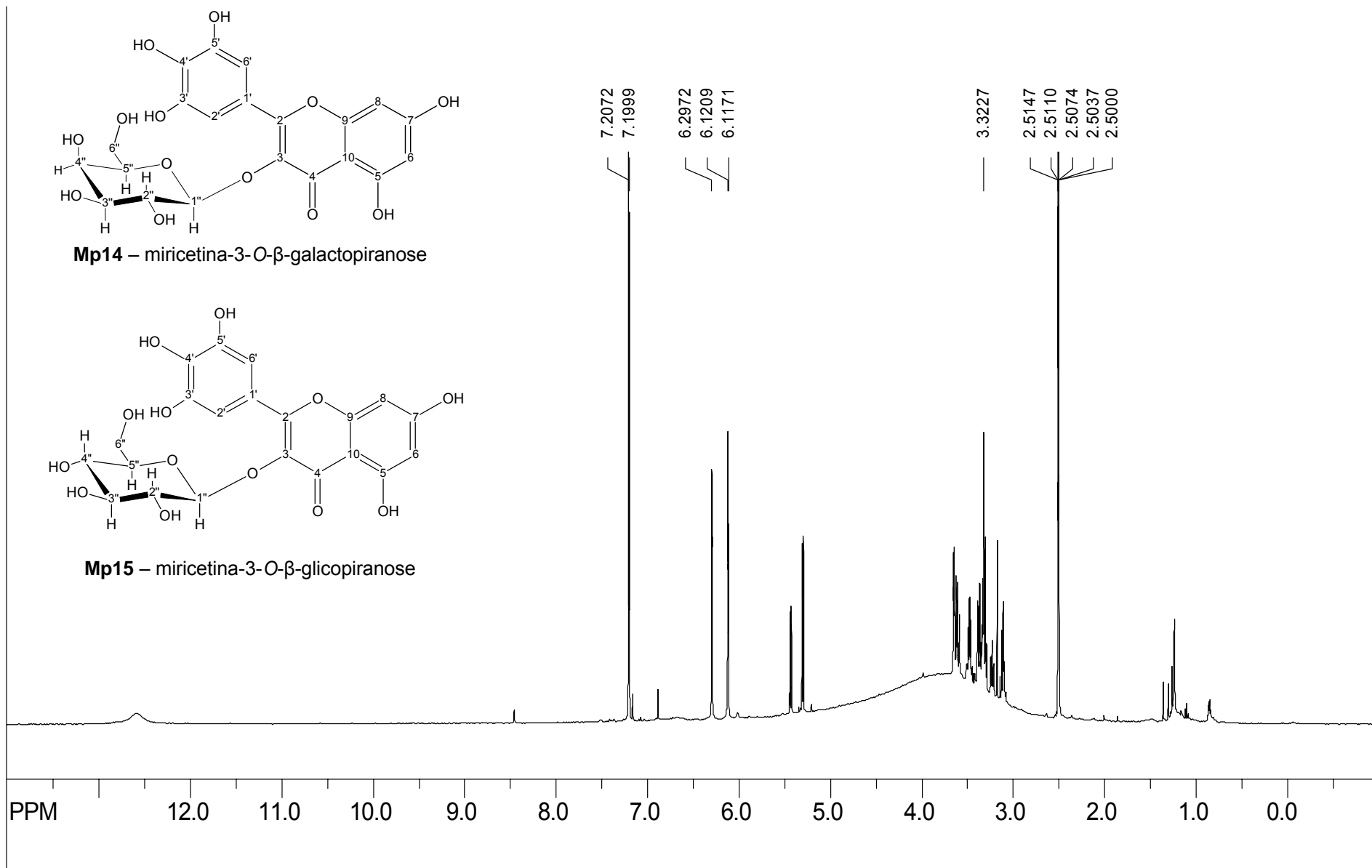
**Espectro 38:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de Mp12 (125 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , TMS).



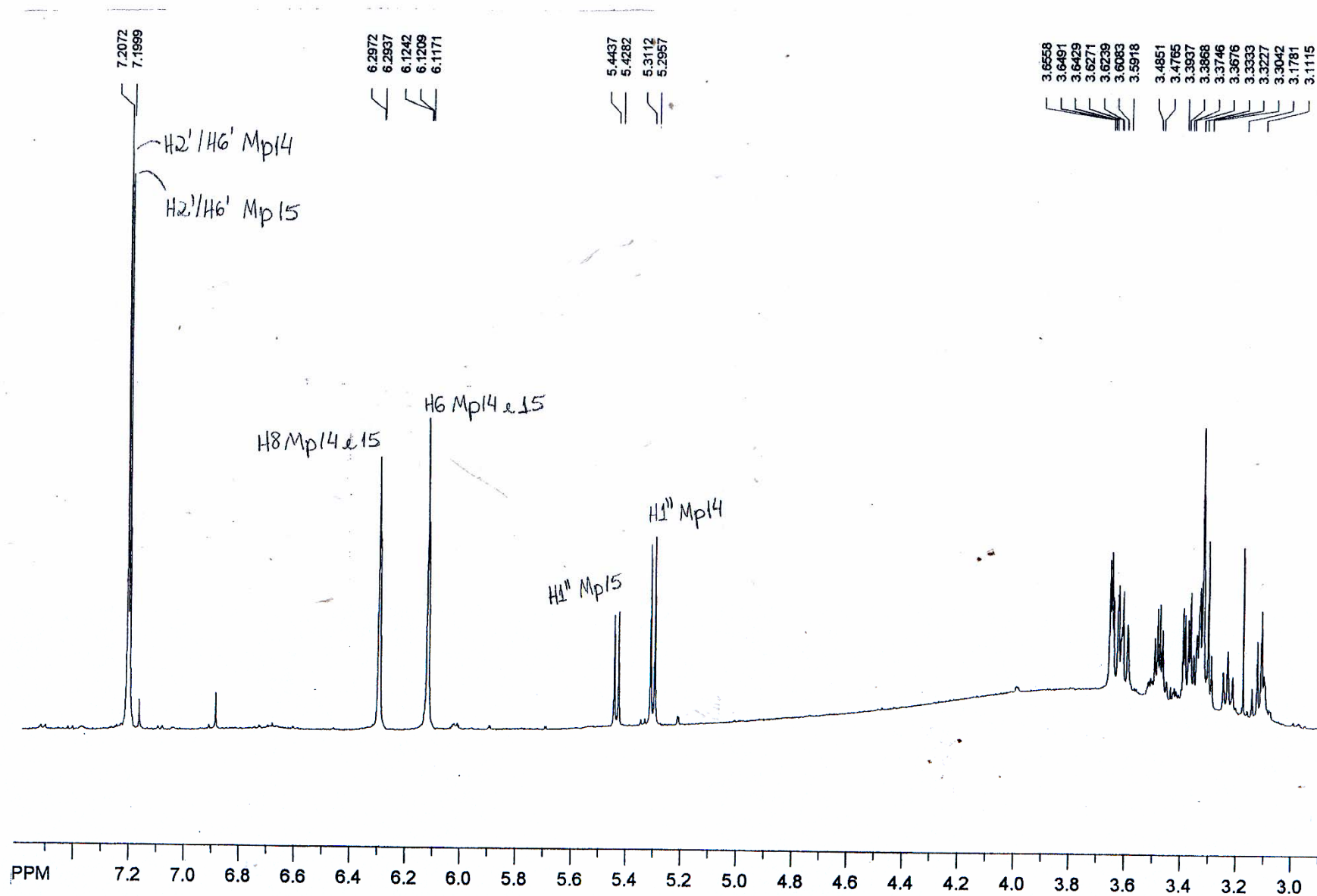
Mp13 – Rutina



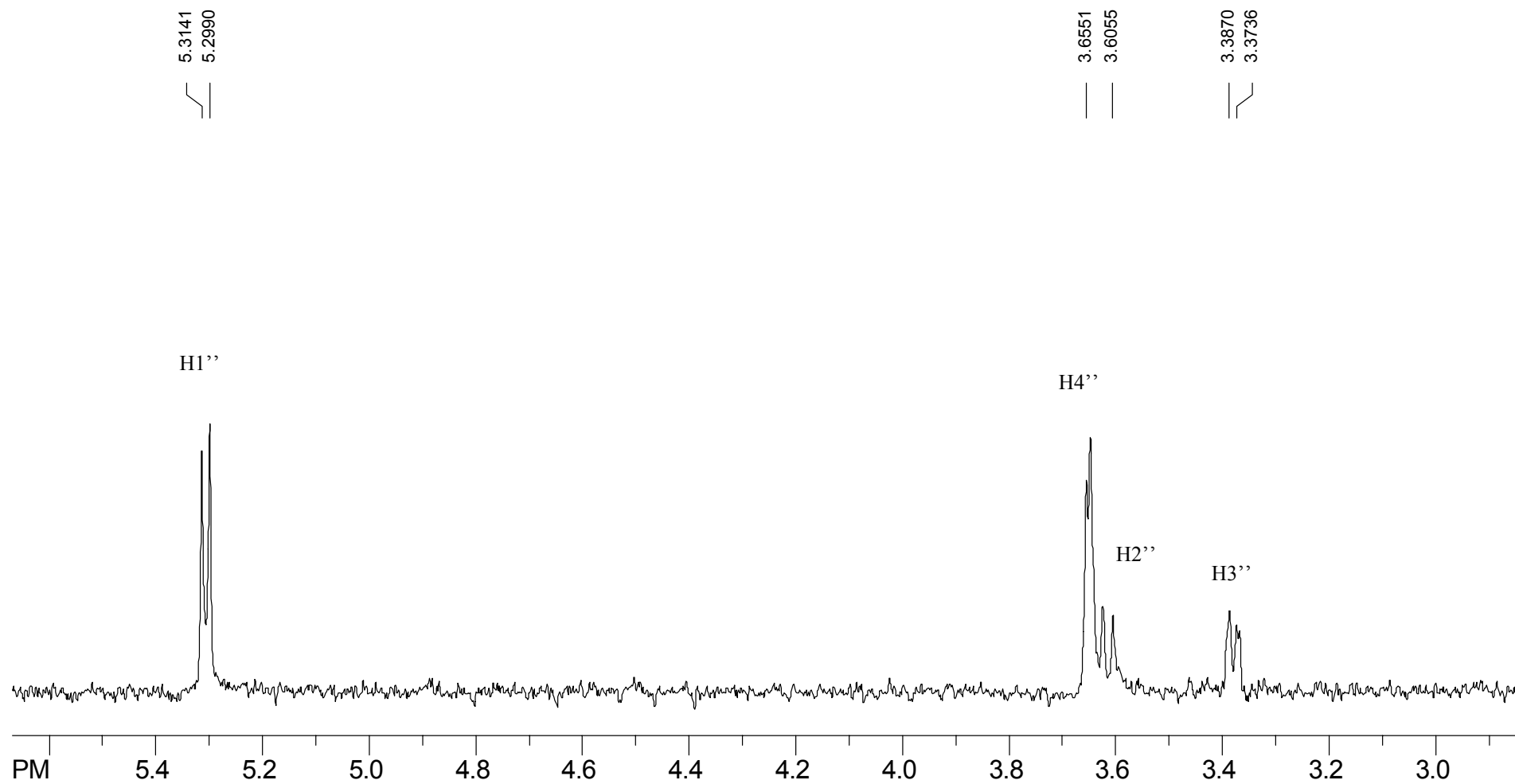
**Espectro 39:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de Mp13 (200 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



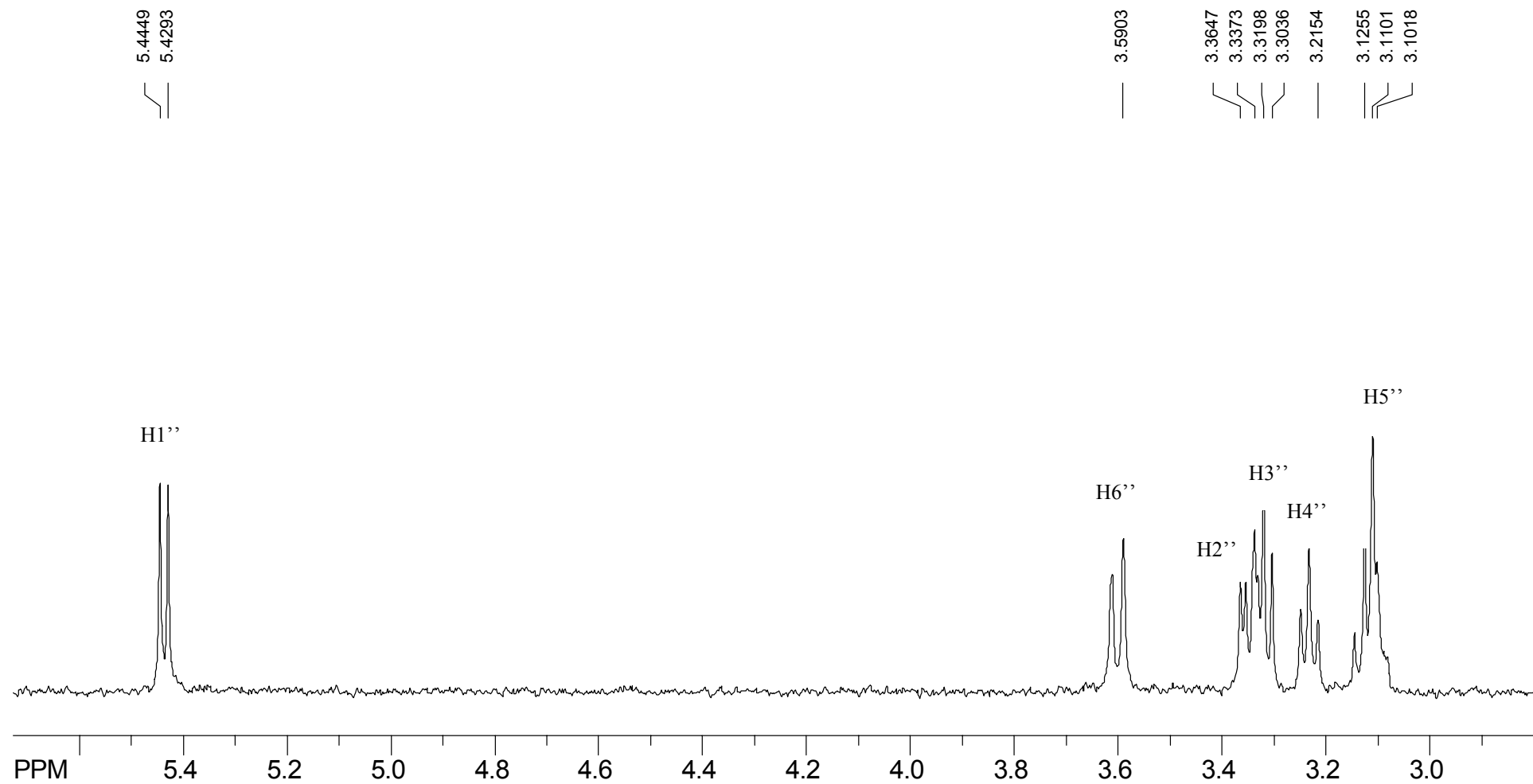
**Espectro 40:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **Mp14** e **Mp15** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



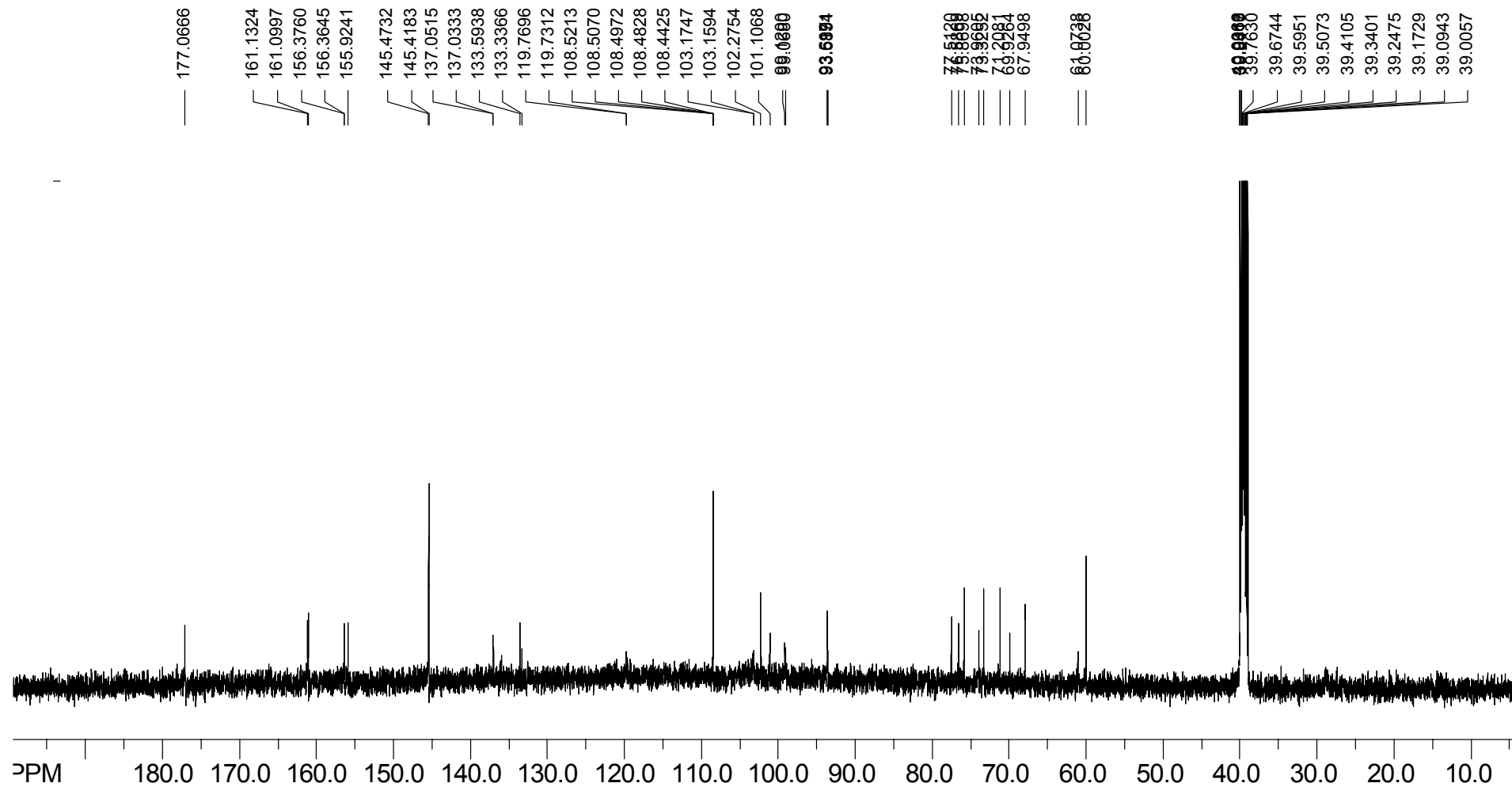
**Espectro 41:** Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup>H de **Mp14** e **Mp15** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



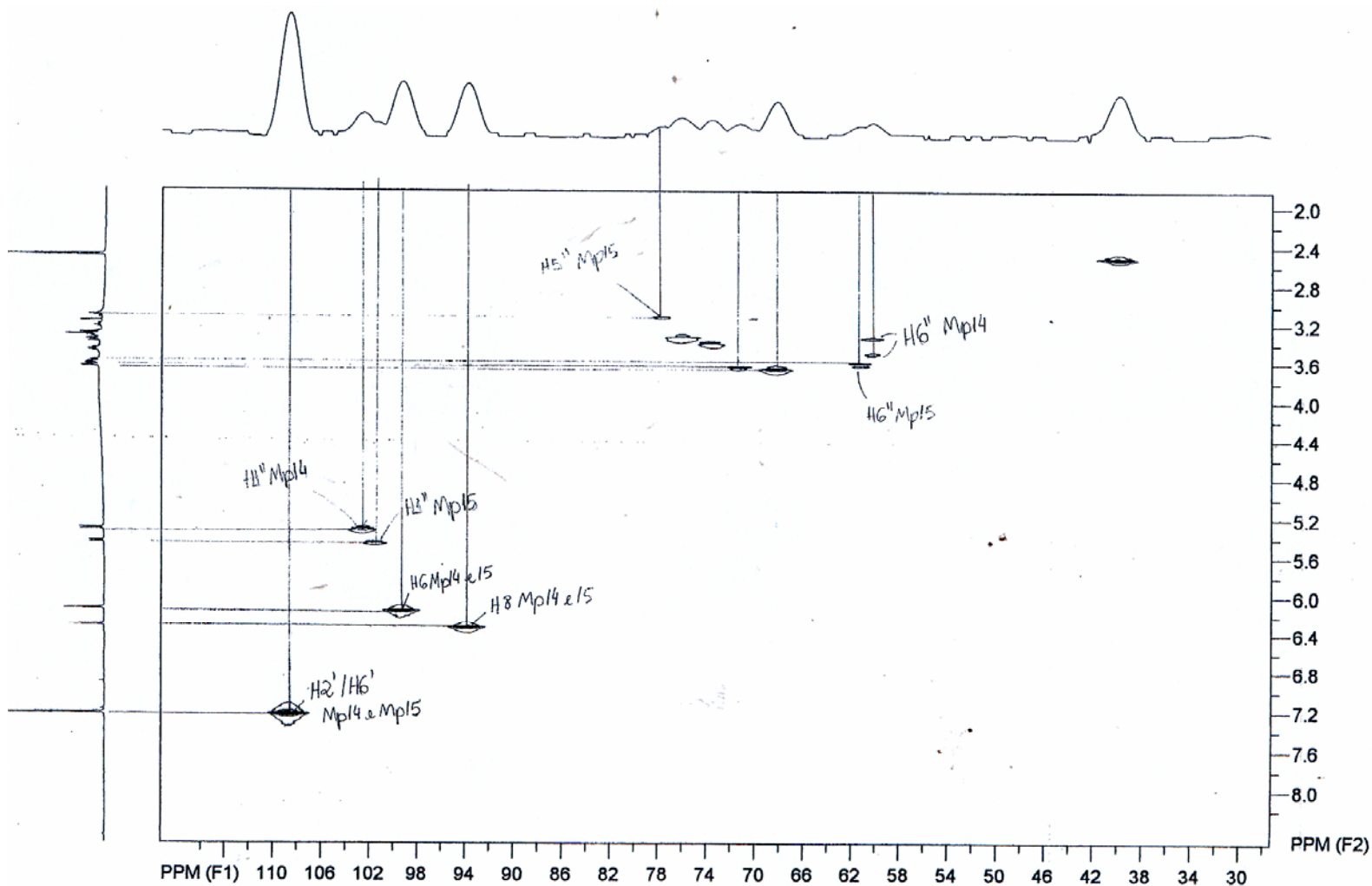
**Espectro 42:** Experimento TOCSY-1D de **Mp14** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, irradiado em  $\delta$ 5,30 ppm).



**Espectro 43:** Experimento TOCSY-1D de **Mp15** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, irradiado em  $\delta$  5,44).

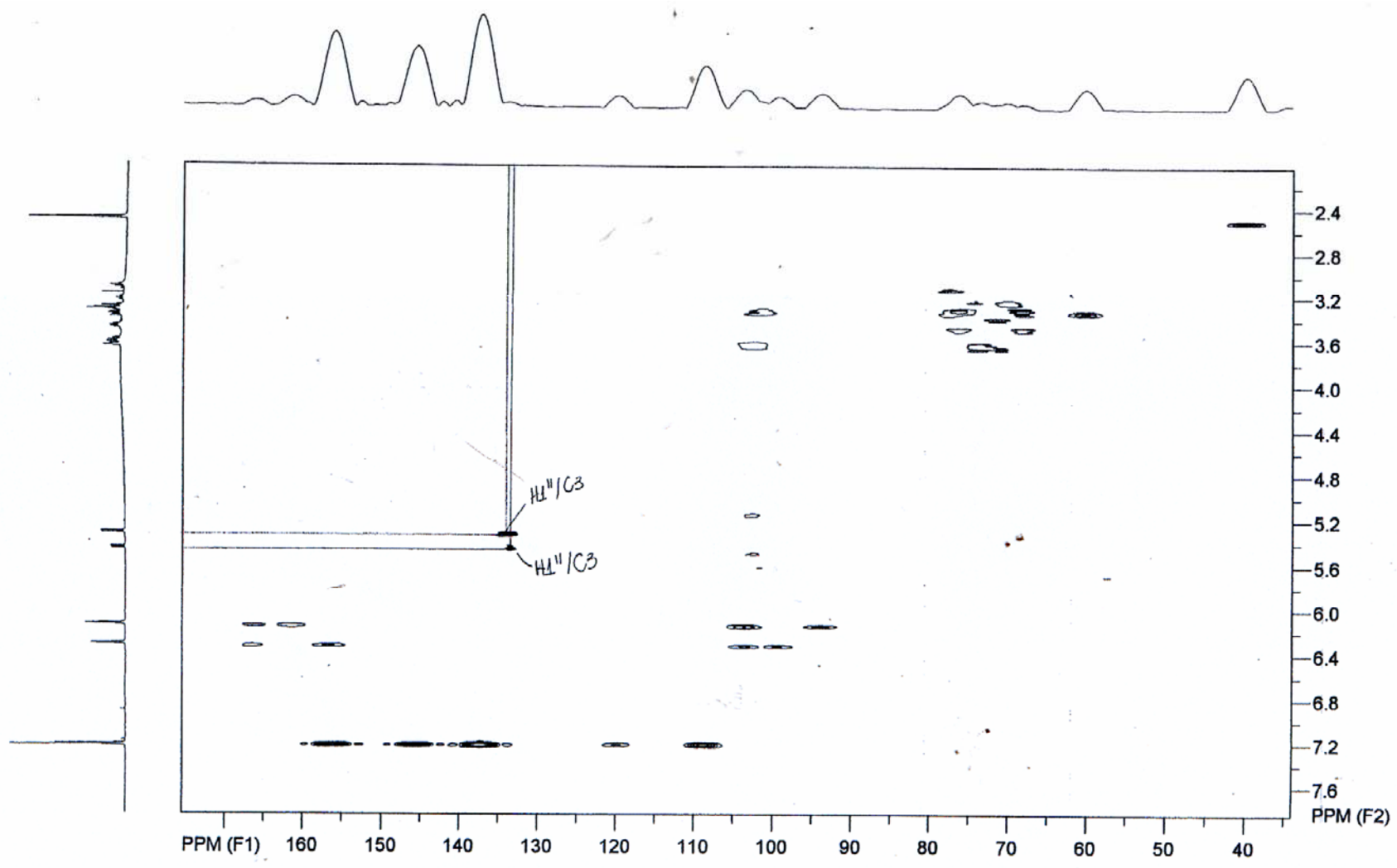


**Espectro 44:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **Mp14** e **Mp15** (125 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).

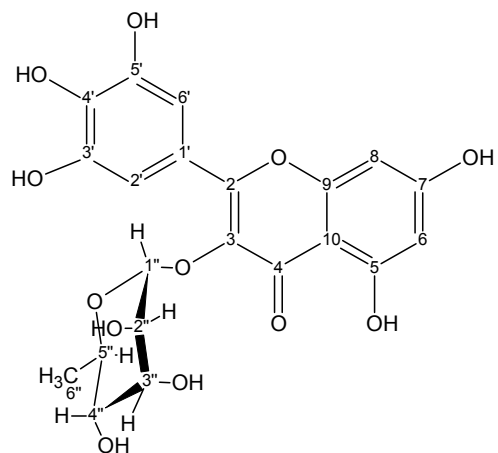


**Espectro 45:** Experimento gHMOC de **Mp14** e **Mp15** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).

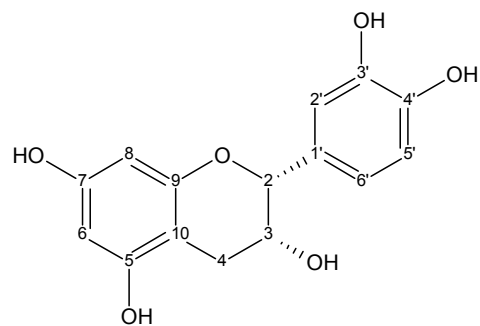




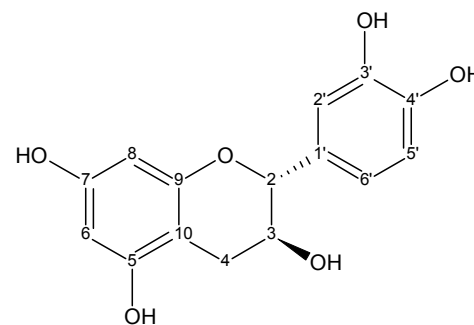
**Espectro 46:** Experimento gHMBC de **Mp14** e **Mp15** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



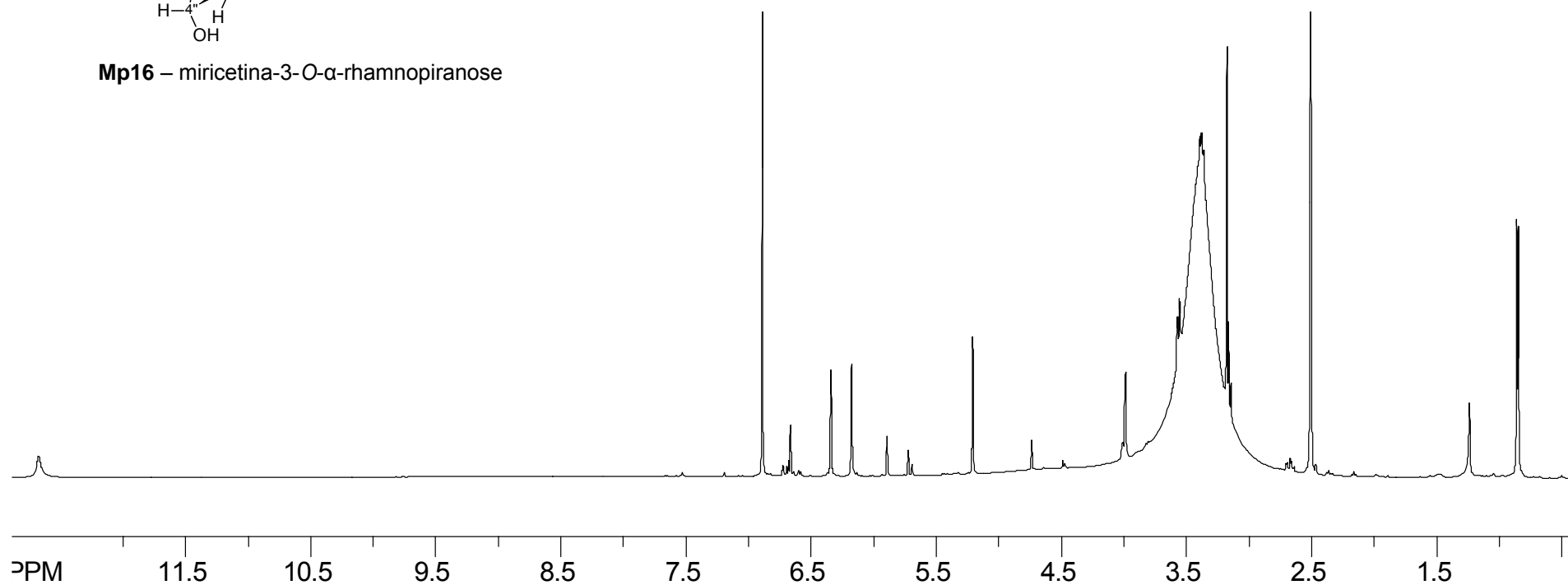
**Mp16** – miricetina-3-O- $\alpha$ -rhamnopyranose



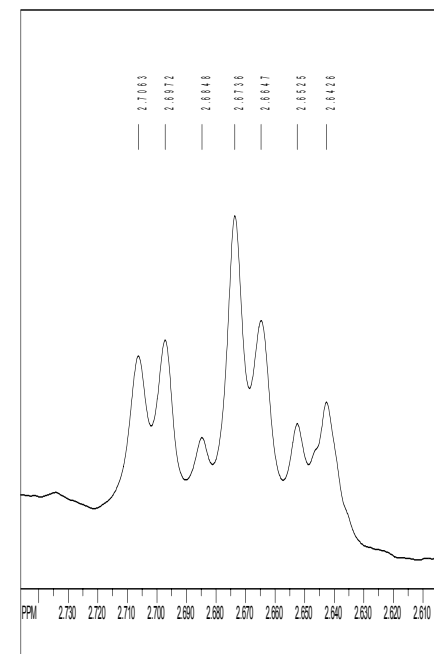
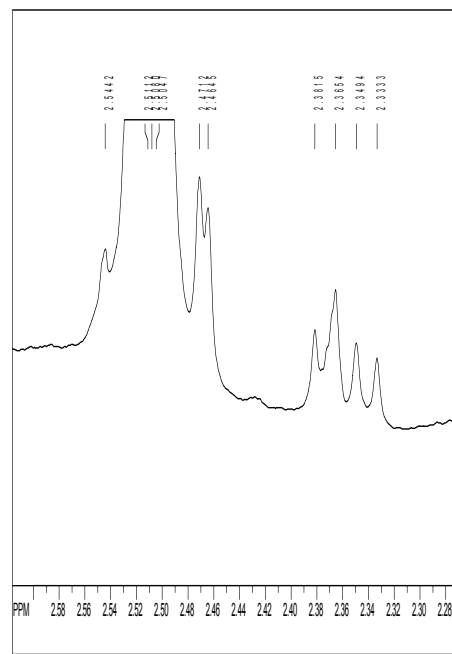
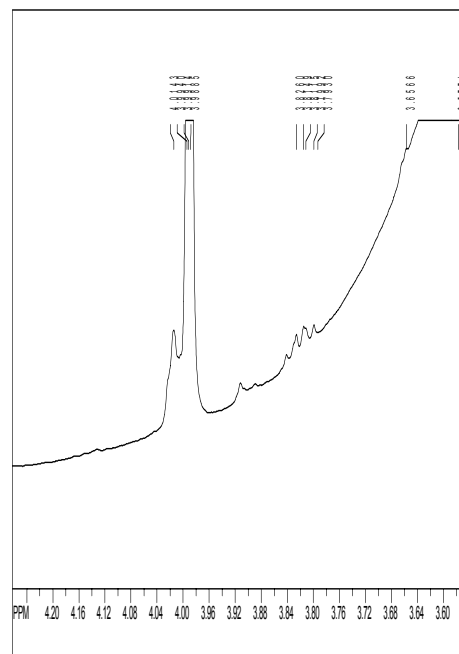
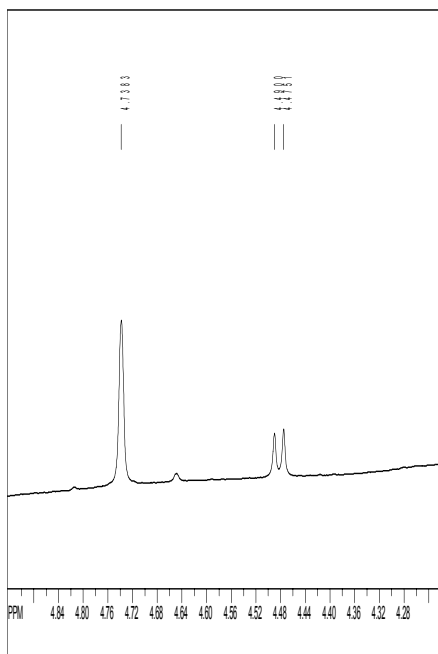
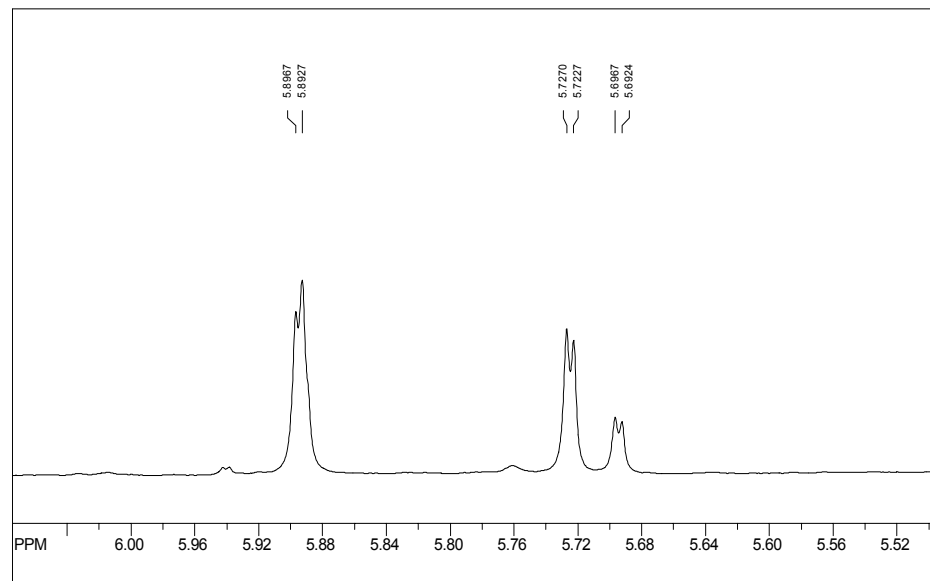
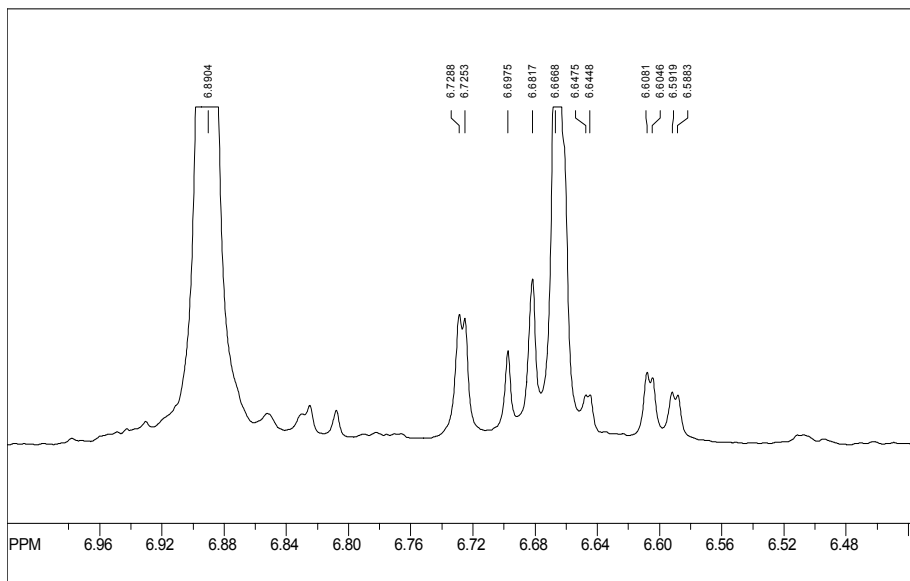
**Mp17** – epicatequina



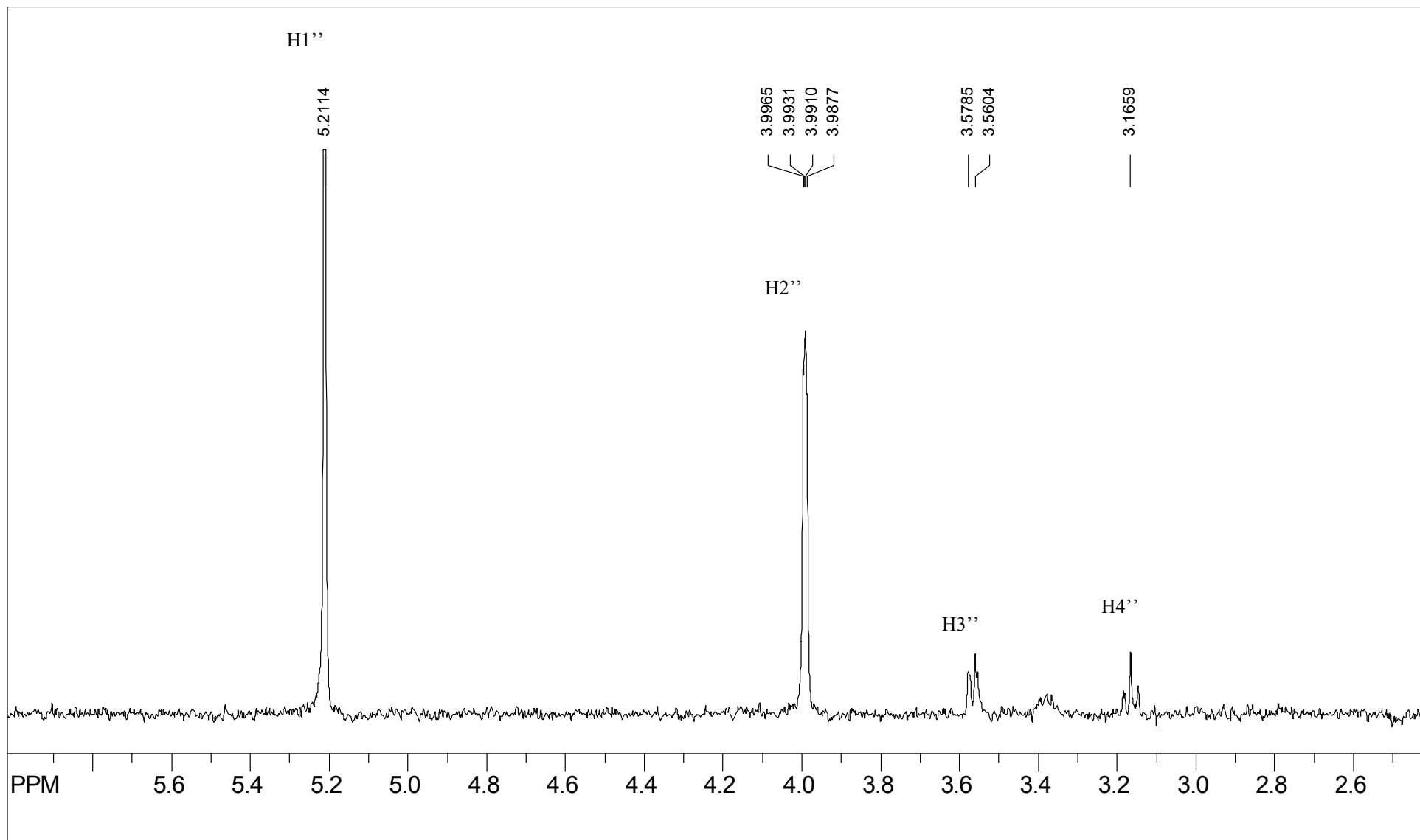
**Mp18** – catequina



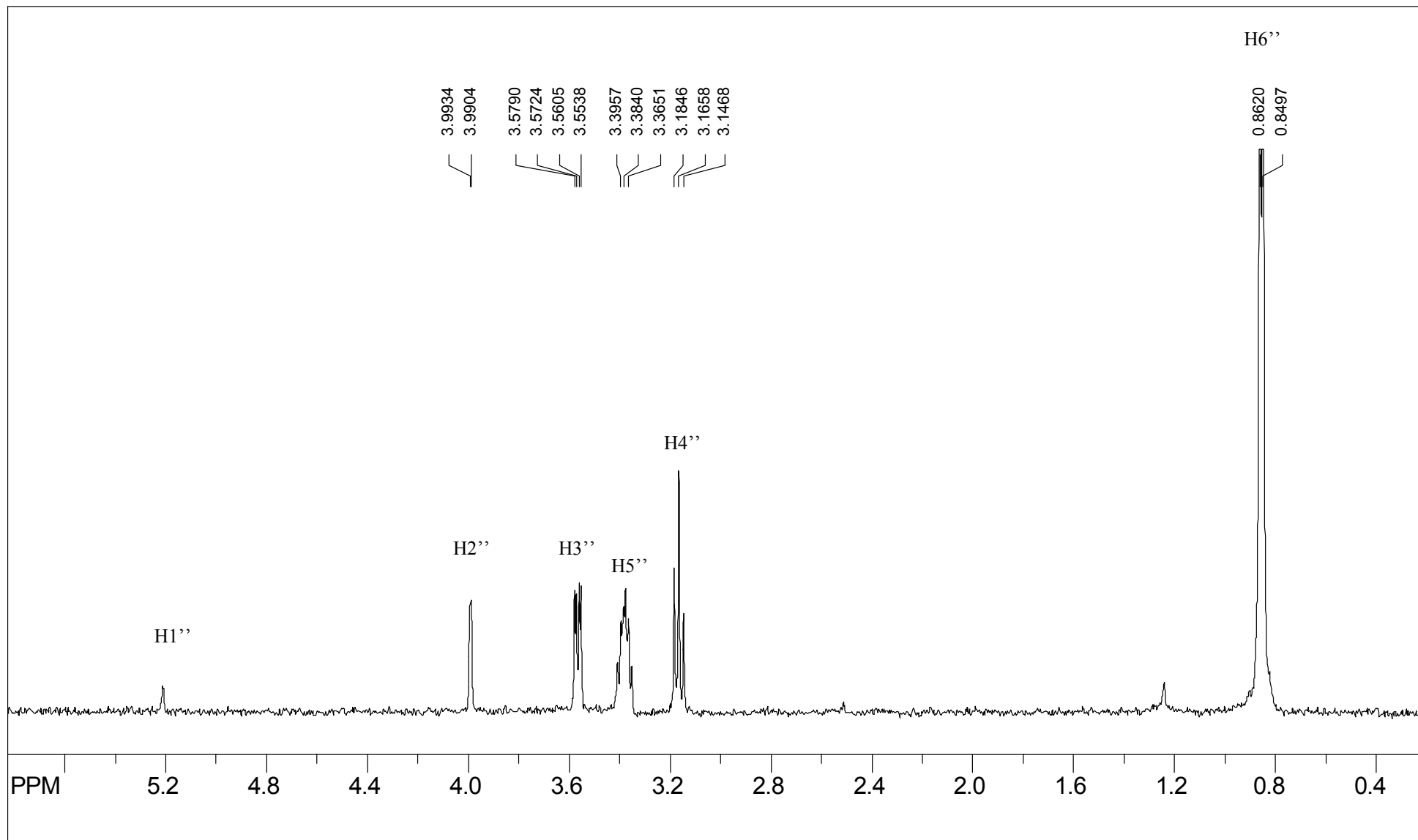
**Espectro 47:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Mp16**, **Mp17** e **Mp18** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



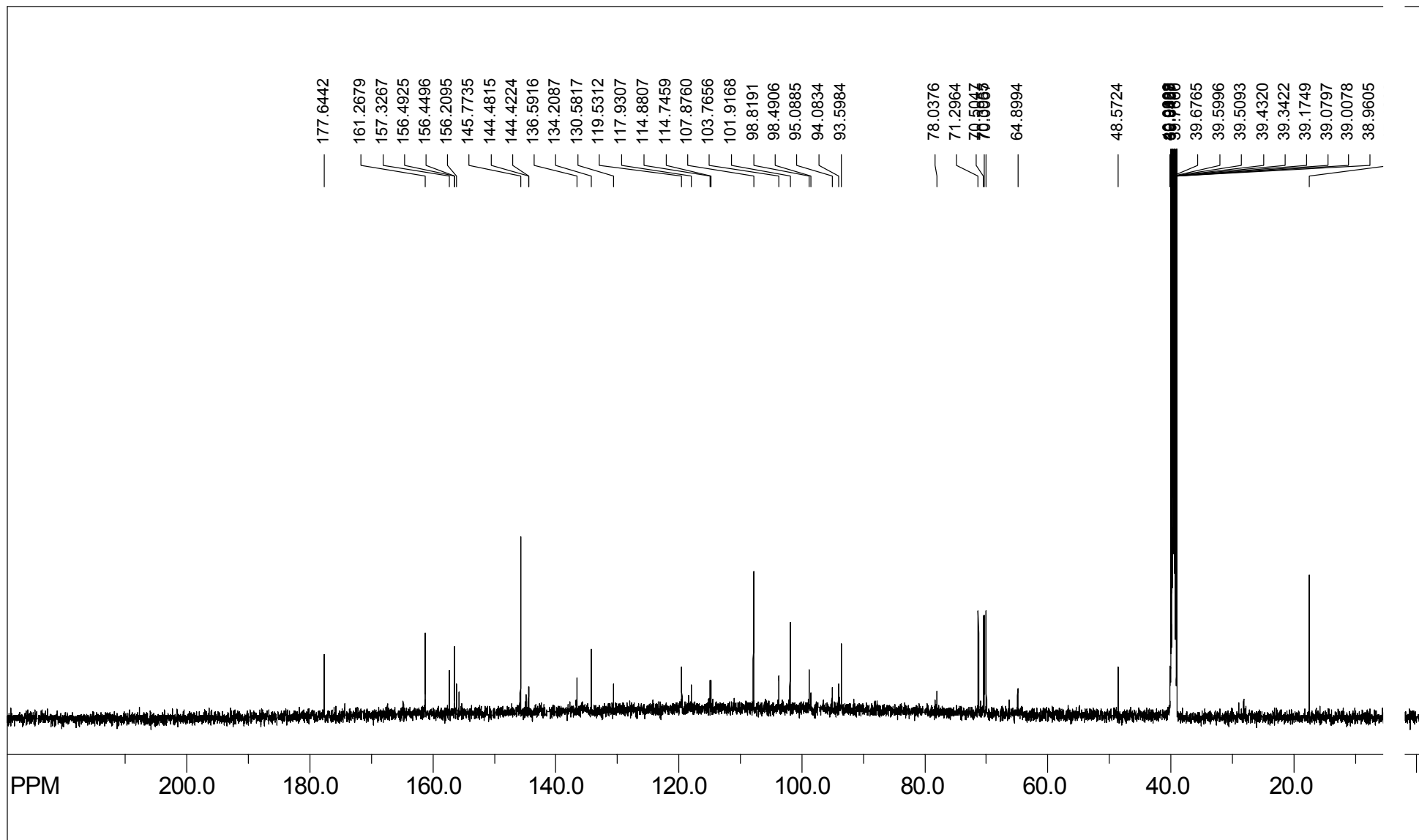
**Espectro 48:** Ampliações do espectro de RMN <sup>1</sup>H de **Mp16**, **Mp17** e **Mp18** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



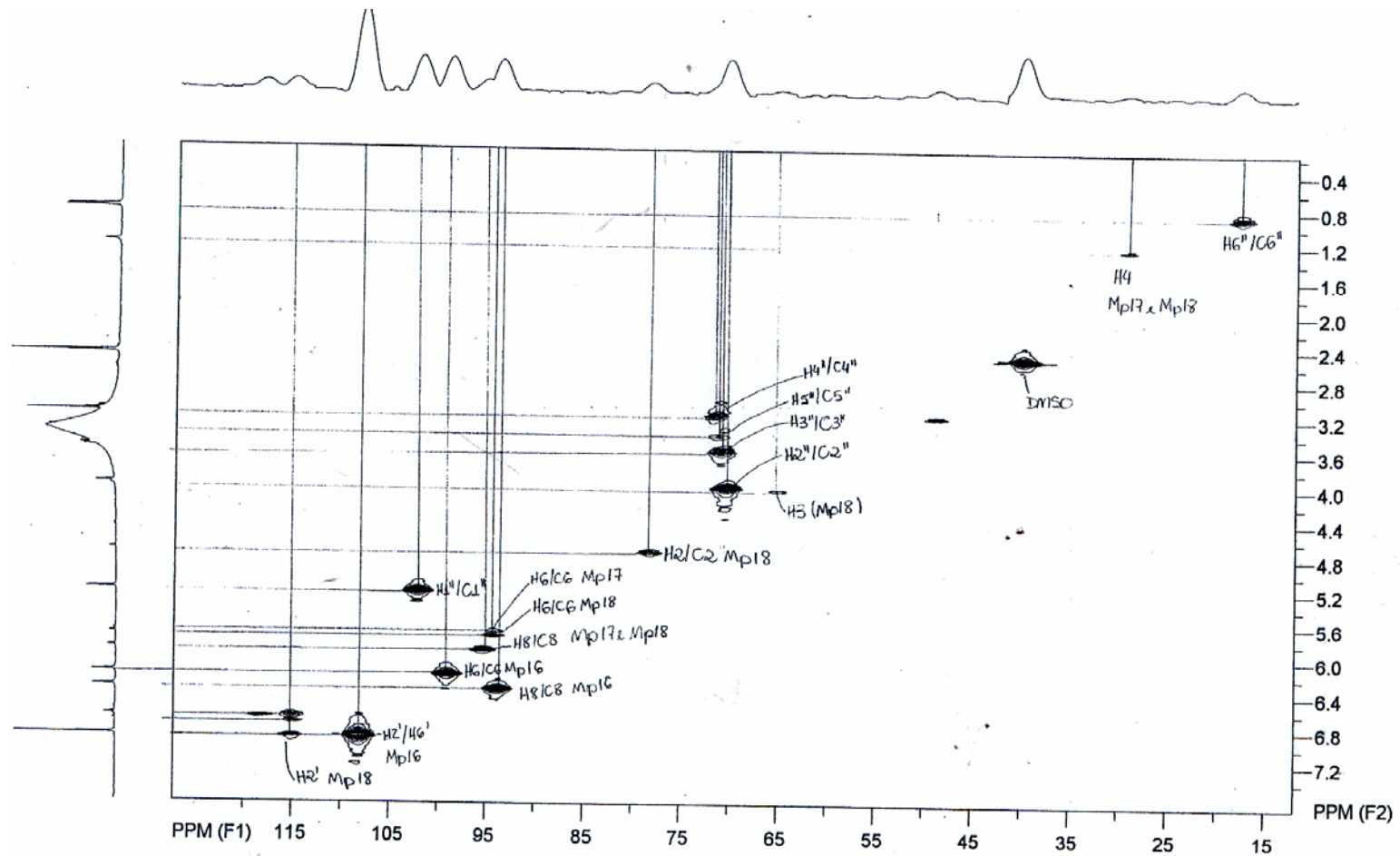
**Espectro 49:** Experimento TOCSY-1D de **Mp16** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, irradiado em  $\delta$  5,21).



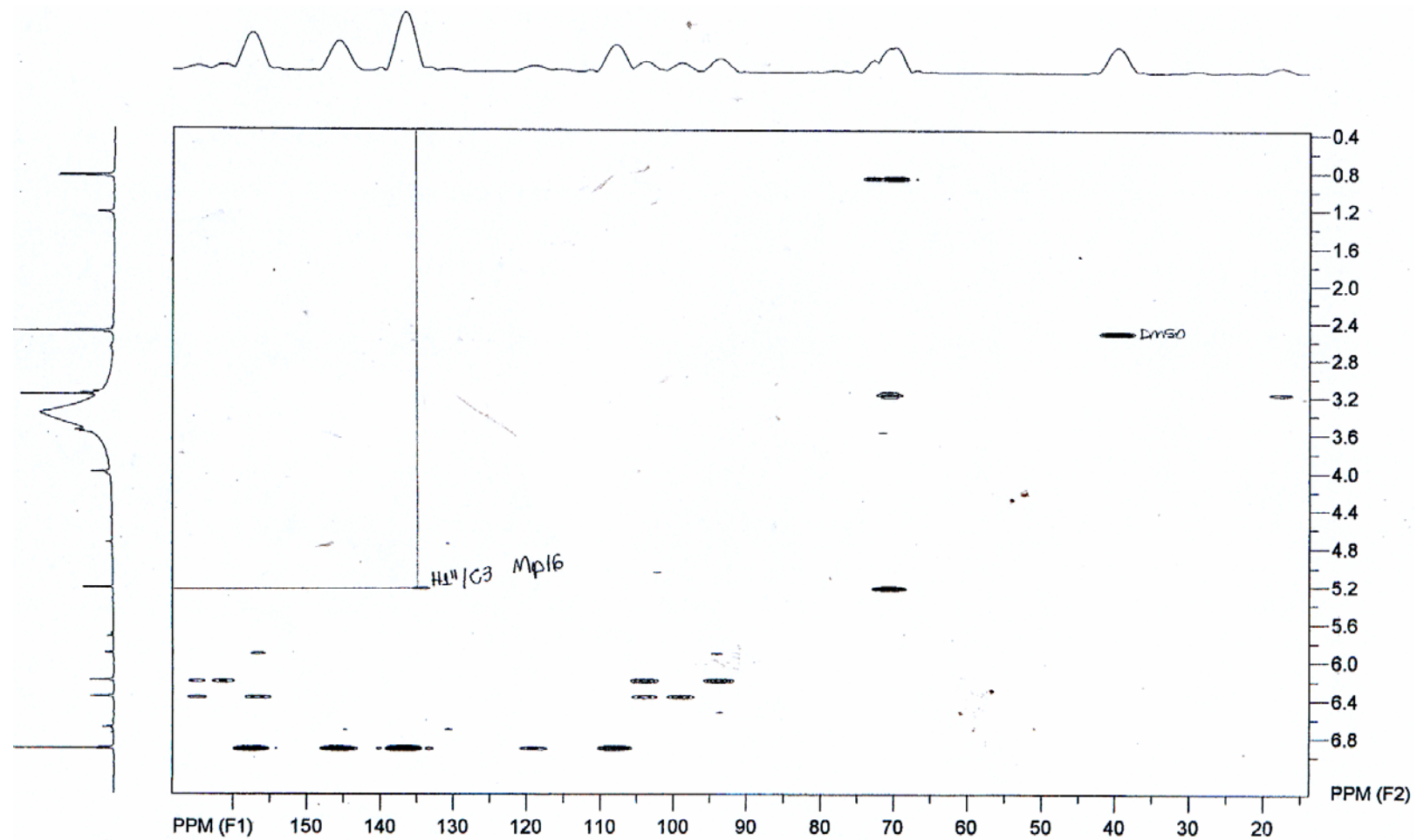
**Espectro 50:** Experimento TOCSY-1D de **Mp16** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, irradiado em  $\delta$  0,85).



**Espectro 51:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **Mp16**, **Mp17** e **Mp18** (125 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , TMS).

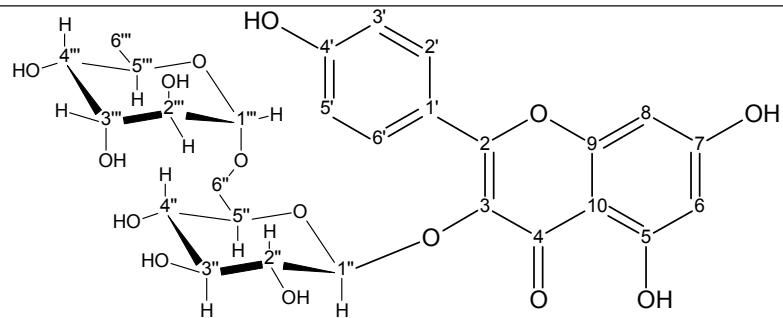


Espectro 52: Experimento gHMQC de Mp16, Mp17 e Mp18 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

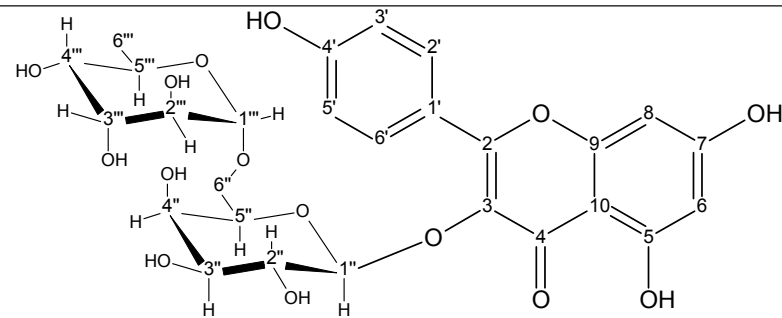


**Espectro 53:** Experimento gHMBC de **Mp16**, **Mp17** e **Mp18** (500MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).

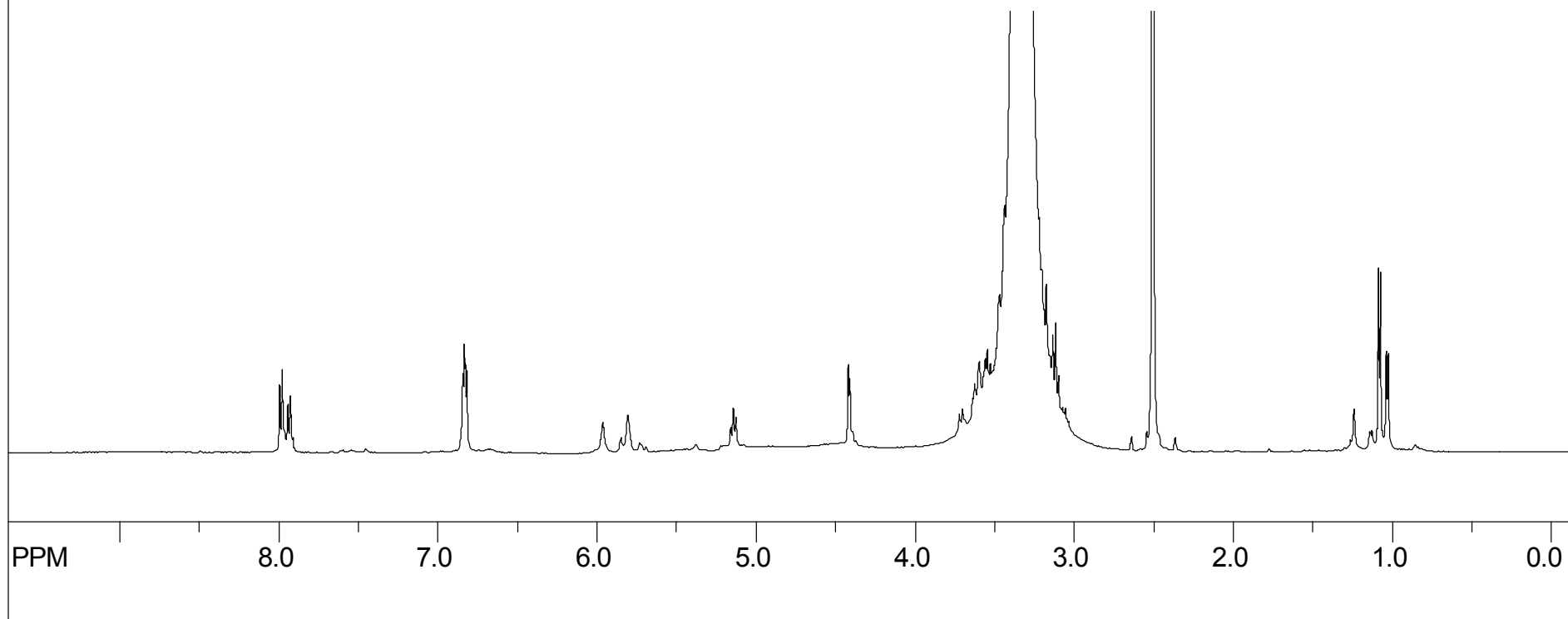




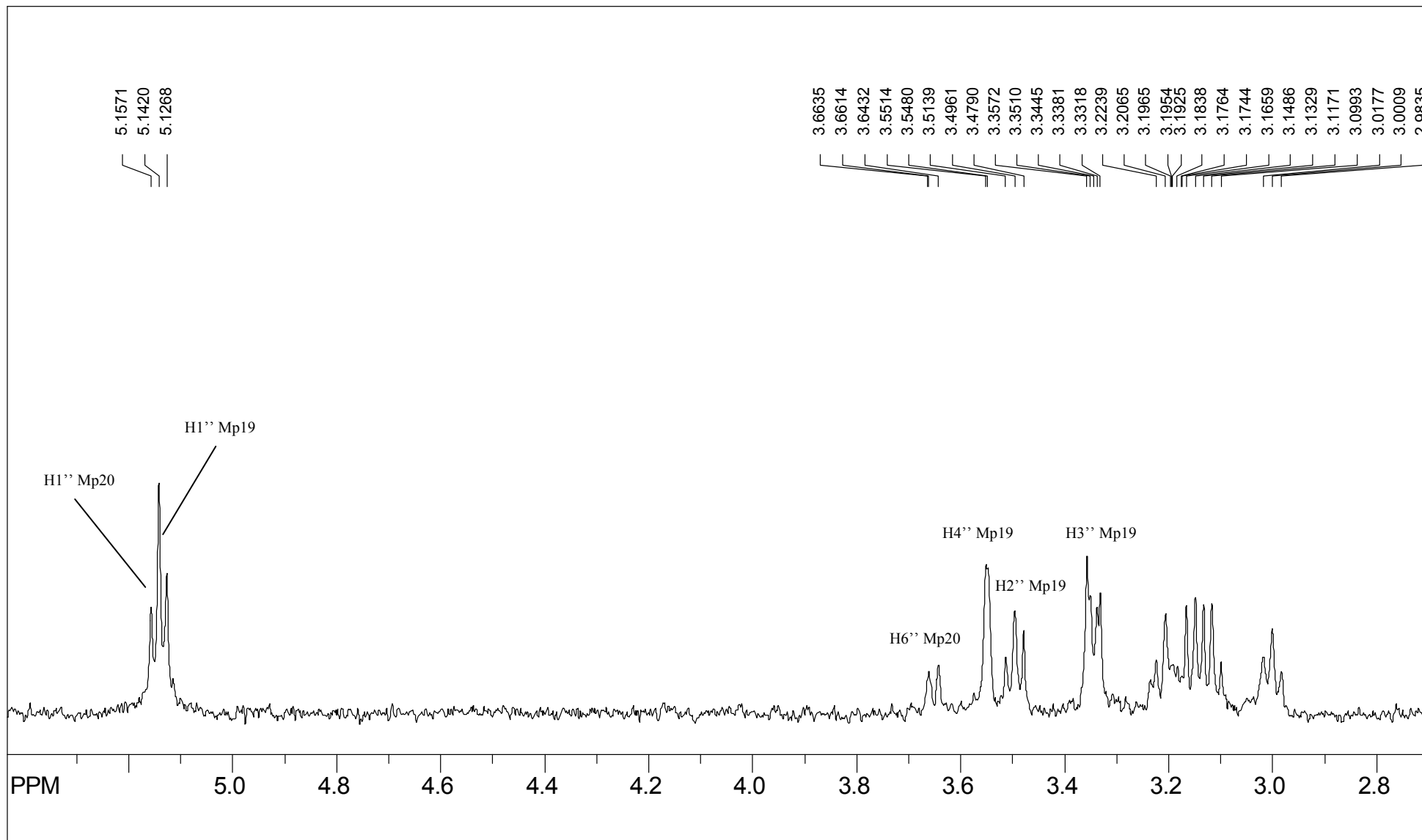
**Mp20** - Kaempferol-3-O- $\beta$ -rhamnopyranosil-(6 $\rightarrow$ 1)-glucopiranoose



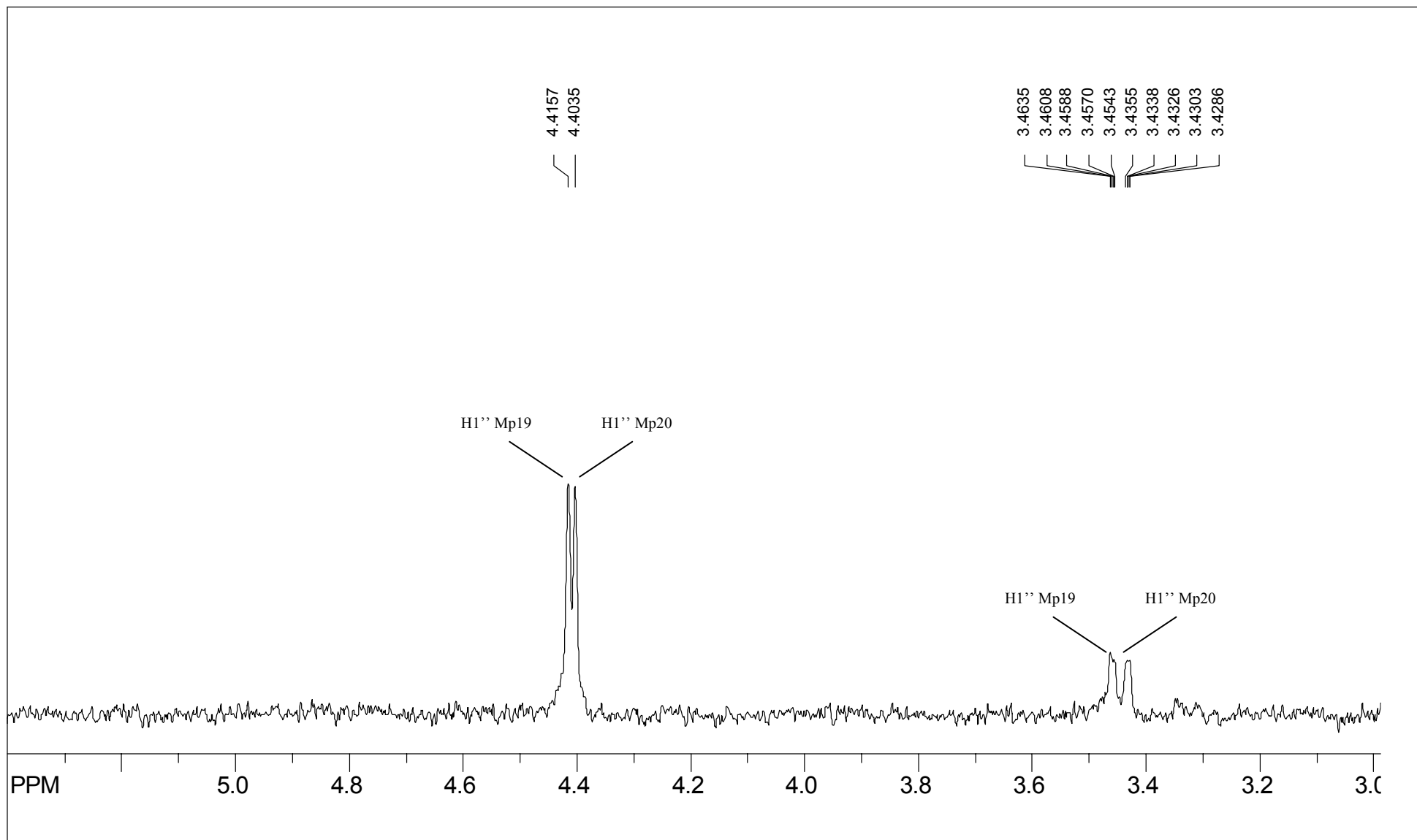
**Mp19** - Kaempferol-3-O- $\beta$ -rhamnopyranosil-(6 $\rightarrow$ 1)-galactopiranoose



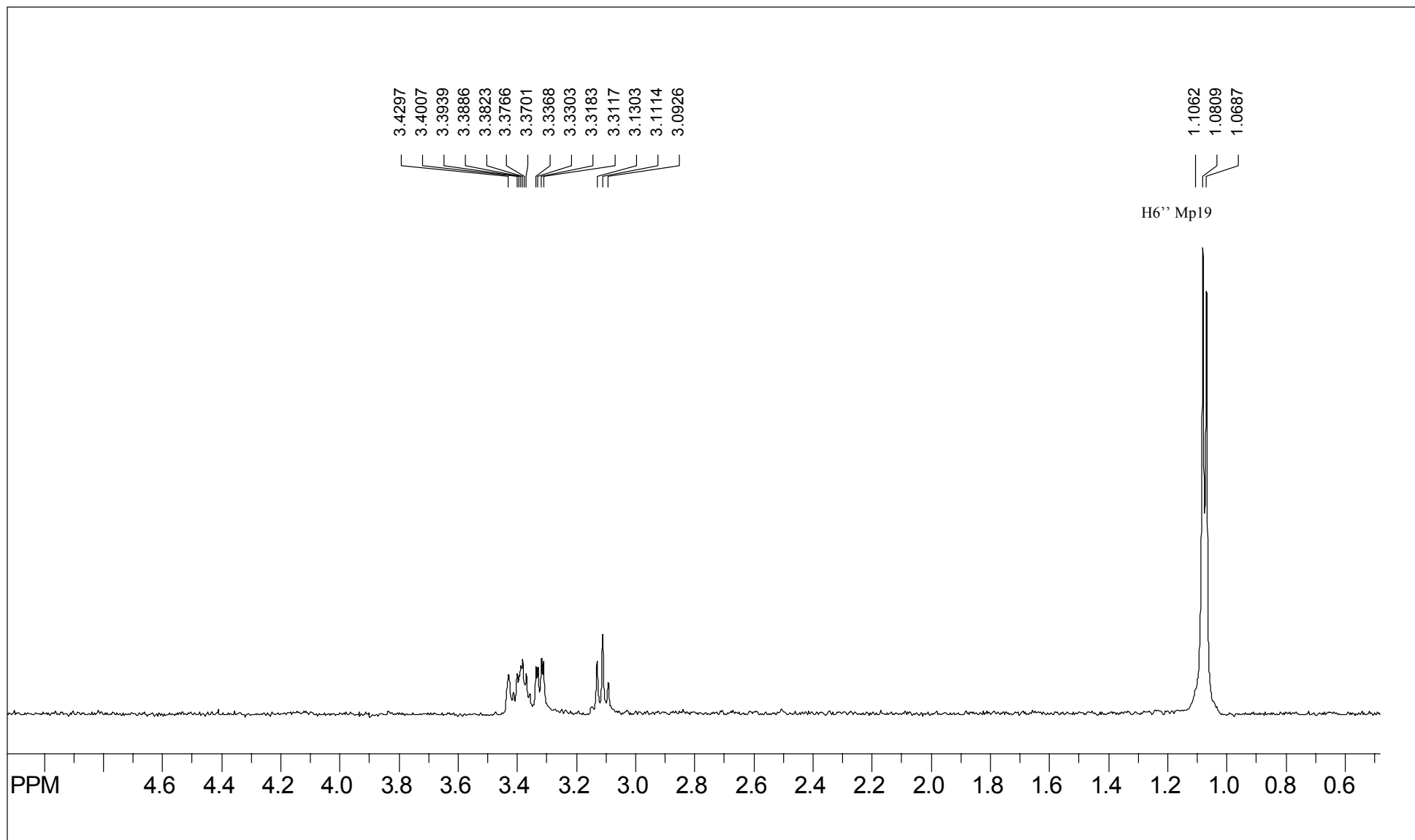
**Espectro 54:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Mp19** e **Mp20** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



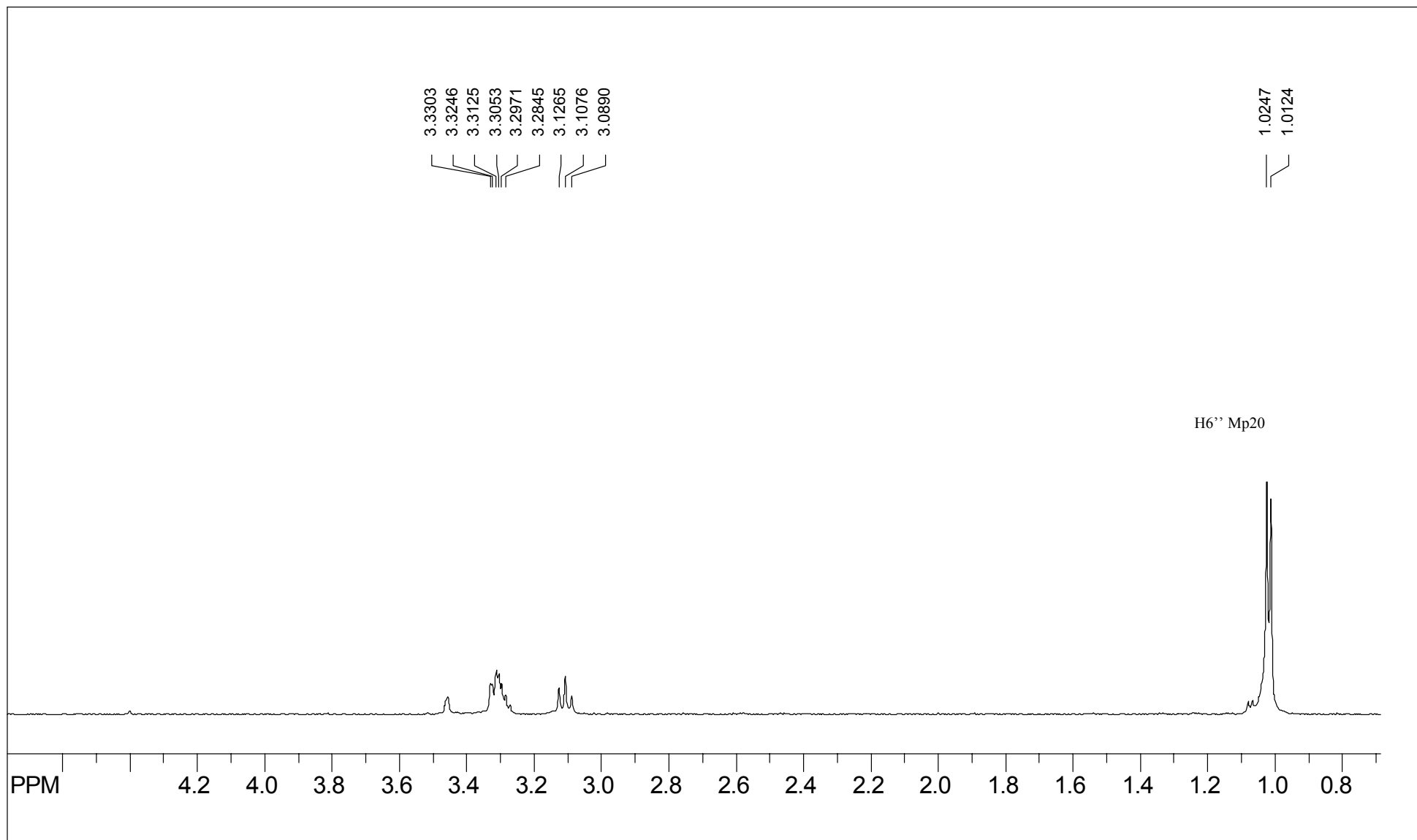
**Espectro 55:** Experimento TOCSY-1D de **Mp19** e **Mp20** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, irradiado em δ 5,14 ppm).



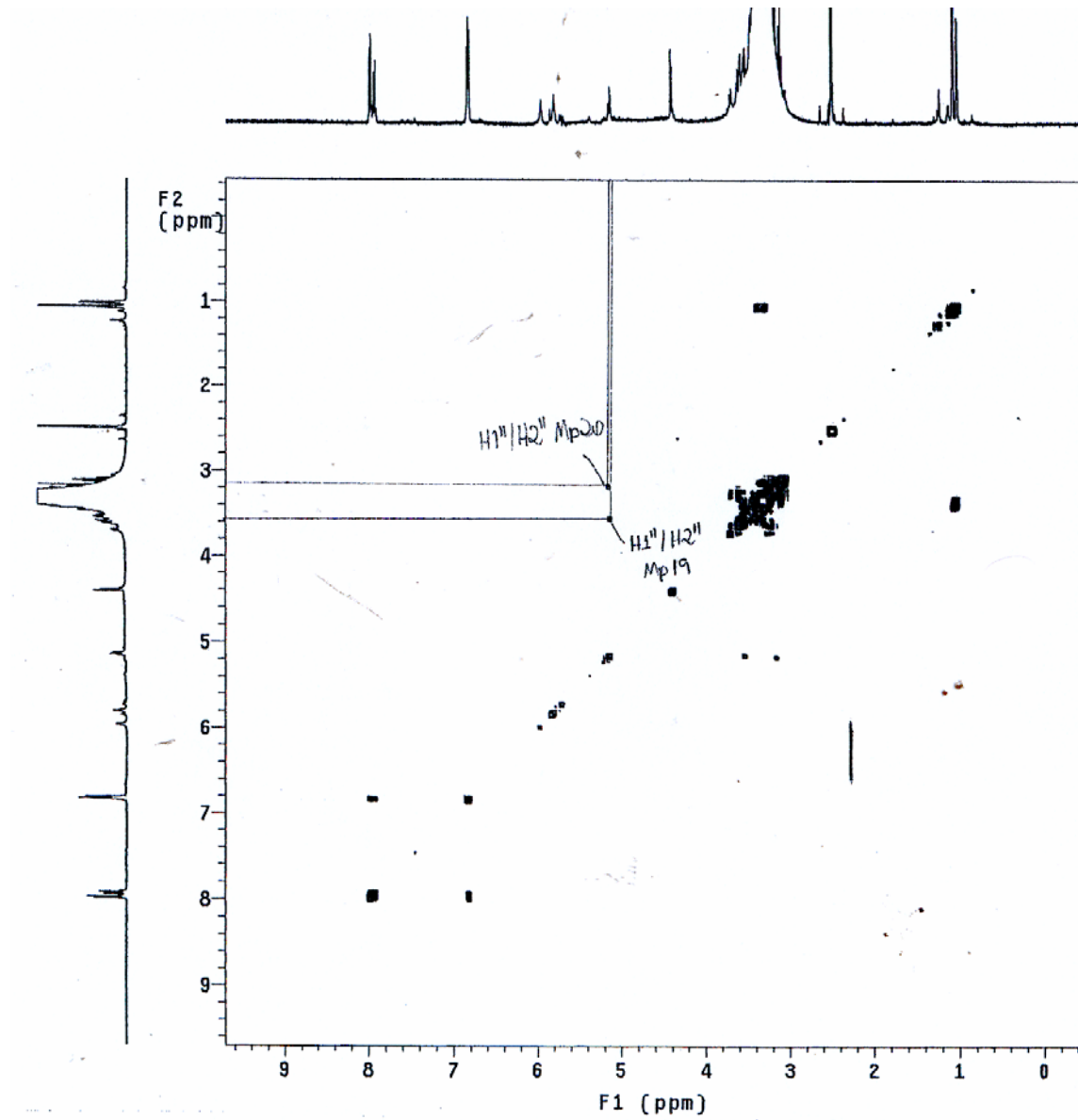
**Espectro 56:** Experimento TOCSY-1D de **Mp19** e **Mp20** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, irradiado em  $\delta$  4,40 ppm).



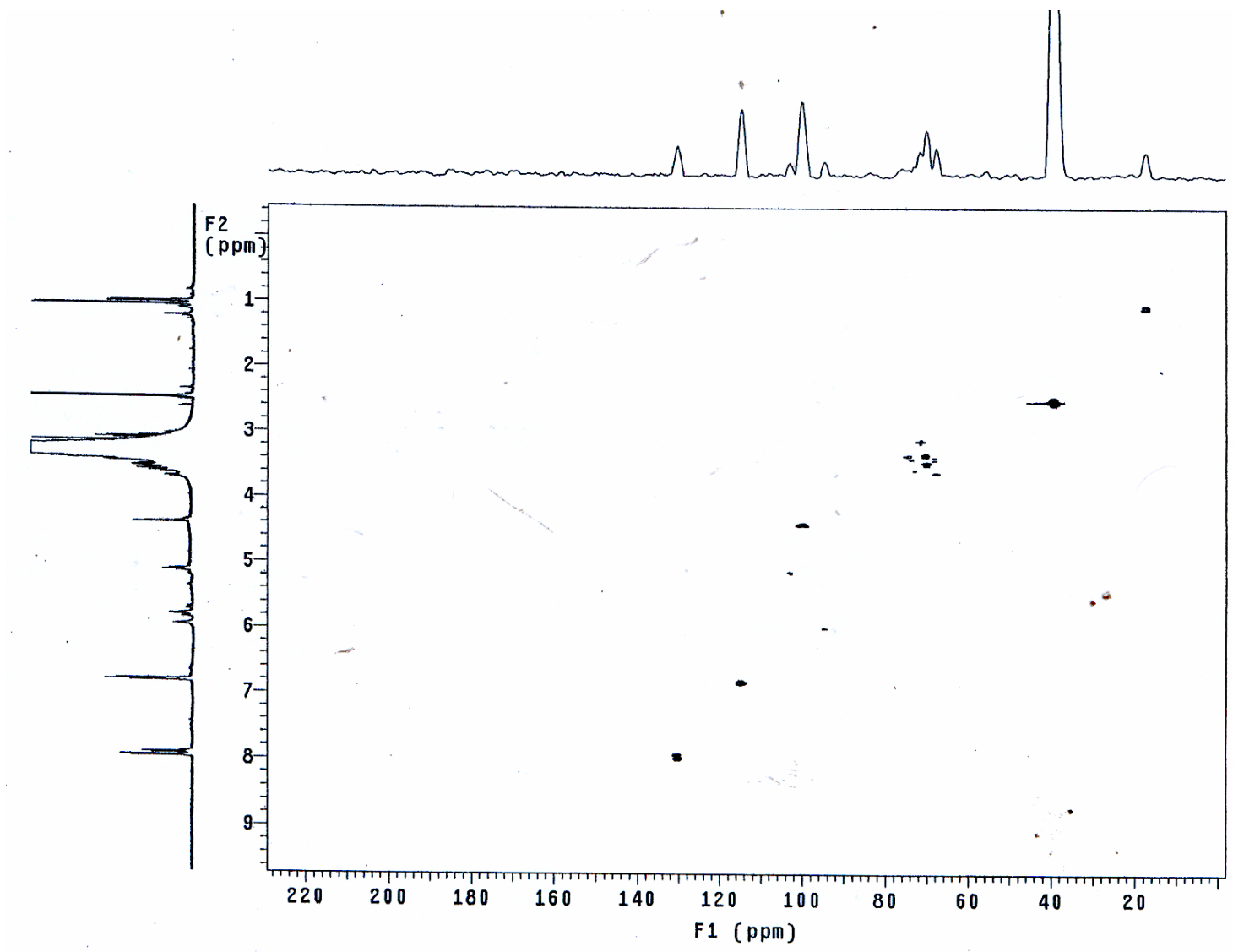
**Espectro 57:** Experimento TOCSY-1D de **Mp19** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, irradiado em  $\delta$  1,08 ppm).



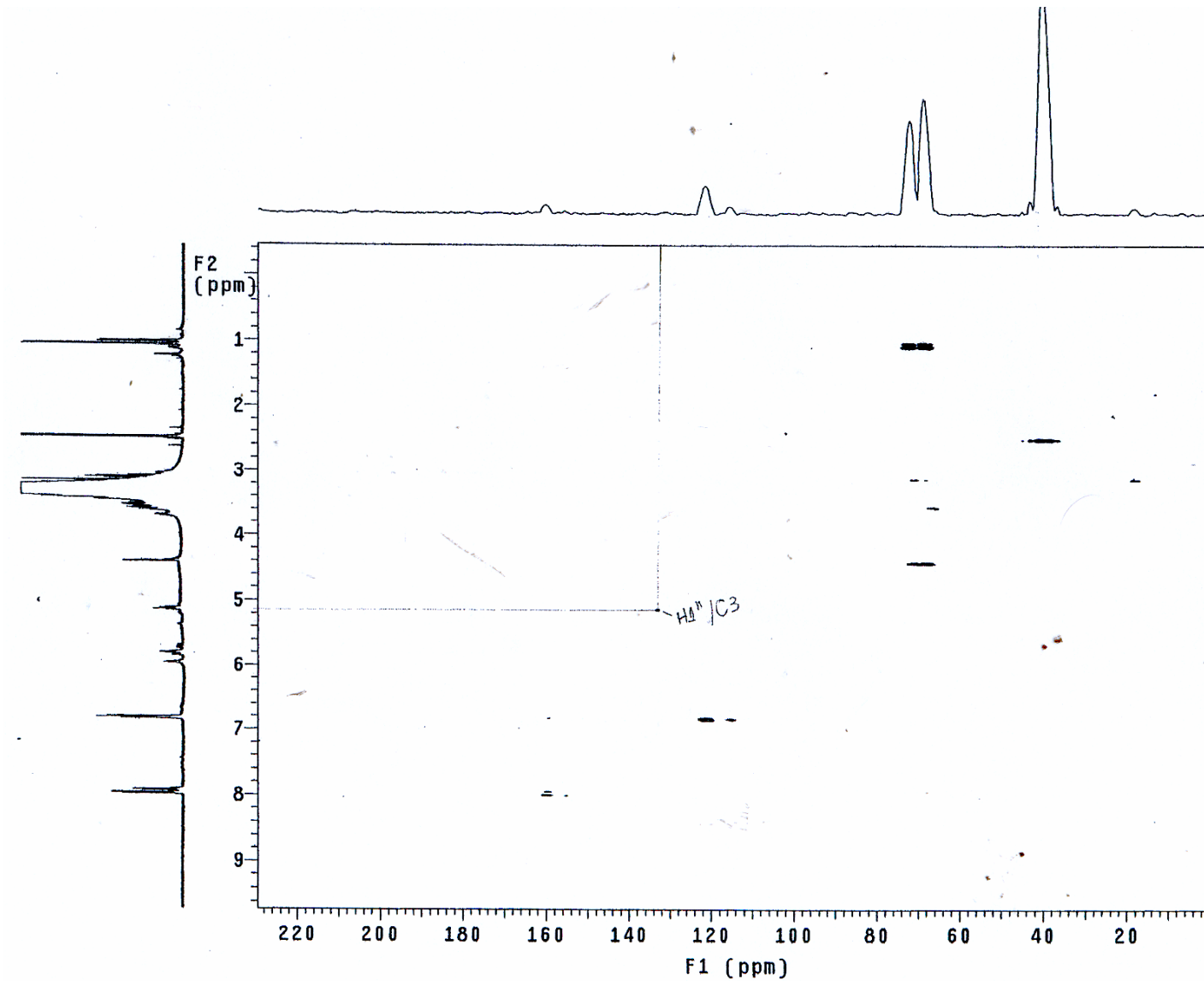
**Espectro 58:** Experimento TOCSY-1D de **Mp20** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, irradiado em  $\delta$  1,02 ppm).



**Espectro 59:** Experimento COSY- <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H de **Mp19** e **Mp20** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

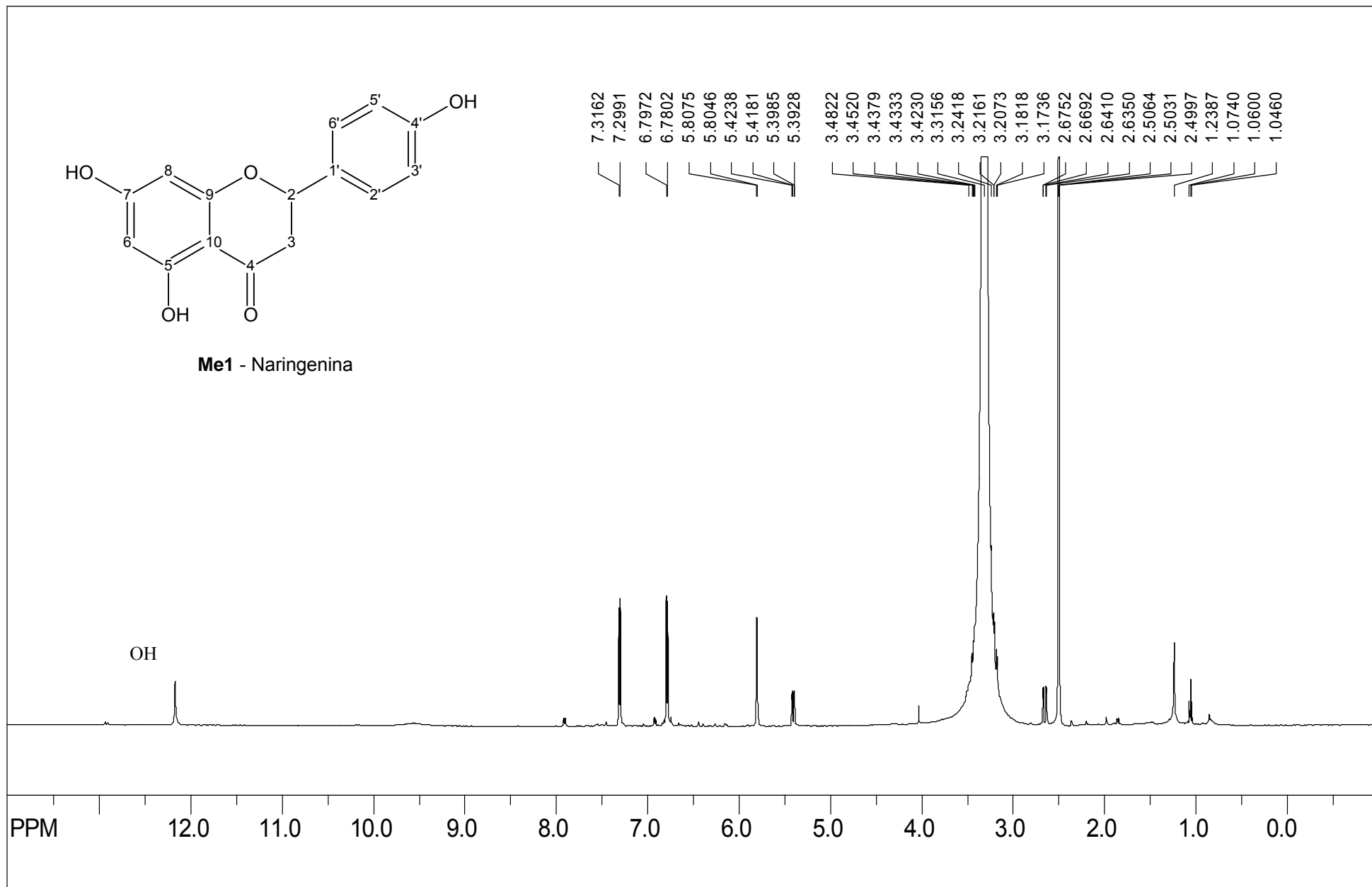


Espectro 60: Experimento gHMBC de Mp19 e Mp20 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

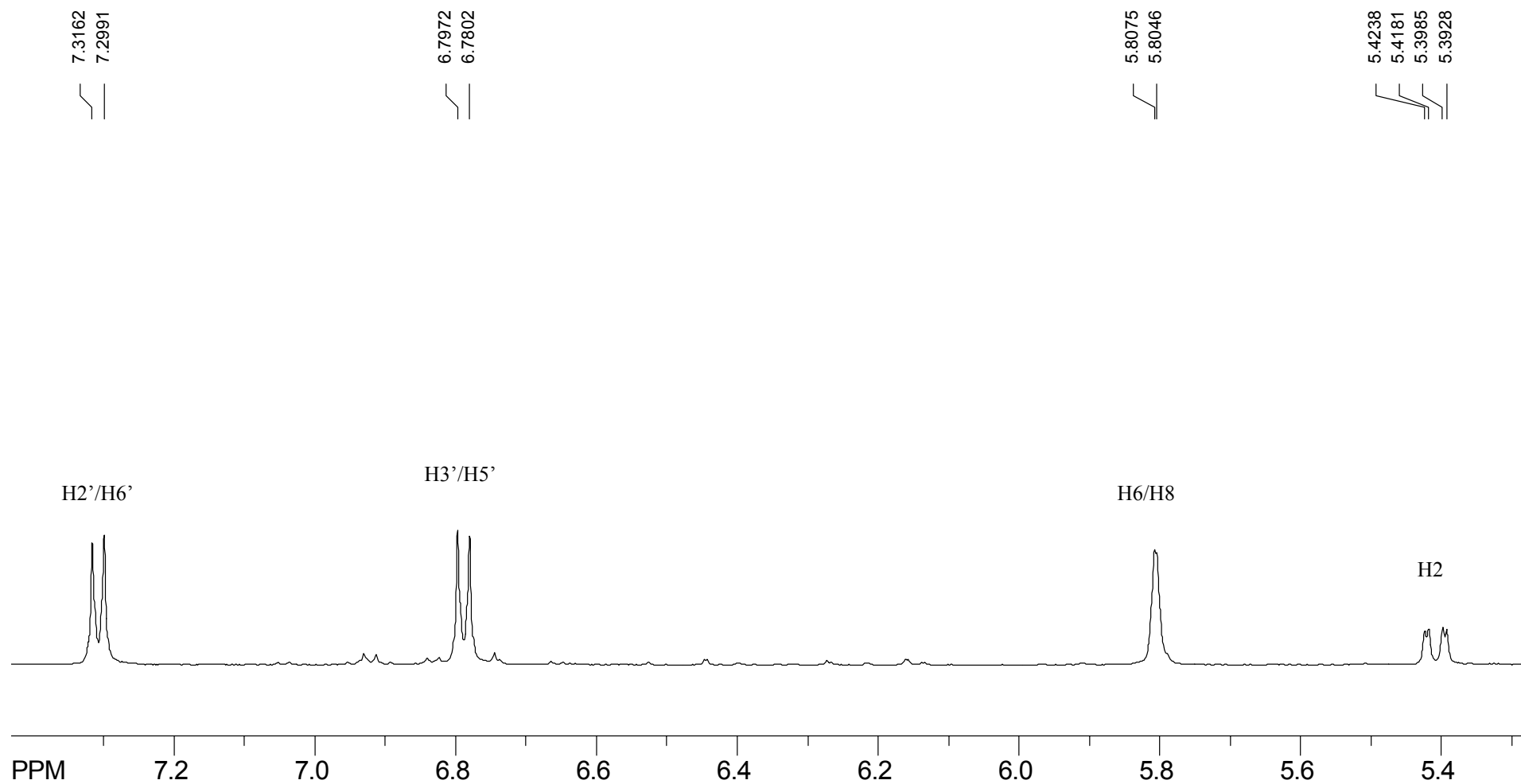


Espectro 61: Experimento gHMBC de Mp19 e Mp20 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

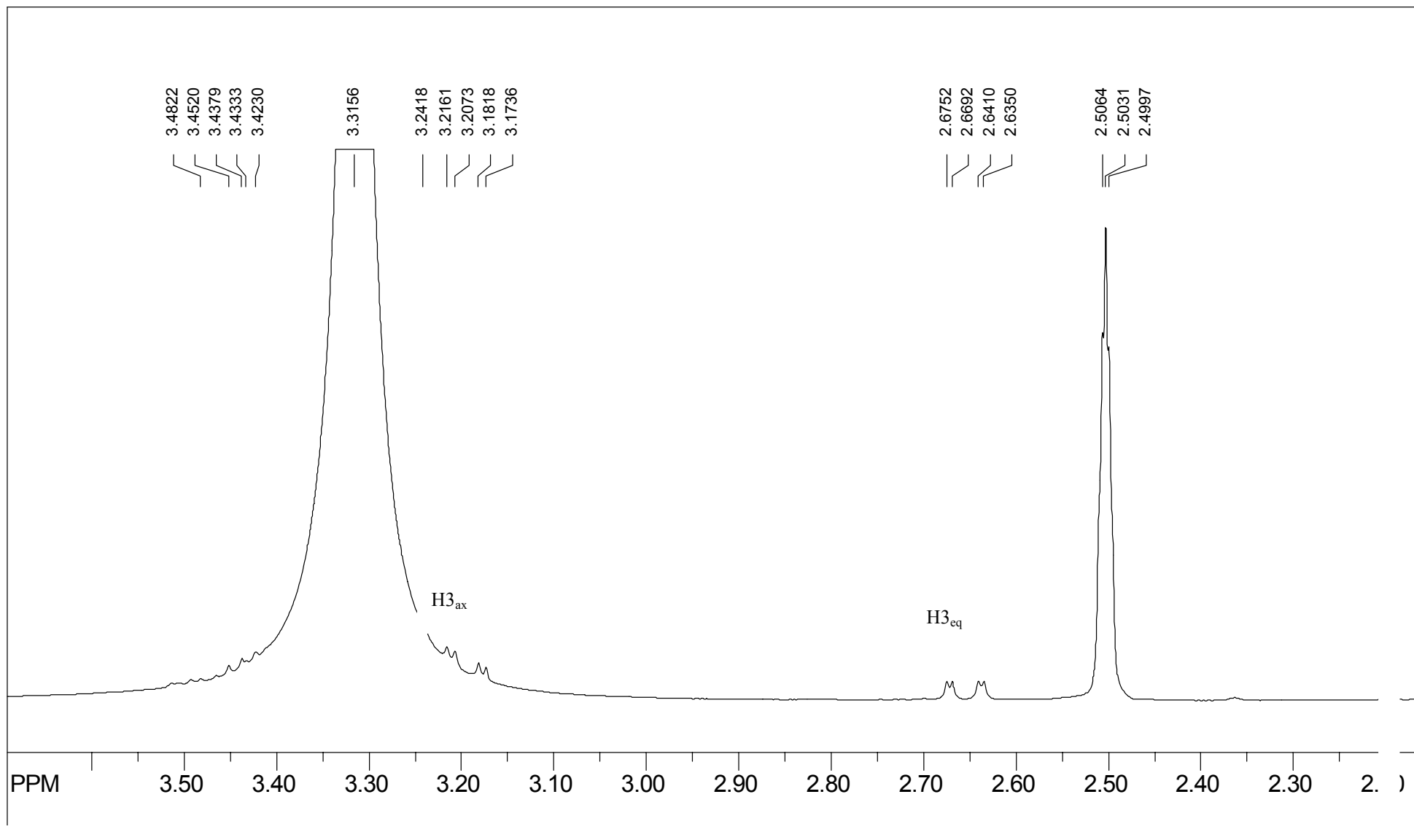




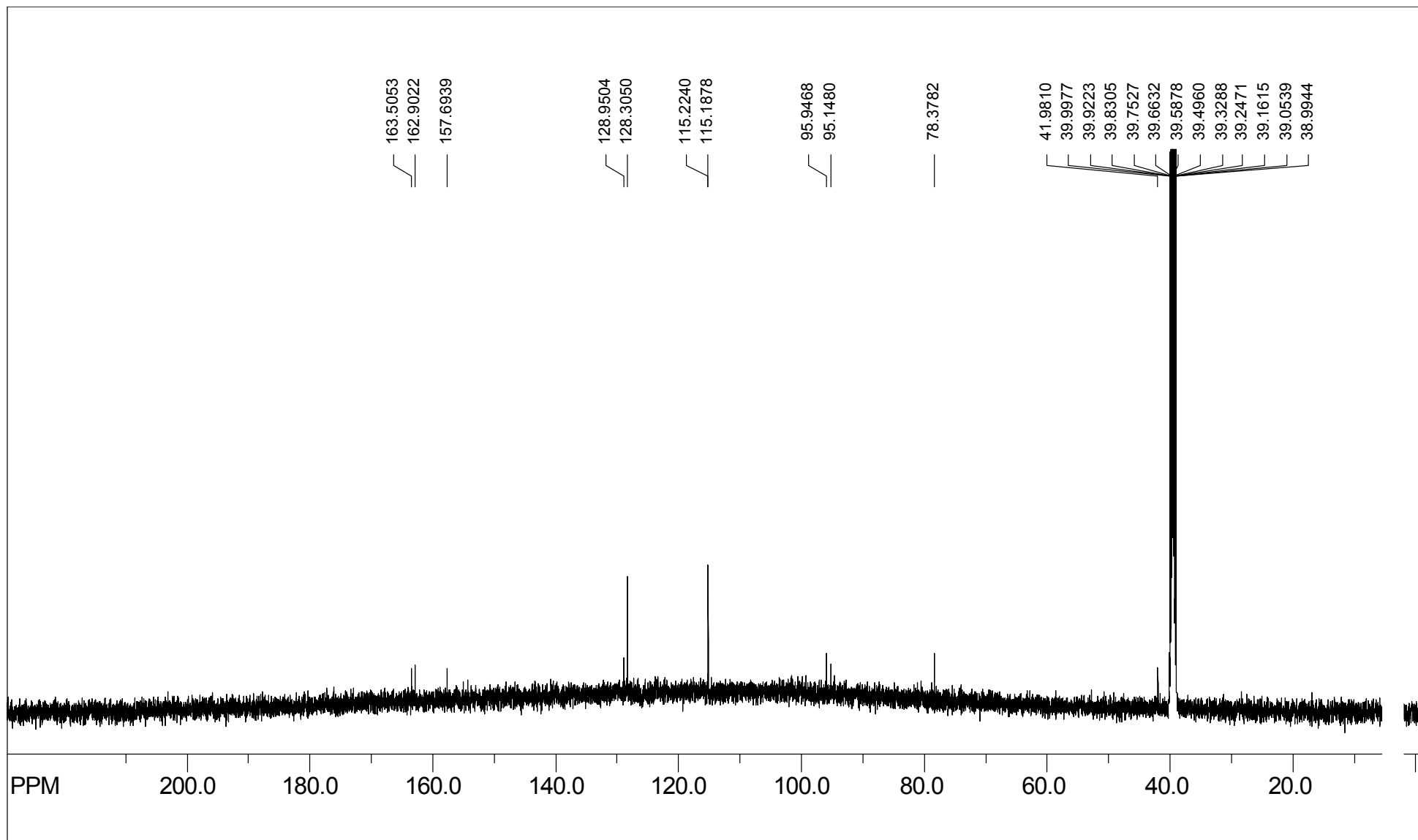
**Espectro 62:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Me1** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



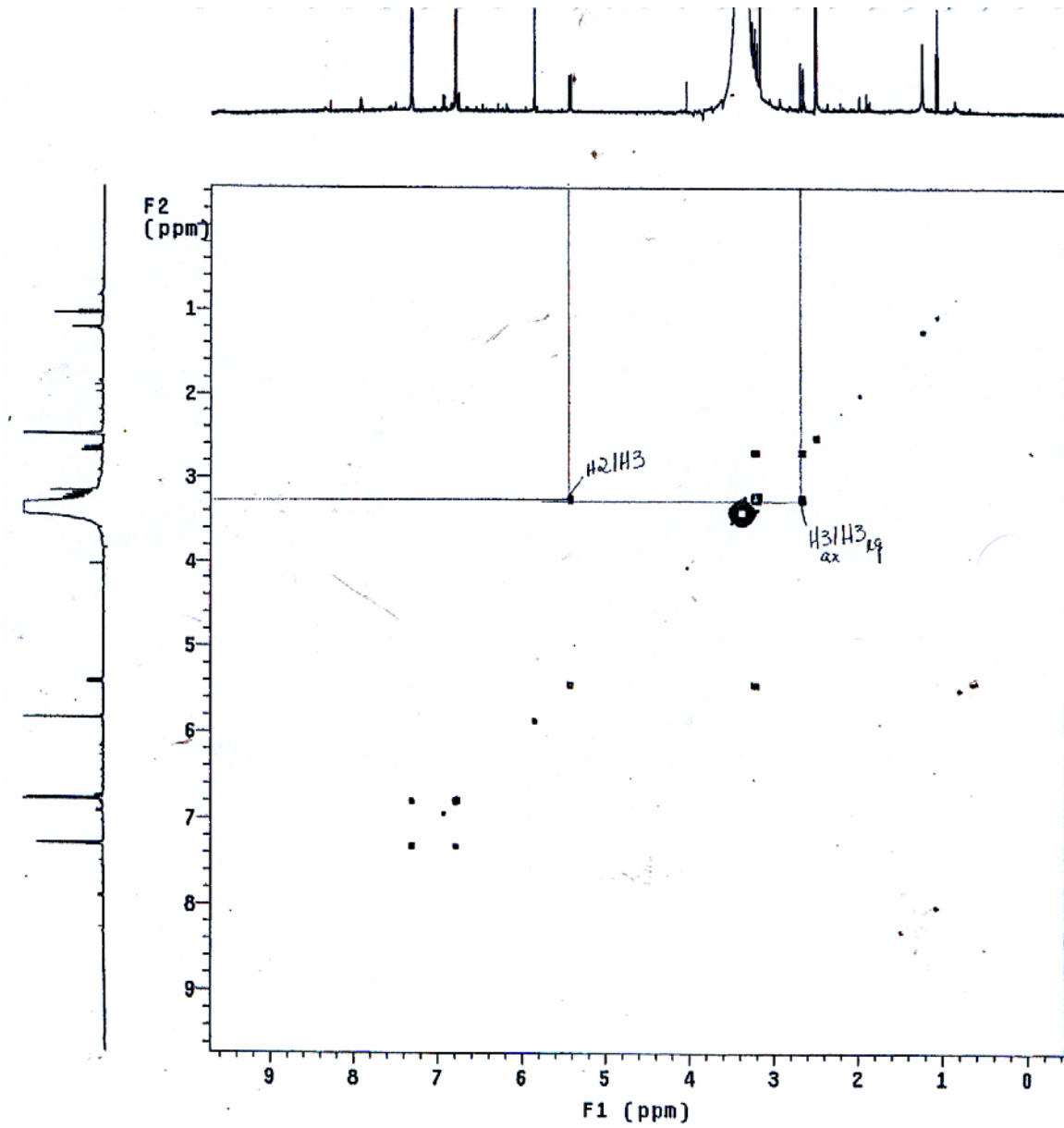
**Espectro 63:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **Me1** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, ampliação de δ 5,3 a 7,4 ppm).



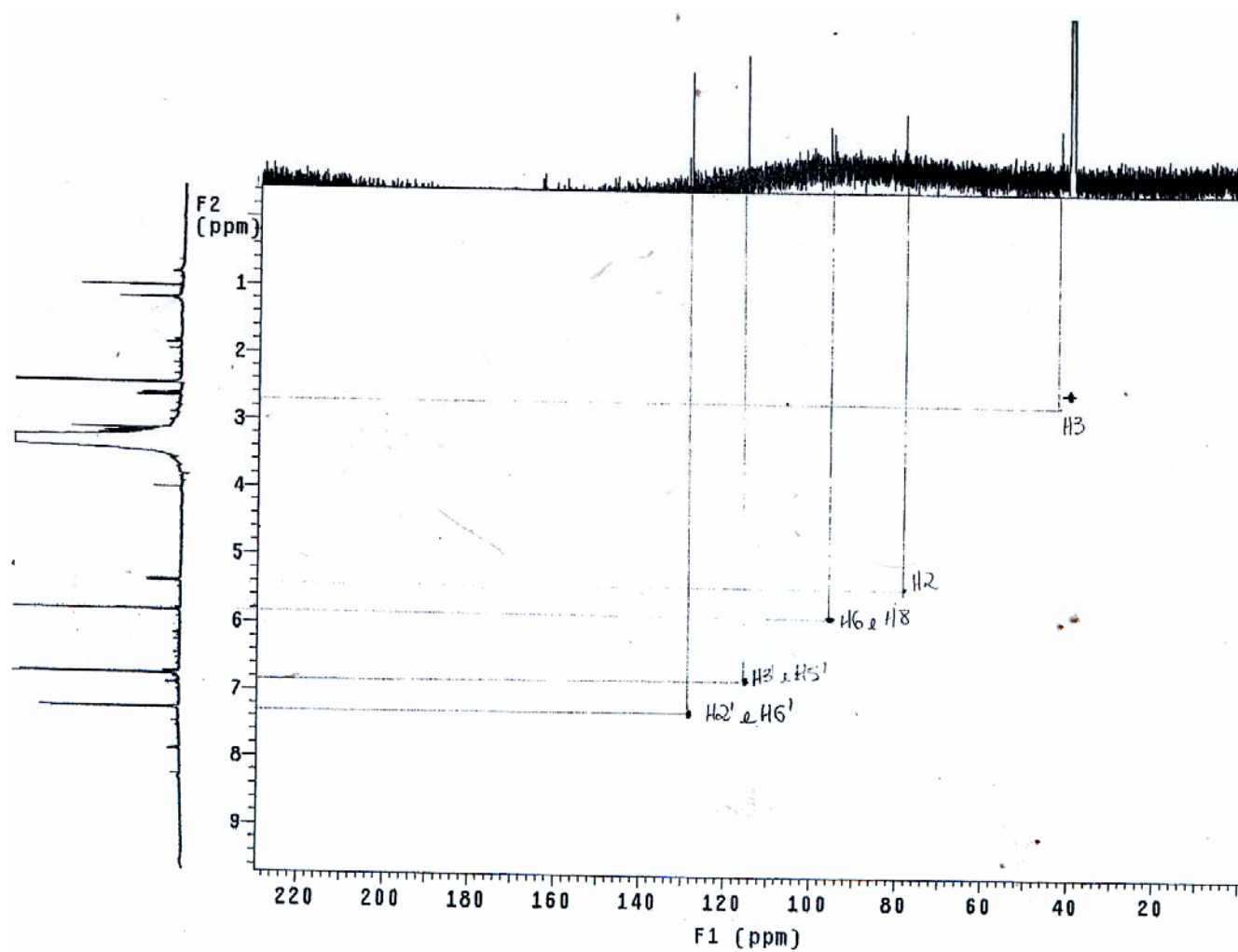
**Espectro 64:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de Me1 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, ampliação de δ 2,2 a 3,6 ppm).



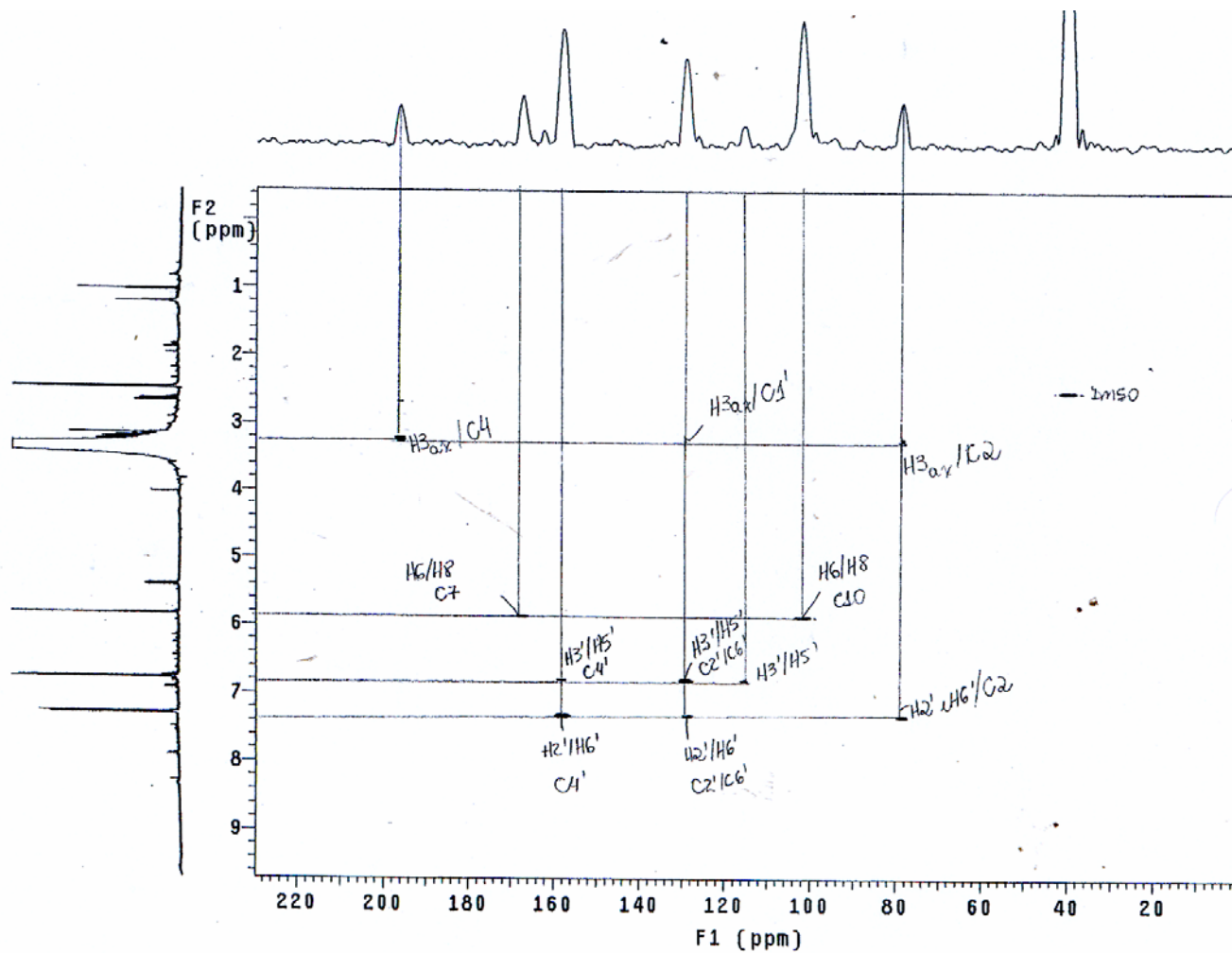
**Espectro 65:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **Me1** (125 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



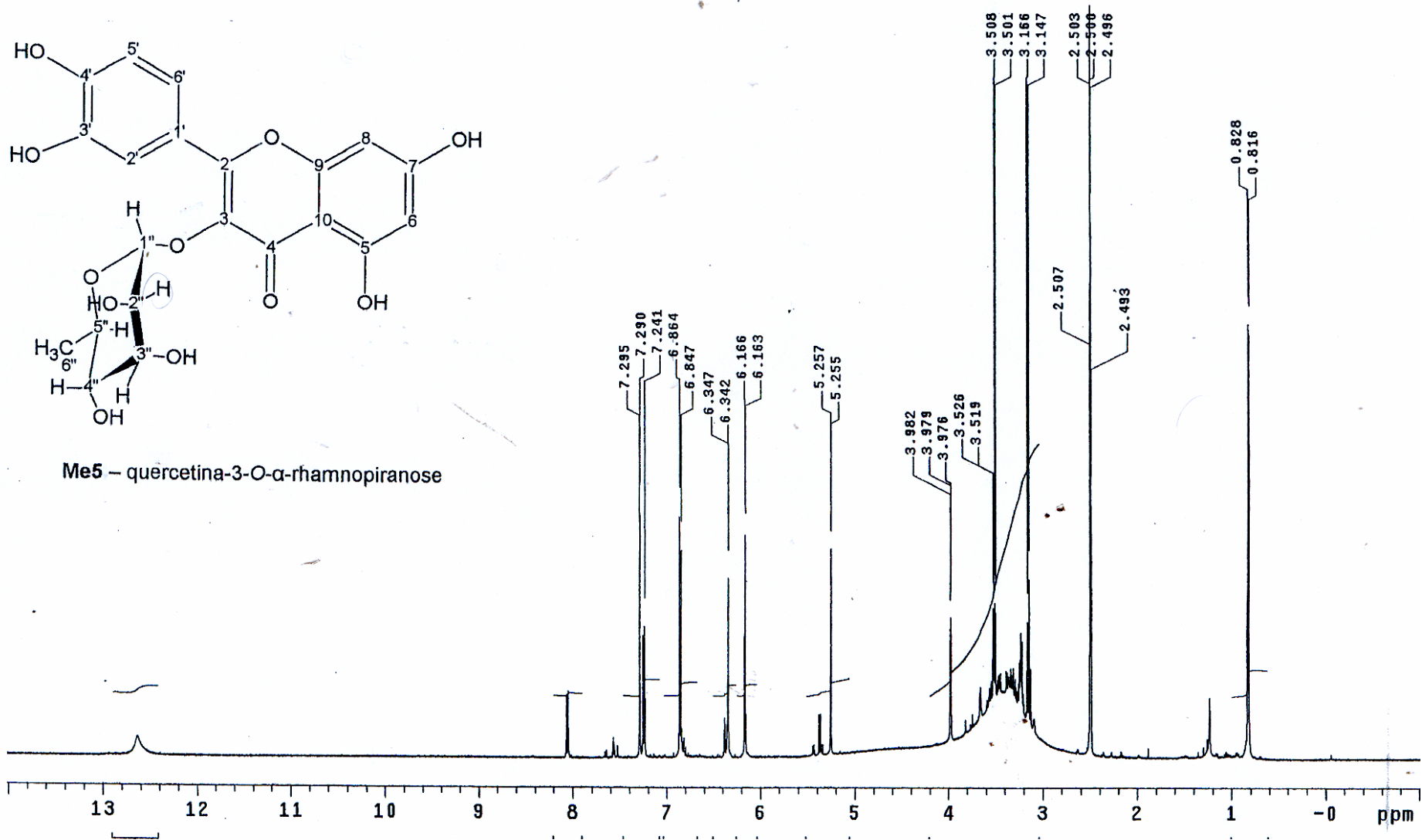
**Espectro 66:** Experimento COSY- <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H de **Me1** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



Espectro 67: Experimento gHMBC de Me1 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



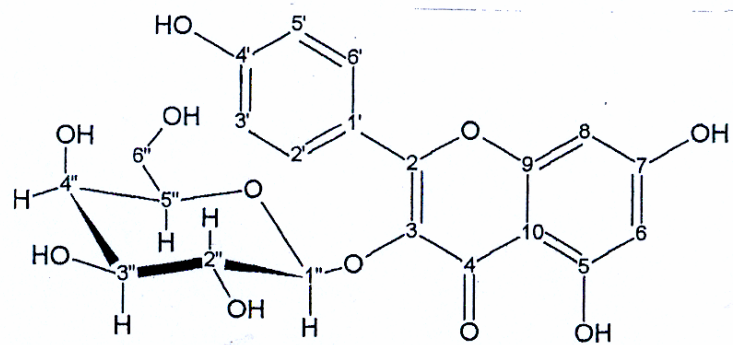
Espectro 68: Experimento gHMBC de Me1 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



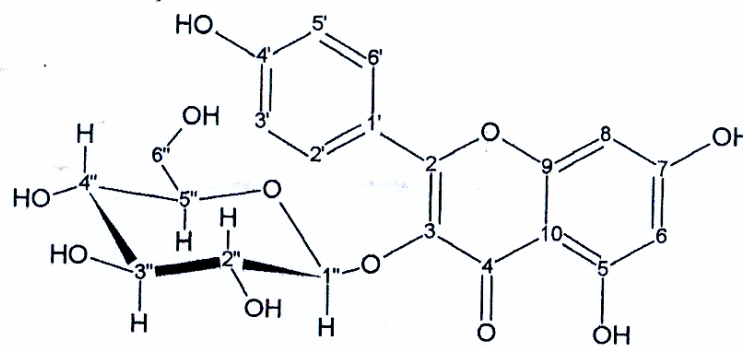
Me5 – quercetina-3-O- $\alpha$ -rhamnopyranose

Espectro 69: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de Me5 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).

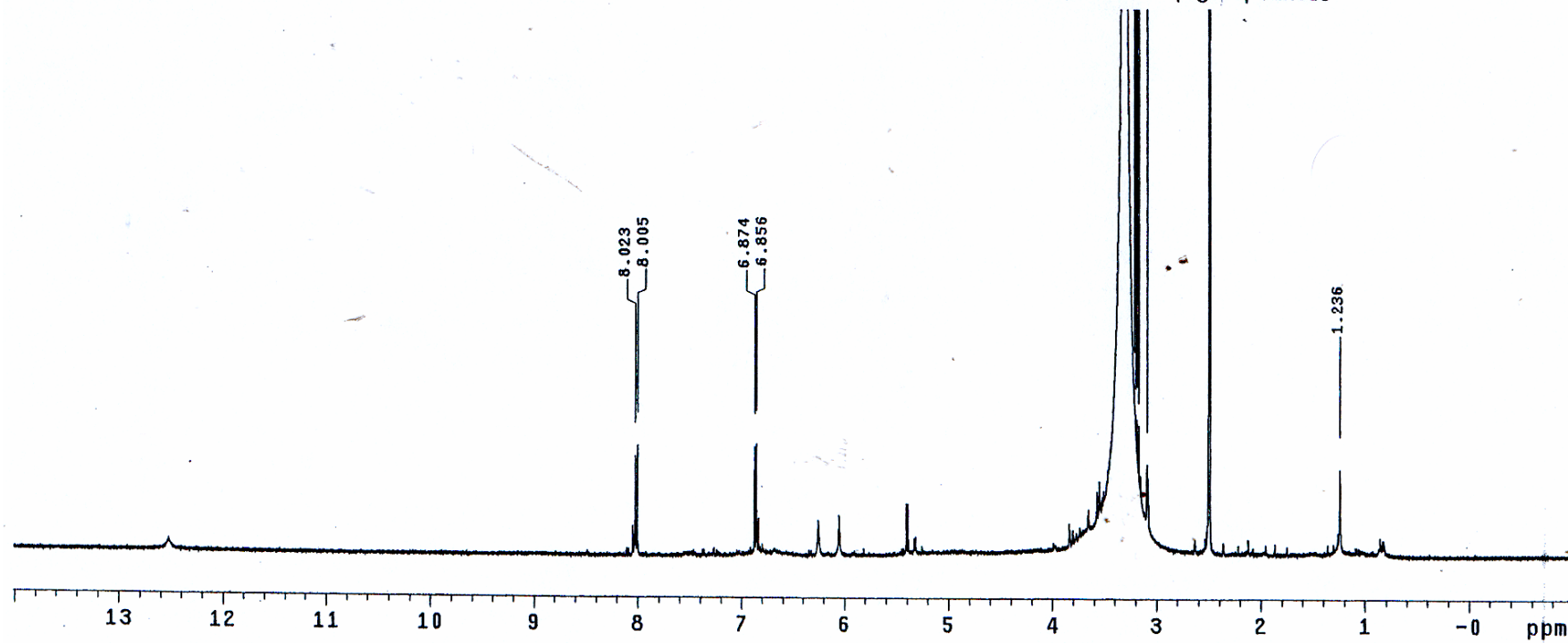




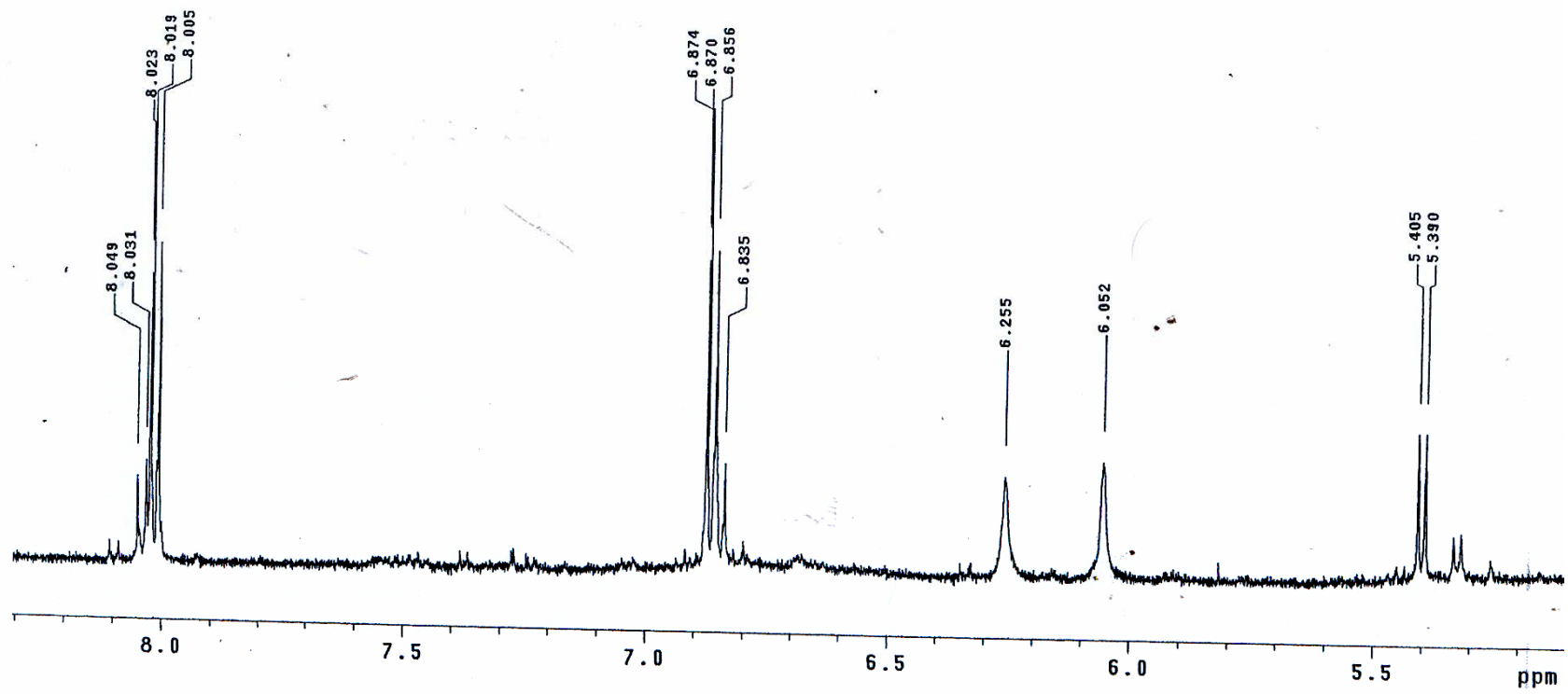
Me7 - kaempferol-3-O-β-galactopiranoose



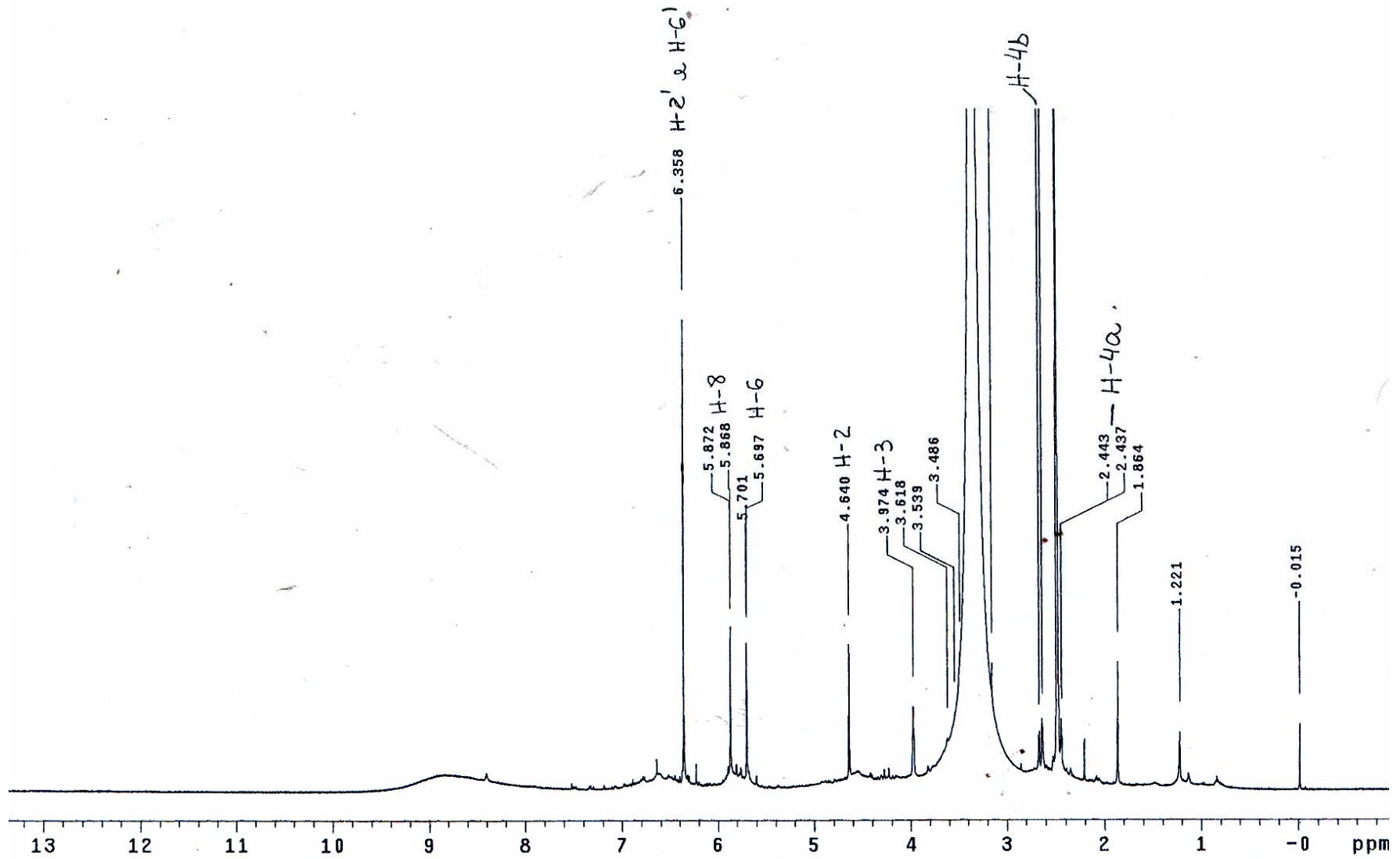
Me6 - kaempferol-3-O-β-glicopiranoose



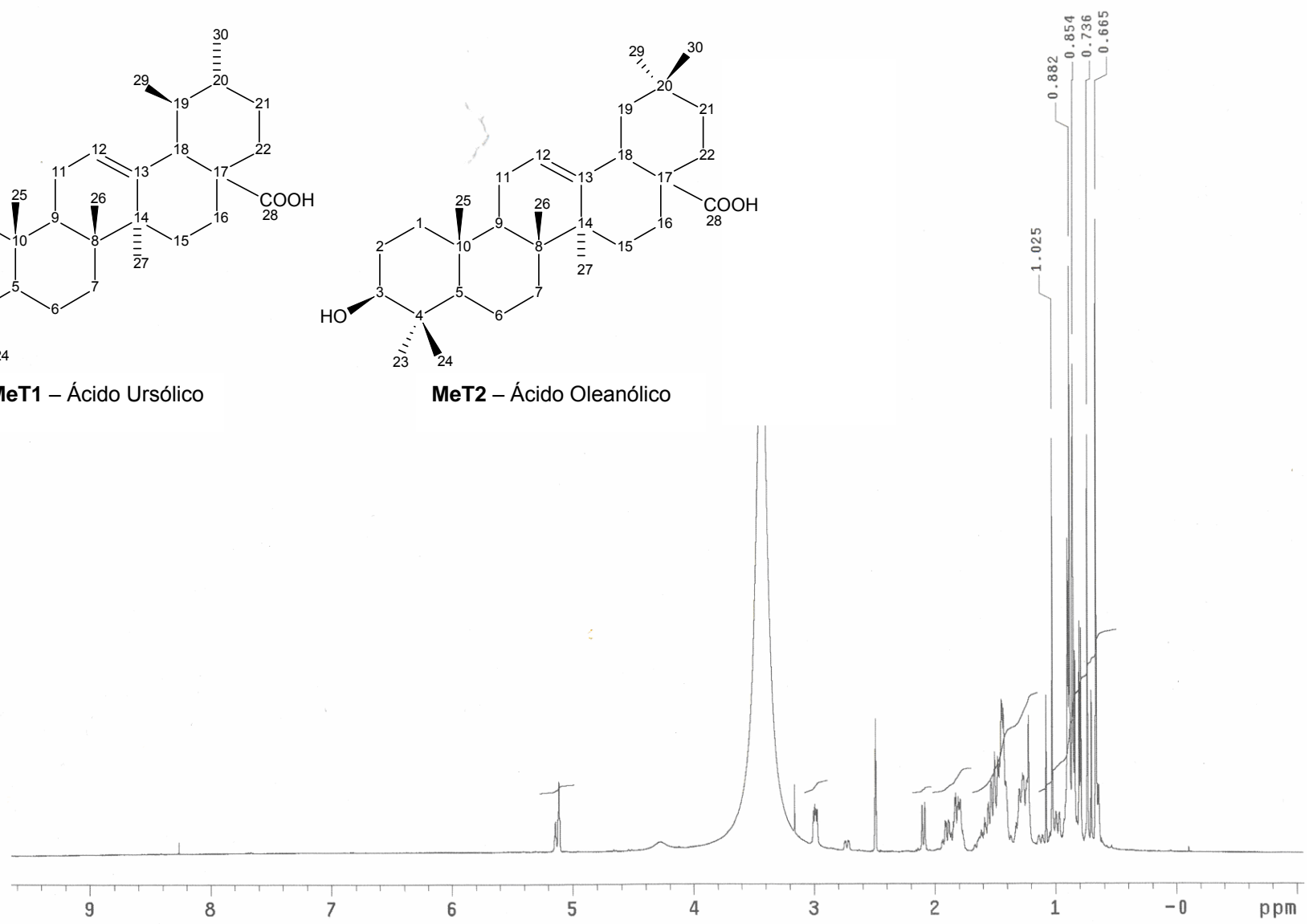
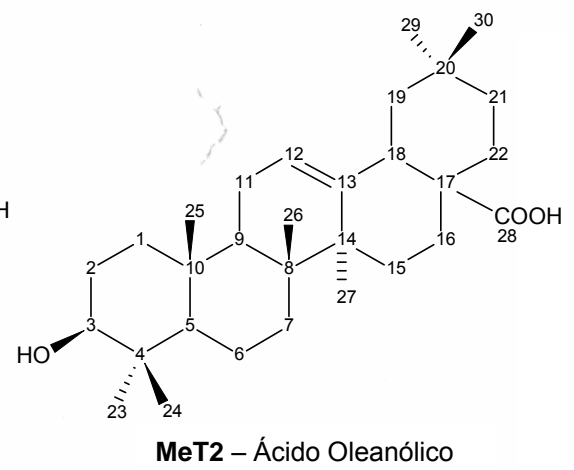
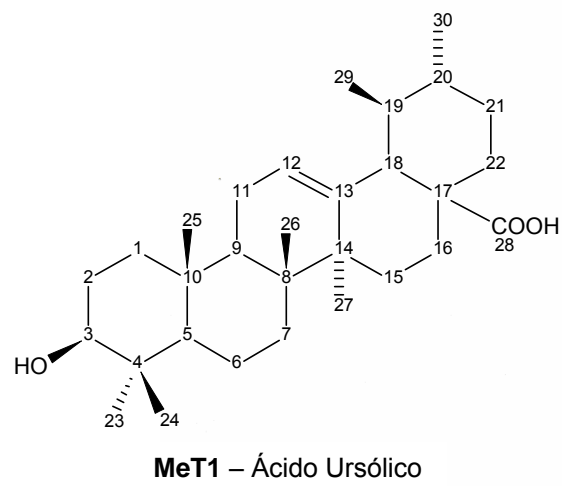
Espectro 70: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de Me6 e Me7 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



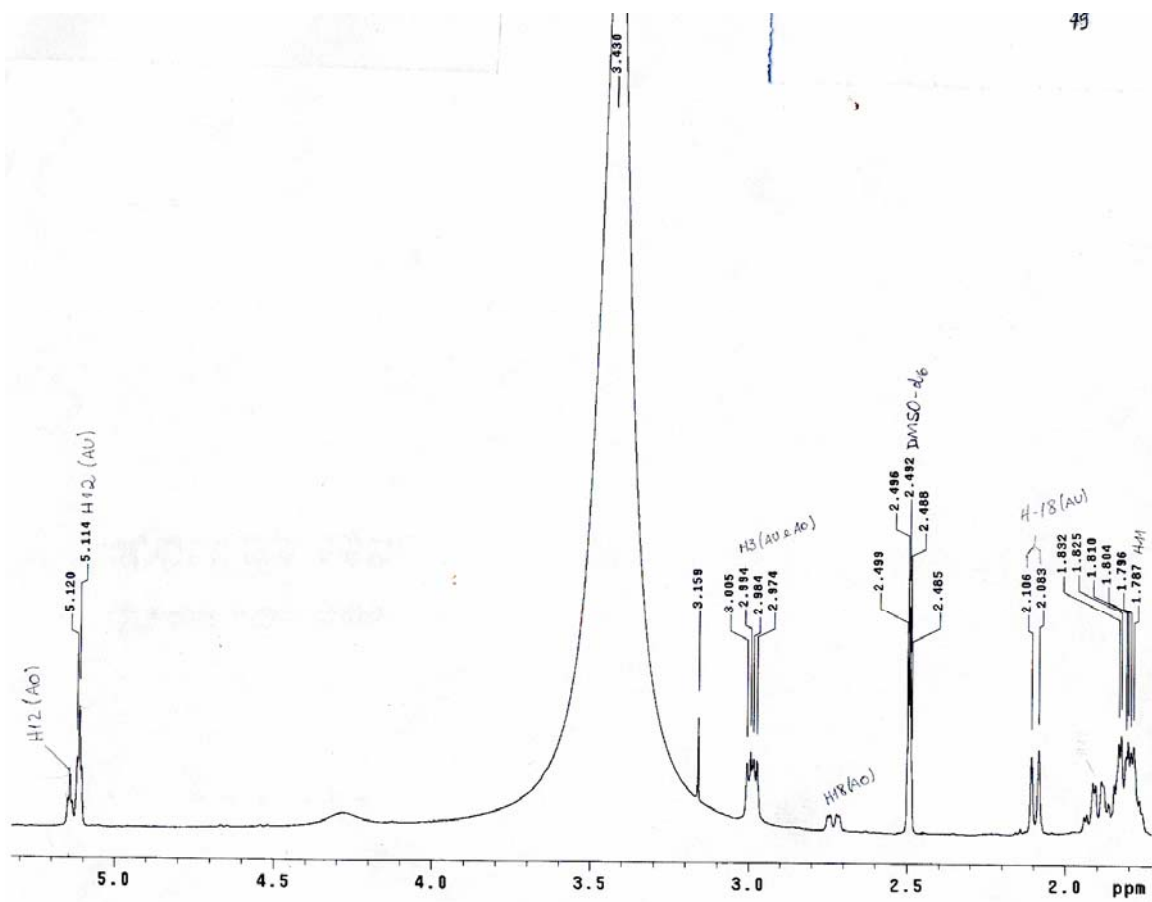
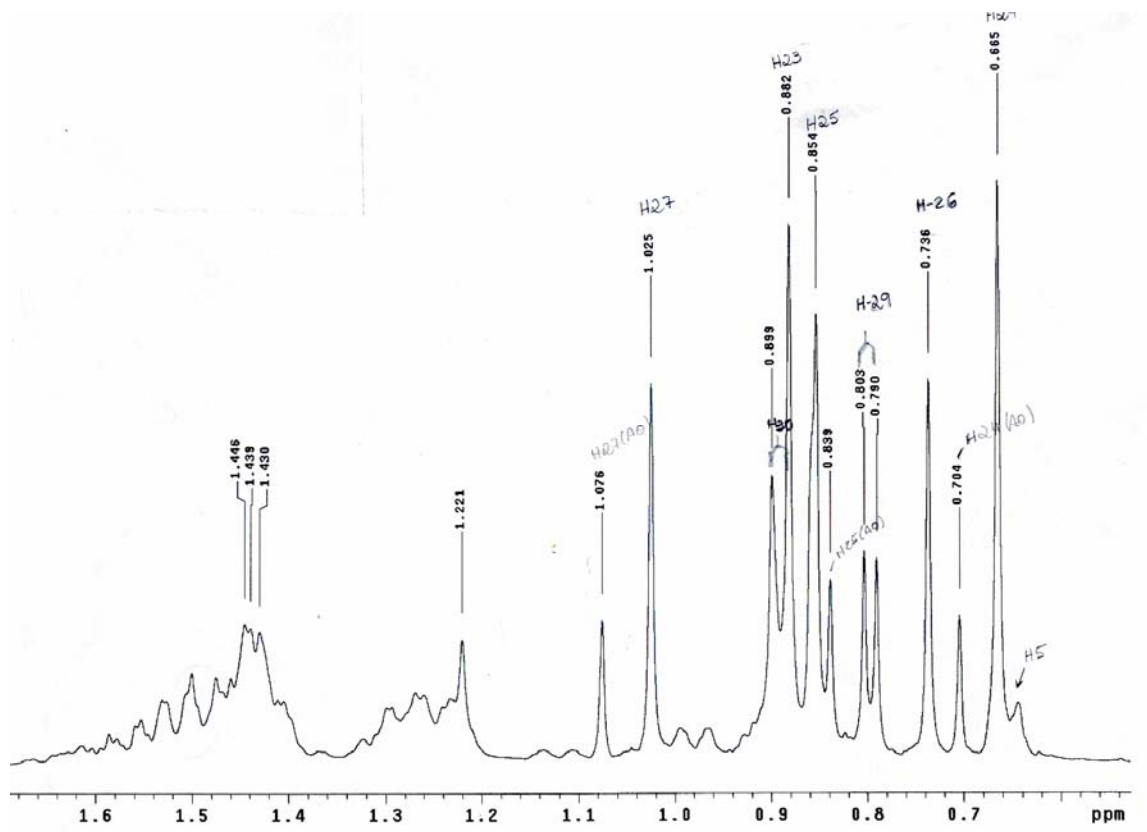
**Espectro 71:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H Me6 e Me7 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, ampliação de δ 5,1 a 8,3 ppm).



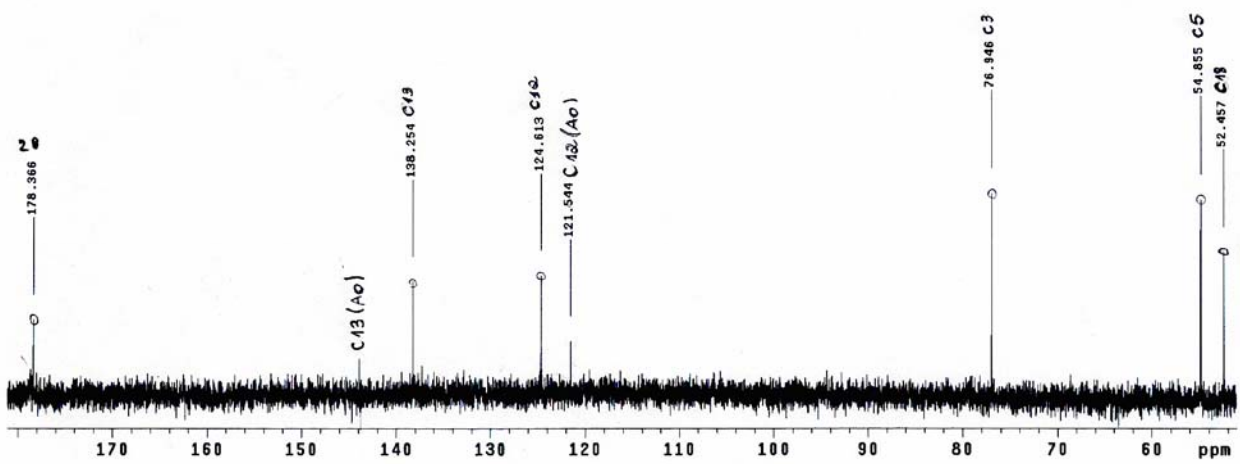
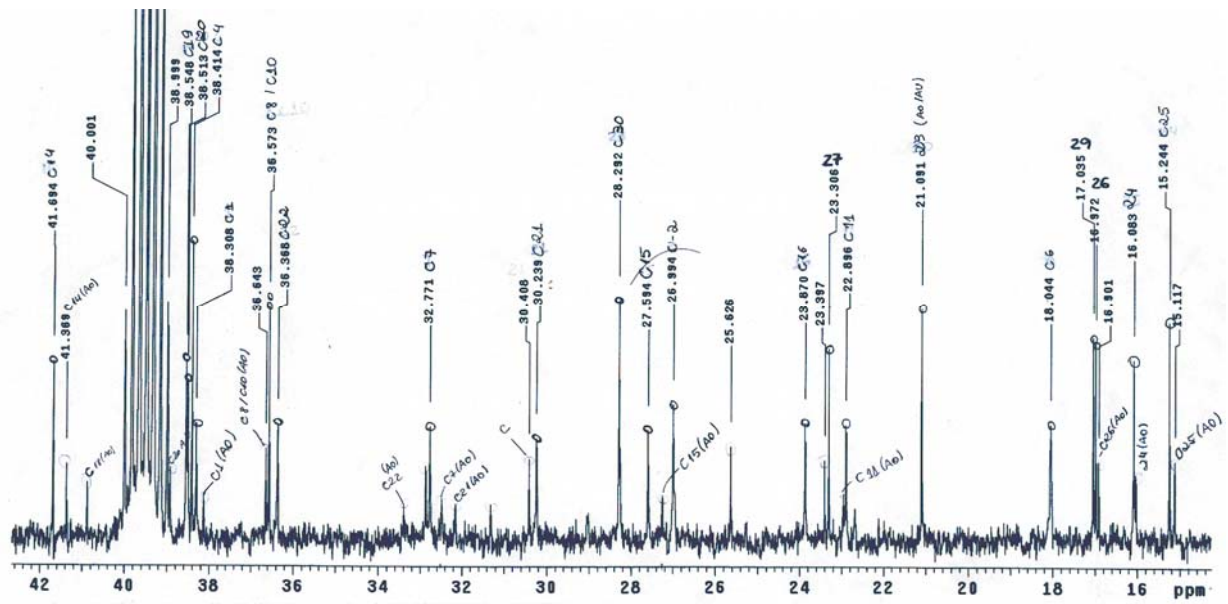
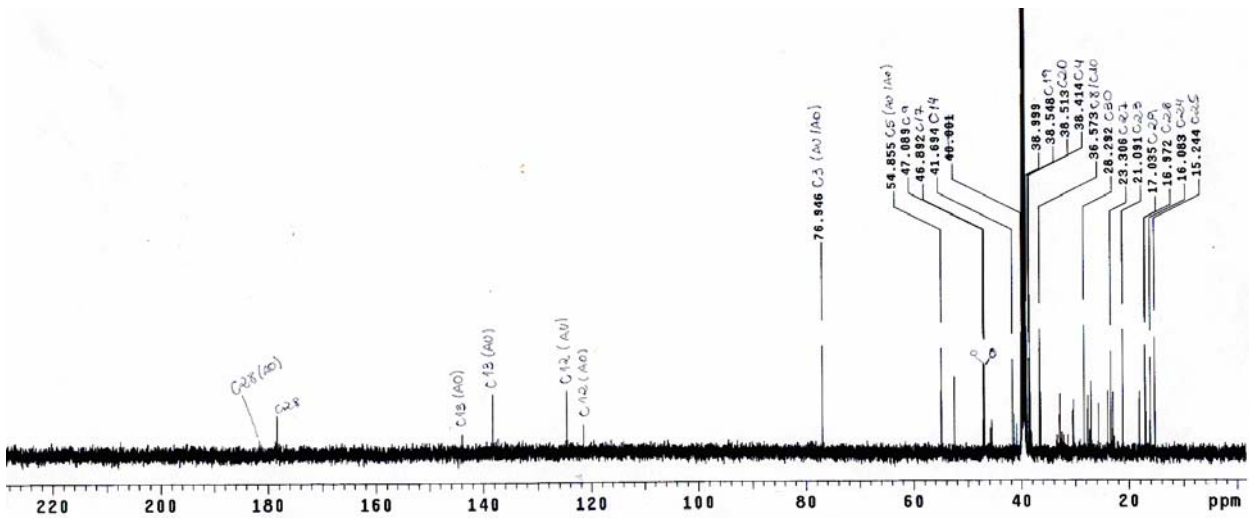
**Espetro 72:** Espetro de RMN <sup>1</sup>H de Me13 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



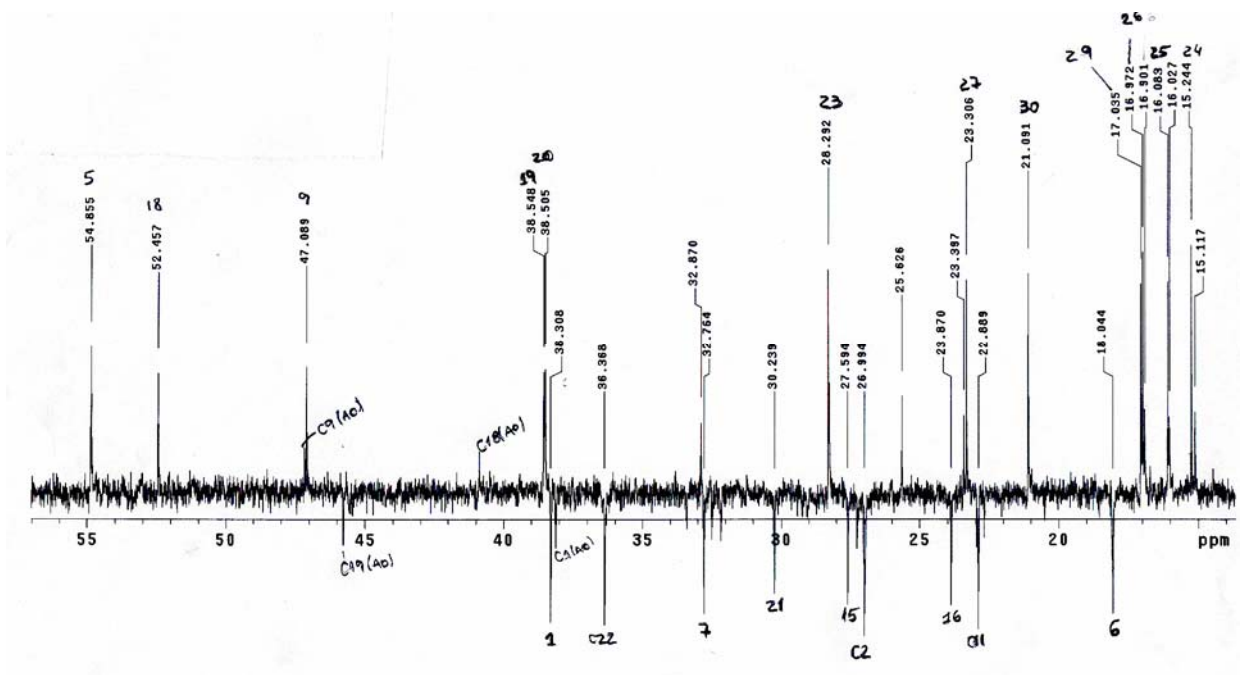
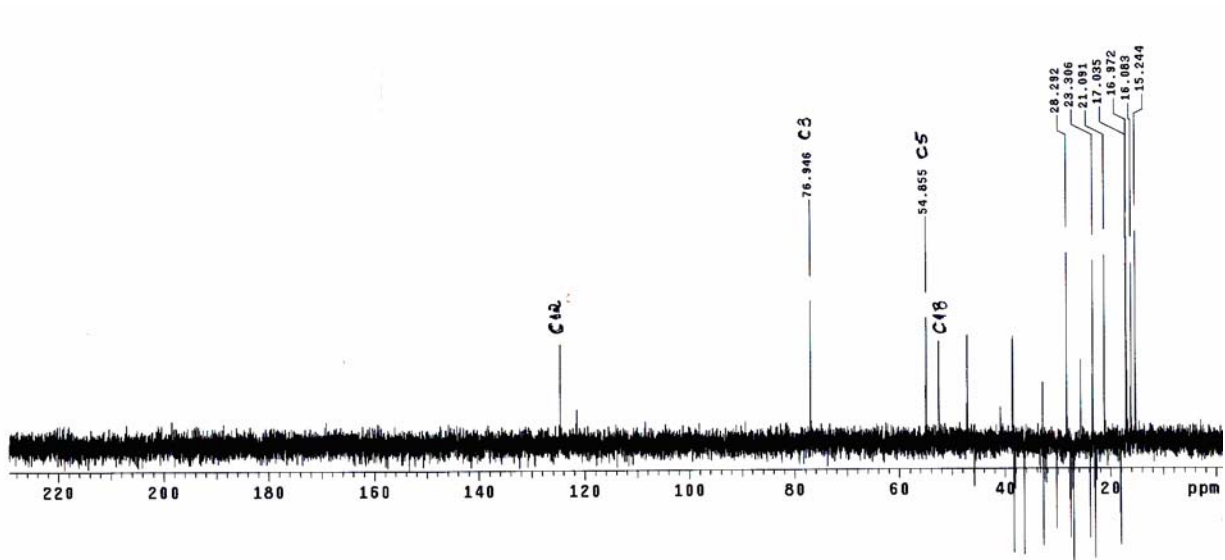
**Espectro 73:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **MeT1** e **MeT2** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



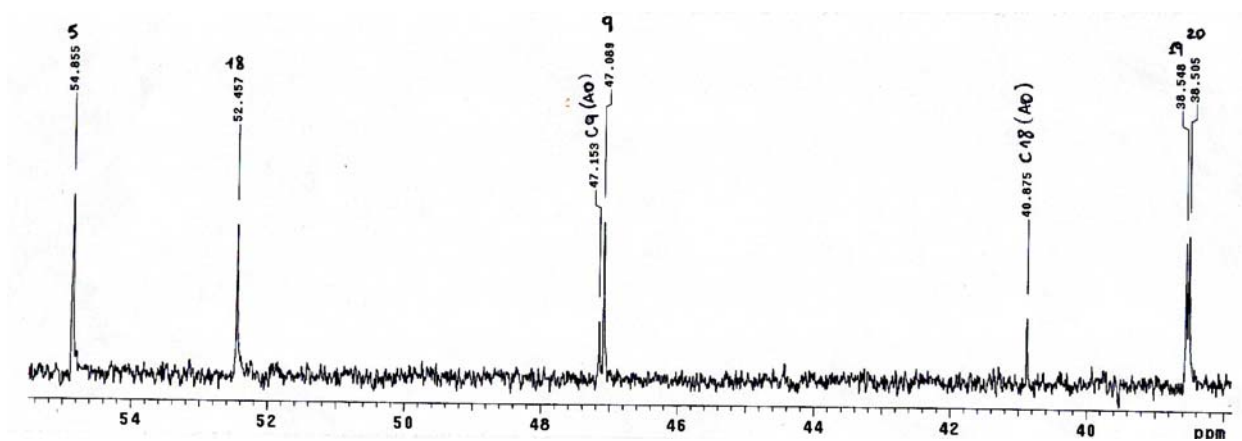
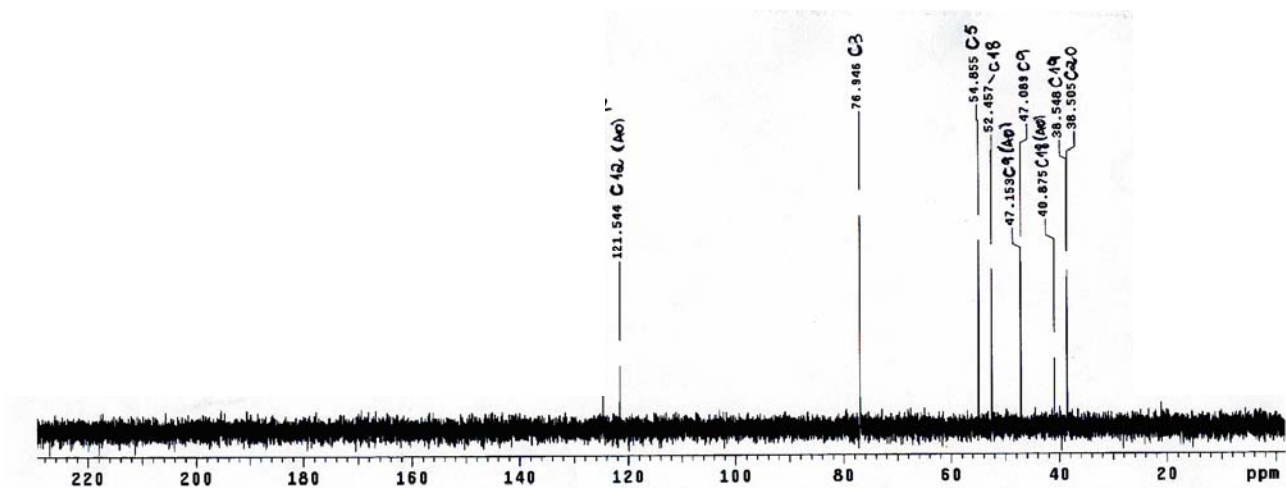
**Espectro 74:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **MeT1** e **MeT2** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS, ampliações).



Espectro 75: Espectro de RMN <sup>13</sup>C de MeT1 e MeT2 (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

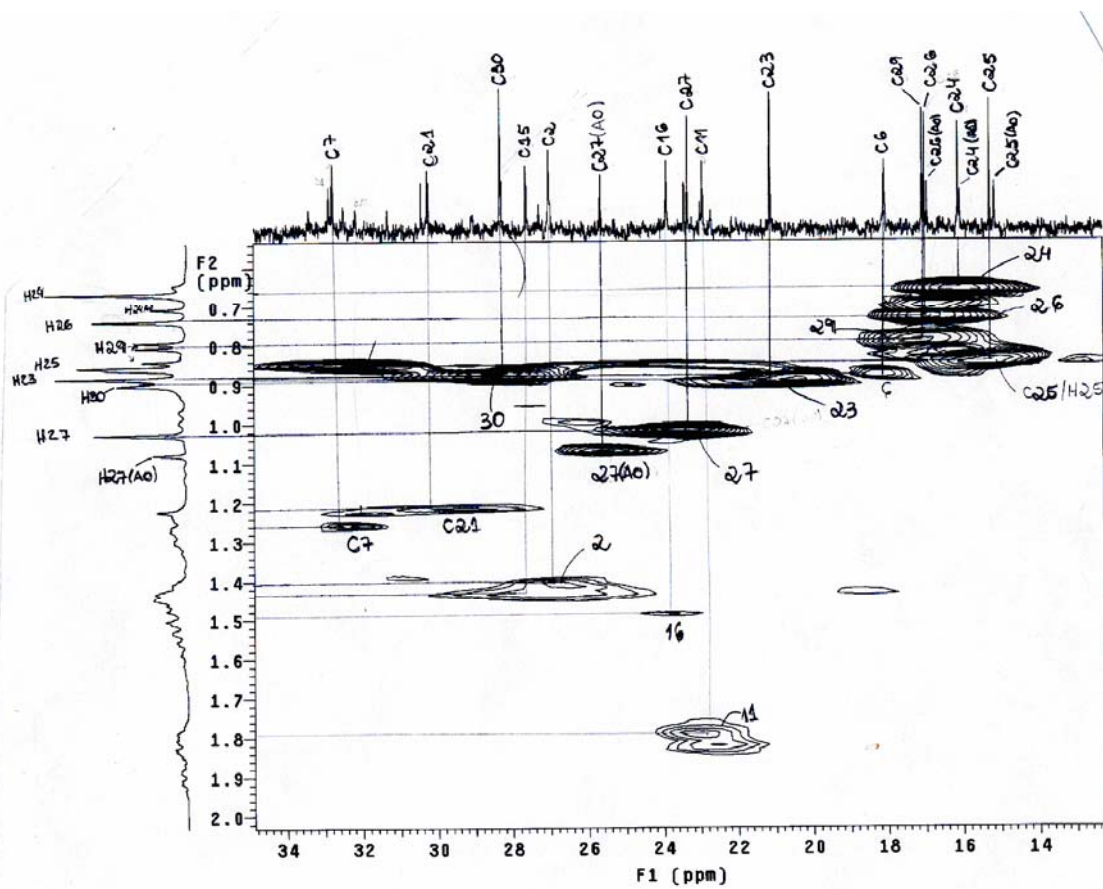
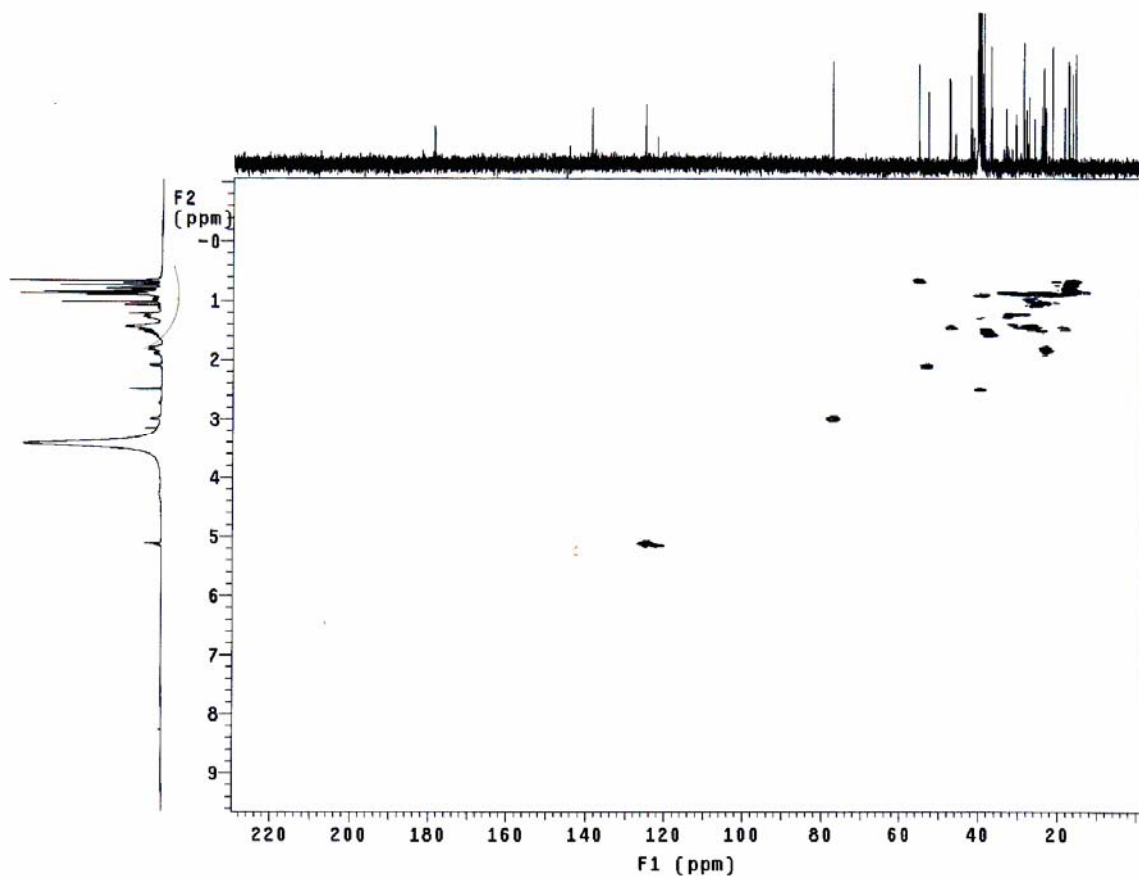


**Espectro 76:** Espectro do experimento DEPT 135° de MeT1 e MeT2 (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

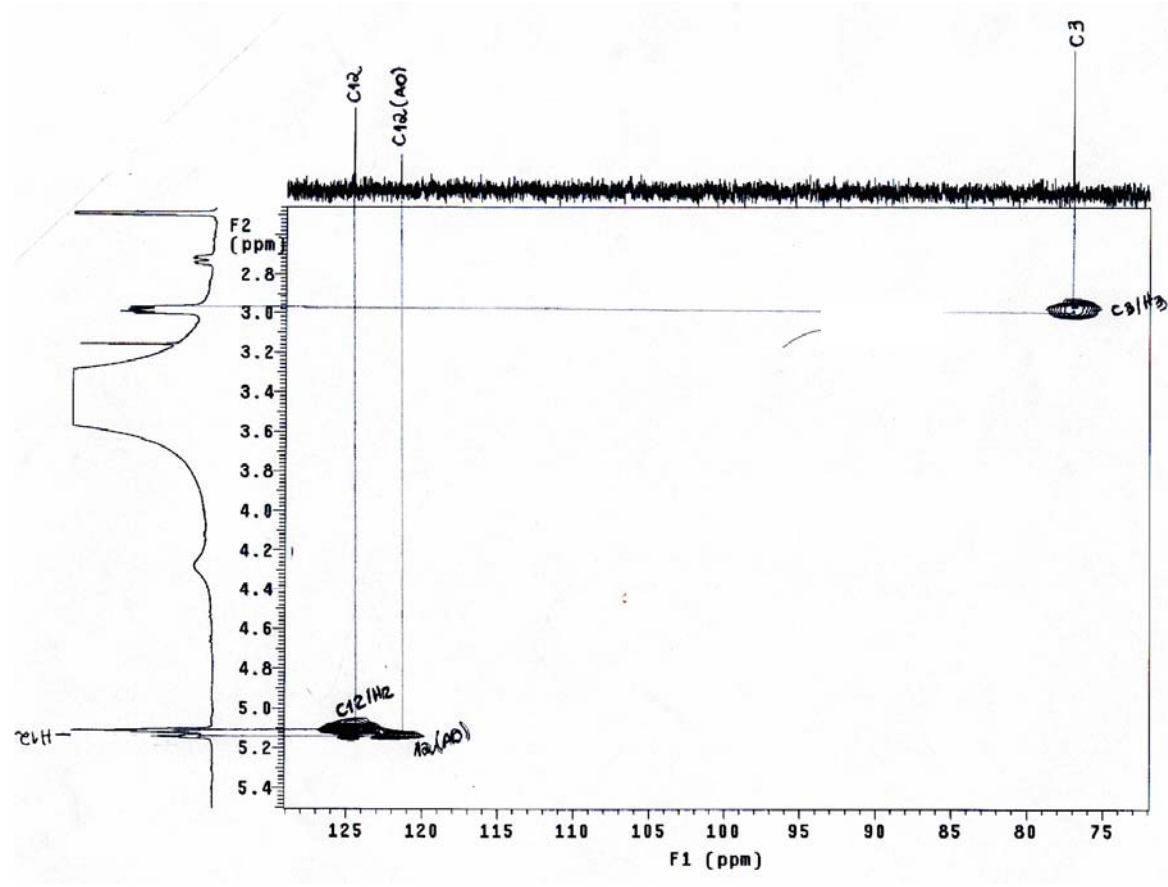
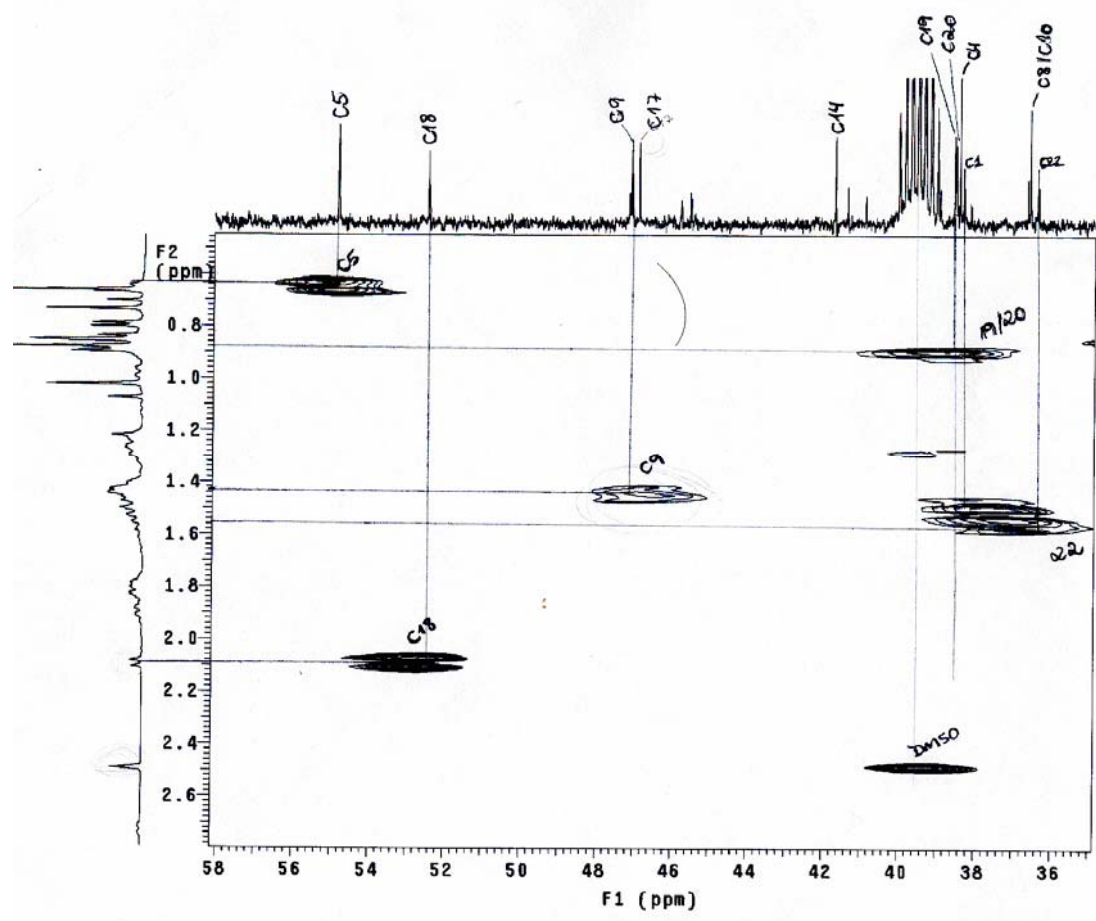


**Espectro 77:** Experimento DEPT 90° de **MeT1** e **MeT2** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

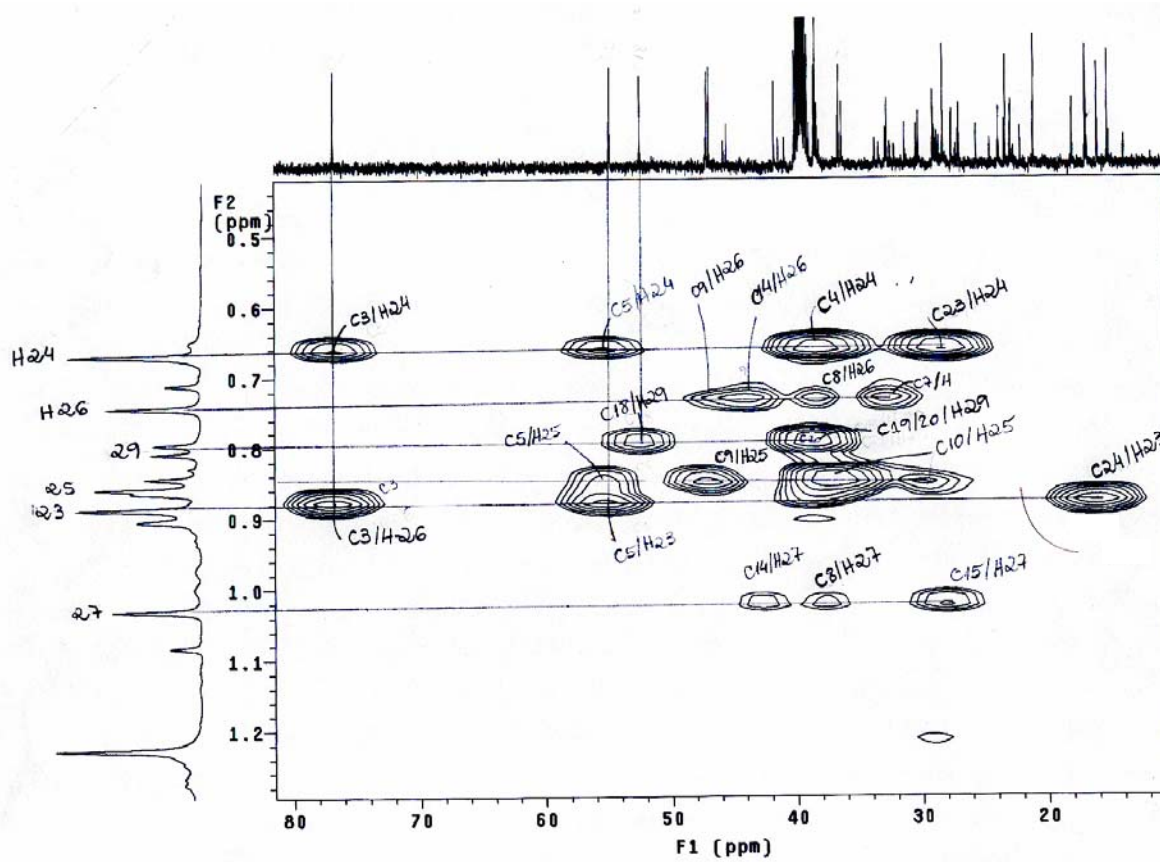
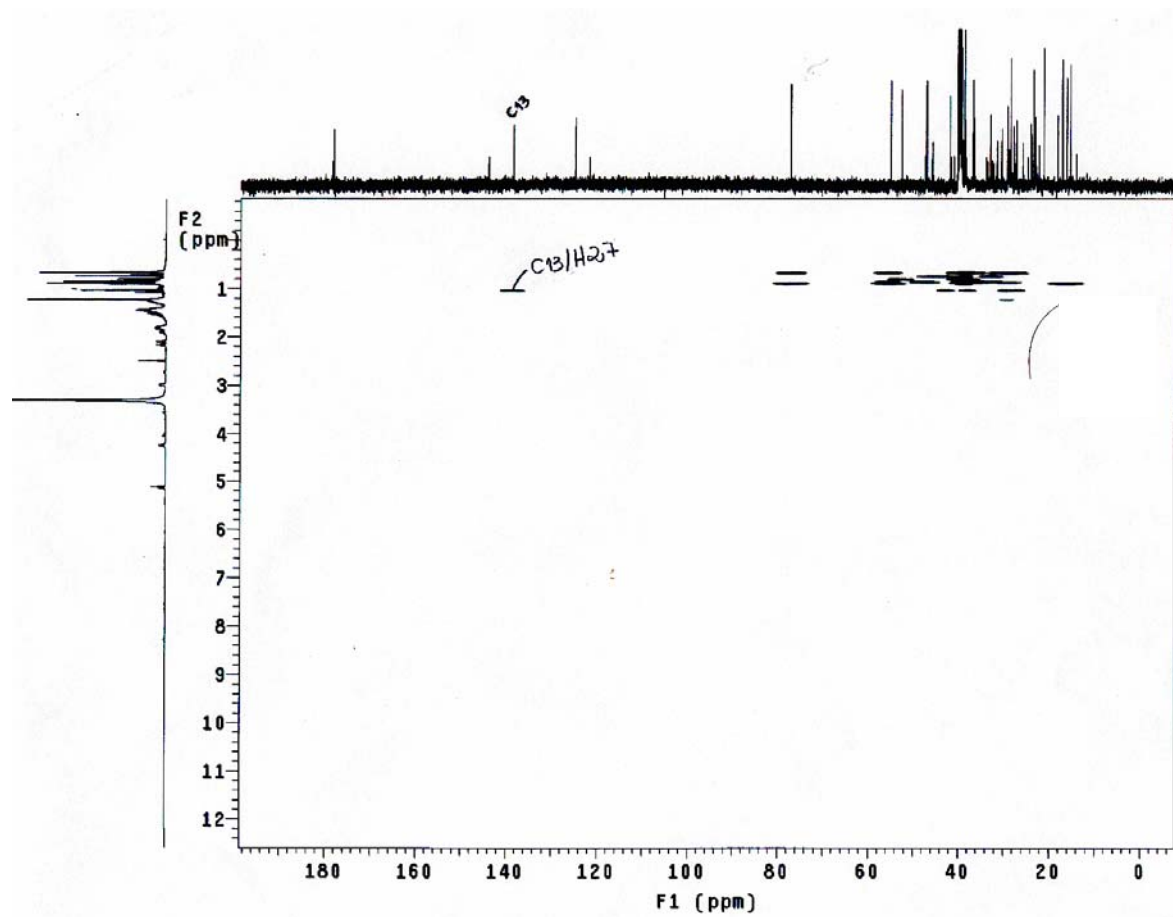




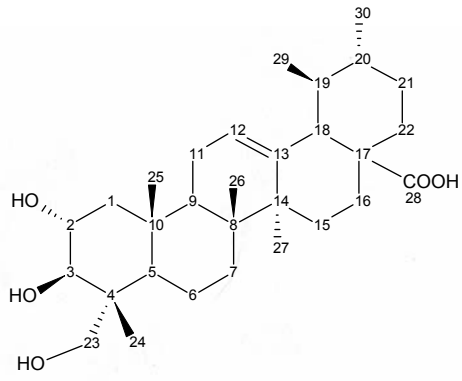
**Espectro 78:** Experimento gHMBC de MeT1 e MeT2 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



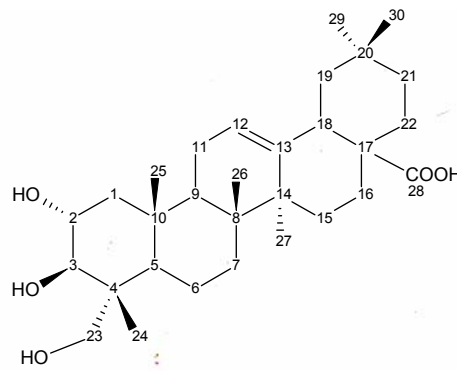
**Espectro 79:** Experimento gHMBC de MeT1 e MeT2 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



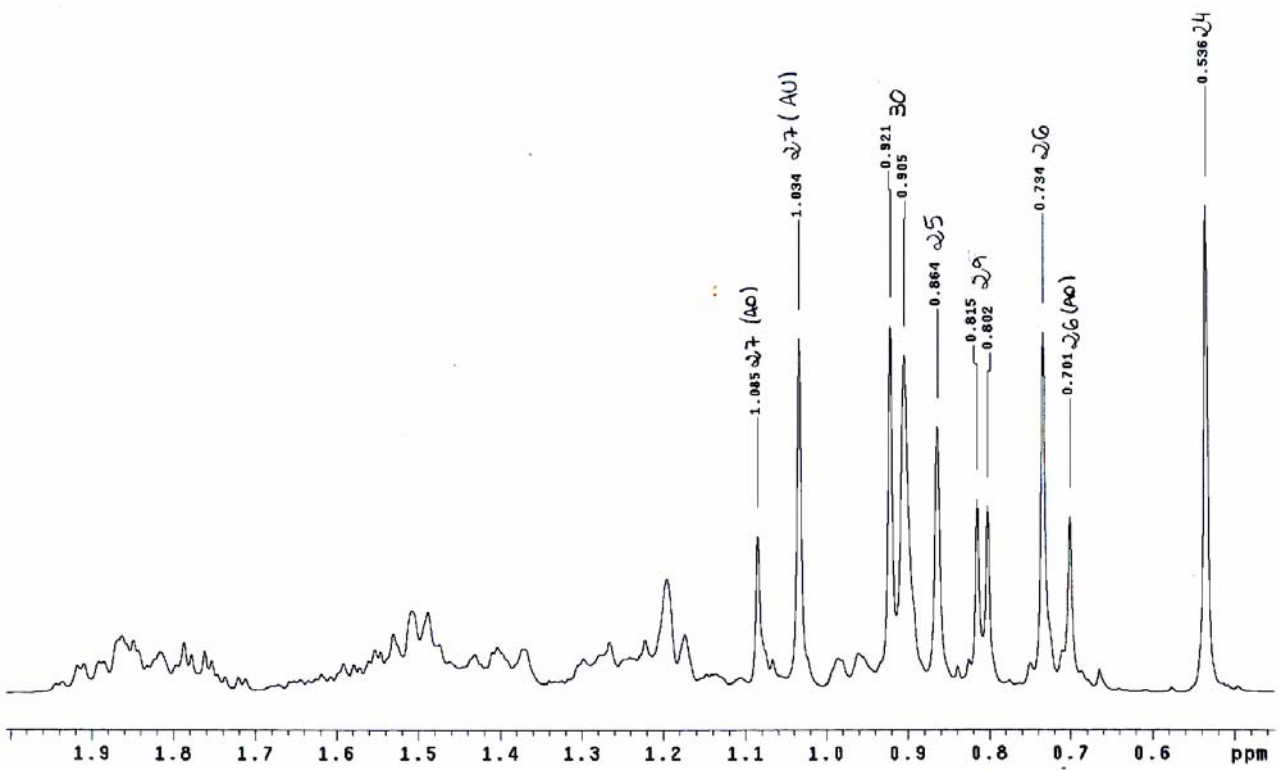
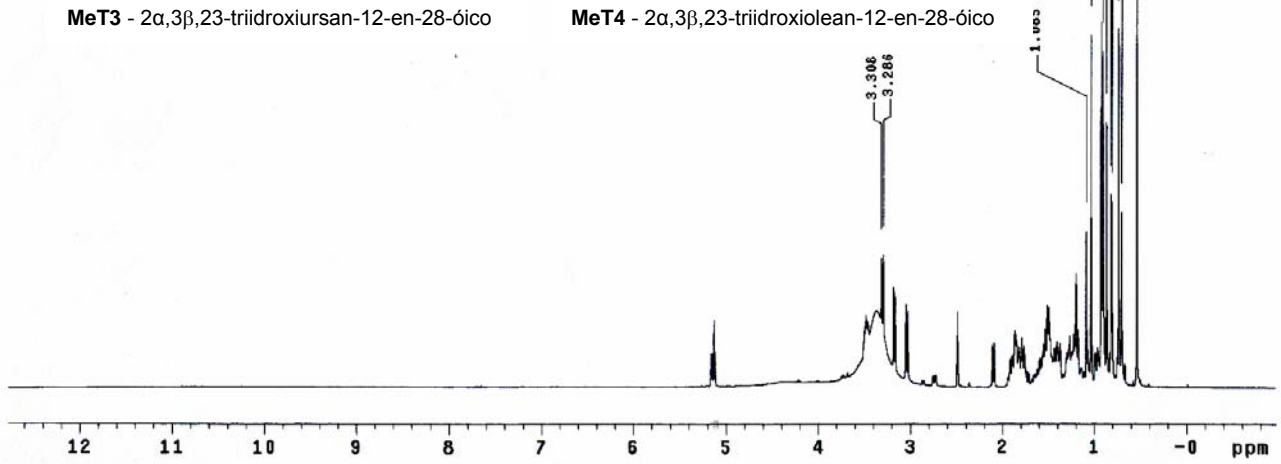
**Espectro 80:** Experimento gHMBC de MeT1 e MeT2 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



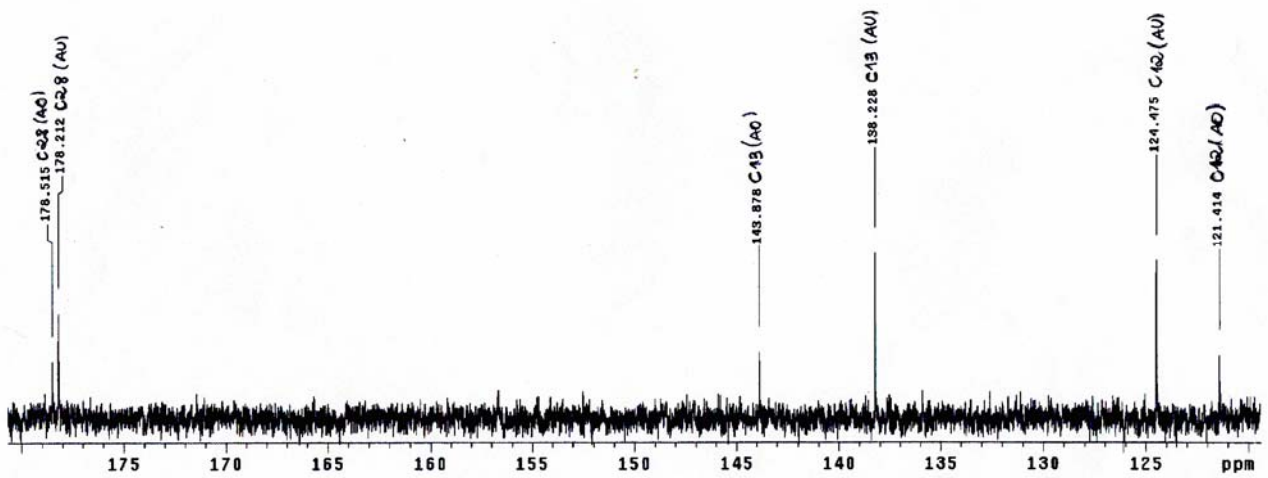
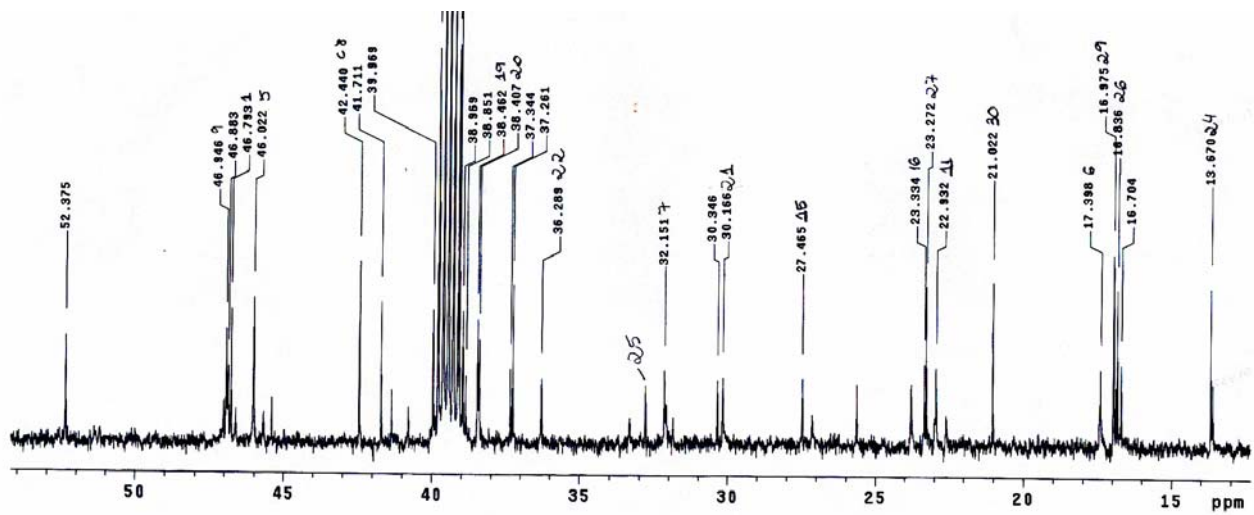
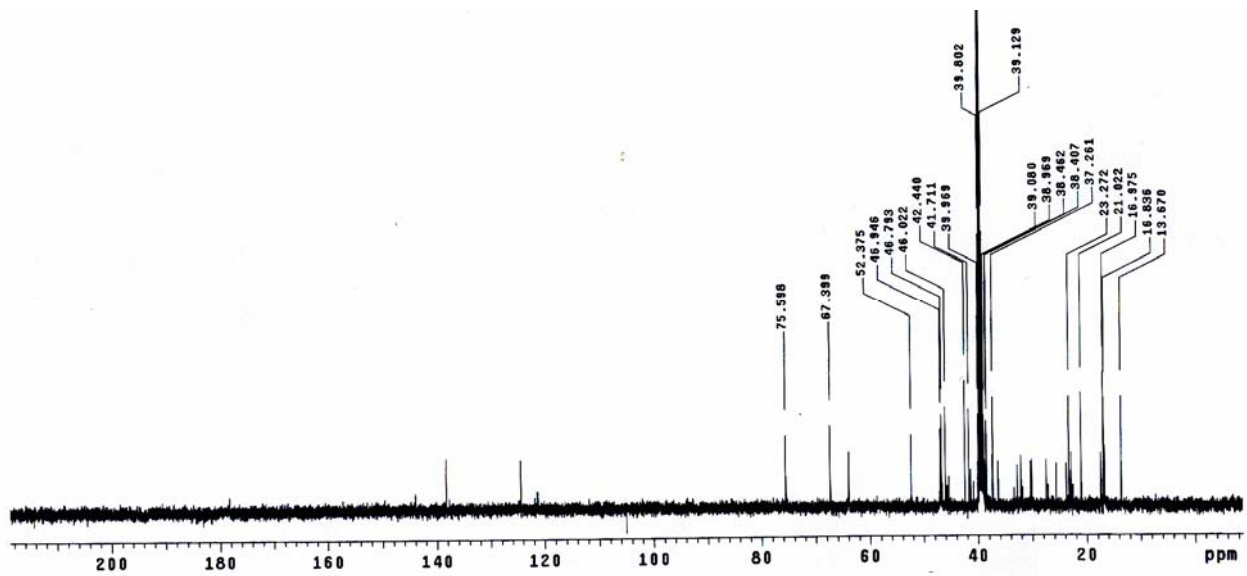
**MeT3** - 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-triidroxiursan-12-en-28-óico



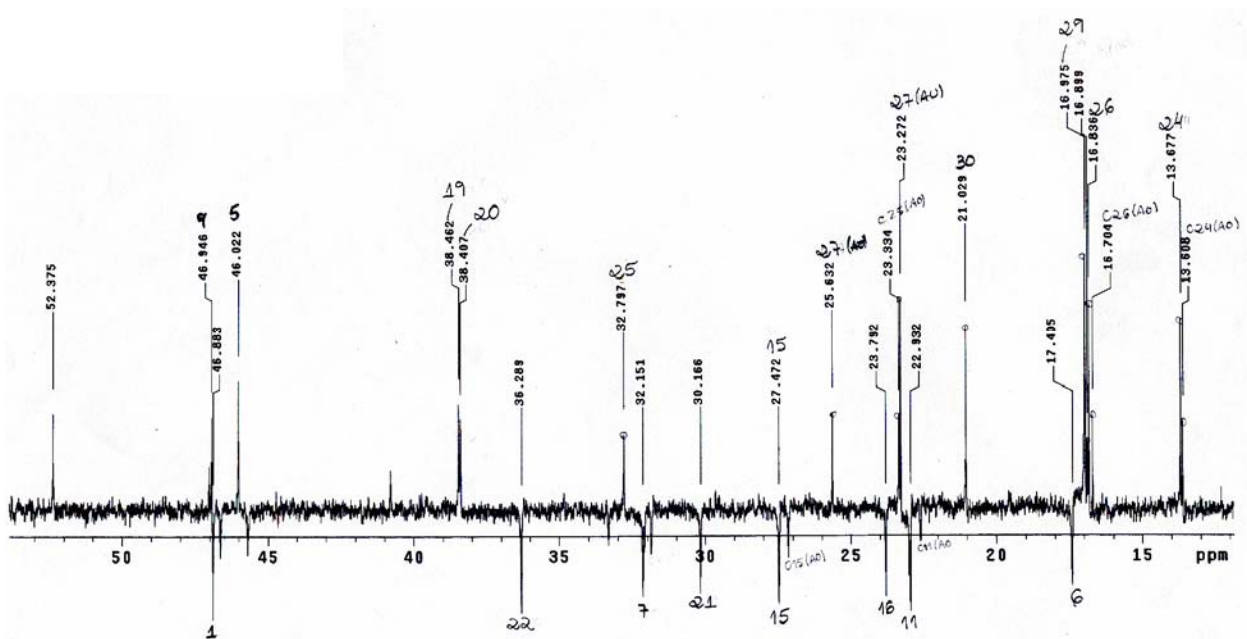
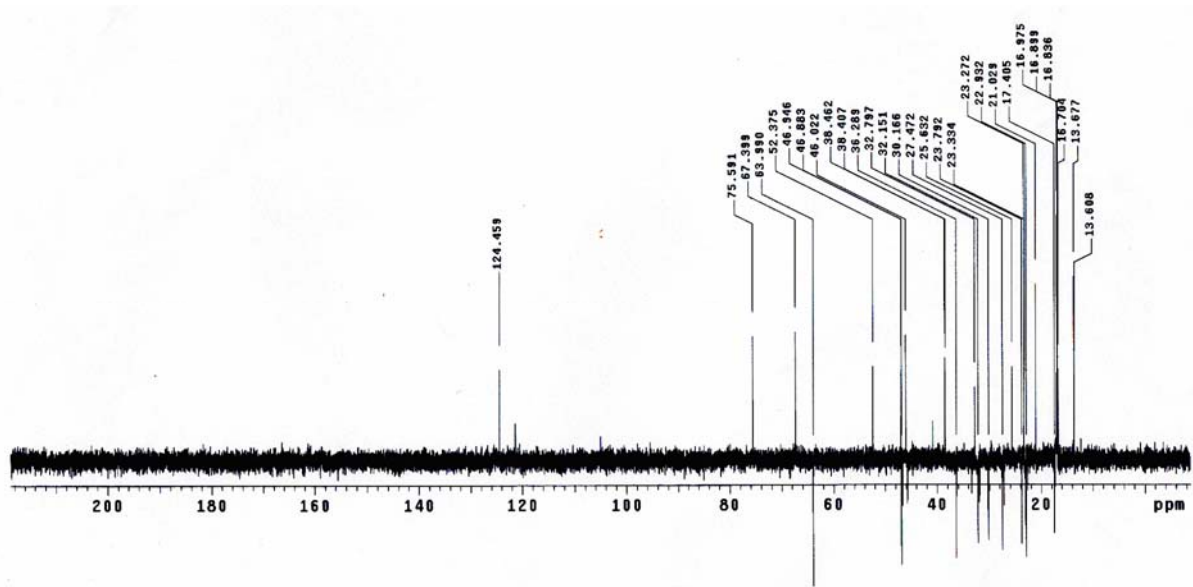
**MeT4** - 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-triidroxiolean-12-en-28-óico



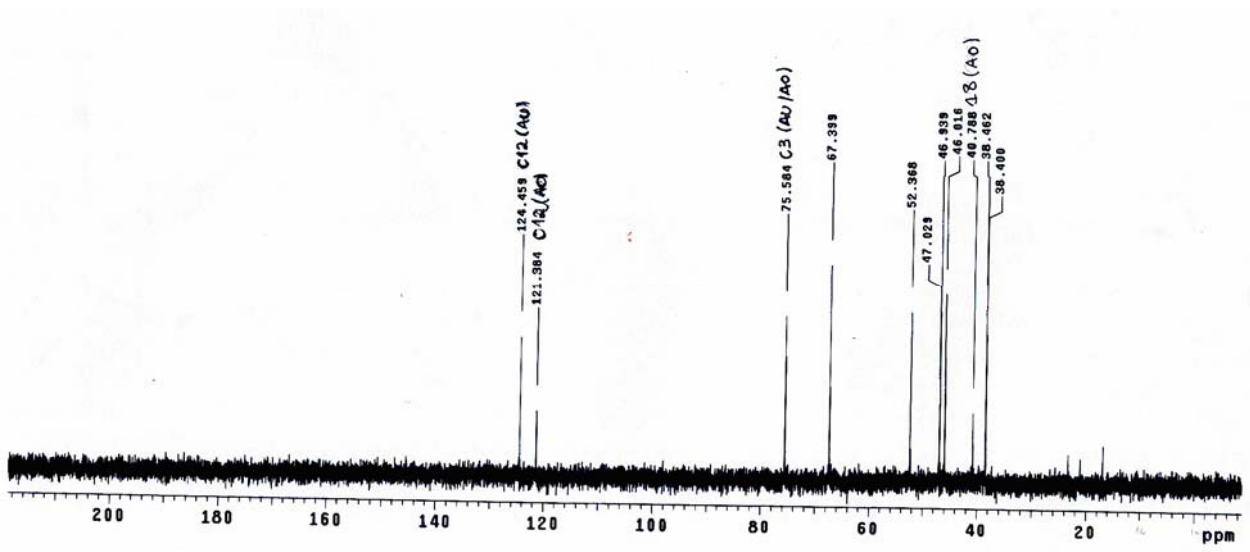
**Espectro 81:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **MeT3** e **MeT4** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



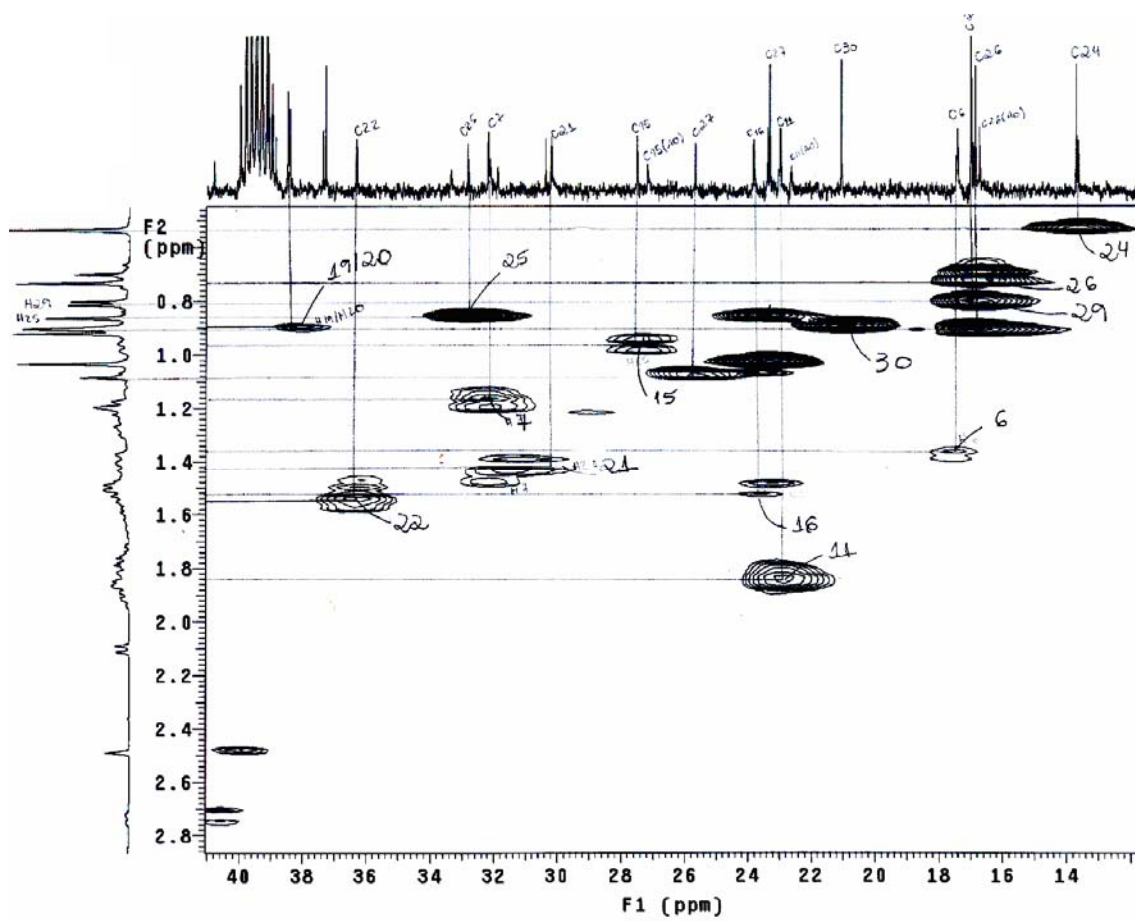
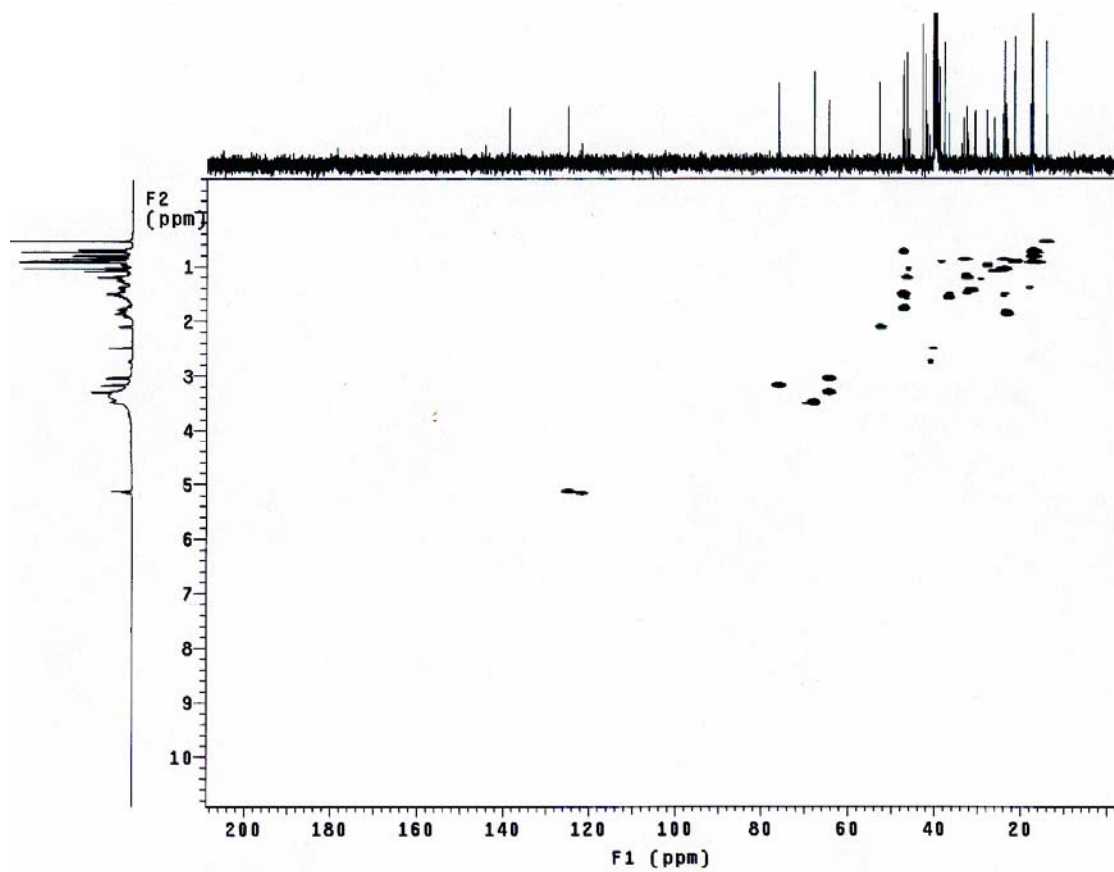
Espectro 82: Espectro de RMN <sup>13</sup>C de MeT3 e MeT4 (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



**Espectro 83:** Experimento DEPT 135° de MeT3 e MeT4 (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

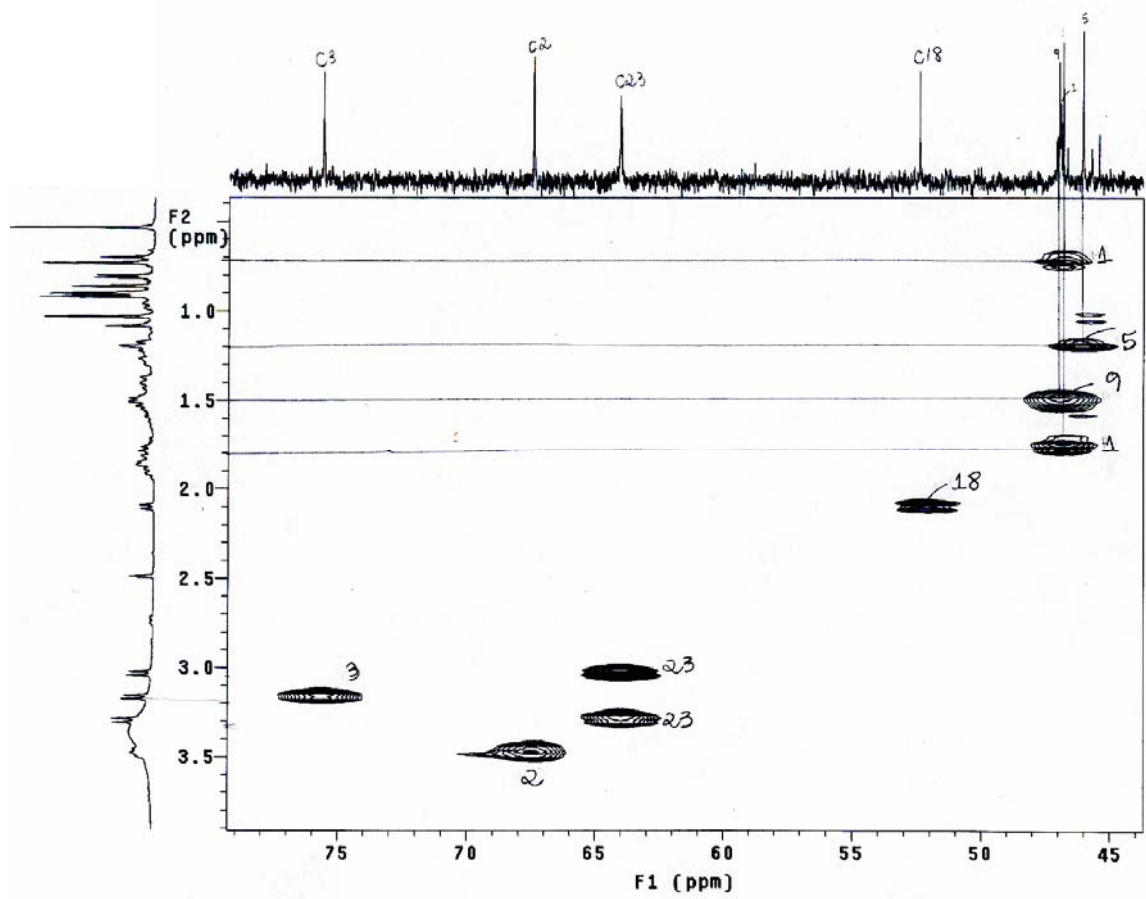


**Espectro 84:** Experimento DEPT 90° de **MeT3** e **MeT4** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

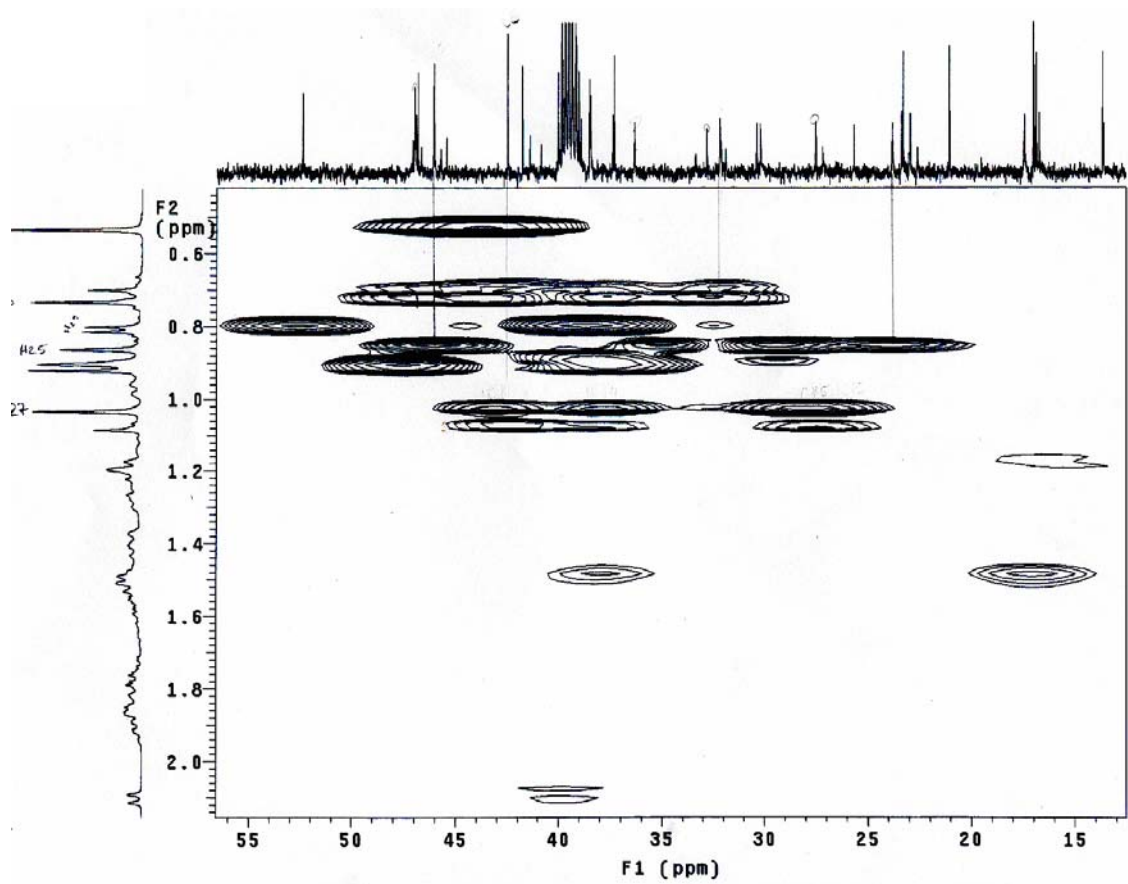
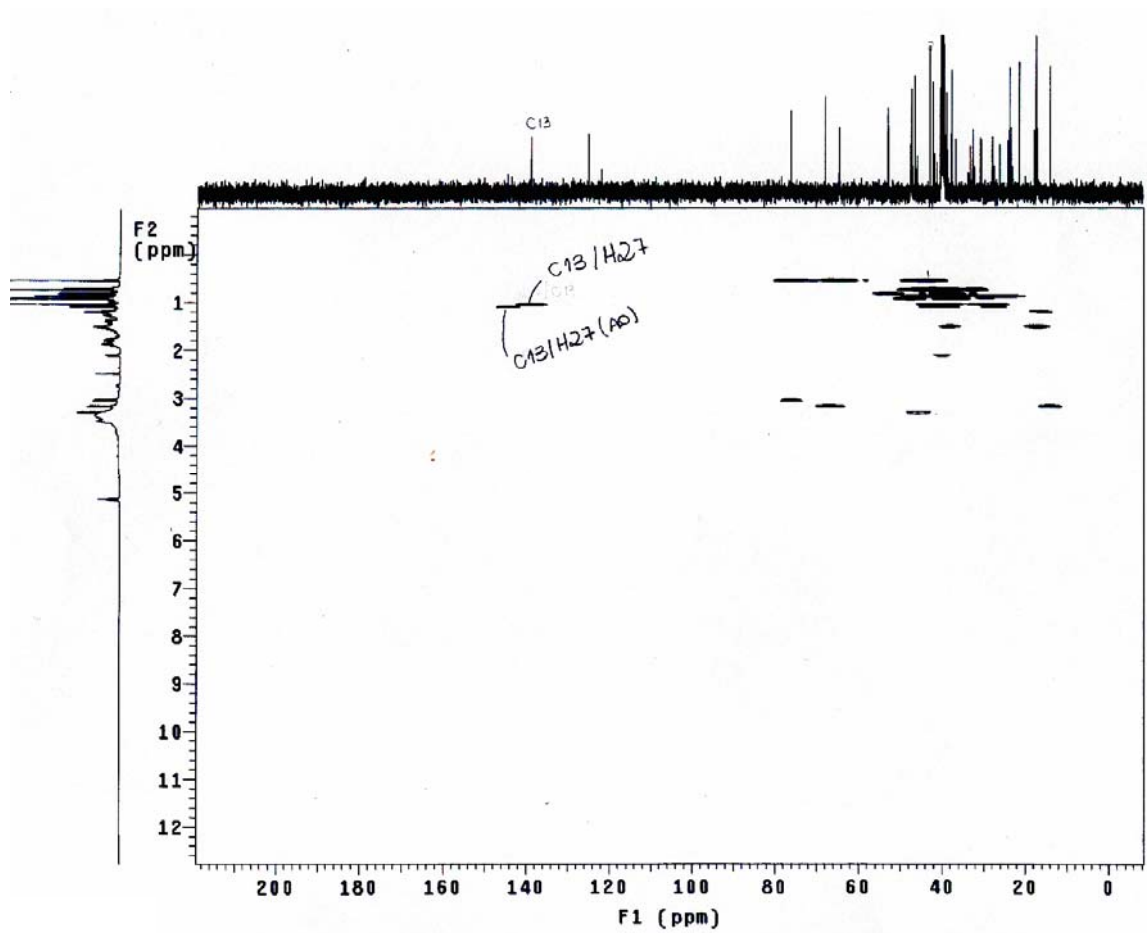


Espectro 85: Experimento gHMQC de MeT3 e MeT4 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

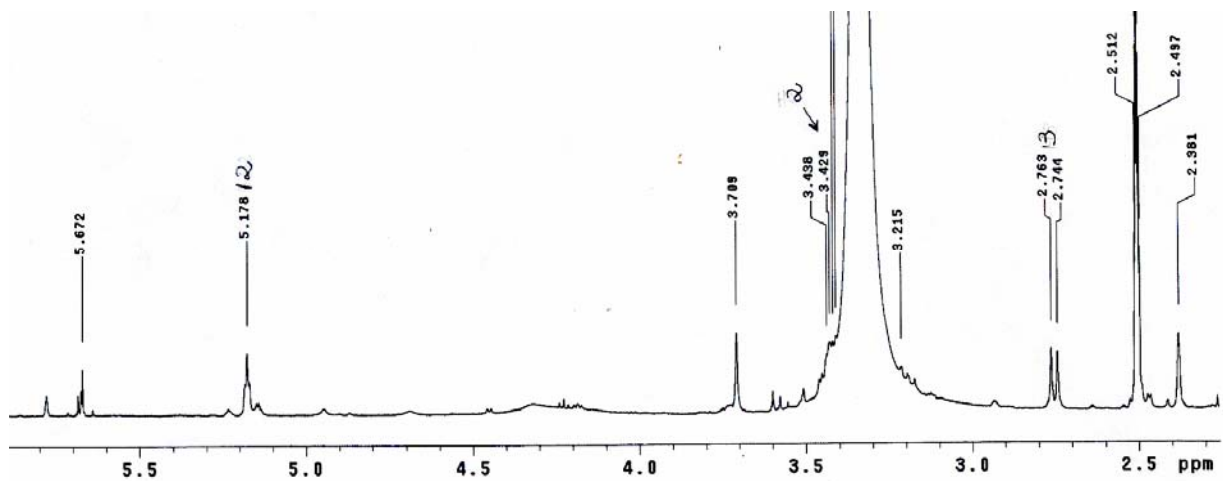
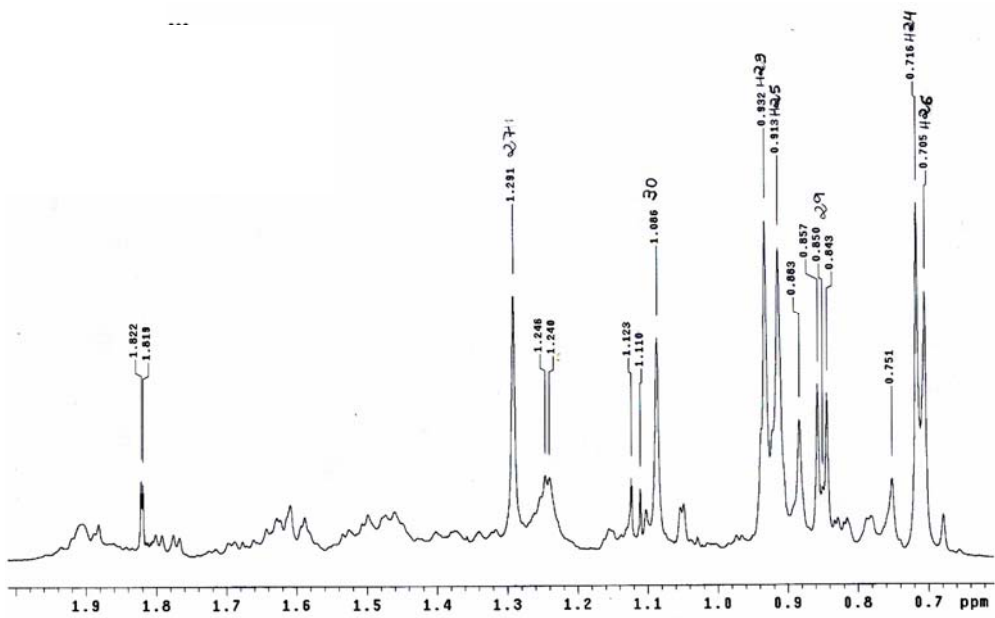
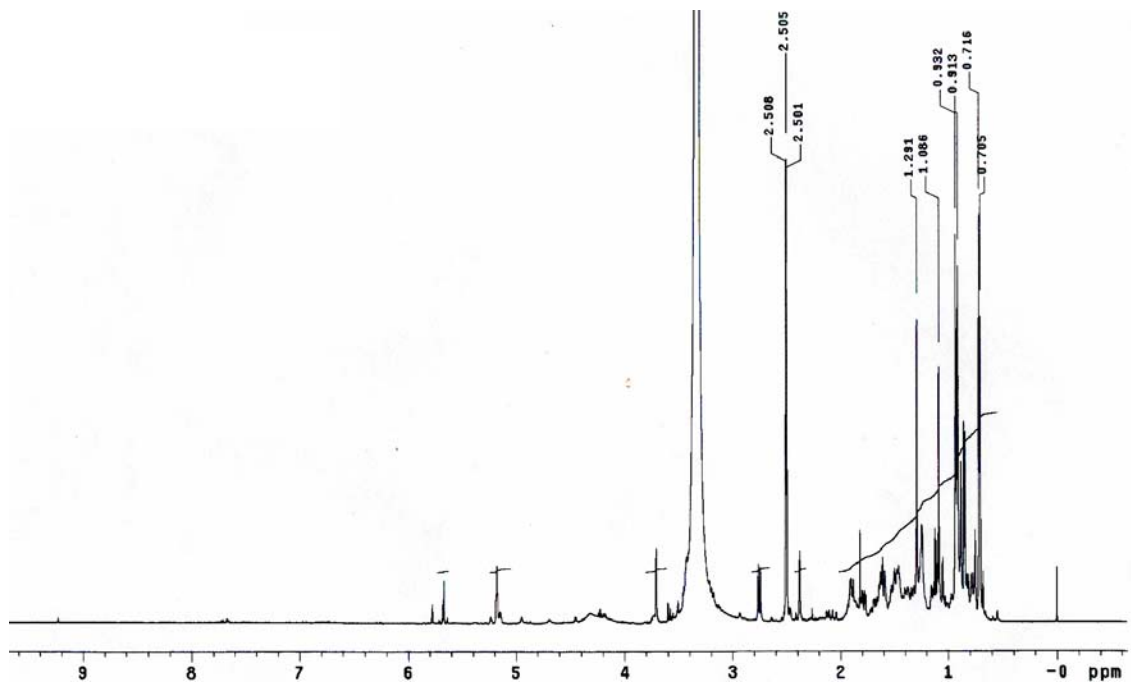




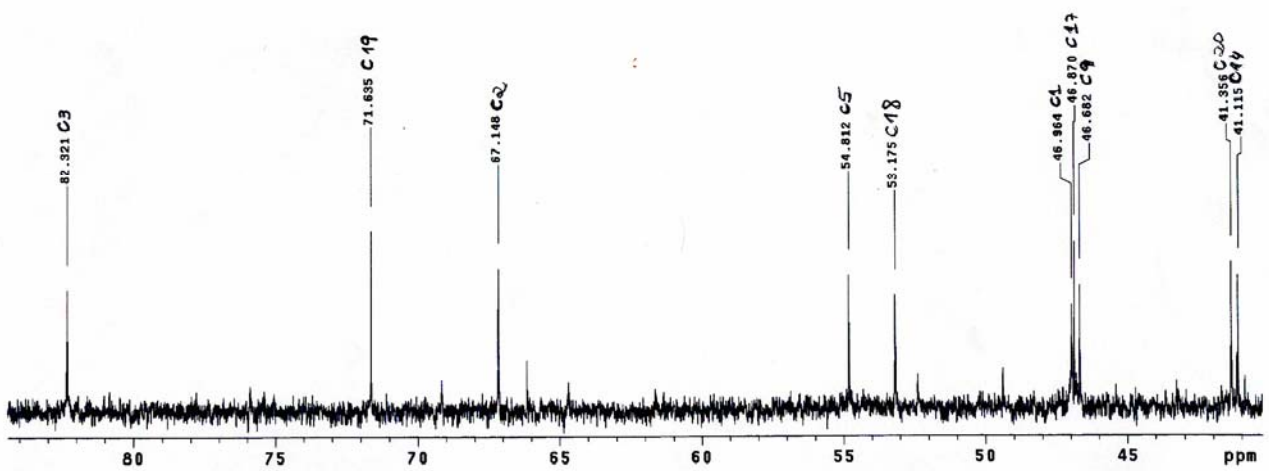
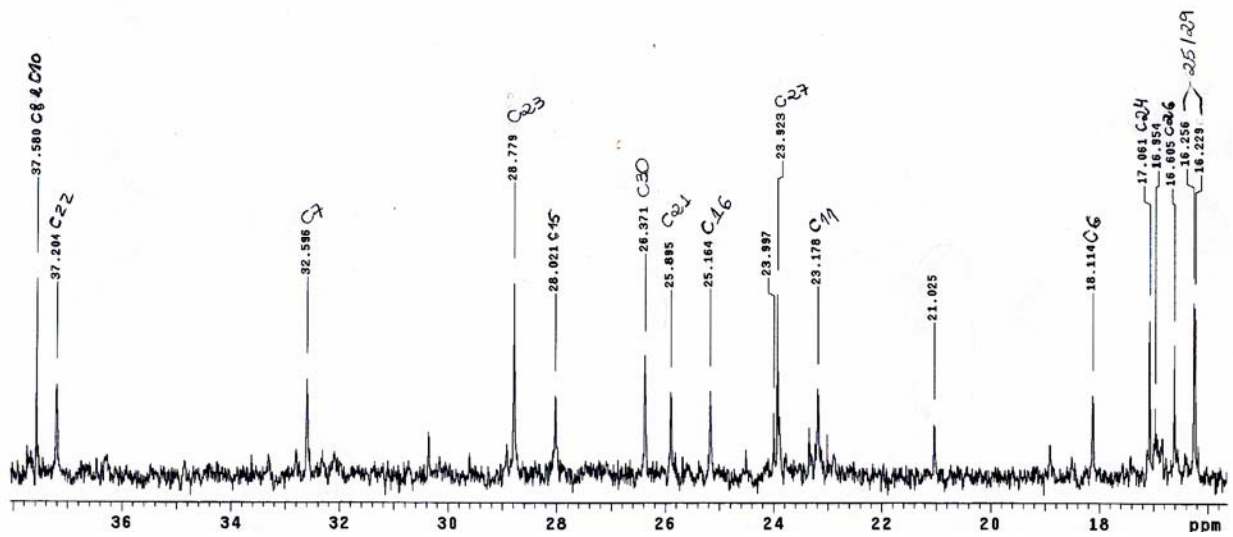
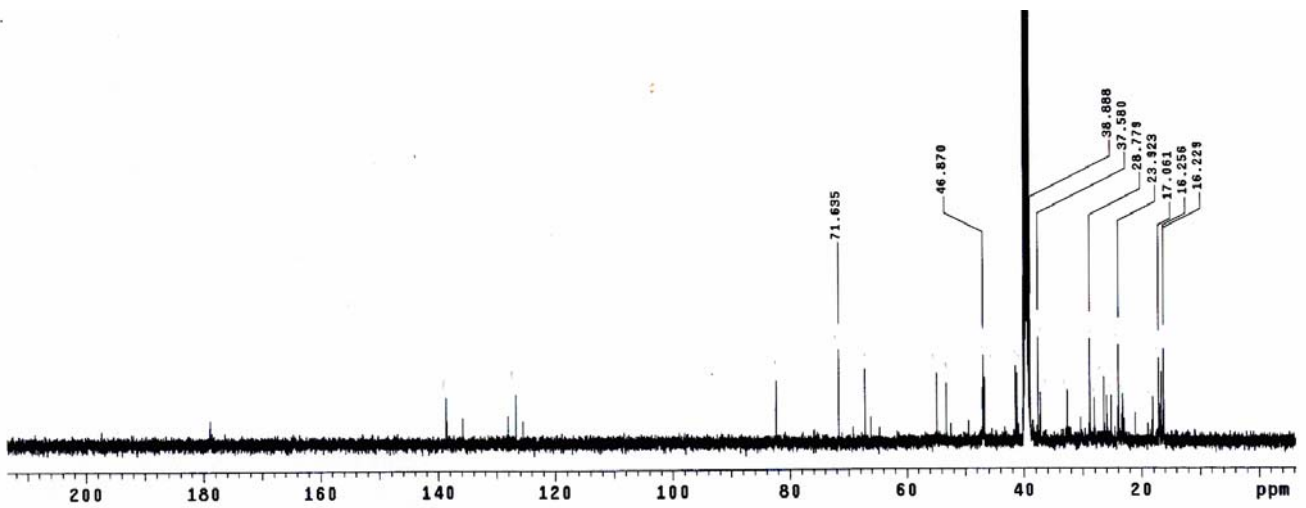
**Espectro 86:** Experimento gHMPC de MeT3 e MeT4 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



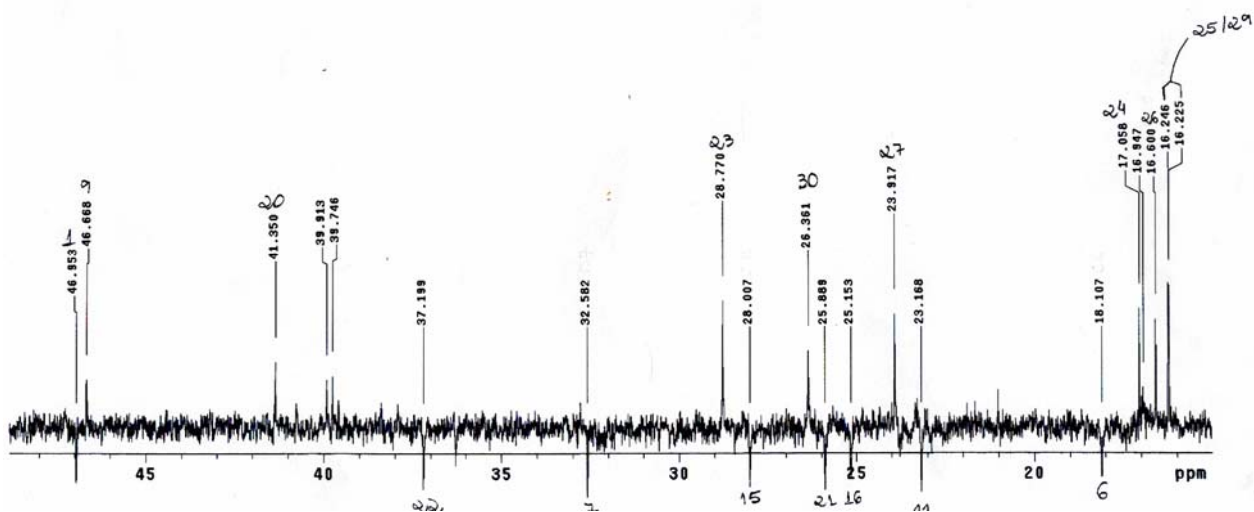
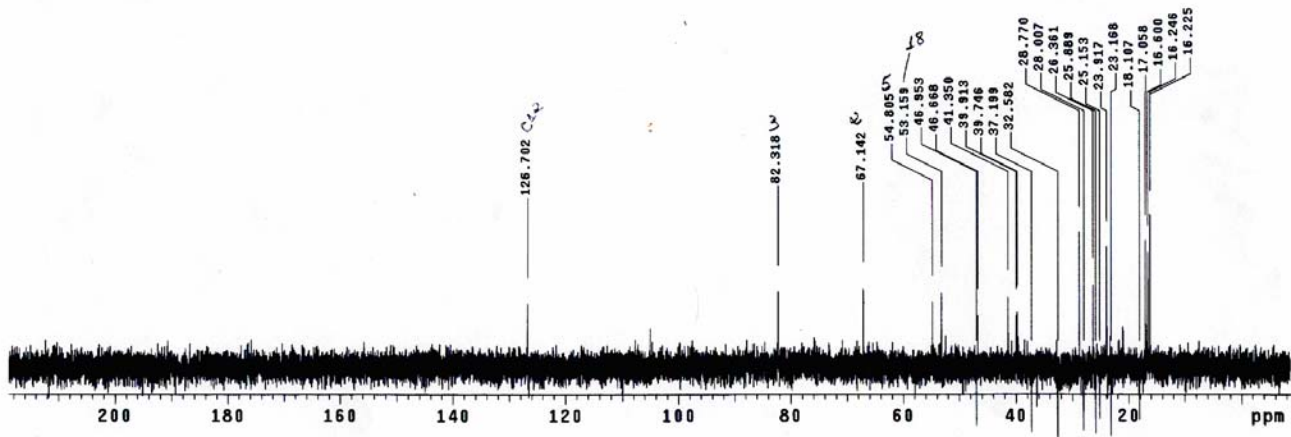
**Espectro 87:** Experimento gHMBC de MeT3 e MeT4 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



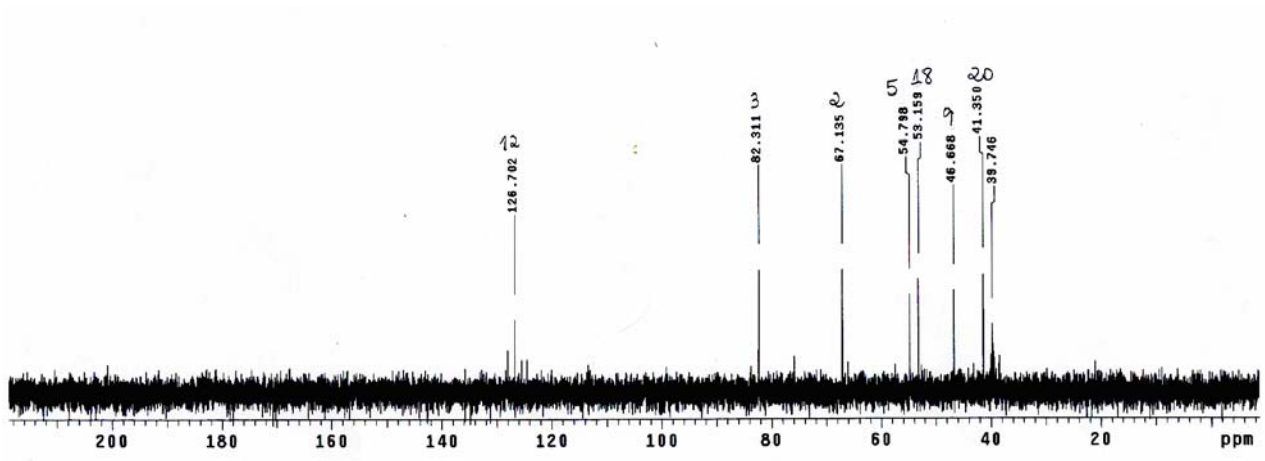
**Espectro 88:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de MeT5 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



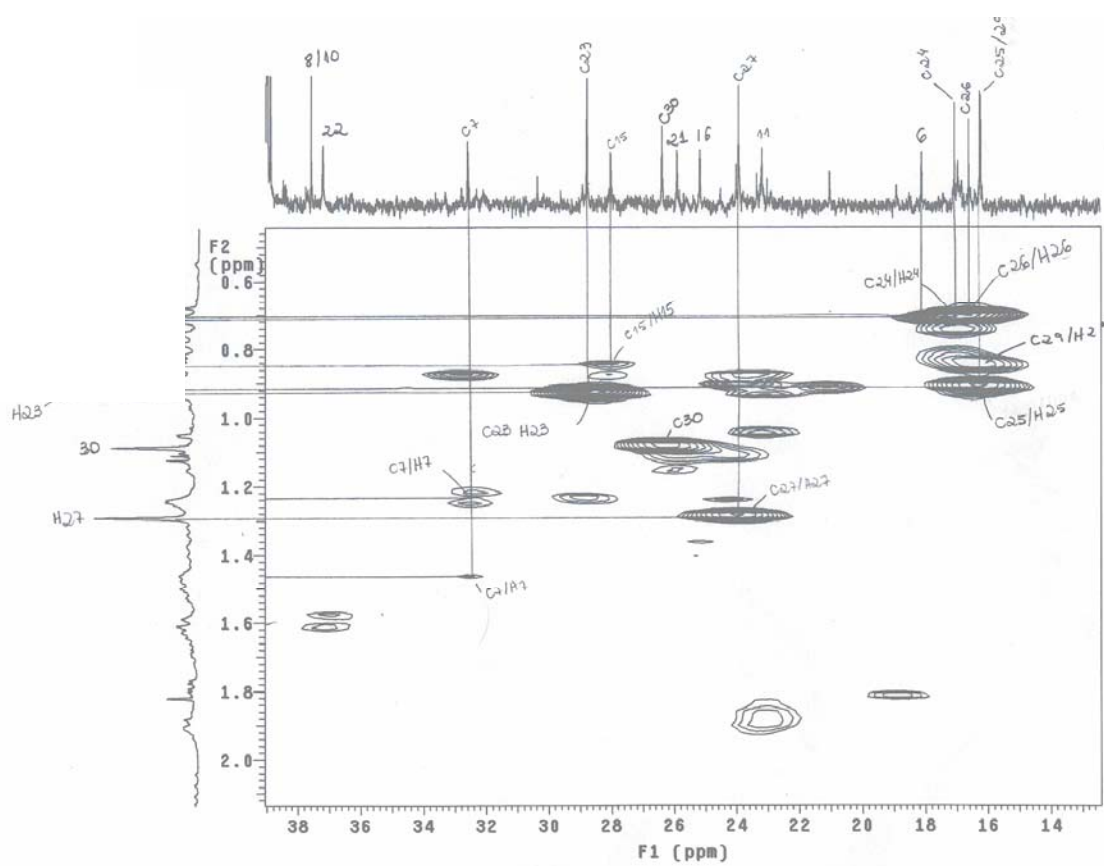
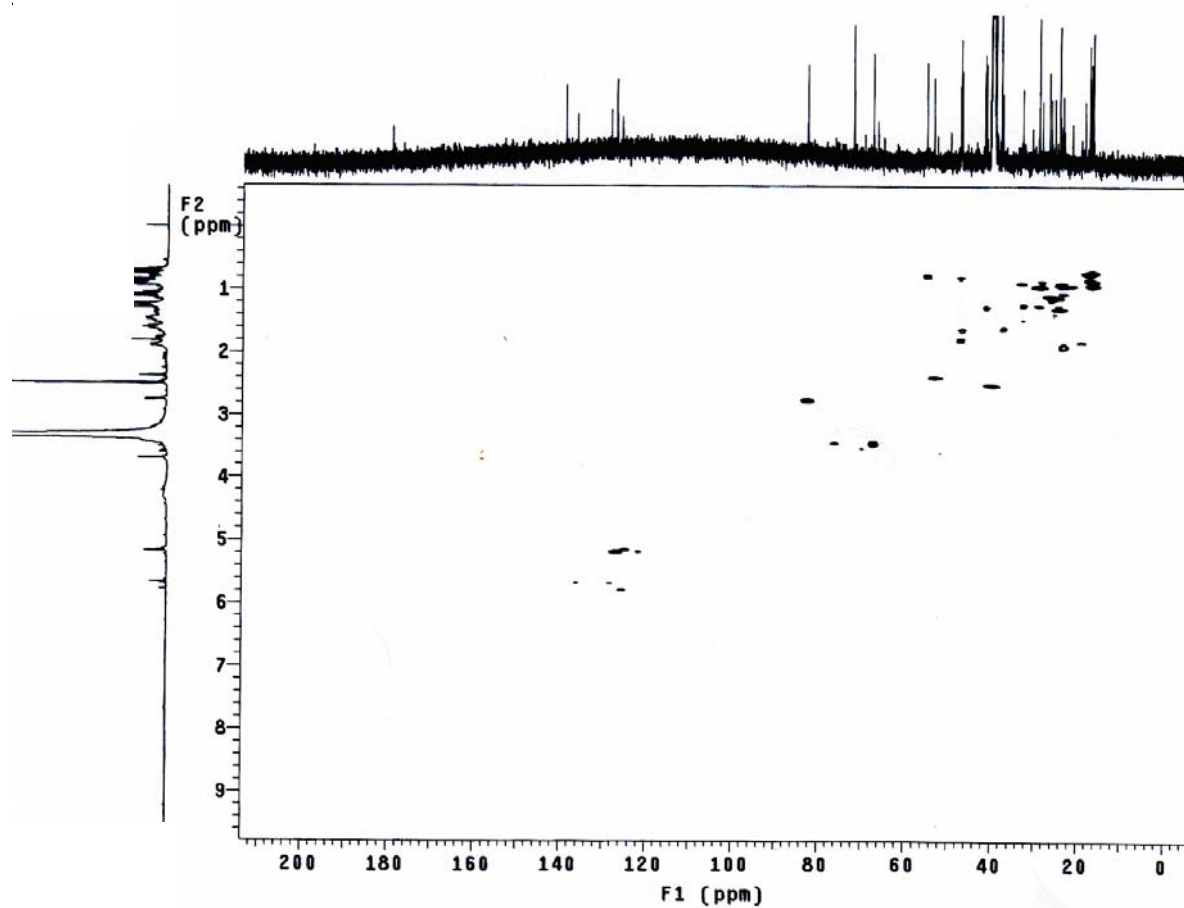
**Espetro 89:** Espetro de RMN  $^{13}\text{C}$  de MeT5 (125 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



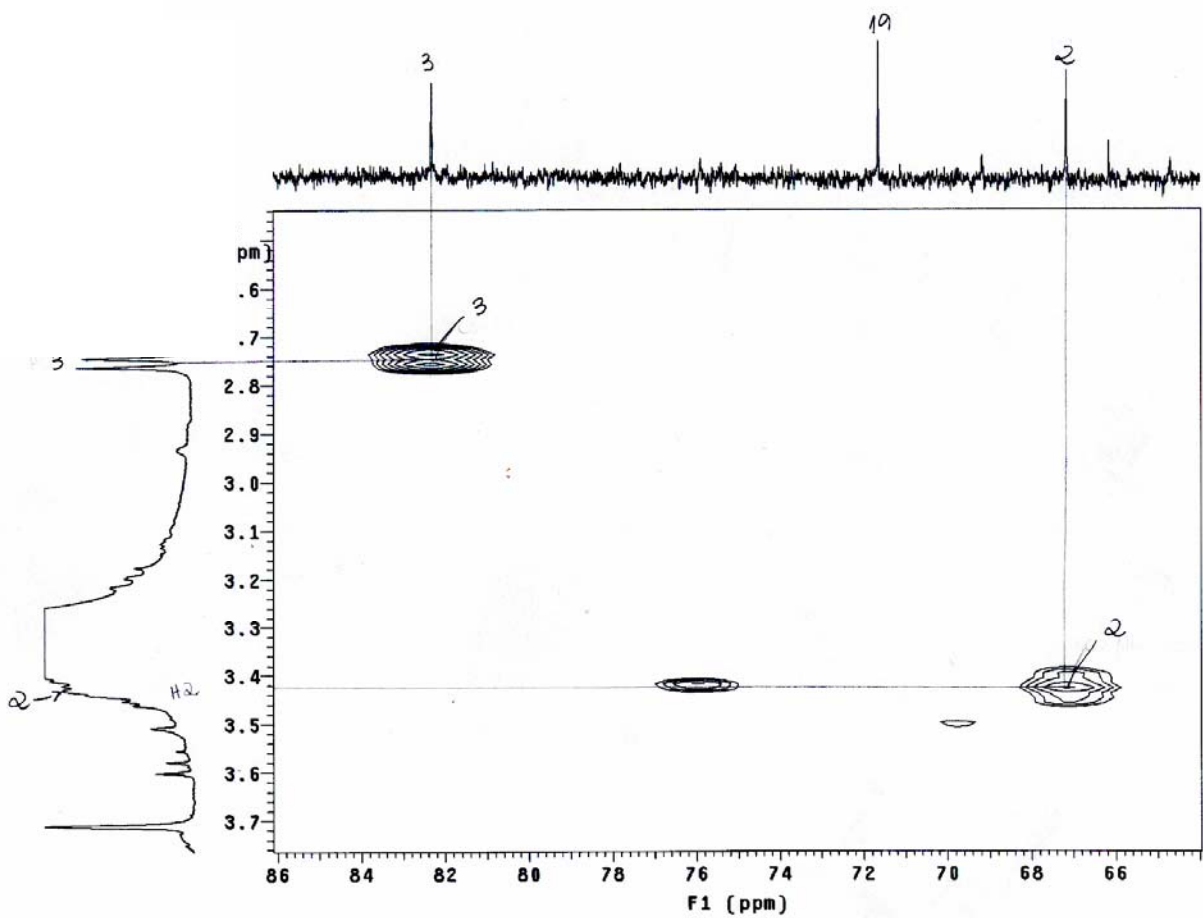
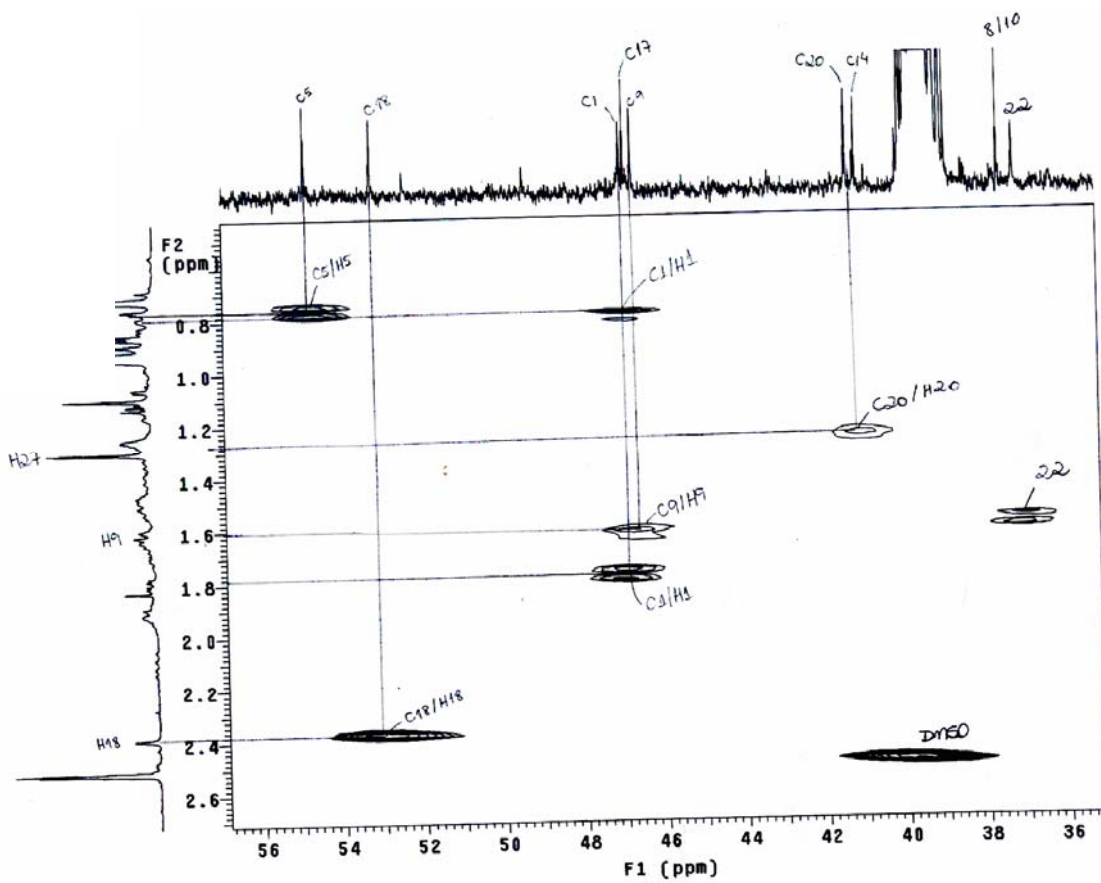
**Espectro 90:** Experimento DEPT 135° de **MeT5** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



**Espectro 91:** Experimento DEPT 90° de **MeT5** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

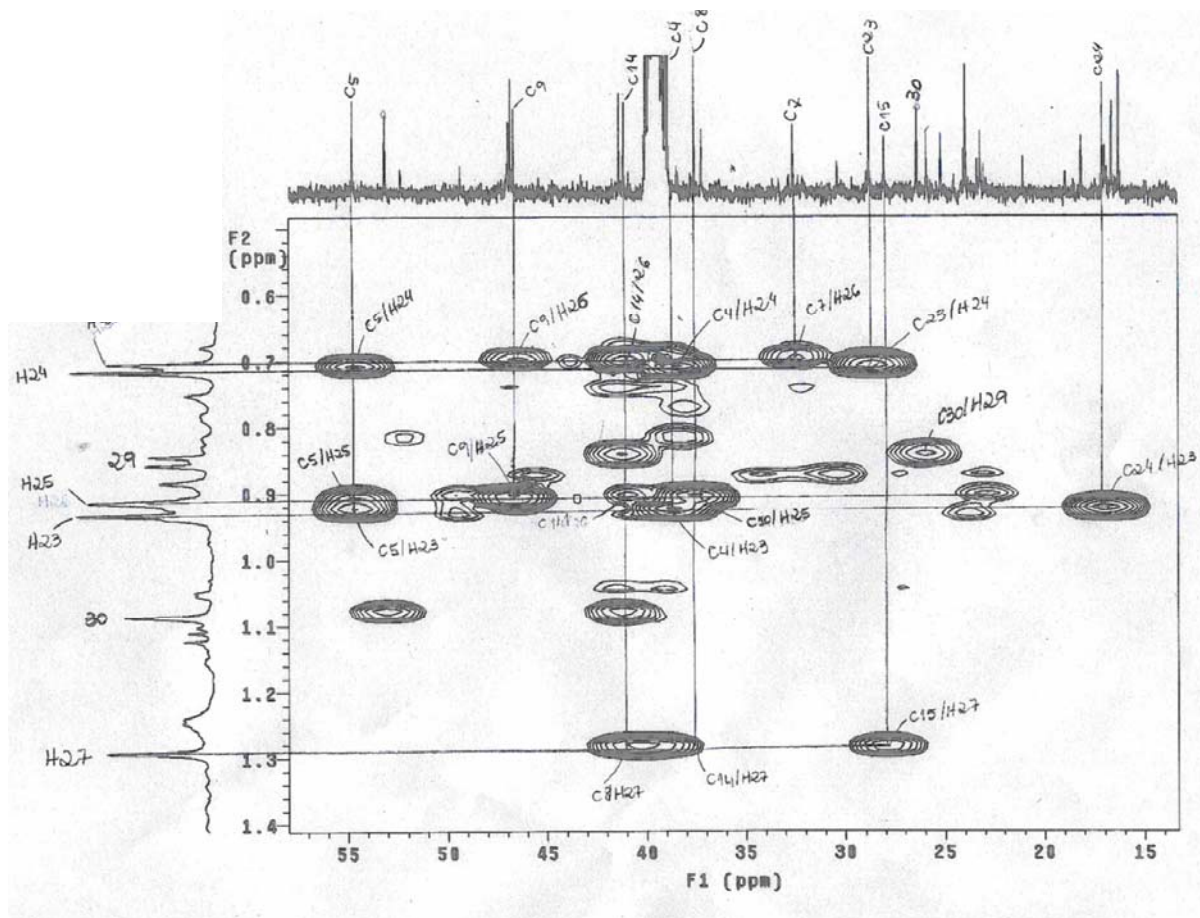
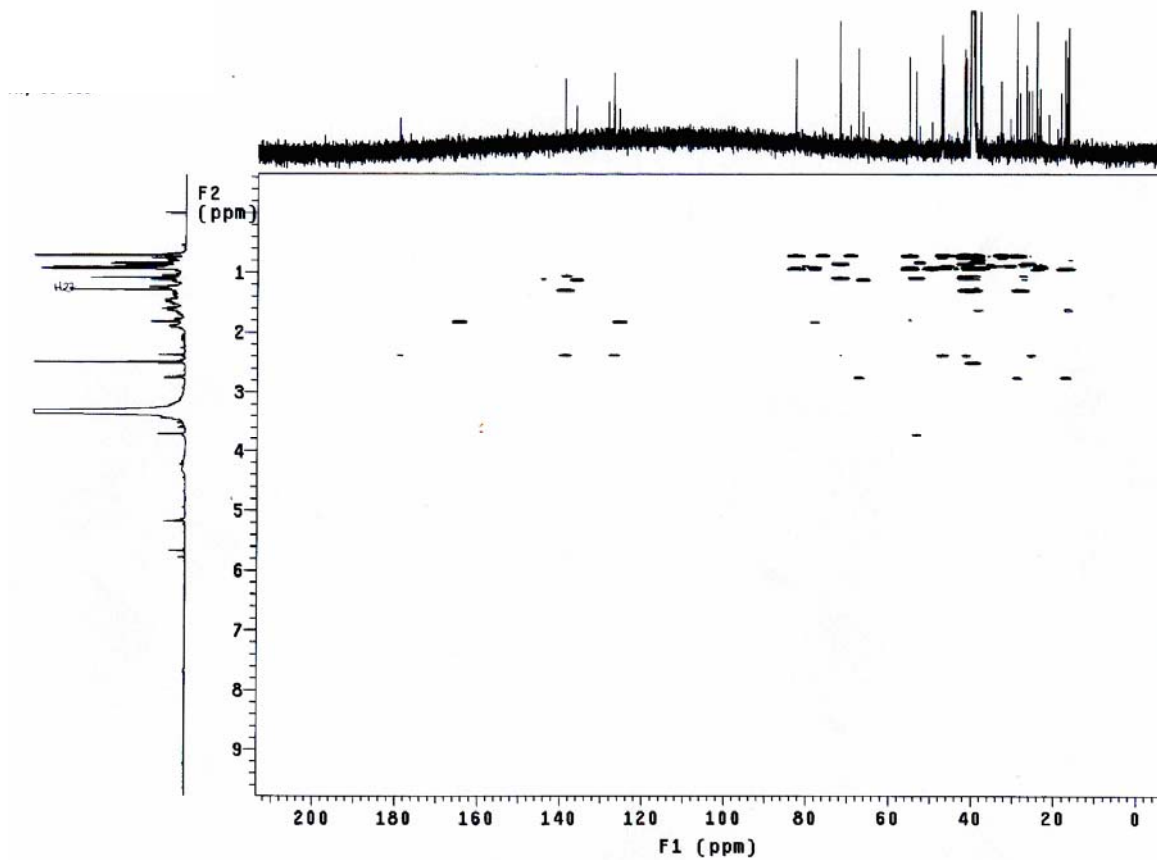


**Espectro 92:** Experimento gHMQC de MeT5 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

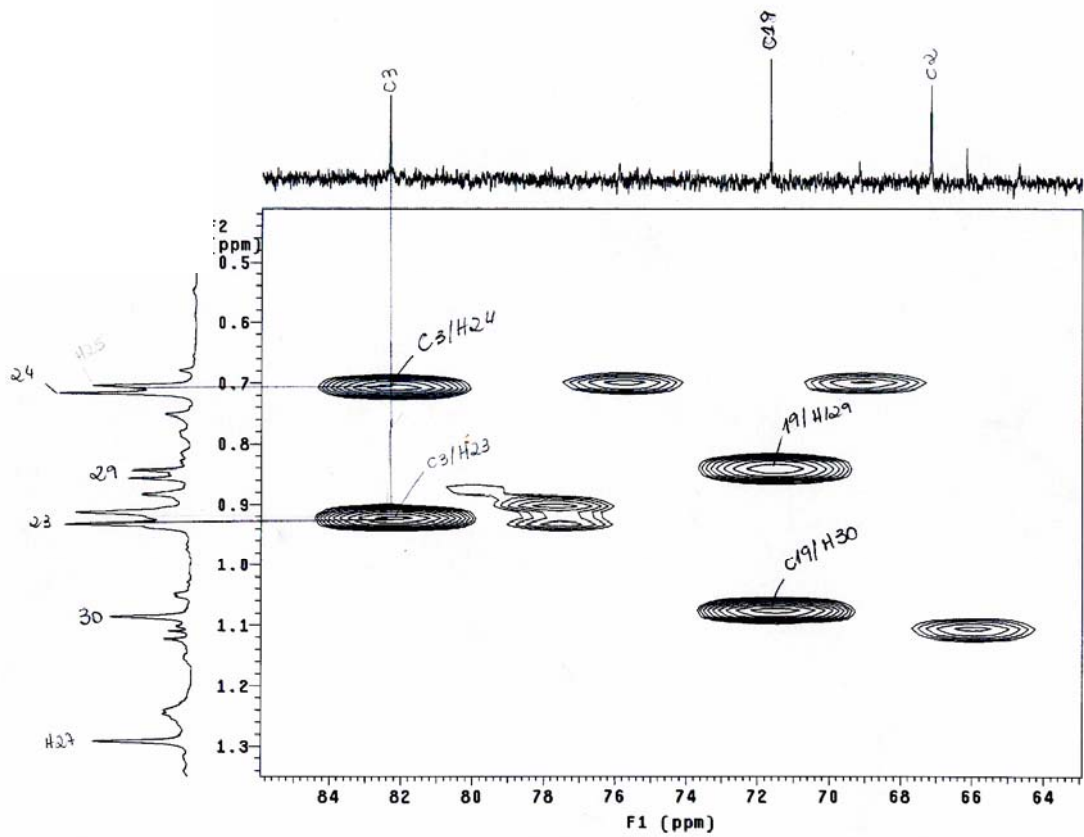
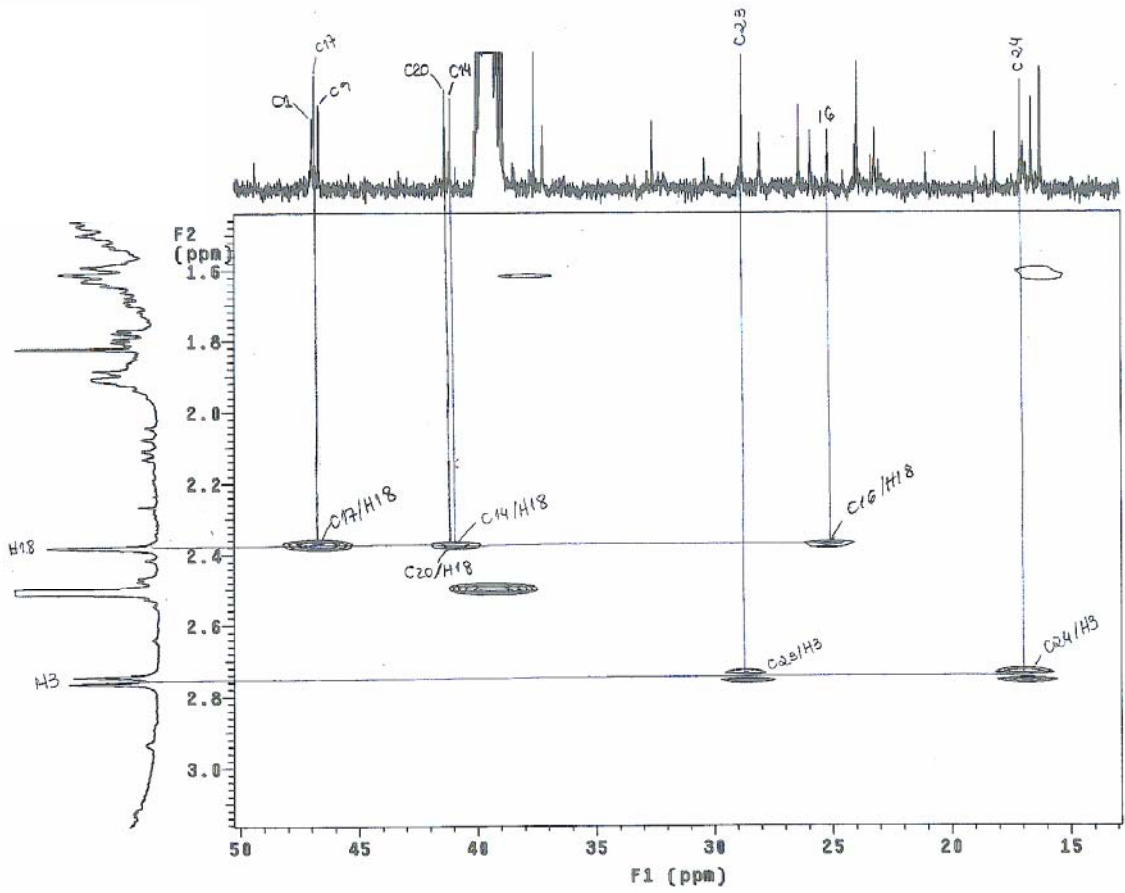


Espectro 93: Experimento gHMQC de MeT5 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

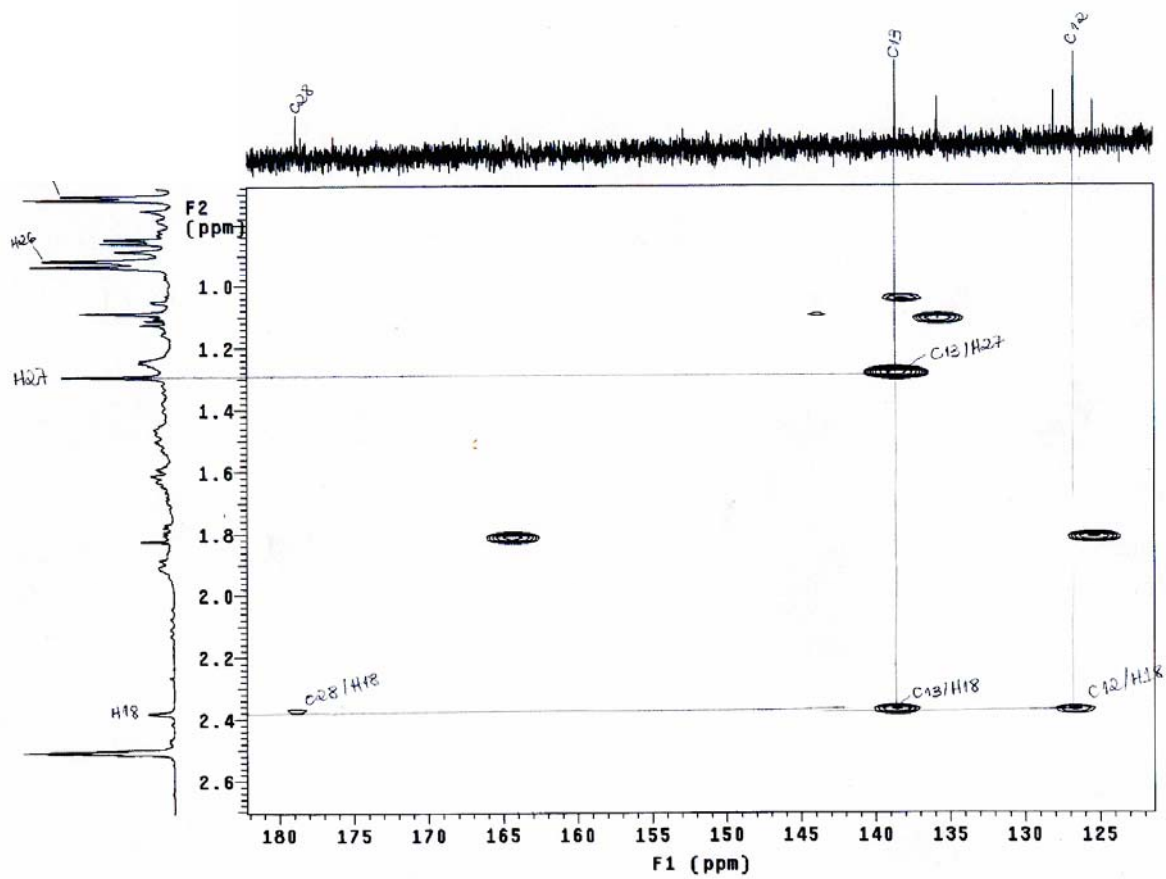




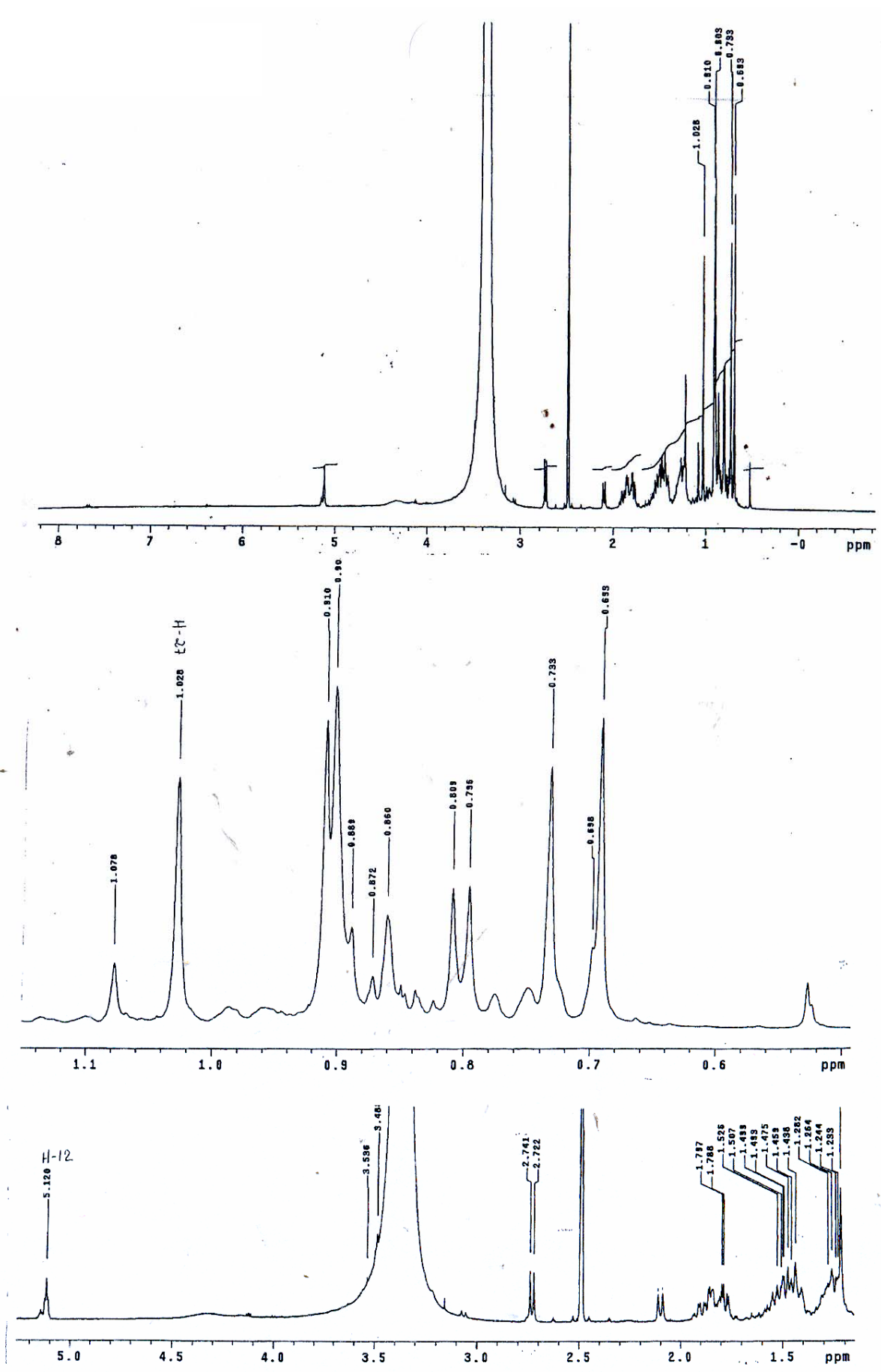
Espectro 94: Experimento gHMBC de MeT5 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



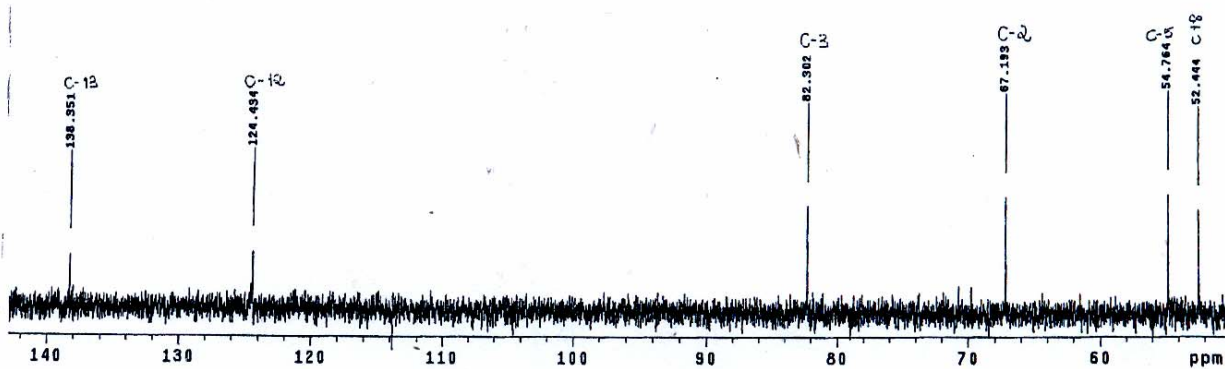
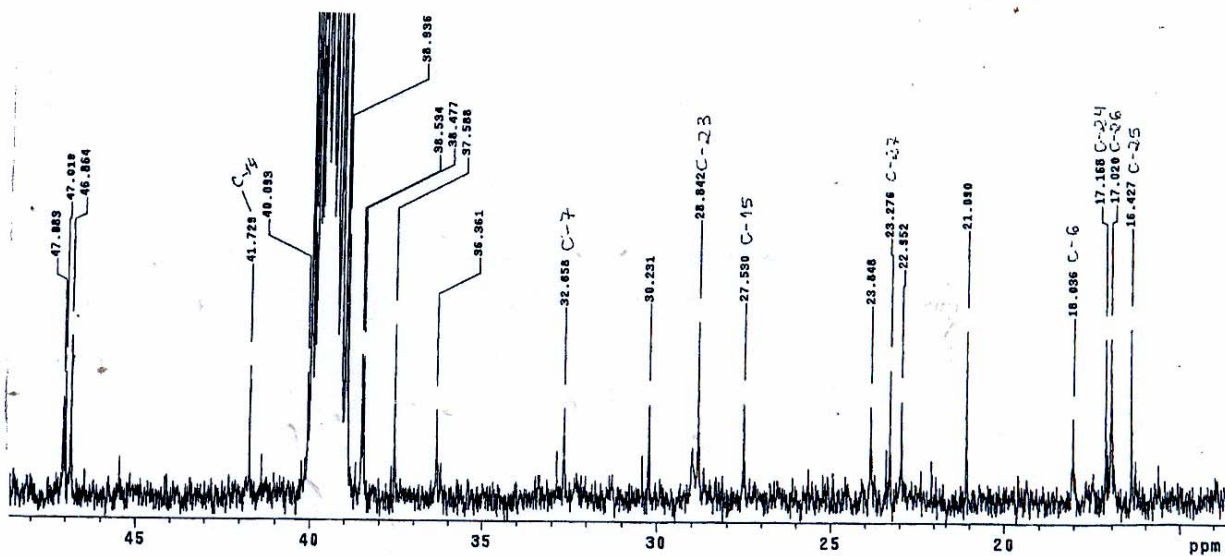
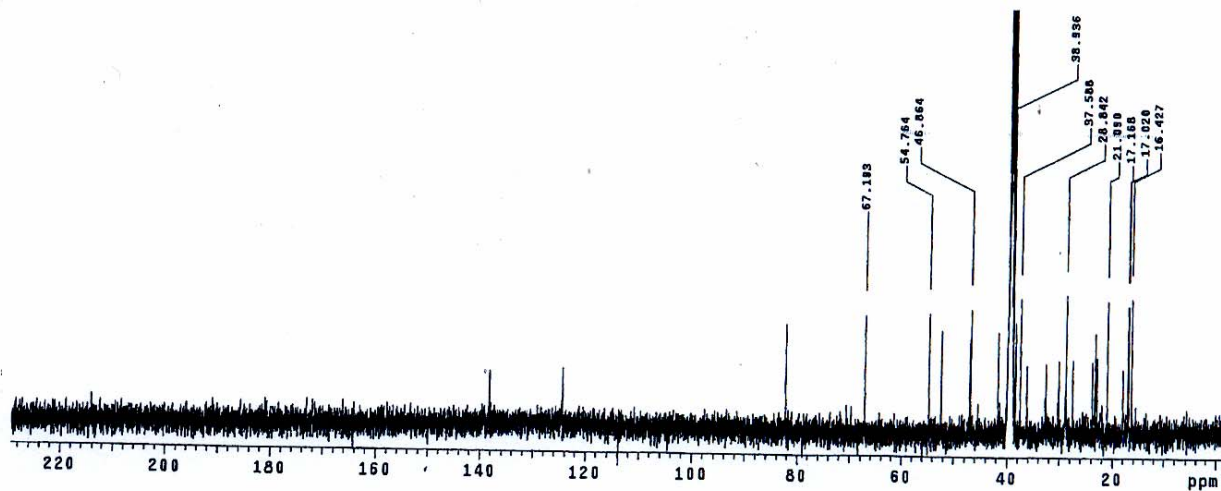
Espectro 95: Experimento gHMBC de MeT5 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



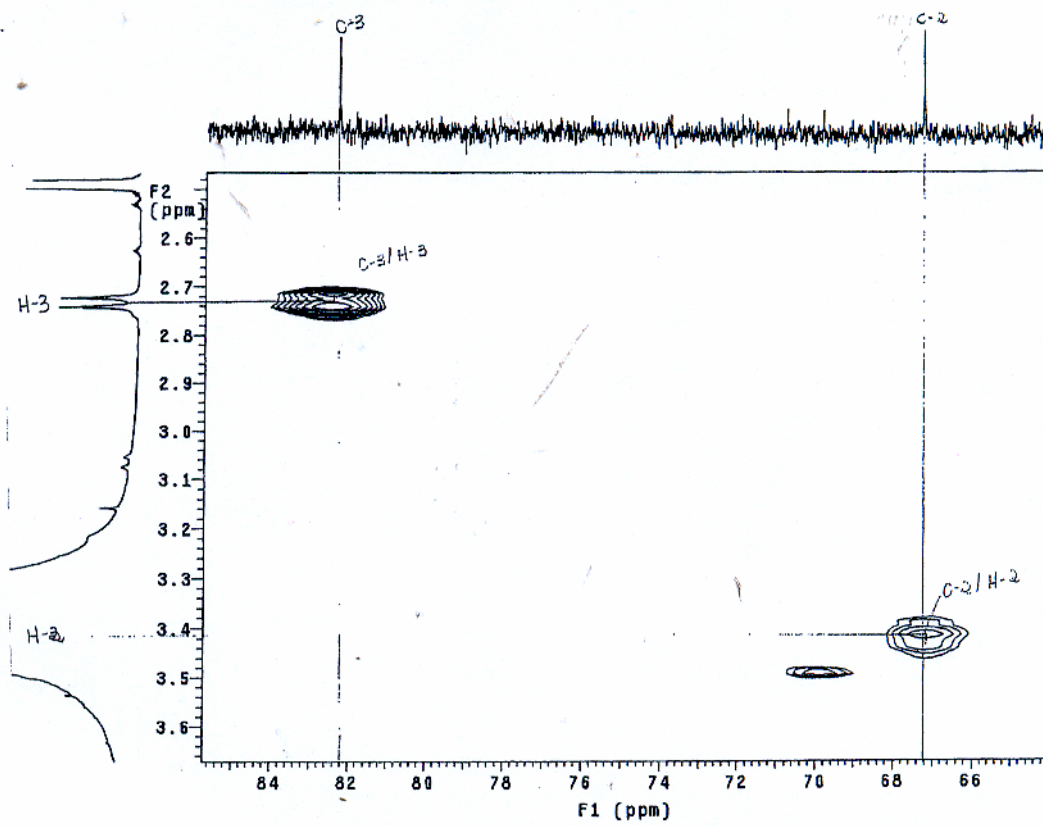
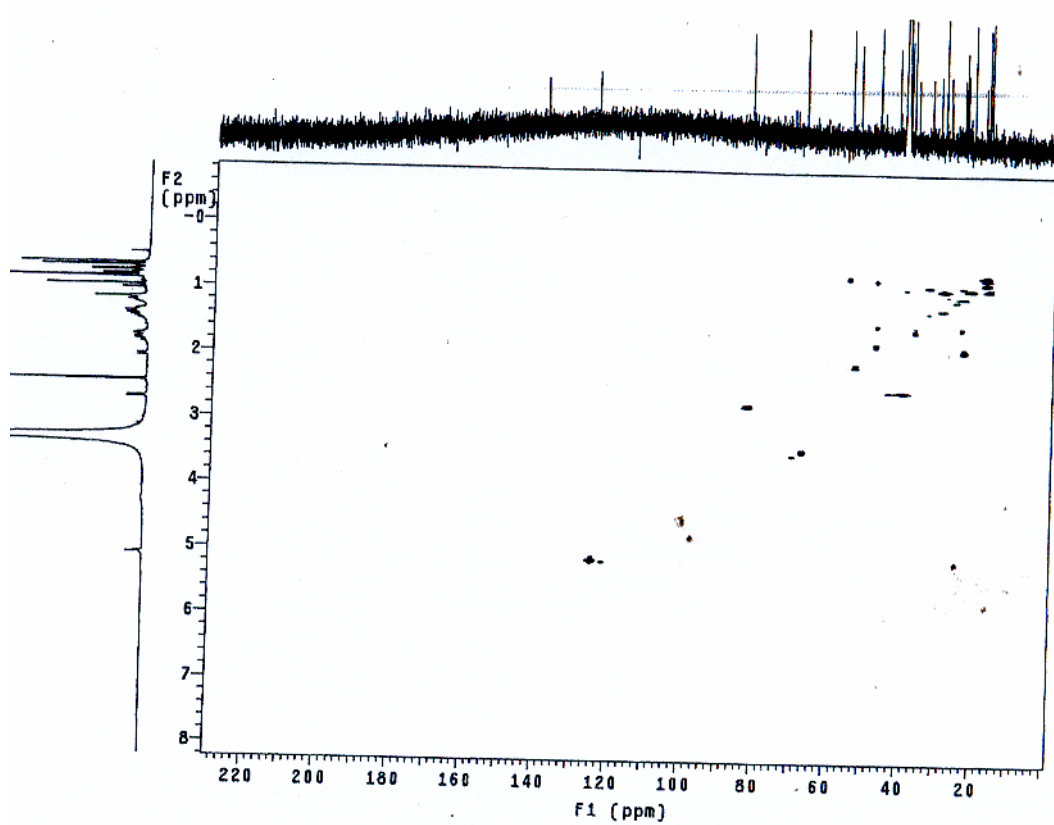
**Espectro 96:** Experimento gHMBC de MeT5 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



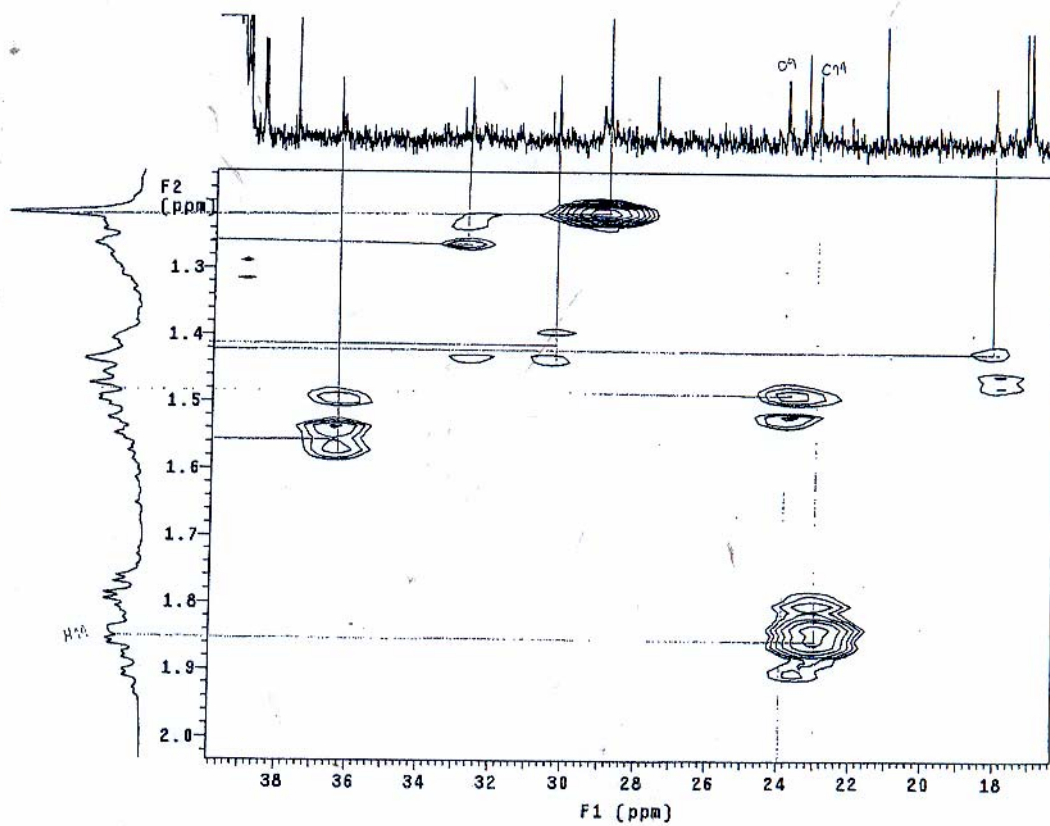
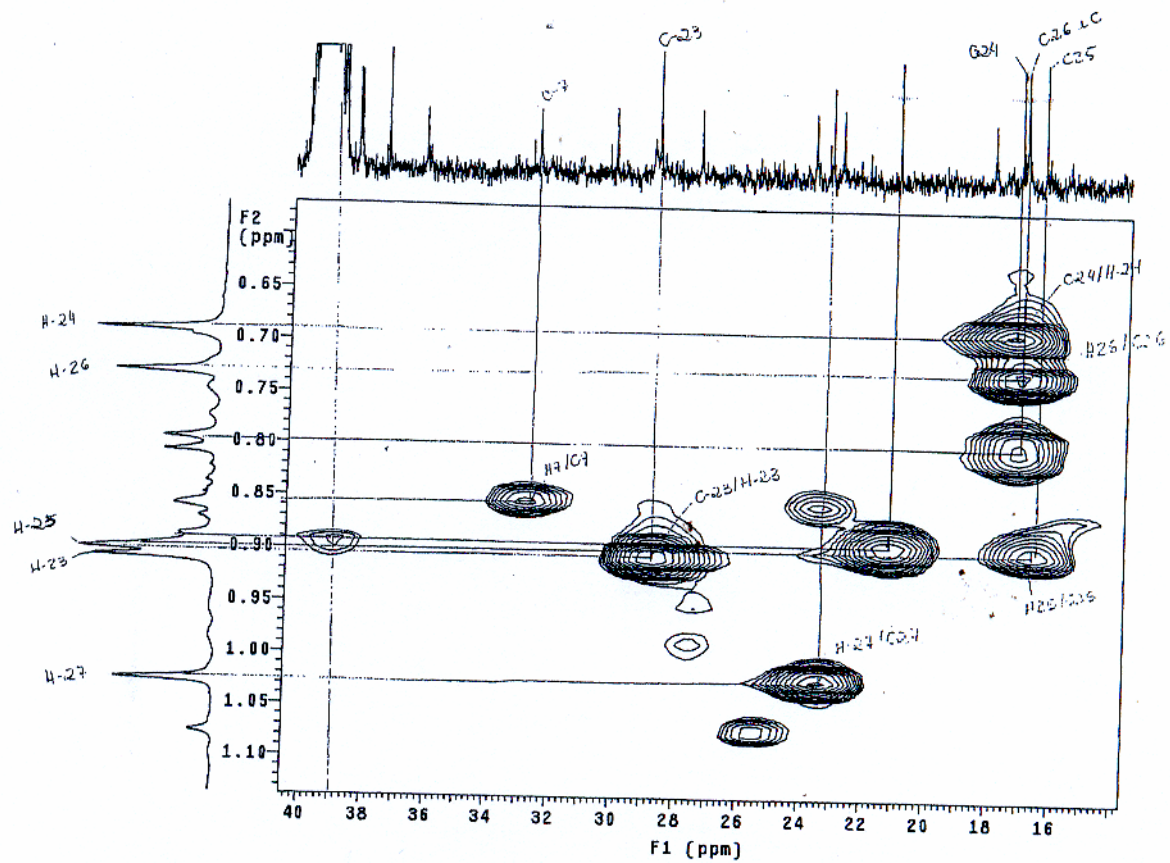
**Espectro 97:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de MeT6 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



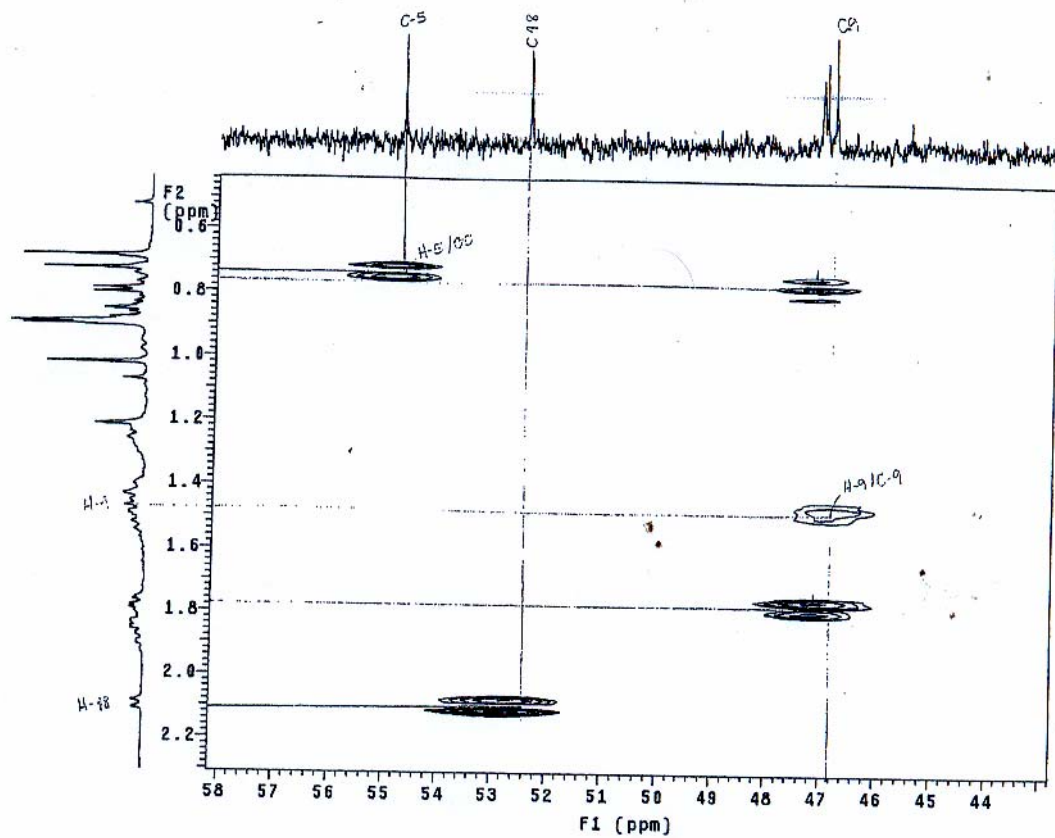
**Espetro 98:** Espetro de RMN <sup>13</sup>C de MeT6 (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



Espectro 99: Experimento gHMQC de MeT6 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).

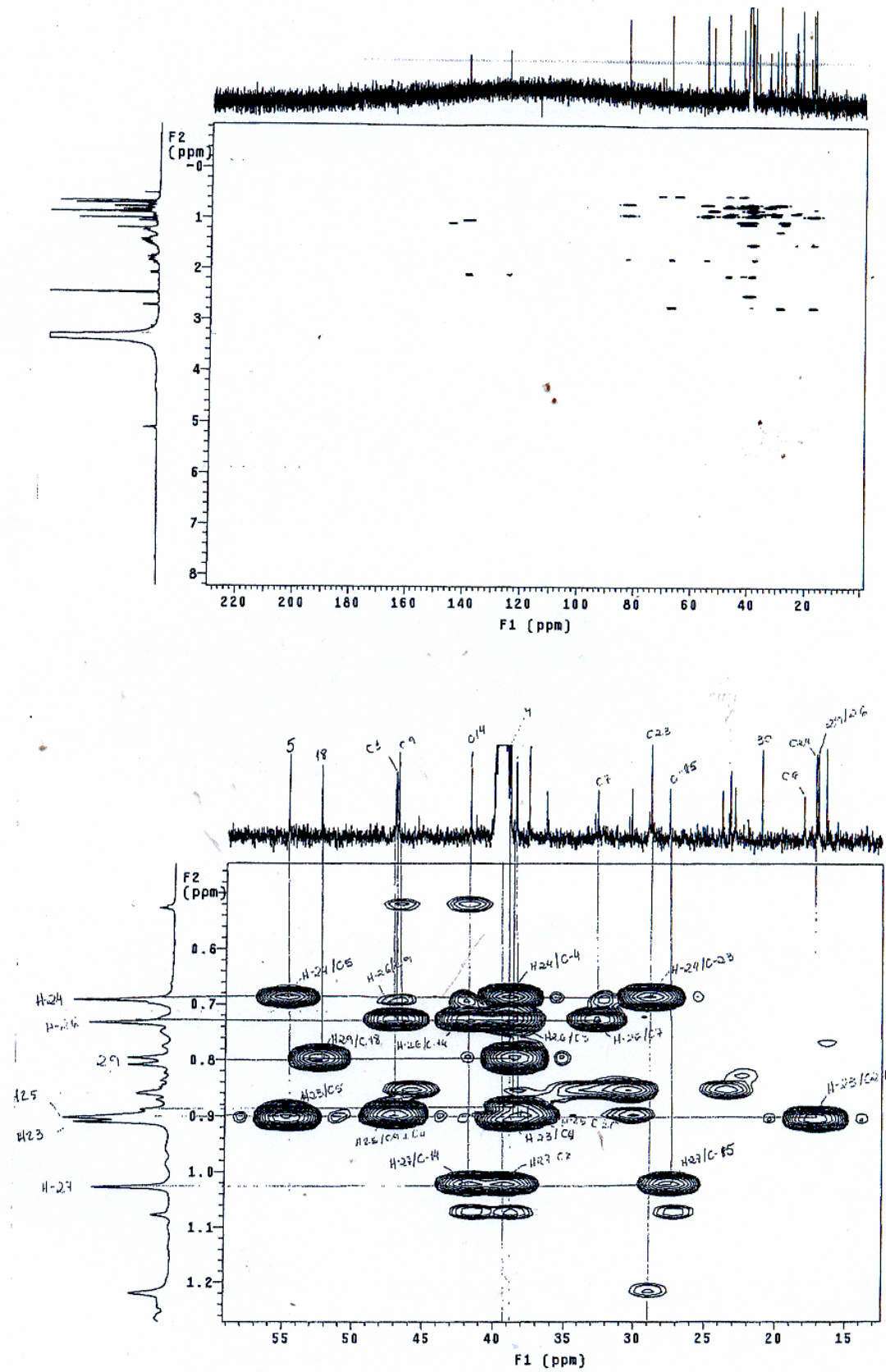


Espectro 100: Experimento gHMQC de MeT6 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

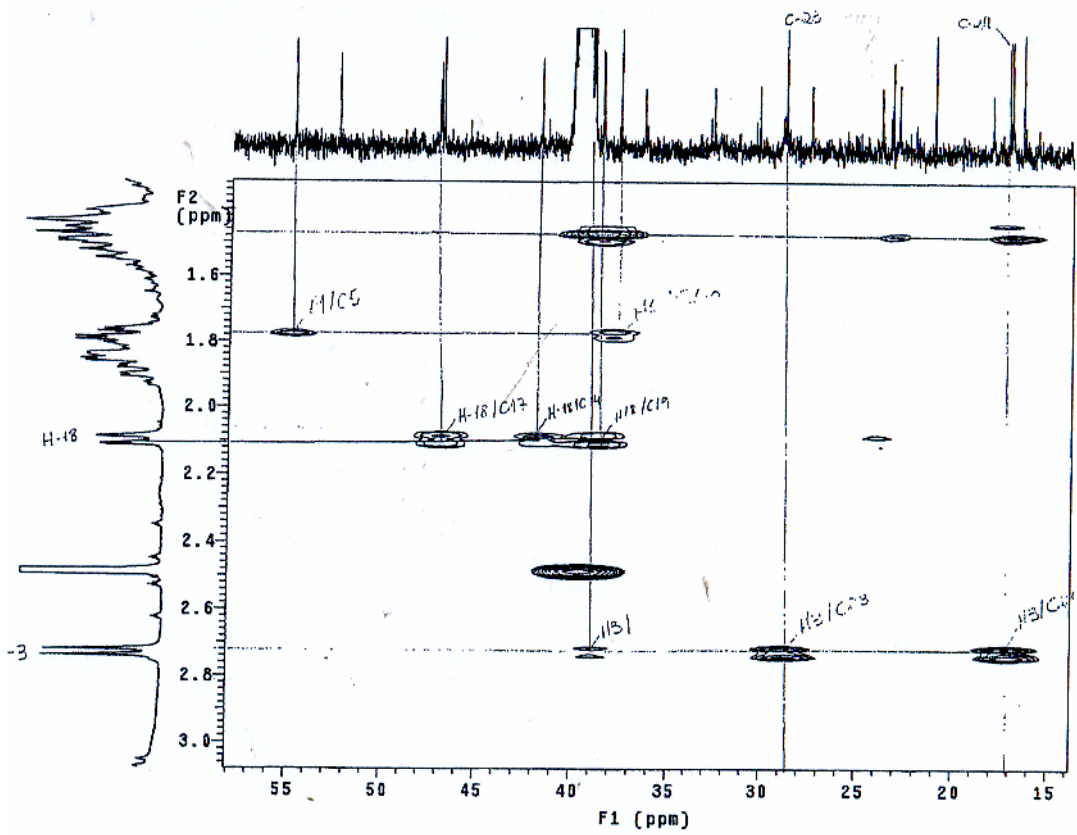
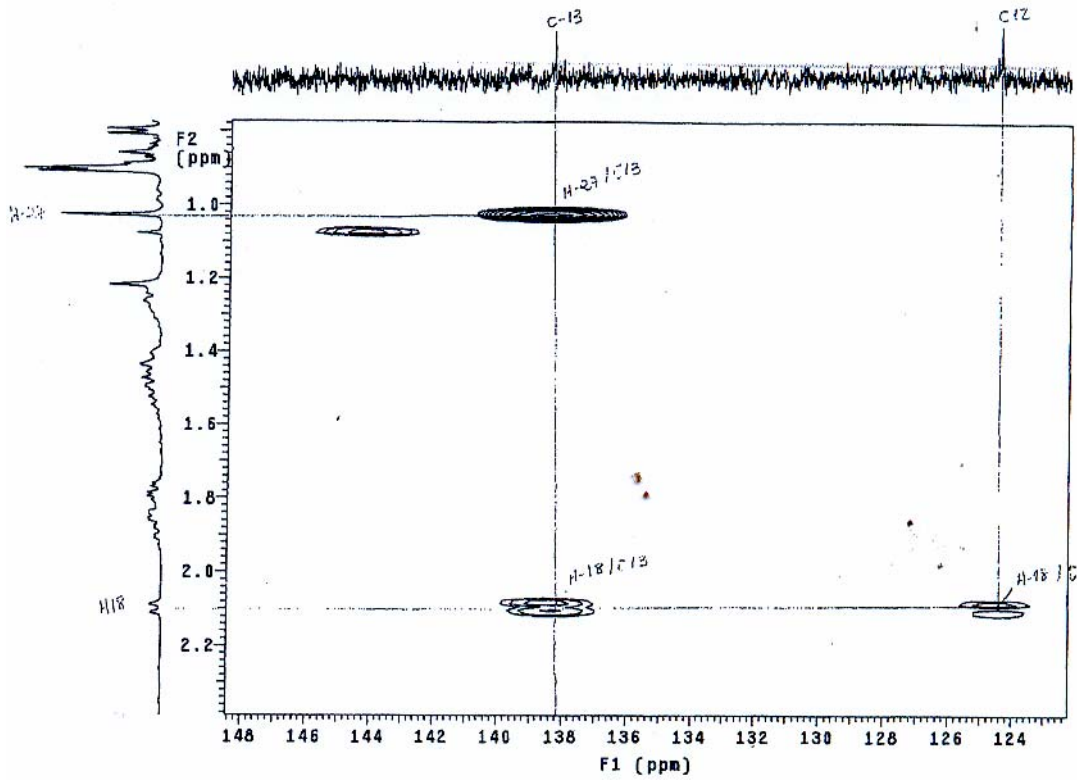


**Espectro 101:** Experimento gHMTC de MeT6 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).

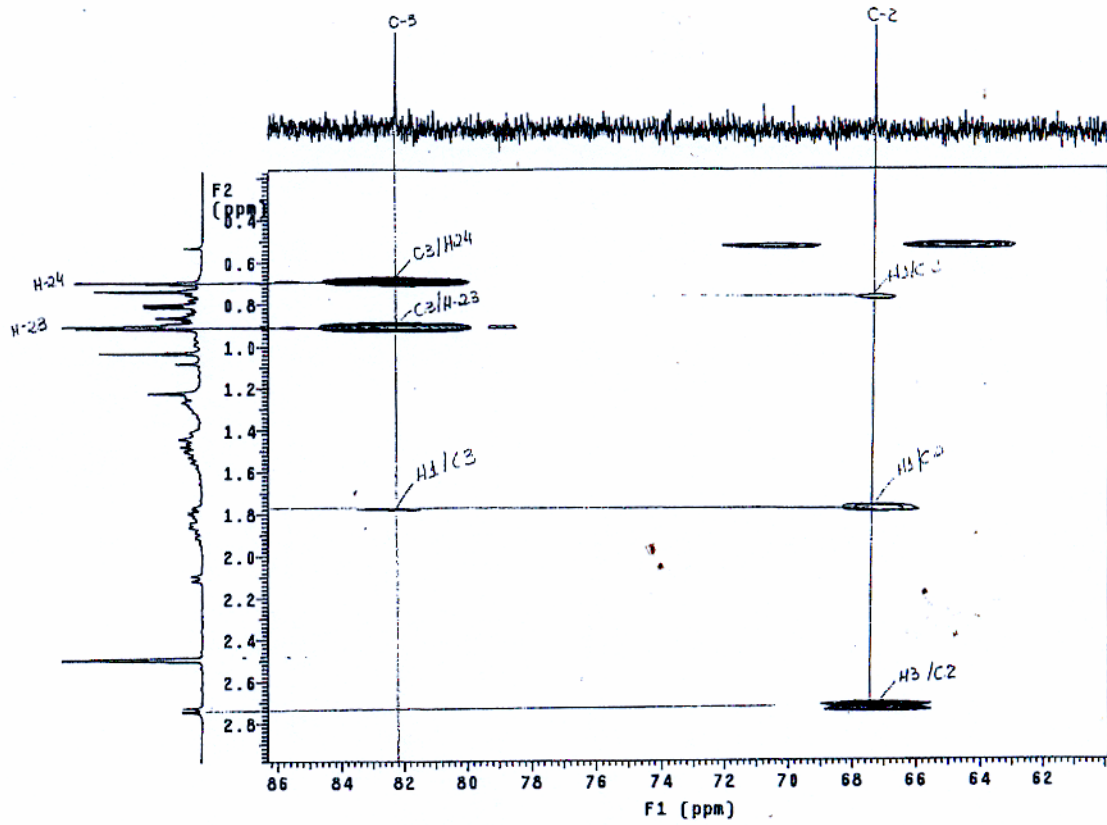




Espectro 102: Experimento gHMBC de MeT6 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).

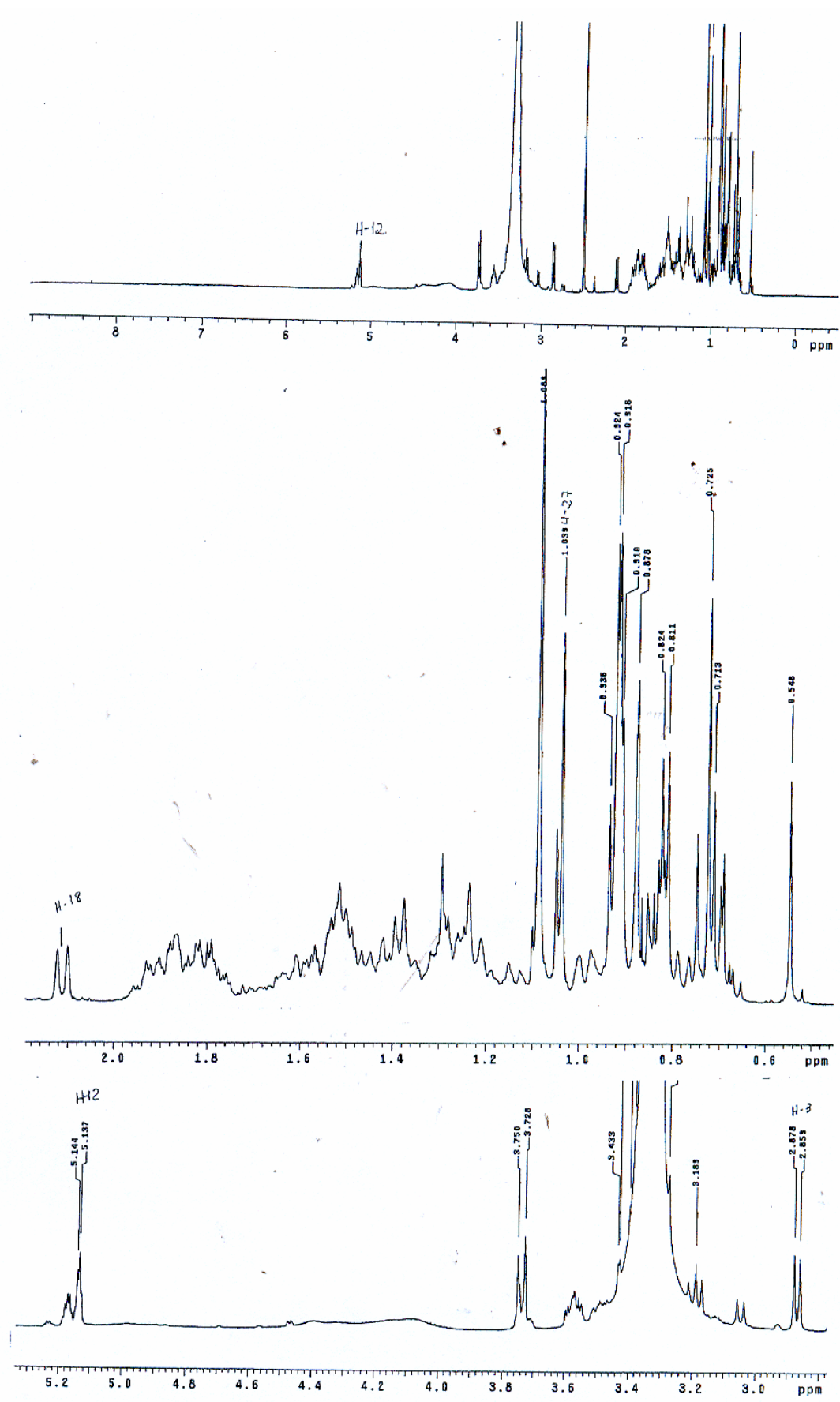


Espectro 103: Experimento gHMBC de MeT6 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).

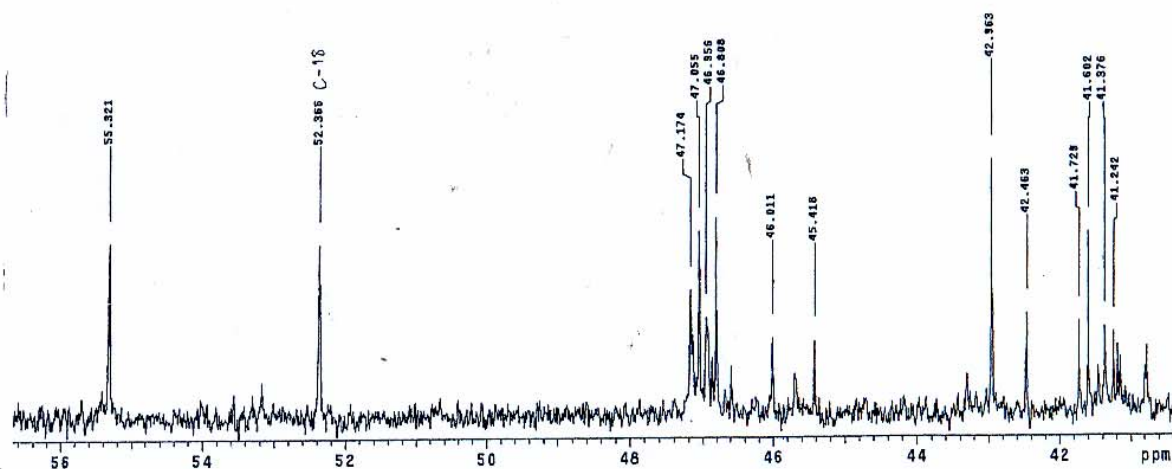
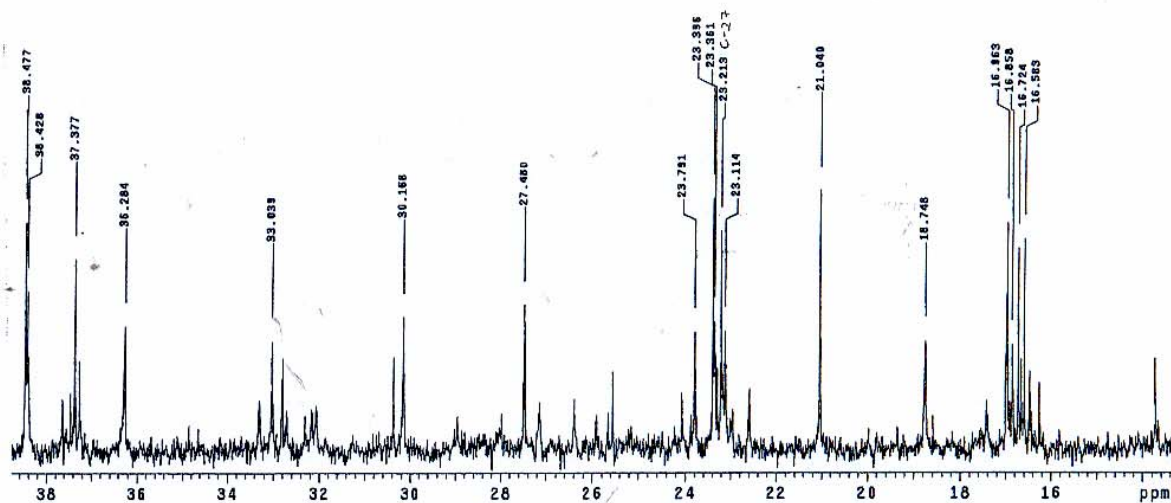
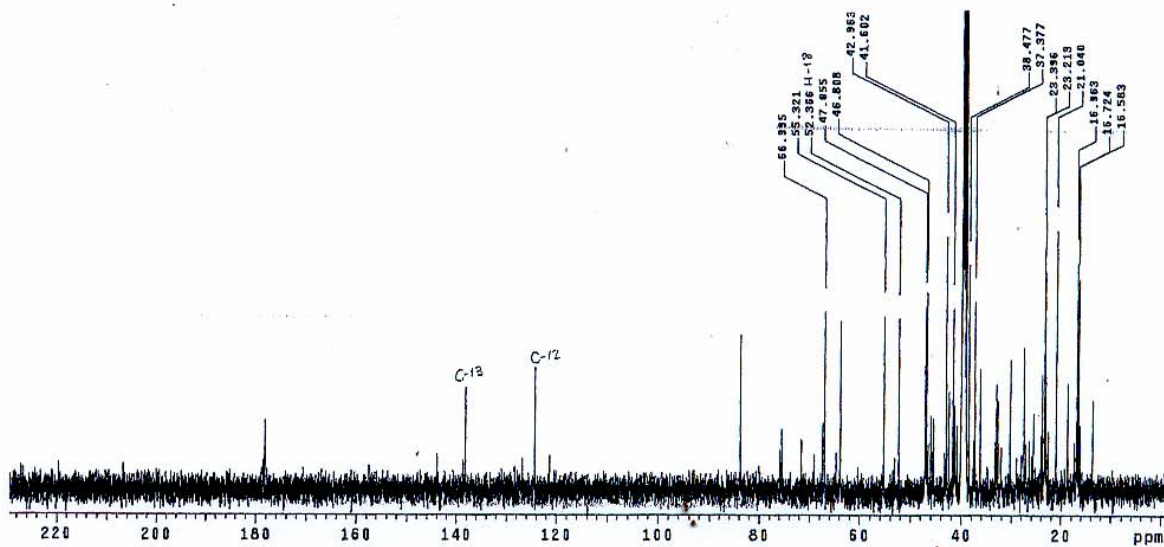


Espectro 104: Experimento gHMBC de MeT6 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

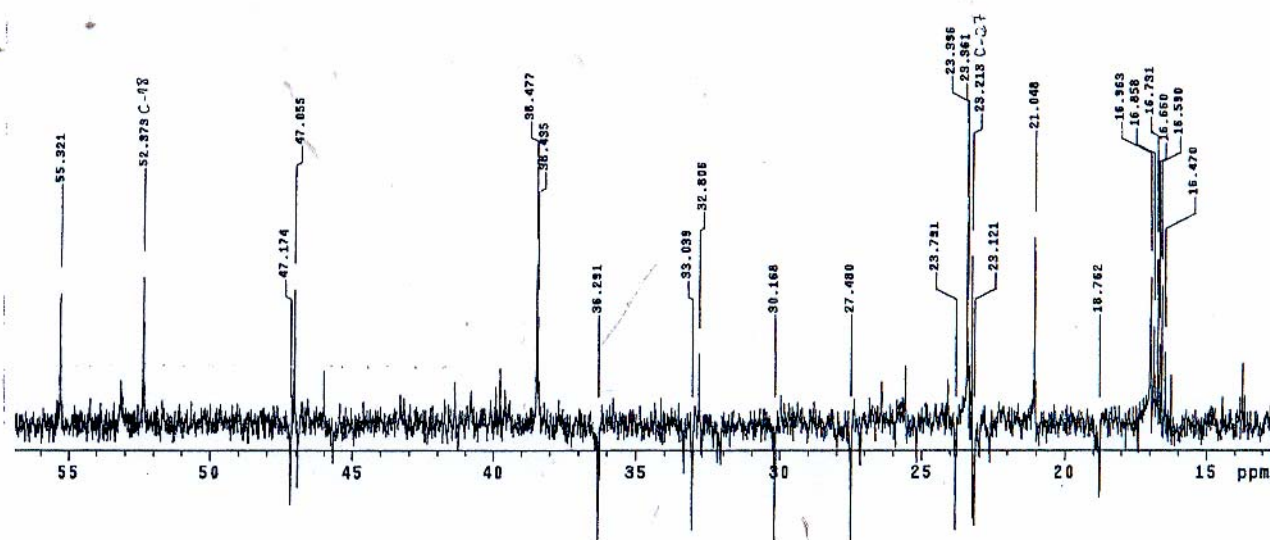
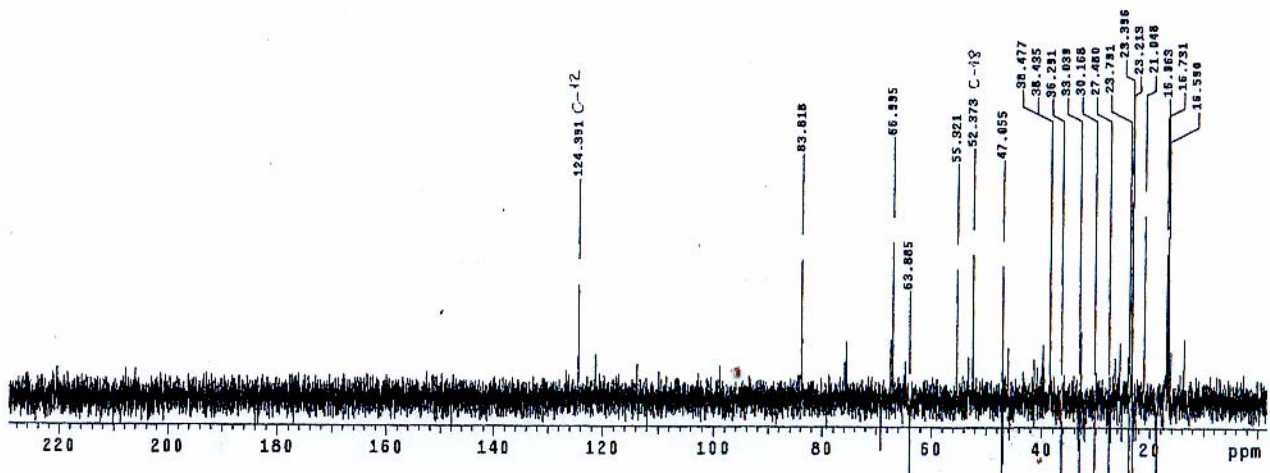




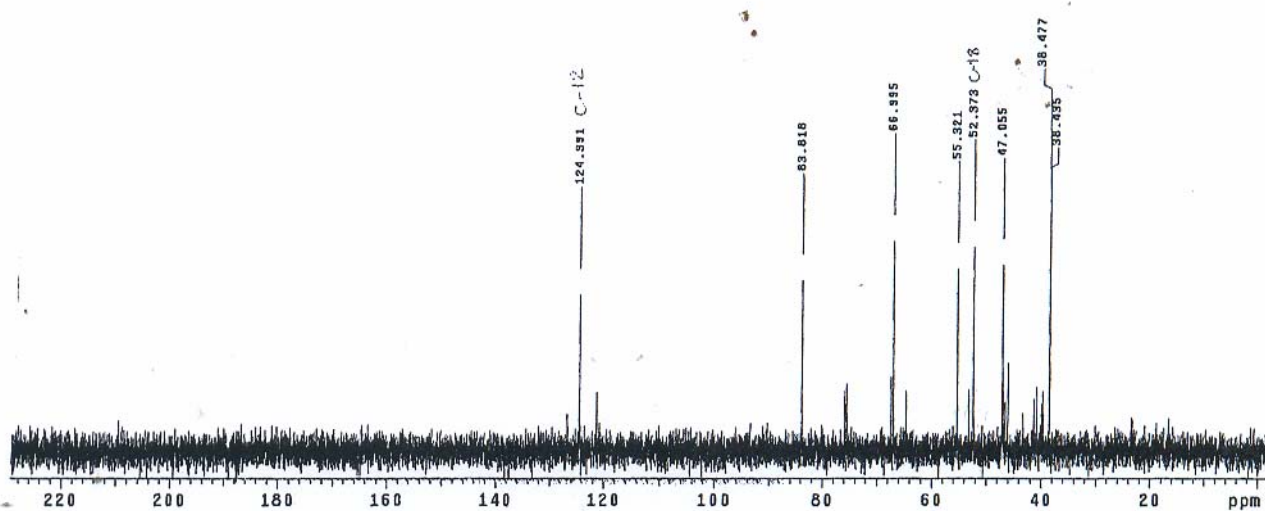
**Espectro 106:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de MeT7 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



Espectro 107: Espectro de RMN <sup>13</sup>C de MeT7 (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

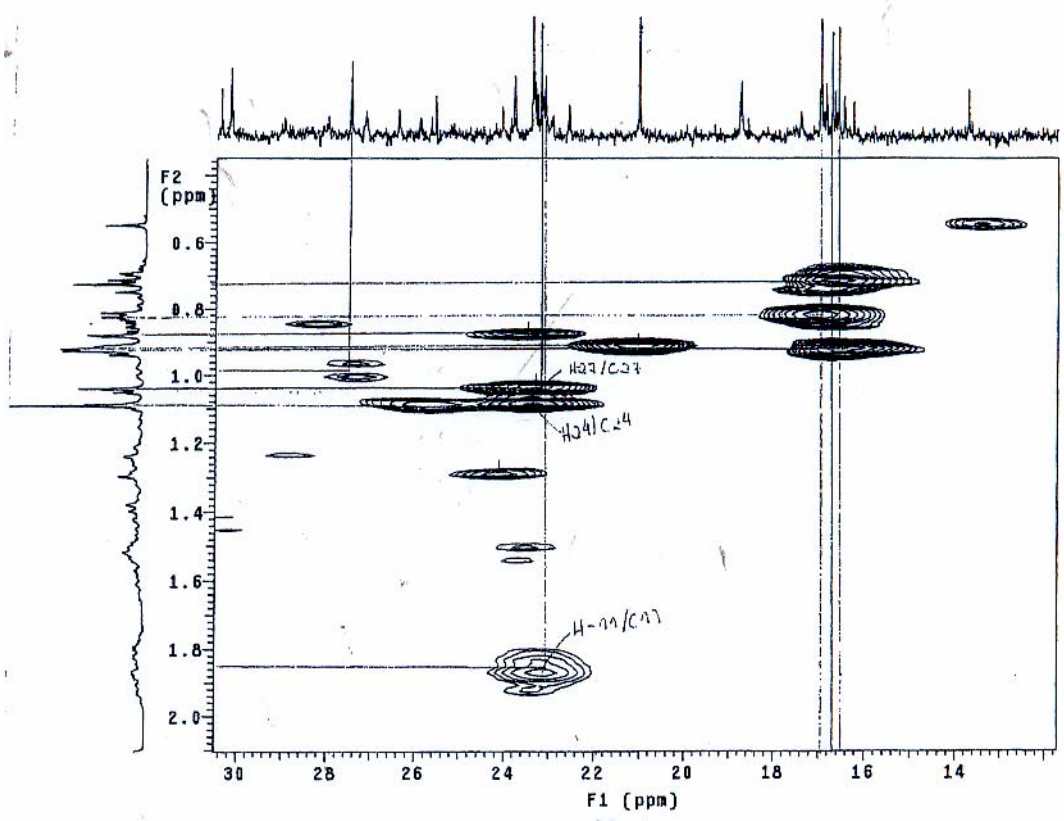
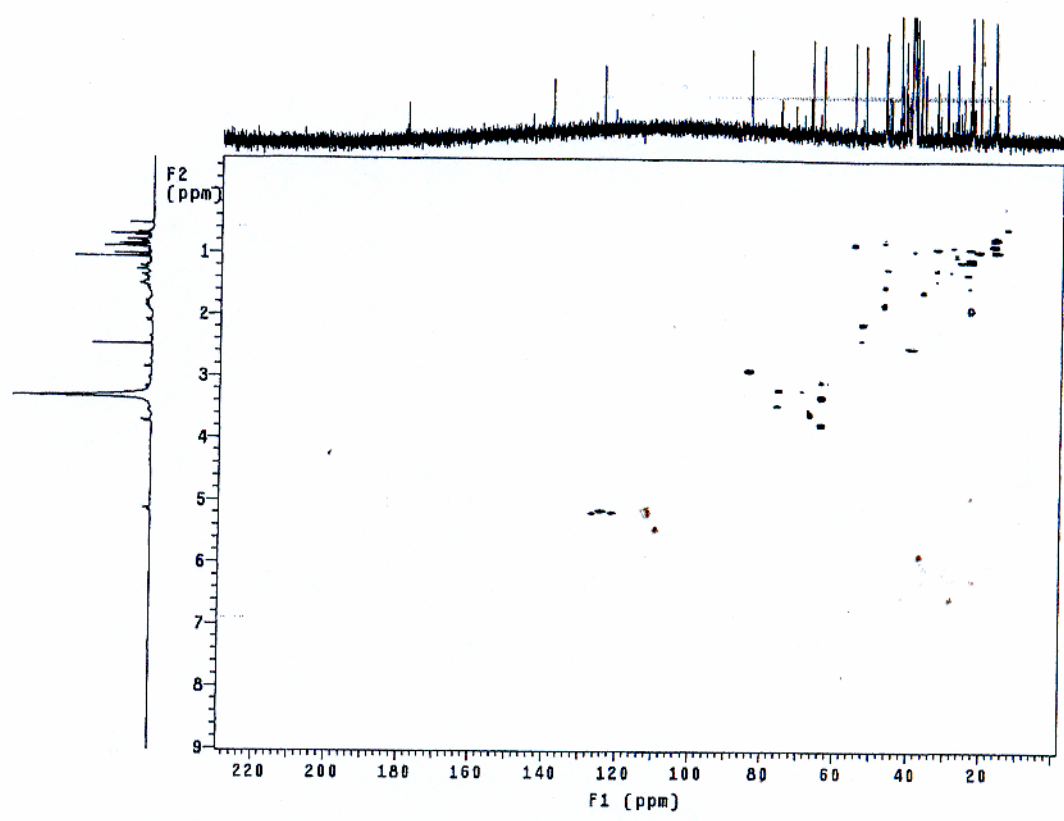


**Espectro 108:** Experimento DEPT 135° de MeT7 (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

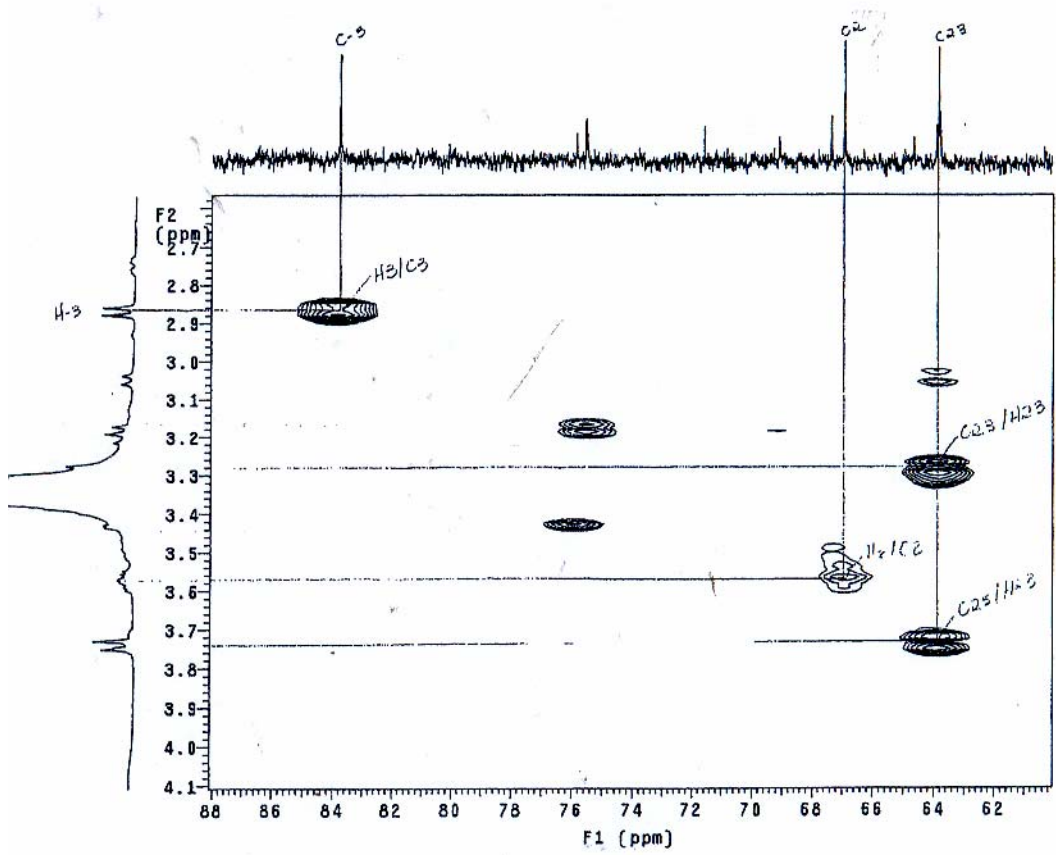
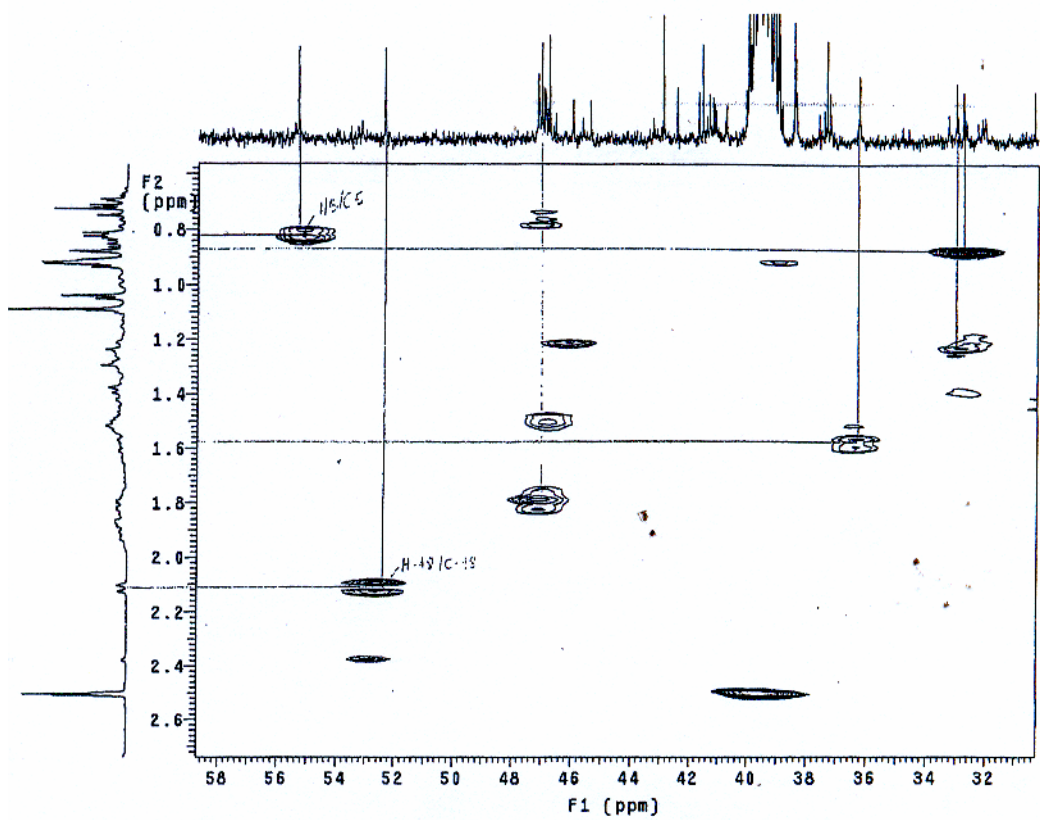


**Espectro 109:** Experimento DEPT 90° de MeT7 (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

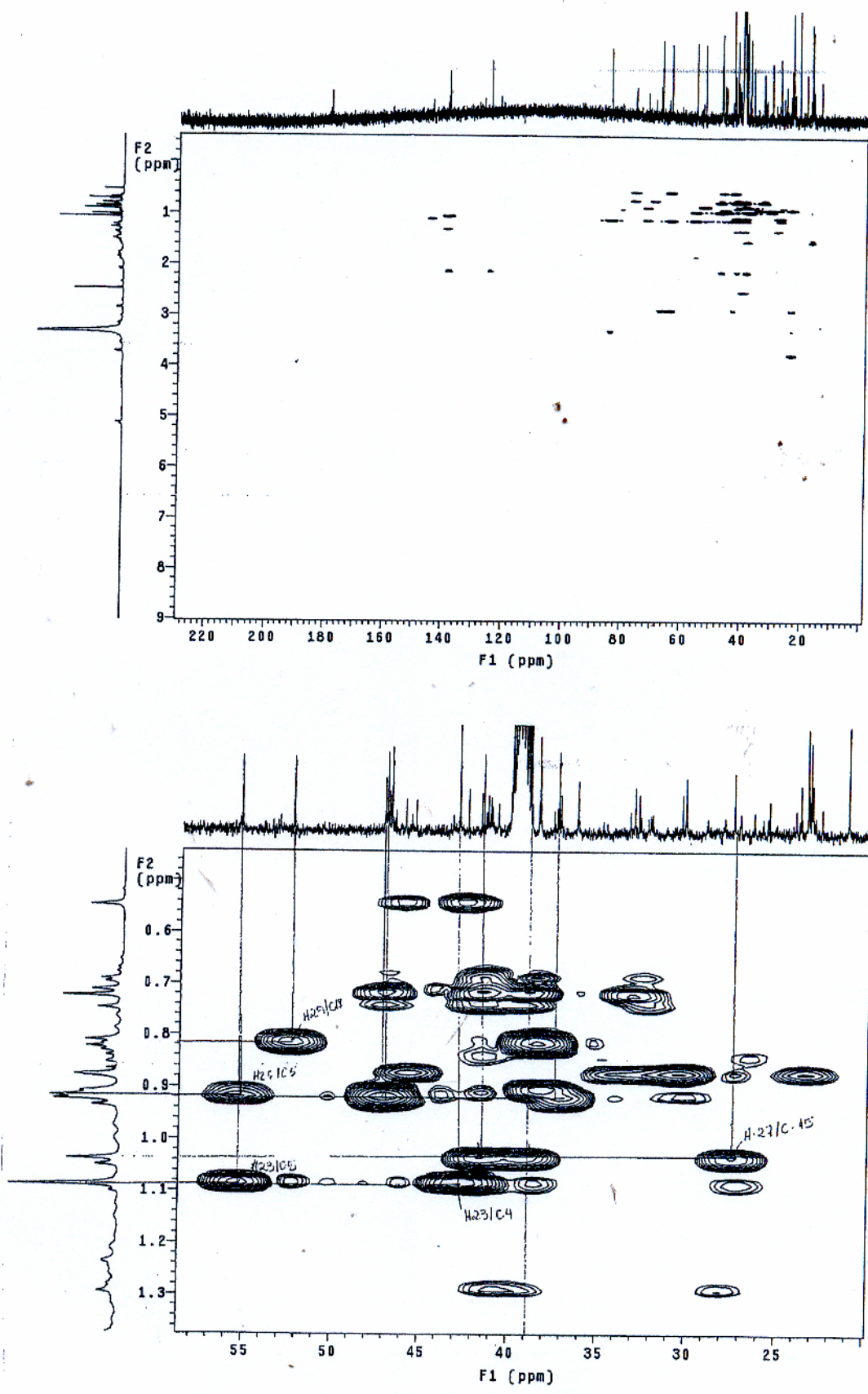




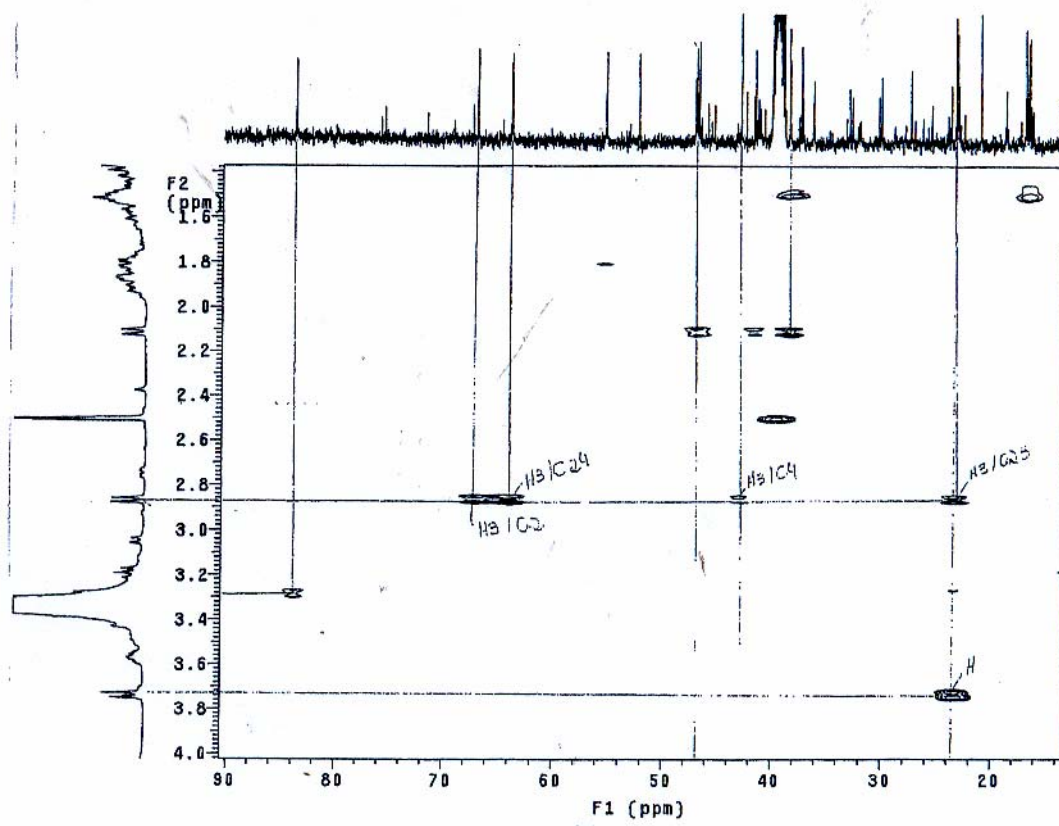
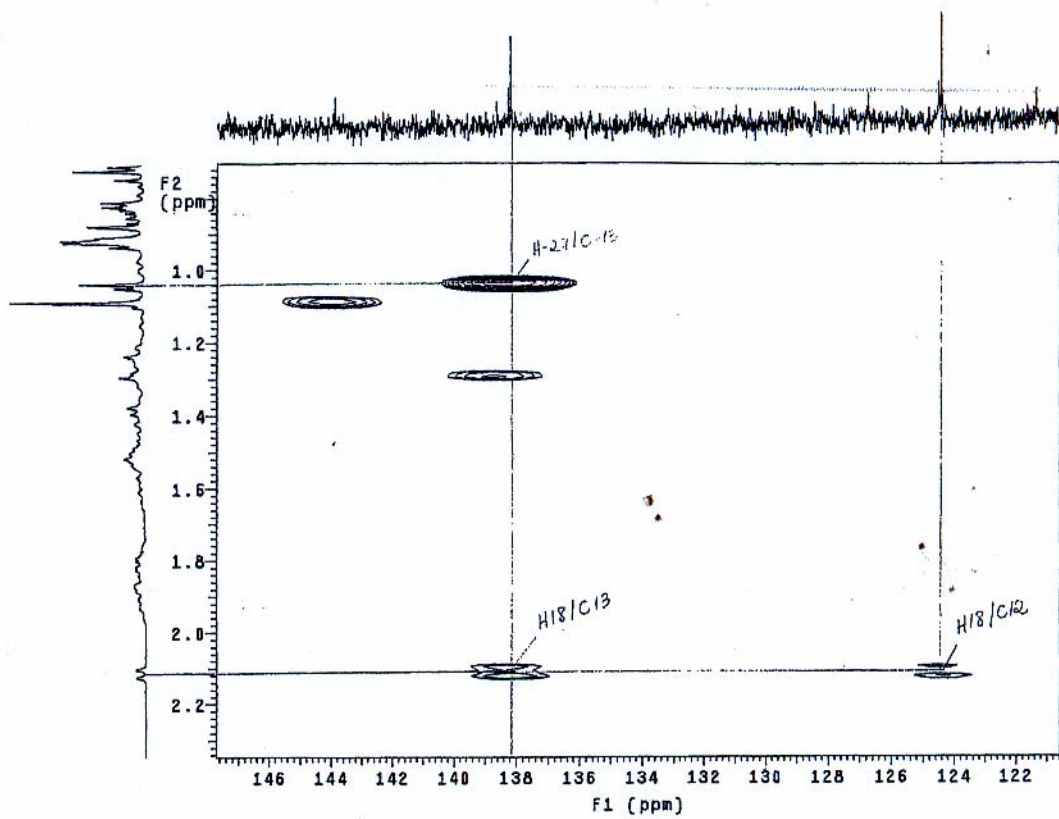
Espectro 110: Experimento gHMQC de MeT7 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



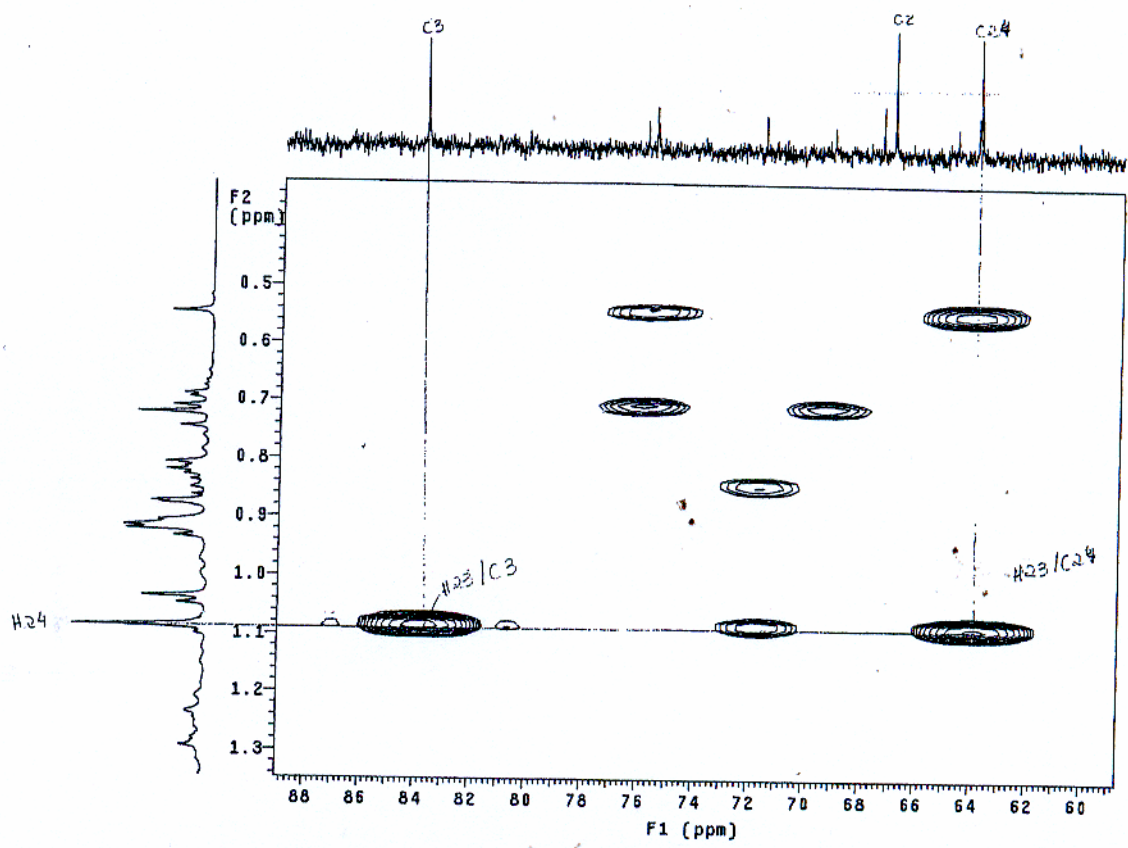
**Espectro 111:** Experimento gHMQC de MeT7 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



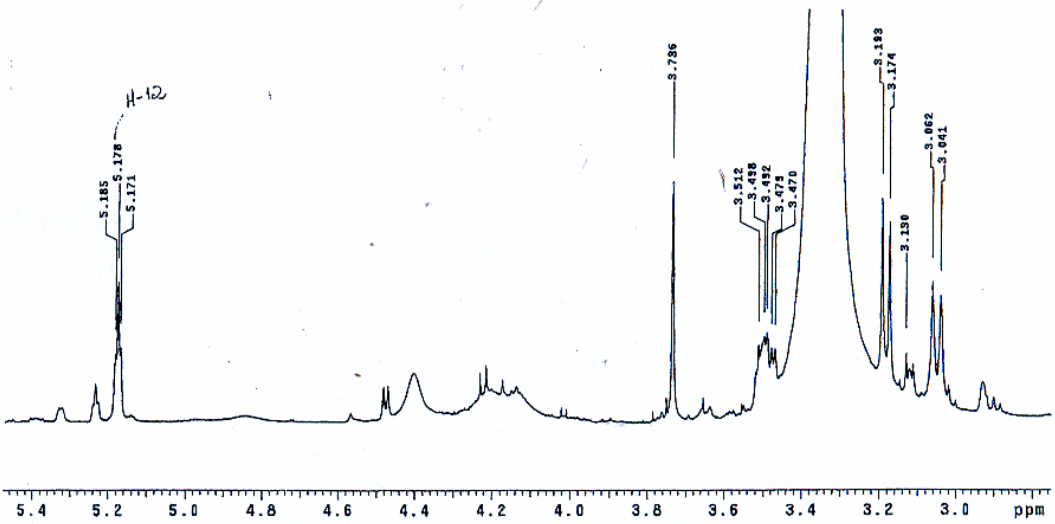
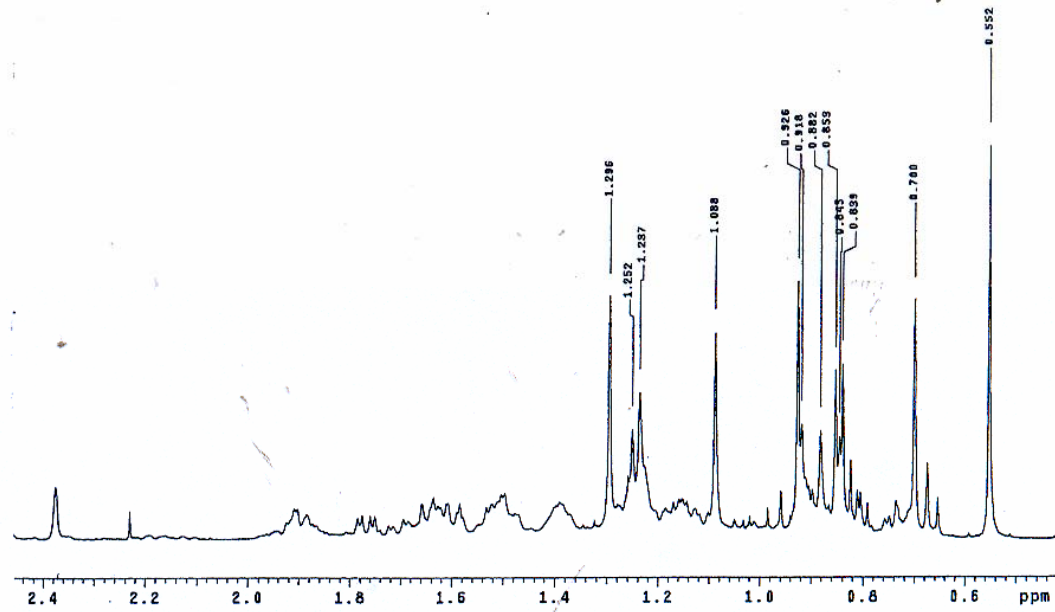
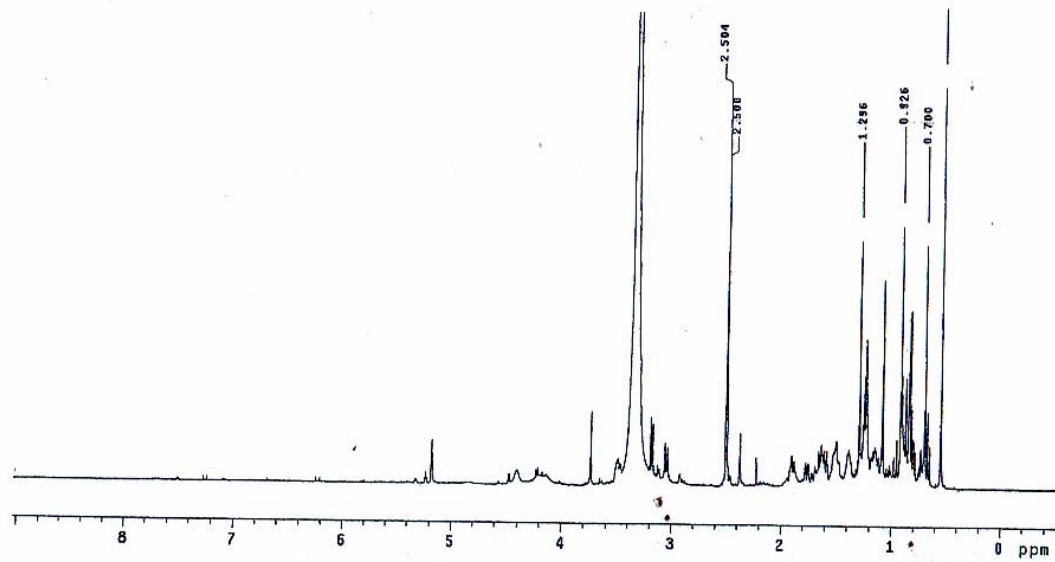
**Espectro 112:** Experimento gHMBC de Me7 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



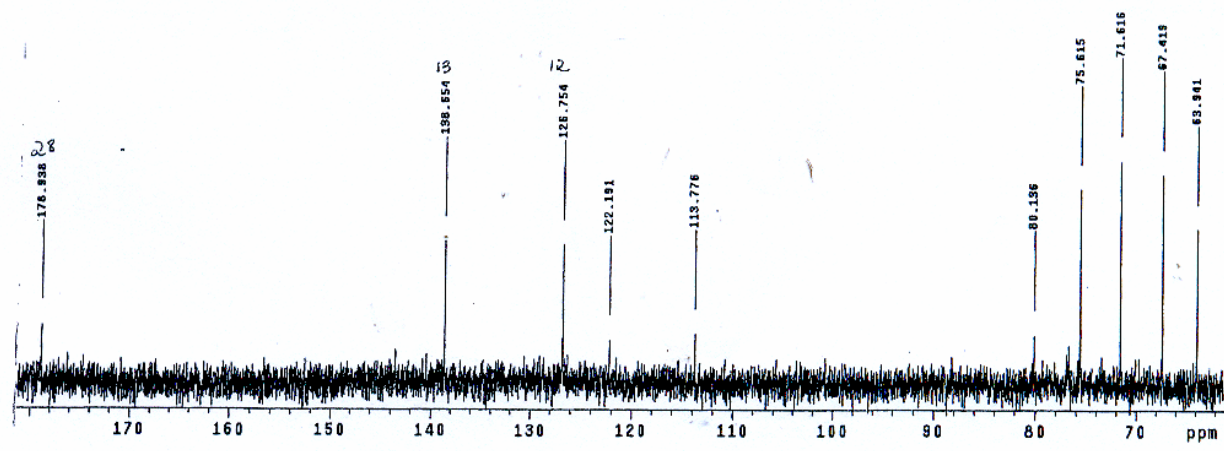
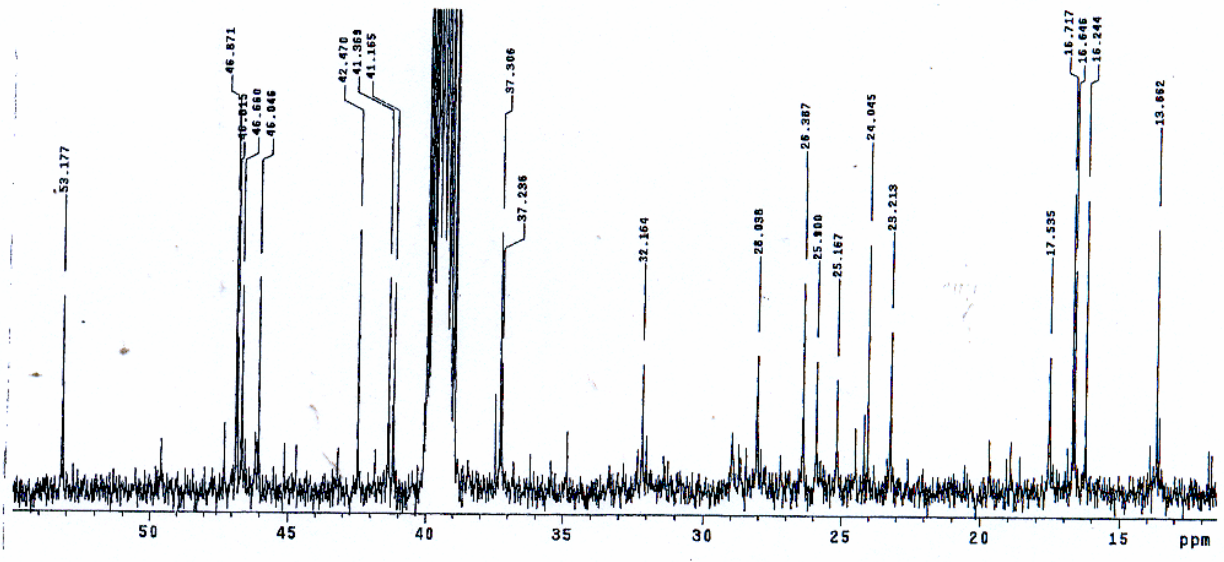
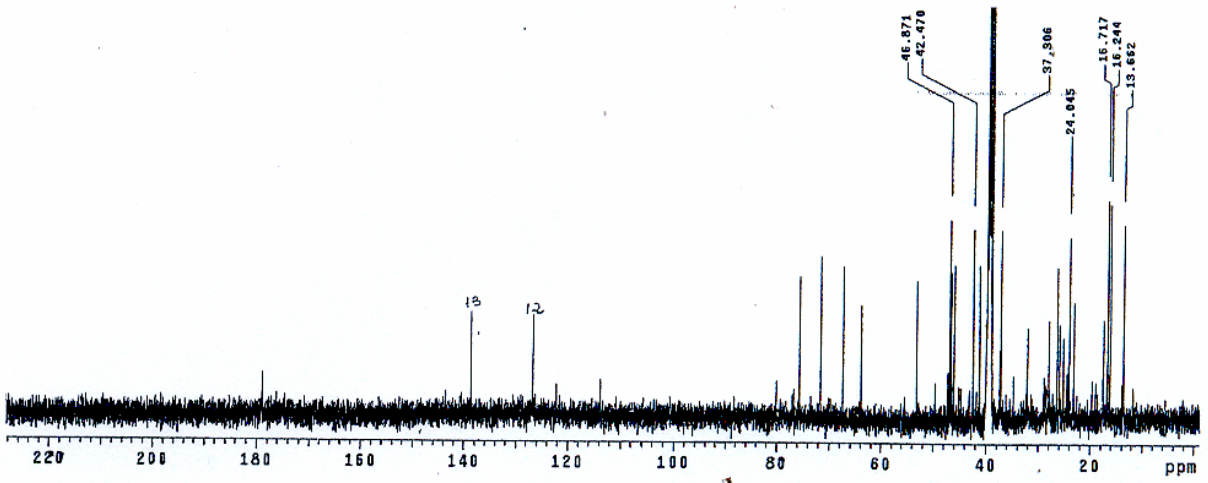
Espectro 113: Experimento gHMBC de MeT7 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



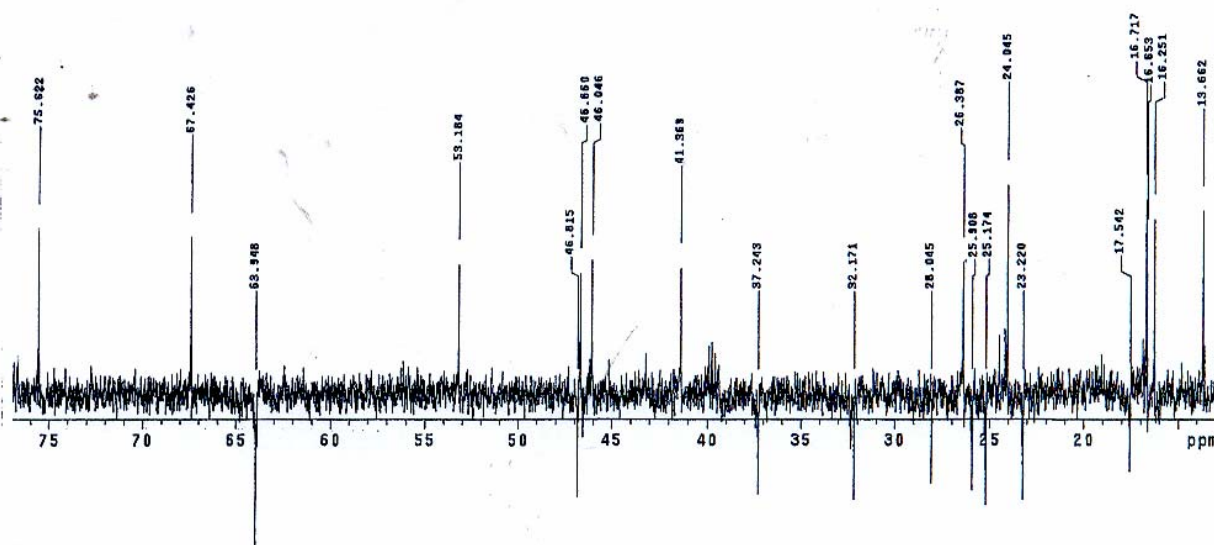
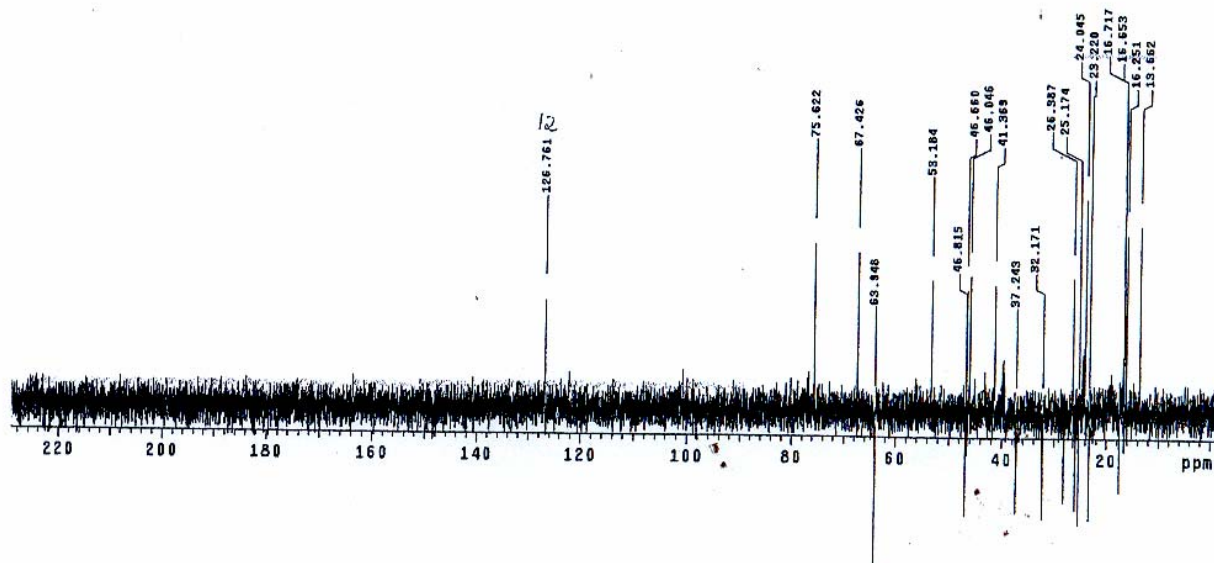
**Espectro 114:** Experimento gHMBC de MeT7 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).



**Espectro 115:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de MeT8 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

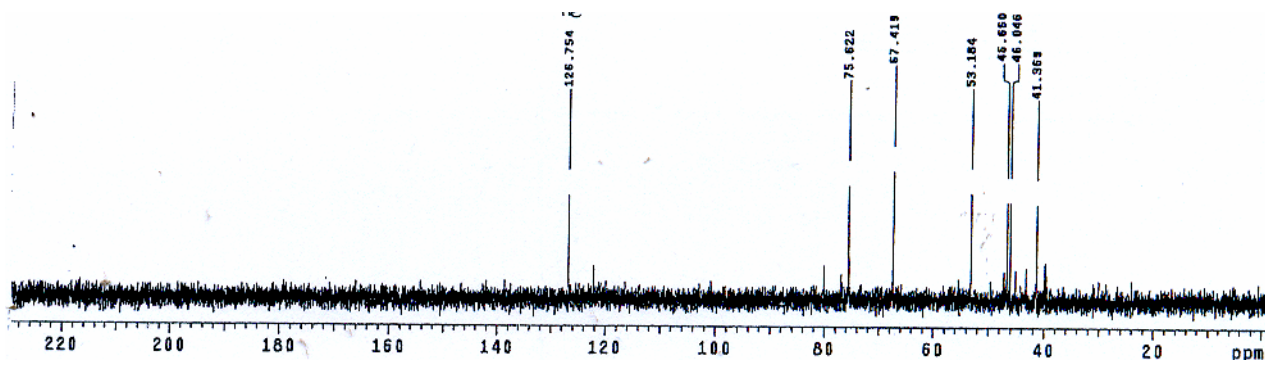


Espectro 116: Espectro de RMN <sup>13</sup>C de MeT8 (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

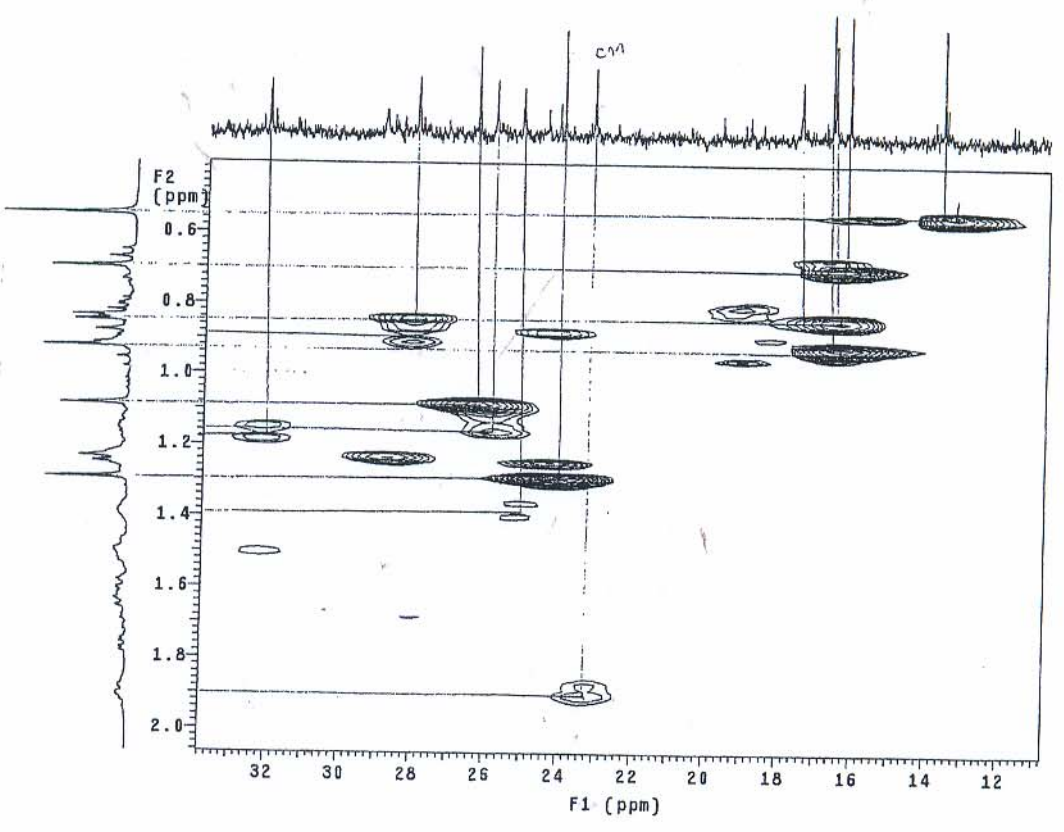
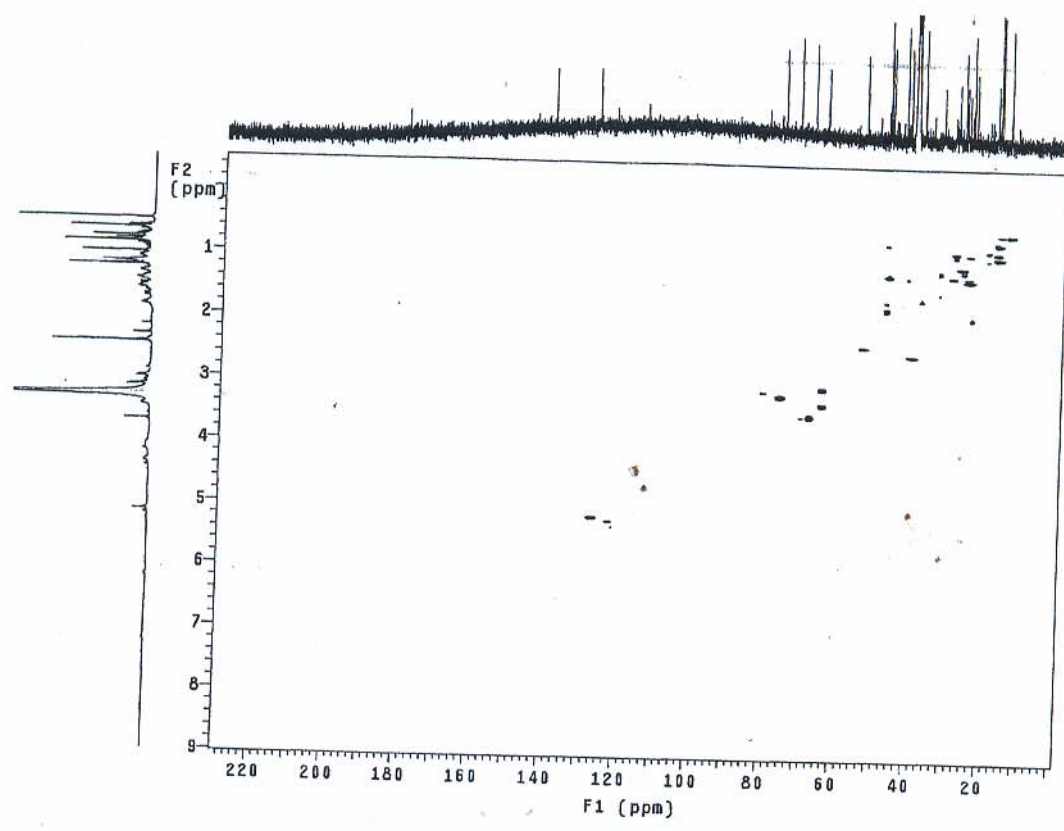


**Espectro 117:** Experimento DEPT 135° de **MeT8** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).

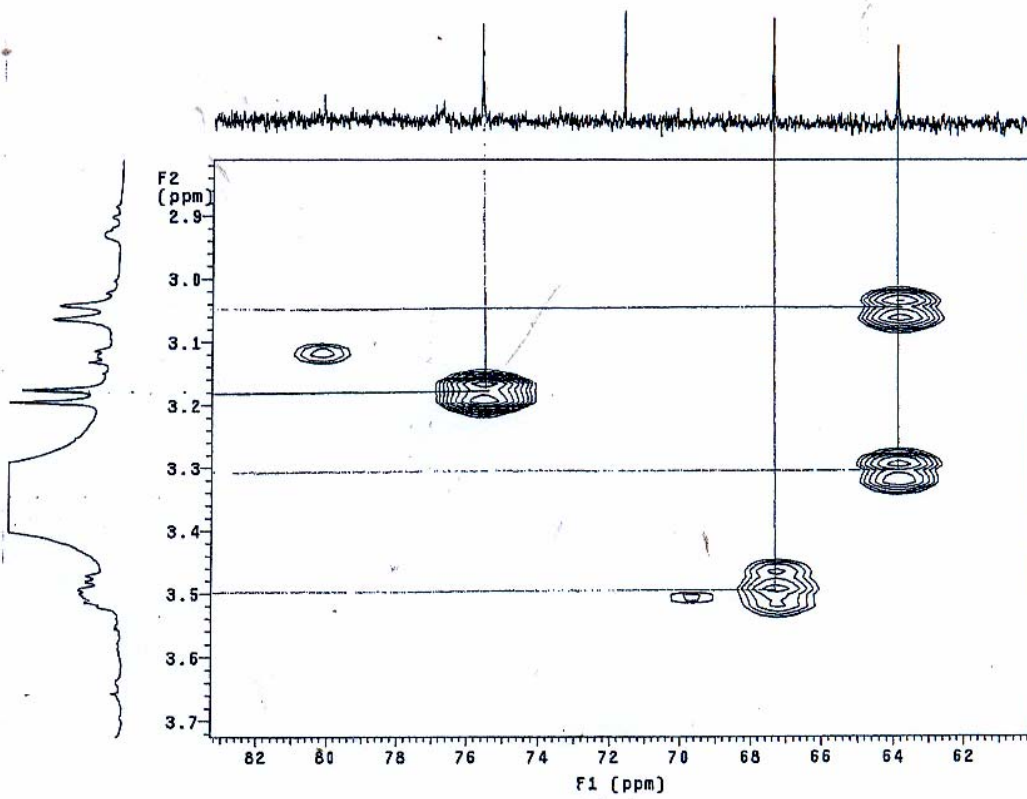
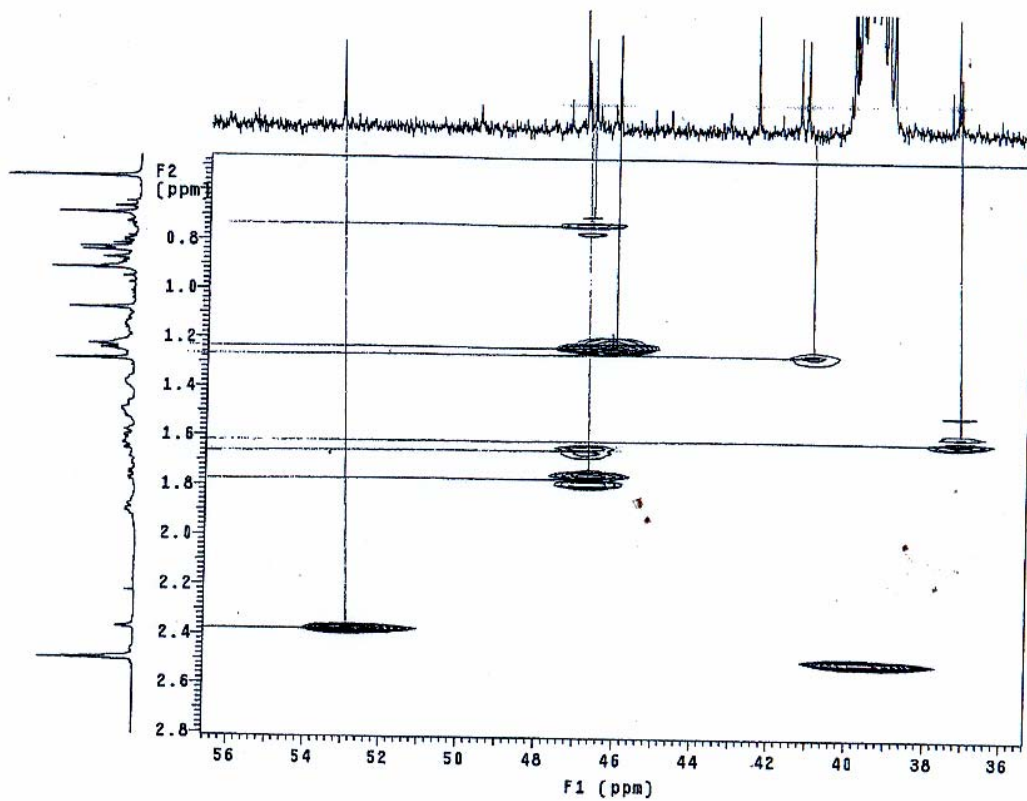




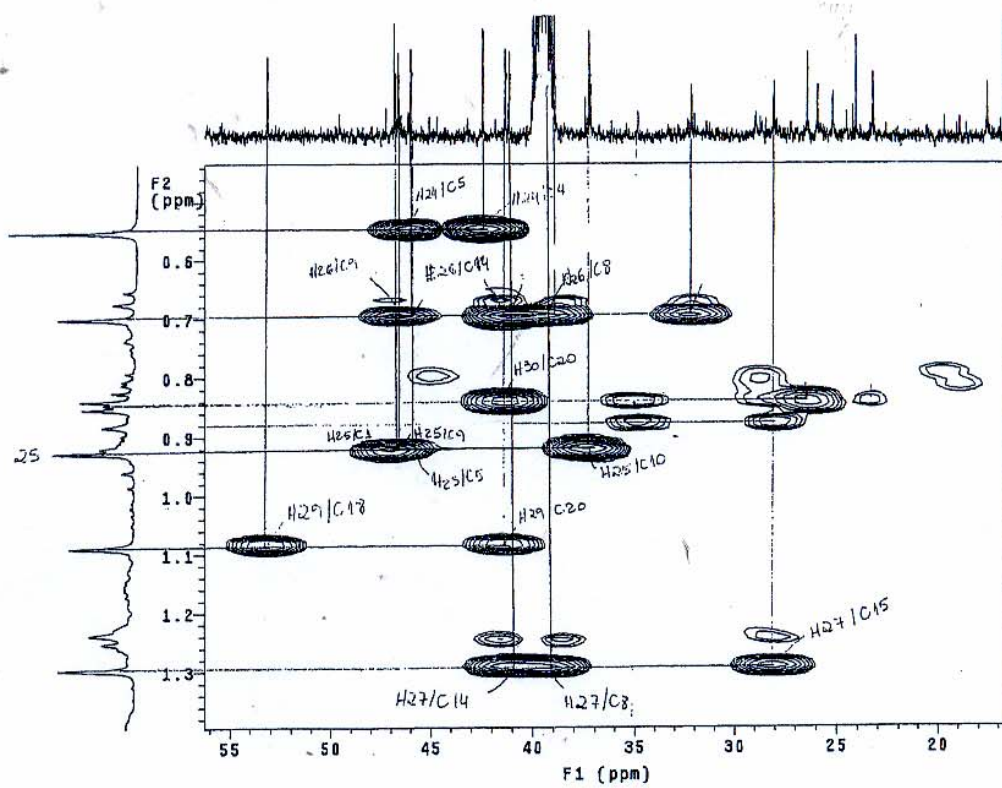
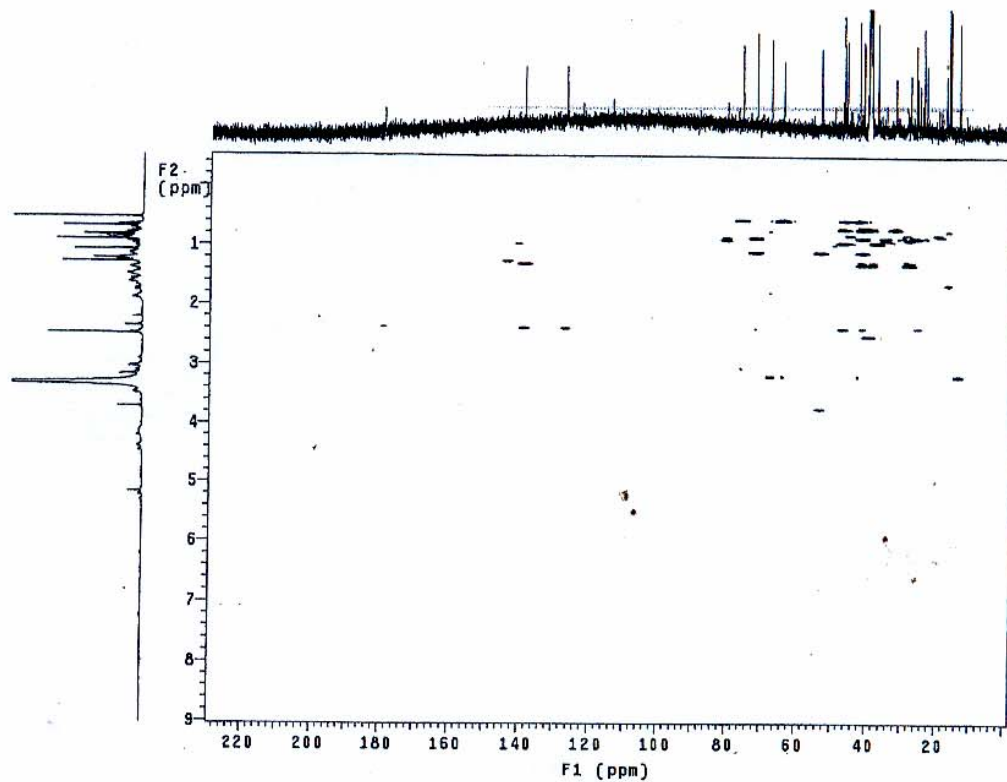
**Espectro 118:** Experimento DEPT 90° de **MeT8** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



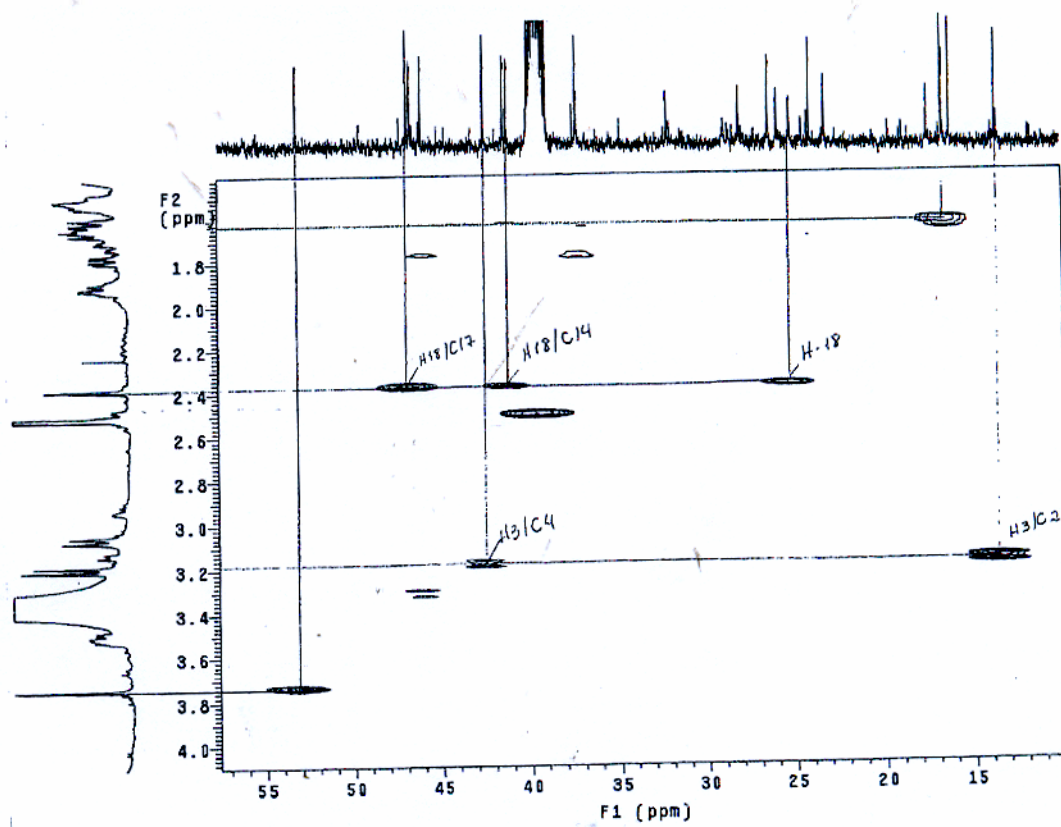
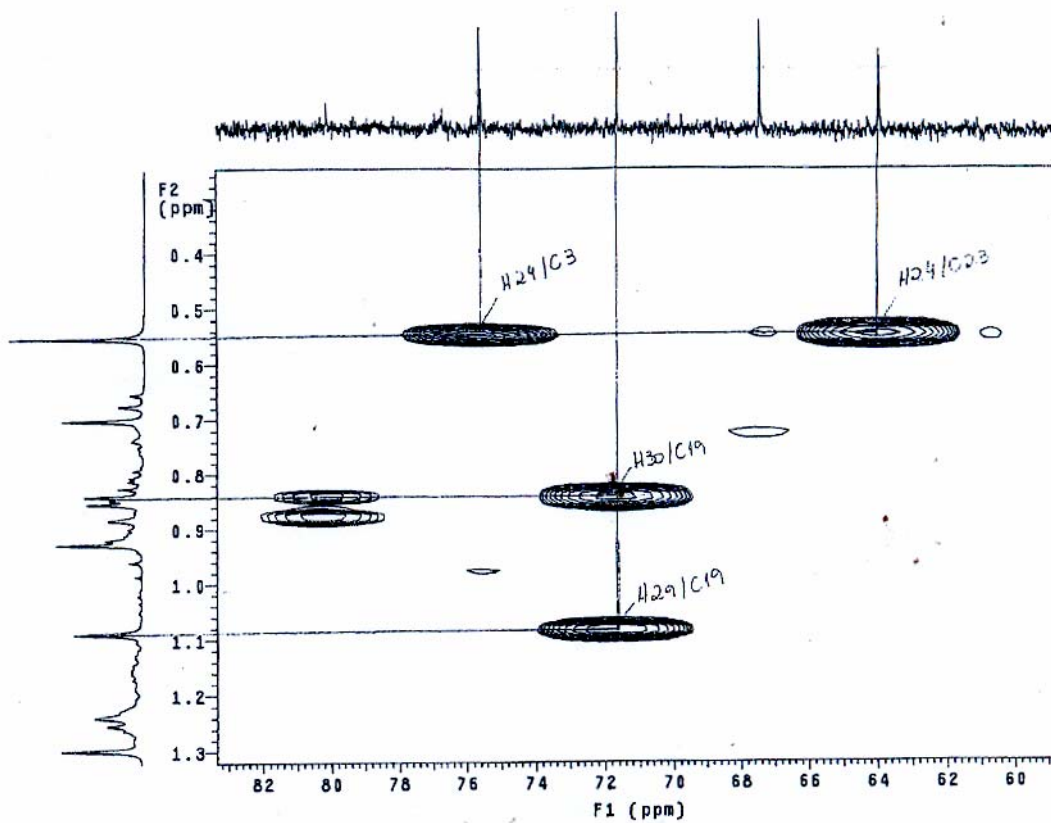
**Espectro 119:** Experimento gHMQC de MeT8 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



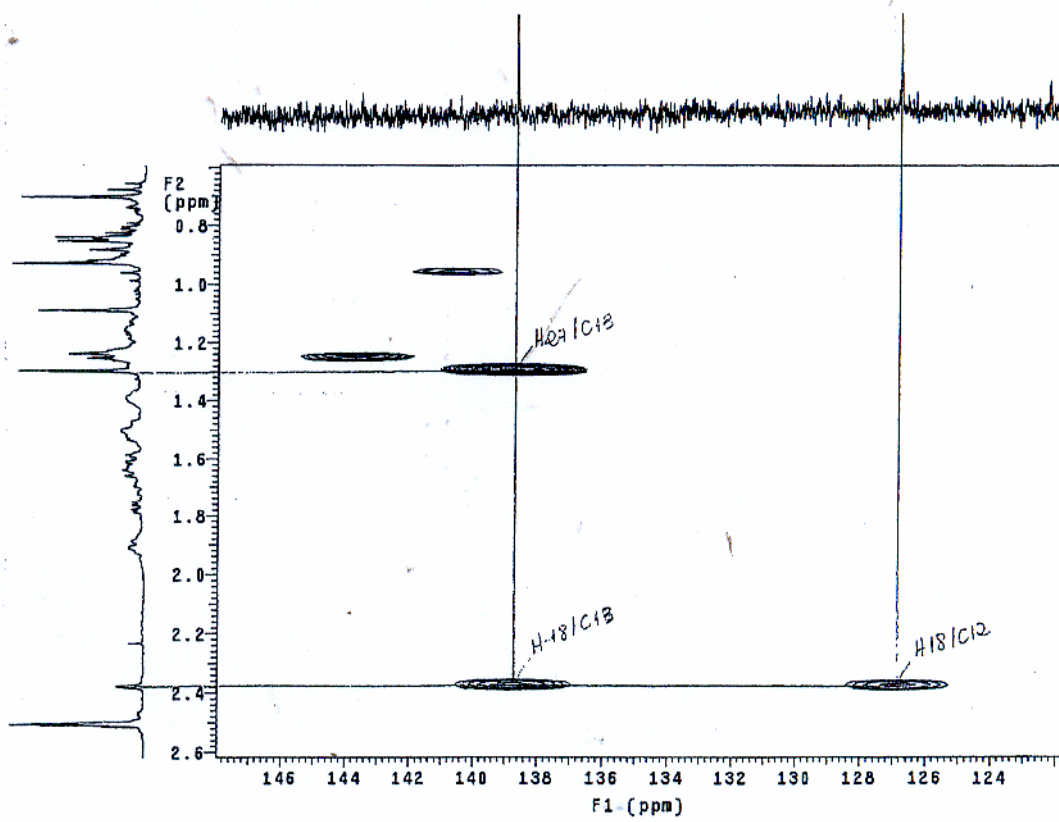
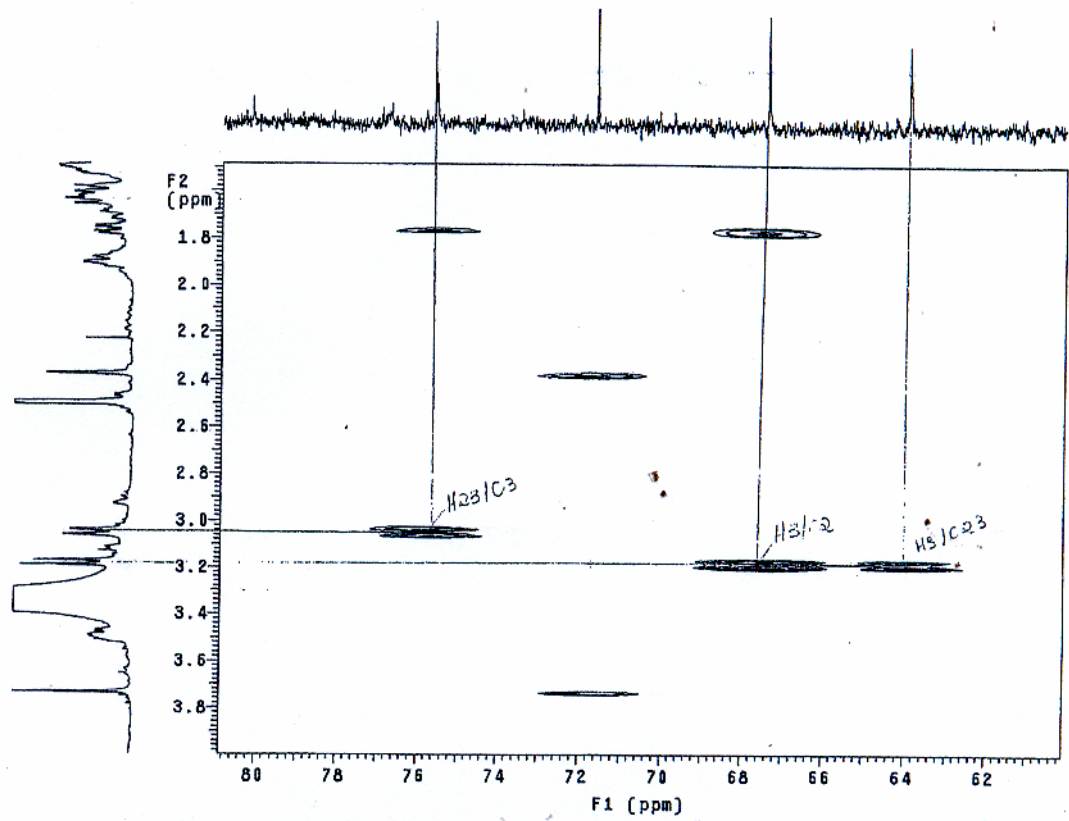
Espectro 120: Experimento gHMBC de MeT8 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



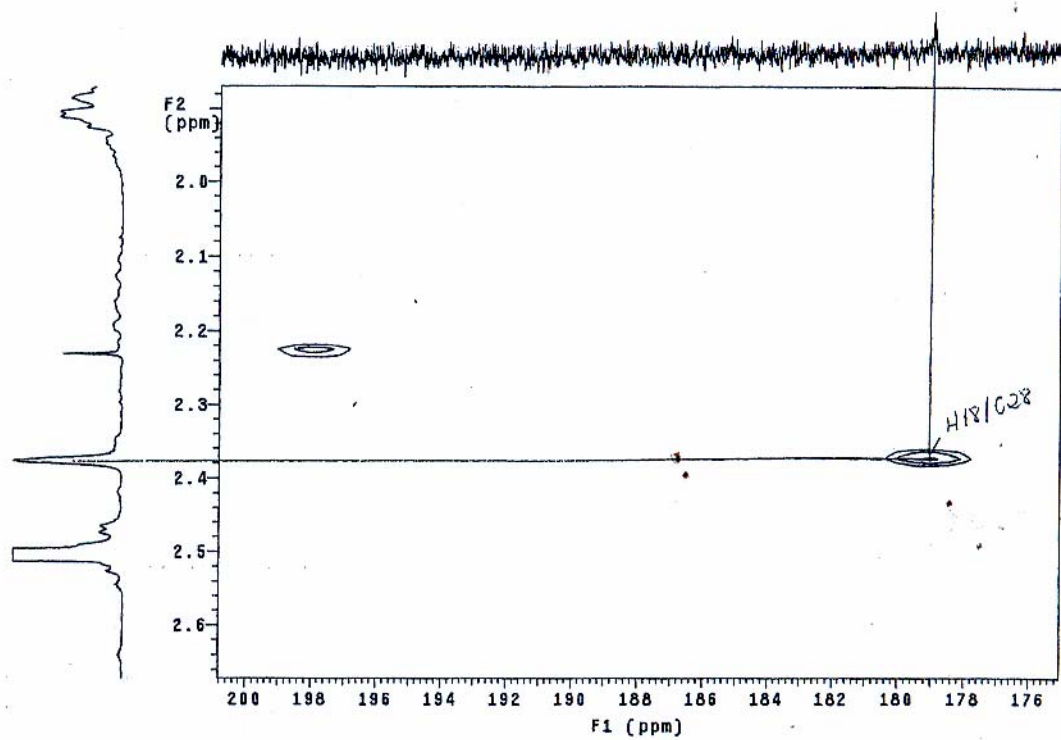
**Espectro 121:** Experimento gHMBC de MeT8 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



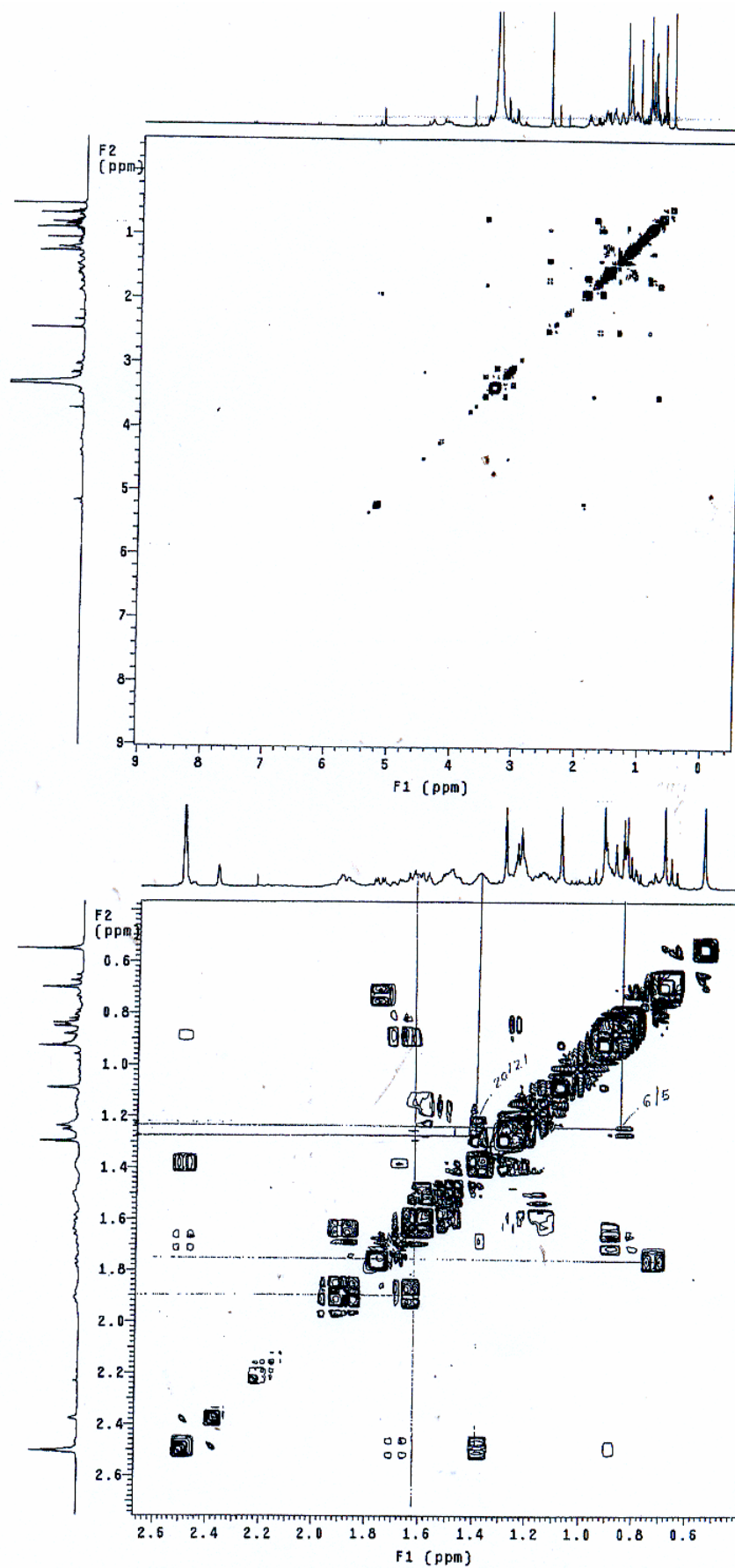
Espectro 122: Experimento gHMBC de MeT8 (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS).



Espectro 123: Experimento gHMBC de MeT8 (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , TMS).

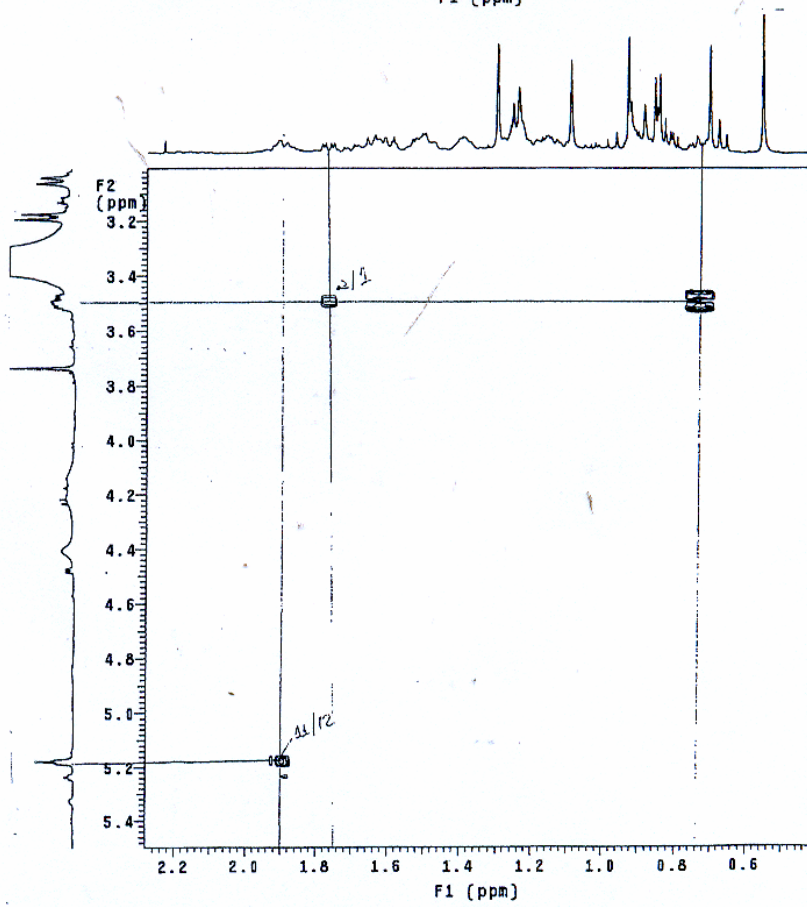
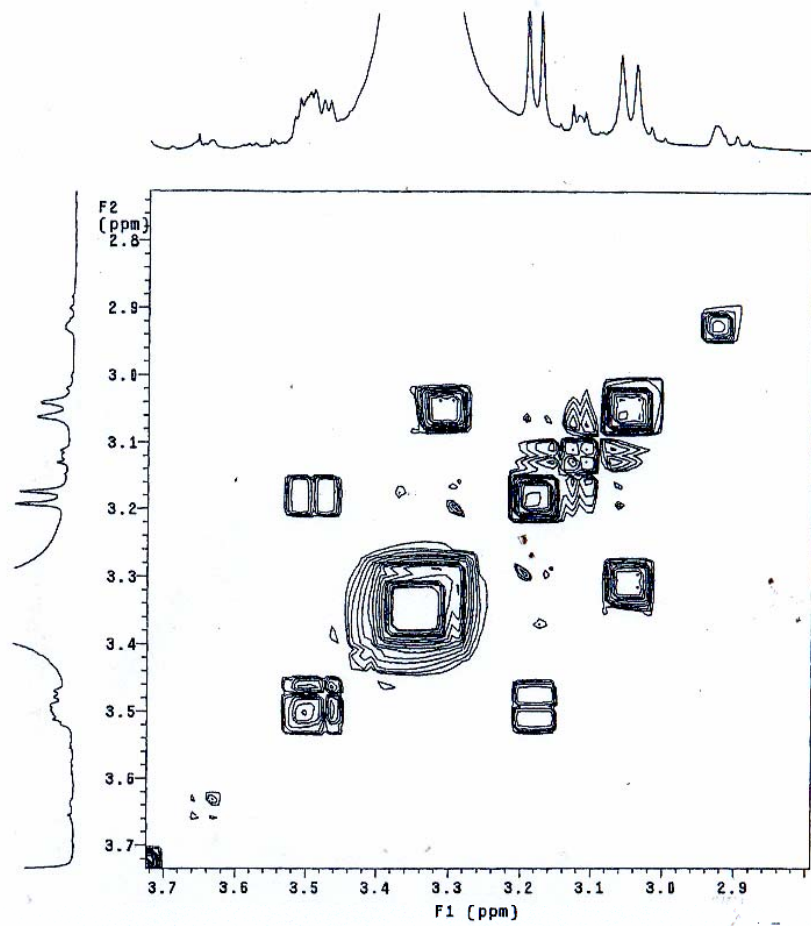


**Espectro 124:** Experimento gHMBC de MeT8 (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , TMS).



**Espectro 125:** Experimento gCOSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  de MeT8 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).





Espectro 126: Experimento gCOSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  de MeT8 (500 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS).