

JULIANA RODRIGUES

Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: Metodologia para estabelecimento de perfis quali e quantitativos para extratos vegetais

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

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Araraquara
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

R696u	Rodrigues, Juliana Uso sustentável da biodiversidade brasileira : prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: metodologia para estabelecimento de perfis quali e quantitativos para extratos vegetais / Juliana Rodrigues. – Araraquara : [s.n], 2011 140 f. : il. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Wagner Vilegas Coorientador: Lourdes Campaner dos Santos 1. Produtos naturais. 2. Fitoquímica. 3. Flavonoides. 3. Estereoquímica. 4. Dicroísmo circular. I. Título.
-------	---

JULIANA RODRIGUES

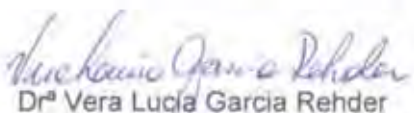
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 23 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA


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


Prof. Dr. Isabele Rodrigues Nascimento
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Dr.ª Vera Lucia Garcia Rehder
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas e Biológicas – UNICAMP, Paulínia


Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Centro de Ciências da Saúde – UEM, Maringá


Prof. Dr. José Arimateia Dantas Lopes
Centro de Ciências da Natureza - UFPI, Teresina

DADOS CURRICULARES

JULIANA RODRIGUES

DADOS PESSOAIS

- Nascimento: 05/11/1981
- Nacionalidade: Brasileira
- Naturalidade: Araraquara/SP
- Filiação: Manoel Gilmar Rodrigues
Sonia Aparecida Doswaldo Rodrigues
- Profissão: Química
- E-mail: juliroduq@bol.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Química – Licenciatura Plena

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Concluído em 15/01/2005.

- Mestrado em Química

Área de Concentração: Química Orgânica

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Concluído em 19/01/2007

- Doutorado em Química

Área de Concentração: Química Orgânica

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Concluído em 23/02/2011

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

- RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; CALVO, T. R.; TAMASHIRO, J.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Perfil químico do extrato metanólico das folhas de espécies de *Miconia* (Melastomataceae). In: V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 4 a 7 de outubro, Recife-PE, 2005.
- RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; CALVO, T. R.; TAMASHIRO, J.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Perfil químico do extrato metanólico das folhas de espécies de *Miconia* (Melastomataceae). In: V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp 2005, 15 a 20 de novembro, Águas de Lindóia-SP, 2005.
- RODRIGUES, J.; SANTOS, L. C.; TAMASHIRO, J.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Constituintes químicos isolados das folhas de *Miconia cabucu* Hoehne (Melastomataceae). In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 19 a 22 de maio, Águas de Lindóia-SP, 2006.
- RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; TAMASHIRO, J.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Simultaneous identification of glycosides flavonoids and gallic acid in leaves of *Miconia cabucu* by solid-phase extraction and HPLC-UV-DAD. In: XV Congresso Italo Latino Americano de Etnomedicina, 23 a 26 de setembro, Perugia, Itália, 2006.

- SILVA, M. A.; RODRIGUES, J.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Metabólitos secundários isolados das folhas de *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae) por HSCCC (High Speed Counter-current Chromatography). In: SIMCRO – Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 18 a 20 de outubro, São Pedro-SP, 2006.
- SILVA, M. A.; RODRIGUES, J.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Flavonóides isolados dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum* (Eriocaulaceae) por HSCCC (High Speed Counter-current Chromatography). In: SIMCRO – Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 18 a 20 de outubro, São Pedro-SP, 2006.
- RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Biflavonóide isolado das folhas de *Miconia cabucu* Hoehne (Melastomataceae). In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 26 a 29 de maio, Águas de Lindóia-SP, 2008.
- RINALDO, D.; BEGO, A. M.; RODRIGUES, J.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Metodologias para análises de diastereoisômeros da catequina e enantiômeros da naringenina por CLAE-DAD-DC. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 26 a 29 de maio, Águas de Lindóia-SP, 2008.
- RODRIGUES, J.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Metabólitos secundários encontrados nas espécies *Miconia cabucu* e *Miconia rubiginosa*. In: VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, 8 a 12 de julho, Araraquara-SP, 2008.
- RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; SANNOMIYA, M.; CARBONE, V.; MARI, A.; NAPOLITANO, A.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Identificação de metabólitos secundários opticamente ativos por HPLC-CD-DAD. In: COLACRO XII – Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, 28 a 30 de outubro, Florianópolis-SC, 2008.
- PACÍFICO, M.; RODRIGUES, J.; SILVA, V. C. S.; RODRIGUES, C. M.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Caracterização da constituição química por HPLC-DAD e avaliação da atividade antioxidante de *Syngonanthus nitens* (Eriocaulaceae). In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 30 de maio a 02 de junho, Fortaleza-CE, 2009.

TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

- SANTOS, L. C.; SILVA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Fast preparative separation of flavones from capitula of *Eriocaulon ligulatum* (Vell.) L.B.Smith (Eriocaulaceae) by High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC). **Rev. Bras. Cienc. Farm. Bas. Apl.**, v. 26, p. 101-103, 2005.
- RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Flavonoids from *Miconia cabucu* (Melastomataceae). **Phytochemistry**, v. 68, n. 13, p. 1781-1784, 2007.
- RINALDO, D.; RODRIGUES, C. M.; RODRIGUES, J.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A. New flavone from the leaves of *Neea theifera* (Nyctaginaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 6, p. 1132-1135, 2007.
- RODRIGUES, J.; MICHELIN, D. C.; RINALDO, D.; ZOCCOLO, G. J.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Miconia* species (Melastomataceae). **J. Med. Food**, v. 11, n. 1, p. 120-126, 2008.
- SERPELONI, J. M.; REIS, M. B.; RODRIGUES, J.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.; DOKKEDAL, A. L.; CÓLUS, I. M. S. In vivo assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test. **Mutagenesis**, v. 23, n. 6, p. 501-507, 2008.
- RINALDO, D.; BATISTA JUNIOR, J. M.; RODRIGUES, J.; BENFATTI, A. C.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; FURLAN, M.; VILEGAS, W. Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD. **Chirality**, v. 22, n. 8, p. 726-733, 2010.

TRABALHOS CIENTÍFICOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

- RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; SILVA, M. A.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Secondary metabolites of *Miconia rubiginosa*. **J. Med. Food**, *in press*.

ATIVIDADES EXTRACURRICULARES

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

Estágio Docência na disciplina Química Orgânica Experimental, 2006.

Estágio Docência na disciplina Química Orgânica II, 2008.

Bolsista Didático das disciplinas “Química Orgânica Experimental” e “Química Orgânica I”, ministradas para os cursos de Bacharelado em Química e Farmácia-Bioquímica, respectivamente, 2010.

Dedico este trabalho à minha família, minha mãe Sonia, meu irmão Lucas, minha cunhada Eloá e minha sobrinha linda, Maria Eduarda

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida.

Aos meus pais e toda minha família pelo apoio e compreensão, por me propiciar a oportunidade de chegar até aqui.

Ao Instituto de Química e seus professores pela formação.

Ao meu orientador Wagner Vilegas pela dedicação, paciência e atenção como orientador e amigo. E pelo exemplo de profissional e pessoa, que sempre nos esforçamos em seguir.

À minha co-orientadora Lourdes Campaner dos Santos pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Aos companheiros e amigos de laboratório, que foram muitos desde o começo do Doutorado.

Não colocarei nomes para não cometer nenhuma injustiça, mas sintam-se todos abraçados.

Aos meus companheiros e irmãos Daniel Rinaldo, Ju Severi, Marcelo Silva, Adriana Moura, Mariana Pacífico, Fabiano Amaral e Ana Carolina Benfatti, que estavam sempre ali, dentro e fora do laboratório.

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

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

Às funcionárias da Biblioteca pela grande ajuda dispensada.

Às funcionárias da Seção de pós-graduação pela atenção.

Ao Nivaldo e Jorge pelos espectros e paciência.

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

À Capes pela bolsa concedida.

Ao programa Biota/Fapesp e ao CNPq pelo suporte financeiro.

“Aquilo que é impenetrável para nós existe de fato. Por trás dos segredos da natureza há algo sutil, intangível e inexplicável. A veneração à essa força, que está além de tudo o que podemos compreender, é a minha religião.”
Albert Einstein

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ara(f)	Arabinofuranose
ara(p)	Arabinopirranose
α	Fator de separação
CCC	Cromatografia em Contracorrente
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CD	<i>Circular Dichroism</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
cum	Cumaroil
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
d.i.	Diâmetro interno
dt	Duplo tripleto
DMSO- d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Efeito Cotton
FEQ	Fase Estacionária Quiral
Fr.	Fração
gal	Galactose
glc	Glicose
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlations</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantun Coherence</i>
HPLC-CD-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography with Circular Dichroism and Diode Array Detectors</i>
HPLC-UV-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector</i>
HSCCC	<i>High Speed Counter-Current Chromatography</i>
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
k	Fator de retenção
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
m	Multipleto
MC	<i>Miconia cabucu</i>
MPLC	<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i>
MR / Mr	<i>Miconia rubiginosa</i>

MS	<i>Mass Spectrometry</i>
Ms	<i>Miconia stenostachya</i>
rha	Rhamnose
Rf	Fator de Retenção
RMN- ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN- ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
r ²	Coefficiente de correlação
R _s	Resolução cromatográfica
s	Singleto
sl	Singleto largo
SPE	<i>Solid-phase Extraction</i>
t	Tripleto
tt	Triplo tripleto
t ₀	Tempo morto
t _R	Tempo de retenção
TFA	Ácido trifluoroacético
TOCSY	<i>Totally Correlated Spectroscopy</i>
UV	Ultravioleta
V ₀	Volume morto
xyl	Xylose
δ	Deslocamento químico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades biológicas de espécies da família Melastomataceae.	35
Tabela 2. Metabólitos isolados de espécies da família Melastomataceae.	36
Tabela 3. Massas obtidas das partições dos infusos das espécies de <i>Miconia</i>	47
Tabela 4. Métodos em gradiente desenvolvidos para a separação dos metabólitos encontrados nos infusos das folhas das espécies de <i>Miconia</i>	50
Tabela 5. Identificação dos picos dos cromatogramas por coinjeção com padrões isolados.	51
Tabela 6. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H de Mr1 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	55
Tabela 7. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C de Mr2 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	58
Tabela 8. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H de Mr3 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	60
Tabela 9. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C de Mr4 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	62
Tabela 10. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância Ms1 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	66
Tabela 11. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância Ms2 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	68
Tabela 12. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância Ms3 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	70
Tabela 13. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H de Ms4 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	71
Tabela 14. Propriedades biológicas de enantiômeros.....	102
Tabela 15. Valores de t_R e α para os principais picos do cromatograma do padrão de ($\pm$)-naringenina.	110
Tabela 16. Valores de t_R e α para os principais picos do cromatograma dos padrões de ($\pm$)-catequina e ($\pm$)-epicatequina.	112
Tabela 17. Dados das curvas analíticas dos padrões de (+)-catequina e (-)-epicatequina.	116

Tabela 18. Métodos utilizados para *clean-up* do infuso de *Byrsonima crassa*.118

Tabela 19. Recuperação da (+)-catequina e (-)-epicatequina nos cartuchos de C₁₈ testados.119

Tabela 20. Dados quantitativos e de recuperação do infuso de *M. rubiginosa*.121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica do Cerrado.	27
Figura 2. Substâncias isoladas das espécies de <i>Miconia</i> (RODRIGUES et al., 2007)...	40
Figura 3. Substâncias isoladas das espécies de <i>Miconia</i> neste trabalho.....	41
Figura 4. Classificação estrutural dos flavonóides.	43
Figura 5. Classificação dos taninos.	44
Figura 6. Exemplos de lignanas e neolignanas.....	45
Figura 7. Gradiente inicial de <i>M. rubiginosa</i> (a), <i>M. stenostachya</i> (b) e <i>M. cabucu</i> (c). [Coluna Phenomenex luna C ₁₈ ; 5-100 % de B em 60 min; Solvente A: H ₂ O + 0,05% TFA e Solvente B: ACN + 0,05% TFA); DAD (254 nm); vazão 1,0 mL.min ⁻¹]......	49
Figura 8. Perfil cromatográfico de <i>M. cabucu</i> (a), <i>M. rubiginosa</i> (b) e <i>M. stenostachya</i> (c). [Coluna Phenomenex luna C ₁₈ ; Solvente A: H ₂ O + 0,05% TFA e Solvente B: ACN + 0,05% TFA; vazão 1,0 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 20 µL]......	50
Figura 9. Cromatograma e espectro de CD de Mr1 em Hex/EtOH (75:25, v/v) [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 µL; λ 280 nm].	56
Figura 10. Estrutura da (-)-(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-epicatequina (Mr1) isolada de <i>M. rubiginosa</i>	56
Figura 11. Espectro de CD de Mr2 em MeOH/H ₂ O (4:6, v/v) [Coluna Chiralcel OD-RH; Solvente A: H ₂ O + 0,05% Ác. fórmico e Solvente B: MeOH + 0,05% Ác. fórmico; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 µL; λ 235 nm]......	59
Figura 12. Casuarictina (Mr2) isolada de <i>M. rubiginosa</i>	59
Figura 13. Canferol-3- <i>O</i> -β-galactopiranosídeo (Mr3) isolado de <i>M. rubiginosa</i>	60
Figura 14. Espectro de CD de Mr4 em MeOH/H ₂ O (4:6, v/v) [Coluna Chiralcel OD-RH; Solvente A: H ₂ O + 0,05% Ác. fórmico e Solvente B: MeOH + 0,05% Ác. fórmico; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 µL; λ 284 nm]......	63
Figura 15. Schizandrisídeo (Mr4) isolada de <i>M. rubiginosa</i>	63
Figura 16. Estrutura parcial da Sephadex LH-20.	64
Figura 17. (+)-(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-4'- <i>O</i> -Metilgalocatequina (Ms1) isolada de <i>M. stenostachya</i>	67

Figura 18. Cromatograma de CD de Mr1 em Hex/EtOH (75:25, v/v) [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 µL; λ 280 nm].....	67
Figura 19. Espectro de CD de Ms2 em Hex/EtOH (75:25, v/v) [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 µL; λ 280 nm].....	69
Figura 20. (-)-(2R,3R)-4'-O-Metilepigallocatequina (Ms2) isolada de <i>M. stenostachya</i>	69
Figura 21. Miricetina-3-O-α-rhamnopiranosídeo (Ms3) isolada de <i>M. stenostachya</i>	71
Figura 22. Espectro de CD de Ms4 em Hex/EtOH (75:25, v/v) [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 µL; λ 280 nm].....	72
Figura 23. (-)-(2R,3R)-Epicatequina isolada de <i>M. stenostachya</i>	72
Figura 24. Interação diferencial de dois enantiômeros em um receptor biológico.	102
Figura 25. Talidomida.	103
Figura 26. Estereoisômeros da catequina.	105
Figura 27. Fases estacionárias das colunas utilizadas neste trabalho.	107
Figura 28. Estruturas dos enantiômeros da naringenina.....	108
Figura 29. Perfil cromatográfico do padrão de (±)-naringenina por HPLC-CD-DAD. [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; método: 80:20 A/B em 40 min; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 µL; λ 289 nm].....	109
Figura 30. Cromatograma de CD da mistura de (±)-naringenina e espectros de CD dos dois picos.....	110
Figura 31. Perfil cromatográfico do padrão de (±)-naringenina por HPLC-CD-DAD. [Coluna Chiralcel OD-RH; Solvente A: H ₂ O + 0,05% Ác. fórmico, Solvente B: ACN + 0,05% Ac. fórmico e Solvente C: MeOH + 0,05% Ác. fórmico; método: 57:40:3 A/B/C em 20 min; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 µL; λ 289 nm].	111
Figura 32. Perfil cromatográfico do padrão de (±)-catequina e (±)-epicatequina por HPLC-CD-DAD. [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; método: 75:25 A/B em 60 min; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 µL; λ 280 nm].....	112

Figura 33. Cromatograma de CD da mistura de (±)-catequina e (±)-epicatequina (λ 280 nm) e espectros de CD dos quatro picos [pico 1: (-)-(2S,3R)-catequina; pico 2: (+)-(2R,3S)-catequina; pico 3: (-)-(2R,3R)-epicatequina; pico 4: (+)-(2S,3S)-epicatequina].....	113
Figura 34. Perfil cromatográfico do padrão de (±)-catequina e (±)-epicatequina por HPLC-CD-DAD. [Coluna Chiralcel IC; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; método: 75:25 A/B em 30 min; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 μ L; λ 280 nm].....	114
Figura 35. Perfil cromatográfico do padrão de (±)-catequina e (±)-epicatequina por HPLC-CD-DAD. [Coluna Chiralcel OD-RH; Solvente A: H ₂ O + 0,05% Ác. fórmico, Solvente B: MeOH + 0,05% Ác. fórmico e Solvente C: <i>n</i> -PrOH + 0,05% Ác. fórmico; método: 75:5:15 A/B/C em 30 min; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 μ L; λ 280 nm]	114
Figura 36. Cromatograma de CD da mistura de (±)-catequina nas colunas Chiralcel IC (a) e Chiralcel OD-RH (b); λ 280 nm.	115
Figura 37. Curvas analíticas da (+)-catequina (a) e da (-)-epicatequina (b).....	116
Figura 38. Cromatograma da fração 8:2 do infuso das folhas de <i>M. rubiginosa</i> [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; método: 75:25 A/B em 60 min; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 μ L; λ 280 nm].	121
Figura 39. Perfil cromatográfico do infuso das folhas de <i>Miconia stenostachya</i> por HPLC-CD-DAD [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; método: 75:25 A/B em 60 min; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 μ L; λ 280 nm]. Pico 1: (+)-4'-O-metilgalocatequina; Pico 2: (-)-epicatequina; Pico 3: (-)-4'-O-metilepigalocatequina.....	122
Figura 40. Espectros no UV das substâncias presentes no infuso das folhas de <i>M. stenostachya</i>	122
Figura 41. Perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas de <i>Maytenus obtusifolia</i> por HPLC-CD-DAD [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; método: 75:25 A/B em 60 min; vazão 0,5 mL.min ⁻¹ ; volume de injeção: 10 μ L; λ 280 nm].....	124

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Preparação dos infusos das espécies de <i>Miconia</i>	47
Esquema 2. Método para escolha do sistema de solvente para HSCCC (1 mg da fração AcOEt do infuso foi dissolvida em 2 mL da mistura de solventes. Após agitação vigorosa e separação das fases, cada uma delas foi aplicada, em quantidades iguais, em placa cromatográfica. Após a eluição da placa, observou-se a distribuição das substâncias nas fases. FO = fase orgânica; FA = fase aquosa)	53
Esquema 3. Fracionamento do infuso das folhas de <i>Miconia rubiginosa</i>	54
Esquema 4. Fracionamento do infuso das folhas de <i>Miconia stenostachya</i>	65
Esquema 5. Metodologia de <i>clean-up</i> desenvolvida para o estudo quiral das catequinas.	119
Esquema 6. Metodologia utilizada para preparação do infuso de <i>M. rubiginosa</i> para análise por HPLC-CD-DAD.....	120

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN- ¹ H da substância Mr1 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	74
Espectro 2. RMN- ¹ H da substância Mr2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	75
Espectro 3. gHMQC da substância Mr2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	76
Espectro 4. gHMBC da substância Mr2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	77
Espectro 5. RMN- ¹ H da substância Mr3 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	78
Espectro 6. 1D-TOCSY da substância Mr3 , irradiado em δ 5,37 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	79
Espectro 7. RMN- ¹ H da substância Mr4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	80
Espectro 8. Expansões do espectro de RMN- ¹ H da substância Mr4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	81
Espectro 9. gHMQC da substância Mr4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	82
Espectro 10. gHMBC da substância Mr4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	83
Espectro 11. gHMBC da substância Mr4 (expansão 3,2 a 5,4 / 45 a 80 ppm) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	84
Espectro 12. gHMBC da substância Mr4 (expansão 2,4 a 4,4 / 122 a 150 ppm) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	85
Espectro 13. RMN- ¹ H da substância Ms1 e expansões (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T e 7,02 T).....	86
Espectro 14. gHMQC da substância Ms1 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	87
Espectro 15. gHMBC da substância Ms1 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	88
Espectro 16. gHMBC da substância Ms1 (expansão 2,8 a 5,0 / 129 a 141 ppm) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	89
Espectro 17. RMN- ¹ H da substância Ms2 e expansões (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	90
Espectro 18. gHMQC da substância Ms2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	91
Espectro 19. gHMBC da substância Ms2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	92
Espectro 20. gHMBC da substância Ms2 (expansão 3,5 a 7,0 / 130 a 160 ppm) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	93
Espectro 21. RMN- ¹ H da substância Ms3 e expansão (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	94
Espectro 22. 1D-TOCSY da rhamnose da substância Ms3 , irradiado δ 5,19 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	95
Espectro 23. COSY da substância Ms3 (expansão) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	96
Espectro 24. gHMQC da substância Ms3 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	97
Espectro 25. gHMBC da substância Ms3 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	98
Espectro 26. RMN- ¹ H da substância Ms4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).	99

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	25
Cerrado.....	26
OBJETIVOS.....	29
Objetivo Geral.....	29
Objetivos Específicos.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
CAPÍTULO 1. ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>Miconia rubiginosa</i> (Bonpl.) DC. E	
<i>Miconia stenostachya</i> DC.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
1.1 <i>Miconia</i> spp.....	35
1.2 Classes de substâncias isoladas neste trabalho.....	42
2. ESTUDO FITOQUÍMICO.....	45
2.1 Coleta do material vegetal e obtenção dos infusos das folhas das espécies de	
<i>Miconia</i>	46
2.2 Perfil cromatográfico das espécies de <i>Miconia</i> por HPLC-UV-DAD.....	47
2.3 Fracionamento do infuso das folhas de <i>Miconia rubiginosa</i>	52
Identificação da (-)-(2R,3R)-epicatequina (Mr1).....	55
Identificação da casuarictina (Mr2).....	56
Identificação do canferol-3-O- β -galactopiranosídeo (Mr3).....	59
Identificação do schizandrisídeo (Mr4).....	61
2.4 Fracionamento do infuso das folhas de <i>Miconia stenostachya</i>	64
Identificação da (+)-(2R,3S)-4'-O-metilgalocatequina (Ms1).....	65
Identificação da (-)-(2R,3R)-4'-O-metilepigalocatequina (Ms2).....	67
Identificação da miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo (Ms3).....	69
Identificação da (-)-(2R,3R)-epicatequina (Ms4).....	71
2.5 Dados físicos e espectroscópicos das substâncias isoladas.....	72
CAPÍTULO 2. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA ANÁLISE	
QUIRAL DE EXTRATOS VEGETAIS.....	100
1. INTRODUÇÃO.....	101

1.1 Quiralidade	101
1.2 Dicroísmo circular	103
2. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA ESTUDO QUIRAL DE EXTRATOS VEGETAIS	108
2.1 Flavanonas	108
2.2 Catequinas	112
2.3 Construção das curvas analíticas	115
2.4 Preparação de amostra, teste de seletividade, recuperação e precisão	117
3. APLICAÇÃO DO MÉTODO	120
3.1 Análise quali e quantitativa de espécies de <i>Miconia</i>	120
3.2 Aplicação do métodos desenvolvido para outra espécie vegetal: análise qualitativa da espécie <i>Maytenus obtusifolia</i> Mart	123
CONSIDERAÇÕES FINAIS, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	126
REFERÊNCIAS	129

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi a investigação da composição química de plantas do Cerrado, aplicando técnicas que permitam uma análise quali e quantitativa rápida e eficaz. As espécies estudadas neste projeto foram *Miconia rubiginosa* e *Miconia stenostachya*, pertencentes à família Melastomataceae. As espécies foram coletadas no Estado de São Paulo e os infusos foram preparados e particionados com acetato de etila e água. A fração acetato de etila da *M. rubiginosa* foi fracionada por Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC), sendo isolados os compostos (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina (**Mr1**), casuarictina (**Mr2**), canferol-3-*O*- β -galactopiranosídeo (**Mr3**) e schizandrisídeo (**Mr4**). A fração acetato de etila da *M. stenostachya* foi fracionada por cromatografia de permeação em gel utilizando Sephadex LH-20, que possibilitou o isolamento da (+)-(2*R*,3*S*)-4'-*O*-metilgalocatequina (**Ms1**), (-)-(2*R*,3*R*)-4'-*O*-metilepigalocatequina (**Ms2**), miricetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo (**Ms3**) e (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina (**Ms4**). Foram desenvolvidos métodos de separação dos enantiômeros da naringenina e catequinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detectores de Dicroísmo Circular e Arranjo de Diodos (HPLC-CD-DAD). Os métodos desenvolvidos forneceram separação adequada com boa resolução. Foram obtidos os espectros de dicroísmo circular (CD) de todas as substâncias isoladas, permitindo a identificação dos enantiômeros. Uma metodologia de *clean-up* foi desenvolvida para a preparação de amostras para análise por cromatografia quiral. O método que utiliza cartucho de C₁₈ (STRATA Phenomenex[®]) foi o que apresentou melhor seletividade. O método desenvolvido no HPLC-CD-DAD permitiu identificar a (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina no infuso de *M. rubiginosa*. O mesmo método foi aplicado para investigar a espécie *Maytenus obtusifolia*. Nessa espécie foram encontrados os estereoisômeros (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina e (+)-(2*R*,3*S*)-catequina.

Palavras-chave: *Miconia*, Melastomataceae, HPLC, dicroísmo circular, catequinas

ABSTRACT

The objective of this project was to investigate the chemical composition of Cerrado plants, using techniques that allow a quick and efficient qualitative and quantitative analysis. In this project we studied the species *Miconia rubiginosa* and *Miconia stenostachya* which belong to the Melastomataceae family. *Miconia* species were collected at São Paulo State and water infusions were prepared and partitioned with EtOAc and water. The ethyl acetate fraction of *M. rubiginosa* was fractioned by High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC), and afforded (-)-(2*R*,3*R*)-epicatechin (**Mr1**), casuarictin (**Mr2**), kaempferol-3-*O*- β -galactopyranoside (**Mr3**), and schizandriside (**Mr4**). The ethyl acetate fraction of *M. stenostachya* was submitted to gel permeation chromatography over Sephadex LH-20, that led to the isolation of (+)-(2*R*,3*S*)-4'-*O*-methylgallocatechin (**Ms1**), (-)-(2*R*,3*R*)-4'-*O*-methylepigallocatechin (**Ms2**), myricetin-3-*O*- α -rhamnopyranoside (**Ms3**), and (-)-(2*R*,3*R*)-epicatechin (**Ms4**). Methods were developed for the enantiomeric separation of naringenin and catechins by High Performance Liquid Chromatography with Circular Dichroism and Diode Array Detectors (HPLC-CD-DAD). The developed methods provided good separation and resolution. CD spectra of all these substances were obtained, allowing the identification of the enantiomers. A *clean-up* methodology was developed for the preparation of plant samples previous to the chiral HPLC analysis. The method using C₁₈-cartridge (Phenomenex STRATA[®]) showed the best selectivity. The method developed using HPLC-CD-DAD allowed to identify (-)-(2*R*,3*R*)-epicatechin in the infusion of *M. rubiginosa*. The same method was applied to investigate the commonly used commercial plant *Maytenus obtusifolia*. In this specie, we found (-)-(2*R*,3*R*)-epicatechin and (+)-(2*R*,3*S*)-catechin.

Keywords: *Miconia*, Melastomataceae, HPLC, circular dichroism, catechins

INTRODUÇÃO

As plantas são popularmente empregadas no tratamento de moléstias desde a mais remota antiguidade e sem dúvida são excelentes fontes de agentes terapêuticos. Uma recente pesquisa revelou que 61% das drogas introduzidas em todo o mundo foram inspiradas em produtos naturais (CSEKE et al., 2006). O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje, elas são comercializadas livremente em mercados, feiras livres e são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas (MACIEL et al., 2002).

Entretanto, esse uso indiscriminado é muito perigoso, pois a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos é um problema sério de saúde pública. As pesquisas realizadas para a avaliação do uso seguro ainda são incipientes no Brasil e desconhecer as características de um produto de consumo generalizado pode, por uso exagerado ou equivocado, gerar problemas graves de saúde (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; DI STASI, 2007).

Estima-se que dentre as espécies já identificadas em regiões tropicais, somente cerca de 15% foram estudadas quanto ao seu potencial farmacêutico (CSEKE et al., 2006).

Para garantir a segurança da população, a Secretaria de Vigilância Sanitária estabelece uma série de requisitos para o registro de um medicamento fitoterápico. Dentre os requisitos fundamentais estão o conhecimento da composição química, quali e quantitativamente, e da atividade farmacológica da planta, a fim de que se possam estabelecer critérios e metodologias para análise, controle de qualidade e preparo de formulações fitoterápicas.

Tradicionalmente, o estudo químico de plantas é realizado utilizando métodos de isolamento, purificação e identificação demorados e dispendiosos, tais como cromatografia em coluna (sílica gel, sephadex, entre outros), RMN, UV, IV, entre outros (ROBARDS, 2003). Além disso, essas técnicas não permitem determinar a identidade da substância e sua concentração ao mesmo tempo.

Portanto, um dos objetivos desse trabalho é a investigação da composição química de plantas do Cerrado, aplicando técnicas que permitam uma análise quali e quantitativa rápida e eficaz. Uma das formas de realizar isso é empregando técnicas hífenadas tais como HPLC-DAD, HPLC-MS/MS, HPLC-RMN, entre outras, que permitem uma rápida análise da composição vegetal através dos tempos de retenção e/ou propriedades espectroscópicas/espectrométricas (LI et al., 2010; MAN et al., 2010).

Outro ponto importante quando se discutem os fitoterápicos é o estudo da quiralidade das substâncias naturais. Atualmente, para moléculas sintéticas, a FDA (*Food and Drug*

Administration) americana requer a avaliação da eficácia e toxicidade individual de cada um dos enantiômeros, caso a droga possua centros assimétricos (ABOUL-ENEIN; ALI, 2003; ZHANG et al., 2004). Isso se deve ao fato de que um grande número de enantiômeros pode apresentar diferenças em suas propriedades farmacológicas, farmacocinéticas ou tóxicas. Um exemplo é o da talidomida, que causou sérias deformidades físicas em crianças devido às propriedades teratogênicas do enantiômero (-)-S. Nesse contexto, a determinação da estereoquímica tem sido de valiosa importância para a química de produtos naturais, tendo em vista que a estrutura de um composto não pode ser considerada determinada até que sua configuração absoluta seja conhecida (BARREIROS; DAVID J.M.; DAVID J.P., 2005).

As espécies de *Miconia* têm fornecido substâncias de interesse farmacológico, inclusive quirais, o que as torna propícias para o estudo de quiralidade proposto neste trabalho.

Cerrado

O Brasil possui uma superfície de 8.514.876,6 km², segundo o IBGE. No âmbito dessa extensão continental, abrange desde regiões equatoriais ao norte até áreas extratropicais ao sul, diferenciadas climática e geomorfologicamente, com uma extraordinária diversidade ecológica. Em território brasileiro encontram-se 7 biomas principais: Amazônia, Pantanal, Caatinga, Mata Atlântica, Costeiros, Campos Sulinos e Cerrado (IBAMA, 2010).

O Cerrado nativo era o segundo maior bioma do País, superado apenas pela Floresta Amazônica. Ocupava uma área superior a 2 milhões de km², cerca de 23% do território brasileiro (DURIGAN et al., 2004). É cortado por três das maiores bacias hidrográficas da América do Sul, com índices pluviométricos regulares que lhe propiciam sua grande biodiversidade, com mais de 10.000 espécies de plantas, das quais 4.400 endêmicas deste bioma (OLIVEIRA; MARQUIS, 2002).

Essa riqueza biológica, porém, é seriamente afetada pelo comércio ilegal. O Cerrado é o sistema ambiental brasileiro que mais sofreu alteração com a ocupação humana. Atualmente vivem ali cerca de 20 milhões de pessoas. A intensa atividade garimpeira na região, por exemplo, contaminou os rios de mercúrio e contribuiu para seu assoreamento. A mineração favoreceu o desgaste e a erosão dos solos. Na economia, também se destaca a agricultura

mecanizada de soja, milho e algodão, que começou a se expandir principalmente a partir da década de 80. Nos últimos 30 anos, a pecuária extensiva, as monoculturas e a abertura de estradas destruíram boa parte do cerrado (PORTAL BRASIL, 2010).

Atualmente, dos mais de 2 milhões de km² de vegetação nativa de Cerrado restam apenas 20% e a expansão da atividade agropecuária pressiona cada vez mais as áreas remanescentes (Fig. 1). Essa situação faz com que a região seja considerada um *hotspot* de biodiversidade e desperte especial atenção para a conservação dos seus recursos naturais.



Figura 1. Distribuição geográfica do Cerrado.

A Constituição Federal promulgada em 1988 não atribuiu ao Cerrado o "status" de patrimônio nacional, o que poderia assegurar sua utilização dentro de critérios para a manutenção de sua preservação. Ao contrário, desde o início da denominada política de expansão agrícola, na década de 50, a região do Cerrado foi citada pelo Governo Federal como sendo a principal fronteira agrícola do país, ou seja, a vegetação "feia", "vagabunda" e "desprezível" do Cerrado. Apesar de possuir uma fauna e flora riquíssimas, foi sistematicamente, e legalmente, condenada ao desaparecimento. Recentemente, uma série de ações por parte dos legisladores tem buscado amenizar os erros do passado cometidos com este bioma.

Existem hoje, no estado de São Paulo, 280.000 ha cobertos por vegetação natural de Cerrado, dos quais 25.000 ha (menos de 10%) estão protegidos na forma de Unidades de Conservação (UCs) estaduais, incluindo as Áreas de Proteção Ambiental (APAs). Além das

UCs e APAs, muitos fragmentos estão legalmente amparados por se enquadrarem no conceito de "áreas de preservação permanente" ou nos 20% de reserva legal obrigatória. A diversidade presente nesses pequenos fragmentos, no entanto, é imensa (IBAMA, 2010).

A continuidade do estudo de espécies pertencentes ao Cerrado, portanto, é de extrema importância, com o objetivo de possibilitar um uso sustentável desse Bioma, evitando a sua completa extinção.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Contribuir para o aumento do conhecimento sobre a biodiversidade brasileira, investigando a composição química de espécies vegetais brasileiras, bem como obter dados que possam auxiliar a compreender suas atividades biológicas.

Objetivos Específicos

- ◆ Investigar a composição química dos infusos de espécies de *Miconia* de forma rápida e eficiente;
 - ◆ Desenvolver métodos cromatográficos para a obtenção dos perfis dos infusos das folhas de *M. cabucu* Hoehne, *M. rubiginosa* (Bonpl.) DC. e *M. stenostachya* DC.;
 - ◆ Isolar e caracterizar os metabólitos secundários dos infusos de *M. rubiginosa* (Bonpl.) DC. e *M. stenostachya* DC.;
- ◆ Desenvolver métodos que permitam analisar a presença de compostos opticamente ativos em extratos vegetais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Solventes

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

Solventes grau HPLC: metanol, acetonitrila, *n*-propanol, *tert*-butanol, *n*-hexano, etanol (Mallinckrodt[®]), água purificada em sistema Milli Q, ácido trifluoroacético (TFA) (Riedel-deHaën), ácido fórmico (Tedia[®]).

Solvente deuterado: DMSO-*d*₆ (Aldrich[®])

Reagentes para reveladores: anisaldeído (Riedel-deHaën[®]), ácido sulfúrico concentrado e ácido acético (Quimis[®]).

Padrões utilizados: (±)-naringenina 95%, (+)-catequina (10 mg, Ref. C1251, Lote 036K1604, hidrato 98%), (-)-catequina [1 mg, Ref. C0567, Lote 066K1088, 98% (HPLC)], (+)-epicatequina [1 mg, Ref. E4018, Lote 100K1673, 98% (HPLC)], (-)-epicatequina (10 mg, Ref. E1753, Lote 026K2611, 90%), todos da Sigma Aldrich[®].

Procedimentos Cromatográficos

Nas análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 (Sigma Aldrich[®] e Merck[®]) sem indicador de fluorescência, de tamanho 20 x 20 cm e 0,2 mm de espessura de adsorvente. O eluente utilizado foi CHCl₃/MeOH/*n*-PrOH/H₂O (5:6:1:4 v/v).

Como reveladores para CCDC foram utilizados:

- Luz UV 254-366 nm (Chromatovue[®]);
- Anisaldeído/H₂SO₄ (WAGNER; BLADT; ZGAINSKY, 1984): 0,85 mL de anisaldeído + 85,0 mL de MeOH + 10,0 mL de ácido acético + 5,0 mL de H₂SO₄ concentrado. Pulveriza-se a placa cromatográfica com o revelador e, após aquecimento, pode-se observar manchas roxas para terpenos, avermelhadas para saponinas e catequinas, marrom para taninos e amarelas para flavonóides.
- Iodo

A preparação das amostras (*clean-up*) para traçar o perfil cromatográfico por HPLC-CD-DAD foi feita a partir de 20,0 mg de material vegetal. As amostras foram submetidas à extração em fase sólida (SPE) em cartuchos (Supelco®) de fase reversa (C₁₈) com 100,0 mg de adsorvente, ativados com 5,0 mL de MeOH e ambientados com 5,0 mL de H₂O. As infusões foram eluídas com 5,0 mL de MeOH/H₂O 9:1 (v/v), para eliminar substâncias lipofílicas, e secas em ar comprimido. Em seguida, as frações foram ressuspensas em H₂O/MeOH 95:5 (v/v), filtradas em discos de 0,45 µm e 0,2 µm de poro (Millipore®) e analisadas por HPLC.

Os testes para desenvolvimento de método para análise quiral foram realizados utilizando os cartuchos: fase polimérica Oasis HLB (150 mg, 10 mL, Waters®); fase reversa C₁₈ (500 mg, 6 mL, Supelco®); fase reversa Strata C₁₈ (500 mg, 6 mL, Phenomenex®). Para a filtração das frações e padrões foi utilizado o microfiltro de polipropileno GHP (25 mm; 0,45 µm, Waters®).

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

Fórmulas utilizadas nas análises cromatográficas qualitativas e quantitativas:

$$V_0 = 0,5 \times L \times d^2$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

$$t_0 = \frac{V_0}{F}$$

$$R_s = 1,177 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{W_2^{1/2} + W_1^{1/2}}$$

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

$$LD = \frac{DPA \times 3}{IC}$$

$$LQ = \frac{DPA \times 10}{IC}$$

$$DPR = \frac{DP \times 100}{CMD}$$

$$\%R = \frac{C_f - C_{nf}}{C_{pd}} \times 100$$

V_o = volume morto
 α = fator de separação
 t_o = tempo morto
 R_s = resolução
 k = fator de retenção
 L = comprimento da coluna
 d = diâmetro da coluna
 F = vazão da fase móvel
 $W^{1/2}$ = largura do pico a meia altura
 LD = limite de detecção
 LQ = limite de quantificação
 DPa = desvio padrão do intercepto como eixo y de 3 curvas analíticas
 IC = inclinação da curva analítica
 DPR = desvio padrão relativo
 DP = desvio padrão
 CMD = concentração média determinada
 $\%R$ = porcentagem do padrão recuperado
 C_f = concentração do analito fortificado com padrão
 C_{nf} = concentração do analito não fortificado com padrão
 C_{pd} = concentração do padrão usado para fortificar a amostra

Equipamentos

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

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

A massa dos padrões foram medidas em uma balança analítica (Bioprecisa[®]) com capacidade de 200 g e precisão de 0,01 mg, modelo FA2104N. Os volumes foram medidos em micropipetas de alta precisão (Gilson[®]) com faixa de transferência de volume compreendida entre 2 e 1000 μ L, modelos P20, P200 e P1000.

As análises cromatográficas foram realizadas em um HPLC-CD-DAD da marca Jasco[®], equipado com uma bomba de 4 canais modelo PU-2095 *plus*, injetor automático AS-2055 *plus*, com detector PDA modelo MD-2010 *plus* e detector de dicroísmo circular modelo CD-2095 *plus*.

Para as análises fitoquímicas foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa C_{18} [Luna (2), Phenomenex[®]] de 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m de poro com diâmetro interno de 100 Å, e uma coluna de guarda (Phenomenex[®]) de 4 mm x 3 mm x 5 μ m; e uma coluna semi-

preparativa de fase reversa C₁₈ (Phenomenex[®]) de 250 mm x 10 mm x 10 μ m de poro. Para as análises quirais foram utilizadas as colunas Chiralcel OD-H, de fase normal, de 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m de poro e uma coluna de guarda (Chiralcel[®]) 10 x 4 mm, 5 μ m, Chiralcel OD-RH, de fase reversa, de 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m de poro e uma coluna de guarda (Chiralcel[®]) 10 x 4 mm, 5 μ m e Chiralcel IC, de fase normal, de 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m de poro e uma coluna de guarda (Chiralcel[®]) 10 x 4 mm, 5 μ m.

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

Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ("HPLC: High Performance Liquid Chromatography") no modo semipreparativo foram realizadas em um HPLC-UV-DAD da marca Varian[®] modelo *ProStar* 210/330.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram registrados em espectrômetro Varian, INOVA 500, operando a 300 (7,02 T) e 500 MHz (11,7 T).

As medidas de rotação específica foram obtidas utilizando-se um polarímetro Jasco P-1020 em celas de quartzo com caminho ótico de 1 cm.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrômetro FT/IR – 4100 Jasco, no intervalo de 400 a 4000 cm⁻¹, utilizando sólido direto.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro LCQ Fleet Thermo Scientific com ionização nos modos positivo e negativo por ESI.

Capítulo 1

Estudo Fitoquímico de *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) DC. e *Miconia stenostachya* DC.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Miconia* spp

A família Melastomataceae apresenta cerca de 4.570 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais de todo o globo (GOLDENBERG, 2004). O gênero *Miconia* é o mais representativo, possuindo aproximadamente 1.000 espécies, distribuídas ao longo da América tropical (MARTINS et al., 1996), desde o sul do México até o norte da Argentina e Uruguai.

Levantamento bibliográfico da fitoquímica e propriedades biológicas da família, até janeiro de 2007, pode ser encontrado em Rodrigues (2007). Nas tabelas 1 e 2 é mostrado o levantamento até dezembro de 2010.

Tabela 1. Propriedades biológicas de espécies da família Melastomataceae.

Espécie	Atividade biológica	Referência
<i>Dissotis brazzae</i> Cogn.	Antimalárica	OMULOKOLI et al., 1997
<i>Leandra lacunosa</i> Cogn.	Hipoglicêmica	CUNHA et al., 2008
<i>Henriettella fascicularis</i> (Sw.) Triana	Antitumoral	CALDERÓN et al., 2002
<i>Melastoma malabathricum</i> L.	Antiviral; antioxidante; citotóxica	DÉVÉHAT et al., 2002 SUSANTI et al., 2007
<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Steud.	Antimicrobiana	CELOTTO et al., 2003
<i>Miconia fallax</i> DC.	Analgésica	ANDRADE e SILVA et al., 2002
<i>Miconia lepidota</i> Schrank & Mart. ex DC.	Antitumoral, citotóxica	GUNATILAKA et al., 2001
<i>Miconia ligustroides</i> (DC.) Naudin e <i>Miconia sellowiana</i> Naudin	Tripanocida	CUNHA et al., 2006
<i>Miconia myriantha</i> Benth.	Antimicrobiana	LI et al., 2001
<i>Miconia rubiginosa</i> (Bonpl.) DC.	Antimicrobiana; analgésica	CELOTTO et al., 2003; SPESSOTO et al., 2003
<i>Mouriri elliptica</i> Martius	Mutagênica	SANTOS et al., 2008
<i>Mouriri pusa</i> Gardner	Mutagênica; antiulcerogênica	SANTOS et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2008; 2010
<i>Tibouchina semidecandra</i> L.	Antioxidante	SIRAT et al., 2010

Tabela 2. Metabólitos isolados de espécies da família Melastomataceae.

Espécie	Substâncias isoladas	Classe	Referências
<i>Bredia tuberculata</i> (Guillaumin) Diels	Brediatina A e B; taninos monoméricos e diméricos	Taninos hidrolisáveis	YOSHIDA et al., 1994
<i>Henriettella fascicularis</i> (Sw.) Triana	4',5,7-triidroxi-6,8-dimetiliso flavona; ácido (2E,6S)-6-[(1R,5Z,3aS,9R,10Z, ácido sesterterpenóico; ácido betulínico; ácido palmítico; β -sitosterol; liquexantona; (-)-pinoresinol; taxifilina e ácido 3,3-di-O-metilelágico-4- β -D-glc	Flavonóides, terpenos e derivados do ácido elágico	CALDERÓN et al., 2002; 2003
<i>Huberia carvalhoi</i> Baumgratz	Apigenina; apigenina-7-O-glc; quercetina-3-O-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Huberia consimilis</i> Baumgratz	Apigenina; apigenina-7-O-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Huberia espiritosantensis</i> Baumgratz	Apigenina; kaempferol; kaempferol-3-O-(gal-xyl); kaempferol-3-O-(glc-rha); quercetina-3-O-glc; quercetina-3-O-rha-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Huberia glazioviana</i> Cogn.	Apigenina; apigenina-C-glc; apigenina-7-O-glc; apigenina-7-O-glc-rha; luteolina-7-O-glc; quercetina-3-O-gal; quercetina-3-O-glc; quercetina-3-O-rha-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Huberia minor</i> Cogn.	Apigenina; kaempferol-3-O-(gal-xyl); kaempferol-3-O-(glc-rha); quercetina-3-O-gal; quercetina-3-O-glc; quercetina-3-O-rha-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Huberia nettoana</i> Brade	Apigenina; luteolina; quercetina; quercetina-3-O-ara; quercetina-3-O-glc; quercetina-3-O-rha-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Huberia ovalifolia</i> DC.	Apigenina; apigenina-7-O-(glc-rha); luteolina; kaempferol-3-O-glc; quercetina-3-O-glc; quercetina-3-O-glc-glc; quercetina-3-O-rha-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004

Tabela 2. Metabólitos isolados de espécies da família Melastomataceae (cont.)

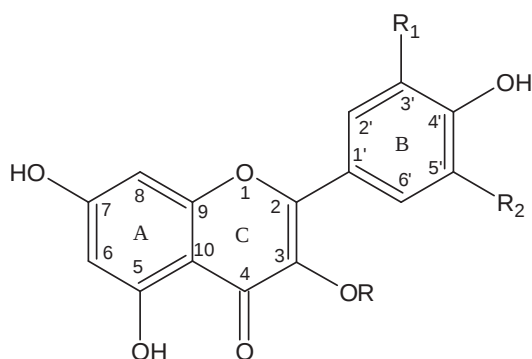
Espécie	Substâncias isoladas	Classe	Referências
<i>Huberia semiserrata</i> DC.	Apigenina; luteolina; kaempferol; kaempferol-3-O-ara; kaempferol-3-O-glc; quercetina-3-O-ara; quercetina-3-O-gal; quercetina-3-O-glc; quercetina-3-O-rha-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Leandra lacunosa</i> Cogn.	Ácido ursólico; kaempferol; luteolina; quercetina	Flavonóides e terpenos	CUNHA et al., 2008
<i>Melastoma malabathricum</i> L.	Malabatrina B, C e D; isoquercitrina-6"-O-galato; 1,4,6-tri-O-galoil- β -D-glc; 1,2,4,6-tetra-O-galoil- β -D-glc; estricnina; casuarictina; pedunculagina; nobotanino D; pterocararina; nobotanino B, G, H e J ; naringenina; kaempferol; kaempferol-3-O-D-glc; kaempferol-3-O-(2",6"-di-O-p-trans-cum)glc; kaempferol-3-O-D-glc	Flavonóides e taninos hidrolisáveis	YOSHIDA et al., 1992; SUSANTI et al., 2007
<i>Miconia lepidota</i> Schrank & Mart. ex DC.	2-metoxi-6-heptil-1,4-benzoquinona; 2-metoxi-6-pentil-1,4-benzoquinona	Benzoquinonas	GUNATILAK A et al., 2001
<i>Miconia ligustroides</i> (DC.) Naudin	Ácido urjónico; ácido oleanólico; ácido ursólico	Terpenos	CUNHA et al., 2006
<i>Miconia myriantha</i> Benth.	Matucinol-7-O-[4",6"-O-(S)-hexaidroxifenoil]- β -D-glc; matucinol-7-O-[4",6"-di-O-galoil]- β -D-glc	Compostos fenólicos	LI et al., 2001
<i>Miconia sellowiana</i> Naudin	Ácido ursólico; ácido 2 α -hidroxiursólico; ácido máslico	Terpenos	CUNHA et al., 2006
<i>Miconia trailii</i> Cogn.	Miconiosídeo A e B	Flavonóides	ZHANG et al., 2003

Tabela 2. Metabólitos isolados de espécies da família Melastomataceae (cont.)

Espécie	Substâncias isoladas	Classe	Referências
<i>Monochaetum multiflorum</i> (Bompl.) Naudin	Ácido 4-O-(6'-O-galoil- β -glc)-cis-p-cumárico; 6'-O-galoilprunasina (ou o isômero sambunigrina); benzil 6'-O-galoil- β -D-glc; monocaetina; trifolina; hiperina; quercetina-3-(6'-O-cafeoil)- β -D-gal; isoquercitrina; melastoflorinas A-D	Taninos hidrolisáveis e flavonóides	ISAZA et al., 2001; YOSHIDA et al., 2005
<i>Mouriri elliptica</i> Martius	Kaempferol-3-O- β -gal; kaempferol-3-O- β -glc; kaempferol-3-O- β -rha; quercetina-3-O- β -gal; quercetina-3-O- β -xyl; quercetina-3-O- α -rha	Flavonóides	SANTOS et al., 2008
<i>Mouriri pusa</i> Gardner	Kaempferol-3-O- β -gal; kempferol-3-O- β -glc; quercetina-3-O- β -glc-rha; kaempferol-3-O- β -rha; quercetina-3-O- β -gal; quercetina-3-O- β -xyl; quercetina-3-O- β -ara(p); quercetina-3-O- α -ara(f); miricetina-3-O- β -gal; quercetina-3-O- α -rha; quercetina; kaempferol	Flavonóides	SANTOS et al., 2008
<i>Tibouchina multiflora</i> Cogn.	Nobotaninos O e P	Taninos hidrolisáveis	YOSHIDA et al., 1999
<i>Tibouchina semidecandra</i> L.	Malvidina-3-(p-cum-glc)-5-glc; quercetina; quercetina-3-O- α -L-(2"-O-acetil)ara(f); avicularina; quercitrina; ácido 3,3'-O-dimetilelágico-4-O- α -L-rha	Antocianidinas, flavonóides e taninos hidrolisáveis	HARBORNE, 1964; SIRAT et al., 2010
<i>Tibouchina urvilleana</i> (DC.) Cogn.	Malvidina-3-(p-cum-glc)-5-acetilxyl	Antocianidinas	TERAHARA et al., 1993
<i>Trembleya laniflora</i> (D. Don) Cogn.	5-hidróxi-7,4'-dimetóxi flavona; α -amirina; β -amirina; lupeol; β -sitosterol; estigmasterol	Flavonóides e terpenos	VENTURA et al., 2007

A partir das informações apresentadas na Tabela 2 pode-se verificar uma variedade de classes de metabólitos secundários presentes nas espécies investigadas. Algumas substâncias, como os derivados de taninos hidrolisáveis e flavonoides, parecem ser comuns nestas espécies, enquanto que outras classes, como os terpenos e quinonas, ocorrem raramente.

As espécies *Miconia cabucu* e *Miconia rubiginosa* estão sendo estudadas por nosso grupo de pesquisa desde 2005. Dessas espécies foram isolados flavonoides *O*-glicosilados, ácido gálico, epicatequina e um biflavonoide (RODRIGUES et al., 2007), um tanino hidrolisável e uma lignana (Fig. 2 e 3). A espécie *Miconia stenostachya* foi estudada no presente trabalho e foram isolados flavonoides (Fig. 3).



	R	R ₁	R ₂		R	R ₁	R ₂
(MC1)	Rha-(2''→1''')-Xyl;	OH;	H	(MR1)	Rha;	OH;	H
(MC4)	Rha-(2''→1''')-Xyl;	OH;	OH	(MR2)	Ara(f);	OH;	H
(MC5)	Rha;	OH;	H	(MR3)	α-Ara(p);	OH;	H
(MC6)	Rha;	OH;	OH	(MR4)	β-Ara(p);	OH;	H
(MC7)	Glc;	OH;	H	(MR7)	Gal;	OH;	H
(MC8)	Glc-(6''-cum)	H;	H	(MR8)	Gal-(4''→1''')-Rha;	H;	H

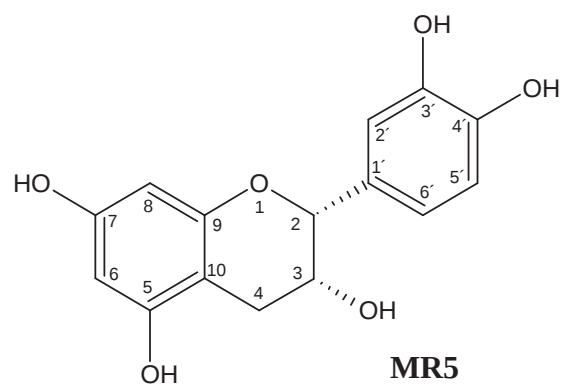
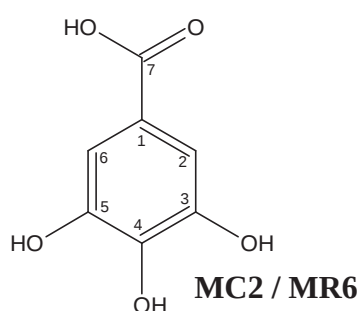
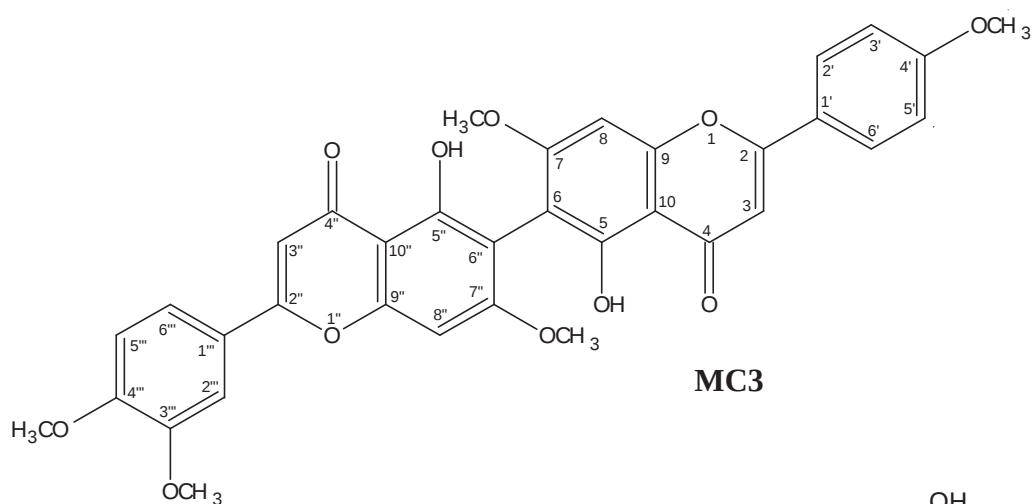


Figura 2. Substâncias isoladas das espécies de *Miconia* (RODRIGUES et al., 2007).

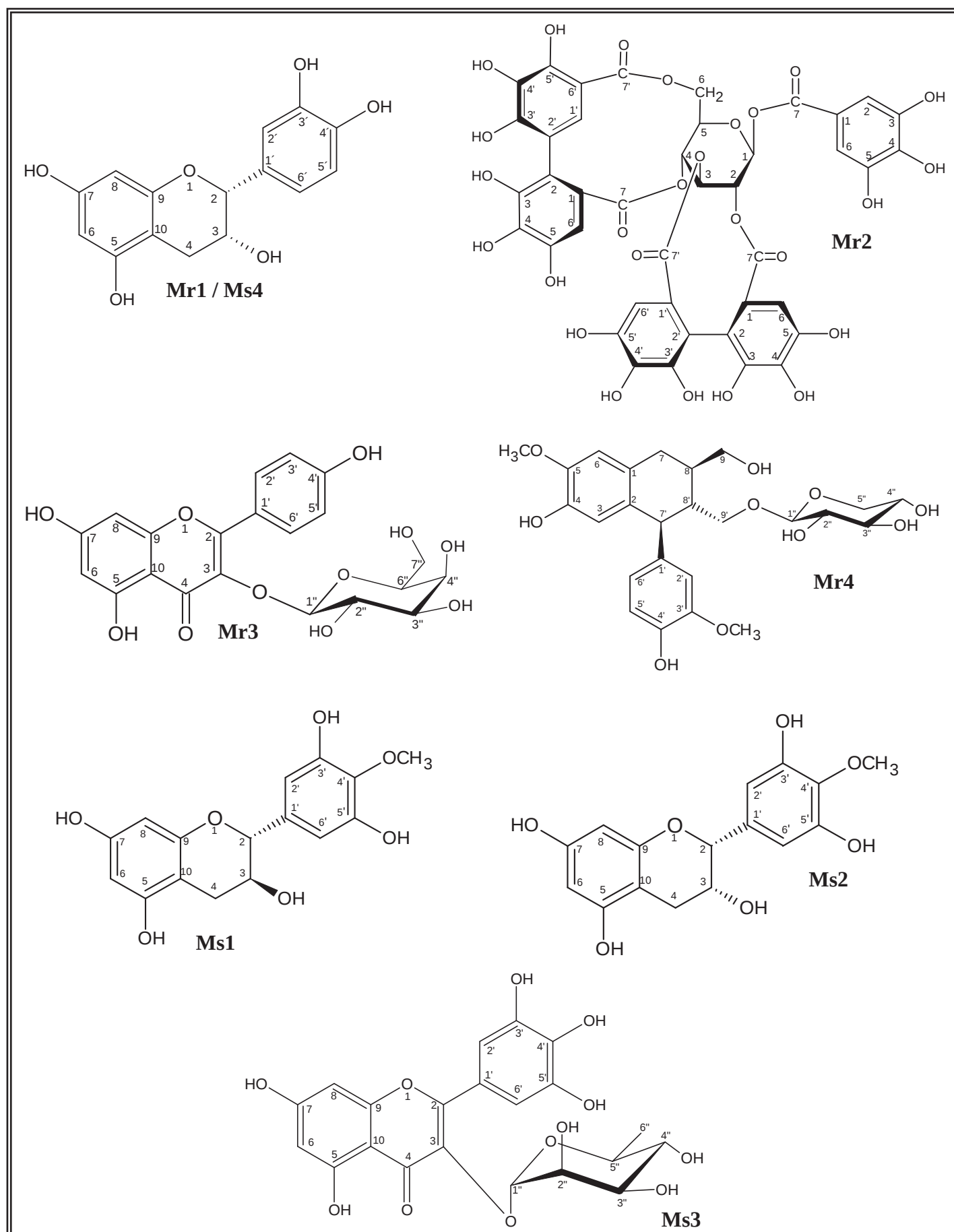


Figura 3. Substâncias isoladas das espécies de *Miconia* neste trabalho.

Nos ensaios farmacológicos anteriormente realizados, observou-se que o extrato metanólico de *M. rubiginosa* apresentou atividade promissora contra *Mycobacterium tuberculosis* (RODRIGUES, 2007). Ambas as espécies, *M. cabucu* e *M. rubiginosa*, apresentaram atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, sendo que o resultado mais significativo foi obtido no teste do extrato clorofórmico de *M. cabucu* na inibição do fungo *Candida albicans* (RODRIGUES et al., 2008).

Neste trabalho continuamos o estudo químico das espécies *Miconia cabucu* e *Miconia rubiginosa* e iniciamos o estudo da espécie *Miconia stenostachya*, dando enfoque no isolamento e identificação das substâncias quirais presentes nestas espécies.

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

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

Miconia stenostachya DC. é um arbusto de aproximadamente 1,5 m de altura, com folhas elípticas (GOLDENBERG, 2004). Existem poucas informações sobre a fitoquímica dessa espécie na literatura. Chan et al. (1992) relataram o isolamento dos triterpenos ácido sumaresinólico e ácido 3-*epi*-sumaresinólico. Do extrato diclorometano foram isolados o ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido sumaresinólico e ácido gipsogênico (CUNHA et al., 2003).

Quanto à atividade biológica, esta espécie apresentou atividades tripanocida (CUNHA et al., 2003) e antimicrobiana (CELOTTO et al., 2003).

1.2 Classes de substâncias isoladas neste trabalho

Os flavonoides representam um dos grupos de compostos polifenólicos mais importantes e diversificados entre os metabólitos secundários de origem vegetal, sendo conhecidos mais de 5.000 moléculas (PATIL et al, 2009).

Eles são caracterizados por apresentar o núcleo fundamental constituído por quinze átomos de carbono (duas fenilas ligadas por uma cadeia de três átomos de carbono, C6-C3-

C6). A classificação estrutural é mostrada na Figura 4 (PATIL et al., 2009; HAVSTEEN, 2002).

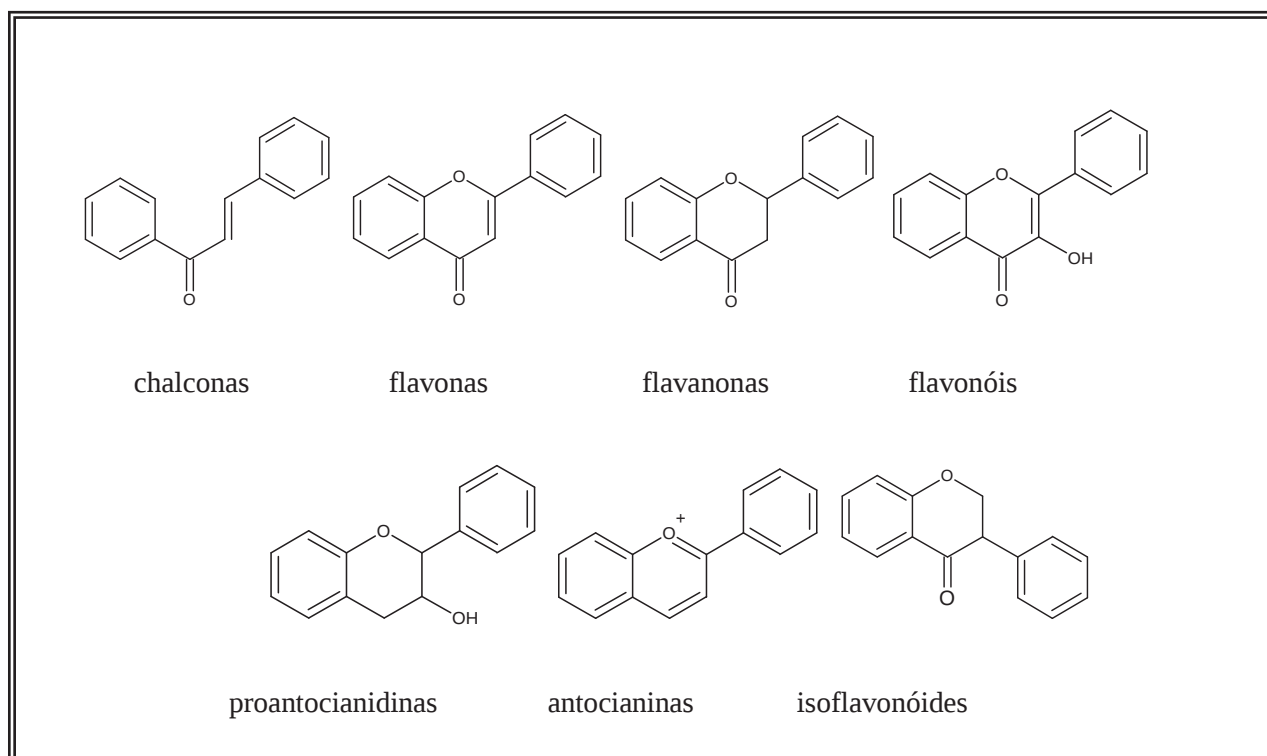


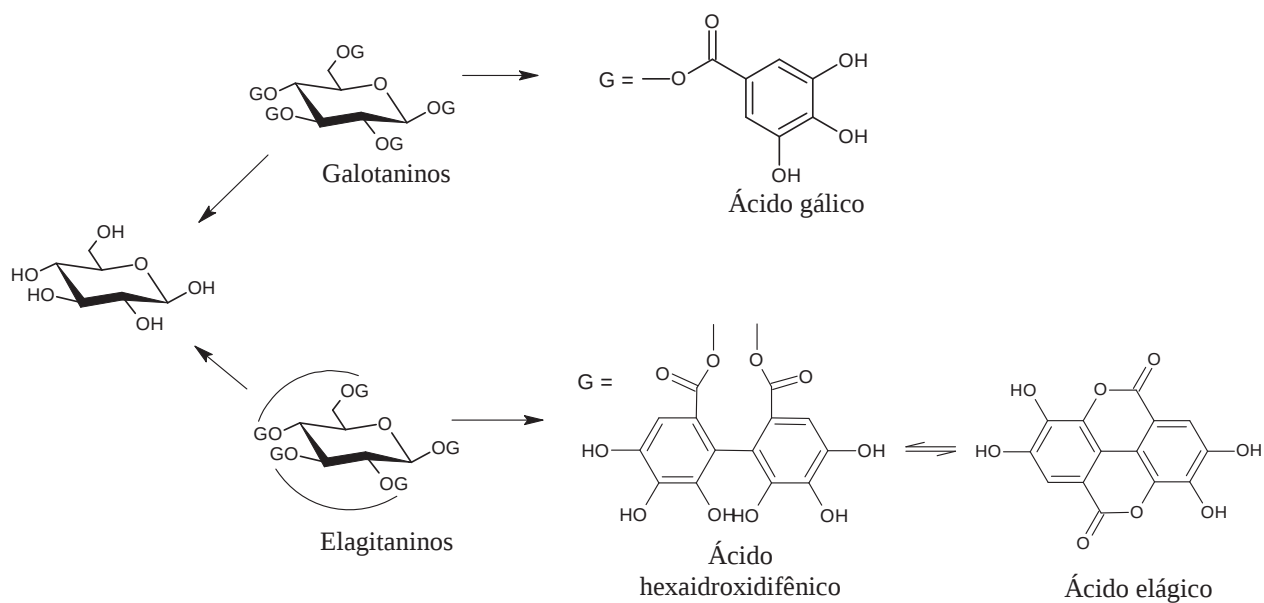
Figura 4. Classificação estrutural dos flavonóides.

Os flavonoides têm origem biossintética mista, na qual o anel A é derivado de três unidades de acetato, enquanto o anel B e os três átomos de carbono do anel central são derivados do ácido cinâmico.

Os flavonoides apresentam diversas atividades biológicas, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, anticarcinogênica, antiulcerogênica, entre outras. Diversos estudos discutem a relação das atividades apresentadas pelos flavonoides com sua capacidade antioxidante, ou seja, sequestradora de radicais livres (HAVSTEEN, 2002).

O termo tanino designa os metabólitos secundários de natureza polifenólica. A classificação dos tipos de taninos está apresentada na Figura 5. Taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálico (galotaninos) ou elágico (elagitaninos) glicosilados, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Taninos condensados são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol (HASLAM, 2007).

Taninos hidrolisáveis



Taninos condensados

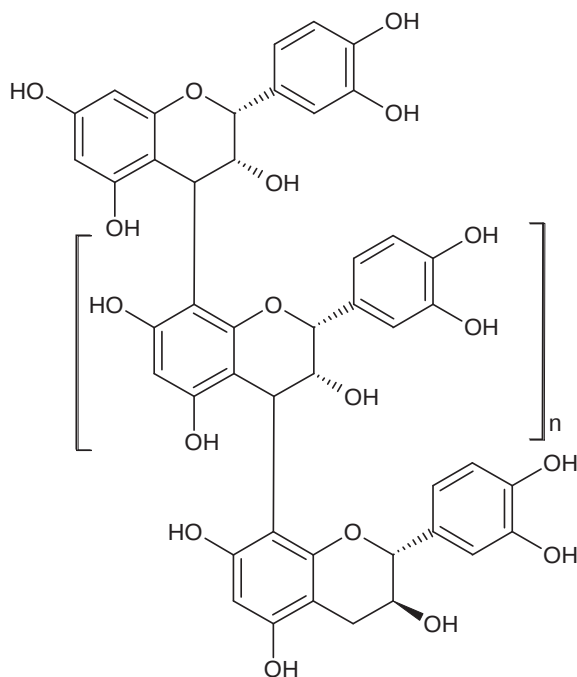


Figura 5. Classificação dos taninos.

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e processos inflamatórios em geral (MONAGAS et al., 2009; WANNES et al., 2010).

Existem diversos trabalhos na literatura que discutem a presença de taninos hidrolisáveis em espécies da família Melastomataceae (YOSHIDA et al., 1992; 1999; 2005; ISAZA et al., 2001). A epicatequina já foi isolada da espécie *Miconia rubiginosa* (RODRIGUES, 2007).

O termo lignana descreve o grupo de derivados fenólicos diméricos de C_6C_3 caracterizados estruturalmente pelo acoplamento oxidativo das posições 8 e 8' de duas unidades fenilpropanoídicas. Quando este acoplamento ocorre entre outros carbonos destas unidades, estes compostos são chamados de neolignanas (MESSIANO, 2010; MOSS, 2000), Fig. 6.

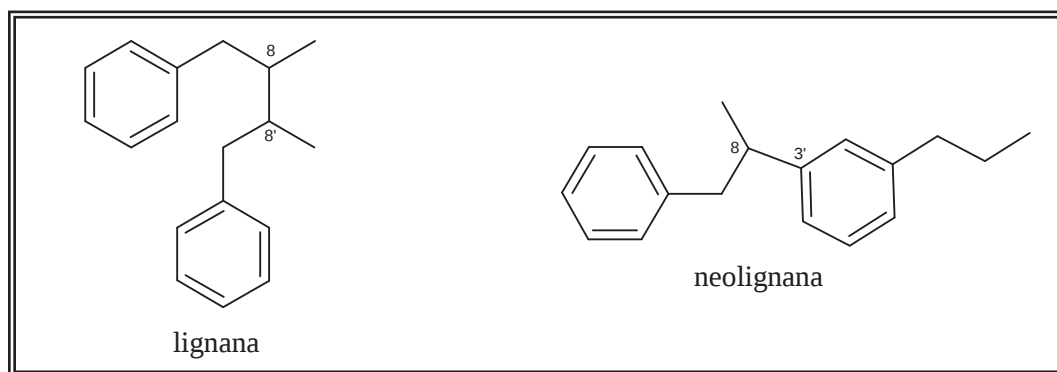


Figura 6. Exemplos de lignanas e neolignanas.

As lignanas apresentam uma grande variedade de estruturas químicas devido aos diferentes precursores monoméricos que geram novos subprodutos de lignanas por ciclizações e/ou modificações nos esqueletos carbônicos (SILVA, 2006).

As lignanas apresentam importantes propriedades farmacológicas, tais como atividade cardiovascular e anti-HIV *in vitro* (KATAYAMA et al., 1993), efeitos neuroprotetivos em modelos de doença de Alzheimer e Parkinson (ZHAI et al., 2005) e atividade fungicida (LOPES; NASCIMENTO; SILVA, 2001).

2. ESTUDO FITOQUÍMICO

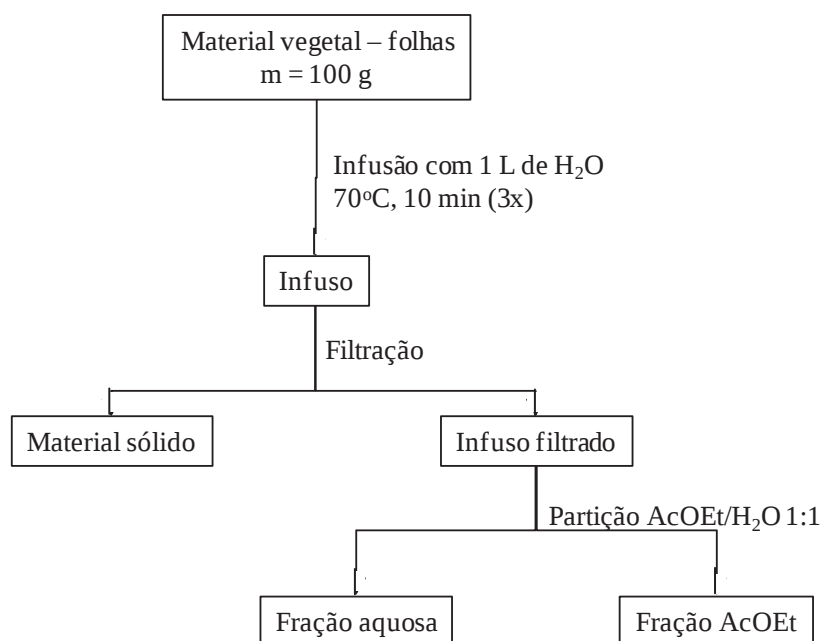
2.1 Coleta do material vegetal e obtenção dos infusos das folhas das espécies de *Miconia*

A coleta das espécies *M. cabucu* e *M. rubiginosa* foi realizada no dia 29 de agosto de 2006 e a da espécie *M. stenostachya* no dia 26 de abril de 2007, no município de Itirapina, São Paulo, pelo Prof. Jorge Tamashiro do IB-Unicamp. As exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Campinas sob os números 1433, 1430 e 1439, respectivamente. Os materiais vegetais foram secos em estufa a 40 °C e moídos em moinho de facas.

A preparação por infusão foi o método escolhido por ser uma extração rápida e não utilizar solventes prejudiciais à saúde e ao meio-ambiente, além de ser a preparação que mais se assemelha às utilizadas pela população.

As espécies de *Miconia* possuem derivados de catequinas, que são substâncias que podem sofrer degradação ou epimerização quando expostas a calor e luz. Portanto, é essencial condições de extração adequadas. Perva-Uzunalic et al. (2006) avaliaram a eficiência de extração das catequinas utilizando diferentes solventes, temperaturas e tempos de extração. Verificaram que uma extração múltipla (4x) utilizando H₂O (infusão), por 10 minutos cada e temperatura máxima de 80 °C seria ideal, pois temperaturas mais altas e tempos mais longos podem causar a epimerização, oxidação ou degradação das catequinas.

Portanto, as condições escolhidas para a preparação por infusão estão mostradas no esquema 1.



Esquema 1. Preparação dos infusos das espécies de *Miconia*.

A partição com AcOEt foi realizada para a eliminação dos componentes poliméricos presentes nessas espécies e, assim, minimizar problemas na etapa de fracionamento dos metabólitos. As massas obtidas são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Massas obtidas das partições dos infusos das espécies de *Miconia*.

	Quantidade/g (Rendimento/%)		
	<i>Miconia cabucu</i>	<i>Miconia rubiginosa</i>	<i>Miconia stenostachya</i>
Material vegetal seco	100	100	100
Fração AcOEt	1,3 (1,3)	1,5 (1,5)	1,7 (1,7)
Fração aquosa	13,5 (13,5)	13,9 (13,9)	14,5 (14,5)

2.2 Perfil cromatográfico das espécies de *Miconia* por HPLC-UV-DAD

Nessa primeira etapa foram desenvolvidos métodos cromatográficos para a separação dos compostos das espécies de *Miconia*.

A fração AcOEt do infuso foi submetida ao *clean-up* discutido na seção “Materiais e Métodos”, p. 30. O volume morto da coluna analítica utilizada nas análises por HPLC-UV-DAD foi calculado em $V_0 = 2,65$ mL e, portanto, o t_0 calculado para essa coluna foi $t_0 = 2,65$ min, em uma vazão de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

A fase móvel escolhida foi ACN/H₂O (Solvente A: H₂O + 0,05% de TFA e Solvente B: ACN + 0,05% TFA). O solvente acetonitrila foi a primeira escolha para análises por HPLC devido à ausência de absorção na faixa de trabalho (200 – 700 nm) e baixa viscosidade. Os solventes foram acidificados com TFA para evitar encaudamento dos picos devido à interação dos analitos com grupos silanóis residuais presentes na fase estacionária. Além disso, o ácido tem a função de suprimir a ionização de compostos de caráter ácido.

A otimização de uma separação deve ser realizada com base nos seguintes parâmetros cromatográficos: fator de retenção (k' ou k^*), fator de separação (α) e resolução (R_s). Um cromatograma com uma separação adequada deve ter uma boa resolução ($R_s > 1,5$) e um tempo de corrida razoável. Além disso, os picos devem possuir valores de k dentro da faixa considerada ideal ($0,5 < k < 20$) e valores de $\alpha > 1$.

Segundo a estratégia sugerida por Snyder, Kirkland e Glajch (1997), a primeira etapa é realizar um gradiente inicial, ou seja, 5-100% de ACN, para estabelecer se a separação deve ser feita em modo isocrático ou gradiente e as porcentagens ideais do solvente B para a análise. Observou-se que as substâncias eluíram entre 12 e 19 minutos ($3,5 < k < 6,2$), 7,6 e 22,1 minutos ($1,8 < k < 7,3$) e 7,3 e 25,1 minutos ($1,7 < k < 8,5$) para *M. rubiginosa*, *M. stenostachya* e *M. cabucu*, respectivamente (Fig. 7).

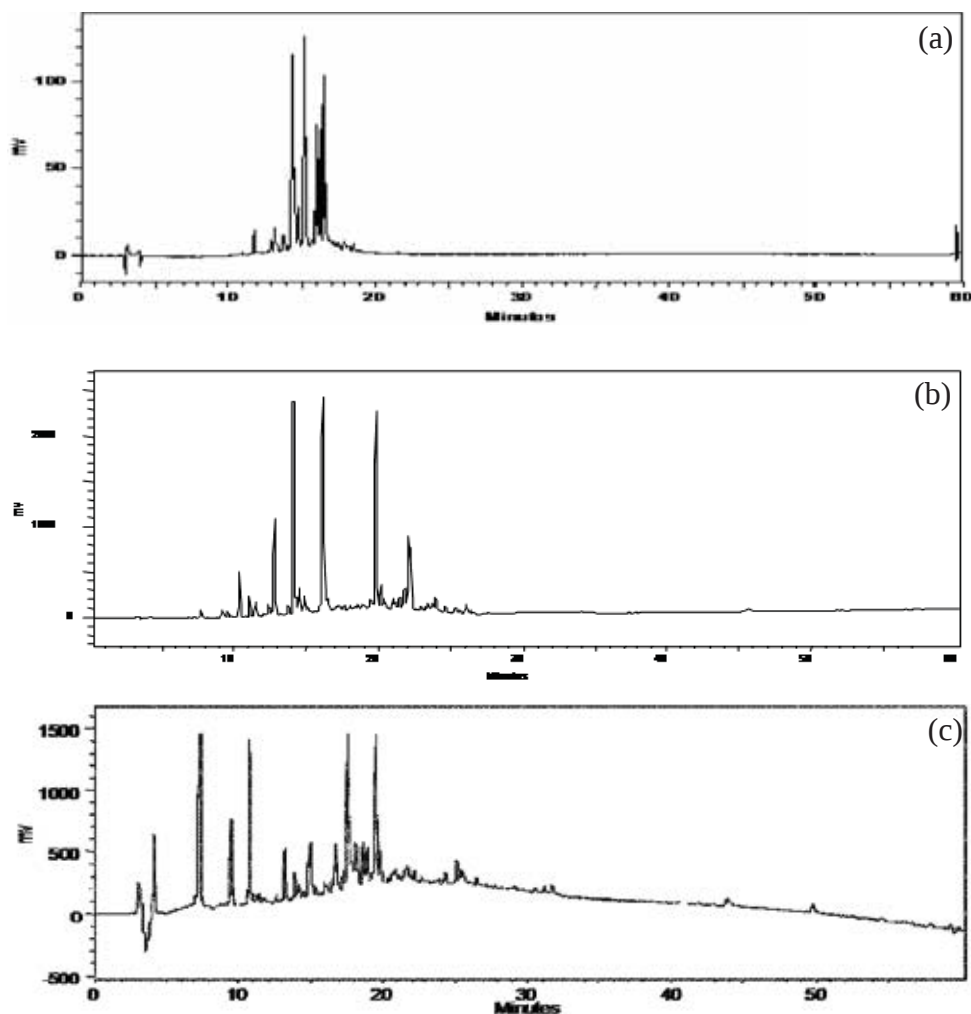


Figura 7. Gradiente inicial de *M. rubiginosa* (a), *M. stenostachya* (b) e *M. cabucu* (c). [Coluna Phenomenex luna C₁₈; 5-100 % de B em 60 min; Solvente A: H₂O + 0,05% TFA e Solvente B: ACN + 0,05% TFA; DAD (254 nm); vazão 1,0 mL.min⁻¹].

Segundo Snyder, Kirkland e Glajch (1997) os valores encontrados acima permitem que o modo isocrático seja utilizado. Foram realizadas, então, diversas análises. Entretanto, apesar de as substâncias apresentarem um intervalo de k adequado, a separação entre elas não foi boa, ou seja, apresentou baixa resolução. Métodos em gradiente, então, foram testados para a otimização dos parâmetros cromatográficos. Os que apresentaram melhores resultados são os gradientes lineares descritos na tabela 4. Os respectivos cromatogramas são mostrados na Figura 8.

Tabela 4. Métodos em gradiente desenvolvidos para a separação dos metabólitos encontrados nos infusos das folhas das espécies de *Miconia*.

Espécie	Gradiente (% de B em A)
<i>M. cabucu</i>	10-30% (40 min); 30-100% (45 min)
<i>M. rubiginosa</i>	13-23% (40 min); 23-100% (45 min)
<i>M. stenostachya</i>	13-23% (40 min); 23-100% (45 min)

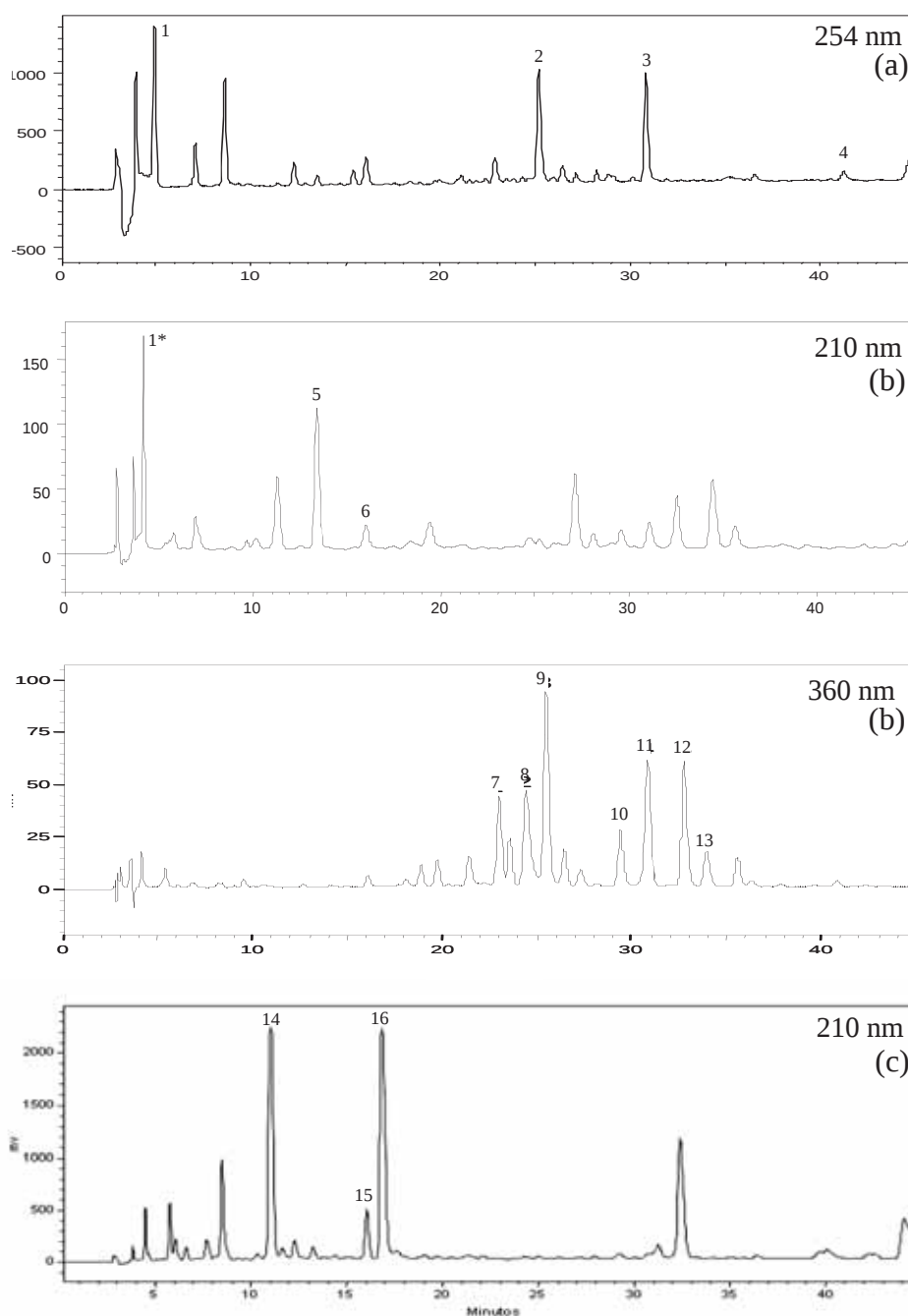


Figura 8. Perfil cromatográfico de *M. cabucu* (a), *M. rubiginosa* (b) e *M. stenostachya* (c) [Coluna Phenomenex luna C₁₈; Solvente A: H₂O + 0,05% TFA e Solvente B: ACN + 0,05% TFA; vazão 1,0 mL.min⁻¹; volume de injeção: 20 µL].

A resolução de uma análise é dada pelo par de picos críticos, ou seja, os que possuem a menor separação. As resoluções apresentadas para as espécies estudadas foram $R_s = 3,43$ (*Mc*), $R_s = 1,25$ (*Mr*) e $R_s = 2,08$ (*Ms*), que são valores adequados para uma matriz complexa como um extrato vegetal. Os métodos apresentaram fator de retenção (k^*) do gradiente dentro da faixa considerada ideal ($1 < k^* < 10$), sendo 3,77 (*Mc*), 3,90 (*Mr*) e 3,90 (*Ms*). Os tempos de análise de 45 minutos foram razoáveis para um extrato vegetal. Os valores encontrados demonstram que a otimização foi eficiente.

Os picos foram identificados por coinjeção com as substâncias isoladas, segundo a Tabela 5.

Tabela 5. Identificação dos picos dos cromatogramas por coinjeção com padrões isolados.

Pico	t_R (min)	Substância
1	4,95	Ácido gálico
1*	4,10	“
2	25,2	miricetina-3- <i>O</i> - α -rhamnopiranosídeo
3	30,8	quercetina-3- <i>O</i> - α -rhamnopiranosídeo
4	41,3	canferol-3- <i>O</i> - β -(6"-cumaroil)-glicopiranosídeo
5	13,3	(-)-(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-epicatequina
6	15,9	casuarictina
7	23,7	quercetina-3- <i>O</i> - α -rhamnopiranosil-(1→4)- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo
8	24,6	schinzandrisídeo
9	27,2	quercetina-3- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo
10	31,0	quercetina-3- <i>O</i> - α -arabinopiranosídeo quercetina-3- <i>O</i> - β -arabinopiranosídeo
11	32,5	canferol-3- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo
12	34,9	quercetina-3- <i>O</i> - α -rhamnopiranosídeo
13	35,9	quercetina-3- <i>O</i> - α -arabinofuranosídeo
14	10,9	(+)-(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-4'- <i>O</i> -metilgalocatequina
15	16,1	(-)-(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-epicatequina
16	16,7	(-)-(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-4'- <i>O</i> -metilepigalocatequina

A substância (-)-epicatequina apresentou tempos de retenção diferentes, comparando os cromatogramas das espécies *M. rubiginosa* e *M. stenostachya*. Isso provavelmente ocorreu devido a presença de substâncias que não absorvem no UV (saponinas, açúcares, entre outros), que podem interagir fortemente com a fase estacionária provocando impedimento estérico e, com isso, diminuindo a interação da mesma com os analitos. Consequentemente, provocam alterações nos t_R . A identidade das substâncias foi comprovada por coinjeção com padrão.

2.3 Fracionamento do infuso das folhas de *Miconia rubiginosa*

A Fração AcOEt foi submetida a fracionamento preliminar através da técnica de Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (“HSCCC: *High Speed Counter-Current Chromatography*”).

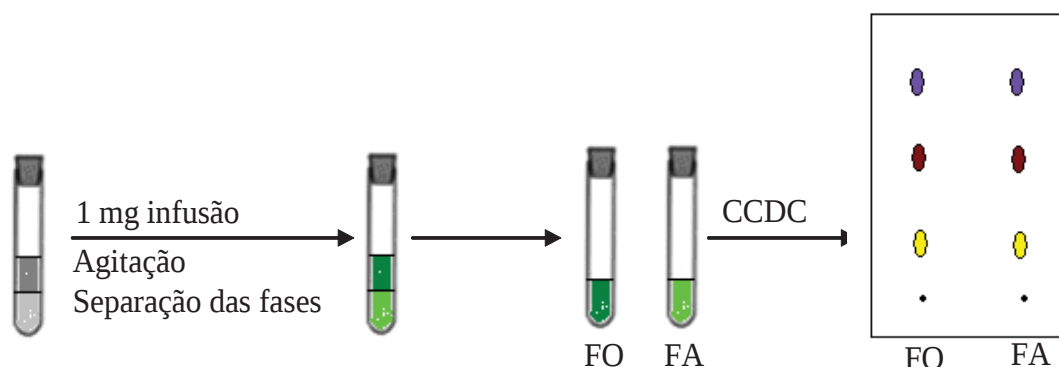
A cromatografia em contracorrente (CCC) é uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido sem o uso de adsorvente, e consiste na utilização de duas fases líquidas imiscíveis, onde uma é a fase móvel e a outra a fase estacionária (CONWAY, 1990).

A distribuição do soluto em cada uma das fases é determinada através de seus respectivos coeficientes de partição (K). Em HSCCC, para que a separação seja eficiente, o K deve ser o mais próximo de um quanto possível. Então $K = \frac{C_O}{C_A} \approx 1$, onde

$$C_A$$

C_O = concentração do analito na fase orgânica e C_A a concentração do analito na fase aquosa.

Existem diversas maneiras de escolher o melhor sistema de solvente para uma determinada amostra, sendo que a utilizada neste trabalho está ilustrada no esquema 2. Foram analisados três sistemas de solventes: AcOEt/*n*-PrOH/H₂O (140:8:80, v/v), AcOEt/*n*-BuOH/H₂O (140:4:80, v/v) e Hex/AcOEt/MeOH/H₂O (1:1:1:1, v/v). Uma das características básicas na escolha é que a amostra seja solúvel no sistema escolhido. A solubilidade do infuso no último sistema testado foi baixa, por isso ele foi descartado. Nos dois primeiros a solubilidade foi muito boa. Além disso, análise por CCDC mostrou que o coeficiente de partição das substâncias presentes no infuso era próximo de 1, propiciando que as mesmas ficassem distribuídas igualmente em cada uma das fases líquidas. O sistema escolhido foi AcOEt/*n*-PrOH/H₂O (140:8:80, v/v), pois o *n*-PrOH é mais volátil que o *n*-BuOH e, portanto, mais fácil de eliminar das frações obtidas.



Esquema 2. Método para escolha do sistema de solvente para HSCCC (1 mg da fração AcOEt do infuso foi dissolvida em 2 mL da mistura de solventes. Após agitação vigorosa e separação das fases, cada uma delas foi aplicada, em quantidades iguais, em placa cromatográfica. Após a eluição da placa, observou-se a distribuição das substâncias nas fases. FO = fase orgânica; FA = fase aquosa)

O sistema escolhido foi preparado em funil de separação, agitado e deixado em repouso por 12 horas para uma total separação e saturação das fases. A fase inferior (aquosa) foi utilizada como fase estacionária e a superior (orgânica) como fase móvel. A fase estacionária foi bombeada para a coluna. Após o preenchimento desta, a fase móvel foi bombeada em um fluxo de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ com o equipamento ligado a uma velocidade de 850 RPM. O volume morto medido foi de 46 mL.

Uma massa de 830 mg da fração AcOEt foi dissolvida em 15 mL do sistema utilizado (1:1 v/v de FO e FA). Essa mistura foi filtrada e injetada no *loop* com auxílio de uma seringa. Coletou-se frações de 5 mL cada, totalizando 154 frações que foram analisadas por CCDC e reunidas. Esse procedimento foi repetido com 600 mg da amostra, obtendo-se uma ótima reprodutibilidade entre as duas injeções.

A fração 29-41 precipitou, originando um composto amorfo amarelo. Esse precipitado foi analisado por HPLC-UV-DAD com padrões isolados da espécie. Por coinjeção a substância foi identificada como quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo, previamente isolada desta espécie (RODRIGUES, 2007).

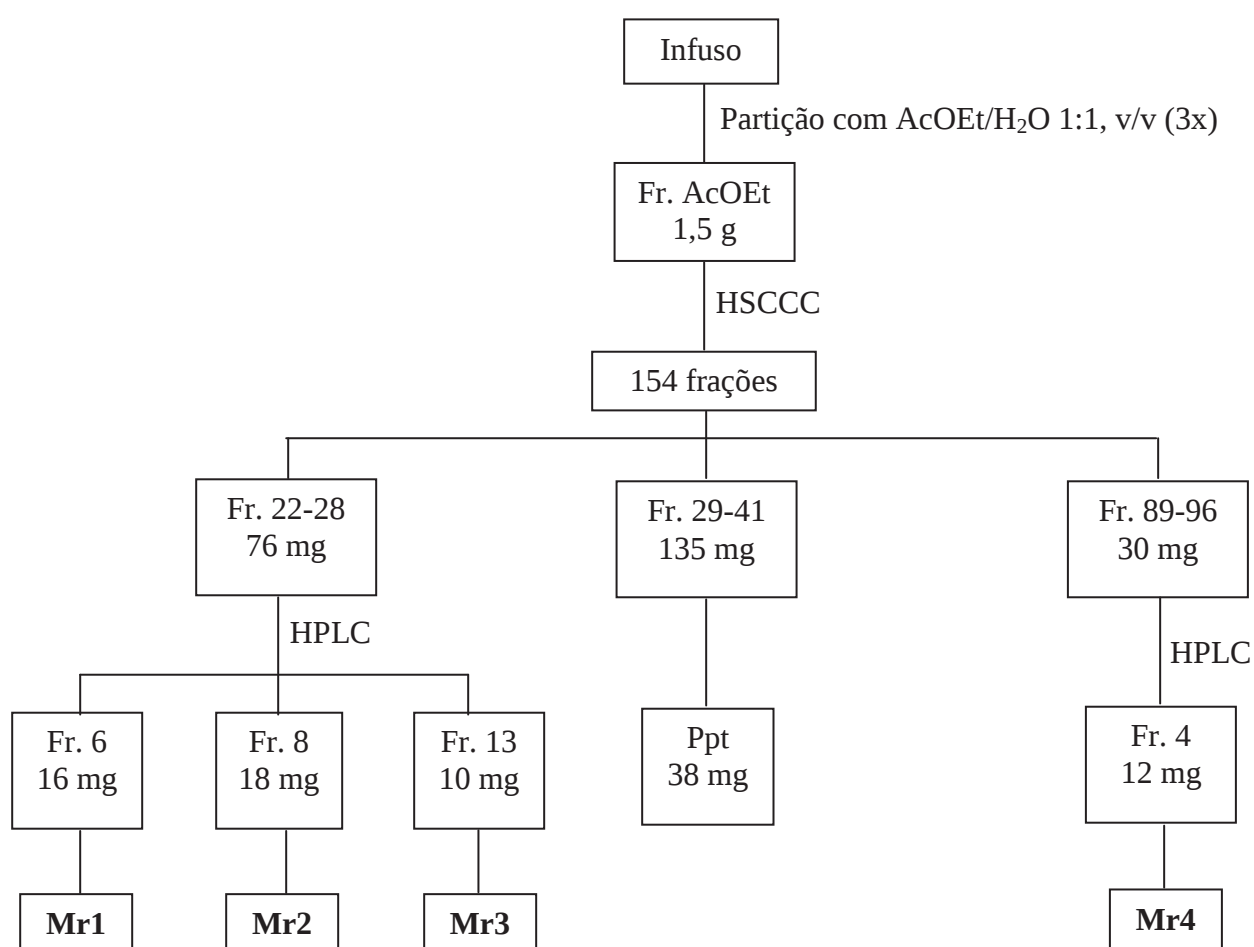
As substâncias presentes nas frações 22-28 e 89-96 foram submetidas à purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) semi-preparativa. Essas frações foram solubilizadas em $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 85:15 (em uma concentração aproximada de $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e filtradas em Millex de $0,45 \mu\text{m}$.

O método utilizado foi o mesmo em todas as injeções: Coluna Phenomenex C₁₈, 250 x 10 mm d.i. x 5 µm; Solvente A (H₂O + 0,05% TFA), Solvente B (ACN + 0,05 % TFA). Gradiente de 15-35% de B em A em 30 minutos, vazão de 4,8 mL.min⁻¹.

Para a fração 22-28 (76 mg) foram realizadas 10 injeções de 80 µL cada e coletadas 15 frações. As frações 6 (**Mr1**), 8 (**Mr2**) e 13 (**Mr3**) foram analisadas por RMN mono e bidimensional.

Foram realizadas 6 injeções (80 µL) da fração 89-96 (30 mg), coletando-se 8 frações. A fração 4 (**Mr4**) foi analisada por RMN mono e bidimensional.

O procedimento fitoquímico utilizado para esta espécie está ilustrado no Esquema 3.



Esquema 3. Fracionamento do infuso das folhas de *Miconia rubiginosa*.

Identificação da (-)-(2R,3R)-epicatequina (**Mr1**)

O espectro de RMN-¹H (Espectro 1) mostrou os sinais da epicatequina, previamente isolada dessa espécie (tabela 6).

Análise do espectro de RMN-¹H de **Mr1** apresentou o sinal de um dubleto em δ 6,89 ($J = 1,5$ Hz, H2'), além de sinais em δ 6,67 (m , H6') e δ 6,66 (m , H5').

Outros sinais foram observados em δ 5,89 (d , $J = 2,0$ Hz, H8) e δ 5,73 (d , $J = 2,0$ Hz, H6) referentes ao anel A e δ 4,74 (s , H2), δ 4,02 (s , H3), δ 2,67 (dd , $J = 4,5$ e $16,0$ Hz, H4a) e δ 2,50 (dd , $J = 4,5$ e $16,0$ Hz, H4b) referentes ao anel C.

Tabela 6. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H de **Mr1** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).

Posição	Mr1	(-)-(2R,3R)-epicatequina*
2	4,74 <i>sl</i>	4,73 <i>s</i>
3	4,02 <i>sl</i>	4,01 <i>s</i>
4a	2,67 <i>dd</i> (4,5; 16,0)	2,68 <i>dd</i> (4,5; 16,5)
4b	2,50 <i>dd</i> (4,5; 16,0)	2,46 <i>dd</i> (3,5; 16,5)
6	5,73 <i>d</i> (2,0)	5,72 <i>d</i> (2,0)
8	5,89 <i>d</i> (2,0)	5,88 <i>d</i> (2,5)
2'	6,89 <i>d</i> (1,5)	6,88 <i>d</i> (1,5)
5'	6,66 <i>m</i>	6,65 <i>m</i>
6'	6,67 <i>m</i>	6,66 <i>m</i>

* RODRIGUES, 2007

Foi realizada a análise por HPLC-CD para estabelecer a configuração absoluta de **Mr1**. Comparação do tempo de retenção ($t_R = 20,0$) dessa substância no cromatograma obtido (Fig. 9) com o cromatograma dos quatro padrões de catequina (Fig. 32, p. 112), identifica a substância como a (-)-epicatequina. O EC (Efeito Cotton) positivo em 240 nm (transição L_a , cromóforo B) e o EC negativo em 280 nm (transição L_b , cromóforo A), indicam as configurações 3-R e 2-R, respectivamente, para **Mr1**.

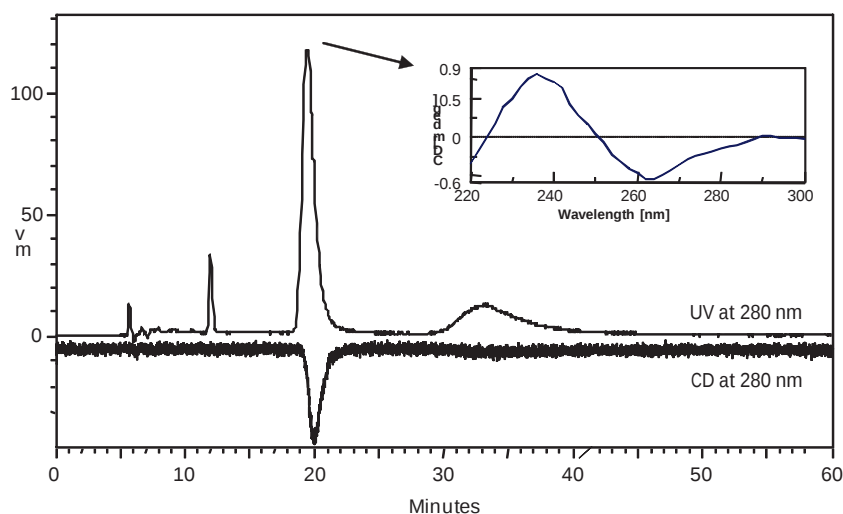


Figura 9. Cromatograma e espectro de CD de **Mr1** em Hex/EtOH (75:25, v/v) [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; vazão 0,5 mL.min⁻¹; volume de injeção: 10 μ L; λ 280 nm].

A substância **Mr1** foi identificada, portanto, como a (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina (Fig. 10).

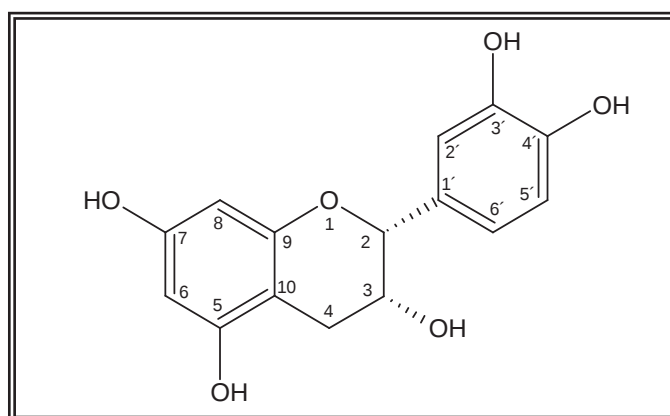


Figura 10. Estrutura da (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina (**Mr1**) isolada de *M. rubiginosa*.

Identificação da casuarictina (**Mr2**)

O espectro de **Mr2** mostrou sinais referentes a um elagitanino monomérico. Os elagitaninos são um grande subgrupo dos taninos hidrolisáveis. Essa classe de substâncias foi encontrada em seis gêneros pertencentes à família Melastomataceae, utilizados medicinalmente: *Medinilla*, *Heterocentrum*, *Tibouchina*, *Melastoma*, *Bredia* e *Monochaetum*.

(YOSHIDA et al., 1992; 1994; 1999; 2005; ISAZA et al., 2001). Os taninos hidrolisáveis são responsáveis pelas propriedades adstringentes dessas plantas.

O espectro de RMN-¹H de **Mr2** (Espectro 2) mostrou sinais em δ 6,44, 6,38, 6,25 e 6,18 (s, 1H cada, H6/6'), referentes a dois grupos hexaidroxibifenil (HHDP). A presença de um grupo galoil foi comprovada pelo singlete em δ 7,02 (H2/6).

O sinal em δ 6,27 (d, $J = 8,5$ Hz, H1 Glc) referente ao próton anomérico indica que o grupo galoil está ligado à unidade de açúcar na posição equatorial (anômero β) (OKUDA et al., 1984).

Os experimentos bidimensionais (gHMQC e gHMBC) (Espectros 3 e 4) possibilitaram as correlações entre os sinais, que comparados com os sinais da literatura possibilitaram confirmar a identidade da molécula.

Os sinais de RMN apresentam pequenas diferenças em relação aos valores encontrados na literatura (Tabela 7) devido ao fato dos autores terem realizado os experimentos utilizando acetona deuterada como solvente.

Tabela 7. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C de **Mr2** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	
	Mr2	1(β)-O-galloylpedunculagin**	Mr2	Cuspinin***
Éster C=O	-	-	169,0	168,5
	-	-	168,0	168,1
	-	-	167,9	168,0
	-	-	167,0	167,3
	-	-	164,5	165,0
Gal				
1	-	-	*	121,9
2/6	7,02 <i>s</i>	7,18 <i>s</i>	108,8	110,5
3/5	-	-	146,0	146,2
4	-	-	140,0	138,6
HHDP				
1/1'	-	-	*	119,8 – 126,2
2/2'	-	-	*	111,1 – 117,8
3/3'	-	-	*	144,3 – 145,6
4/4'	-	-	*	136,5 – 140,0
5/5'	-	-	*	144,3 – 145,6
6/6'	6,18 – 6,44 <i>s</i>	6,37 – 6,68	104,4 – 105,6	
Glc				
1	6,27 <i>d</i> (8,5)	6,22 <i>d</i> (8,0)	90,6	92,4
2	5,00 <i>t</i> (10,0)	5,22 <i>t</i> (9,0)	74,4	73,2
3	5,49 <i>t</i> (9,0)	5,47 <i>t</i> (9,0)	75,0	77,2
4	4,99 <i>t</i> (10,0)	5,18 <i>t</i> (9,0)	68,0	69,6
5	4,58 <i>dd</i> (7,0; 9,0)	4,51 <i>dd</i> (7,0; 9,0)	71,8	78,2
6	5,12 <i>dd</i> (6,5; 13,0)	5,37 <i>dd</i> (7,0; 14,0)	62,0	63,1
	3,84 <i>d</i> (13,0)	3,88 <i>d</i> (14,0)		

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

* Valores de RMN-¹³C não observados

** TANAKA et al., 1993

*** NONAKA et al., 1989

A substância **Mr2** foi identificada como a casuarictina, um elagitanino β -glicosilado monomérico.

Devido à rotação restrita da ligação bifenil, existe atropisomerismo nos grupos hexaidroxibifenil (NONAKA et al., 1989). Foi realizado, então, o estudo de **Mr2** por HPLC-CD.

A casuarictina exibe três Efeitos Cotton nas regiões de 235, 265 e 285 nm. Esses ECs estão associados com as bandas de conjugação do grupo bifenil no espectro de UV. O EC em 235 nm é diagnóstico da configuração absoluta do grupo HHDP [positivo para configuração (*S_a*) e negativo para a (*R_a*)] (OKUDA et al., 1982).

O espectro de CD de **Mr2** (Fig. 11) exibiu um EC positivo em 235 nm, indicando a configuração (*S_a*) para os grupos HHDP (Fig. 12).

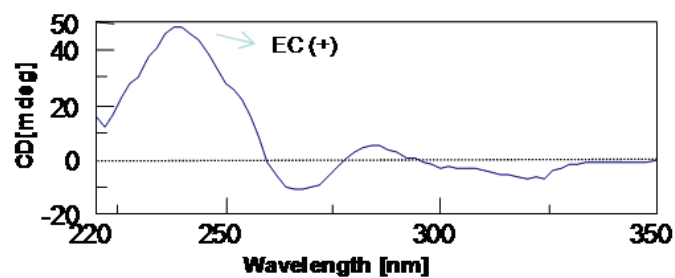


Figura 11. Espectro de CD de **Mr2** em MeOH/H₂O (4:6, v/v) [Coluna Chiralcel OD-RH; Solvente A: H₂O + 0,05% Ác. fórmico e Solvente B: MeOH + 0,05% Ác. fórmico; vazão 0,5 mL.min⁻¹; volume de injeção: 10 µL; λ 235 nm].

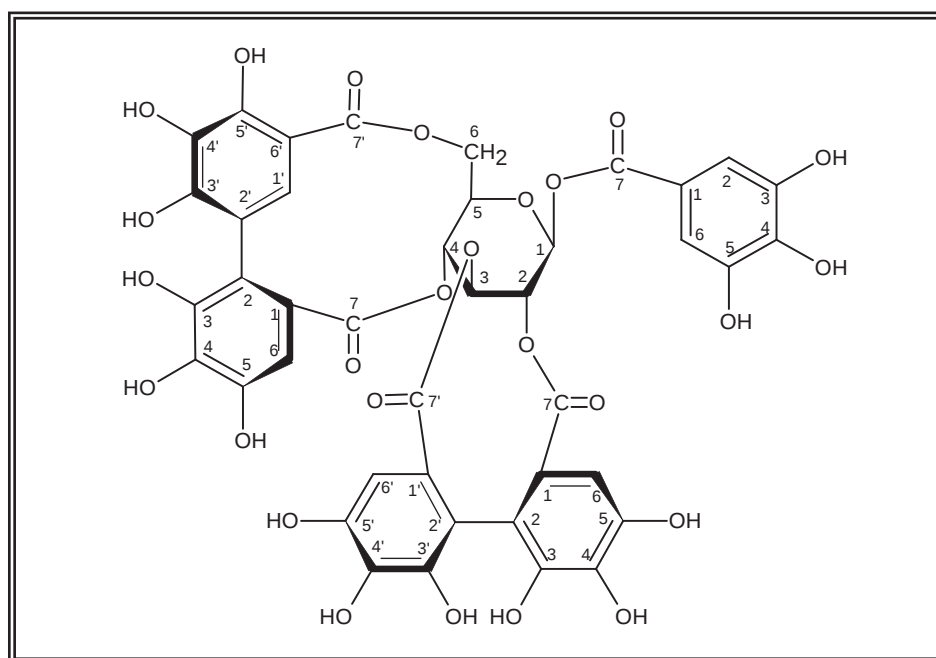


Figura 12. Casuarictina (**Mr2**) isolada de *M. rubiginosa*.

A casuarictina é um exemplo de tanino hidrolisável. Plantas ricas em taninos são usadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças, como discutido na introdução (MONAGAS et al., 2009; WANNES et al., 2010).

Identificação do canferol-3-O-β-galactopiranosídeo (Mr3)

O espectro de RMN-¹H (Espectro 5, Tabela 8) mostrou os sinais na região aromática característicos de um flavonoide: os dubletos em δ 6,19 e δ 6,42, ambos com *J* = 2,0 Hz, referentes aos hidrogênios H6 e H8 do anel A e os dubletos em δ 6,85 e δ 8,05, ambos com *J*

= 9,0 Hz, referentes aos hidrogênios H3'/5' e H2'/6', indicando que o anel B é monossustituído.

No espectro de RMN-¹H observa-se, ainda, um dubleto em δ 5,37 ($J = 8,0$ Hz, H1') referente ao hidrogênio anomérico de uma unidade de açúcar. O espectro de 1D-TOCSY (Espectro 6), forneceu a sequência dos deslocamentos químicos de uma galactose.

Tabela 8. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H de **Mr3** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).

Posição	Mr3	Trifolin*
6	6,19 <i>d</i> (2,0)	6,21 <i>d</i> (2,0)
8	6,42 <i>d</i> (2,0)	6,43 <i>d</i> (2,0)
2'/6'	8,05 <i>d</i> (9,0)	8,07 <i>d</i> (9,0)
3'/5'	6,85 <i>d</i> (9,0)	6,88 <i>d</i> (9,0)
1''	5,37 <i>d</i> (8,0)	5,25 <i>d</i> (7,0)
2''	3,52 <i>dd</i> (5,0; 12,5)	-
3''	3,35 <i>dd</i> (6,0; 11,5)	-
4''	3,64 <i>sl</i>	-
5''	-	-
6''	-	-
OH	10,2 – 12,6	-

* LIU; CHEN; WANG, 2009

Os dados obtidos sugerem que essa substância é o canferol-3-*O*- β -galactopiranosídeo (Fig. 13).

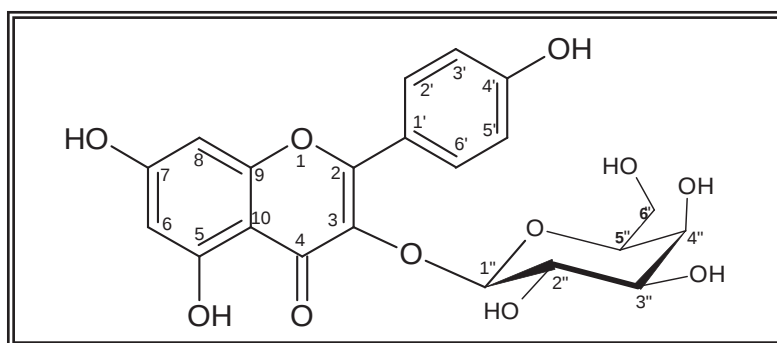


Figura 13. Canferol-3-*O*- β -galactopiranosídeo (**Mr3**) isolado de *M. rubiginosa*.

A substância **Mr3** foi submetida à análise por HPLC-UV-DAD com adição de padrão, confirmando sua identidade.

Identificação do schizandrisídeo (Mr4)

O espectro de RMN-¹H de **Mr4** (Espectros 7 e 8, Tabela 9) indicou a presença de dois anéis aromáticos, ambos com dois substituintes eletronegativos. Os singletos em δ 6,08 e δ 6,61, correspondentes aos H3 e H6 respectivamente, indicam que estão na posição para, no anel A. Um dubleto em δ 6,79 ($J = 1,5$ Hz, H2'), um dubleto em δ 6,69 ($J = 8,0$ Hz, H5') e um duplo dubleto em δ 6,48 ($J = 1,5$ e $8,0$ Hz, H6') evidenciaram que o anel B é dissustituído.

Observou-se também a presença de sinais referentes a três hidrogênios metilênicos (H7, H9 e H9'), dois dos quais ligados a átomos de oxigênio, três metinos (H8, H7' e H8') e uma unidade de xilose. O valor da constante de acoplamento do hidrogênio anomérico (δ 3,93, $J = 7,5$ Hz, H1''), indica tratar-se de β -xilose.

Sinais equivalentes a dois grupos metoxílicos (integração para 6 Hs) foram observados em δ 3,70 e δ 3,72. Os valores de δ de ¹³C foram obtidos através das correlações observadas nos espectros gHMQC e gHMBC (Espectros 9 e 10). O experimento de gHMBC (Espectro 12) mostrou acoplamento desses sinais com os C5 e C3' (δ 146,3 e δ 147,9, respectivamente), indicando que estão ligadas nessas posições ao esqueleto da lignana.

A correlação do H1'' (δ 3,93) com o C9' (δ 67,7), observada no espectro de gHMBC (Espectro 11), permitiu confirmar que a unidade de açúcar está ligada nesta posição.

Comparação dos dados obtidos com a literatura permitem identificar a substância **Mr4** como uma lignana glicosilada.

Tabela 9. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C de **Mr4** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	
	Mr4	Schizandriside**	Mr4*	Schizandriside**
1	-	-	127,6	129,1
2	-	-	133,0	134,3
3	6,08 <i>s</i>	6,16 <i>s</i>	116,4	117,4
4	-	-	144,9	145,1
5	-	-	146,3	147,1
6	6,61 <i>s</i>	6,64 <i>s</i>	112,0	112,3
7	2,73 <i>d</i> (6,5)	2,77-2,86 <i>m</i>	33,0	33,9
8	1,89 <i>tt</i> (3,5; 10,5)	2,03-2,10 <i>m</i>	38,5	39,6
9	3,58 <i>dd</i> (4,0; 10,0) 3,47 <i>m</i>	3,76 <i>dd</i> (3,7; 11,0) 3,70 <i>dd</i> (6,1; 11,0)	63,0	65,1
1'	-	-	137,5	138,6
2'	6,79 <i>d</i> (1,5)	6,67 <i>d</i> (1,8)	114,5	114,2
3'	-	-	147,9	148,9
4'	-	-	145,4	145,8
5'	6,69 <i>d</i> (8,0)	6,73 <i>d</i> (8,2)	115,8	116,1
6'	6,48 <i>dd</i> (1,5; 8,0)	6,62 <i>dd</i> (1,8; 8,2)	121,4	123,1
7'	4,02 <i>d</i> (10,5)	4,05 <i>dl</i> (10,3)	46,0	47,9
8'	1,72 <i>t</i> (10,5)	1,84 <i>tt</i> (2,8; 10,3)	44,9	45,9
9'	2,99 <i>m</i> 3,86 <i>dd</i> (2,5; 9,5)	3,21 <i>dd</i> (3,1; 10,1) 3,97 <i>dd</i> (2,4; 10,1)	67,7	69,3
1''	3,93 <i>d</i> (7,5)	4,04 <i>d</i> (7,6)	105,2	105,8
2''	2,99 <i>m</i>	3,18 <i>dd</i> (7,6; 9,2)	73,6	75,0
3''	3,09 <i>dt</i> (9,0)	3,28 <i>t</i> (8,9)	77,0	77,9
4''	3,27 <i>m</i>	3,42-3,47 <i>m</i>	72,0	71,3
5''	2,98 <i>m</i> 3,66 <i>dd</i> (5,5; 11,5)	3,11 <i>dd</i> (10,4; 11,3) 3,80 <i>dd</i> (5,8; 11,3)	66,0	66,9
OCH ₃	3,70 <i>s</i>	3,78 <i>s</i>	56,0	56,4
OCH ₃	3,72 <i>s</i>	3,79 <i>s</i>	56,0	56,3

* Valores de RMN-¹³C atribuídos através dos experimentos gHMQC e gHMBC** Resultados obtidos em CD₃OD (SADHU et al., 2007)

A configuração absoluta de **Mr4** foi estabelecida por HPLC-CD baseando-se nas seguintes evidências: Klyne, Stevenson e Swan (1966) propuseram uma regra empírica para o espectro de CD de lignanas deste tipo. Estabeleceram que todos os derivados 7' α de 7'-ariltetralinas apresentavam EC positivo na região de 280-290 nm; enquanto que derivados 7' β , apresentavam EC negativo nessa região.

Como pode-se observar no espectro de CD de **Mr4** (Fig. 14), o EC em 284 nm é negativo, indicando que o grupo aril está orientado em β (configuração *S* no C-7'). A configuração do grupo no C-8' foi estabelecida em α , devido ao valor da constante de acoplamento entre H-7' e H-8' (J = 10,5 Hz), que indica posicionamento *trans* diaxial entre os H7' e H8'. O grupo no C-8, por sua vez, é β orientado, como pode ser comprovado pela constante de acoplamento *trans* diaxial entre H-8 e H-8' (J = 10,5 Hz).

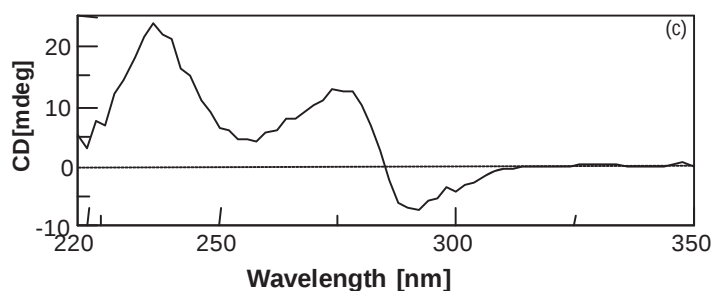


Figura 14. Espectro de CD de **Mr4** em MeOH/H₂O (4:6, v/v) [Coluna Chiralcel OD-RH; Solvente A: H₂O + 0,05% Ác. fórmico e Solvente B: MeOH + 0,05% Ác. fórmico; vazão 0,5 mL.min⁻¹; volume de injeção: 10 µL; λ 284 nm].

A substância **Mr4** foi identificada, portanto, como schinzandrisídeo (Fig. 15), tendo a configuração absoluta 7'-(S), 8-(R) e 8'-(R).

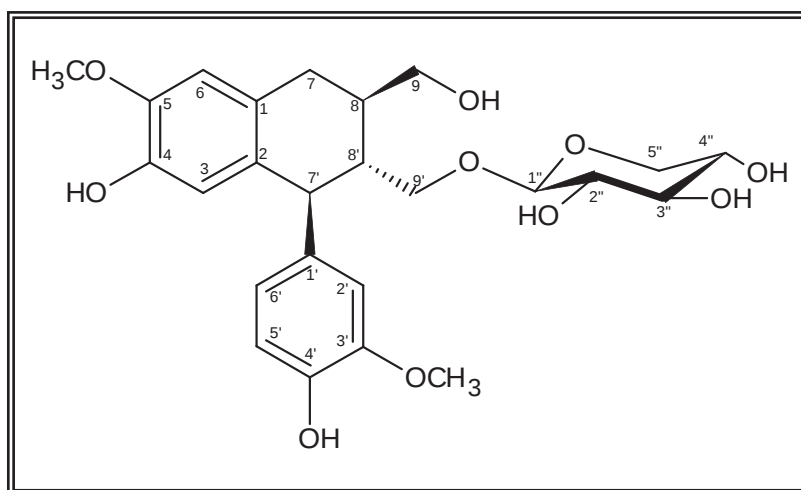


Figura 15. Schinzandrisídeo (**Mr4**) isolada de *M. rubiginosa*.

O schinzandrisídeo foi aqui isolado pela primeira vez de espécies de *Miconia*. Essa substância possui atividade antioxidante moderada (SADHU et al., 2007). Apresenta, também, atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus* (DONG et al., 2006).

2.4 Fracionamento do infuso das folhas de *Miconia stenostachya*

Para o fracionamento da fração AcOEt do infuso de *M. stenostachya* utilizou-se uma coluna Sephadex LH-20 como fase estacionária (Fig. 16). Este tipo de adsorvente proporciona boa separação de compostos polares, não causando muita adsorção.

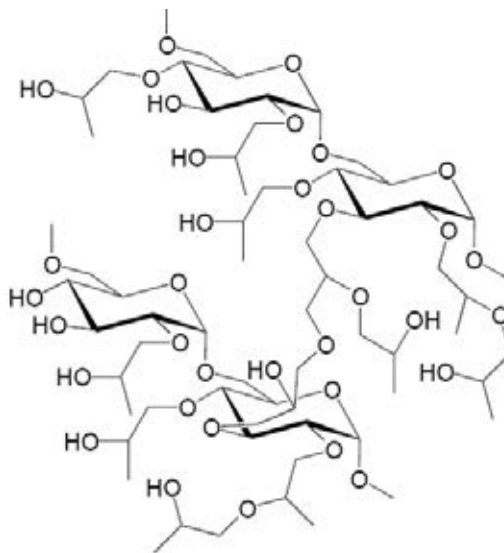


Figura 16. Estrutura parcial da Sephadex LH-20.

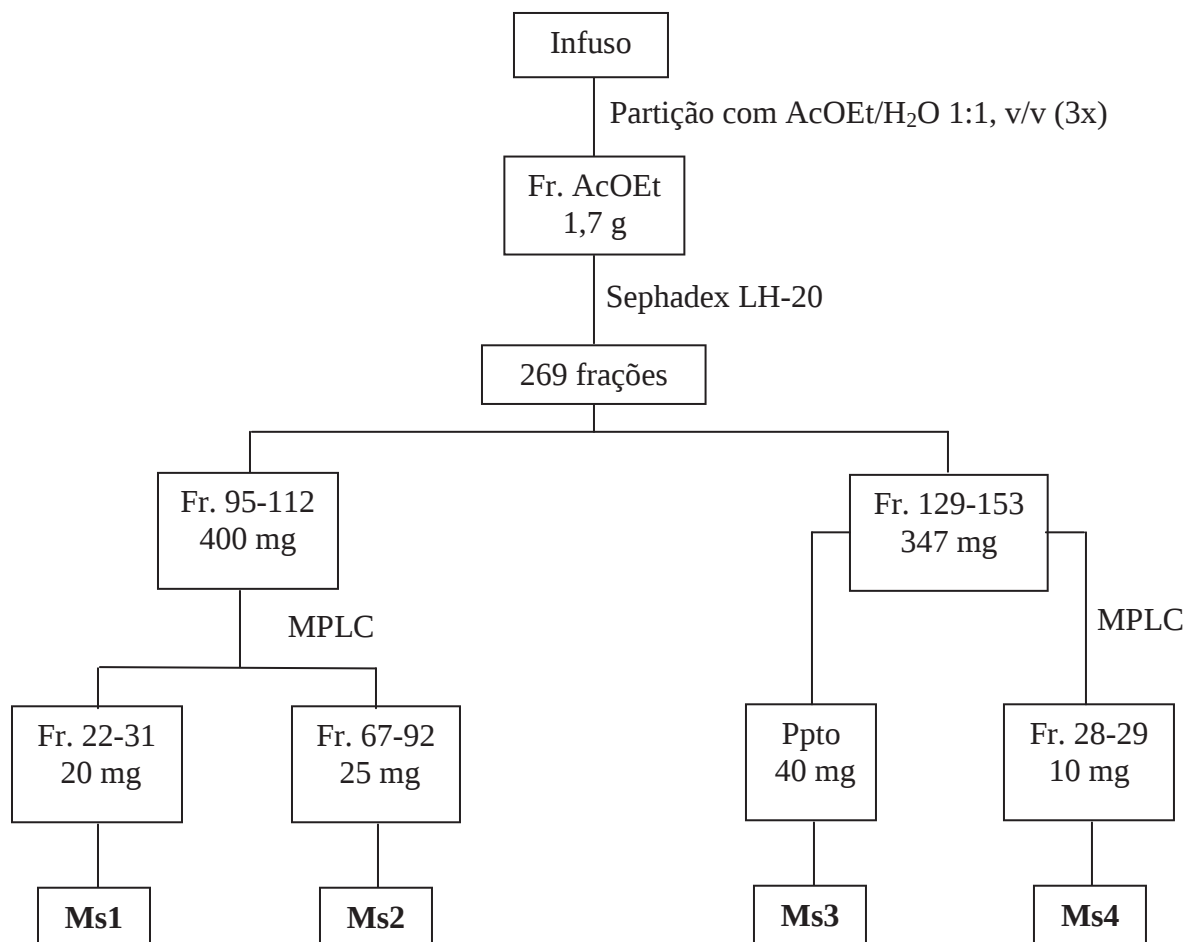
A fração AcOEt (1,7 g) obtida na partição foi dissolvida em 10 mL de MeOH e centrifugada (3x). Injetou-se a amostra na coluna de Sephadex LH-20 e procedeu-se a eluição com MeOH, em fluxo de 0,5 mL.min⁻¹.

As 269 frações (5 mL cada) obtidas foram analisadas por CCDC, utilizando como reveladores luz UV e anisaldeído/ácido sulfúrico. As frações semelhantes foram agrupadas.

A fração 95-112 (400 mg) foi submetida à Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC) utilizando um gradiente de MeOH/H₂O (de 5 a 100 % de MeOH) como eluente. As frações 22-31 (**Ms1**) e 67-92 (**Ms2**) apresentaram-se puras e foram analisadas por HPLC e RMN.

A fração 129-153 (347 mg) foi purificada por MPLC, utilizando o mesmo gradiente da fração anterior. Ao dissolver a fração em H₂O/MeOH 95:5, houve a formação de um precipitado amarelo (**Ms3**). A fração 28-29 (**Ms4**) apresentou-se pura e, juntamente com o precipitado, foram analisados por HPLC e RMN.

O procedimento fitoquímico utilizado para esta espécie está ilustrado no Esquema 4.



Esquema 4. Fracionamento do infuso das folhas de *M. stenostachya*.

Identificação da (+)-(2R,3S)-4'-O-metilgalocatequina (**Ms1**)

O espectro de RMN-¹H de **Ms1** apresentou sinais na região de aromáticos (Espectro 13, Tabela 10), característicos de um derivado de catequina.

A análise do espectro de RMN-¹H de **Ms1** apresentou singlete intenso em δ 6,28, referente aos H2' e H6', indicando que o anel B é trissubstituído. Outros sinais foram observados em δ 5,88 (*d*, *J* = 2,5 Hz, H8) e δ 5,71 (*d*, *J* = 2,5 Hz, H6) referentes ao anel A e δ 4,45 (*d*, *J* = 7,5 Hz, H2), δ 3,80 (*d*, *J* = 6,5 Hz, H3), δ 2,62 (*dd*, *J* = 5,1 e 15,9 Hz, H4a) e δ 2,37 (*dd*, *J* = 7,8 e 16,2 Hz, H4b) referentes ao anel C. Além disso, observa-se o sinal em δ 3,65 (3H), referente a uma metoxila.

Os deslocamentos químicos dos carbonos foram obtidos através das correlações observadas no espectro de gHMQC e gHMBC (Espectros 14 e 15).

Os valores da literatura mostram que a catequina e a epicatequina são diferenciadas pelo valor do C2, o qual para a catequina apresenta deslocamento químico próximo a δ 81,0 (WENKERT; GOTTLIEB, 1977) e para a epicatequina em aproximadamente δ 78,0 (MARKHAM; TERNAL, 1976). O valor do C2 de **Ms1** (δ 80,6) indica tratar-se de um derivado da catequina. Além disso, as constantes de acoplamento dos picos referentes aos hidrogênios H2 e H3 ($J = 7,5$ e $J = 6,5$ Hz, respectivamente) confirmam sua posição *trans* no anel C.

No espectro de gHMBC (Espectro 16) pode-se observar a correlação do sinal em δ 3,65 com o C4' (δ 135,4), indicando que a metoxila está ligada ao esqueleto da catequina nesta posição.

Tabela 10. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C da substância **Ms1** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	Ms1		4'-O-methylgallo catechin**	
	RMN- ¹ H	RMN- ¹³ C*	RMN- ¹ H	RMN- ¹³ C*
2	4,45 <i>d</i> (7,5)	80,6	4,57 <i>d</i> (7,0)	82,4
3	3,80 <i>d</i> (6,5)	66,6	3,98 <i>m</i>	68,6
4a	2,62 <i>dd</i> (5,1; 15,9)	27,6	2,79 <i>dd</i> (5,5; 16,3)	27,9
4b	2,37 <i>dd</i> (7,8; 16,2)		2,51 <i>dd</i> (7,6; 16,3)	
5	-	156,8	-	157,5
6	5,88 <i>d</i> (2,5)	95,1	5,94 <i>d</i> (1,8)	96,4
7	-	+	-	157,7
8	5,71 <i>d</i> (2,5)	93,8	5,89 <i>d</i> (1,8)	95,6
9	-	156,0	-	156,6
10	-	99,8	-	100,7
1'	-	135,6	-	136,6
2'/6'	6,28 <i>s</i>	106,1	6,42 <i>s</i>	107,4
3'/5'	-	150,7	-	151,5
4'	-	135,4	-	136,4
OCH ₃	3,65 <i>s</i>	60,0	3,78 <i>s</i>	60,8

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

** GARCIA et al., 1993.

+ Valores de RMN-¹³C não observados nos espectros bidimensionais

Os resultados obtidos permitiram identificar a substância **Ms1** como a (+)-(2*R*,3*S*)-4'-O-metilgalocatequina (Fig. 17), o que foi confirmado pela análise por HPLC-CD-DAD com padrão (Fig. 18).

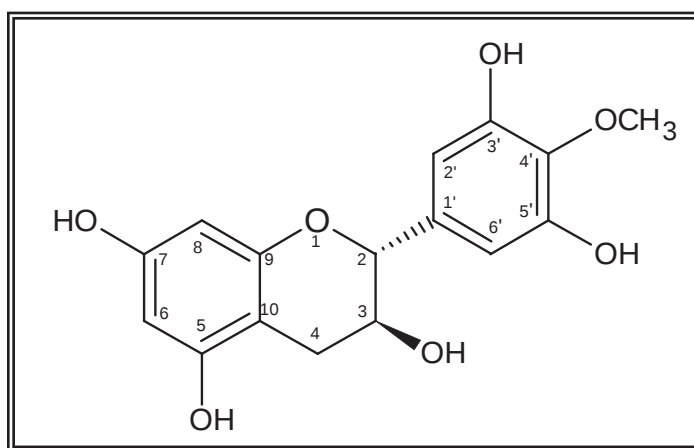


Figura 17. (+)-(2*R*,3*S*)-4'-*O*-Metilgalocatequina (**Ms1**) isolada de *M. stenostachya*.

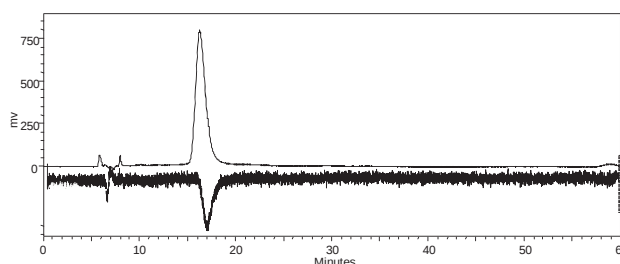


Figura 18. Cromatograma de **Mr1** em Hex/EtOH (75:25, v/v) [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; vazão 0,5 mL.min⁻¹; volume de injeção: 10 µL; λ 280 nm].

O cromatograma CD mostra que a substância desvia a luz circularmente polarizada negativamente em 280 nm. Esse desvio é característico de derivados da (+)-catequina, como discutido no capítulo 2 desta tese.

*Identificação da (-)-(2*R*,3*R*)-4'-*O*-metilepigalocatequina (**Ms2**)*

O espectro de RMN-¹H de **Ms2** (Espectro 17, Tabela 11) mostra sinais muito parecidos com **Ms1**. Observou-se um singlete intenso em δ 6,38, referente aos H2' e H6', indicando que o anel B é trissubstituído. Outros sinais foram observados em δ 5,86 (*d*, *J* = 2,4 Hz, H8) e δ 5,71 (*d*, *J* = 2,4 Hz, H6) referentes ao anel A e δ 4,66 (*sl*, H2), δ 4,00 (*sl*, H3), δ

2,44 (*dd*, $J = 3,5$ e $16,5$ Hz, H4a) e δ 2,66 (*dd*, $J = 5,0$ e $16,5$ Hz, H4b) referentes ao anel C. Além disso, observa-se o sinal em δ 3,63 (3H), referente a uma metoxila.

Os valores dos deslocamentos de carbono foram obtidos através das correlações observadas no espectro de gHMQC e gHMBC (Espectros 18 e 19).

No espectro de gHMBC (Espectro 20) pode-se observar a correlação do sinal em δ 3,66 com o C4' (δ 134,6), indicando que a metoxila está ligada ao esqueleto da catequina nesta posição.

Tabela 11. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C da substância **Ms2** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).

Posição	Ms2	(-)-4'-methylepigallocatechin**	
	RMN- ^1H	RMN- ^{13}C *	RMN- ^{13}C **
2	4,66 <i>sl</i>	77,8	79,6
3	4,00 <i>sl</i>	64,5	67,3
4a	2,44 <i>dd</i> (3,5; 16,5)	+	29,1
4b	2,66 <i>dd</i> (5,0; 16,5)		
5	-	156,5	157,9
6	5,71 <i>d</i> (2,4)	94,0	96,3
7	-	95,3	157,5
8	5,86 <i>d</i> (2,4)	94,9	95,8
9	-	156,5	157,1
10	-	98,9	100,0
1'	-	135,2	135,9
2'/6'	6,38 <i>s</i>	106,0	107,1
3'/5'	-	150,0	151,3
4'	-	134,6	136,5
OCH ₃	3,63 <i>s</i>	59,5	60,7

* Valores de RMN- ^{13}C atribuídos através dos experimentos gHMQC e gHMBC.

** RMN- ^{13}C em CD₃OD (HUSSEIN et al., 1999)

+ Valores de RMN- ^{13}C não observados nos espectros bidimensionais

Foi realizada a análise por HPLC-CD para estabelecer a configuração absoluta de **Ms2** (Fig. 19). O EC positivo em 240 nm (transição L_a, cromóforo B) e o EC negativo em 280 nm (transição L_b, cromóforo A), indicam as configurações 3-*R* e 2-*R*, respectivamente.

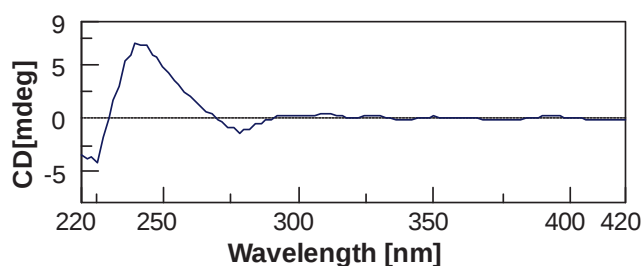


Figura 19. Espectro de CD de **Ms2** em Hex/EtOH (75:25, v/v) [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; vazão 0,5 mL.min⁻¹; volume de injeção: 10 µL; λ 280 nm].

A substância **Ms2** foi identificada, portanto, como a (-)-(2*R*,3*R*)-4'-*O*-metilepigalocatequina (Fig. 20)

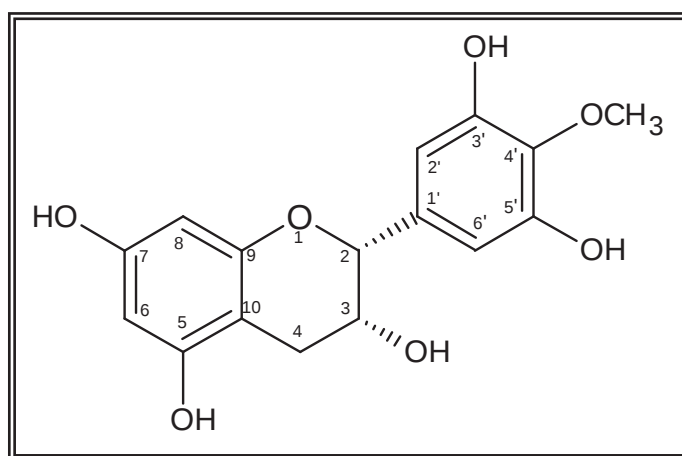


Figura 20. (-)-(2*R*,3*R*)-4'-*O*-metilepigalocatequina (**Ms2**) isolada de *M. stenostachya*.

Identificação da miricetina-3-*O*-α-*rhamn*opiranosídeo (**Ms3**)

O espectro de RMN-¹H (Espectro 21, Tabela 12) mostrou um singlete em δ 6,87, referente aos H2' e H6' de um flavonoide, indicando que o anel B é trissubstituído. Pode-se observar também, sinais em δ 6,19 (*d*, *J* = 2,0 Hz) e δ 6,35 (*d*, *J* = 2,0 Hz) referentes aos H6 e H8 do anel A, indicando que se trata de um derivado da miricetina.

O dubleto em δ 5,19 ($J = 1,5$ Hz, H1'') e o sinal em δ 0,84 (d , $J = 6,5$ Hz, H6'') sugerem a presença de uma unidade de rhamnose. O espectro 1D-TOCSY (Espectro 22) confirmou a natureza do açúcar, pois irradiando-se o H1'' (anomérico), houve correlação somente com H2'' (δ 3,97). A sequência dos deslocamentos químicos da unidade de açúcar foi obtida através dos experimentos 1D-TOCSY e COSY (Espectros 22 e 23).

Os valores dos deslocamentos de carbono foram obtidos através das correlações observadas nos espectros de gHMQC e gHMBC (Espectros 24 e 25).

Tabela 12. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C da substância **Ms3** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).

Posição	Ms3		Myricitrin**	
	RMN- ^1H	RMN- ^{13}C *	RMN- ^1H	RMN- ^{13}C
2	-	157,5	-	156,2
3	-	+	-	134,5
4	-	+	-	177,8
5	-	161,6	-	161,4
6	6,19 <i>d</i> (2,0)	98,4	6,19 <i>d</i> (2,3)	98,7
7	-	164,0	-	164,1
8	6,35 <i>d</i> (2,0)	93,2	6,35 <i>d</i> (2,3)	93,6
9	-	156,2	-	157,4
10	-	104,0	-	104,2
1'	-	+	-	119,8
2' / 6'	6,87 <i>s</i>	107,6	6,94 <i>s</i>	108,3
3' / 5'	-	145,6	-	145,8
4'	-	136,5	-	136,5
1''	5,19 <i>d</i> (1,5)	101,7	5,30 <i>d</i> (1,8)	102,1
2''	3,97 <i>sl</i>	69,8	4,21 <i>dd</i> (1,8; 3,2)	70,5
3''	3,55 <i>d</i> (9,0)	70,1	3,78 <i>dd</i> (3,2; 9,2)	70,7
4''	3,14 <i>t</i> (9,5)	70,4	3,51 <i>dq</i> (6,4; 9,2)	71,6
5''	3,32 <i>m</i>	70,9	3,33 <i>t</i> (9,2)	70,1
6''	0,84 <i>d</i> (6,5)	18,0	0,95 <i>d</i> (6,4)	21,4

* Valores de RMN- ^{13}C atribuídos através dos experimentos gHMQC e gHMBC.

+ Valores de RMN- ^{13}C não observados

** CHUNG et al., 2004 / MARKHAM et al., 1978

Comparação dos dados de **Ms3** com os existentes na literatura e a análise por HPLC-UV-DAD com padrão confirmaram a identificação da substância como sendo a miricetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo, ilustrada na Figura 21.

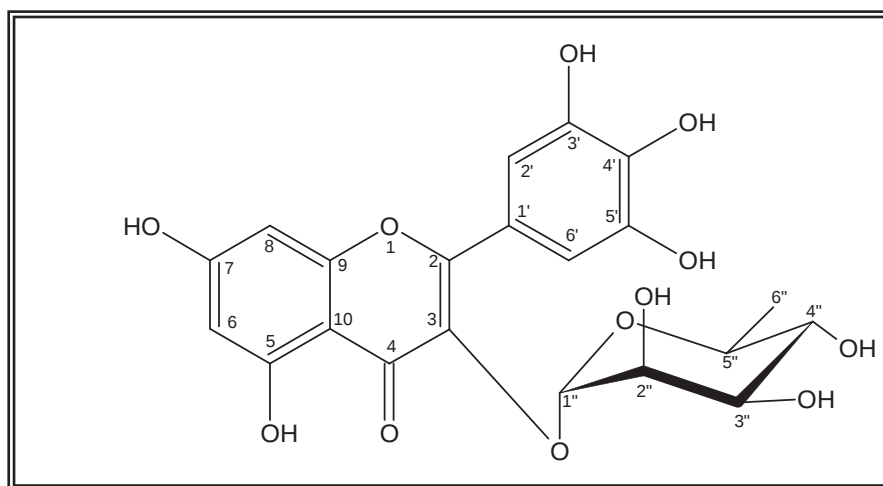


Figura 21. Miricetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo (**Ms3**) isolada de *M. stenostachya*.

Identificação da (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina (**Ms4**)

O espectro de RMN-¹H (Espectro 26) mostrou os sinais da epicatequina, previamente isolada dessa espécie (tabela 13).

Tabela 13. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H de **Ms4** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	Ms4	(-)-(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-epicatequina*
2	4,71 <i>s</i>	4,73 <i>s</i>
3	3,99 <i>d</i> (2,5)	4,01 <i>s</i>
4a	2,68 <i>dd</i> (4,5; 16,5)	2,68 <i>dd</i> (4,5; 16,5)
4b	2,45 <i>dd</i> (3,5)	2,46 <i>dd</i> (3,5; 16,5)
6	5,70 <i>d</i> (2,0)	5,72 <i>d</i> (2,0)
8	5,87 <i>d</i> (2,0)	5,88 <i>d</i> (2,5)
2'	6,87 <i>d</i> (1,5)	6,88 <i>d</i> (1,5)
5'	6,64 <i>m</i>	6,65 <i>m</i>
6'	6,64 <i>m</i>	6,66 <i>m</i>

* RODRIGUES, 2007

Foi realizada a análise por HPLC-CD para estabelecer a configuração absoluta de **Ms4** (Fig. 22). O EC positivo em 240 nm (transição L_a, cromóforo B) e o EC negativo em 280 nm (transição L_b, cromóforo A), indicam a configuração 3-*R* e 2-*R*, respectivamente, para **Ms4**.

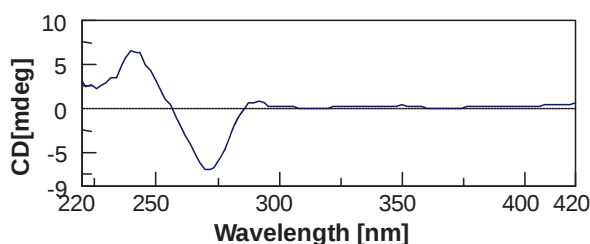


Figura 22. Espectro de CD de **Ms4** em Hex/EtOH (75:25, v/v) [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; vazão 0,5 mL.min⁻¹; volume de injeção: 10 µL; λ 280 nm].

A substância **Ms4** foi identificada, portanto, como a (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina (Fig. 23).

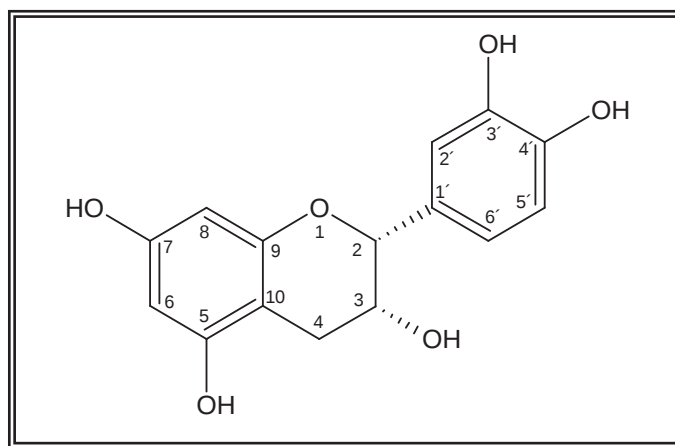


Figura 23. (-)-(2*R*,3*R*)-Epicatequina (**Ms4**) isolada de *M. stenostachya*.

As substâncias quirais isoladas das espécies de *Miconia* foram analisadas por HPLC-CD-DAD, utilizando coluna quiral (OD-H), com o sistema Hex/EtOH (75:25, v/v) como eluente para verificar sua pureza enantiomérica. Em todos os cromatogramas observou-se apenas um pico, indicando que essas substâncias estão na forma enantiomericamente pura.

2.5 Dados físicos e espectroscópicos das substâncias isoladas

(-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina (**Mr1**): sólido amorfo marrom avermelhado; C₁₅H₁₄O₆ (MM 290,27); [α]_D -26° (*c* = 0,1 g/100mg, MeOH); UV λ_{max} (*c* = 0,1 g/100 mL, MeOH) nm (log ϵ) 209, 279; CD ver figura 9; RMN-¹H ver tabela 6.

Casuarictina (**Mr2**): sólido amorfo marrom avermelhado; $C_{41}H_{28}O_{26}$ (MM 936,65); $[\alpha]_D -4^\circ$ ($c = 0,1$ g/100mg, MeOH); UV λ_{max} ($c = 0,1$ g/100 mL, MeOH) nm 219, 286nm; IV ν_{max} cm^{-1} 3222 (ν_{O-H}), 1719 ($\nu_{C=O}$), 1607 e 1444 ($\nu_{C=C arom}$), 1051 (δ_{O-H}); CD ver figura 11; RMN- 1H e RMN- ^{13}C ver tabela 7.

Kaempferol-3-*O*- β -galactopiranosídeo (**Mr3**): sólido amorfo amarelo; $C_{21}H_{20}O_{11}$ (MM 448,38); UV λ_{max} ($c = 0,1$ g/100 mL, MeOH) nm 206, 265, 347; RMN- 1H ver tabela 8.

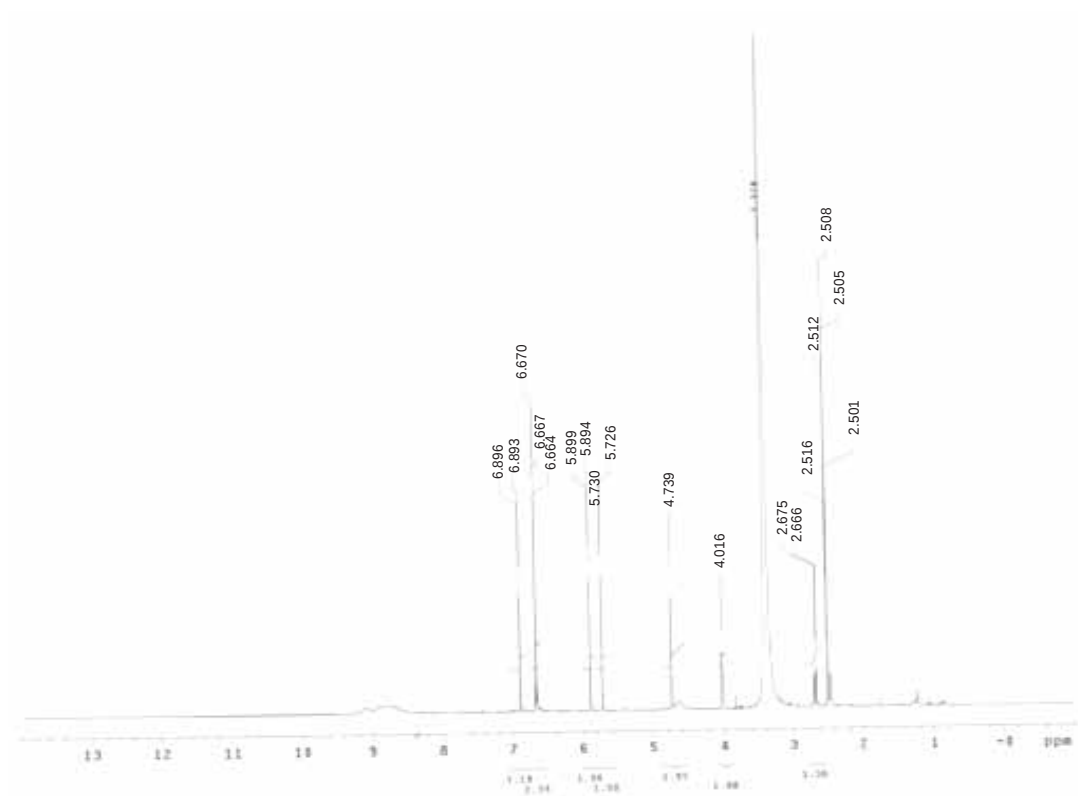
Schizandrisídeo (**Mr4**): sólido amorfo amarelo; $C_{25}H_{32}O_{10}$ (MM 492,51); $[\alpha]_D +20^\circ$ ($c = 0,1$ g/100mg, MeOH); UV λ_{max} ($c = 0,1$ g/100 mL, MeOH) nm 207, 284; CD ver figura 14; RMN- 1H e RMN- ^{13}C ver tabela 9.

(+)-(2*R*,3*S*)-4'-*O*-Metilgalocatequina (**Ms1**): sólido amorfo marrom avermelhado; $C_{16}H_{16}O_7$ (MM 320,29); $[\alpha]_D +0,9^\circ$ ($c = 0,1$ g/100mg, MeOH); UV λ_{max} ($c = 0,1$ g/100 mL, MeOH) nm 212, 272; IV ν_{max} cm^{-1} 3338 (ν_{O-H}), 2928 ($\nu_{C-H alif}$), 1604, 1523 e 1456 ($\nu_{C=C arom}$), 1046 (δ_{O-H}); RMN- 1H e RMN- ^{13}C ver tabela 10.

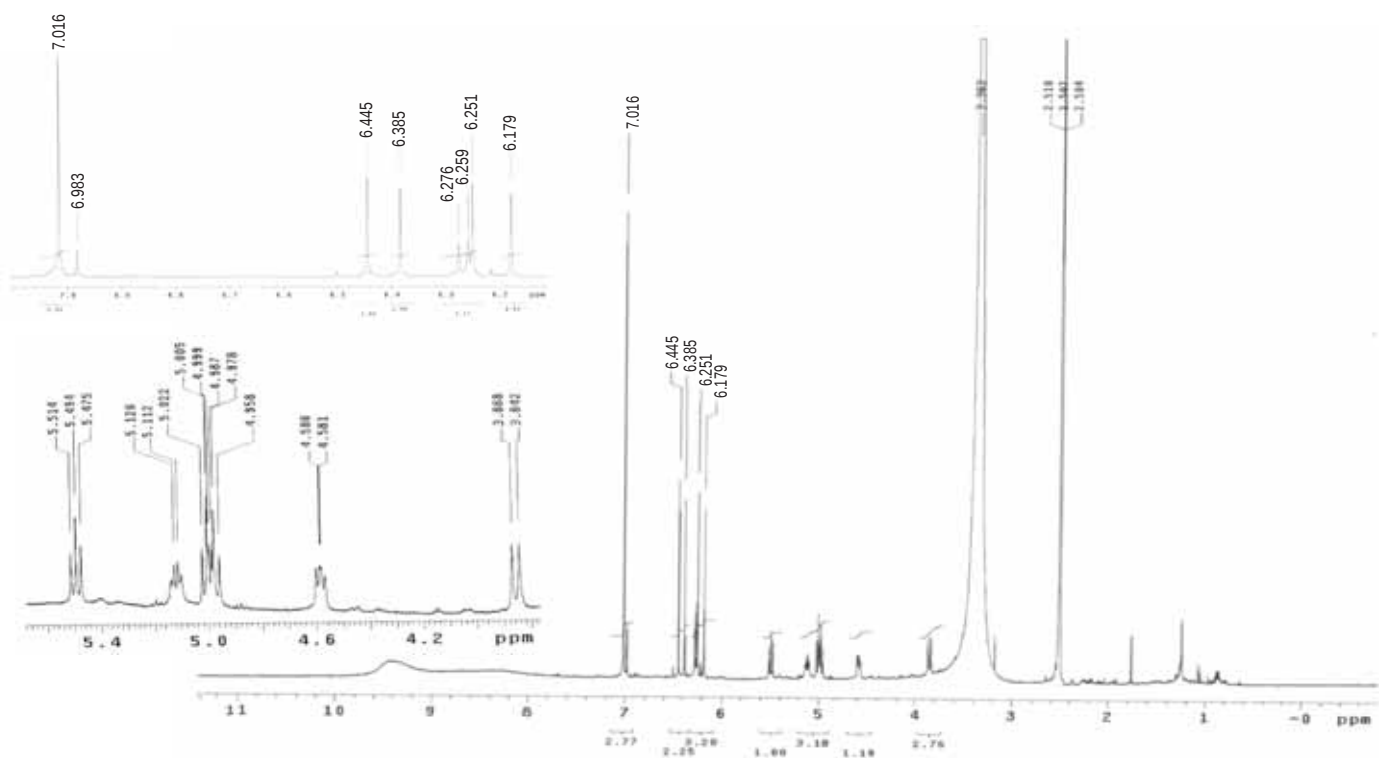
(-)-(2*R*,3*R*)-4'-*O*-Metilepigalocatequina (**Ms2**): sólido amorfo marrom avermelhado; $C_{16}H_{16}O_7$ (MM 320,29); $[\alpha]_D -17^\circ$ ($c = 0,1$ g/100mg, MeOH); UV λ_{max} ($c = 0,1$ g/100 mL, MeOH) nm 213, 272; IV ν_{max} cm^{-1} 3369 (ν_{O-H}), 2928 ($\nu_{C-H alif}$), 1603, 1509 e 1437 ($\nu_{C=C arom}$), 1052 (δ_{O-H}); CD ver figura 19; RMN- 1H e RMN- ^{13}C ver tabela 11.

Miricetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo (**Ms3**): sólido amorfo amarelo; $C_{21}H_{20}O_{12}$ (MM 464,38); UV λ_{max} ($c = 0,1$ g/100 mL, MeOH) nm 213, 260, 350; IV ν_{max} cm^{-1} 3257 (ν_{O-H}), 2924 ($\nu_{C-H alif}$), 1653 ($\nu_{C=O}$), 1602, 1498 e 1450 ($\nu_{C=C arom}$), 1057 (δ_{O-H}); RMN- 1H e RMN- ^{13}C ver tabela 12.

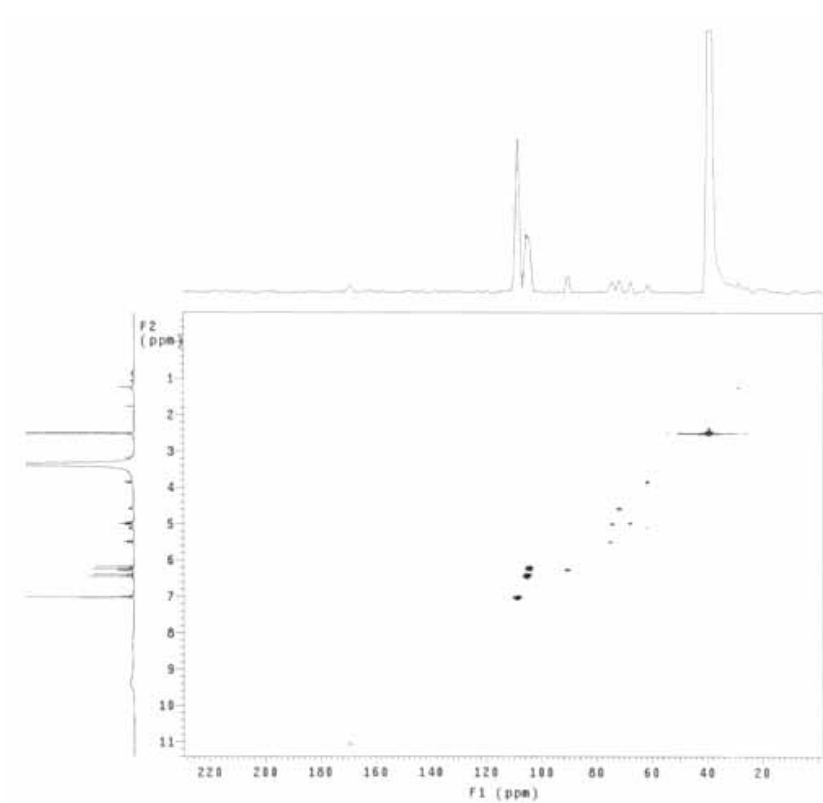
(-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina (**Ms4**): sólido amorfo marrom avermelhado; $C_{15}H_{14}O_6$ (MM 290,27); $[\alpha]_D -20^\circ$ ($c = 0,1$ g/100mg, MeOH); UV λ_{max} ($c = 0,1$ g/100 mL, MeOH) nm 207, 279; IV ν_{max} cm^{-1} 3244 (ν_{O-H}), 2923 ($\nu_{C-H alif}$), 1611, 1518 e 1447 ($\nu_{C=C arom}$); CD ver figura 22; RMN- 1H ver tabela 13.



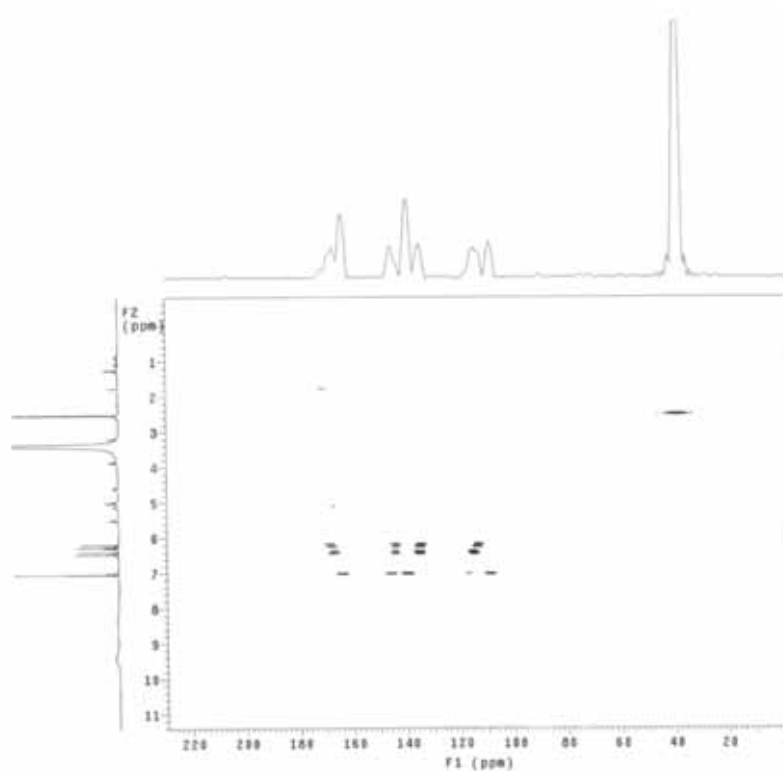
Espectro 1. RMN- ^1H da substância **Mr1** ($\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T).



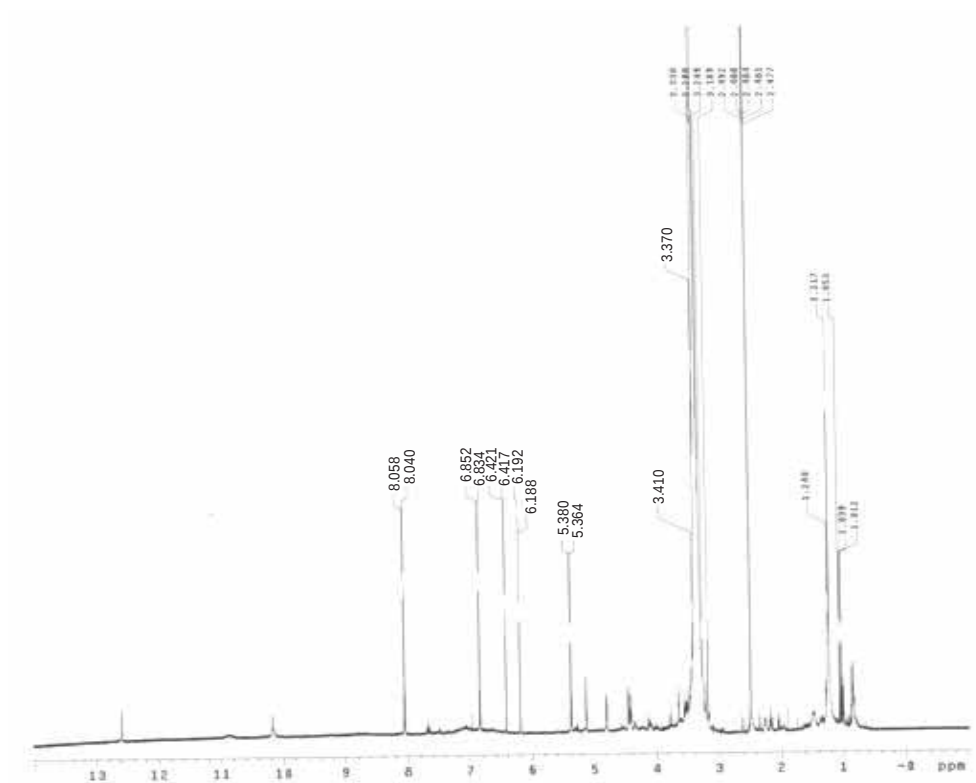
Espectro 2. RMN- ^1H da substância **Mr2** e expansões ($\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T).



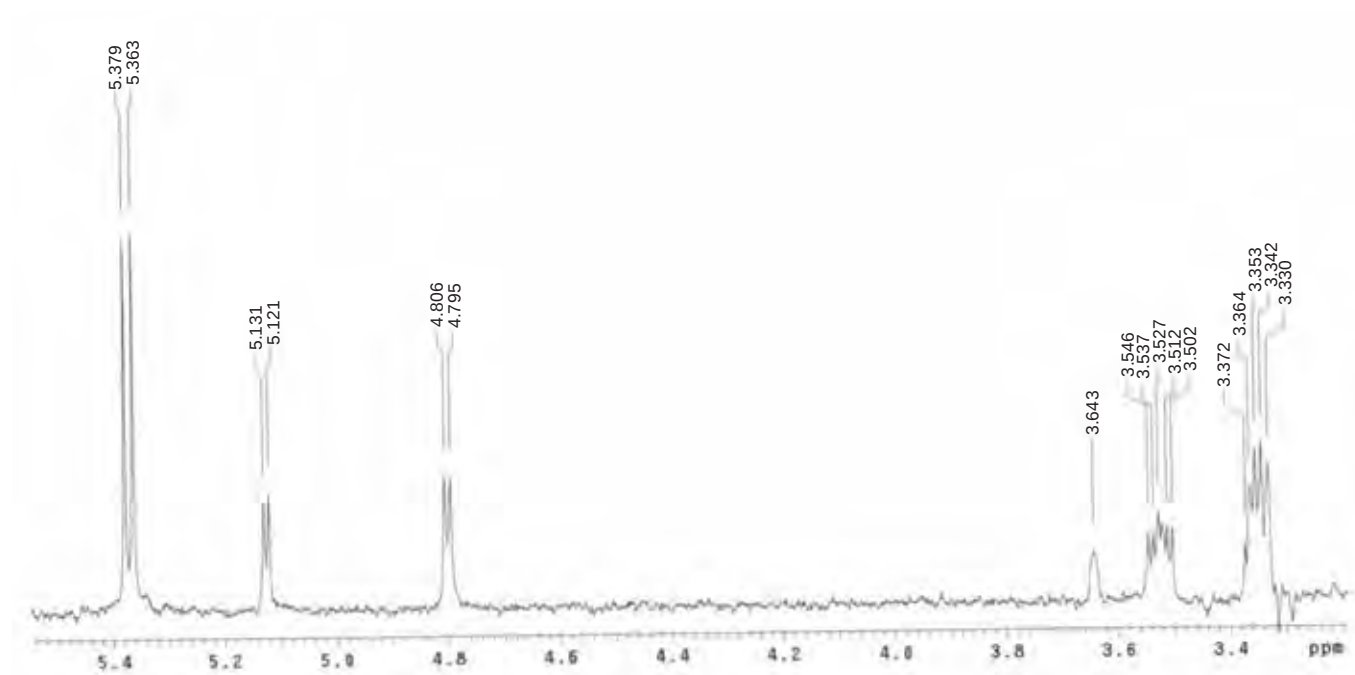
Espectro 3. gHMQC da substância **Mr2** ($\text{DMSO-}d_6$, 11,7 T).



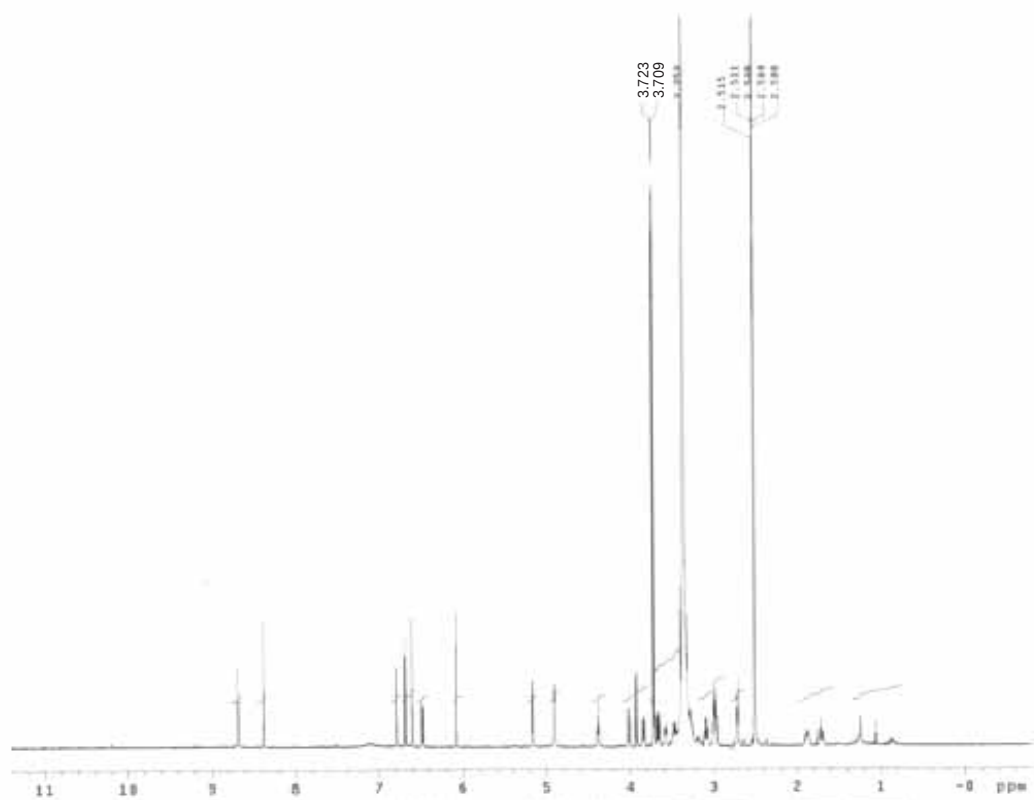
Espectro 4. gHMBC da substância **Mr2** (DMSO- d_6 , 11,7 T).



Espectro 5. RMN- ^1H da substância **Mr3** ($\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T).

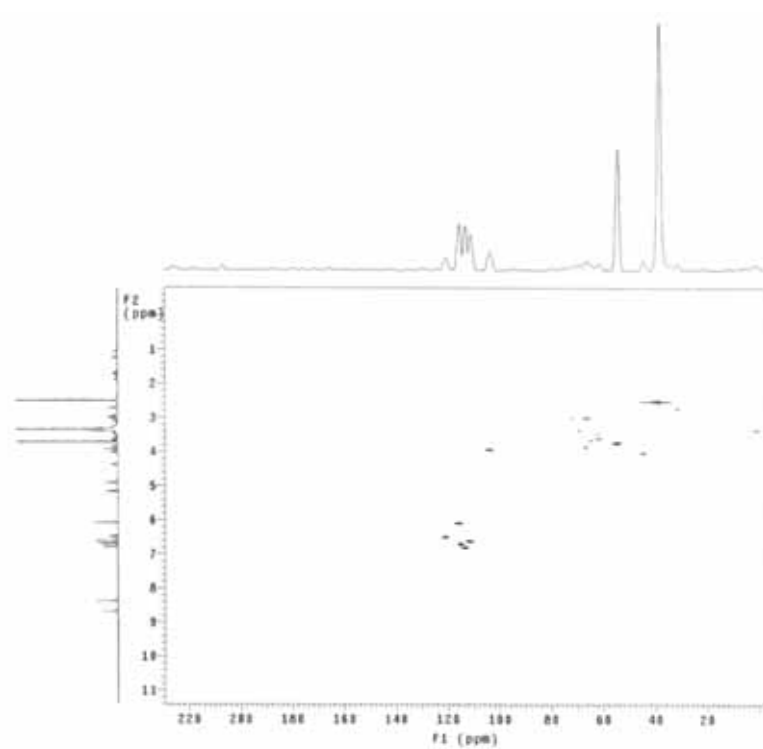


Espectro 6. 1D-TOCSY da substância **Mr3**, irradiado em δ 5,37 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

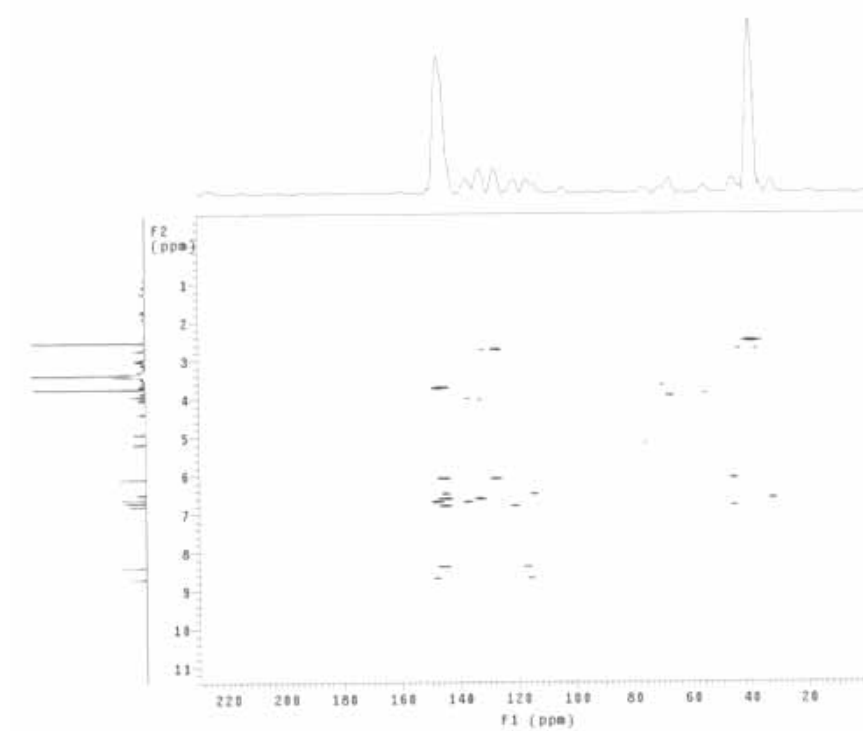


Espectro 7. RMN- ^1H da substância **Mr4** ($\text{DMSO-}d_6$, 11,7 T).

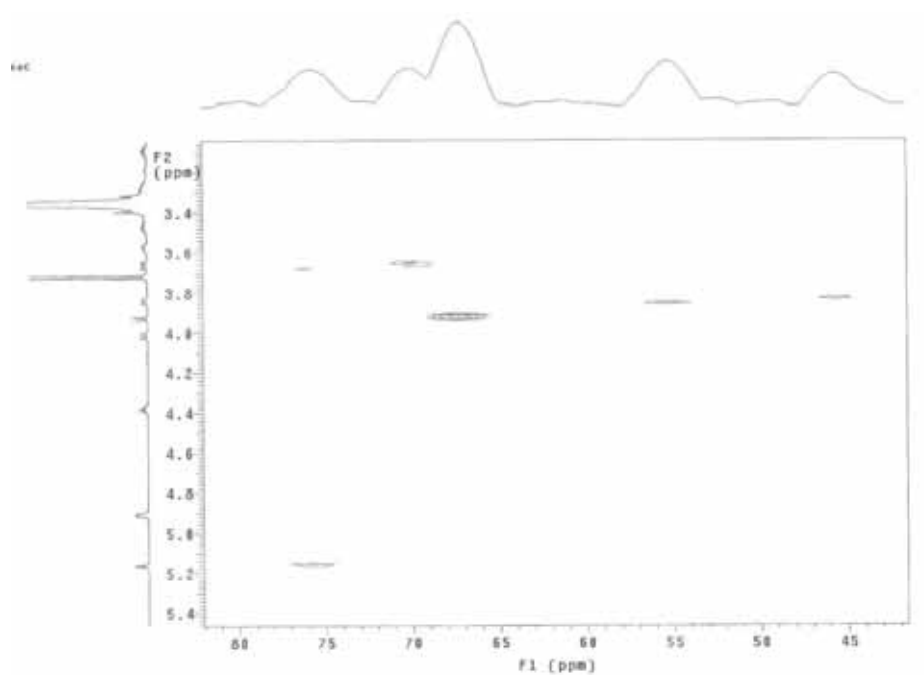




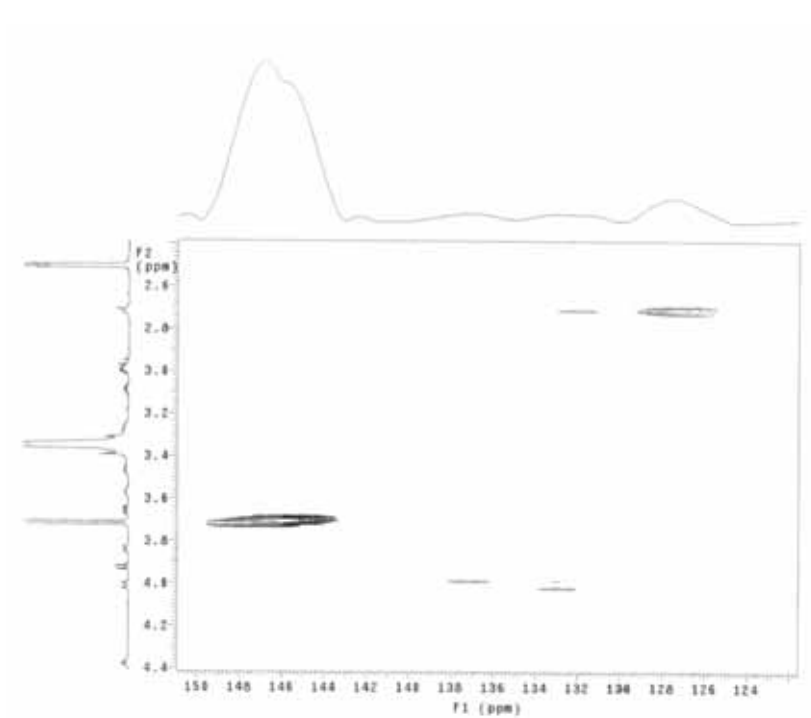
Espectro 9. gHMQC da substância **Mr4** (DMSO- d_6 , 11,7 T).



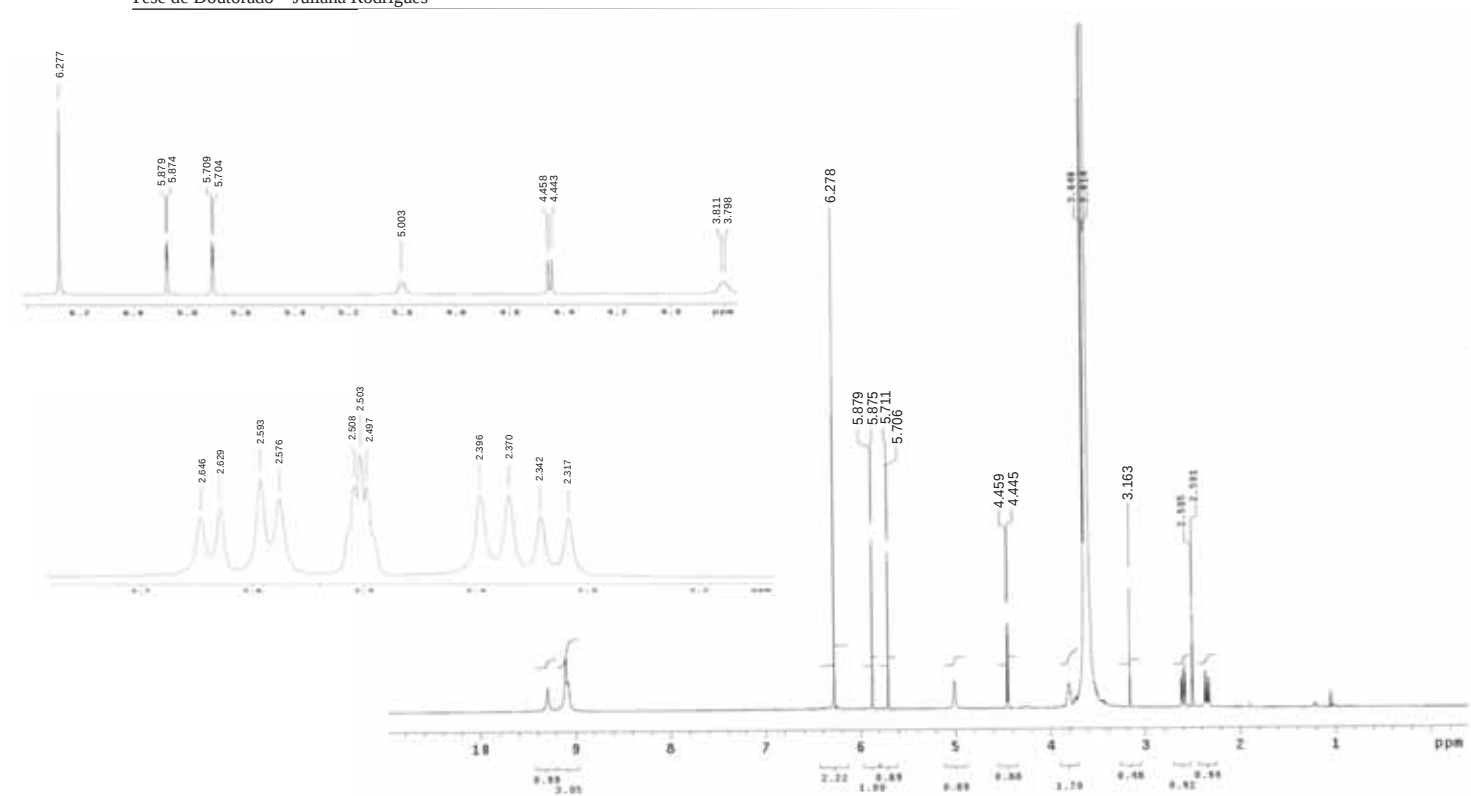
Espectro 10. gHMBC da substância **Mr4** (DMSO- d_6 , 11,7 T).



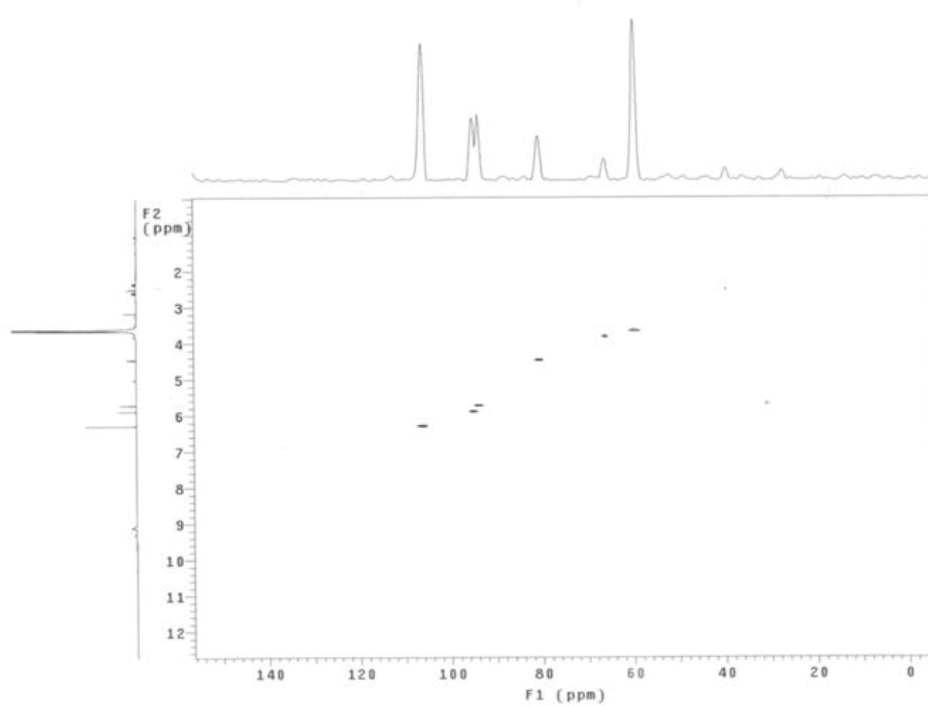
Espectro 11. gHMBC da substância **Mr4** (expansão 3,2 a 5,4 / 45 a 80 ppm) (DMSO- d_6 , 11,7 T).



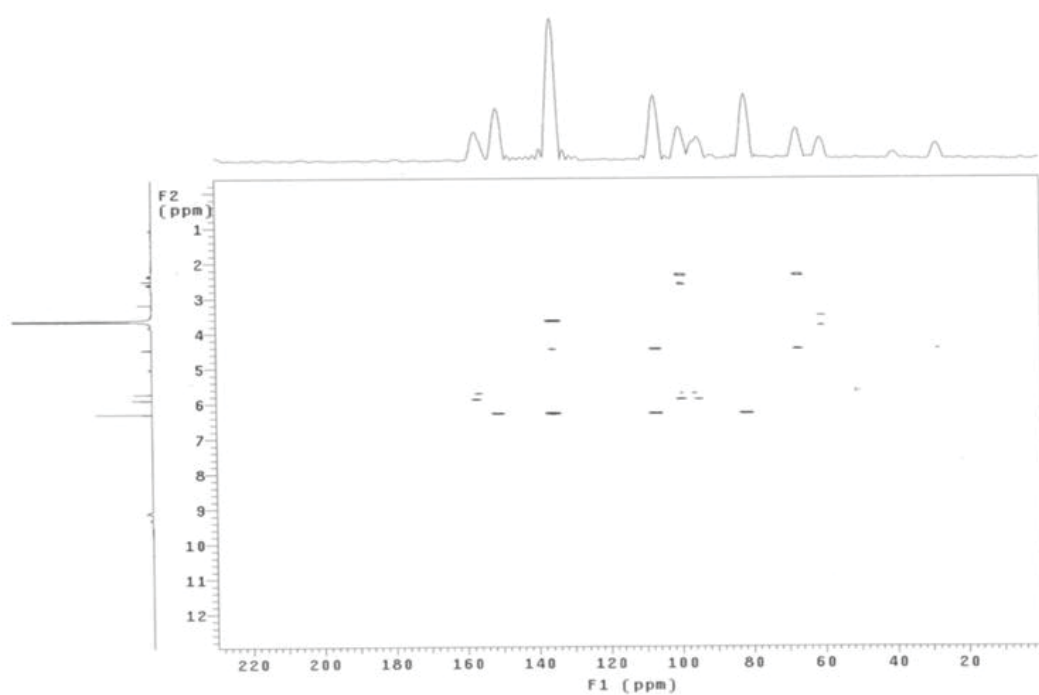
Espectro 12. gHMBC da substância **Mr4** (expansão 2,4 a 4,4 / 122 a 150 ppm) (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



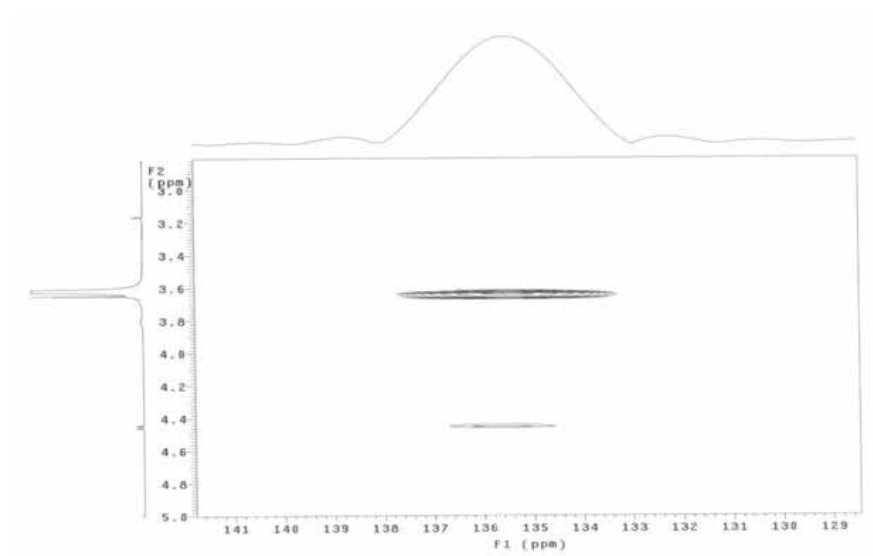
Espectro 13. RMN- ^1H da substância **Ms1** e expansões ($\text{DMSO-}d_6$, 11,7T e 7,02 T).



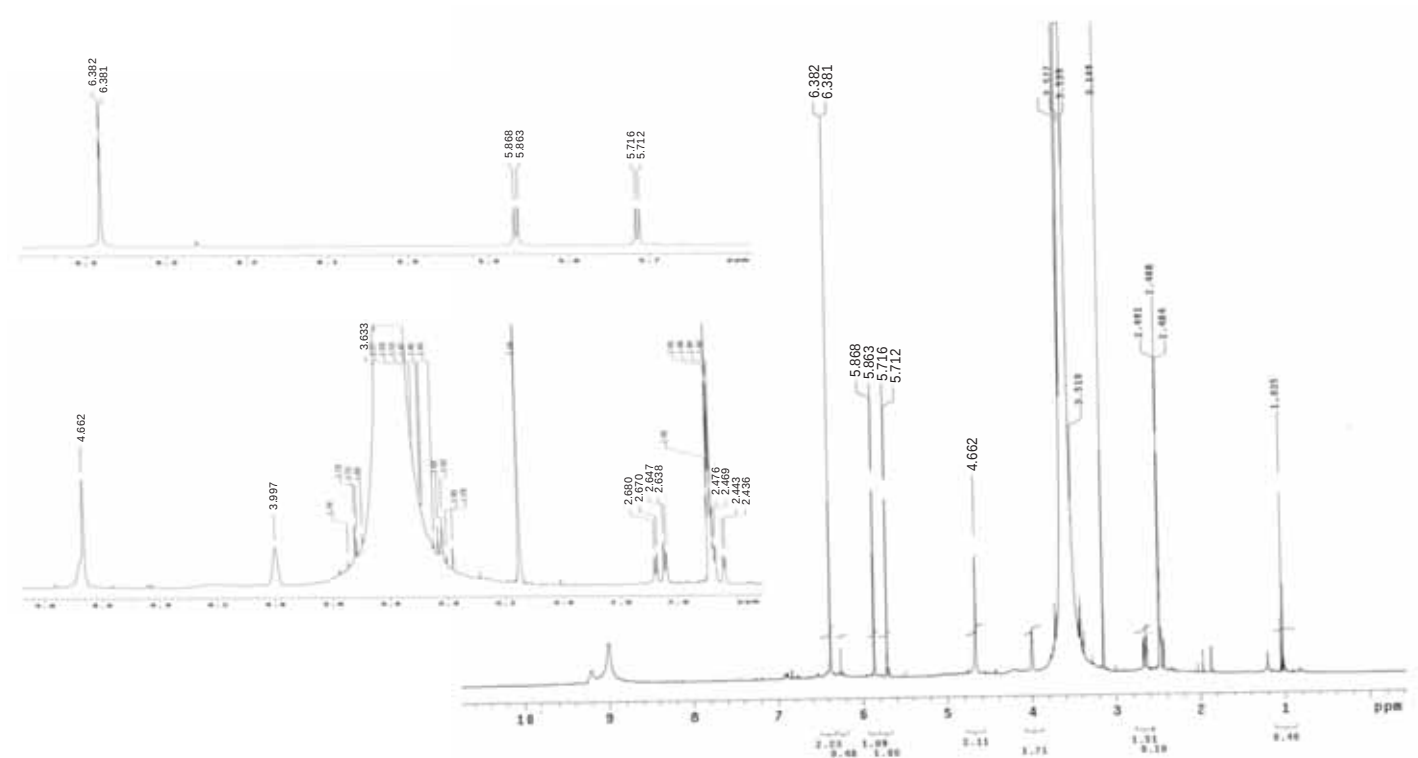
Espectro 14. gHMQC da substância **Ms1** ($\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T).



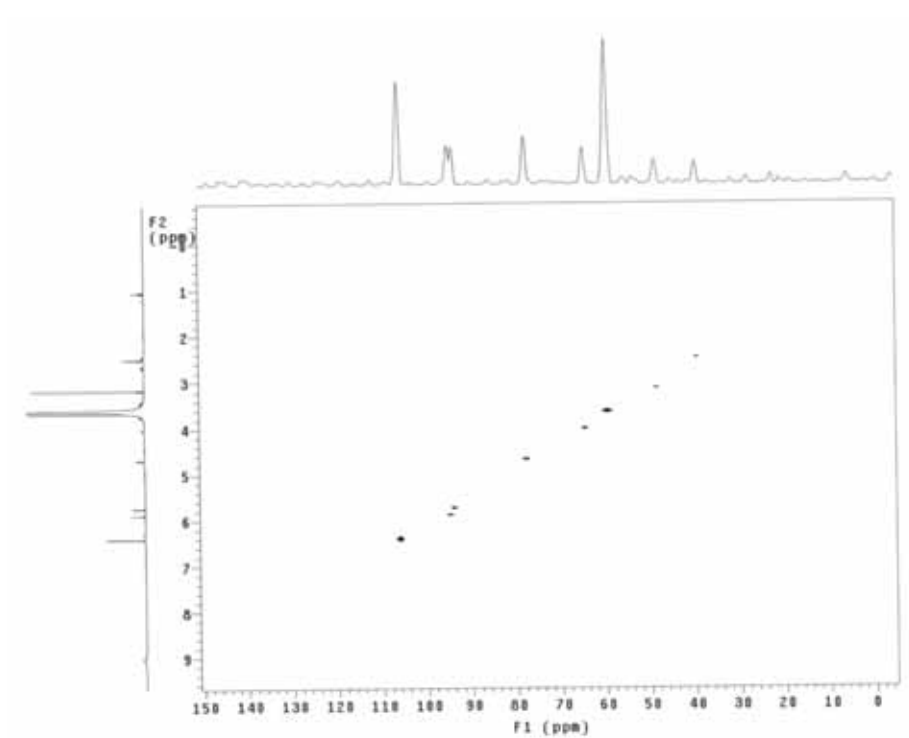
Espectro 15. gHMBC da substância **Ms1** (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



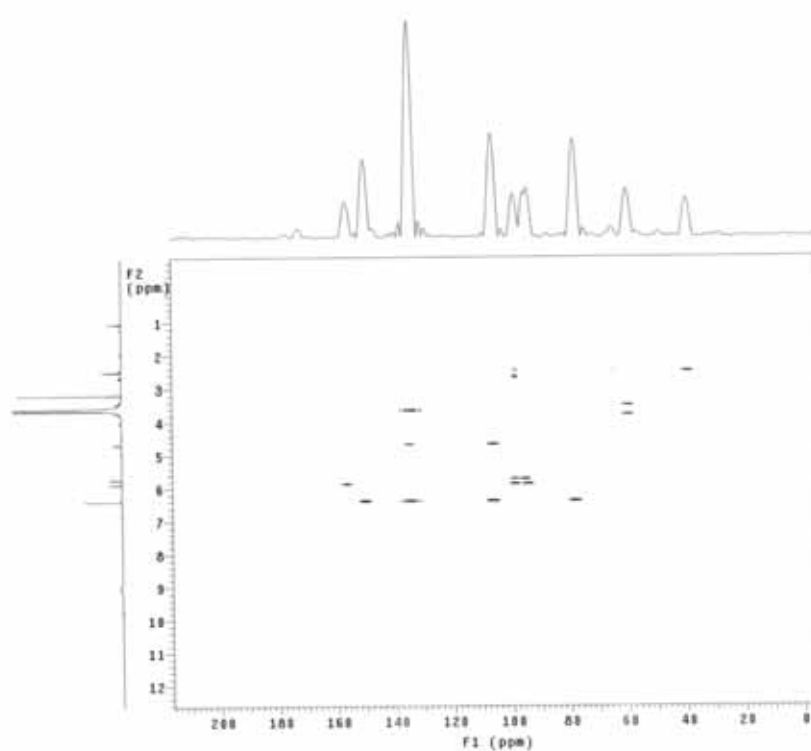
Espectro 16. gHMBC da substância **Ms1** (expansão 2,8 a 5,0 / 129 a 141 ppm) ($\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T).



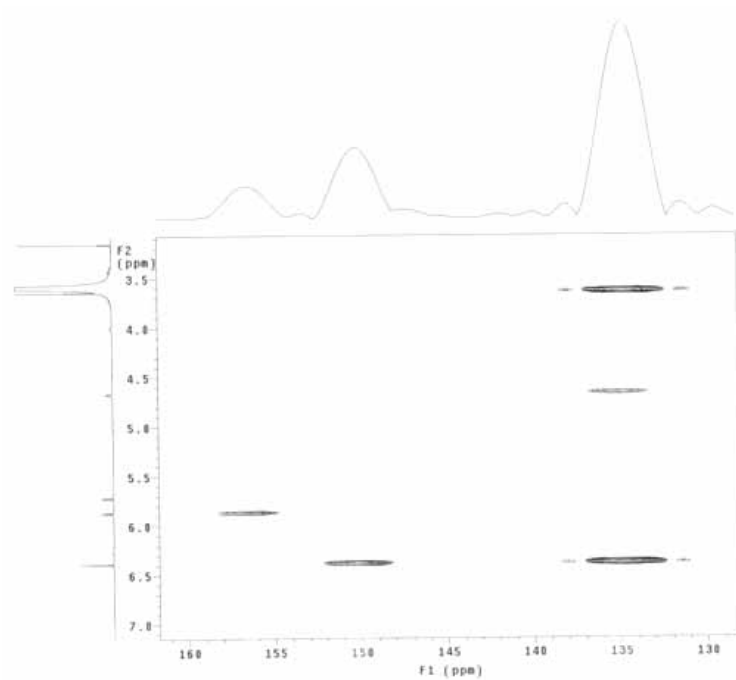
Espectro 17. RMN- ^1H da substância Ms2 e expansões ($\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T).



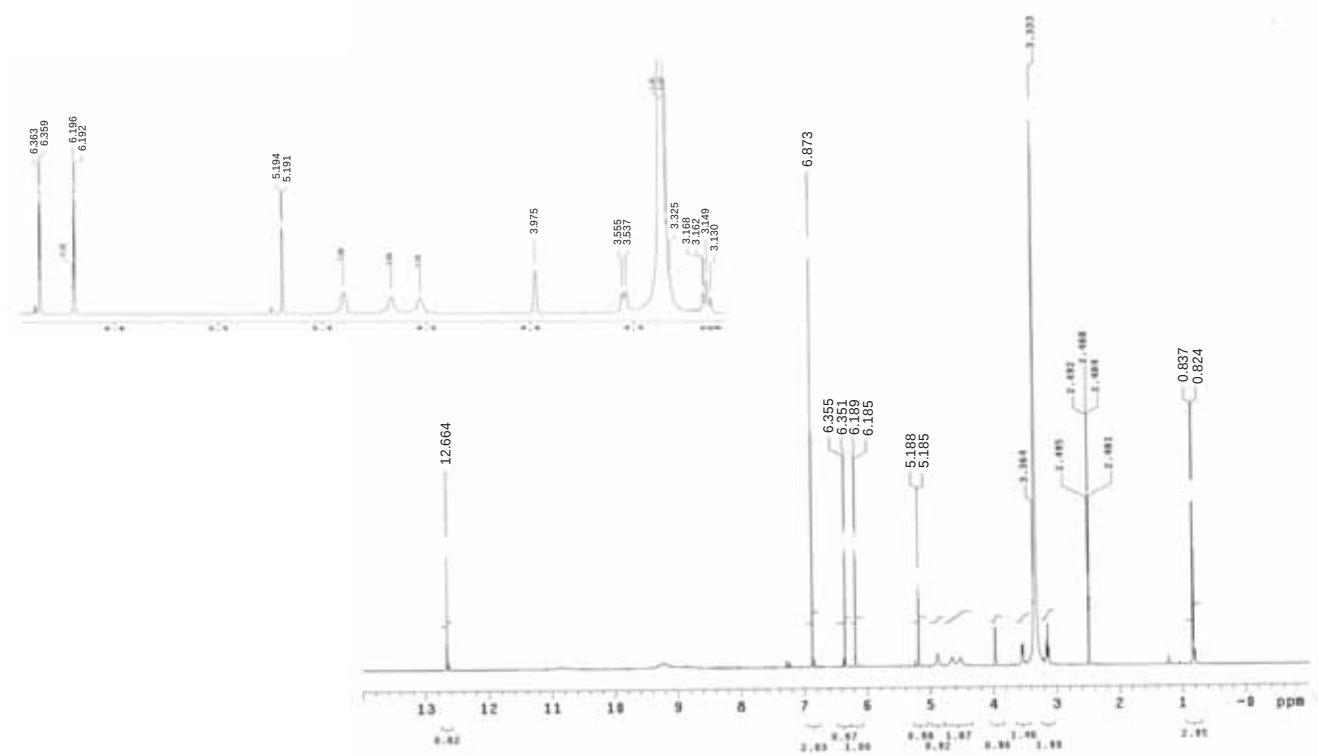
Espectro 18. gHMTC da substância **Ms2** (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



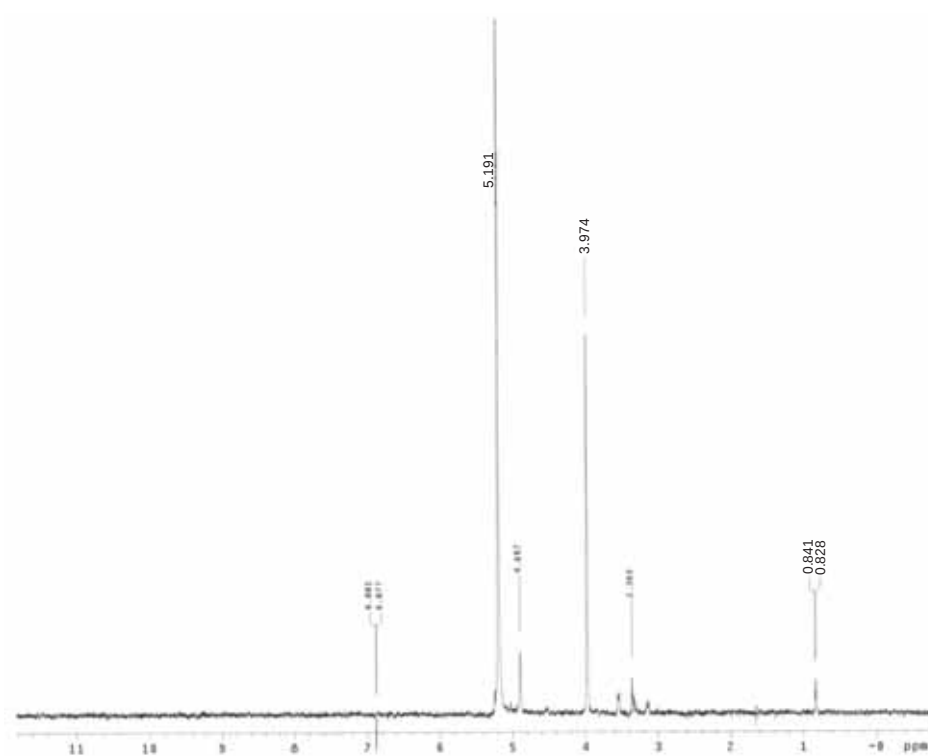
Espectro 19. gHMBC da substância **Ms2** (DMSO- d_6 , 11,7 T).



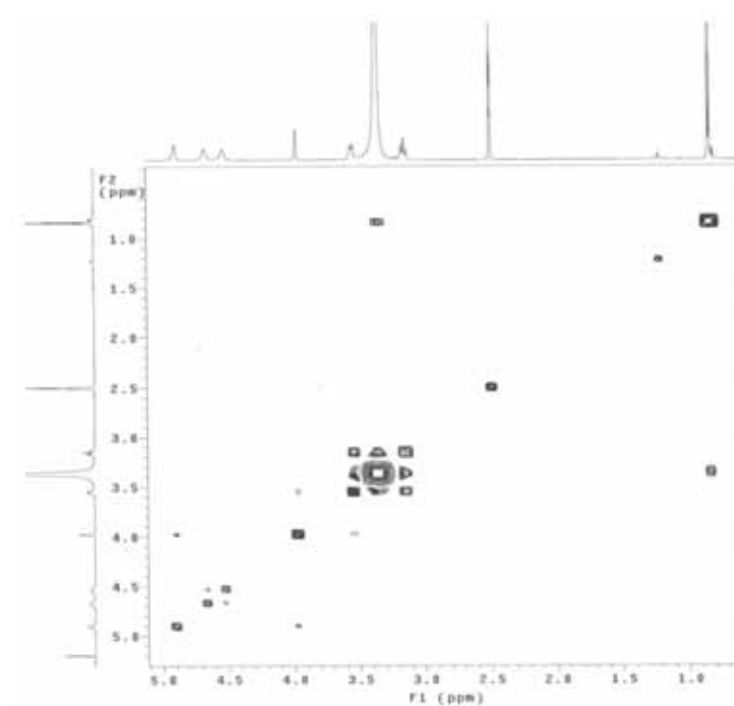
Espectro 20. gHMBC da substância **Ms2** (expansão 3,5 a 7,0 / 130 a 160 ppm) (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



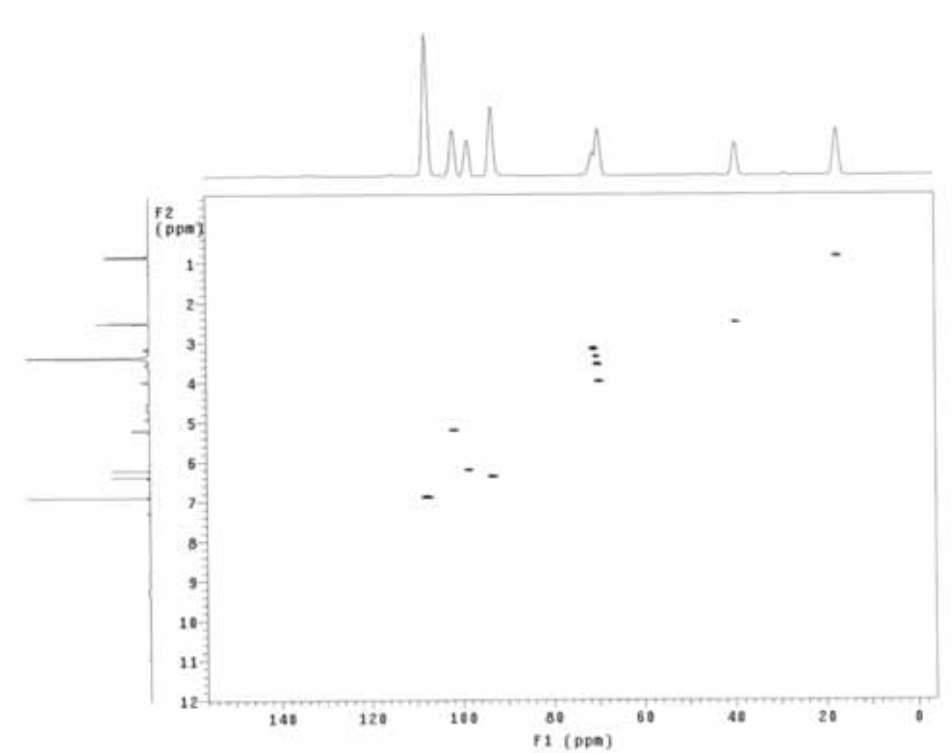
Espectro 21. RMN- ^1H da substância **Ms3** e expansão ($\text{DMSO-}d_6$, 11,7 T).



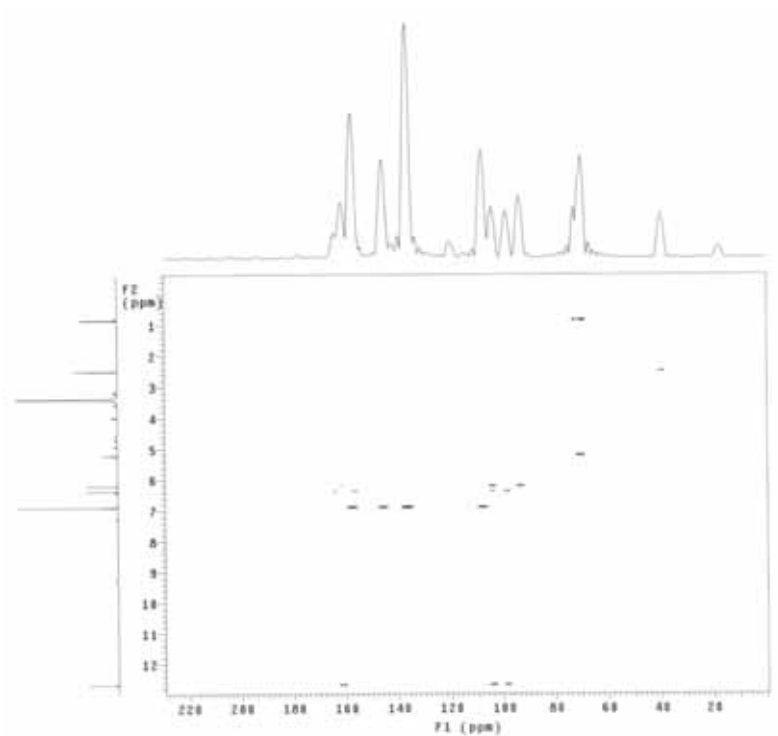
Espectro 22. 1D-TOCSY da substância **Ms3**, irradiado em δ 5,19 (DMSO- d_6 , 11,7 T).



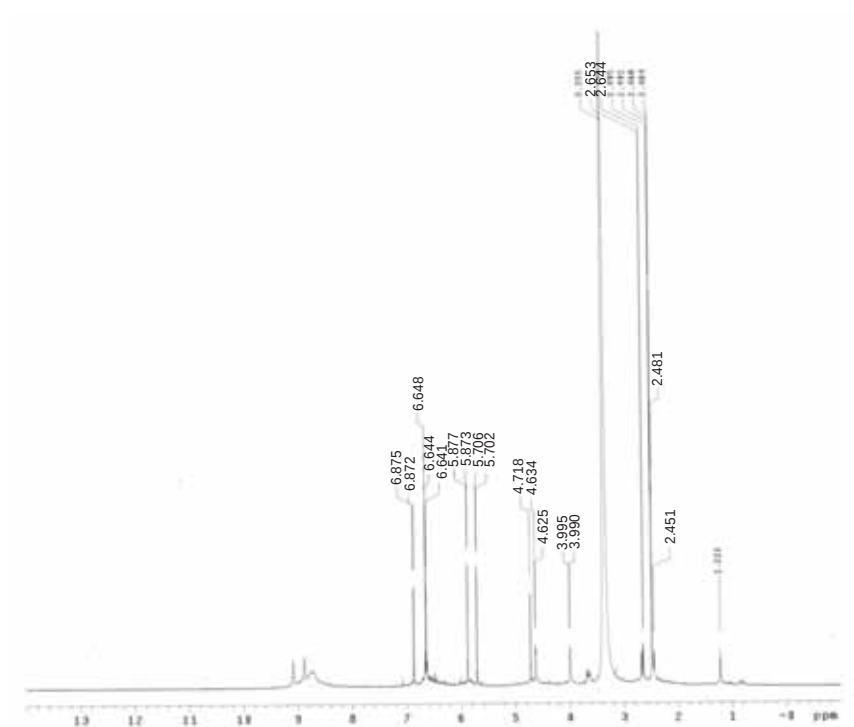
Espectro 23. COSY da substância **Ms3** (DMSO- d_6 , 11,7 T).



Espectro 24. gHMQC da substância **Ms3** (DMSO- d_6 , 11,7 T).



Espectro 25. gHMBC da substância **Ms3** (DMSO- d_6 , 11,7 T).



Espectro 26. RMN- ^1H da substância **Ms4** ($\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T).

Capítulo 2

Desenvolvimento de metodologias para análise quiral de extratos vegetais

1. INTRODUÇÃO

1.1 Quiralidade

Isômeros são compostos que possuem os mesmos constituintes atômicos, porém suas disposições na molécula são diferentes, conferindo conseqüentemente características químicas diversas. Os isômeros possuem diferentes classificações de acordo com esta distribuição atômica.

Estereoisômeros são aqueles isômeros cujos átomos ou grupos de átomos possuem uma distribuição espacial diferente na molécula. Eles podem ser divididos em enantiômeros ou diastereoisômeros (LIMA, 1997; KALOUSTIAN, 2004).

Os *isômeros óticos* apresentam atividade ótica, possuindo centros quirais ou centros assimétricos. Dizemos que uma substância é oticamente ativa quando desvia a luz plano polarizada. Para isso é necessário que a sua estrutura molecular tridimensional não seja sobreponível à sua imagem especular (BARREIRO; FERREIRA; COSTA, 1997; MORRIS, 2001).

Enantiômeros são definidos como moléculas que são imagens especulares uma da outra, não sobreponíveis. As moléculas que apresentam dois ou mais elementos de quiralidade apresentam a *diastereomeria*. Os enantiômeros possuem propriedades físicas e químicas iguais, entretanto apresentam desvios polarimétricos opostos de mesma magnitude:

$$\alpha (+) \text{ ou } d (\textit{dextro}); \alpha (-) \text{ ou } l (\textit{levo})$$

Os diastereômeros possuem propriedades físicas e químicas diferentes.

A existência de enzimas e receptores estereoespecíficos no organismo conduz à características biológicas diferentes para as estruturas quirais (Tabela 14). O resultado desta ação estereosseletiva pelos receptores proteicos é devido a uma ocupação preferencial de um sítio receptor por um dos enantiômeros (Fig. 24), conhecida como Teoria dos três pontos. Essa teoria diz que a formação do complexo enzima-substrato somente é possível para um dos enantiômeros, que possui três pontos corretamente posicionados para que ocorra a interação com o sítio ativo da enzima (BRUICE, 2003).

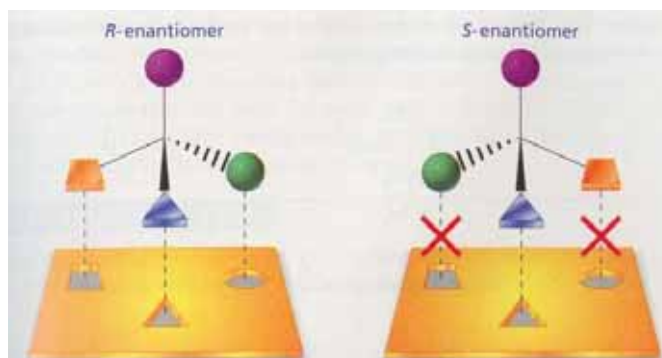


Figura 24. Interação diferencial de dois enantiômeros em um receptor biológico.

Como consequência direta das diferentes interações dos enantiômeros com as enzimas, teremos as mais diversas respostas biológicas para os estereoisômeros (LIMA, 1997).

Tabela 14. Propriedades biológicas de enantiômeros.

Droga	(+)-enantiômero	(-)-enantiômero
Barbituratos	excitação	sedação
Dobutamina	vasodilatador	vasoconstritor
Metadona	efeitos mínimos	forte analgésico
Metanfetamina	estimulante do SNC	vasodilatador periférico
Penicilamina	antiartrítico	mutagênico
Tiroxina	inativo	efeito tiroxêmico
Talidomida	sedativo	teratogênico

Dentre todos esses exemplos, o da talidomida (Fig. 25) é o mais conhecido e, talvez, o que ocasionou consequências mais trágicas. A talidomida, [(±)-2-(2,6-dioxo-3-piperidinil)-1*H*-isoindol-1,3-(2*H*)-diona], começou a ser comercializada em 1957 como um fármaco sedativo-hipnótico. Somente no início da década de 60, essa substância começou a ser usada por gestantes como agente antináuseas, sendo responsável pelo nascimento de milhares de crianças com deformações congênitas. Essas deformações foram posteriormente atribuídas ao seu efeito teratogênico (LIMA; FRAGA; BARREIRO, 2001).

Posterior tentativa de resolução cromatográfica e administração das espécies enantiomericamente puras [(*R*) e (*S*)] demonstrou que o efeito teratogênico da talidomida era proveniente do emprego do enantiômero de configuração absoluta (*S*), enquanto seu antípoda era desprovido de ação teratogênica (WAINER, 2001).

A tragédia da talidomida representou um marco na conscientização do risco da administração de um fármaco em sua forma racêmica.

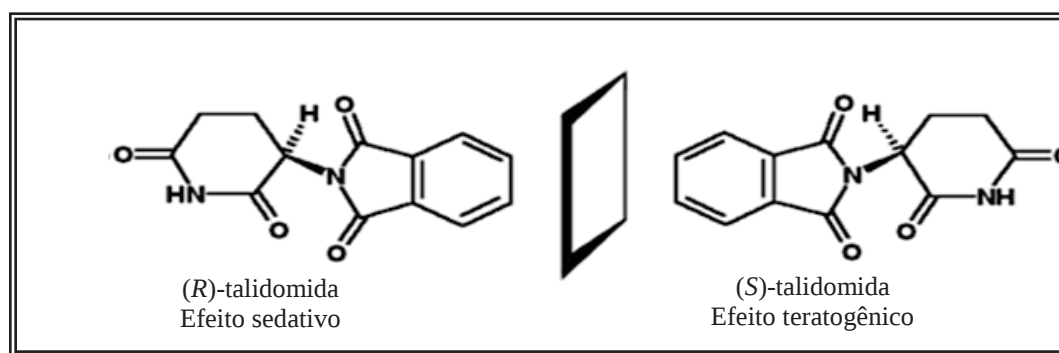


Figura 25. Talidomida.

1.2 Dicroísmo circular

Nas últimas décadas houve um aumento no desenvolvimento de métodos sensíveis e confiáveis para determinação da configuração absoluta dos metabólitos. Esse aumento deveu-se principalmente ao isolamento de grande número de produtos naturais opticamente ativos.

Existem diversas metodologias para estabelecimento da estereoquímica de uma molécula, tais como raio-x, ressonância magnética nuclear (RMN) utilizando agentes de derivatização, dispersão rotatória ótica (ORD), entre outros (McCONNELL et al., 2007). Entre elas, o uso de dicroísmo circular está em crescente desenvolvimento e representa uma poderosa ferramenta no estudo de compostos naturais, principalmente flavonoides, uma classe de metabólitos muito comum nas plantas (SLADE; FERREIRA; MARAIS, 2005).

A detecção por dicroísmo circular é baseada na absorção diferencial entre a luz circularmente polarizada esquerda (E) e direita (D) (KANAZAWA et al., 2000), conforme a fórmula abaixo (BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000) e permite realizar análises de maneira rápida e confiável.

$$\Delta\epsilon = \epsilon_E - \epsilon_D = \frac{1}{cl} \Delta A, \text{ onde } \Delta A = A_E - A_D$$

ϵ = Absortividade molar;

c = concentração molar da amostra (mol.L^{-1})

l = comprimento do caminho ótico da cela do CD (cm)

A = absorbância

Existem vários trabalhos na literatura utilizando dicroísmo circular para a análise de produtos naturais quirais. No trabalho de Caccamese, Manna e Scivoli (2003) os autores separaram e estabeleceram a configuração absoluta de 2-(R) e 2-(S) naringenina isoladas de grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad.) utilizando HPLC com coluna quiral para a separação e um espectropolarímetro para a obtenção dos espectros de CD. Em outro trabalho, os mesmos autores estudaram a estereoquímica de uma série de flavanonas comumente encontradas em espécies de *Citrus* (CACCAMESE et al., 2005). Flavanóis, incluindo derivados de catequinas, foram estudados por Korver e Wilkins (1971), que fizeram uma discussão sobre a influência da temperatura na aquisição dos espectros de CD. No âmbito do projeto temático Biota/Fapesp, tem-se deparado com diversas moléculas naturais quirais, o que motivou a realizar esse estudo de avaliação de compostos quirais isolados de extratos de plantas do Cerrado utilizando a técnica de HPLC-CD-DAD. Esse estudo constitui um importante diferencial em relação às abordagens que tem sido exploradas em nosso e em outros grupos de pesquisas.

A técnica de HPLC-CD é uma das mais poderosas ferramentas disponíveis para a investigação estereoquímica de moléculas opticamente ativas. Possui diversas vantagens como alta velocidade, sensibilidade, reprodutibilidade, entre outras, que fazem com que seja a técnica mais utilizada, com um crescente número de aplicações. Em relação à análise de produtos naturais, diversos trabalhos tem surgido na literatura. No trabalho de Ren et al. (2007), os autores separaram e analisaram a estereoquímica de quatro estereoisômeros conhecidos como dracorupesinas (flavanonas) isoladas de *Dracocephalum rupestre* Hance. Os atropoenantiômeros de um alcalóide conhecido como murrastifolina F, isolados de espécies do gênero *Murraya* (Rutaceae), foram separados por essa técnica (BRINGMANN et al., 2001), assim como fenilntraquinonas isoladas da espécie *Bulbine frutescens* (L.) Wild (MUTANYATTA et al., 2005). Um trabalho interessante foi descrito por Bringmann et al. (1999), em que os autores identificaram duas substâncias, a isoquinolina filina e a naftilisoquinolina 5'-O-metildioncopeltina A, diretamente do extrato bruto, utilizando as técnicas hifenadas HPLC-RMN, HPLC-MS e HPLC-CD.

Dentre as classes de substâncias quirais encontradas em espécies vegetais, as catequinas são as que vêm despertando maior interesse devido às suas interessantes propriedades farmacológicas. Além disso, essas substâncias são largamente encontradas em extratos e chás, como por exemplo o chá preto e o chá verde, que são extensamente utilizados pela população. Espécies da biodiversidade brasileira também são ricas nessas substâncias, como por exemplo o “barbatimão”, *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (MELLO;

PETEREIT; NAHRSTEDT, 1999) e o guaraná, *Paullinia cupana* Kunth (SOUSA et al., 2010). As diferentes atividades farmacológicas apresentadas pelos estereoisômeros da catequina, portanto, geram preocupações quanto à garantia de sua pureza nesses extratos e chás (NYFELER; MOSER; WALTER, 1983; BAIS et al., 2002).

As catequinas, apesar de estruturalmente simples, possuem dois estereocentros e, portanto, quatro possíveis estereoisômeros (Fig. 26):

- (2*R*, 3*S*)-(+)-catequina;
- (2*S*, 3*R*)-(-)-catequina;
- (2*R*, 3*R*)-(-)-epicatequina;
- (2*S*, 3*S*)-(+)-epicatequina.

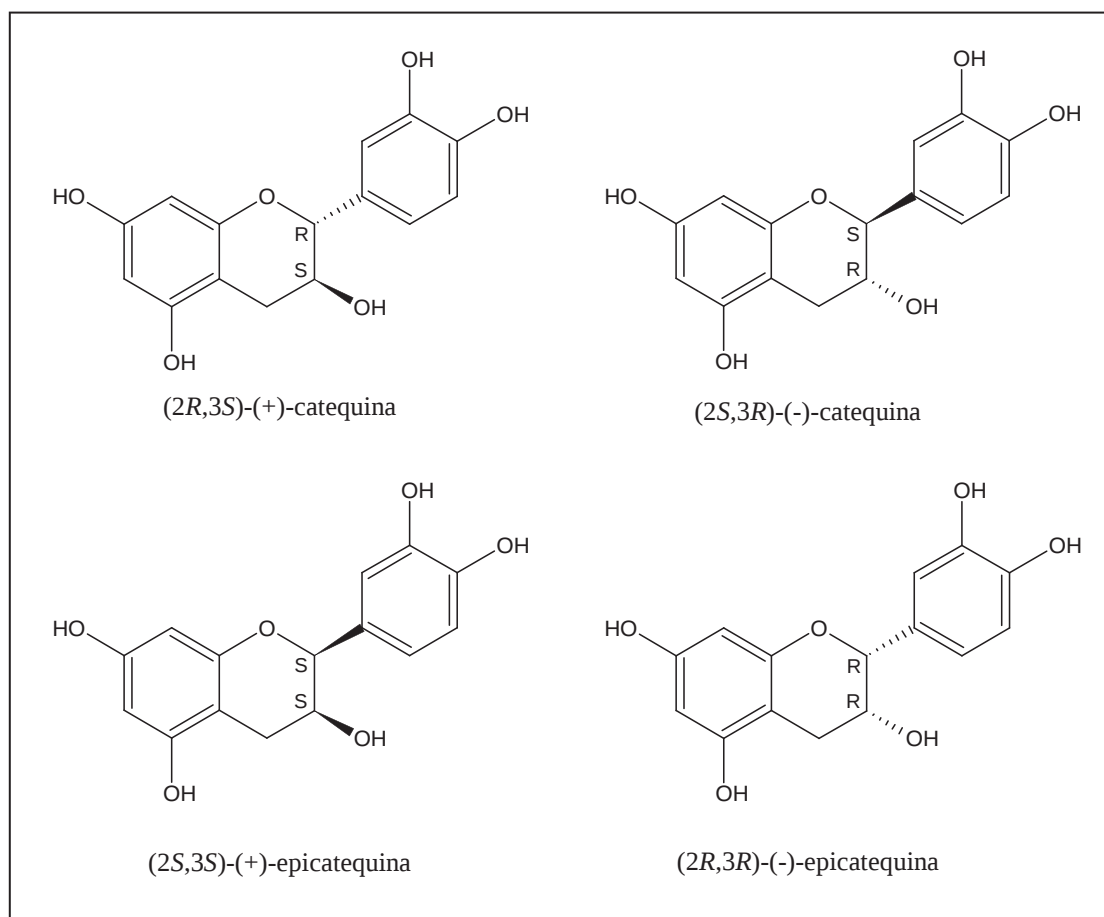


Figura 26. Estereoisômeros da catequina.

Os flavonoides são sintetizados por enzimas presentes nas plantas. Acredita-se que essas enzimas sejam estereosseletivas e, portanto, levem a apenas um enantiômero, quando se discute flavonoides quirais. Entretanto, alguns trabalhos recentes na literatura tem provado a presença dos enantiômeros menos comuns, como por exemplo no trabalho de Rinaldo et al.

(2010). Neste trabalho, os autores discutem a presença da (+)-(2S,3S)-epicatequina em espécies de *Byrsonima*.

A primeira etapa no desenvolvimento de um método de HPLC para separação de substâncias opticamente ativas, e talvez a mais importante, é a escolha da fase estacionária quiral (FEQ).

Existem diversos tipos de FEQ, sendo que as quatro classes seguintes são as mais utilizadas: fases baseadas em proteínas, em polissacarídeos (carboidratos), ciclodextrina e as fases de Pirkle.

O mecanismo de separação de enantiômeros utilizando FEQ está fundamentada na diferença de energia entre os complexos diastereoméricos transitórios formados entre o seletor quiral e os enantiômeros do soluto. As diferenças em estabilidade destes complexos transitórios levam a diferentes tempos de retenção na coluna. O enantiômero que forma o complexo menos estável elui primeiro (CASS; DEGANI, 2001).

Em cada tipo de fase estacionária ocorrem diferentes interações com os analitos quirais, proporcionando seletividade e resolução diferentes. Portanto, as colunas são selecionadas de acordo com os grupos presentes nos analitos que serão analisados.

A maioria dos metabólitos que serão estudados neste trabalho pertence à classe dos flavonoides, que são substâncias de média e alta polaridade com grupos aromáticos hidroxilados. Para análise desse tipo de metabólito secundário, o tipo de fase estacionária quiral recomendada e com ampla aplicação na literatura é o de polímeros de carboidratos (celulose ou amilose). Polissacarídeos como a celulose e a amilose *in natura* apresentam limitada capacidade de resolução quiral. Por outro lado, são facilmente convertidos a uma variedade de derivados como *tris*-benzoatos e *tris*-fenilcarbamatatos, criando novos sítios para o reconhecimento quiral (BONATO et al., 2005). Dentre elas, as colunas do tipo Chiralcel[®] OD têm sido as mais versáteis para separações quirais (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; YÁÑEZ; ANDREWS; DAVIES, 2007).

Em nossos estudos, avaliamos a coluna Chiralcel[®] OD-H [fase normal - *tris*-(3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose)], que é descrita na literatura como tendo ótima retenção, seletividade e resolução em análises de enantiômeros de flavonoides (CACCAMESE et al., 2005), a coluna IC [fase normal – *tris*-(3,5-diclorofenilcarbamato de celulose)] e a coluna OD-RH [fase reversa – *tris*-(3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose)], Fig. 27.

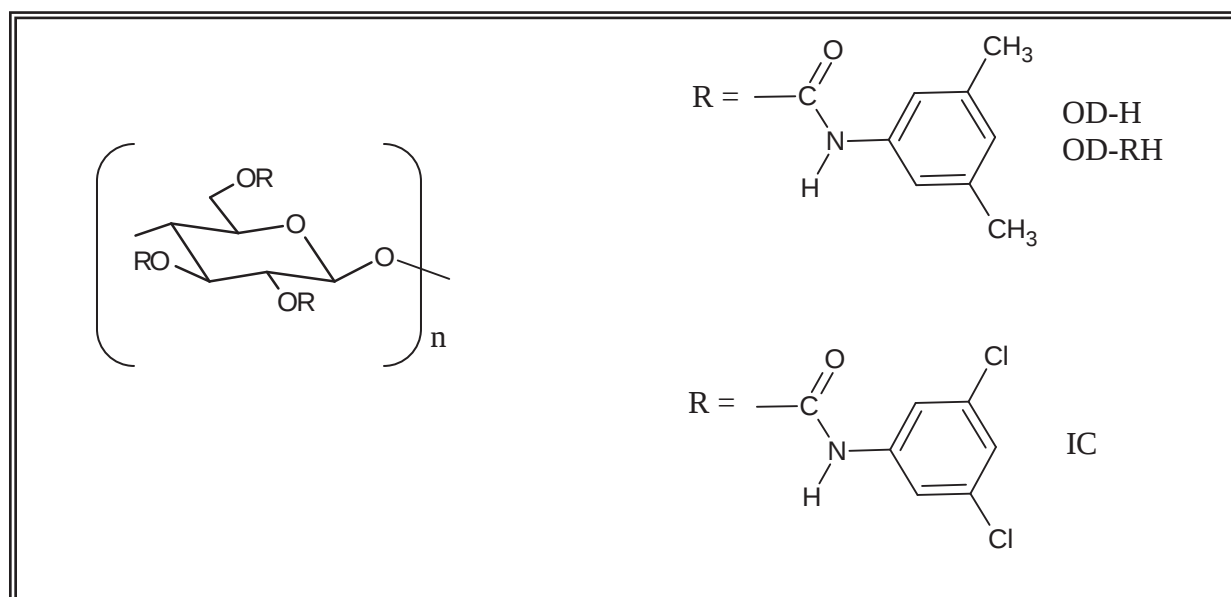


Figura 27. Fases estacionárias das colunas utilizadas neste trabalho.

O mecanismo de discriminação quiral em fases estacionárias baseadas em derivados de polissacarídeos tem sido extensivamente investigado usando dados cromatográficos, espectroscópicos (ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas) e cálculos computacionais. Esses estudos sugerem que os derivados de celulose e amilose apresentam uma estrutura de “calha” helicoidal com os grupos carbamatos e benzoatos localizados no seu interior e os grupos aromáticos hidrofóbicos localizados mais externamente. A resolução quiral depende do ajuste dos enantiômeros nessa “calha” do polissacarídeo e da interação com os grupos carbamato e benzoato (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005).

Nos derivados *tris*-fenilcarbamatos, solutos quirais podem interagir através de ligações de hidrogênio com os grupos NH e C=O e interações dipolo-dipolo com os grupos C=O. As interações π - π do grupo fenil da fase estacionária com grupos aromáticos do soluto podem ser menos importantes que as interações polares, mas elas não podem ser ignoradas, principalmente em separações no modo fase reversa. A habilidade de reconhecimento quiral também é grandemente influenciada pelos substituintes do grupo fenil, como por exemplo, grupos metil, etil, halogênios ou NO₂. O efeito indutivo dos substituintes influencia a resolução quiral quando eles estão nas posições 3 ou 4. Geralmente, a introdução de um grupo doador de elétrons (metil) ou aceitor de elétrons (halogênios) nessas posições melhora a resolução de muitos racematos (YASHIMA, 2001). Derivados fenilcarbamatos de celulose substituídos na posição 2 mostram um baixo grau de resolução, provavelmente porque o impedimento estérico de grupos metil nessa posição impede que o derivado fenilcarbamato assumam uma estrutura regular. Menor grau de resolução quiral também é observado quando os

substituintes do anel aromático são os grupos NO_2 ou OCH_3 , nesse caso por causa da alta polaridade desses grupos (OKAMOTO; KAIDA, 1994; BONATO; JABOR; GAITANI, 2005).

O estudo da quiralidade das moléculas por HPLC-CD-DAD foi iniciado com as flavanonas e catequinas, pois são as substâncias naturais relativamente mais simples de que dispomos e que ocorrem largamente nas plantas estudadas no projeto Biota. Os métodos desenvolvidos foram utilizados em extratos vegetais, facilitando a identificação dessas substâncias nas plantas estudadas no projeto Biota, sem a necessidade de técnicas demoradas de separação, comumente utilizadas para o estudo desse tipo de composto.

2. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA ESTUDO QUIRAL DE EXTRATOS VEGETAIS

2.1 Flavanonas

As flavanonas possuem duas características estruturais que são importantes na determinação de suas configurações absolutas: a ausência da ligação dupla C2-C3 e a presença do estereocentro C2 (SLADE; FERREIRA; MARAIS, 2005), como pode ser visto na Figura 28, que ilustra a estrutura dos enantiômeros da naringenina.

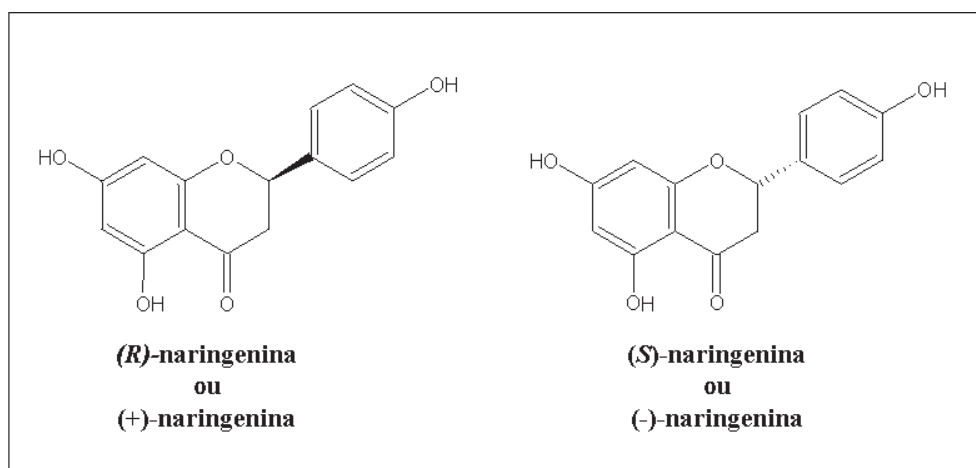


Figura 28. Estruturas dos enantiômeros da naringenina.

Diversos trabalhos na literatura relatam a separação de flavanonas utilizando colunas do tipo OD-H e misturas de hexano/álcool (EtOH ou *iso*-PrOH) como fase móvel. Além disso, a estratégia proposta por Snyder, Kirkland e Glajch (1997), e que será seguida neste trabalho, propõe, inicialmente, o uso de diferentes misturas de Hex/EtOH.

O padrão de ($\pm$)-naringenina foi preparado em uma mistura de hexano/EtOH 1:1 v/v, em uma concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Como fase móvel utilizou-se Hex/EtOH (Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% de TFA).

A otimização de uma separação quiral deve ser baseada em parâmetros cromatográficos já discutidos. A habilidade de uma análise separar dois enantiômeros é medida pela enantioseletividade, ou seja, o valor do fator de separação para os dois enantiômeros. Um par de enantiômeros é considerado resolvido se $\alpha > 1,1$ e $R_s > 1,5$ (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Inicialmente utilizou-se um sistema isocrático de Hex/EtOH (90:10 v/v). Diversas análises foram realizadas com o intuito de otimizar os parâmetros cromatográficos. O melhor sistema encontrado foi Hex/EtOH 80:20, cujo cromatograma está mostrado na Figura 29 e na tabela 15 os valores dos parâmetros cromatográficos. Foi determinado $V_0 = 2,65$ mL para a coluna, portanto $t_0 = 5,30$ min a uma vazão de 0,5 mL.min^{-1} .

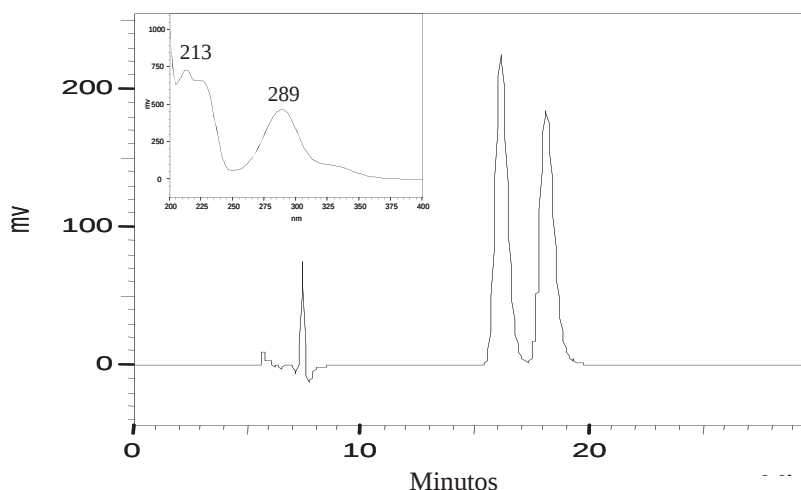


Figura 29. Perfil cromatográfico do padrão de ($\pm$)-naringenina por HPLC-CD-DAD. [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; método: 80:20 A/B em 40 min; vazão 0,5 mL.min^{-1} ; volume de injeção: 10 μL ; λ 289 nm].

Nesse cromatograma, a resolução é $R_s = 2,94$ e $\alpha = 1,18$, que são valores adequados, e o tempo de corrida de 30 minutos foi considerado bom para um extrato vegetal.

Tabela 15. Valores de t_R e α para os principais picos do cromatograma do padrão de ($\pm$)-naringenina.

Pico	t_R (min)	k'	α	R_s
1	16,3	2,07	$\alpha_{1,2} = 1,18$	$R_{s1,2} = 2,94$
2	18,3	2,45		

O equipamento de HPLC-CD utilizado em nosso laboratório permite que o eluente da coluna seja aprisionado dentro na cela do detector de CD permitindo a obtenção de seu espectro. Desse modo os espectros de CD dos dois picos separados no cromatograma foram obtidos e estão mostrados na Figura 30.

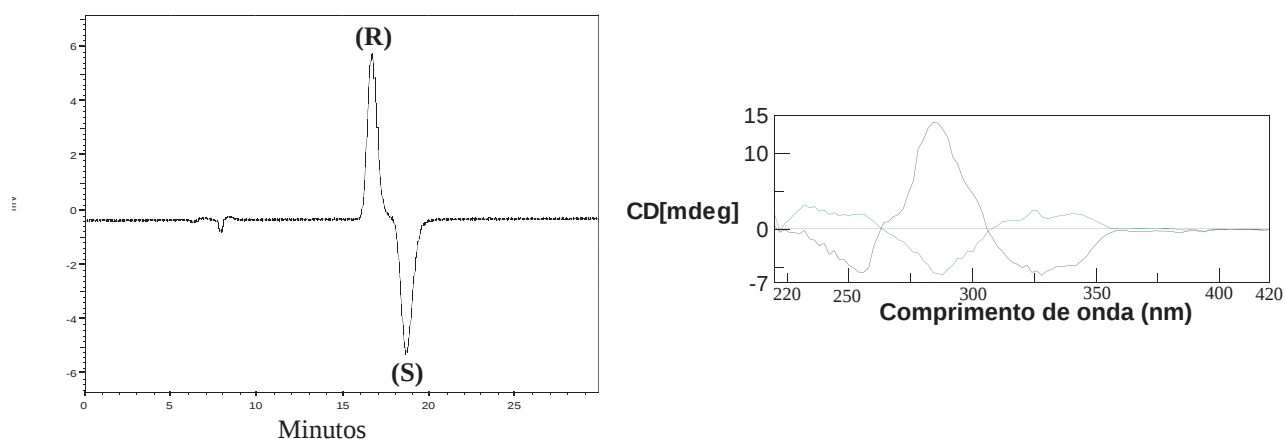


Figura 30. Cromatograma de CD da mistura de ($\pm$)-naringenina e espectros de CD dos dois picos.

O espectro de CD da (-)-naringenina exibe dois Efeitos Cotton (EC) opostos, um devido à forte absorção do cromóforo acetofenona trissubstituído em cerca de 285 nm e outro em um λ abaixo de 240 nm parcialmente devido ao cromóforo metilfenol. O EC positivo na região de 285 nm caracteriza a conformação *R* da (+)-naringenina e um EC negativo a conformação *S* da (-)-naringenina (CACCAMESE et al., 2005).

Segundo Gaffield (1970) a maioria das flavanonas de ocorrência natural possui o grupo fenil no carbono 2 em orientação α , ou seja, em posição equatorial, termodinamicamente favorecida. Dessa forma, essas flavanonas possuem a configuração *S*.

A análise dos espectros de CD permitiu estabelecer a ordem de eluição dos enantiômeros. O primeiro pico, com t_R de 16,3 min, refere-se a (+)-naringenina e o segundo pico, em t_R 18,3 min, refere-se a (-)-naringenina.

A coluna OD-RH também foi testada. Como fase móvel utilizou-se H₂O/ ACN/MeOH (Solvente A: H₂O + 0,05% Ác. fórmico, Solvente B: ACN + 0,05% de Ác. fórmico e Solvente C: MeOH + 0,05% Ác. fórmico). Não se utilizou o TFA pois esse ácido causa um efeito de memória na coluna, ou seja, o arraste da amostra injetada em uma análise posterior (MALDANER; JARDIM, 2009).

Vários métodos isocráticos e gradientes foram testados, sendo que o melhor resultado foi obtido com o sistema H₂O/ACN/MeOH 57:40:3 (v/v), cujo cromatograma está mostrado na Figura 31.

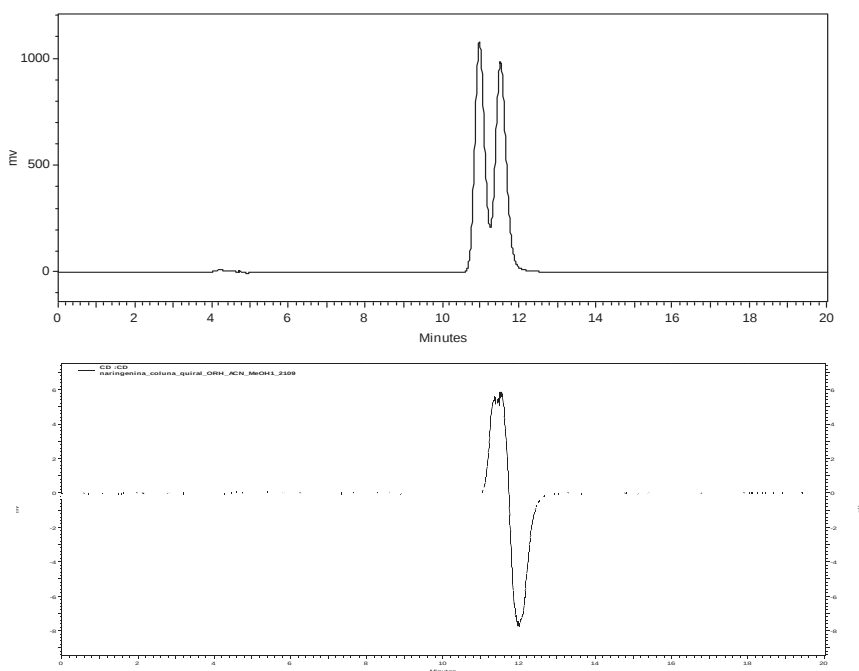


Figura 31. Perfil cromatográfico do padrão de ($\pm$)-naringenina por HPLC-CD-DAD. [Coluna Chiralcel OD-RH; Solvente A: H₂O + 0,05% Ác. Fórmico, Solvente B: ACN + 0,05% Ac. Fórmico e Solvente C: MeOH + 0,05% Ác. Fórmico; método: 57:40:3 A/B/C em 20 min; vazão 0,5 mL.min⁻¹; volume de injeção: 10 μ L; λ 289 nm].

Neste cromatograma, a resolução é $R_s = 1,09$ e $\alpha = 1,08$, que são valores aceitáveis.

Os resultados obtidos com a coluna de fase normal OD-H foram melhores, com melhor resolução quando comparado com os resultados obtidos com a coluna de fase reversa (OD-RH). Isso ocorre provavelmente devido a uma interação mais eficiente entre a fase estacionária da primeira coluna e as substâncias em análise.

2.2 Catequinas

Para a separação das catequinas seguiu-se a mesma estratégia descrita para as flavanonas.

Os padrões foram preparados em uma mistura de Hex/EtOH 1:1 v/v em uma concentração de $200 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Como fase móvel utilizou-se Hex/EtOH (Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% de TFA).

Os parâmetros foram otimizados e o melhor sistema encontrado foi Hex/EtOH 75:25 (isocrático). Na Figura 32 está mostrado o cromatograma e na Tabela 16 seus parâmetros cromatográficos.

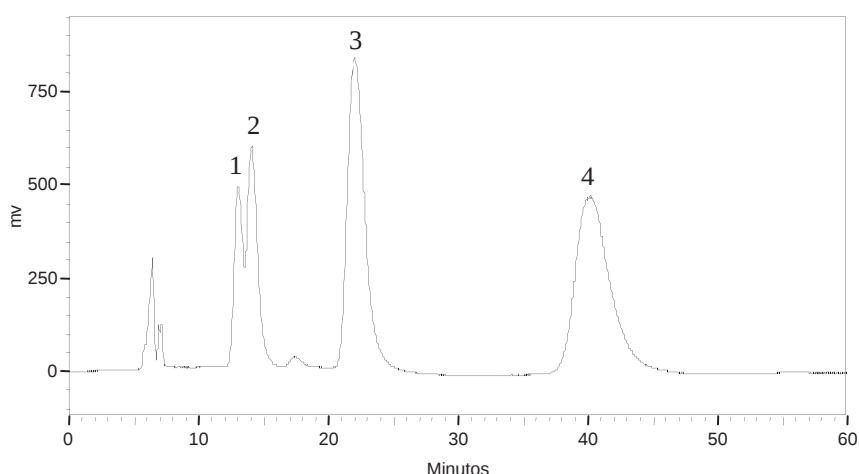


Figura 32. Perfil cromatográfico do padrão de (±)-catequina e (±)-epicatequina por HPLC-CD-DAD. [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; método: 75:25 A/B em 60 min; vazão $0,5 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$; volume de injeção: $10 \mu\text{L}$; λ 280 nm].

Tabela 16. Valores de t_R e α para os principais picos do cromatograma dos padrões de (±)-catequina e (±)-epicatequina.

Pico	t_R (min)	k'	α	R_s
1	13,0	1,45	$\alpha_{1,2} = 1,14$	$R_{s1,2} = 0,8$
2	14,1	1,66		
3	21,9	3,13	$\alpha_{3,4} = 2,10$	$R_{s3,4} = 5,0$
4	40,1	6,57		

Neste cromatograma, a resolução é $R_s = 0,8$ e $\alpha = 1,14$ para o par de bandas crítico (picos 1 e 2), que são valores adequados, e o tempo de corrida de 60 minutos foi considerado bom para um extrato vegetal.

Apesar de a resolução entre os componentes 1 e 2 estar abaixo do valor ideal, é possível identificar inequivocamente cada um deles com o espectro de CD. Na Figura 33 podemos observar o cromatograma de CD a 280 nm e os respectivos espectros.

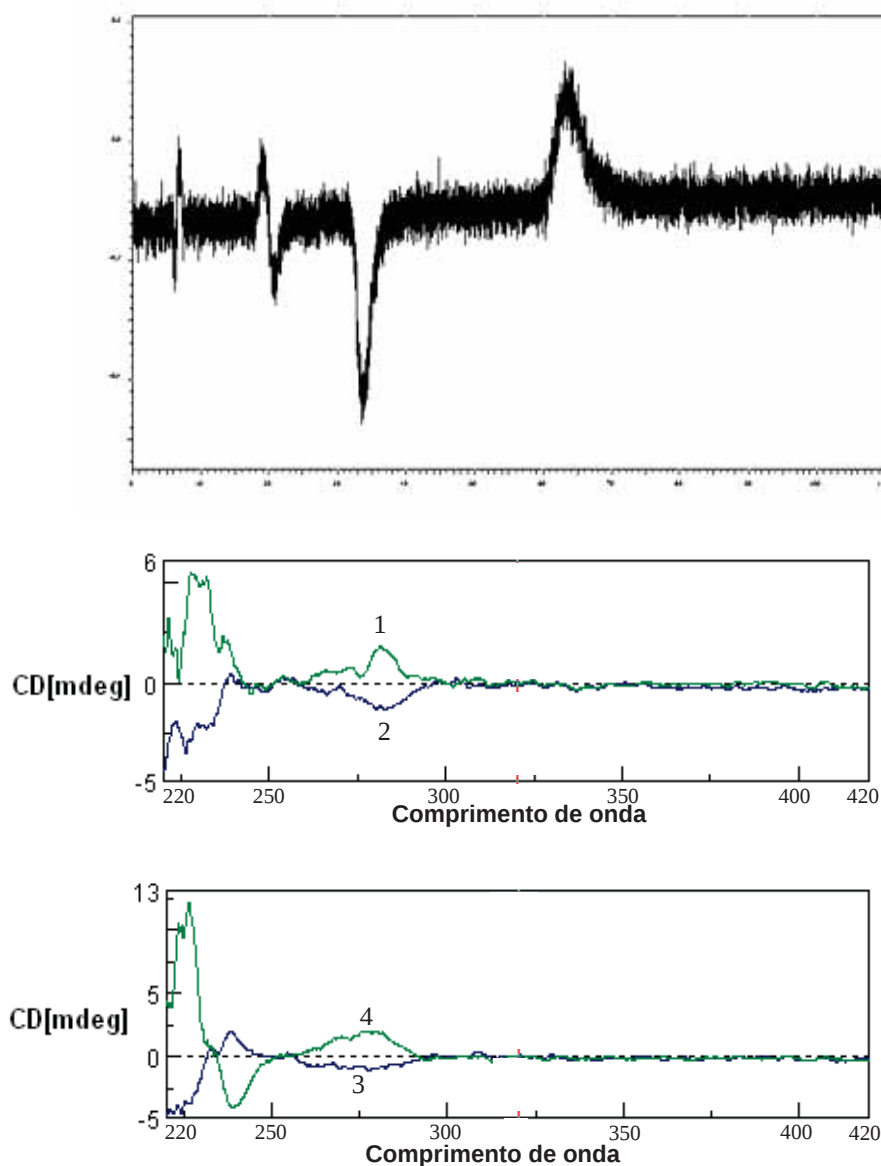


Figura 33. Cromatograma de CD da mistura de ($\pm$)-catequina e ($\pm$)-epicatequina (λ 280 nm) e espectros de CD dos quatro picos [pico 1: (-)-(2*S*,3*R*)-catequina; pico 2: (+)-(2*R*,3*S*)-catequina; pico 3: (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina; pico 4: (+)-(2*S*,3*S*)-epicatequina].

Os derivados de catequinas possuem dois cromóforos aromáticos: os anéis benzênicos A e B, com bandas de absorção em torno de 280 nm (chamada transição L_b) e 240 nm (transição L_a), respectivamente. Dados de CD da literatura indicam que as configurações 2-(*R*) e 2-(*S*) originam EC negativo e positivo, respectivamente, para o cromóforo A. Já para a transição L_a (cromóforo B), um EC positivo caracteriza a configuração 3-(*R*) e um EC

negativo a configuração 3-(S) (KORVER; WILKINS, 1971; SLADE; FERREIRA; MARAIS, 2005).

Com isso, foi possível estabelecer a ordem de eluição dos diastereoisômeros como sendo: (-)-(2S,3R)-catequina ($t_R = 13,0$ min), (+)-(2R,3S)-catequina ($t_R = 14,1$ min), (-)-(2R,3R)-epicatequina ($t_R = 21,9$ min) e (+)-(2S,3S)-epicatequina ($t_R = 40,1$ min).

Duas outras colunas quirais foram testadas, a OD-RH e a IC. Os resultados alcançados não foram tão eficientes como os discutidos acima, sendo que em nenhuma das colunas foi possível efetuar a separação dos dois enantiômeros de catequinas.

Na Figura 34 é mostrado o cromatograma obtido na coluna IC e na Figura 35 o cromatograma da coluna OD-RH.

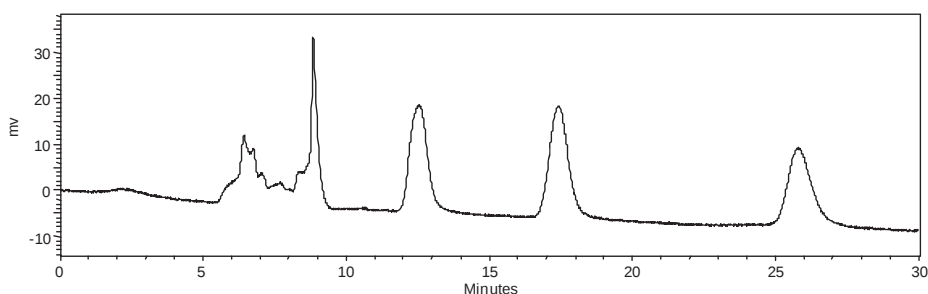


Figura 34. Perfil cromatográfico do padrão de ($\pm$)-catequina e ($\pm$)-epicatequina por HPLC-CD-DAD. [Coluna Chiralcel IC; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; método: 75:25 A/B em 30 min; vazão 0,5 mL.min⁻¹; volume de injeção: 10 μ L; λ 280 nm].

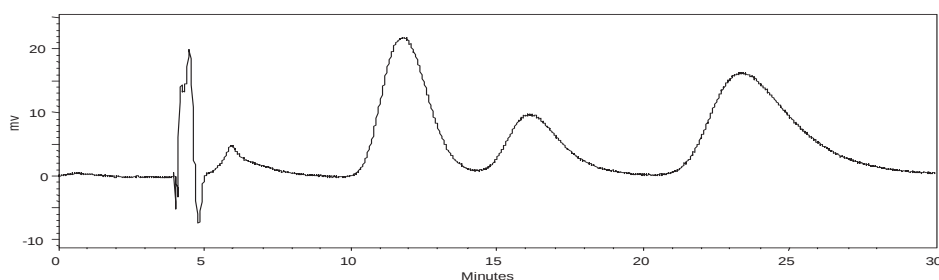


Figura 35. Perfil cromatográfico do padrão de ($\pm$)-catequina e ($\pm$)-epicatequina por HPLC-CD-DAD. [Coluna Chiralcel OD-RH; Solvente A: H₂O + 0,05% Ác. fórmico, Solvente B: MeOH + 0,05% Ac. fórmico e Solvente C: *n*-PrOH + 0,05% Ác. fórmico; método: 75:5:15 A/B/C em 30 min; vazão 0,5 mL.min⁻¹; volume de injeção: 10 μ L; λ 280 nm]

No cromatograma HPLC-CD da mistura de ($\pm$)-catequina observa-se que houve a separação entre os enantiômeros nas duas colunas (Fig. 36). Entretanto, a baixa resolução entre os picos não permite uma análise quantitativa dessas substâncias em um extrato.

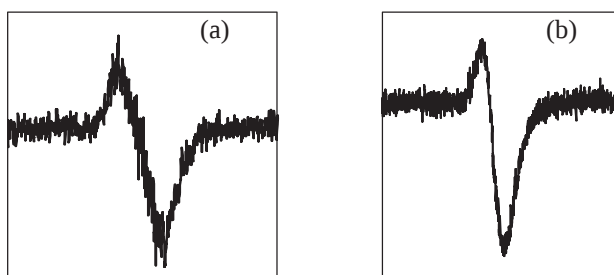


Figura 36. Cromatograma de CD da mistura de (±)-catequina nas colunas Chiralcel IC (a) e Chiralcel OD-RH (b); λ 280 nm.

2.3 Construção das curvas analíticas

É medindo-se as áreas cromatográficas que se estabelecem as quantidades de analitos em amostras analisadas e a melhor forma de realizar quantificações é a baseada numa Curva Analítica. A Curva Analítica é a relação entre sinais – no caso as áreas – e quantidades do analito a ser quantificado.

A solução estoque foi preparada a partir de uma mistura dos padrões (+)-(2*R*,3*S*)-catequina (5,1 mg, concentração 1,02 mg.mL⁻¹) e (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina (5,2 mg, concentração 1,04 mg.mL⁻¹), solubilizados em 5 mL de uma solução Hex/EtOH 1:1 + 0,1 % TFA. Essa solução foi mantida sob refrigeração (4 °C) e protegidas da claridade para evitar a epimerização dos padrões. Foram utilizados somente esses padrões, pois os enantiômeros [(±)-catequina; assim como (±)-epicatequina] possuem a mesma resposta no DAD.

As soluções-padrão foram feitas a partir de diluições da solução estoque com micropipetas de alta precisão, e cobriram oito níveis de concentração: 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 e 100 µg.mL⁻¹. Cada uma das soluções foi preparada em triplicata. Todas foram armazenadas sob refrigeração.

Os padrões foram analisados por HPLC-CD-DAD e injetados em triplicata e a resposta de absorção obtida em 280 nm. Os dados experimentais da curva foram submetidos ao teste de Huber para a rejeição de anômalos (valores claramente destoantes, oriundos de algum erro e que, se usados, descaracterizam o significado da média). Ao final, a área sob os picos cromatográficos foi calculada e os valores obtidos interpolados em função da concentração usando regressão linear (VALENTE, AUGUSTO, RIEDO, 2011).

Utilizando-se um $k = 2$ (k é um fator que pode variar de 2 a 8, quanto menor, mais estreito o limite para desprezar os resultados anômalos e, conseqüentemente, mais confiável o

resultado), houve a necessidade de rejeição de 4 valores para a catequina e 5 valores para a epicatequina, e os coeficientes de correlação (r^2) ficaram entre 0,992 e 0,995. Os limites de detecção e de quantificação foram calculados de acordo com a IUPAC e os valores expostos na tabela 17, revelam que estes se encontram próximos do primeiro e segundo ponto da curva [para a (-)-epicatequina] e segundo e terceiro ponto da curva [para a (+)-catequina], respectivamente, cujos resultados indicam uma maior confiabilidade do sistema de detecção. Em comparação com quantidades de catequinas encontradas em extratos vegetais (ITO et al., 2003; GOTTI et al., 2006), o LD e LQ são satisfatórios para a determinação das mesmas. As curvas analíticas obtidas estão mostradas na Figura 37.

Tabela 17. Dados das curvas analíticas dos padrões de (+)-catequina e (-)-epicatequina.

Substância	Faixa de linearidade/ ($\mu\text{g/mL}$)	Equação da curva analítica ^a	LD/ ($\mu\text{g/mL}$) ^b	LQ/ ($\mu\text{g/mL}$) ^b	Fator de correlação (r^2)
(+)-catequina	2,32-100	$3,93 \cdot 10^5 C + 6,61 \cdot 10^4$	0,770	2,32	0,992
(-)-epicatequina	1,27-100	$3,72 \cdot 10^5 EC - 1,92 \cdot 10^3$	0,420	1,27	0,995

^a Oito pontos ($n = 3$); C: a concentração da substância ($\mu\text{g/mL}$).

^b LD= limite de detecção; LQ= limite de quantificação.

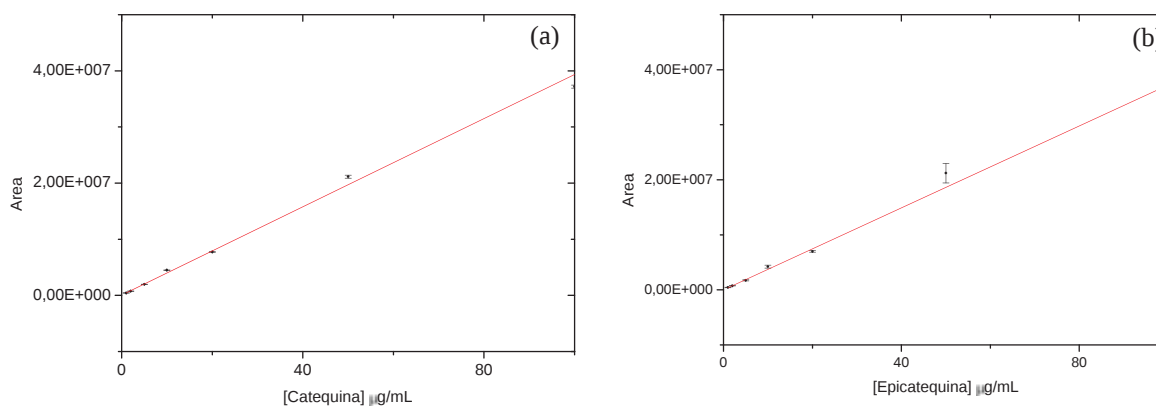


Figura 37. Curvas analíticas da (+)-catequina (a) e da (-)-epicatequina (b).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI et al., 2004). O fator de correlação avalia a linearidade do método, ou seja, capacidade de gerar resultados proporcionais à concentração do composto dentro de uma faixa analítica especificada. Valores acima de 0,99 são aceitáveis (CASS; DEGANI, 2001).

Quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais (RIBANI et al., 2004).

2.4 Preparação de amostra, teste de seletividade, recuperação e precisão

Os infusos das espécies de *Miconia* estudadas foram submetidos a um *clean-up* com o objetivo de obter frações enriquecidas com catequinas, livres de interferentes, promovendo assim uma melhora na seletividade nas análises e uma maior vida útil da coluna quirál.

Uma etapa de *clean-up* é fundamental para eliminar compostos indesejáveis e que fazem parte da constituição da matriz, principalmente aqueles presentes em extratos vegetais e matrizes biológicas, as quais podem interferir drasticamente no método analítico a ser executado. Além do mais, a etapa de *clean-up* pode estar intimamente ligada à longevidade de parte da instrumentação usada. Uma forma de minimizar os custos relacionados aos processos de investigação clássicos e maximizar os resultados da análise compreende a utilização, em uma etapa prévia, da extração em fase sólida (SPE), seguida de análise cromatográfica. A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. A SPE, em sua forma mais simples e conhecida, comporta-se como uma cromatografia líquida empregando-se uma pequena coluna aberta, usualmente denominada cartucho de extração, a qual contém a fase sólida (fase estacionária) (CASS; DEGANI, 2001). Isso permite a caracterização química de uma matriz complexa com a eliminação de possíveis interferentes durante o processo de avaliação cromatográfica (LANÇAS, 2004). Nesse caso, ocorre a retenção seletiva dos componentes de interesse presentes numa matriz complexa pelo suporte usado, ou o contrário. Os interferentes menos retidos são eluídos com um solvente de baixa força de eluição e os analitos removidos com um solvente forte ($k' \sim 0$), isso possibilita o uso de pequenos volumes do solvente extrator, resultando no aumento da sensibilidade do método empregado, pois o nível de diluição passa a ser muito pequeno, além de ser um método rápido e eliminar problemas de emulsão na preparação das amostras (CASS; DEGANI, 2001). Portanto, a SPE foi o método escolhido para a preparação de amostras para as análises por cromatografia quirál.

Foram testados 3 tipos de cartuchos diferentes: fase normal (sílica), fase reversa (C₁₈) e fase reversa polimérica (OASIS). Em todos os cartuchos testados, foram avaliados a

seletividade, isto é, habilidade do método em separar as substâncias de interesse de componentes que podem interferir na sua determinação, e a recuperação das catequinas.

A seletividade dos cartuchos foi avaliada quanto a capacidade de separar as catequinas de outros metabólitos presentes no infuso. Para isso foram analisadas diversas frações, eluídas em diversas misturas de solventes (Tabela 18). Nessa etapa do trabalho, as frações foram analisadas por HPLC-DAD em fase reversa.

Tabela 18. Métodos utilizados para *clean-up* do infuso de *Byrsonima crassa*.

Adsorvente	Solventes	Sistemas de eluição
Sílica gel ¹	Hexano / Etanol	9:1 ; 1:1 ; EtOH
Sílica gel	Hexano / Etanol + 0,1% TFA	9:1 ; 1:1 ; EtOH
OASIS ²	H ₂ O / MeOH / ACN	95:5 (H ₂ O/MeOH) ; 1:1 (ACN/MeOH)
OASIS	H ₂ O / MeOH	8:2 ; 4:6 ; MeOH
C ₁₈ ³	H ₂ O / MeOH	8:2 ; 1:1 ; MeOH

¹O cartucho de fase normal (sílica) foi empacotado em nosso laboratório utilizando hexano como solvente com 500 mg de sílica gel H da Merck® com tamanho de partículas de 10 a 40 µm, em uma seringa de 1,0 cm d. i., e após o empacotamento a fase estacionária apresentou uma altura de 1,5 cm. Empacotamento e condicionamento com hexano.

²O cartucho de fase reversa polimérica utilizado foi o OASIS da marca Waters® com 150 mg de fase estacionária e 0,5 cm de altura por 1,3 cm d. i.

³Para os testes em fase reversa (C₁₈), utilizou-se cartuchos de 2 marcas diferentes, STRATA Phenomenex® e Supelco®, ambos com 500 mg de fase estacionária e 1,5 cm de altura por 1,0 cm d. i.

Todas as frações foram secas, ressuspensas em 1 mL de H₂O/MeOH (95:5 v/v) acidificado com 0,1% de TFA e injetadas no HPLC-DAD.

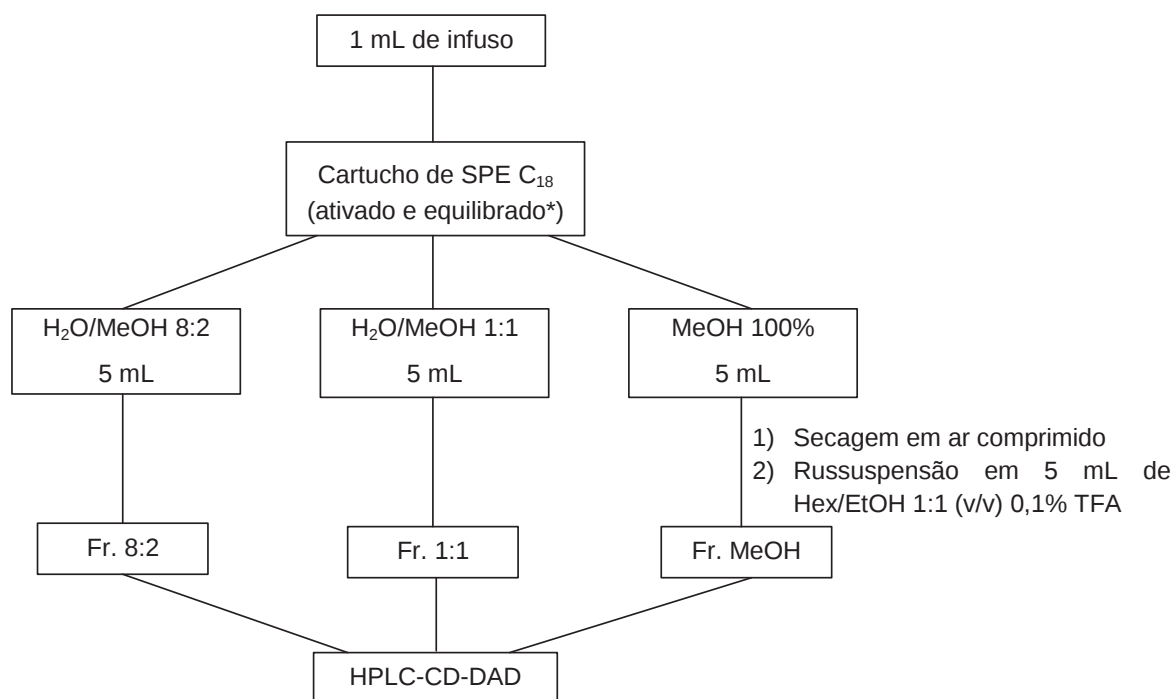
No cartucho de fase normal, 1,0 mL do infuso foi congelado, liofilizado, ressuspensado em 1 mL de Hex/EtOH (9:1 v/v) e aplicado no cartucho já condicionado com hexano.

Nos cartuchos de fase reversa, ativados com 5 mL de MeOH e condicionados com 5 mL de H₂O, foi aplicado uma alíquota de 1 mL da solução acidificada com 2% de ácido acético (o ácido aumenta a recuperação das catequinas).

Os cartuchos que apresentaram melhor seletividade foram os cartuchos de C₁₈ como fase estacionária. Portanto o teste de recuperação (exatidão) foi realizado somente nesses dois cartuchos.

A recuperação do método foi avaliada em três níveis de concentrações, 2, 50 e 100 µg.mL⁻¹, que são, respectivamente, a menor concentração, concentração média e maior concentração dentro da faixa linear. Para os testes, foi escolhido arbitrariamente o infuso das folhas de *Byrsonima crassa*, uma espécie estudada em nosso laboratório rica em catequinas, fortificado com 20 µL, 500 µL e 1000 µL de uma solução estoque de 1 mg.mL⁻¹ de (+)-(2R,3S)-catequina e (-)-(2R,3R)-epicatequina. As alíquotas fortificadas foram eluídas nos

sistemas de solventes especificados na Tabela 18, apresentando ótimas seletividade e porcentagens de recuperação nos cartuchos de C₁₈ testados. Após a eluição, as frações foram secas, ressuspensas em 1 mL de Hex/EtOH (1:1, v/v) acidificado com 0,1% de TFA e injetadas no sistema de HPLC quiral (esquema 5).



* Ativação com 5 mL de MeOH e condicionamento com 5 mL de H₂O

Esquema 5. Metodologia de *clean-up* desenvolvida para o estudo quiral das catequinas.

Os derivados de catequina foram concentrados na fração 8:2, enquanto os outros componentes do infuso eluíram nas frações 1:1 e MeOH.

A porcentagem aceitável de recuperação em análises de princípio ativo em matéria prima vegetal, estabelecida pela Anvisa, deve estar na faixa de 80-120% (AGÊNCIA..., 2011)

Embora os cartuchos de C₁₈ tenham apresentado uma seletividade satisfatória, o STRATA Phenomenex[®] foi o que apresentou uma melhor recuperação e, portanto, foi o escolhido para a utilização no método (tabela 19).

Tabela 19. Recuperação da (+)-catequina e (-)-epicatequina nos cartuchos de C₁₈ testados.

Cartuchos de C ₁₈	Recuperação (%) ^a ± DPR (%)	
	(+)-catequina	(-)-epicatequina
STRATA Phenomenex	99,8 ± 4,2	100,7 ± 2,3
Supelco	55,6 ± 2,8	61,1 ± 3,3

^a Cada valor representam a média de três replicatas (n = 3).

O Desvio Padrão Relativo (DPR) é uma medida da precisão do método, ou seja, representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI et al., 2004).

A repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia) foram realizadas avaliando os t_R e áreas dos picos de soluções contendo os quatro estereoisômeros da catequina, em três níveis de concentração, 2, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Dez injeções de cada concentração foram realizadas. Os resultados obtidos foram: 0,3-3,8% (intra-dia) e 2,0-4,8% (inter-dia), mostrando que o método possui uma boa precisão, já que, em relação a extratos vegetais, um desvio padrão relativo menor que 5 % é aceitável.

Esse método foi aplicado para análise quali e quantitativa das espécies de *Miconia* estudadas neste trabalho e outras espécies que possuem catequinas que são estudadas em nosso laboratório.

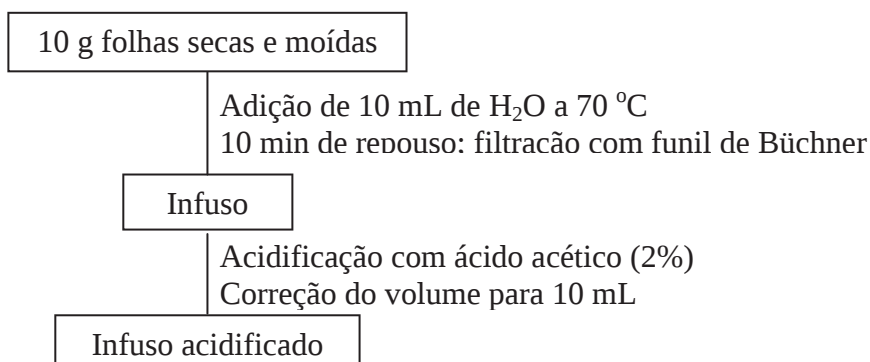
3. APLICAÇÃO DO MÉTODO

3.1 Análise quali e quantitativa de espécies de *Miconia*

Foi analisado o infuso das folhas de *M. rubiginosa* para a identificação e quantificação dos derivados de catequina presentes nesta espécie.

A quantificação foi feita pelo método de calibração externa, ou seja, as áreas dos picos de cada analito foram medidas e comparadas com aquelas obtidas para as soluções de referência de (-)-(2R,3R)-epicatequina e (+)-(2R,3S)-catequina (curvas obtidas no item 2.3).

O procedimento de preparação está ilustrado no esquema 6. Uma quantidade exata (1 mL) da solução resultante foi submetida ao *clean-up* desenvolvido.



Esquema 6. Metodologia utilizada para preparação do infuso de *M. rubiginosa* para análise por HPLC-CD-DAD.

Foi possível observar somente a presença da (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina (Fig. 38), já isolada desta espécie.

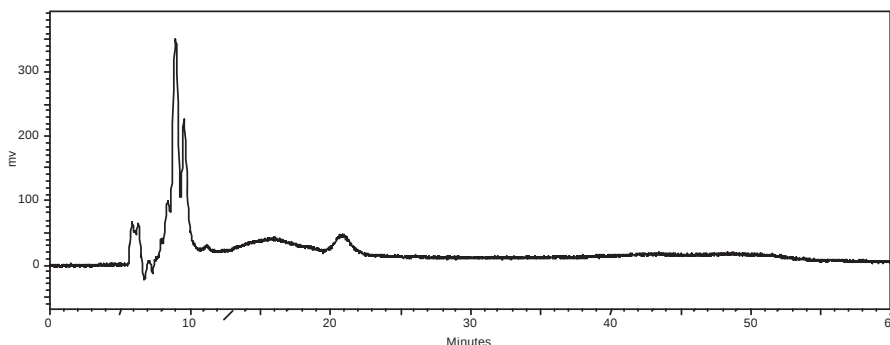


Figura 38. Cromatograma da fração 8:2 do infuso das folhas de *M. rubiginosa* [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; método: 75:25 A/B em 60 min; vazão 0,5 mL.min⁻¹; volume de injeção: 10 µL; λ 280 nm].

É bem estabelecido que pode ocorrer a epimerização das catequinas durante o processo de produção do chá. Essas substâncias sofrem epimerização no C-2. Esse processo é acelerado em valores de pH maiores que 6,0. Por isso, as amostras analisadas foram acidificadas com 2% de ácido acético (pH4).

Para analisar se houve epimerização, uma solução padrão [(+)-(2*R*,3*S*)-catequina e (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina] foi submetida aos mesmos procedimentos de extração e *clean-up* realizados com o infuso. As frações foram analisadas por HPLC-CD-DAD. Nas condições utilizadas não se observou epimerização.

A recuperação foi avaliada em três níveis de concentrações, 2, 25 e 50 µg mL⁻¹. O infuso foi fortificado com 20, 250 e 500 µL de uma solução estoque de 1 mg.mL⁻¹ de (+)-(2*R*,3*S*)-catequina e (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina.

Os resultados de recuperação e de quantificação da (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina são mostrados na tabela 20.

Tabela 20. Dados quantitativos e de recuperação do infuso de *M. rubiginosa*.

Recuperação ± DPR %	Concentração/(µg g ⁻¹) ^a ± DPR %
70,6 ± 2,2	1,5 ± 0,4

^aOs valores representam a média de três replicatas (n = 3)

O infuso das folhas de *Miconia stenostachya* foi submetido ao *clean-up* para análise quiral de derivados de catequina.

Análise por HPLC-CD-DAD permitiu inferir que as substâncias derivadas da galocatequina interferiram na identificação dos derivados de catequina, como pode ser observado no cromatograma da figura 39. Os espectros no UV das substâncias são mostrados na figura 40.

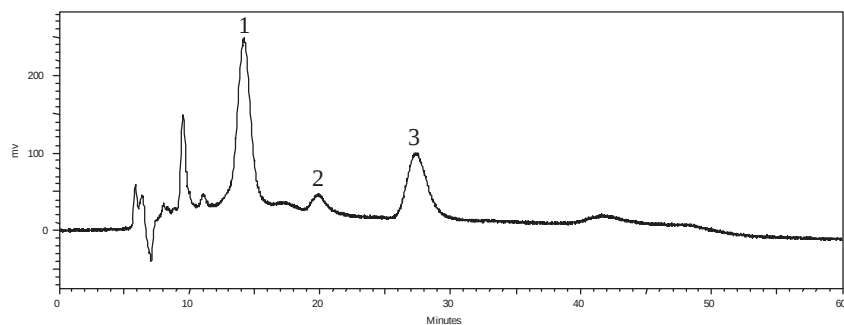


Figura 39. Perfil cromatográfico do infuso das folhas de *Miconia stenostachya* por HPLC-CD-DAD [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; método: 75:25 A/B em 60 min; vazão 0,5 mL.min⁻¹; volume de injeção: 10 µL; λ 280 nm]. Pico 1: (+)-4'-O-metilgalocatequina; Pico 2: (-)-epicatequina; Pico 3: (-)-4'-O-metilepigalocatequina.

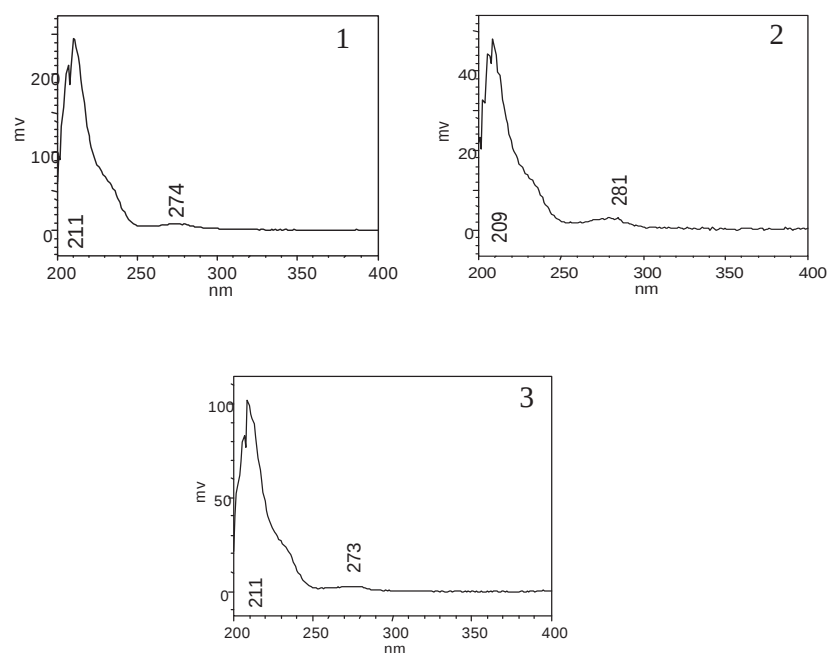


Figura 40. Espectros no UV das substâncias presentes no infuso das folhas de *M. stenostachya*.

A substância 1 [(+)-(2R,3S)-4'-O-metilgalocatequina] possui tempo de retenção na mesma região da (+)-(2R,3S)-catequina e da (-)-(2S,3R)-catequina. Portanto, se essas substâncias estiverem presentes não será possível identificá-las por esse método.

Portanto, é necessário desenvolver um método específico para espécies de plantas que possuem derivados de galocatequina e epigalocatequina.

A espécie *Miconia cabucu* foi submetida ao método desenvolvido e, análise por HPLC-CD-DAD com coluna de C₁₈, evidenciou a ausência de derivados de catequina nesta espécie.

3.2 Aplicação do método desenvolvido para outra espécie vegetal: análise qualitativa da espécie *Maytenus obtusifolia* Mart.

O gênero *Maytenus* é o mais representativo da família Celastraceae com cerca de 225 espécies distribuídas em todo o mundo. Algumas espécies são utilizadas na medicina tradicional para tratamento de doenças estomacais (ALMEIDA et al., 2010). Esse gênero tem sido extensivamente investigado por vários grupos de pesquisas no Brasil e no mundo. Nas espécies de *Maytenus* foram identificados diversas classes de metabólitos secundários, principalmente terpenos, alcaloides, flavonoides e taninos. Quanto às propriedades biológicas possuem atividades antioxidante, antitumoral, antiúlcera, antibacteriana, anti-inflamatória e neuroléptica (SILVA et al., 2008; SOUSA; ALMEIDA, 2005). Alguns trabalhos discutem a atividade antioxidante de derivados de catequina isolados de espécies de *Maytenus* (CORSINO et al., 2003). Pessuto et al. (2009) demonstraram que a estereoquímica desses derivados influencia na capacidade sequestradora de radicais livres.

As folhas de *Maytenus* são utilizadas na forma de infusos. Existem diversos produtos comerciais no mercado, vendidos com o nome de “Espinheira-Santa”. Devido à presença de derivados de catequina nestas espécies e aos estudos que mostraram que as atividades biológicas estão intimamente relacionadas com a estereoquímica dessas substâncias, é essencial um método para identificar rápida e corretamente os enantiômeros presentes nestas espécies.

A espécie *Maytenus obtusifolia* Mart. é encontrada em vários Estados das regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. É utilizada na medicina tradicional para o tratamento de úlceras (SILVA et al., 2008).

A espécie *M. obtusifolia* foi submetida ao método desenvolvido em HPLC-CD-DAD para análise qualitativa, ou seja, para avaliar a presença de derivados de catequina.

O extrato etanólico da folhas de *M. obtusifolia* foi submetido ao mesmo procedimento de *clean-up* utilizado para as espécies de *Miconia*.

A fração 8:2 (H₂O/MeOH) foi ressuspendida em Hex/EtOH 1:1 + 0,1% TFA e analisada por HPLC-CD-DAD. O cromatograma é mostrado na Fig. 41.

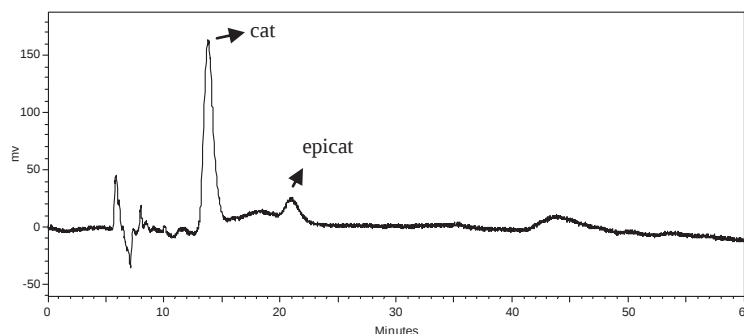


Figura 41. Perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *Maytenus obtusifolia* por HPLC-CD-DAD [Coluna Chiralcel OD-H; Solvente A: Hexano + 0,1% TFA e Solvente B: EtOH + 0,1% TFA; método: 75:25 A/B em 60 min; vazão 0,5 mL.min⁻¹; volume de injeção: 10 µL; λ 280 nm].

Através do cromatograma, pode-se observar que na espécie *M. obtusifolia* há a presença dos estereoisômeros (+)-(2R,3S)-catequina e (-)-(2R,3R)-epicatequina.

(+)-(2R,3S)-Catequina e (-)-(2R,3R)-epicatequina são os isômeros óticos mais comuns encontrados na natureza. Entretanto os enantiômeros já foram encontrados em espécies vegetais, como descreve o trabalho de Rinaldo et al. (2010), onde a (-)-(2R,3R)-epicatequina foi identificada em espécies de *Byrsonima*. Na espécie *Peperomia obtusifolia*, pertencente à família Piperaceae, foram encontrados os dois enantiômeros de um cromano (BATISTA JUNIOR et al., 2009). A correta identificação dos derivados de catequina presentes em uma planta é de extrema importância, visto que esses estereoisômeros possuem diferentes atividades biológicas. Os enantiômeros da catequina apresentam atividades opostas no metabolismo glicogênico quando testados em ratos, enquanto a (+)-catequina estimulou em 90% a produção do glicogênio, a (-)-catequina inibiu 90% a produção do mesmo (NYFELER; MOSER; WALTER, 1983). Elas também mostraram diferentes atividades alelopáticas, em que a (-)-catequina apresentou atividade fitotóxica e a (+)-catequina apresentou atividade antimicrobiana contra patógenos presentes em raízes de *Centaurea maculosa*, “Flor do mal” (BAIS et al., 2002).

O controle de qualidade de um chá deve incluir não somente a avaliação da presença de catequinas, mas também a quantificação de cada enantiômero presente na espécie. Para que se possa raciocinar mais concretamente a respeito da possível relação entre a composição química e a atividade biológica observada, não é desejável apenas o reconhecimento qualitativo do perfil químico: nem sempre o metabólito secundário isolado é aquele responsável pela atividade biológica e nem sempre é isolado o metabólito secundário presente em maior quantidade, mas sim aquele cuja técnica aplicada permitiu seu isolamento. Além disso, para o registro de um fitoterápico, segundo a atual legislação brasileira, é uma exigência que se proceda às análises quali e quantitativa do material a fim de não por em risco a saúde da população com medicamentos de origem duvidosa e cuja dose pode estar longe de ser a terapêutica, mas sim próxima à dose tóxica.

O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo e é reconhecido pela sua alta quantidade de polifenóis, em particular as catequinas. Acredita-se que essas substâncias, juntamente com taninos, sejam responsáveis pelos efeitos benéficos dos chás, tais como propriedades antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antivirais, antibacteriana, antiséptica, diurética, contra diarreia e inibição da replicação do HIV.

O chá verde e o chá preto, obtidos da espécie *Camellia sinensis*, estão entre os mais populares. No chá verde, as catequinas correspondem a aproximadamente 20% da massa seca. Existem vários estudos de quantificação na literatura para os diversos derivados de catequina presentes neste chá. No trabalho de Chen et al. (2001), os autores encontraram que a (-)-(2R,3R)-epicatequina está presente numa quantidade de 0,11 g/100 g de folhas no chá preto e 0,32-1,41 g/100 g de folhas secas no chá verde, neste caso sendo analisadas diversas marcas comerciais. Outras plantas do gênero *Camellia* também foram estudadas quanto ao teor de catequinas. Nas espécies *C. oleifera* e *C. tenuifolia* foram encontradas quantidades de (-)-(2R,3R)-epicatequina de 1,78 e 1,53 mg/g, respectivamente (WAY et al., 2009).

Nos chás pretos, a quantidade de catequina é menor devido a processos de oxidação e/ou polimerização, os quais são promovidos nesse tipo de matriz (PELILLO et al., 2002). Esse fato pode explicar a baixa concentração de (-)-(2R,3R)-epicatequina encontrada em *M. rubiginosa*, já que essa espécie possui uma grande quantidade de substâncias poliméricas, tais como taninos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

As espécies de *Miconia* possuem metabólitos e atividades biológicas interessantes, o que nos motivou a continuar o trabalho com esse gênero.

O método de extração escolhido foi a preparação por infusão, pois foi efetivo na extração de catequinas, substâncias de interesse nesta etapa do trabalho, devido apresentar interessantes atividades farmacológicas, que estão relacionadas com sua estereoquímica. Além disso, esse tipo de extração é rápido e não utiliza solventes prejudiciais à saúde e ao meio-ambiente, além de ser a preparação que mais se assemelha com as utilizadas pela população.

A primeira etapa do estudo fitoquímico foi a obtenção dos perfis cromatográficos. Os métodos desenvolvidos permitiram uma boa resolução entre as substâncias. Em etapa posterior, os picos foram identificados por co-injeção com as substâncias isoladas.

A Fração AcOEt obtida do infuso das folhas de *M. rubiginosa* foi fracionada por HSCCC. Foram isoladas as substâncias (-)-(2R,3R)-epicatequina (**Mr1**), casuarictina (**Mr2**), canferol-3-O- β -galactopiranosídeo (**Mr3**) e schinzandrisídeo (**Mr4**).

As substâncias quirais isoladas de *M. rubiginosa* tiveram sua estereoquímica absoluta confirmada através da técnica de HPLC-CD-DAD. Os Efeitos Cotton (EC) obtidos para **Mr1** (positivo em 240 nm e negativo em 280 nm) indicaram a configuração 3-R e 2-R, da (-)-epicatequina. Para o elagitanino **Mr2**, o EC negativo em 235 nm possibilitou a identificação da casuarictina [configuração (S) para o grupo HHDP]. A substância **Mr4** isolada de *M. rubiginosa* teve sua estereoquímica absoluta confirmada através da técnica de HPLC-CD-DAD. O EC negativo observado em 284 nm, além dos valores das constantes de acoplamento entre H-7' e H-8' e H-8 e H-8', indicaram a configuração absoluta 7-(S), 8-(R) e 8'-(R) do schinzandrisídeo.

A Fração AcOEt obtida do infuso das folhas de *M. stenostachya* foi submetida a cromatografia de exclusão (Sephadex LH-20). A purificação das frações por MPLC permitiu o isolamento das substâncias (+)-(2R,3S)-4'-O-metilgalocatequina (**Ms1**), (-)-(2R,3R)-4'-O-metilepigalocatequina (**Ms2**), miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo (**Ms3**) e (-)-(2R,3R)-epicatequina (**Ms4**). Através da técnica de HPLC-CD foram confirmadas as estereoquímicas absolutas das substâncias quirais isoladas.

As substâncias quirais isoladas das espécies de *Miconia* foram analisadas por HPLC-CD-DAD com colunas quirais. Em todos os cromatogramas observou-se apenas um pico, indicando que essas substâncias estão na forma enantiomericamente pura. Como já discutido,

os estereoisômeros possuem diferentes atividades biológicas. Devido a isso, é essencial a correta identificação dos enantiômeros presentes em uma espécie vegetal. Acreditava-se que as plantas sintetizavam apenas os estereoisômeros mais comuns. Entretanto, diversos trabalhos na literatura tem comprovado a presença do enantiômero menos comum em diversas espécies.

Os resultados obtidos até o momento permitiram observar que a constituição química da espécie *M. stenostachya* é diferente das outras duas espécies estudadas, *M. cabucu* e *M. rubiginosa*. Enquanto essas possuem principalmente derivados de flavonóis glicosilados, a primeira é rica em derivados de catequina.

A atividade antimicrobiana apresentada pelos EMeOH de *M. rubiginosa* e *M. stenostachya* pode ser explicada pela presença de derivados de catequina nesses extratos. Essas substâncias não foram encontradas no extrato de *M. cabucu*, que não apresentou essa atividade no mesmo teste (RODRIGUES et al., 2008).

Atualmente tem havido um grande aumento nas aplicações dos chás, especialmente nas áreas farmacológica e alimentícia. Isso tem resultado na crescente demanda de metodologias de controle de qualidade para a determinação de metabólitos nos chás e material bruto, inclusive dos metabólitos oticamente ativos, já que é conhecido o fato de que os enantiômeros de um par podem apresentar propriedades farmacológicas diferentes.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é a técnica mais largamente utilizada para a determinação e quantificação de metabólitos em chás, principalmente de flavonoides e derivados de catequina. Para análise desse tipo de metabólito secundário, o tipo de fase estacionária quiral com ampla aplicação na literatura e que apresenta os resultados mais satisfatórios é o de polímeros de carboidratos (celulose ou amilose). As análises quirais realizadas até o momento mostraram que a coluna Chiralcel OD-H de fase normal [*tris*-(3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose)], foi eficiente na separação (resolução) das substâncias quirais.

A metodologia de *clean-up* desenvolvida para a obtenção de uma fração rica em derivados de catequina apresentou ótima seletividade e recuperação. O cartucho utilizado foi o de fase reversa C₁₈ Strata Phenomenex[®]. Os valores de recuperação obtidos evidenciam uma boa exatidão para o método desenvolvido. Tanto a etapa de obtenção do infuso quanto de *clean-up* não causaram epimerização dos estereoisômeros da catequina.

O método desenvolvido para a resolução dos padrões de (±)-naringenina forneceu uma ótima separação com resolução de R_s = 2,94. O método para a separação dos padrões de (±)-

catequina e ($\pm$)-epicatequina foi adequado, apresentando uma boa resolução para os enantiômeros da catequina. Além disso, apresentou uma boa sensibilidade e boa precisão.

O método possibilitou uma avaliação qualitativa e quantitativa rápida e eficiente dos derivados de catequina presentes em espécies vegetais. Além disso, o desenvolvimento de um método que permite a análise dos quatro diastereoisômeros da catequina simultaneamente foi de extrema importância e inédito.

O sistema HPLC-CD é extremamente simples. Essa facilidade de acoplamento permite o uso em série com muitos outros detectores, como DAD, RMN, entre outros. A técnica de HPLC-CD-DAD permite uma análise mais profunda do extrato vegetal. Através dos espectros no UV é possível identificar a classe das substâncias em estudo e, no caso de coinjeção com padrões disponíveis, sua identidade. A obtenção de espectros de CD permite estabelecer a estereoquímica absoluta desses metabólitos. Esse conjunto de informações fornece maior segurança no estudo desses extratos vegetais.

A (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina foi o único derivado encontrado na espécie *M. rubiginosa* e sua quantidade foi inferior às comumente encontradas em chás ricos nessas substâncias, como por exemplo o chá verde. Esse fato pode ser explicado pela grande quantidade de substâncias poliméricas, tais como taninos, presentes em *M. rubiginosa*. A presença dessas substâncias pode indicar que essa espécie possui efeitos farmacológicos similares aos de plantas reconhecidamente ativas, como a *Camellia sinensis* (chá verde), entre outras.

Devido à presença de derivados de galocatequina na espécie *M. stenostachya*, não foi possível realizar a quantificação dos derivados de catequina. Será necessário desenvolver um novo método para quantificação de espécies que possuem essas substâncias.

O método desenvolvido foi aplicado para investigar a presença de catequinas em *Maytenus obtusifolia*. Foi detectada a presença de (+)-(2*R*,3*S*)-catequina e (-)-(2*R*,3*R*)-epicatequina, os dois estereoisômeros mais comuns encontrados nas espécies vegetais.

Portanto, a junção da técnica hifenada HPLC-CD-DAD com colunas quirais será uma ferramenta essencial no estudo de substâncias opticamente ativas isoladas de plantas de forma rápida e eficiente, sem a necessidade de etapas de isolamento e purificação demoradas e onerosas. Além disso, fornecerá informações essenciais para o correto entendimento das atividades biológicas observadas.

REFERÊNCIAS

- ABOUL-ENEIN, H. Y.; ALI, I. **Chiral separations by liquid chromatography and related technology**. New York: Marcel Dekker, 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 8 jan. 2011.
- ALMEIDA, M. T. R.; RIOS-LUCI, C.; PADRÓN, J. M.; PALERMO, J. A. Antiproliferative terpenoids and alkaloids from the roots of *Maytenus vitis-idaea* and *Maytenus spinosa*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 14/15, p. 1741-1748, 2010.
- ANDRADE E SILVA, M. L.; CUNHA, W. R.; PEDRO, C.; GARCIA, P. A.; MARTINS, C. Evaluation of the analgesic activity of an ethanol extracts of *Miconia fallax*. **Boll. Chim. Farmac.**, v. 141, n. 2, p. 158-160, 2002.
- BAIS, H. P.; WALKER, T. S.; STERMITZ, F. R.; HUFBAUER, R. A.; VIVANCO, J. M. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. **Plant Physiol.**, v. 128, n. 4, p. 1173-1179, 2002.
- BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Pure enantiomeric substances: the question of chiral drugs. **Quim. Nova**, v. 20, n. 6, p. 647-656, 1997.
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Utilization of H-1 NMR in the determination of absolute configuration of alcohols. **Quim. Nova**, v. 28, n. 6, p. 1061-1065, 2005.
- BASE DE DADOS TROPICAL. **O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae) no estado de São Paulo**. Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/iRead>>. Acesso em: 25 fev. 2005.
- BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, W. **Circular dichroism: principles and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.
- BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. Enantioselective analysis of drugs: contributions of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

BRINGMANN, G.; MESSER, K.; WOHLFARTH, M.; KRAUS, J.; DUMBUYA, K.; RÜCKERT, M. HPLC-CD on-line coupling in combination with HPLC-NMR and HPLC-MS/MS for the determination of the full absolute stereostructure of new metabolites in plant extracts. **Anal. Chem.**, v. 71, n. 14, p. 2678-2686, 1999.

BRINGMANN, G.; TASLER, S.; ENDRESS, H.; KRAUS, J.; MESSER, K.; WOHLFARTH, M.; LOBIN, W. Murrastifoline-F: first total synthesis, atropo-enantiomer resolution, and stereoanalysis of an axially chiral N,C-coupled biaryl alkaloid. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 123, n. 12, p. 2703-2711, 2001.

BRUICE, P. Y. **Organic chemistry**. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2003.

CACCAMESE, S.; MANNA, L.; SCIVOLI, G. Chiral HPLC separation and CD spectra of the C-2 diastereomers of naringenin in grapefruit during maturation. **Chirality**, v. 15, n. 8, p. 661-667, 2003.

CACCAMESE, S.; CARUSO, C.; PARRINELLO, N.; SAVARINO, A. High-performance liquid chromatography separation and chiroptical properties of the enantiomers of naringenin and others flavanones. **J. Chromatogr. A**, v. 1076, n. 1/2, p. 155-162, 2005.

CALDERÓN, A. I.; TERREAUX, C.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Occurrence of taxiphyllin and 3,3-di-O-methylellagic acid 4- β -D-glucoside in *Henriettella fascicularis*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 31, n. 7, p. 789-791, 2003.

CALDERÓN, A. I.; TERREAUX, C.; SCHENK, K.; PATTISON, P.; BURDETTE, J. E.; PEZZUTO, J. M.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Isolation and structure elucidation of an isoflavone and a sesterterpenoic acid from *Henriettella fascicularis*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, n. 12, p. 1749-1753, 2002.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: Ed. UFSCar, 2001.

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

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

CHEN, Z.; ZHU, Q. Y.; TSANG, D.; HUANG, Y. Degradation of green tea catechins in tea drinks. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 1, p. 477-482, 2001.

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

CONWAY, W. D. **Countercurrent chromatography**: apparatus, theory & applications. New York: VCH, 1990.

CORSINO, J.; SILVA, D. H. S.; ZANONI, M. V. B.; BOLZANI, V. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytother. Res.**, v. 17, n. 8, p. 913-916, 2003.

CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural products from plants**. 2nd ed. New York: CRC Press, 2006.

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

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

CUNHA, W. R.; ARANTES, G. M.; FERREIRA, D. S.; LUCARINI, R.; SILVA, M. L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA FILHO, A. A.; CROTTI, A. E. M.; ARAÚJO, A. R. B. Hypoglycemic effect of *Leandra lacunosa* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 79, n. 5, p. 356-360, 2008.

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

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais**: verdades e mentiras. São Paulo: Ed. UNESP, 2007.

DONG, L.; NI, W.; DONG, J.; LI, J.; CHEN, C.; LIU, H. A new neolignan glycoside from the leaves of *Acer truncatam*. **Molecules**, v. 11, n. 12, p. 1009-1014, 2006.

DURIGAN, G.; BAITELLO, J. B.; FRANCO, G. A. D. C.; SIQUEIRA, M. F. **Plantas do cerrado paulista**: imagens de uma paisagem ameaçada. São Paulo: Páginas & Letras, 2004.

GAFFIELD, W. Circular dichroism, optical rotatory dispersion and absolute configuration of flavanone, 3-hydroxyflavanones and their glycosides. **Tetrahedron**, v. 26, n. 17, p. 4093-4108, 1970.

GARCIA, J.; MASSOMA, T.; MORIN, C.; MPONDO, T. N.; NYASSÉ, B. 4'-O-Methylgallo catechin from *Panda oleosa*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1626-1628, 1993.

GOLDENBERG, R. The genus *Miconia* (Melastomataceae) in the State of Paraná, Brazil. **Acta Bot. Bras.**, v. 18, n. 4, p. 927-947, 2004.

GOTTI, R.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S.; CAVRINI, V. Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1112, n. 1/2, p. 345-352, 2006.

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

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

HASLAM, E. Vegetable tannins – lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2713-2721, 2007.

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

HUSSEIN, G.; NAKAMURA, N.; MESELHY, M. R.; HATTORI, M. Phenolics from *Maytenus senegalensis*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 4, p. 689-694, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Ecossistemas brasileiros**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/>>. Acesso em: 02 fev. 2010.

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

ITO, R.; YAMAMOTO, A.; KODAMA, S.; KATO, K.; YOSHIMURA, Y.; MATSUNAGA, A.; NAKAZAWA, H. A study on the change of enantiomeric purity of catechins in green tea infusion. **Food Chem.**, v. 83, n. 4, p. 563-568, 2003.

KALOUSTIAN, M. **Concepts and terminology in organic chemistry**. Boston: Elsevier, 2004.

KANAZAWA, H.; KUNITO, Y.; MATSUSHIMA, Y.; OKUBO, S.; MASHIGE, F. Stereospecific analysis of lorazepam in plasma by chiral column chromatography with circular dichroism-based detector. **J. Chromatogr. A**, v. 871, n. 1/2, p. 181-188, 2000.

KATAYAMA, T.; DAVIN, L. B.; CHU, A.; LEWIS, N. G. Novel benzylic ether reductions in lignin biogenesis in *Forsythia intermedia*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 3, p. 581-591, 1993.

KLYNE, W.; STEVENSON, R.; SWAN, R. J. Optical rotatory dispersion. XXVIII. Absolute configuration of otobain and derivatives. **J. Chem. Soc. C**, v. 9, p. 893-896, 1966.

KORVER, O.; WILKINS C. K. Circular dichroism spectra of flavanols. **Tetrahedron**, v. 27, n. 22, p. 5459-5465, 1971.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004.

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

LI, Y.; WU, X.; LI, J.; WANG, Y.; YU, S.; LV, H.; QU, J.; ABLIZ, Z.; LIU, J.; LIU, Y.; DU, D. Identification of cardiac glycosides in fractions from *Periploca forrestii* by high-performance liquid chromatography/diode-array detection/electrospray ionization multi-stage tandem mass spectrometry and liquid chromatography/nuclear magnetic resonance. **J. Chromatogr. B**, v. 878, n. 3/4, p. 381-390, 2010.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. The rebirth of a drug: thalidomide. **Quim. Nova**, v. 24, n. 5, p. 683-688, 2001.

LIMA, V. L. E. Drugs and chirality: a brief overview. **Quim. Nova**, v. 20, n. 6, p. 657-663, 1997.

LIU, C.; CHEN, J.; WANG, J. A novel kaempferol triglycoside from flowers buds of *Panax quinquefolium*. **Chem. Nat. Comp.**, v. 45, n. 6, p. 808-810, 2009.

LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. **Res. Adv. Phytochem.**, v. 2, p. 19-108, 2001.

MACIEL, E. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. The state of art of ultra performance liquid chromatography. **Quim. Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MAN, S.; GAO, W.; ZHANG, Y.; WANG, J.; ZHAO, W.; HUANG, L.; LIU, C. Qualitative and quantitative determination of major saponins in *Paris* and *Trillium* by HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS. **J. Chromatogr. B**, v. 878, n. 29, p. 2943-2948, 2010.

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

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

MARTINS, A. B.; SEMIR, J.; GOLDENBERG, R.; MARTINS, E. O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. no estado de São Paulo. **Acta Bot. Bras.**, v. 10, n. 2, p. 267-316, 1996.

McCONNELL, P.; BACH II, A.; BALIBAR, C.; BYRNE, N.; CAI, Y.; CARTER, G.; CHLENOV, M.; DI, L.; FAN, K.; GOJER, I.; HE, Y.; HEROLD, D.; KAGAN, M.; KERNS, E.; KOEHN, F.; KRAML, C.; MARATHIAS, V.; MARQUEZ, B.; McDONALD, L.; NOGLE, L.; PETUCCI, C.; SCHLINGMANN, G.; TAWA, G.; TISCHLER, M.; WILLIAMSON, R. T.; SUTHERLAND, A.; WATTS, W.; YOUNG, M.; ZHANG, M. Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, D.; HO, D. Enantiomeric separation and determination of absolute stereochemistry of asymmetric molecules in drug discovery-building chiral technology toolboxes. **Chirality**, v. 19, n. 9, p. 658-682, 2007.

MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1105-1107, 1999.

MESSIANO, G. B. **Terpenos e lignanas de Aristolochiaceae**. 2010. 128 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

MIMURA, M. R. M.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Distribution of flavonoids and the taxonomy of *Huberia* (Melastomataceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2004.

MONAGAS, M.; GARRIDO, I.; LEBRÓN-AGUILAR, R.; GÓMEZ-CORDOVÉS, M. C.; RYBARCZYK, A.; AMAROWICZ, R.; BARTOLOMÉ, B. Comparative flavan-3-ol profile and antioxidant capacity of roasted peanut, hazelnut, and almond skins. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, n. 22, p. 10590-10599, 2009.

MORRIS, D. G. **Stereochemistry**. Cambridge: RSC, 2001.

MOSS, G. P. Nomenclature of lignans and neolignans. **Pure Appl. Chem.**, v. 72, n. 8, p. 1493-1523, 2000.

MUTANYATTA, J.; BEZABIH, M.; ABEGAZ, B. M.; DREYER, M.; BRUN, R.; KOCHER, N.; BRINGMANN, G. The first 6'-O-sulfated phenylanthraquinones: isolation from *Bulbine frutescens*, structural elucidation, enantiomeric purity, and partial synthesis. **Tetrahedron**, v. 61, n. 35, p. 8475-8484, 2005.

NONAKA, G.; ISHIMATSU, M.; AGETA, M.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. LXXVI. Isolation and characterization of Cercidinins A and B and Cuspinin, unusual 2,3-(*R*)-hexahydroxydiphenol glucoses from *Cercidiphyllum japonicum* and *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 37, n. 1, p. 50-53, 1989.

NYFELER, F.; MOSER, U. K.; WALTER, P. Stereospecific effects of (+)- and (-)-catechin on glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. **Biochim. Biophys. Acta: Mol. Cell Res.**, v. 763, n. 1, p. 50-57, 1983.

OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases. **J. Chromatogr. A**, v. 666, n. 1/2, p. 403-419, 1994.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; KUWAHARA, M.; MEMON, M. U.; SHINGU, T. Tannins of Rosaceous medicinal plants. I. Structures of potentillin, agrimonic acids A and B, and agrimoniin, a dimeric ellagitannin. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 32, n. 6, p. 2165-2173, 1984.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T.; KOGA, T.; TOH, N.; KURIYAMA, K. Circular dichroism of hydrolysable tannins – I. Ellagitannins and gallotannins. **Tetrahedron Lett.**, v. 23, n. 38, p. 3937-3940, 1982.

OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. **The cerrados of Brazil** – ecology and natural history of a neotropical savana. New York: Columbia University Press, 2002.

OMULOKOLI, E.; KHAN, B.; CHHABRA, S. C. Antiplasmodial activity of four kenyan medicinal plants. **J. Ethnopharm.**, v. 56, n. 2, p. 133-137, 1997.

PATIL, B. S.; JAYAPRAKASHA, K. N.; MURTHY, K. N. C.; VIKRAM, A. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 18, p. 8142-8160, 2009.

PELILLO, M.; BIGUZZI, B.; BENDINI, A.; TOSCHI, T. G.; VANZINI, M.; LERCKER, G. Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the analysis of tea catechins. **Food Chem.**, v. 78, n. 3, p. 369-374, 2002.

PERVA-UZUNALIC, A.; SKERGET, M.; KNEZ, Z.; WEINREICH, B.; OTTO, F.; GRÜNER, S. Extraction efficiency of major catechins and caffeine. **Food Chem.**, v. 96, n. 4, p. 597-605, 2006.

PESSUTO, M. B.; COSTA, I. C.; SOUZA, A. B.; NICOLI, F. M.; MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; LUFTMANN, H. Antioxidant activity of extracts and condensed tannins from leaves of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 412-416, 2009.

PORTAL BRASIL. **O Cerrado brasileiro**. Disponível em:
<<http://www.portalbrasil.eti.br/cerrado>>. Acesso em: 02 fev. 2010.

REN, D. M.; GUO, H. F.; WANG, S. Q.; LOU, H. X. Separation and structure determination of two diastereomeric pairs of enantiomers from *Dracocephalum rupestre* by high-performance liquid chromatography with circular dichroism detection. **J. Chromatogr. A**, v. 1161, n. 1/2, p. 334-337, 2007.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RINALDO, D.; BATISTA JÚNIOR, J. M.; RODRIGUES, J.; BENFATTI, A. C.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; FURLAN, M.; VILEGAS, W. Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD. **Chirality**, v. 22, n. 8, p. 726-733, 2010.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **J. Chromatogr. A**, v. 1000, n. 1/2, p. 657-691, 2003.

RODRIGUES, J. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Miconia* spp.** 2007. 154 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. An unusual C₆-C₆' linked flavonoid of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). **Phytochemistry**, v. 68, n. 13, p. 1781-1784, 2007.

RODRIGUES, J.; MICHELIN, D. C.; RINALDO, D.; ZOCCOLO, G. J.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Miconia* species (Melastomataceae). **J. Med. Food.**, v. 11, n. 1, p. 120-126, 2008.

SADHU, S. K.; KHATUN, A.; PHATTANAWASINA, P.; OHTSUKI, T.; ISHIBASHI, M. Lignan glycosides and flavonoids from *Saraca asoca* with antioxidant activity. **J. Nat. Med.**, v. 61, n. 4, p. 480-482, 2007.

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* Gardner and *Mouriri elliptica* Martius. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, n. 8, p. 2721-2727, 2008.

SILVA, M. S.; SOUSA, S. P.; MEDEIROS, V. M.; FOLLY, M. A. B.; TAVARES, J. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Alkaloids, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 36, n. 5/6, p. 500-503, 2008.

SILVA, T. **Lignanas ariltetralônicas de *Holostylis reniformis* Duch.:** isolamento, síntese, biossíntese e avaliação biológica. 2006. 262 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

SIRAT, H. M.; REZALI, M. F.; UJANG, Z. Isolation and identification of radical scavenging and tyrosinase inhibition of polyphenols from *Tibouchina semidecandra* L. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 19, p. 10404-10409, 2010.

SLADE, D.; FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 66, n. 18, p. 2177-2215, 2005.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N. Neuroleptic-like properties of the chloroform extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. roots. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 2, p. 224-225, 2005.

SOUSA, S. A.; ALVES, S. F.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Determination of tannins and methylxanthines in powdered guarana (*Paullinia cupana* Kurth, Sapindaceae) by high performance liquid chromatography. **Braz. J. Pharm.**, v. 20, n. 6, p.866-870, 2010.

SPESSOTO, M. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R. Evaluation of the analgesic activity on extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, v. 10, n. 6/7, p. 606-609, 2003.

SUSANTI, D.; SIRAT, H. M.; AHMAD, F.; ALI, R. M.; AIMI, N.; KITAJIMA, M. Antioxidant and cytotoxic flavonoids from the flowers of *Melastoma malabathricum* L. **Food Chem.**, v. 103, n. 3, p. 710-716, 2007.

TANAKA, T.; TACHIBANA, H.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I.; HSU, F.; KOHDA, H.; TANAKA, O. Tannins and related compounds. CXXII. New dimeric, trimeric and tetrameric ellagitannins, Lambertianins A-D, from *Rubus lambertianus* SERINGE. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 41, n. 7, p. 1214-1220, 1993.

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

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com>>. Acesso em: 8 jan. 2011.

VASCONCELOS, P. C. P.; ANDREO, M.; VILEGAS W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; PELLIZZON, C. H. Effect of *Mouriri pusa* tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. **J. Ethnopharm.**, v. 131, n. 1, p. 146-153, 2010.

VASCONCELOS, P. C. P.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R. K.; PELLIZZON, C. H. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. **J. Ethnopharm.**, v. 115, n. 2, p. 293-301, 2008.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VENTURA, C. P.; SOUZA FILHO, J. D.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. A flavanone and other constituents of the brazilian endemic species *Trembleya laniflora* (D. Don) Cogn. (Melastomataceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 35, n. 1, p. 40-41, 2007.

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

WAINER, I. W. The therapeutic promise of single enantiomers: introduction. **Hum. Psychopharm. Clin. Exp.**, v. 16, p. S73-S77, 2001. Suppl. 2.

WANNES, W. A.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, M. B.; OUCHIKH, O.; HAMDAOUI, G.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, n. 5, p. 1362-1370, 2010.

WAY, T.; LIN, H.; HUA, K.; LEE, J.; LI, W.; LEE, M.; SHUANG, C.; LIN, J. Beneficial effects of different tea flowers against human breast cancer MCF-7 cells. **Food Chem.**, v. 114, n. 4, p. 1231-1236, 2009.

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

YASHIMA, E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. **J. Chromatogr. A**, v. 906, n. 1/2, p. 105-125, 2001.

YÁÑES, J. A.; ANDREWS, P. K.; DAVIES, N. M. Methods of analysis and separation of chiral flavonoids. **J. Chromatogr. B**, v. 848, n. 2, p. 159-181, 2007.

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

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

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

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

ZHAI, H.; INOUE, T.; MORIYAMA, M.; ESUMI, T.; MITSUMOTO, Y.; FUKUYAMA, Y. Neuroprotective effects of 2,5-diaryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 2, p. 289-293, 2005.

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

ZHANG, Y.; WATTS, W.; NOGLE, L.; McCONNELL, O. Rapid method development for chiral separation in drug discovery using multi-column parallel screening and circular dichroism signal pooling. **J. Chromatogr. A**, v. 1049, n. 1/2, p. 75-84, 2004.