



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E INIBITÓRIA DAS
CATEPSINAS B e K DE *Miconia ferruginata* (MELASTOMATACEAE)**

Gracielle Silva de Oliveira*

Orientador: Professor Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

Co-orientador: Professor Dr. Paulo Cezar Vieira

* Bolsista CAPES

**Anápolis - GO
2010**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

Gracielle Silva de Oliveira

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E INIBITÓRIA DAS
CATEPSINAS B e K DE *Miconia ferruginata* (MELASTOMATACEAE)**

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Moleculares
(Físico-Química Molecular).

Orientador: Professor Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

Co-orientador: Professor Dr. Paulo Cezar Vieira

* Bolsista CAPES

**Anápolis - GO
2010**

Ficha catalográfica

Oliveira, Gracielle Silva de.

Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica e inibitória das catepsinas B e K de *Miconia ferruginata* (Melastomataceae)/ Gracielle Silva de Oliveira. - 2010.

98 f.: figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2010.

Bibliografia.


1. Química Orgânica. 2. Estudo Fitoquímico. 3. Melastomataceae. I. Título.

Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades Antimicrobiana, Citotóxica e Inibitória das Catepsinas B e K de *Miconia ferruginata* (Melastomataceae)

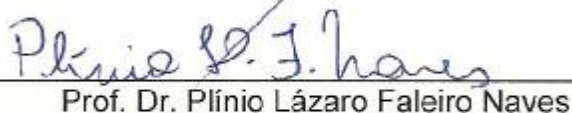
GRACIELLE SILVA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Mestrado em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada por:



Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes



Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves



Prof. Dr. Luciano Morais Lião

ANÁPOLIS, GO- BRASIL
MARÇO 2010

... valeu a pena!

Gracielle Silva de Oliveira

iv

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes pela amizade, orientação, confiança depositada e ensinamentos transmitidos sempre com muita ética e seriedade.

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar por me acolher e proporcionar toda a estrutura para a realização de boa parte do trabalho. Pelo tempo dedicado, pelos ensinamentos e tão grande colaboração, obrigada.

Aos amigos da UFSCar, em especial ao Jame's e ao Titi.

Aos demais professores da UEG e do DQ-UFSCar pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários e técnicos da UEG e da UFSCar.

Aos meus amigos de laboratório da UEG, pela amizade, companhia, incentivo, prontidão e por me proporcionarem momentos tão felizes. Impossível nomeá-los sem cometer falhas!

À Ana Paula Terezan do Laboratório de Bioensaios da UFSCar pelos ensaios antimicrobianos.

Ao Prof. Manoel Odorico de Moraes e a todos do Laboratório de Oncologia Experimental da UFC pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

Aos meus amigos e familiares pelo constante incentivo e compreensão, principalmente nos momentos de ausência. Obrigada pela torcida!

Aos meus pais Nicanor e Edna, que muitas vezes sem nem mesmo entender meus objetivos, nunca mediram esforços para minha realização profissional, me incentivando sempre para que tudo fosse alcançado com responsabilidade, honestidade e para que nunca desistisse diante das dificuldades.

Aos meus irmãos Bruna e Pedro Henrique pelo amor e desprendimento, por estarem sempre ao meu lado e me incentivando.

Ao Mário por fazer parte da minha vida de um modo tão especial, tornando tudo mais prazeroso e fácil de ser conseguido, sempre com sua presença incondicional.

À Capes pelo apoio financeiro.

A Deus pela minha existência e oportunidade de viver tudo isso.

CURRICULUM VITAE

1. Atuação Profissional

- 2009 - 2009** Tutora da disciplina de Química Orgânica - UEG
- 2006 - 2007** Iniciação Científica PIBIC/CNPq/UEG
- 2006 - 2006** Monitora de Química Analítica II - UEG
- 2005 - 2005** Monitora de Química Analítica I - UEG

2. Formação Complementar

- Ressonância Magnética Nuclear 1D Experimental (30h) - UFSCar - 2009.
- Química de Produtos Naturais Secundários (195h) - UFSCar- 2009.
- Supramolecular and Biomimetic Chemistry (15h) – UFSCar- 2009.
- Química Verde: Fundamentos e Aplicações (15h) – UFSCar- 2009.
- Modelagem Molecular de Fármacos (10h) - UCG- 2008.
- Metales em Sistemas Bioinorganicos de Interes Farmacologico (15h) – UFSCar- 2008.
- Introdução a Espectroscopia Raman Aplicada à Química (15h) – UFSCar- 2008.
- A Busca de Substâncias Ativas de Plantas na Cura de Doenças Tropicais (16h) - UniEVANGÉLICA - 2006.

3. Participação em Eventos

- 2 nd Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology - 2009.
- XXIX Escola de Verão em Química *Prof. Dr. José Tércio B. Ferreira* - 2009.
- I Simpósio em Biotecnologia Molecular Industrial - 2008.
- XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X Congresso Internacional de Etnofarmacologia - 2008.
- XXVIII Escola de Verão em Química *Prof. Dr. José Tércio B. Ferreira* - 2008.
- XLVI Congresso Brasileiro de Química - 2006.
- V Seminário de Iniciação Científica - UEG - 2007.
- II Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação - UEG - 2007.
- II Semana da Química - UEG - 2006.
- IV Seminário de Iniciação Científica - UEG - 2006.
- I Semana da Química - UEG - 2005.
- III Encontro de Química e II Simpósio de Gestão Sanitária e Ambiental - UEG - 2004.

- Seminário de Instrumentação Tecnológica - UEG - 2004.

4. Produção Bibliográfica

1. OLIVEIRA, G.S. ; MENEZES, A. C. S. ; VIEIRA, P. C. ; SILVA, J. A. ; BURGER, M. C. M. ; LIMA, R. S. Evaluation of the inhibitory activities of compounds isolated from *Miconia ferruginata* (Melastomataceae) on cathepsin K. In: *2 nd Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology*, 2009, São Pedro - SP.
2. BURGER, M. C. M. ; MENEZES, A. C. S. ; VIEIRA, P. C. ; OLIVEIRA, G.S. ; LIMA, R. S. ; SILVA, J. A. Inhibitory activity of myrsinoic A acid and derivatives isolated from *Myrsine cuneifolia* (Myrsinaceae) on cathepsin K. In: *2 nd Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology*, 2009, São Pedro - SP.
3. MALHEIROS, L. V. ; MENEZES, A. C. S. ; OLIVEIRA, G.S. ; LACERDA, E. P. S. ; LIMA, A. P. Avaliação da Atividade Antitumoral das Frações Obtidas das Folhas de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae). In: *XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology*, 2008, São Paulo. Programa e Anais, 2008. p. 856-856.
4. BATISTA, P. A. R. ; OLIVEIRA, G.S. ; MENEZES, A. C. S. ; LACERDA, E. P. S. ; LIMA, A. P. Avaliação da Atividade Citotóxica das Frações Obtidas das Folhas de *Erythroxylum campestre* (Erythroxylaceae) Frente à Célula Sarcoma 180. In: *XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology*, 2008, São Paulo. Programa e Anais, 2008. p. 865-865.
5. OLIVEIRA, G.S. ; NASCIMENTO, G. C. ; MENEZES, A. C. S. ; LACERDA, E. P. S. ; LIMA, A. P. Avaliação da Atividade Antitumoral dos Extratos Particionados de Espécies do Gênero *Erythroxylum*. In: *II Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação*, 2007, Anápolis.
6. OLIVEIRA, G.S. ; SILVA, H. C. ; BATISTA, P. A. R. Estudo comparativo das indicações do uso de quatro plantas medicinais mais comercializadas por raizeiros da cidade de Anápolis-GO. In: *IV Seminário de Iniciação Científica*, 2006, Anápolis.

5. Organização de Eventos

- II Semana da Química da UEG. 2006

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E INIBITÓRIA DAS CATEPSINAS B e K DE *Miconia ferruginata* (MELASTOMATACEAE). O presente trabalho apresenta o estudo fitoquímico e os ensaios biológicos realizados com o extrato orgânico das folhas de *Miconia ferruginata*. Dentre as substâncias isoladas, algumas foram avaliadas quanto ao potencial antimicrobiano, citotóxico e inibitório das catepsinas B e K. Uma das amostras foi submetida à modificação estrutural com o objetivo de verificar-se a relação estrutura-atividade das moléculas presentes na amostra. O estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *M. ferruginata* levou ao isolamento e identificação de 7 substâncias: as flavonas 5,7,4'-triidroxi-6,8-dimetilflavona, 5,6,7-triidroxi-4'-metoxiflavona e 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-8-metilflavona, além dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico e dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol e à proposta de dois isômeros para um quarto flavonóide. A mistura dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico inibiu consideravelmente a atividade enzimática da catepsina B (IC_{50} = 13,02 μ M), apresentando também inibição de quatro dos cinco microrganismos frente aos quais foi testada. A mistura dos ésteres ursolato e oleanolato de metila, obtida a partir da reação com diazometano da mistura dos triterpenos na forma ácida, não apresentou resultados consideráveis nos ensaios antimicrobianos e inibitório enzimático da catepsina B. No entanto, demonstrou considerável inibição da catepsina K (IC_{50} = 1,42 μ M) e das linhagens tumorais do melanoma (MDA-MB-435) e câncer de cólon (HCT-8). Dos compostos isolados, as flavonas 5,7,4'-triidroxi-6,8-dimetilflavona, 5,6,7-triidroxi-4'-metoxiflavona e 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-8-metilflavona são relatadas pela primeira vez no gênero *Miconia*.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL, CITOTOXIC AND INHIBITORY ACTIVITIES AGAINST CATHEPSINS B AND K OF *Miconia ferruginata* (MELASTOMATACEAE). In this work the phytochemical study and biological tests performed with the organic extract of the leaves of *Miconia ferruginata* are presented. Among the substances isolated, some were evaluated for potential antimicrobial, cytotoxic and inhibitory uses against cathepsins B and K. One sample was subjected to structural modification in order to verify the structure-activity relationship of the molecules in the sample. Phytochemical study of the ethanol extract of the leaves of *M. ferruginata* lead to the isolation and identification of 7 substances: the flavones 5,7,4'-trihydroxy-6,8-dimethylflavone, 5,6,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone and 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-8-methylflavone; the triterpenes ursolic and oleanolic acids; the steroids β -sitosterol and stigmasterol, besides the structural propose for a fourth flavonoid. A mixture of triterpenes ursolic and oleanolic acids inhibited significantly the enzymatic activity of cathepsin B ($IC_{50} = 13.02 \mu M$), displaying also inhibition of four of the five microorganisms where was tested. The mixture of ursolate and oleanolate methyl esters obtained from the reaction with diazomethane of the mixture of triterpenes in the acid form did not show significant results in the antimicrobial assays and enzyme inhibition against cathepsin B. However, showed considerable inhibition against the cathepsin K ($IC_{50} = 1.42 \mu M$) and cell lines of melanoma tumor (MDA-MB-435) and colon cancer (HCT-8). The flavones 5,7,4'-trihydroxy-6,8-dimethylflavone, 5,6,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone and 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-8-methylflavone are reported for the first time in the genus *Miconia*.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Produtos Naturais Bioativos	2
2.2. As Cisteíno Peptidases Lisossomais	4
2.2.1. Catepsina B e Processos Cancerígenos	5
2.2.2. Catepsina K e Doenças Ósseas	6
2.3. Câncer	8
2.4. Atividade Antimicrobiana de Plantas	10
2.5. Flavonóides	11
2.6. Triterpenos	13
2.7. Esteróides	17
2.8. A família Melastomataceae	18
2.9. O gênero <i>Miconia</i>	19
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	24
3.1. Materiais e Métodos	24
3.2. Coleta e Identificação do Material Botânico	25
3.3. Obtenção do Extrato	25
3.4. Fracionamento do extrato	26
3.5. Isolamento dos Constituintes Químicos de <i>M. ferruginata</i>	27
3.5.1. Estudo Fitoquímico de MFFE-H	27
3.5.2. Estudo Fitoquímico de MFFE-A	29
3.5.3. Estudo Fitoquímico de MFFE-D	33
3.6. Metodologia dos ensaios biológicos	35
3.6.1. Ensaio Enzimáticos	35
3.6.2. Ensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	36
3.6.3. Ensaio Antimicrobianos	37
3.7. Análises por RMN	38

3.8. Análises por CG/MS	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Substâncias Isoladas	39
4.2. Identificação da substância F1	41
4.3. Identificação da substância F2	47
4.4. Identificação da substância F3	52
4.5. Identificação da substância F4	57
4.6. Identificação das substâncias T1 e T2 em mistura	60
4.7. Identificação das substâncias E1 e E2 em mistura	63
4.8. Atividades Biológicas	66
4.8.1. Ensaio de Inibição Enzimática	66
4.8.2. Ensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	70
4.8.3. Ensaio Antimicrobianos	71
5. CONCLUSÕES	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
Actn	Acetona
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTE	Ditioeritritol
EM	Espectro de massa
EtOH	Etanol
h	Altura
HMBC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
m	Multipleteo
Me	Metila
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
MHz	Mega hertz
m/z	Relação massa/carga
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
t	Tripleteo
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
φ	Diâmetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Inibição da proliferação celular do ácido ursólico e ácido oleanólico em diferentes linhagens celulares	16
Tabela 3.1. Massa de material vegetal e quantidade de extrato obtido	26
Tabela 3.2. Massas obtidas da partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico	27
Tabela 4.1. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 5,7,4'-trihidroxi-6,8-dimetilflavona	43
Tabela 4.2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona	50
Tabela 4.3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-8-metilflavona	55
Tabela 4.4. Inibição das catepsinas B e K pelo extrato e frações de <i>M. ferruginata</i>	67
Tabela 4.5. Inibição das catepsinas B e K pelas misturas T1 , T2 e T1' , T2'	68
Tabela 4.6. Porcentagem de inibição de alguns triterpenos	70
Tabela 4.7. Porcentagem de inibição dos triterpenos metilados (T1' e T2')	71
Tabela 4.8. Porcentagem de inibição dos triterpenos ácidos (T1 e T2)	71
Tabela 4.9. Concentração inibitória mínima dos triterpenos T1 e T2 e dos antibióticos de referência frente aos microorganismos	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Salicina, saligenina, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico	2
Figura 2.2. Morfina e seu derivado semi-sintético	3
Figura 2.3. Quinina e seus derivados com propriedades antimalariais	3
Figura 2.4. Artemisina e seus derivados	4
Figura 2.5. Biflavonóides de <i>Taxodium mucronatum</i> e <i>Cycas guizhouensis</i> inibidores da catepsina B.	6
Figura 2.6. Produtos naturais inibidores da catepsina K	7
Figura 2.7. Vimblastina, vincristina e paclitaxel	8
Figura 2.8. Camptotecina, isolada de <i>Camptotheca acuminata</i> , e seus derivados semi-sintéticos	9
Figura 2.9. Estruturas químicas da podofilotoxina e de alguns de seus derivados	9
Figura 2.10. Homoarringtonina, isolado de <i>Cephalotaxua harringtonia</i>	10
Figura 2.11. Biossíntese de flavonóides	12
Figura 2.12. Biossíntese dos triterpenos	14
Figura 2.13. Esqueleto triterpênico pentacíclico e potenciais sítios de oxidação em triterpenos do tipo β -amirina	15
Figura 2.14. REA para triterpenos do tipo oleanano e ursano quanto à atividade citotóxica	17
Figura 2.15. Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>M. lepidota</i>	19
Figura 2.16. Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>M. stenostachya</i>	20
Figura 2.17. Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>M. rubiginosa</i>	20
Figura 2.18. Substâncias isoladas de <i>M. cabucu</i>	21
Figura 2.19. Substâncias isoladas de <i>M. ligustroides</i> e <i>M. sellowiana</i>	22
Figura 3.1. Obtenção do extrato de <i>M. ferruginata</i>	25
Figura 3.2. Metodologia utilizada na partição do extrato	26
Figura 3.3. Fracionamento de MFFE-H	26

Figura 3.4. Isolamento da substância F3	28
Figura 3.5. Isolamento das substâncias T1 e T2	29
Figura 3.6. Fracionamento de MFFE-A	30
Figura 3.7. Isolamento das substâncias E1 e E2	31
Figura 3.8. Isolamento da substância F4	32
Figura 3.9. Parte do procedimento para o isolamento da substância F2	32
Figura 3.10. Isolamento da substância F2	33
Figura 3.11. Isolamento da substância F1	33
Figura 3.12. Isolamento da substância F2	34
Figura 3.13. Isolamento da substância F1	35
Figura 4.1. Espectro de RMN ¹ H da substância F1 (MeOD, 400 MHz)	45
Figura 4.2. Mapa de contorno de HSQC da substância F1 (MeOD, 400MHz)	45
Figura 4.3. Mapa de contorno de HMBC da substância F1 (MeOD, 400MHz)	46
Figura 4.4. Espectro de RMN ¹ H da substância F1 (acetona-d ₆ , 200MHz)	46
Figura 4.5. Espectro de RMN ¹ H da substância F2 (acetona d ₆ , 400MHz)	50
Figura 4.6. Mapa de contorno de HSQC da substância F2 (acetona d ₆ , 400MHz)	51
Figura 4.7. Mapa de contorno de HMBC da substância F2 (acetona d ₆ , 400MHz)	51
Figura 4.8. Espectro de RMN ¹ H da substância F3 (CDCl ₃ , 400 MHz)	56
Figura 4.9. Mapa de contorno de HSQC da substância F3 (CDCl ₃ , 400MHz)	56
Figura 4.10. Mapa de contorno de HMBC da substância F3 (CDCl ₃ , 400MHz)	57
Figura 4.11. Estrutura dos isômeros propostos para a substância F4	58
Figura 4.12. Espectro de RMN ¹ H da substância F4 (MeOD, 400MHz)	59
Figura 4.13. Mapa de contorno de HSQC da substância F4 (MeOD, 400MHz)	59
Figura 4.14. Espectro de RMN ¹ H da mistura de T1' e T2'	61
Figura 4.15. Mapa de contorno de HSQC da mistura de T1' e T2'	62

Figura 4.16. Mapa de contorno de HMBC da mistura de T1' e T2'	62
Figura 4.17. Espectro de RMN ¹ H da mistura de T1 e T2 (CDCl ₃ , 200MHz)	63
Figura 4.18. Espectro de RMN ¹ H da mistura E1 e E2 (CDCl ₃ , 400MHz)	64
Figura 4.19. Cromatograma da mistura de esteróides (a) e espectro de massas do sitosterol (b) e do estigmasterol (c)	65
Figura 4.20. Proposta de fragmentação do sitosterol	66
Figura 4.21. IC ₅₀ da mistura dos ácidos ursólico e oleanólico sobre a catepsina B	67
Figura 4.22. IC ₅₀ da mistura de ursolato e oleanolato de metila sobre a Catepsina K	68
Figura 4.23. Triterpenos testados nas catepsinas K, V, L e S	70

1. INTRODUÇÃO

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PHILLIPSON, 1998).

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana (RATES, 2001). Uma estreita relação entre o homem e as plantas consideradas curativas sempre existiu em todas as fases de desenvolvimento das várias civilizações (GOTTLIEB e KAPLAN, 1993).

A rica biodiversidade do Brasil se distribui em diferentes regiões, dentre elas o Cerrado, que ocupa 25% do território brasileiro. A grande diversidade de espécies presente nesse ecossistema fornece material para a realização de estudos especializados na procura de novas drogas para diferentes doenças (MANS *et al.*, 2000).

Este trabalho visou colaborar com o conhecimento fitoquímico e das atividades biológicas de *Miconia ferruginata* (Melastomataceae) através da busca de princípios ativos. Para isto foram cumpridas algumas etapas como preparação do extrato etanólico das folhas do vegetal, fracionamento e isolamento das substâncias constituintes do extrato, identificação das estruturas destes constituintes químicos e realização dos ensaios biológicos para verificação das possíveis atividades:

- a) Antitumoral, verificada *in vitro* frente às células MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon humano) e SF-295 (sistema nervoso central)
- b) Inibitória das catepsinas B e K
- c) Antimicrobiana sobre *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produtos Naturais Bioativos

A procura de fármacos a partir do “screening” de uma grande variedade de vegetais para testes biológicos específicos é uma das formas racionais adotadas para a obtenção de fármacos de origem vegetal. A busca de substâncias que possam se tornar um fármaco em fontes vegetais difere dos meios sintéticos principalmente pela diversidade molecular e pela funcionalidade biológica (NISBET e MOORE, 1997).

Os produtos naturais fornecem medicamentos úteis cuja produção na forma sintética é difícil ou muitas vezes inviável economicamente. De fontes naturais também podem ser retirados compostos básicos que modificados tornam-se mais eficazes ou menos tóxicos (ROBBERS *et al.*, 1997).

A aspirina tem sua origem relacionada aos produtos naturais. A salicina e a saligenina (Figura 2.1), isoladas de *Salix alba* e *Filipendula ulmaria*, respectivamente, são derivados do ácido salicílico que apresentam propriedades analgésicas e antiinflamatórias reconhecidas. No entanto, a aspirina, ou ácido acetilsalicílico, não é encontrada como tal nessas plantas, trata-se de uma modificação estrutural simples: uma acetilação (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

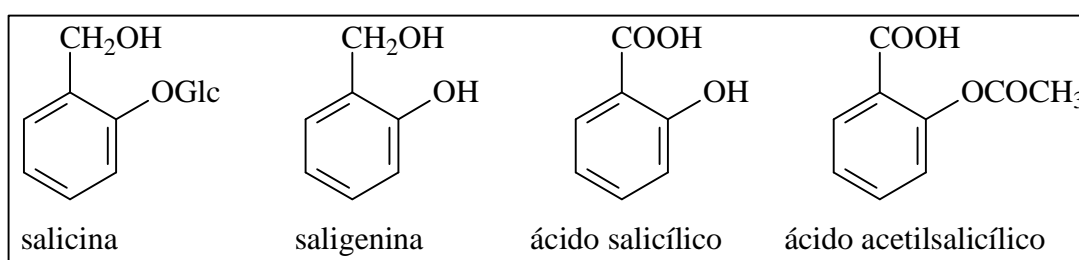


Figura 2.1. Salicina, saligenina, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico

Outro exemplo é a *Papaver somniferum*, ou papoula, espécie da qual é extraído o ópio, cujo constituinte majoritário é a morfina (Figura 2.2), um alcalóide com potente propriedade narcótica e analgésica. A partir da morfina diferentes derivados semi-sintéticos foram preparados; a exemplo a diacetilmorfina. Esta molécula foi comercializada como antitussígeno, sendo tão eficaz que foi considerada como uma substância heróica, daí o nome heroína (HOSTETTMAN *et al.*, 2003).

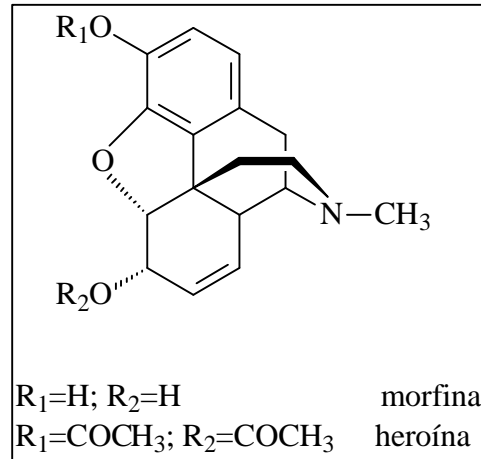


Figura 2.2. Morfina e seu derivado semi-sintético

Das cascas de algumas espécies de *Cinchona* spp. foi isolada a quinina (Figura 2.3), um alcalóide utilizado durante muito tempo como antimalárico e que serviu como protótipo para a descoberta de derivados antimalariais como a cloroquina e a mefloquina (BARREIRO e FRAGA, 2001).

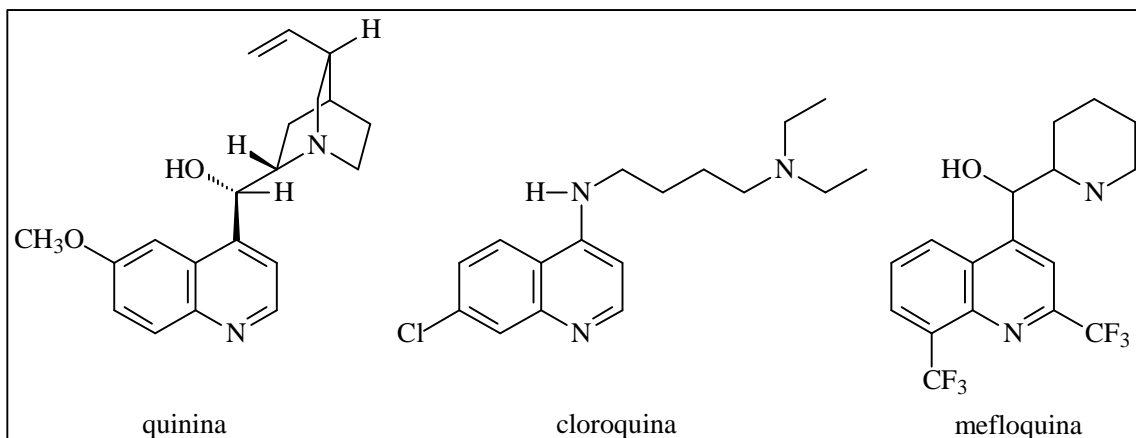


Figura 2.3. Quinina e seus derivados com propriedades antimalariais

A artemisina (Figura 2.4) é outro exemplo de composto protótipo natural para antimaláricos. Essa substância possui grande atividade sobre as formas resistentes de *Plasmodium*. No entanto, alguns problemas de administração surgiram devido à acentuada apolaridade desta molécula. Por este motivo, uma série de derivados foram sintetizados, entre eles o arteméter, arteéter e artesunato de sódio, aprovados como drogas antimaláricas em vários países (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

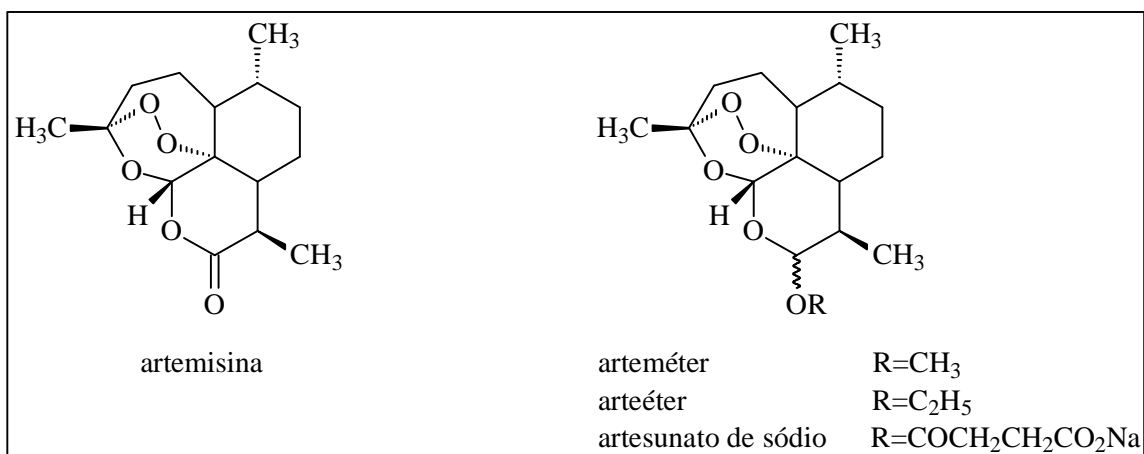


Figura 2.4. Artemisina e seus derivados

O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal começou a acontecer no século XVIII. Os séculos XVIII e XIX caracterizaram-se pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcalóides. Nesta época foi que se realizaram o isolamento de morfina (1806), quinina e estriquinina (1820) (PINTO *et al.*, 2002).

2.2. As Cisteíno Peptidases Lisossomais

As catepsinas estão distribuídas entre as famílias das aspartil peptidases (catepsinas D e E), serino peptidases (catepsinas A e G), e cisteíno peptidases (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X) (TURK *et al.*, 2000; BROMME e KALETA, 2002), e estão envolvidas no processo de degradação de proteínas intracelulares (JEONG *et al.*, 2004).

As cisteíno peptidases lisossomais têm a função primária de degradar, de forma não seletiva, proteínas dentro dos lisossomos. No entanto, recentemente ficou demonstrado que muitas dessas enzimas não são estritamente encontradas nos lisossomos, podendo acumular-se em diferentes organelas e participar de processos celulares mais especializados levando a processos patológicos como artrite reumatóide e osteoporose (YASUDA *et al.*, 2005), progressão de tumores malignos (SLOANE *et al.*, 1994), distrofia muscular (KOMINAMI *et al.*, 1997) e doença de Alzheimer (CATALDO e NIXON, 1990).

2.2.1. Catepsina B e Processos Cancerígenos

Tumores malignos têm tendência de invadir os tecidos vizinhos e atingir os vasos sanguíneos (ENGERS e GABBERT, 2000), que por sua vez transportam as células tumorais para locais diferentes daqueles em que foram formados. A ocorrência desses eventos, conhecidos como metástases tumorais, leva os pacientes à morte em mais de 90% dos casos (GABBERT *et al.*, 1991).

Há crescentes evidências da contribuição das catepsinas nos eventos proteolíticos relacionados à progressão tumoral, tais como proliferação celular, apoptose, angiogênese tumoral, invasão tecidual e metástase, indicando que elas são um alvo em potencial no desenvolvimento de fármacos para o tratamento do câncer (TURK *et al.*, 2002; TURK e GUNGAR, 2003).

A catepsina B é responsável pelo rompimento das células cancerosas e o conseqüente espalhamento do material tumoral na corrente sangüínea, levando à disseminação do câncer por todo organismo. Sua ligação com o processo de progressão e invasão tumoral está baseada em observações de que seus níveis de atividade e secreção são aumentados em tumores, sendo que os tumores malignos apresentam os maiores níveis de atividade desta enzima (LIM *et al.*, 2004). Deste modo, a catepsina B é considerada um alvo importante no processo de intervenção do câncer.

Estudos do extrato acetônico de galhos e folhas de *Taxodium mucronatum* (Taxodiaceae) e do extrato metanólico das folhas de *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae) levaram ao isolamento de biflavonas (Figura 2.5) com expressiva atividade inibitória das catepsinas B e K. Os valores de IC₅₀ (concentração molar de um antagonista que leva a 50% de inibição) destas substâncias determinados para a catepsina B encontram-se na Figura 2.5 (ZENG *et al.*, 2006).

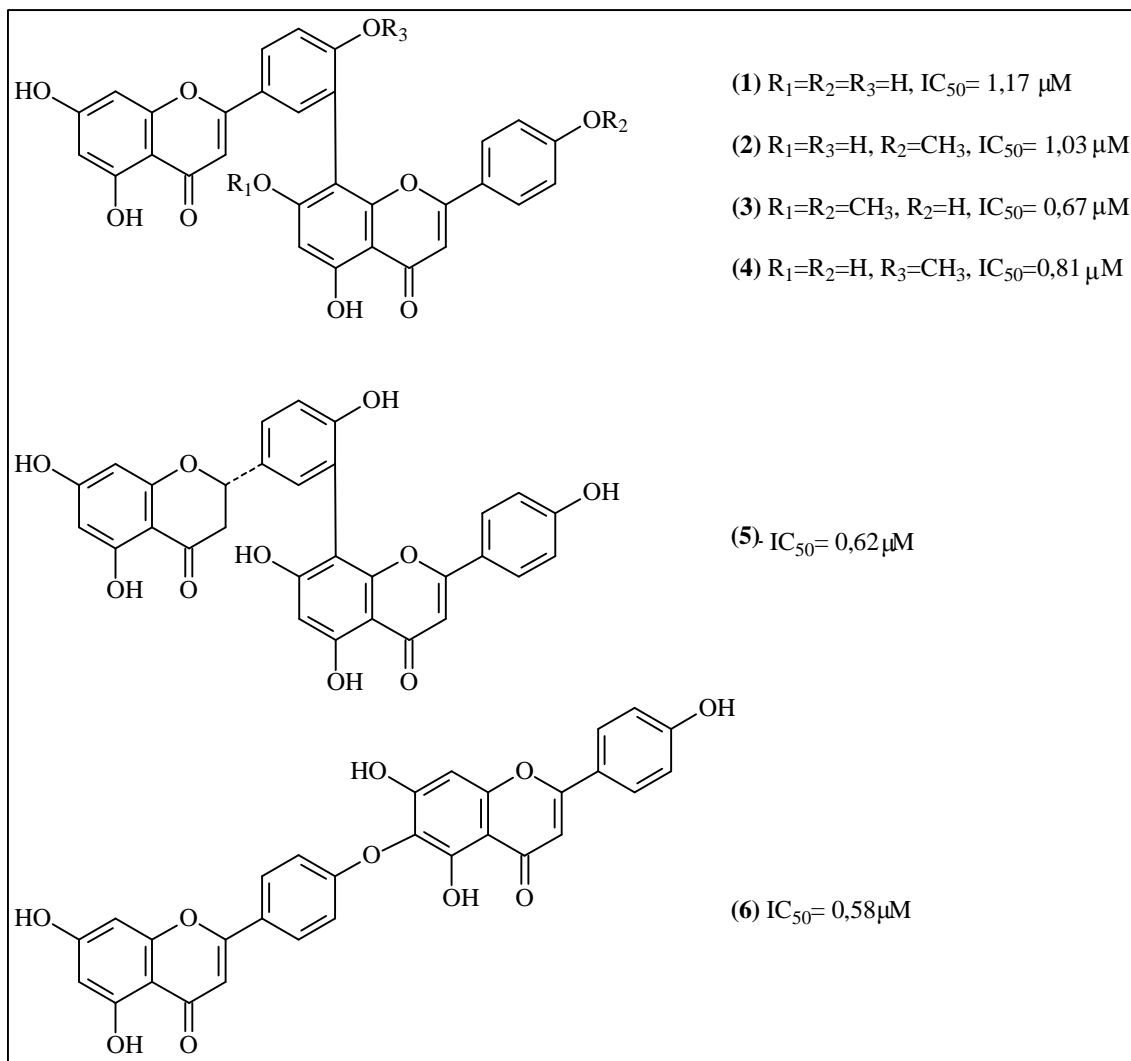


Figura 2.5. Biflavonóides de *Taxodium mucronatum* e *Cycas guizhouensis* inibidores da catepsina B.

2.2.2. Catepsina K e Doenças Ósseas

O remodelamento do esqueleto é um processo cíclico que envolve fases de reabsorção e de substituição óssea, sendo continuamente remodelados pela ação compensatória dos osteoblastos (que sintetizam a matriz orgânica dos ossos nos quais os componentes minerais são depositados) e os osteoclastos (que solubilizam a matriz mineralizada dos ossos pela secreção de enzimas proteolíticas) (SEVERINO, 2008).

Catepsina K (CatK) é uma enzima encontrada nos osteoclastos (células envolvidas no processo de reabsorção óssea) responsáveis pela degradação de colágeno tipo I e tipo II, componentes predominantes da matriz óssea extra-celular. Um aumento

da atividade colagenolítica ocasiona condições patológicas tais como, osteoporose e artrite.

A função específica da catepsina K na reabsorção óssea foi demonstrada pela observação de que a deficiência dessa enzima causa uma displasia óssea conhecida como picnodisostose, uma doença hereditária rara caracterizada pelo endurecimento e fragilidade dos ossos (GELB *et al.*, 1996).

Assim, o desenvolvimento de inibidores específicos desta enzima pode levar à novas fontes de tratamento para doenças que envolvem a reabsorção óssea excessiva. Estudos do extrato metanólico-diclorometânico de *Artocarpus altilis* (Moraceae), levaram ao isolamento de flavonóides (7-9, Figura 2.6) com expressiva atividade contra a catepsina K (PATIL *et al.*, 2002a). O alcalóide (10-Figura 2.6), isolado dos extratos metanólicos de uma esponja da ordem Haplosclerida também apresentou expressiva inibição frente à catepsina K (PATIL *et al.*, 2002b).

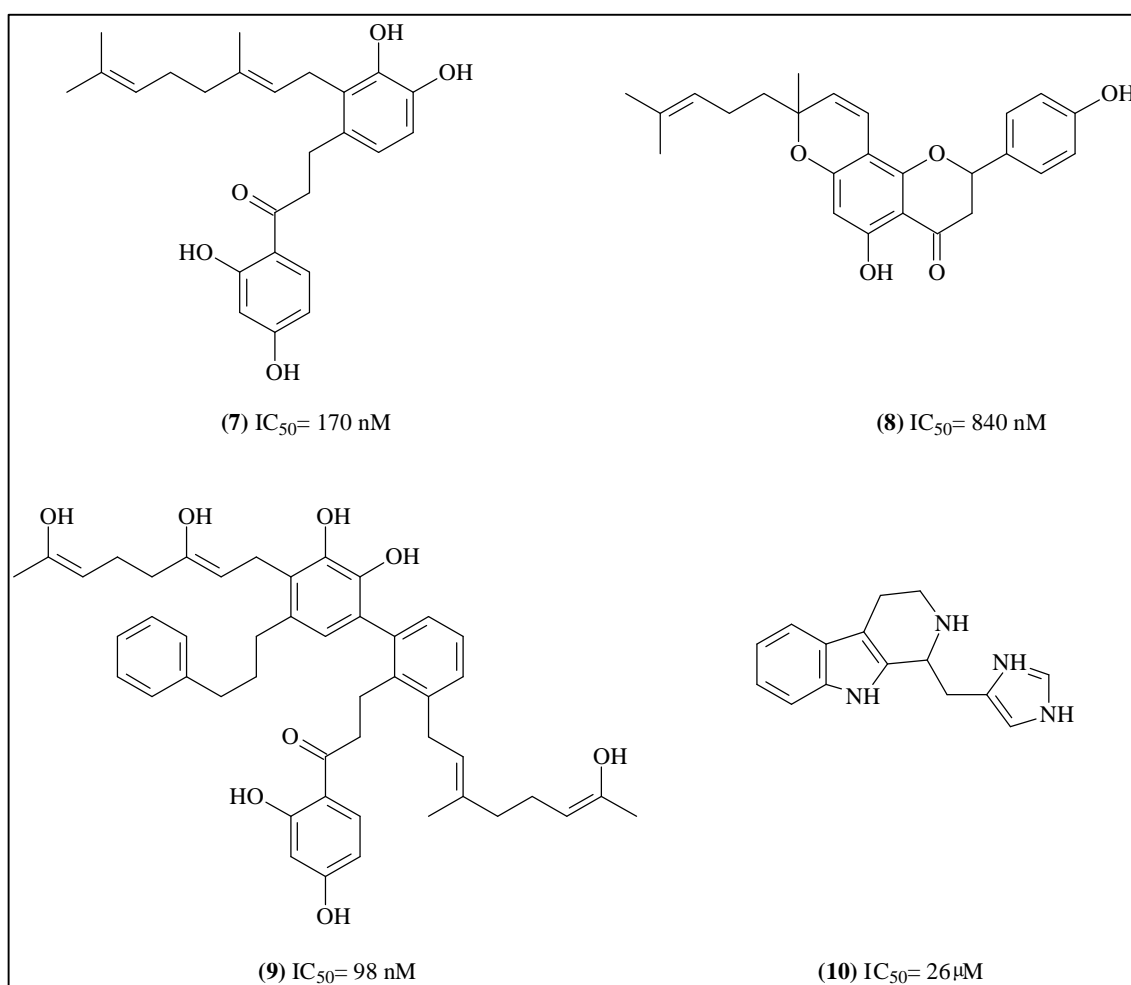


Figura 2.6. Produtos naturais inibidores da catepsina K

2.3. Câncer

O câncer é uma das maiores causas de morte no mundo e, por consequência, tornou-se uma preocupação de saúde pública. Do total de 7,9 milhões de mortes em 2007, 13% foram ocasionadas por doenças neoplásicas (Organização Mundial da Saúde, 2009).

Exemplos importantes de fármacos antitumorais obtidos de plantas são os alcalóides bisindólicos vinblastina e vincristina (Figura 2.7) isolados de *Catharantus roseus* (Apocynaceae). Esses compostos são considerados medicamentos indispensáveis para o tratamento de leucemia. Também pode ser citado o paclitaxel, substância isolada de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) e utilizada a princípio no tratamento do câncer de ovário e atualmente no tratamento de outros cânceres ginecológicos (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

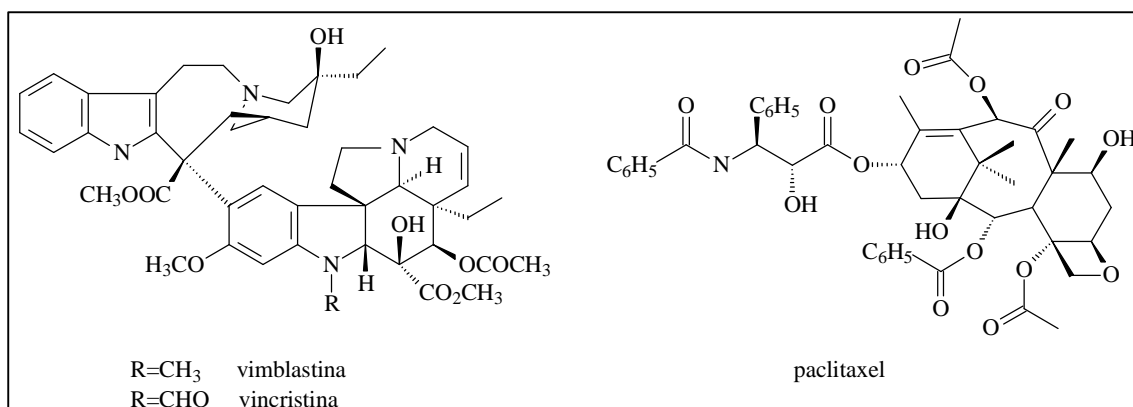


Figura 2.7. Vinblastina, vincristina e paclitaxel

De *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) foi isolado o alcalóide camptotecina (Figura 2.8). O sucesso clínico desta substância foi questionado, apesar de possuir uma grande atividade antitumoral, devido à sua elevada toxicidade e pouca solubilidade. Esforços consideráveis foram realizados na tentativa de encontrar uma estrutura análoga mais ativa e menos tóxica. Em maio de 1996 topotecan foi aprovado para o tratamento de casos avançados de câncer de ovário, resistentes a outros tipos de quimioterápicos. Em junho do mesmo ano foi aprovado o análogo injetável chamado irinotecan, utilizado para o tratamento de câncer do cólon e reto (WALL e WANI, 1996; WAGNER, 1999).

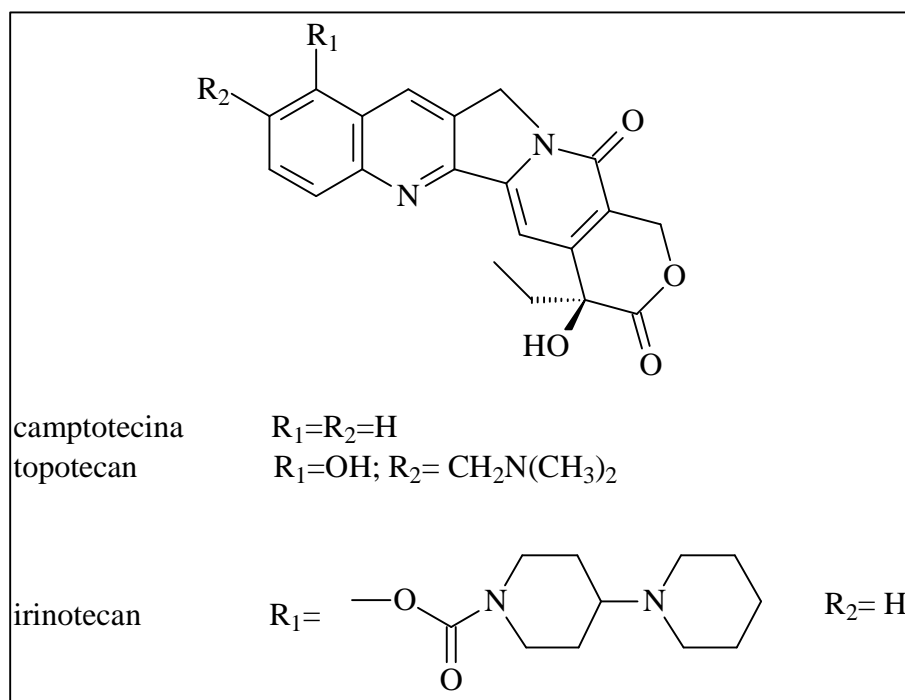


Figura 2.8. Camptotecina, isolada de *Camptotheca acuminata*, e seus derivados semi-sintéticos

A podofilotoxina (Figura 2.9) é o principal componente bioativo da podofilina, uma mistura de resinas obtida a partir do rizoma seco e das raízes das plantas *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodi* (MILLER, 1985).

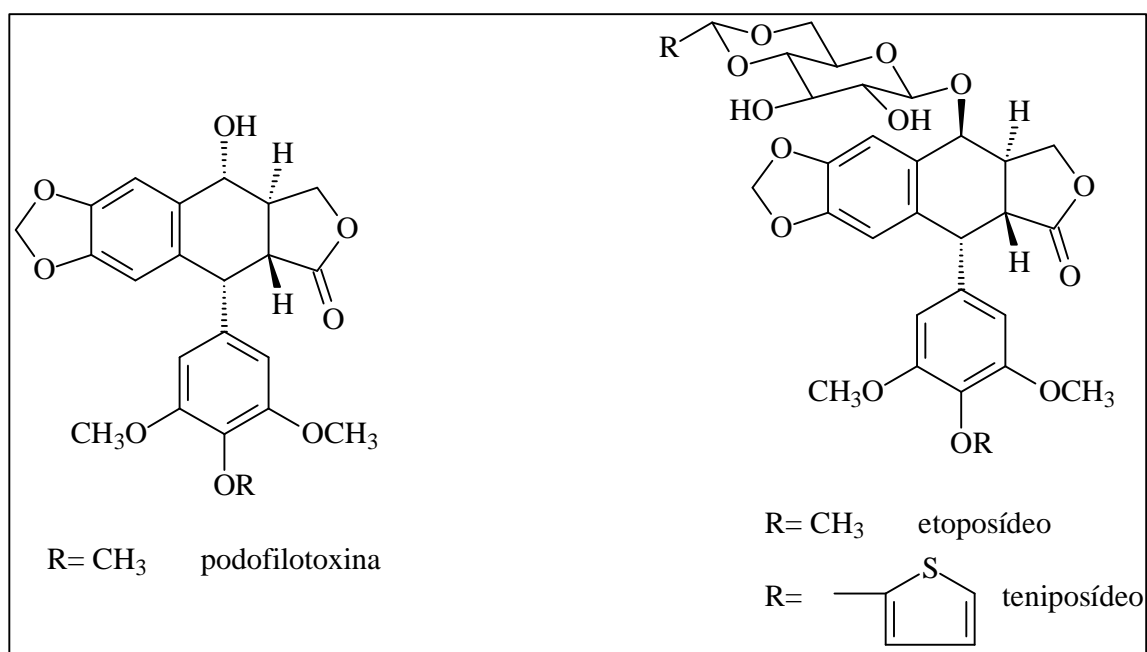


Figura 2.9. Estruturas químicas da podofilotoxina e de alguns de seus derivados

Mais tarde, foram obtidos por semi-síntese dois derivados da podofilotoxina, o etoposídeo e o teniposídeo, cujos estudos experimentais permitiram a introdução dessas drogas na terapia do câncer (CRAGG & NEWMAN, 1999).

Em 2004 a Comissão Européia aprovou o uso da hemoarringtonina (Figura 2.10) para o tratamento da leucemia mielóide crônica (Agência Européia de Medicina, 2004). Este alcalóide foi isolado das sementes de *Cephalotaxua harringtonia* e vem sendo considerado como um dos agentes quimioterápicos mais promissores para o tratamento da leucemia mielóide (CRAGG e NEWMAN, 2005).

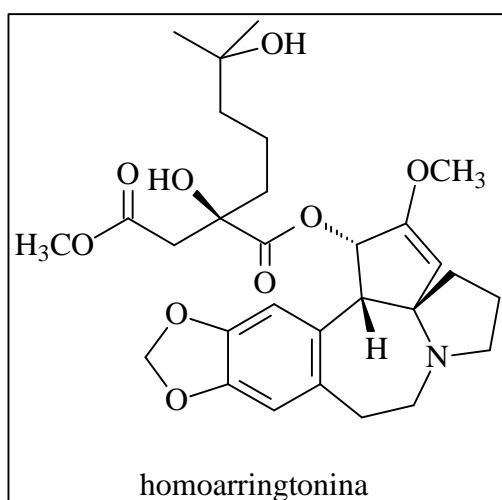


Figura 2.10. Homoarringtonina, isolado de *Cephalotaxua harringtonia*

Outras substâncias obtidas de plantas estão em fase de estudo para o tratamento do câncer. Exemplo são as combretastatinas, isoladas de *Combretum caffrum*, e seus derivados. As combretastatinas têm sido investigadas por apresentarem atividade antiangiogênica (BILENKER *et al.*, 2005).

Em 2003, dos 2255 ensaios clínicos contra o câncer, 173 incluíam o paclitaxel, 115 o docetaxel, 22 a diversos taxanos, 74 o irinotecan, 32 o topotecan, 12 a análogos diversos as camptotecina e 15 as combretastatinas (CRAGG e NEWMAN, 2004).

2.4. Atividade Antimicrobiana de Plantas

Muito antes que a humanidade descobrisse a existência dos micróbios, já era aceita a idéia de que certas plantas (que continham o que hoje é conhecido como antimicrobiano) apresentavam poder de cura. Desde a antiguidade o homem tem feito uso de plantas para tratar doenças infecciosas comuns, sendo que alguns desses

medicamentos tradicionais ainda estão incluídos no tratamento de diversas doenças (RIOS e RECIO, 2005).

O aumento de prevalência de cepas bacterianas resistentes às drogas existentes e o aparecimento de cepas com susceptibilidade reduzida frente aos antibióticos aumenta a ocorrência de infecções bacterianas intratáveis e ressalta a urgência da busca de novas estratégias no combate às infecções (SIERADSKI *et al.*, 1999).

Neste sentido, relevada atenção tem sido dada a extratos e compostos biologicamente ativos isolados de espécies vegetais (ANTOUN *et al.*, 1993). Antimicrobianos de origem vegetal, além de serem eficientes no tratamento de doenças infecciosas, atenuam muitos dos efeitos secundários que são freqüentemente associados aos antimicrobianos de origem sintética (IWU *et al.*, 1999).

2.5. Flavonóides

Os flavonóides representam um diverso grupo de produtos naturais de origem biossintética mista, sendo formados por unidade de fenilpropanóide (4-cumarilCoA) e derivados do malonil-CoA (Figura 2.11) (DEWICK, 2001). São conhecidos mais de 4200 flavonóides, sendo que o número de novas estruturas praticamente dobrou nos últimos 20 anos.

Estes metabólitos são importantes não apenas no crescimento e desenvolvimento das plantas, mas também estão relacionados na defesa contra microorganismos e pragas. Os flavonóides possuem atividade antioxidante, e os efeitos benéficos no consumo de frutas, vegetais, chá-verde e vinho tinto estão relacionados ao efeito antioxidante destes compostos fenólicos e outros produtos naturais. Além das atividades citadas, são também encontradas na literatura atividade anticancerígena e antiprotozoária para esta classe de compostos (DIXON e STEELE, 1999).

Os flavonóides constituem uma grande categoria de metabólitos secundários de plantas encontrados em frutas, vegetais, cereais, plantas medicinais, nozes, especiarias, chá etc (ZHANG *et al.*, 2008; GATTUSO *et al.*, 2007). Apresentam-se como sólidos coloridos ou ainda incolores e concentram-se nas partes aéreas das plantas, ocorrendo em menor proporção nas raízes e rizomas (DEWICK, 2001). São heterosídeos com quinze carbonos em seu esqueleto básico, sendo substâncias fenólicas do tipo C6-C3-C6.

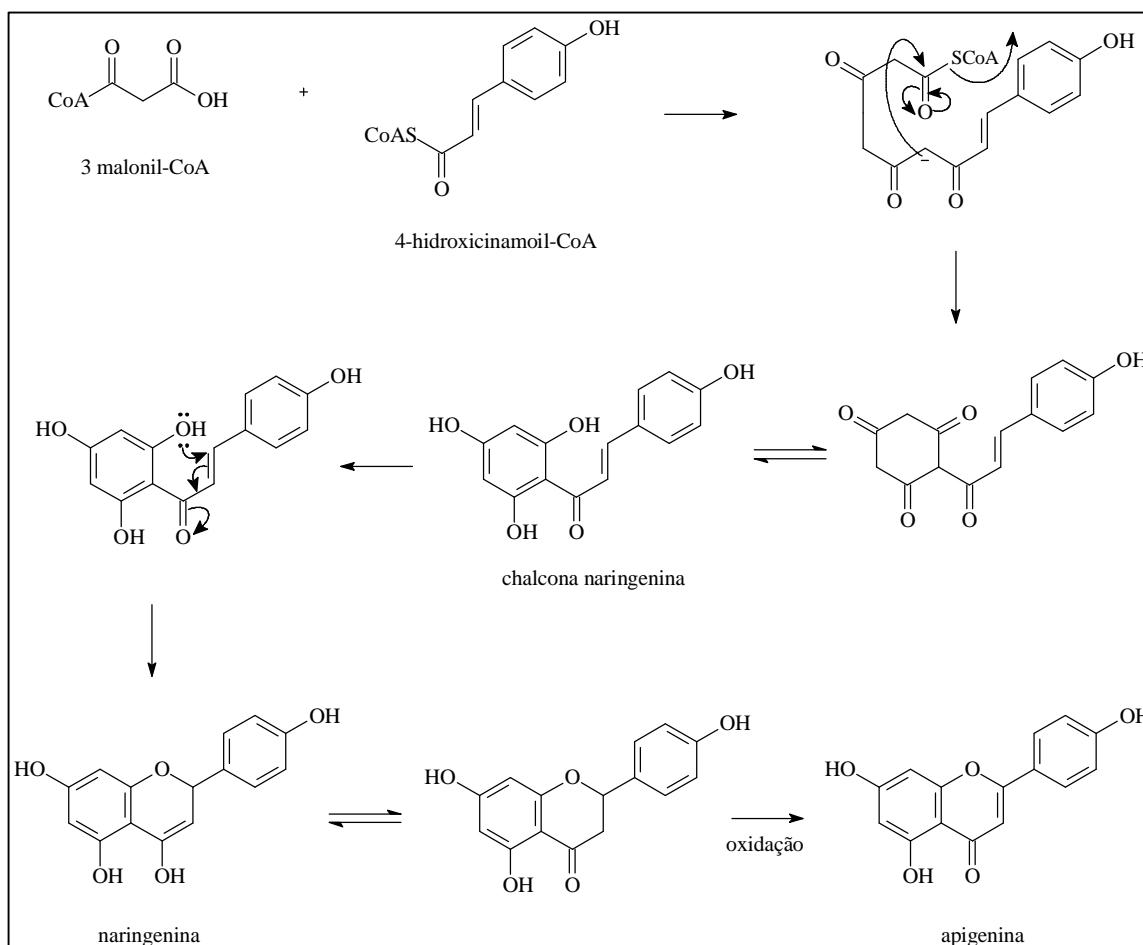


Figura 2.11. Biossíntese de flavonóides

Com base no grau de oxidação e pela presença ou ausência de saturação no anel C heterocíclico, os flavonóides podem ser divididos em oito subclasses: flavonas, flavonols, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas, flavanonols (flavan-3-ols ou catequinas), chalconas e dihidrochalconas as quais são formadas a partir das variações no arranjo estrutural e posições dos grupos funcionais (WANG e HUANG, 2004; LIN e HARNLY, 2008). As subclasses flavonoídicas e os padrões de glicosilação são fortemente correlacionados com a taxonomia da planta e fornecem uma ampla gama de diferentes propriedades químicas (LIN e HARNLY, 2008). As oito subclasses combinadas com glicosilação em múltiplos sítios e com uma grande variedade de sacarídeos produzem cerca de 4000 diferentes flavonóides já identificados, cuja lista ainda continua crescente (ZHANG *et al.*, 2005; LIN e HARNLY, 2008).

Embora os flavonóides sejam geralmente relacionados como agentes não nutrientes, esta classe tem atraído grande atenção dos pesquisadores pelas propriedades fisiológicas, farmacológicas e seus benefícios a saúde humana (ZHANG *et al.*, 2005; GATTUSO *et al.*, 2007). Os Estados Unidos recomendam um consumo diário de 250

mg de flavonóides de diferentes fontes: frutas, vegetais, sucos, suplementos de vitaminas e minerais (LIN e HARNLY, 2008).

Diante dos benefícios citados acima, existem aproximadamente 13000 relatos (artigos e livros) descrevendo as propriedades químicas, bioquímicas, o papel farmacológico e nutricional dos flavonóides desde 1990 (GATTUSO *et al.*, 2007). Os flavonóides são usados em alguns remédios devido as suas propriedades espasmolítica, antialérgica e diurética. Presume-se que estas funções estejam relacionadas à capacidade de formação de radical estabilizado por ressonância pelas hidroxilas fenólicas. A atividade dos flavonóides é relacionada às variações em suas estruturas químicas como, por exemplo, hidroxilação, metoxilação, grau de polimerização e o tipo de conjugação (glicosilação, malonização e sulfonação) (WANG e HUANG, 2004).

Esta classe mostra grande atividade antioxidante que parece estar associada com a redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares e exibem ainda atividades antimicrobiana, antiviral e antiinflamatória. Entretanto, o mecanismo de ação *in vivo* ainda não é conhecido (GATTUSO *et al.*, 2007).

As flavonas e os flavonóis são flavonóides de particular importância por conterem atividade antioxidante em alimentos, além disso, estudos epidemiológicos indicaram que seu consumo diário assegura redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares (WANG e HUANG, 2004).

2.6. Triterpenos

Os triterpenos são compostos contendo 30 átomos de carbono formados por 6 unidades de isopreno (C-5) (Figura 2.12). O fechamento do anel do esqueleto (precursor biogenético desta classe de compostos) pode dar diferentes tipos de esqueletos, sendo conhecidos mais de 4000 triterpenos naturais com mais de 40 tipos de esqueletos identificados. Podem ser divididos em duas classes principais: os tetracíclicos e os pentacíclicos (DEWICK, 2002).

Quimicamente, triterpenos pentacíclicos são todos baseados em um esqueleto de 30 átomos de carbono, constituído por cinco anéis de seis membros (tipos ursano e oleanano) ou quatro anéis de seis membros e um anel de cinco (tipo lupano).

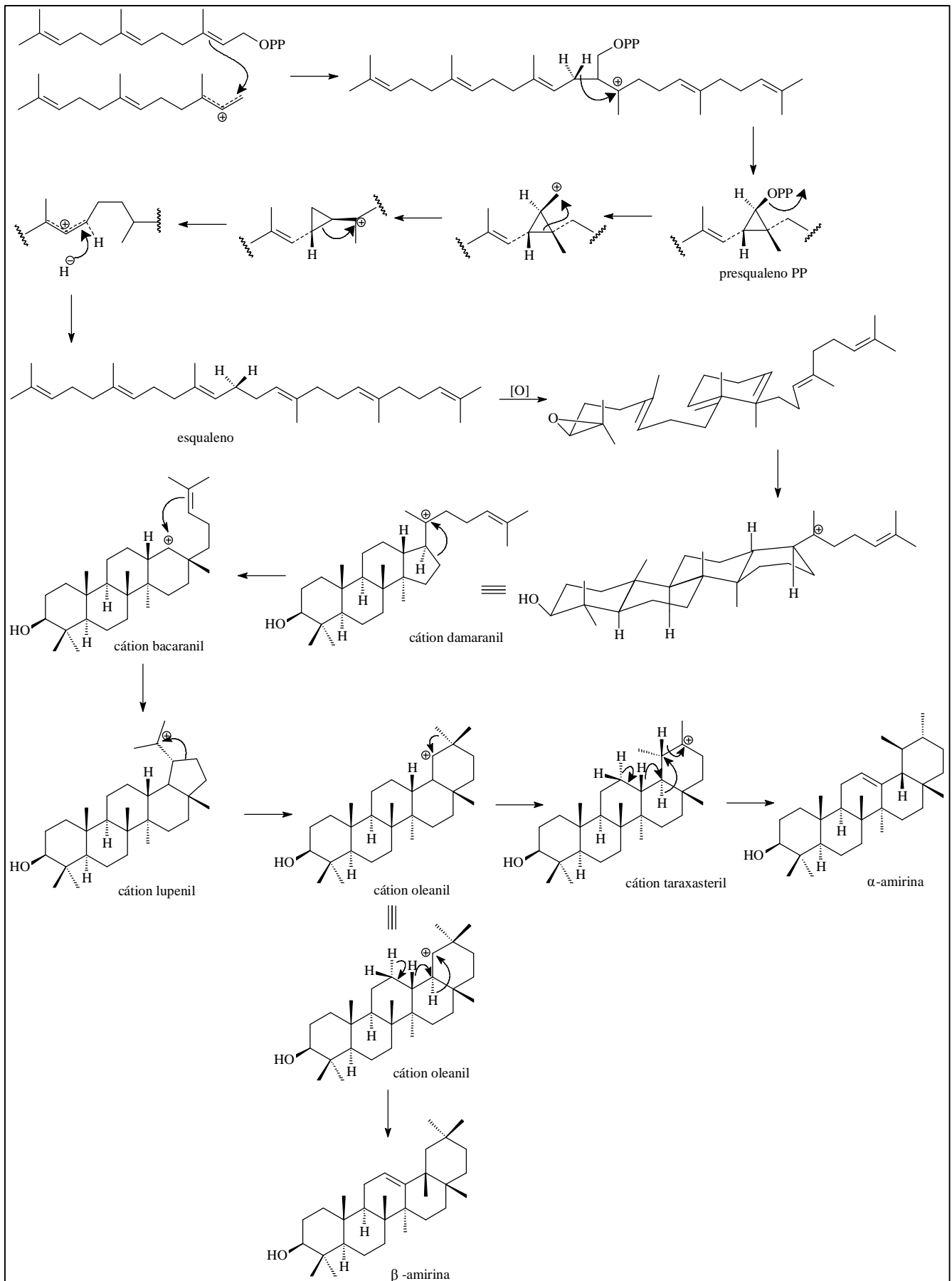


Figura 2.12. Biossíntese dos triterpenos

Os grupos metil, principalmente aqueles das posições 4 (C-23), 17 (C-28) e 20 (C-30), podem ser oxidados à ácido carboxílico. Além destas, as posições 11 e 16 também podem apresentar-se oxidadas (Figura 2.13), o que leva a uma numerosa possibilidade de estruturas (DEWICK, 2001).

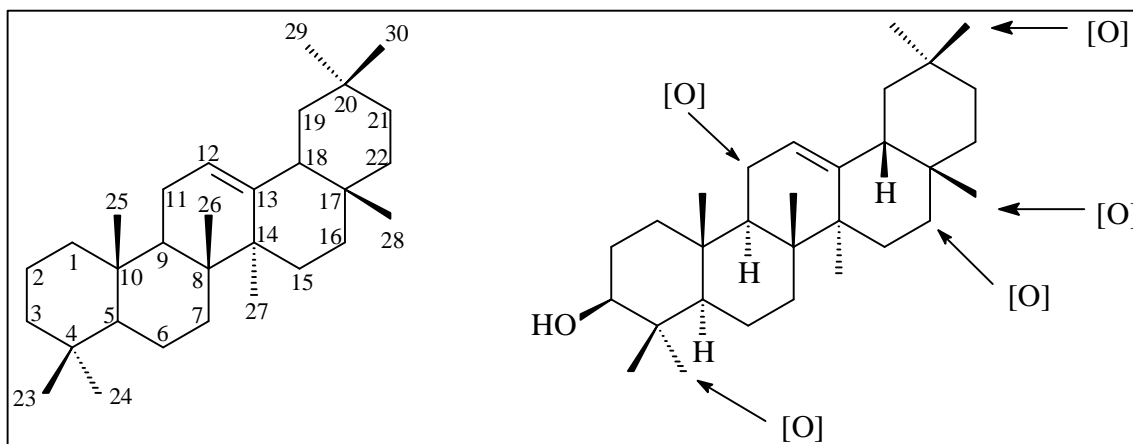


Figura 2.13. Esqueleto triterpênico pentacíclico e potenciais sítios de oxidação em triterpenos do tipo β -amirina

Compostos triterpênicos são constituintes comuns de plantas e ocorrem em todo o reino vegetal, tanto na forma de ácidos livres quanto na forma de agliconas de saponinas triterpenóides. Surpreendentemente, a literatura contém relativamente pouca informação sobre a distribuição de triterpenos no reino vegetal, apesar de suas propriedades farmacológicas, que incluem efeitos anti-inflamatório (SIQUEIRA *et al.*, 2007), hepatoprotetor (MANKANI *et al.*, 2006), antitumoral (AKIHISA *et al.*, 2007), antivirais (WU *et al.*, 2007), anti-HIV (YU *et al.*, 2006), antimicrobiana (ANGEH *et al.*, 2007), antifúngicos (ROCHA *et al.*, 2004), antidiabéticos (VILLASENOR *et al.*, 2004), gastroprotetor (SÁNCHEZ *et al.*, 2006), e antihiperlipidêmicos (YOSHIKAWA *et al.*, 2005).

O triterpeno ácido ursólico e seu isômero ácido oleanólico são amplamente abordados do ponto de vista farmacológico. Os usos tradicionais de plantas contendo estas substâncias também são muitos, e podendo-se citar brevemente o uso como anti-inflamatório, hepatoprotetor, analgésico, cardiotônico, sedativo e tônico, sendo muitos destes usos comprovados cientificamente (DALLA VECHIA, GNOATTO e MOSMANN, 2009). Destaca-se, sobretudo, a atividade antitumoral exibida por estes dois triterpenos e seus derivados, a qual vem sendo comprovada por trabalhos na área.

A atividade citotóxica destes triterpenos foi testada frente a uma grande diversidade de linhagens celulares. A Tabela 2.1 apresenta os valores de IC₅₀ destes

triterpenos para as diferentes linhagens estudadas e que estão disponíveis na literatura (CIPAK *et al.*, 2006; OVESNÁ *et al.*, 2006; TANIGUCHI *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2002; HARMAND *et al.*, 2005; KASSI *et al.*, 2007; MIZUSHINA *et al.*, 2000; TIAN *et al.*, 2006).

Tabela 2.1. Inibição da proliferação celular do ácido ursólico e ácido oleanólico em diferentes linhagens celulares

<i>Composto</i>	<i>Linhagem celular</i>	<i>IC₅₀ μM</i>
Ácido oleanólico	L1210 - Leucemia murina	32,3
	HL-60 - Leucemia humana pró-mielocítica	70,6
	K562 - Leucemia humana mielogênica	>100
	HSC-2 - Carcinoma oral escamoso humano	285
	HCT15 - Carcinoma de cólon humano	60
Ácido ursólico	L1210 - Leucemia murina	14,6
	HL-60 - Leucemia humana pró-mielocítica	10,9
	K562 - Leucemia humana mielogênica	~24
	HSC-2 - Carcinoma oral escamoso humano	63,6
	HCT15 - Carcinoma de cólon humano	30
	M4Beu - Melanoma humano	12,5-15
	PC-3 - Carcinoma de próstata	32,6
	LNCap - Carcinoma de próstata	15,7
	NUGC-3 - Carcinoma estomacal humano	30
	HepG2 - Carcinoma hepatocelular humano	18
R-HepG2 - Carcinoma hepatocelular humano resistente à quimioterapia	15	

Fonte: DALLA VECHIA, GNOATTO e GOSMAN, 2009.

Segundo os valores de IC₅₀ para a inibição da proliferação celular observa-se, de maneira geral, que o ácido ursólico é mais potente que seu isômero ácido oleanólico, embora o contrário seja observado em algumas linhagens celulares. Desta maneira, pode-se afirmar que o esqueleto ursano é mais potente que o esqueleto oleanano quanto à atividade citotóxica.

O estudo da relação estrutura-atividade (REA) de compostos orgânicos é considerado, atualmente, uma ferramenta fundamental no planejamento de novos

protótipos de fármacos. Com este intuito, DALLA VECHIA, GNOATTO e GOSMAN (2009) traçaram a REA de compostos triterpênicos com esqueleto oleanano e ursano quanto à sua atividade citotóxica. As conclusões deste estudo são apresentadas na Figura 2.14.

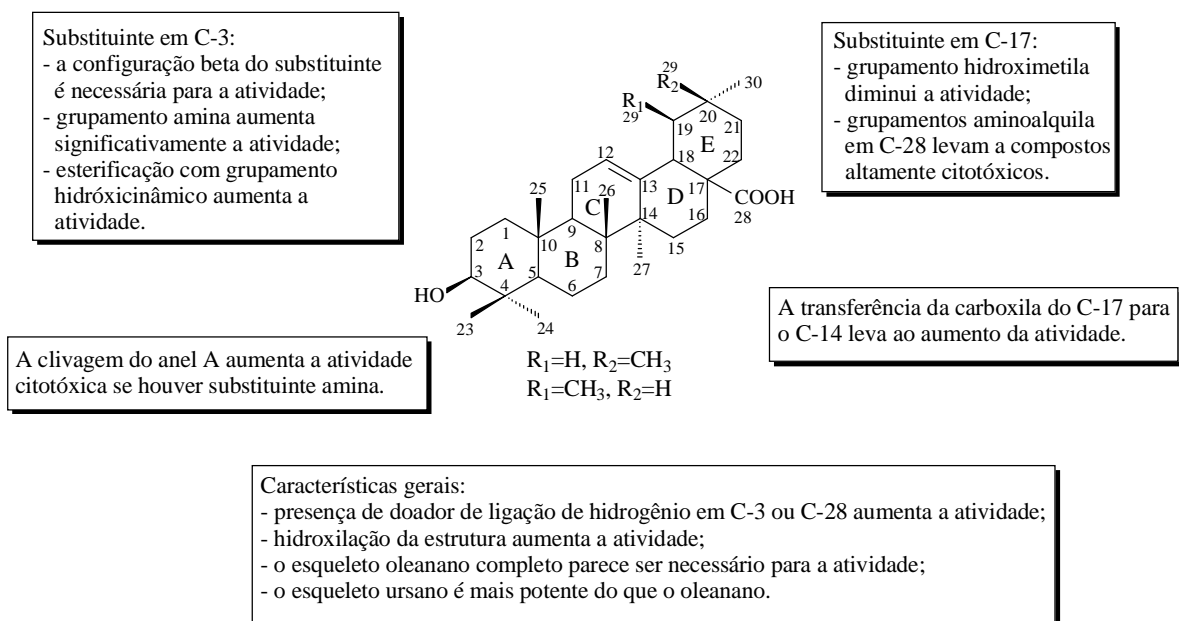


Figura 2.14. REA para triterpenos do tipo oleanano e ursano quanto à atividade citotóxica.

Fonte: DALLA VECHIA, GNOATTO e GOSMAN, 2009.

Até o presente momento, não há relatos de nenhum trabalho de REA realizado com a mistura destes triterpenos tendo a metilação do grupo ácido como única fonte de modificação estrutural.

2.7. Esteróides

Os esteróides constituem uma classe de compostos amplamente distribuídos na natureza. Eles são triterpenos degradados (em geral 27 carbonos) similares em estrutura ao colesterol, no qual o núcleo do esteróide é composto por quatro anéis ligados. O grupo 3β -hidroxil e freqüentemente a dupla ligação entre C-5 e C-6, tem como função propiciar estabilização às membranas celulares (FERNANDES e CABRAL, 2007).

Mais de 100 tipos de fitoesteróides foram encontrados em plantas, nas quais os mais abundantes são sitosterol, estigmasterol e campesterol (FERNANDES e CABRAL, 2007). Estes três esteróides citados acima se encontram, na maioria das vezes, em mistura e devido às suas semelhanças estruturais são de difícil separação. Desta forma a identificação dos mesmos é realizada em mistura por CG-EM.

Diversas atividades biológicas são citadas para os esteróides, como exemplos podem ser citados sua atuação no desenvolvimento e controle da reprodução humana (estradiol, progesterona e testosterona); na troca de muda em insetos (ecdisona); na produção de vitamina D (ergosterol); como agentes antiinflamatórios (corticoesteróides) e cardiotônica (ROBBERS *et al.*, 1996).

2.8. A família Melastomataceae

A família Melastomataceae, pertencente à ordem Myrtales, é formada por aproximadamente 166 gêneros que incluem 4200-4500 espécies (RENNER, 1993). Na América tropical, a família está representada por aproximadamente 3000 espécies, distribuídas em 100 gêneros, sendo *Miconia* o maior gênero da família, com cerca de 1000 espécies (MEYER, 1998).

No Brasil, a família abrange principalmente espécies das tribos Melastomeae, Miconiae e Microlicieae (ROMERO, 2003) com cerca de 68 gêneros e mais de 1500 espécies. Devido à grande diversidade de hábitos que inclui espécies herbáceas, arbustivas e frequentemente arbóreas, essa família pode ser encontrada desde a região Amazônica até o Rio Grande do Sul, ocupando diversos ambientes (ROMERO E MARTINS, 2002).

Estudos químicos e biológicos têm sido realizados em espécies de diversos gêneros da família Melastomataceae. Do ponto de vista químico, a família destaca-se pela presença de ácidos graxos, triterpenóides, flavonóides e taninos. Dentre as atividades biológicas, encontram-se registros da ação contra verminoses, ulcerações, escabiose, dispepsia, hipertensão e infecções causadas por bactérias (CELOTO *et al.*, 2003).

2.9. O gênero *Miconia*

O gênero *Miconia* é considerado o mais representativo da família Melastomataceae e conta com aproximadamente 1000 espécies, distribuídas ao longo da América tropical. No Brasil estão representadas cerca de 250 espécies (MARTINS *et al.*, 1996)

O gênero é ainda pouco conhecido com relação ao seu potencial químico. De *Miconia lepidota* foram isoladas duas benzoquinonas (GUNATILAKA *et al.*, 2001) (Figura 2.15).

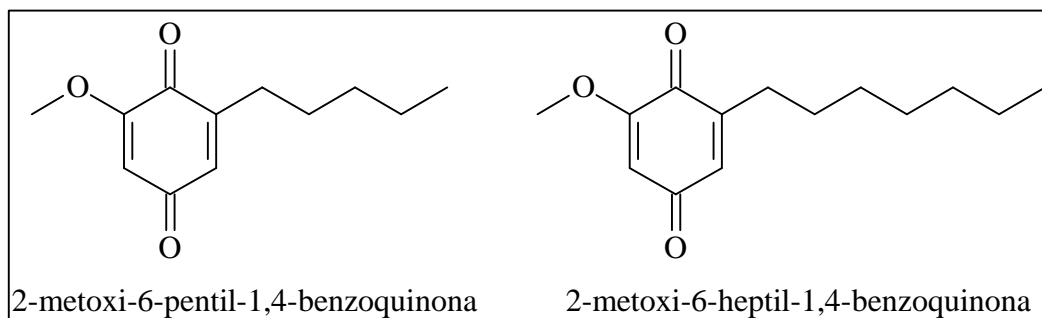


Figura 2.15. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *M. lepidota*

O estudo de *Miconia stenostachya* levou ao isolamento de dois triterpenos por CHAN *et al.* (1992), cujas estruturas químicas estão demonstradas na Figura 2.16. De *M. rubiginosa* foram isolados quatro triterpenos (SPESSOTO *et al.*, 2003), além da epicatequina e do ácido gálico (Figura 2.17), e de seis flavonóides glicosilados: quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo, quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo, quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo, quercetina-3-O- β -arabinopiranosídeo, quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo e quercetina-3-O- α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- β -galactopiranosídeo (RODRIGUES *et al.*, 2007a).

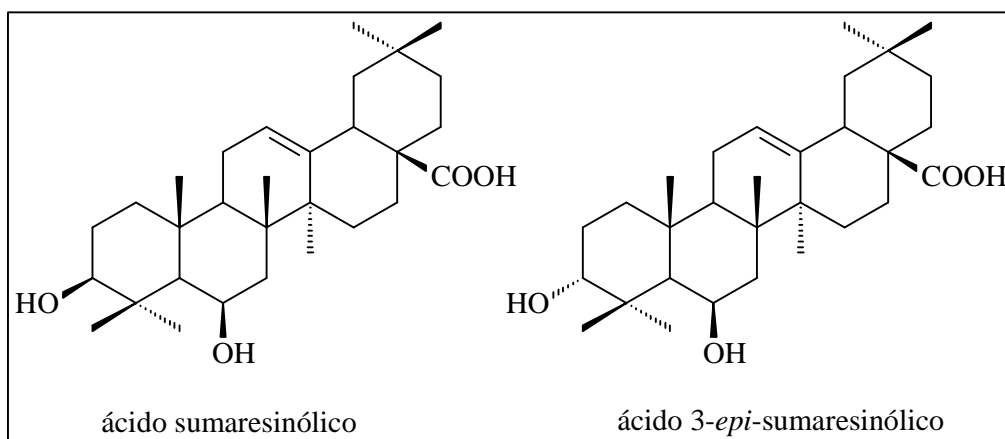


Figura 2.16. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *M. stenostachya*

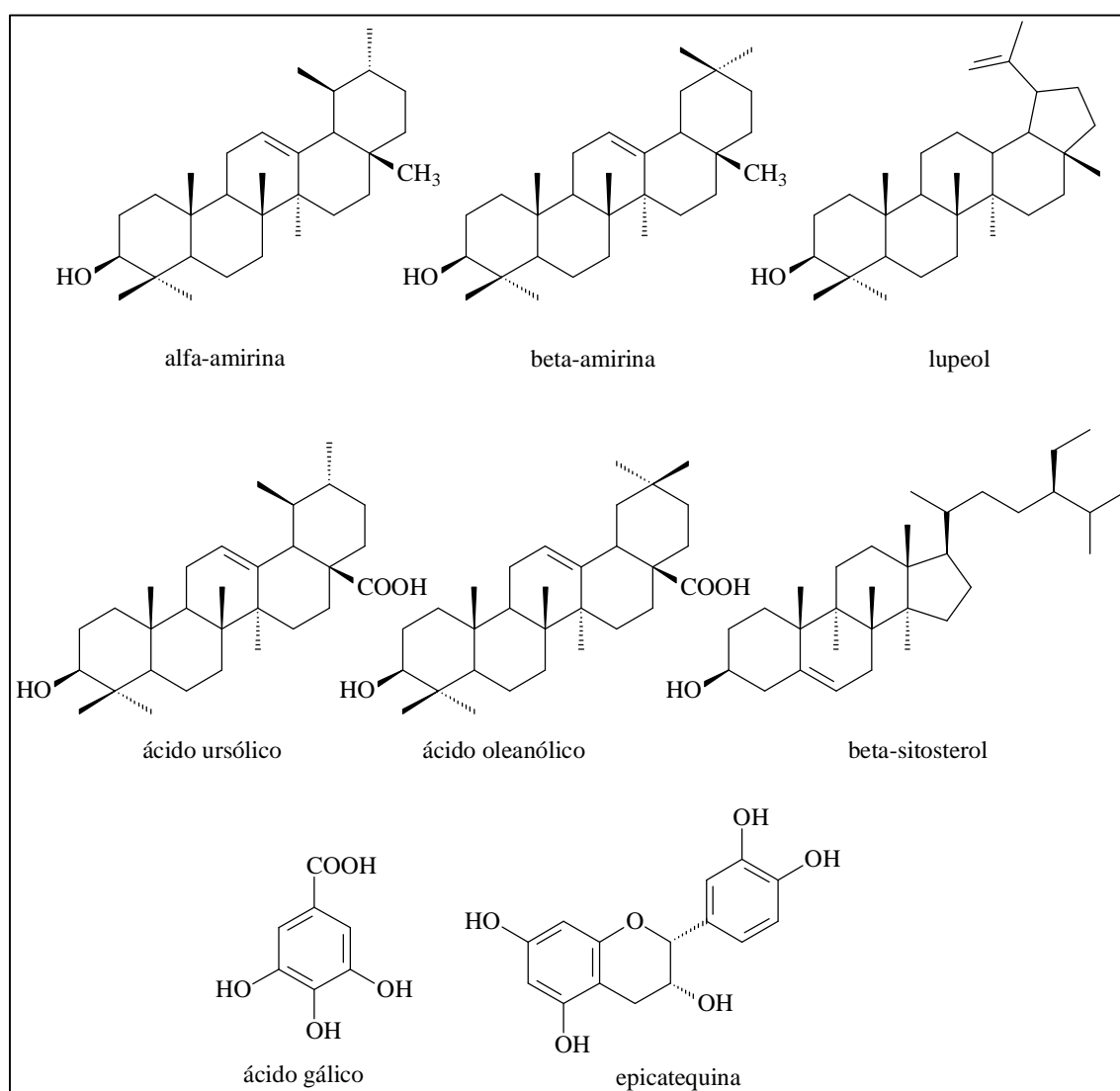


Figura 2.17. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *M. rubiginosa*

Da espécie *Miconia cabucu* foram isolados a quercetina-3- α -L-ramnopiranosil-(2 \rightarrow 1)-O- β -D-xilopiranosídeo, a quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (Figura 2.18) e o ácido gálico (Figura 2.17). Além destas substâncias, foram isolados outros três flavonóides glicosilados: miricetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo, quercetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo e kaempferol-3-O- β -D-(6''-coumaroil)-glucopiranosídeo e o biflavonóide 5-hidroxi-4'-7-dimetoxiflavona-(6-C-6'')-5''-hidroxi-3''',4''',7'''-trimetoxiflavona (Figura 2.15) (RODRIGUES *et al.*, 2007b).

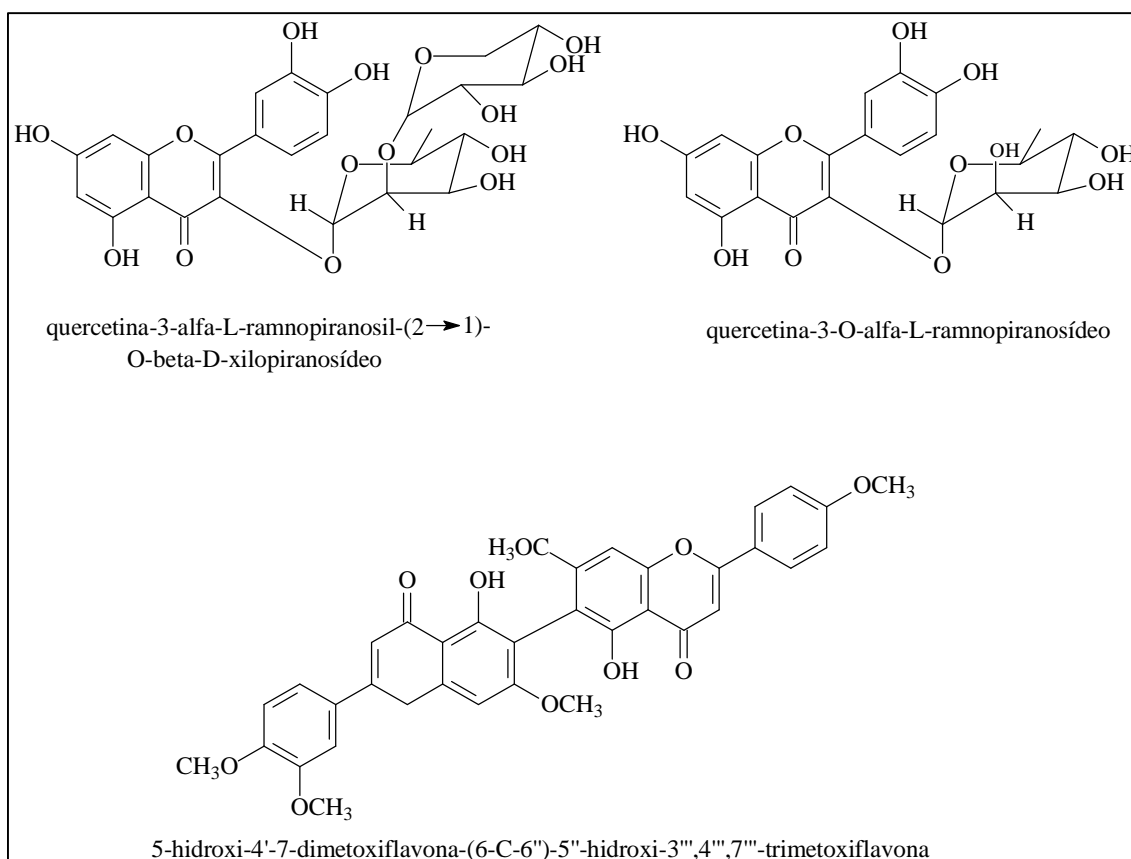


Figura 2.18. Substâncias isoladas de *M. cabucu*

O estudo de *M. ligustroides* e *M. sellowiana* evidenciou a presença de triterpenos no gênero *Miconia*. Além dos ácidos ursólico e oleanólico (Figura 2.17), foram isolados o ácido 2- α -hidroxiursólico, ácido máslico e ácido urjinólico (Figura 2.19) (CUNHA *et al.*, 2006).

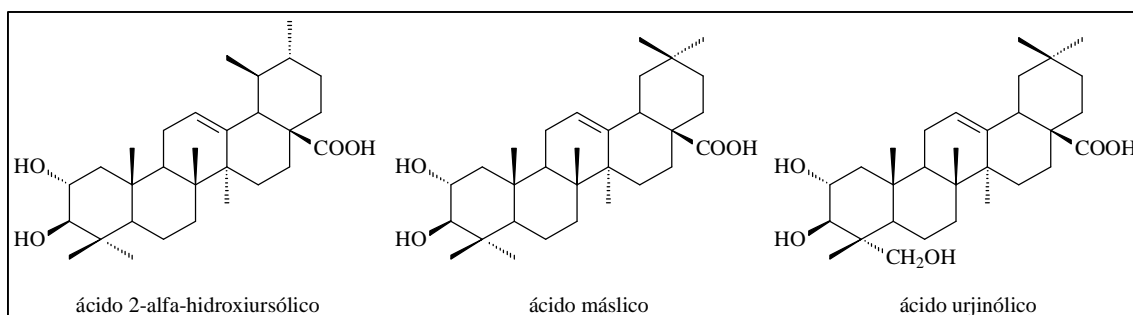


Figura 2.19. Substâncias isoladas de *M. ligustroides* e *M. sellowiana*

O potencial antimicrobiano de espécies de *Miconia* já foi descrito em trabalhos anteriores. As espécies *Miconia chamissois* e *Miconia ligustroides* foram avaliadas por BARROS *et al.* (2006) quanto ao potencial antimicrobiano através do método de difusão em disco. O extrato metanólico de *Miconia chamissois* inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e de *Candida albicans*, enquanto o extrato hexânico inibiu o crescimento destes microrganismos somente a partir de 500µg do extrato bruto. Os extratos de *M. ligustroides* inibiram o crescimento de *Candida albicans* (extrato metanólico) e de *Bacillus cereus* (extrato hexânico) em concentrações maiores.

CELLOTO *et al.* (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólico, hexânico e diclorometânico de *Miconia rubiginosa*, *Miconia albicans* e *Miconia stenostachya* utilizando a técnica de difusão em poço. Neste ensaio observou-se que o extratos etanólicos de *Miconia albicans* e *Miconia rubiginosa* mostraram-se os mais ativos frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* e *Candida albicans*. Os extratos de *Miconia stenostachya* foram ativos apenas frente à *Candida albicans*.

Os triterpenos ácido ursólico, ácido urjínólico, ácido oleanólico e a mistura de ácido 2- α -hidroxiursólico e ácido máslico, isolados de *Miconia ligustroides* e *Miconia sellowiana* foram avaliados quanto ao potencial tripanocida, bem como o sal de potássio derivado do ácido ursólico. Os estudos *in vitro* mostraram que os ácidos ursólico e oleanólico e o sal derivado do ácido ursólico foram os mais ativos contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀ 17,1 µM, 12,8 µM and 8,9 µM, respectivamente) (CUNHA *et al.*, 2006).

Efeitos analgésicos dos extratos hexânico, diclorometânico e etanólico de *Miconia rubiginosa* foram avaliados por CELLOTO *et al.* (2003), os quais mostraram

efeito antinociceptivo significativo. O fracionamento do extrato diclorometânico levou ao isolamento dos ácidos ursólico e oleanólico como compostos majoritários.

Os ácidos ursólico e oleanólico foram os principais metabólitos isolados em mistura de *Miconia albicans*, cujo extrato bruto apresentou atividades analgésica e antiinflamatória. Entretanto, a administração da mistura contendo 65% de ácido ursólico e 35% de ácido oleanólico não exibiu significativas ações analgésica e antiinflamatória. Com base nestes resultados, considerando que a mistura de ácido ursólico e ácido oleanólico foi inativa, foi sugerido que outros compostos devem ser responsável por estes efeitos, uma vez que o extrato bruto apresentou boa atividade (VASCONCELOS *et al.*, 2006).

O trabalho realizado por CALDERÓN *et al.* (2003) evidenciou o potencial citotóxico do extrato metanólico das partes aéreas de *Miconia serrulata*. Este extrato apresentou significativa citotoxicidade *in vitro* frente às linhagens de câncer de mama, carcinoma de pulmão e câncer do sistema nervoso central, com IC₅₀ de 17,0 µM, 18,0 µM e 18,0 µM respectivamente.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Material e Métodos

Fases estacionárias utilizadas para cromatografia em coluna (CC):

- Sílica gel 60 (70-230 Mesh) da ACROS ORGANICS
- Sílica gel 60 (230-400 Mesh) da ACROS ORGANICS
- Sephadex LH 20 da Amersham Pharmacia Biotech AB

Foram utilizadas colunas de tamanhos variados, dependendo das quantidades a serem aplicadas.

Solventes utilizados no fracionamento e identificação dos compostos:

- Solventes comerciais BRENTAGLA, SINTH, VETEC, LABSYNTH e outros destilados na sala de destilação do Departamento de Química da UFSCar para obtenção de extratos e fracionamento dos mesmos.
- Solventes grau HPLC da JTB.
- Solventes deuterados da ALDRICH CHEMICAL COMPANY, ACROS ORGANICS, CIL - CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, Inc. para obtenção de espectros de RMN.

Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA):

Utilizada para monitoração dos fracionamentos efetuados:

- Cromatoplaça de sílica gel 60 HF254 em alumínio da MERCK.

Reveladores:

- Radiação na região do UV (254 e 360 nm)
- Vanilina em ácido sulfúrico

Reagentes

Utilizados para reação de metilação com diazometano:

- p-toluilsulfonilmetilnitrosamida (reagente de Diazald) – Sigma Aldrich
- Hidróxido de potássio
- Éter etílico
- A solução de diazometano foi preparada dissolvendo-se 1,0 g de p-toluilsulfonilmetilnitrosamina (diazald) em 15 mL de éter etílico. A solução foi

resfriada em banho de gelo e transferida para um balão de destilação, onde foi adicionado 1,0 g de hidróxido de potássio em 10 mL de etanol 96%. O sistema foi deixado em repouso por 5 minutos em banho de gelo e em seguida destilado em manta térmica a 65° C. O destilado foi coletado sobre éter etílico em banho de gelo (LEONARD *et al*, 1995). A metilação foi realizada adicionando-se a solução de diazometano ao material a ser metilado até não haver mais desprendimento de gás (N₂).

3.2. Coleta e Identificação do Material Botânico

As folhas de *Miconia ferruginata* foram coletadas no mês de setembro de 2008, no campus da Universidade Estadual de Goiás (UEG) em Anápolis, Goiás, Brasil e identificadas pela Prof^a Dr^a Mirley Luciene dos Santos. A exsicata do material vegetal encontra-se depositada no herbário da Universidade Estadual de Goiás sob o número 5794.

3.3. Obtenção do Extrato

O material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar a 45° C e pulverizado em moinho Willey. A extração do material moído foi realizada por maceração em etanol, à temperatura ambiente, seguida pela evaporação do solvente em rotaevaporador Quimis, obtendo-se o extrato conforme representado na Figura 3.1.

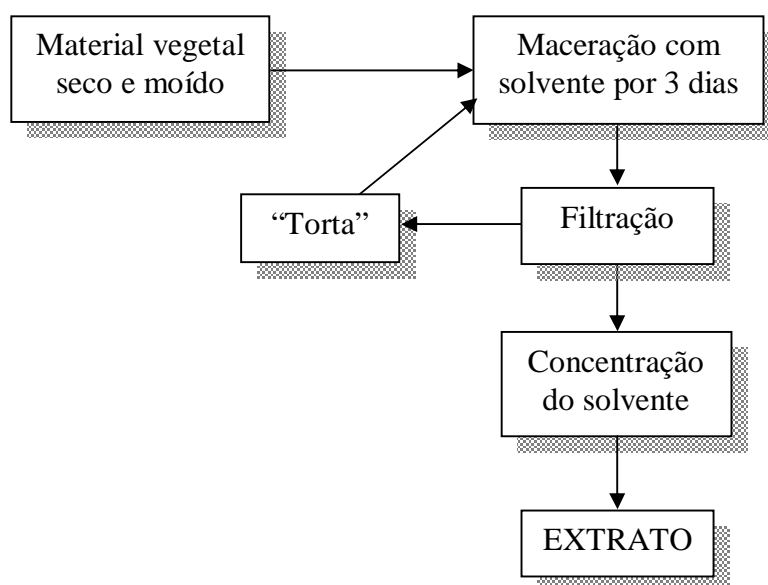


Figura 3.1. Obtenção do extrato de *M. ferruginata*

A parte vegetal utilizada no preparo do extrato assim como a quantidade de extrato obtida estão descritas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Massa de material vegetal e quantidade de extrato obtido

<i>Material Vegetal Seco (g)</i>	<i>Solvente</i>	<i>Massa de extrato obtida (g)</i>	<i>Código</i>
Folhas (1485)	Etanol	405,11	MFFE

M = *Miconia*; F = *ferruginata*; F = folha; E = etanol

3.4. Fracionamento do extrato

O extrato etanólico das folhas de *M. ferruginata* foi fracionado através de partição líquido-líquido, Figura 3.2, originando 4 frações.

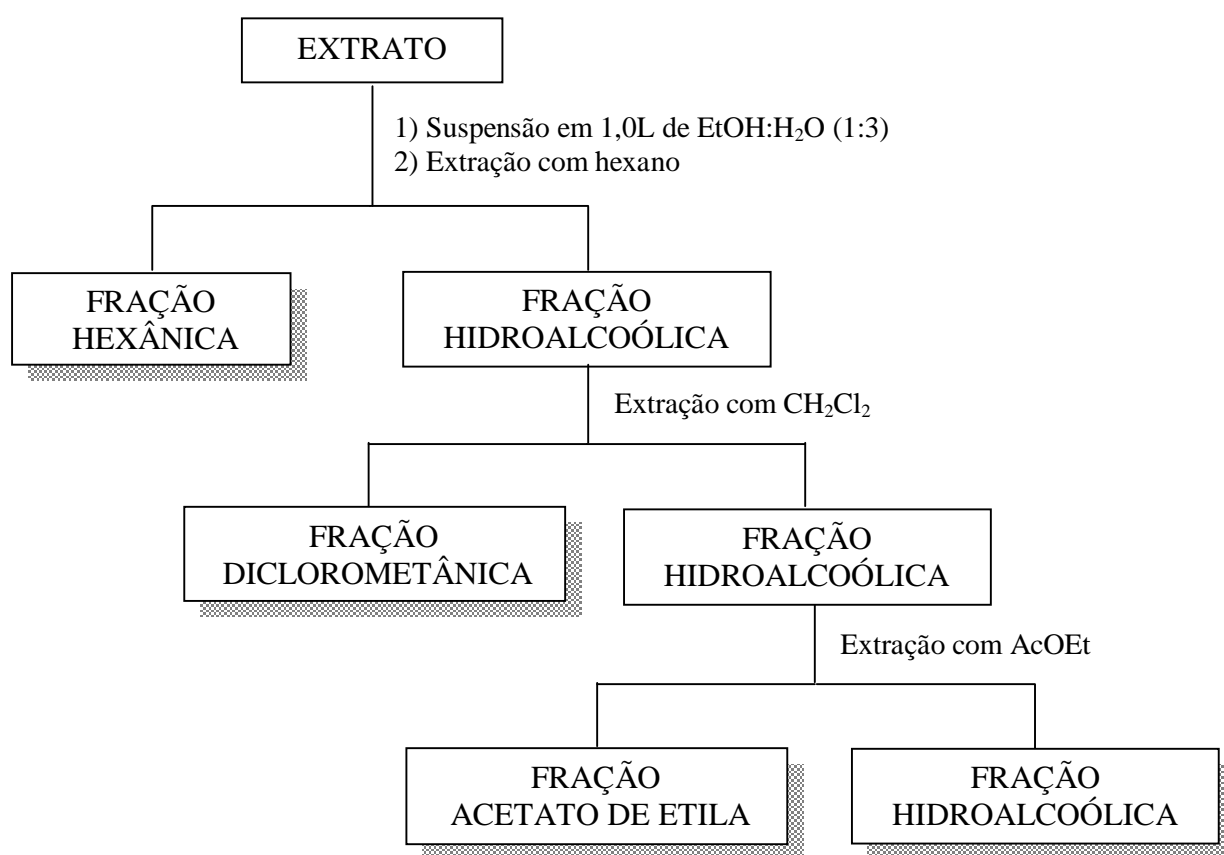


Figura 3.2. Metodologia utilizada na partição do extrato

As frações obtidas após a partição e suas respectivas massas estão representadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Massas obtidas da partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico

<i>Extrato (g)</i>	<i>Solvente</i>	<i>Massa obtida (g)</i>	<i>Código</i>
405,11	Hexano	19,63	MFFE-H
	Diclorometano	0,86	MFFE-D
	Acetato de etila	24,30	MFFE-A
	Resíduo aquoso	65,19	MFFE-W

M = *Miconia*; F = *ferruginata*; F = folha; E = etanol; H = hexano; D = diclorometano; A = acetato de etila; W = água

3.5. Isolamento dos Constituintes Químicos de *M. ferruginata*

3.5.1 – Estudo Fitoquímico de MFFE-H

O estudo da fração hexânica levou ao isolamento da substância **F3** e de **T1** e **T2** em mistura isomérica. Essa fração foi primeiramente submetida à cromatografia líquida a vácuo, realizada em funil de placa sinterizada ($\phi \times h = 7 \times 26$ cm), tendo como suporte sílica 70-230 mesh e utilizando-se solventes em ordem crescente de polaridade, conforme esquematizado na Figura 3.3.

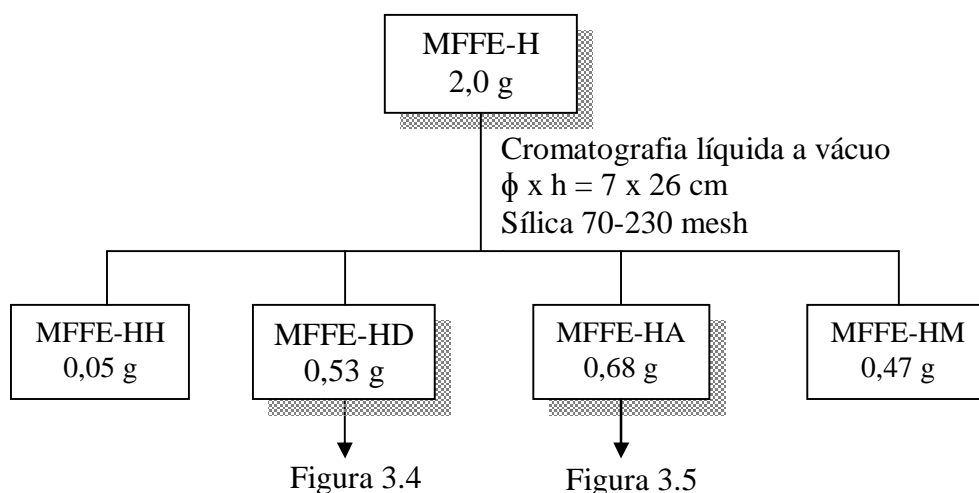


Figura 3.3. Fracionamento de MFFE-H

Isolamento da substância F3

A subfração hexano-diclorometano (MFFE-HD) foi submetida à cromatografia por adsorção em coluna de vidro ($\phi = 2,0$ cm, $h = 12$ cm) utilizando sílica gel do tipo “flash” (230-400 Mesh) como fase estacionária e como fase móvel mistura de solventes com gradiente de eluição em ordem crescente de polaridade como demonstrado resumidamente na Figura 3.4.

Foram obtidas 43 frações, as quais de acordo com as semelhanças apresentadas na análise por CCDC foram reunidas em 11 frações. Através de experimento de RMN ^1H verificou-se a presença de sinais característicos de flavonóide na fração HD 7.2. A substância **F3** foi isolada a partir da fração HD 7.2 através de cromatografia líquida em coluna utilizando sephadex LH-20 como fase estacionária, sendo identificada por RMN de ^1H e experimentos de correlação heteronuclear.

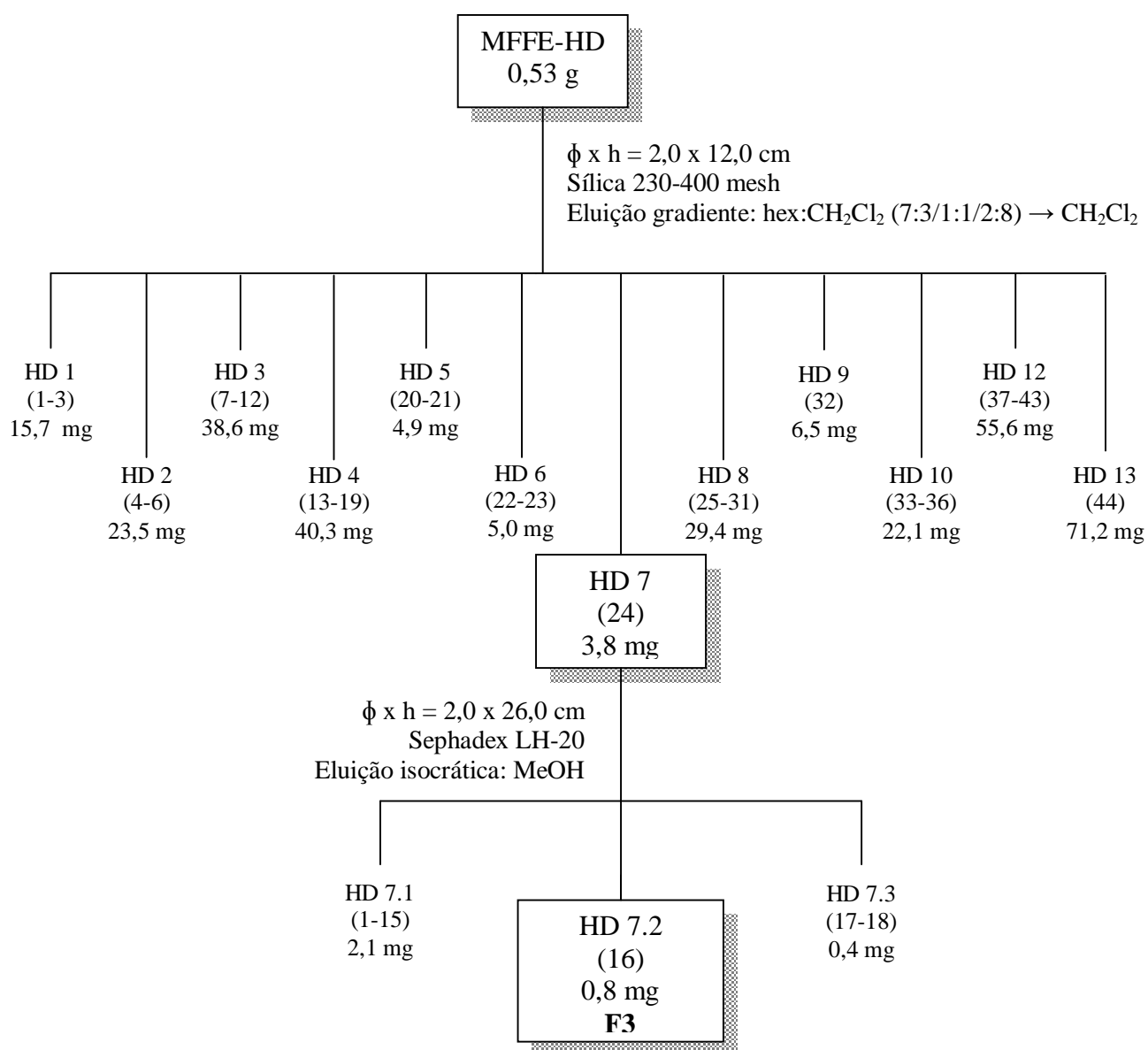


Figura 3.4. Isolamento da substância **F3**

Isolamento das substâncias **T1** e **T2**

O estudo da subfração hexano-acetato de etila (MFFE-HA) das folhas de *M. ferruginata* levou ao isolamento das substâncias **T1** e **T2**. Essas substâncias foram isoladas através de cromatografia líquida em coluna, utilizando-se sílica gel 230-240 mesh, sendo identificada por RMN ^1H e ^{13}C . A Figura 3.5 mostra resumidamente como este estudo foi realizado.

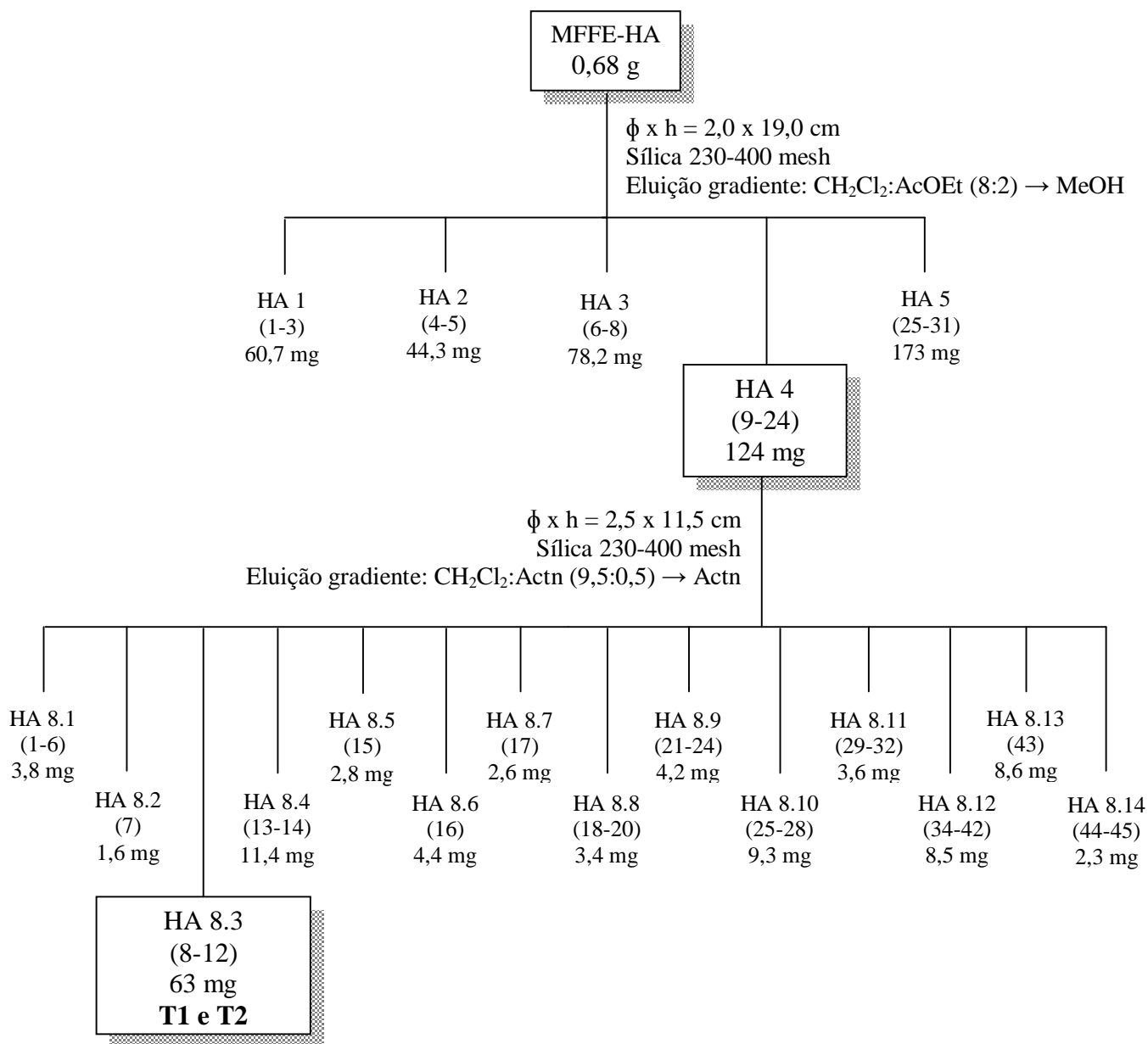


Figura 3.5. Isolamento das substâncias **T1** e **T2**

3.5.2 – Estudo Fitoquímico de MFFE-A

A fração acetato de etila foi submetida à cromatografia líquida a vácuo em funil de placa sinterizada ($\phi \times h = 7 \times 26$ cm), tendo como suporte sílica 70-230 mesh, conforme esquematizado na Figura 3.6. Do estudo dessa fração foram isoladas as substâncias **F1**, **F2** e **F4**, além de **E1** e **E2** em mistura.

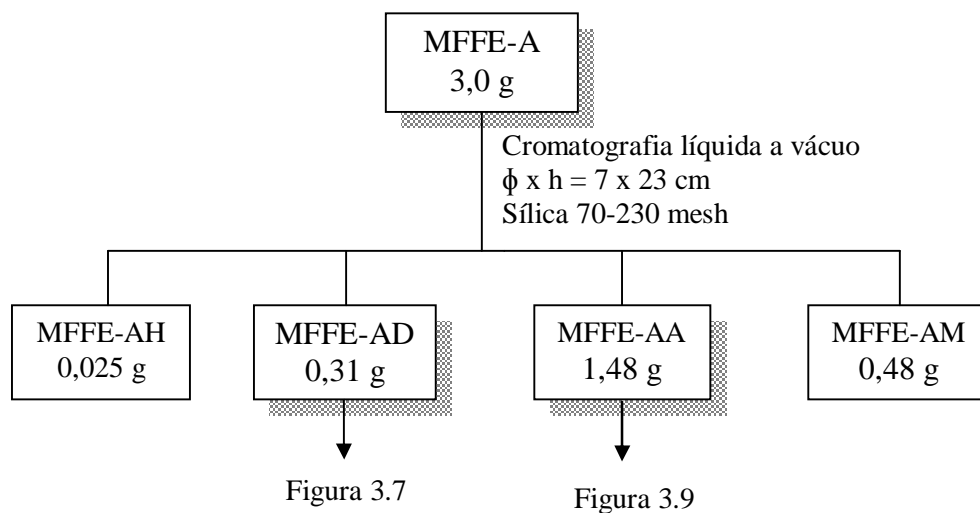


Figura 3.6. Fracionamento de MFFE-A

Isolamento das substâncias **E1** e **E2**

As substâncias **E1** e **E2** foram isoladas por cromatografia em coluna utilizando-se sílica gel 230-400 mesh a partir da subfração acetato de etila-diclorometano (MFFE-AD). Estas substâncias foram identificadas por RMN ^1H e CG-EM. A Figura 3.7 mostra resumidamente como este estudo foi realizado.

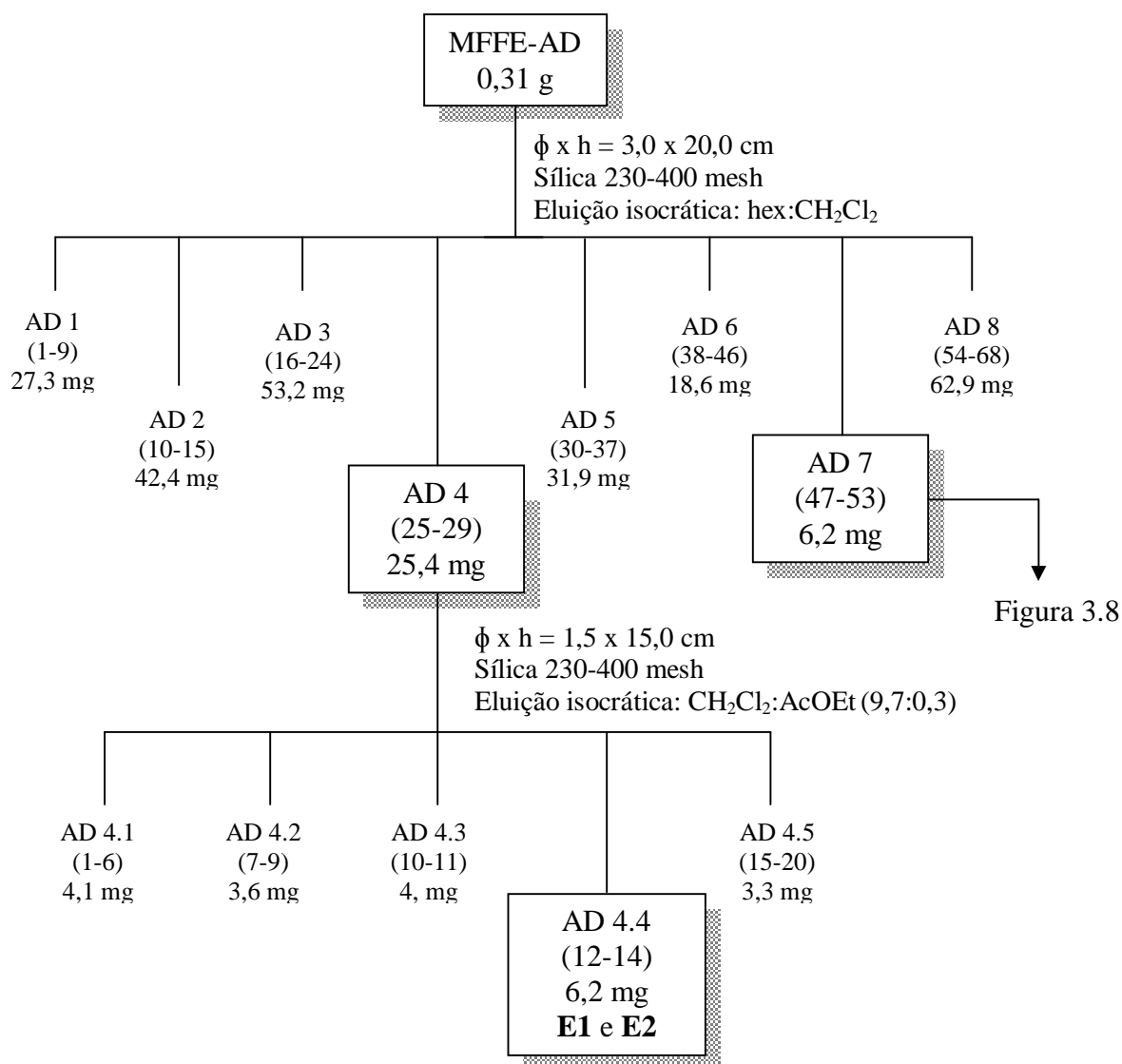


Figura 3.7. Isolamento das substâncias **E1** e **E2**

Isolamento da substância **F4**

A substância **F4** foi isolada por cromatografia em camada delgada preparativa a partir da fração AD 7, como representado na Figura 3.8. Essa substância foi identificada por experimentos de RMN em uma e duas dimensões.

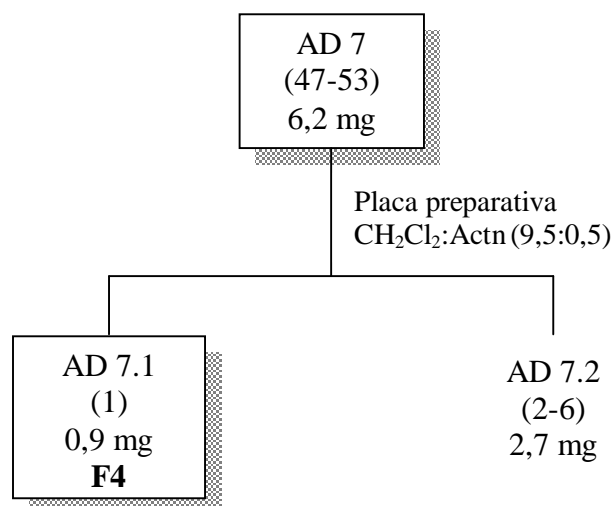


Figura 3.8. Isolamento da substância **F4**

Isolamento da substância **F2**

A substância **F2** foi isolada por cromatografia em coluna utilizando-se sílica gel 230-400 mesh a partir da subfração acetato de etila-acetato de etila (MFFE-AA). Esta substância foi identificada através de experimentos de RMN em uma e duas dimensões. As Figuras 3.9 e 3.10 mostram resumidamente como este estudo foi realizado.

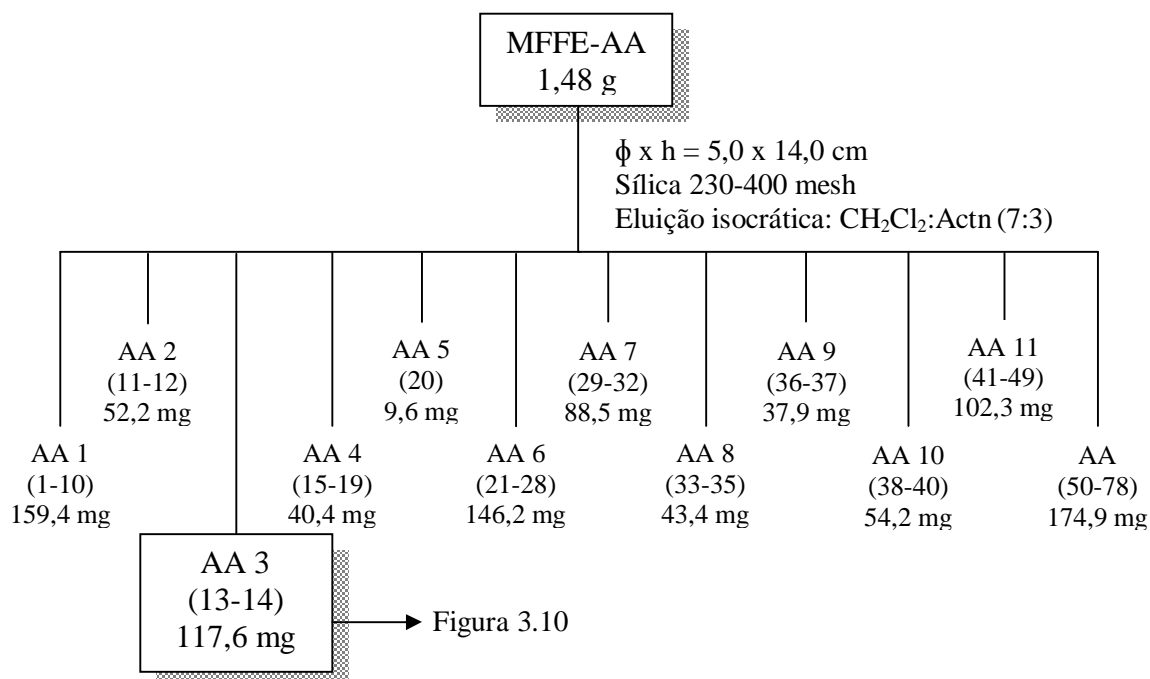


Figura 3.9. Parte do procedimento para o isolamento da substância **F2**

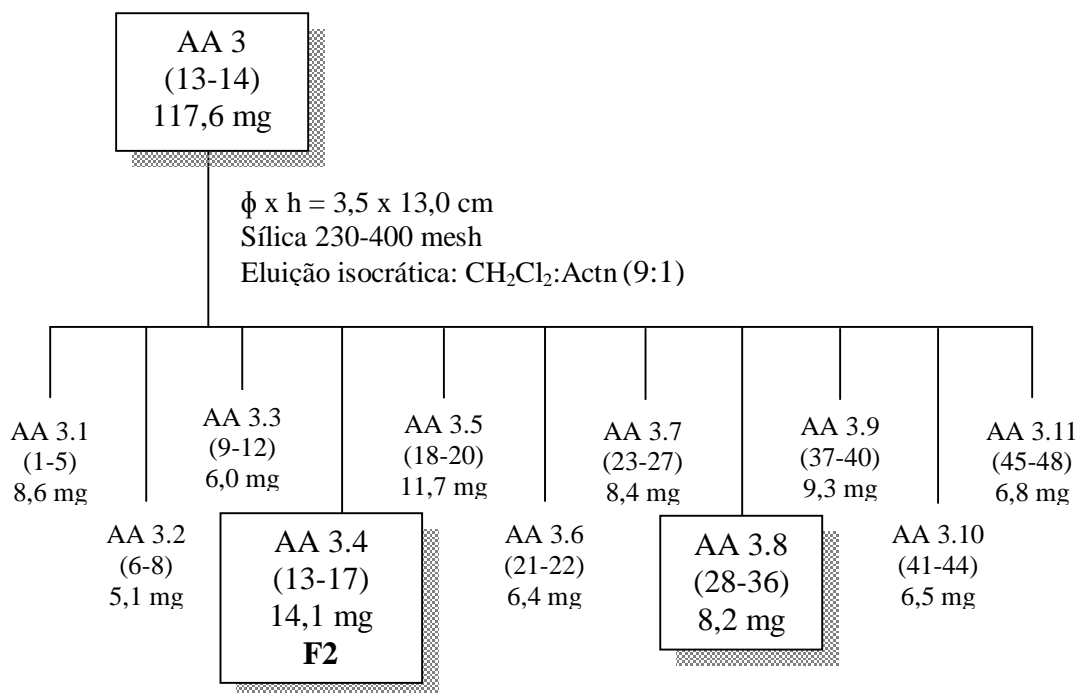


Figura 3.10. Isolamento da substância **F2**

Isolamento da substância **F1**

A substância **F1** foi isolada por cromatografia em coluna utilizando-se sílica gel 230-400 mesh, como representado na Figura 3.10. Essa substância foi identificada por experimentos de RMN em uma e duas dimensões.

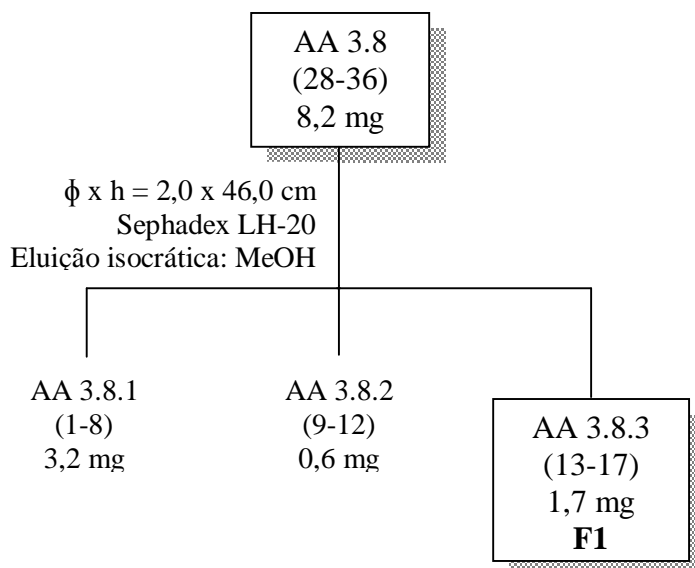


Figura 3.11. Isolamento da substância **F1**

3.5.3. Estudo Fitoquímico de MFFE-D

O estudo dessa fração levou ao isolamento das substâncias **F1** e **F2**, já isoladas anteriormente na fração acetato de etila.

Isolamento da substância **F2**

A substância **F2** foi isolada através de cromatografia líquida em coluna utilizando-se sílica gel 230-400 mesh e sephadex LH-20, como representado na Figura 3.11. Essa substância foi identificada por experimentos de RMN em uma e duas dimensões.

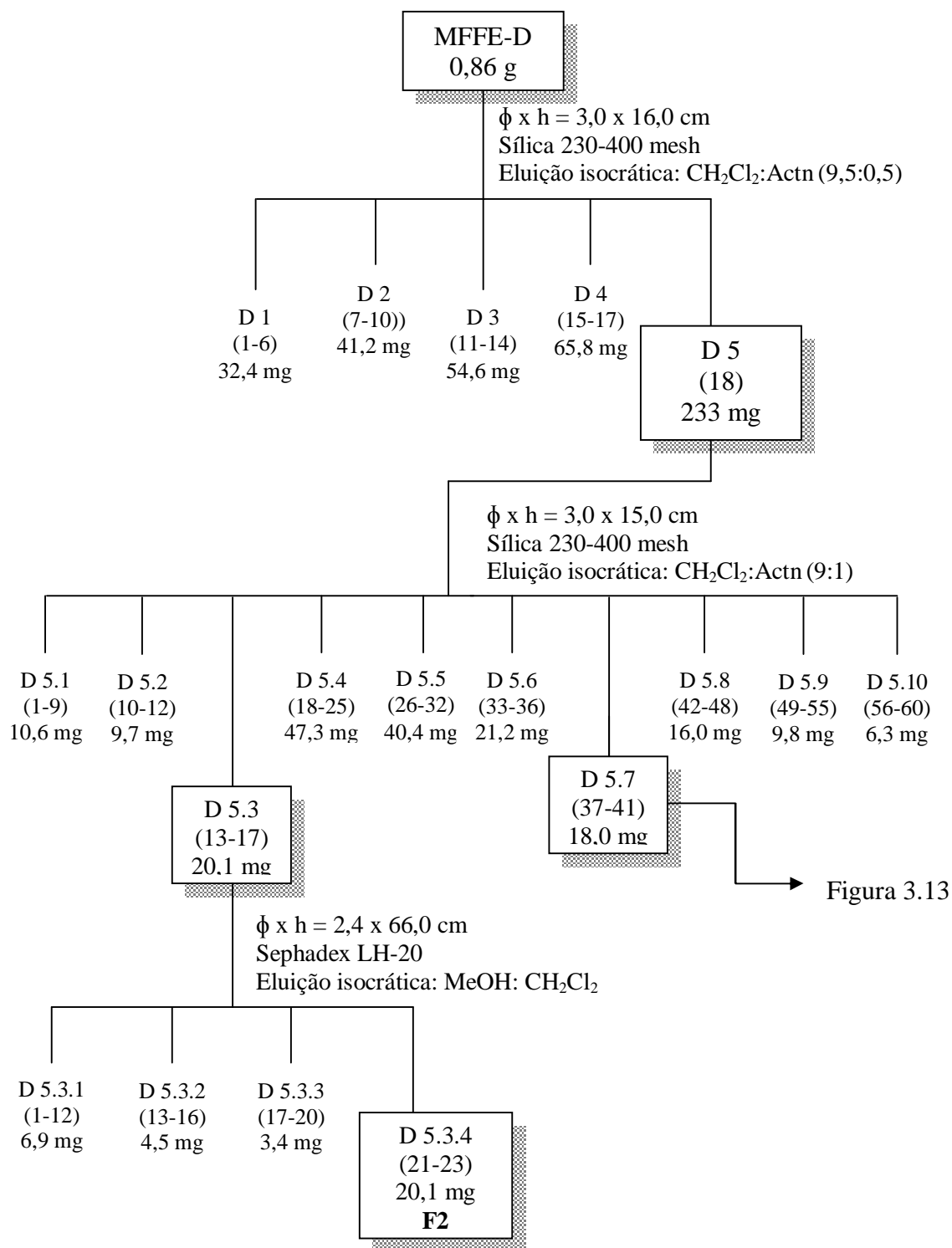


Figura 3.13

Figura 3.12. Isolamento da substância **F2**

Isolamento da substância F1

A substância **F1** foi isolada através de cromatografia líquida em coluna utilizando-se sílica gel 230-400 mesh e sephadex LH-20, como representado na Figura 3.12. Essa substância foi identificada por experimentos de RMN em uma e duas dimensões.

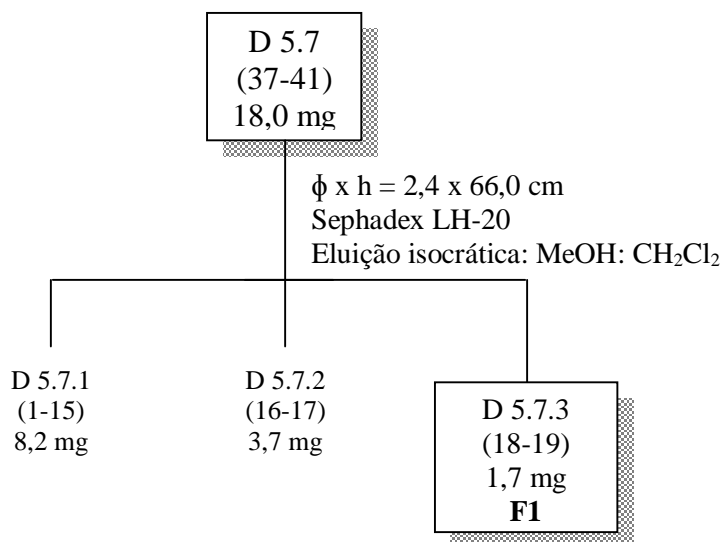


Figura 3.13. Isolamento da substância **F1**

3.6. Metodologia dos ensaios biológicos

3.6.1. Ensaios Enzimáticos

Foram realizados ensaios enzimáticos frente às catepsinas K e B. A atividade enzimática foi determinada pelo aumento de fluorescência devido à hidrólise dos substratos. A leitura foi convertida em μmols de substrato hidrolisado por minuto a partir das curvas de fluorescência das soluções de substrato antes e depois da hidrólise total. Os parâmetros cinéticos foram calculados usando-se o programa Origin.

As atividades enzimáticas frente aos inibidores naturais foram determinadas pela hidrólise do substrato fluorogênico Z-FRMCA (SIGMA). Essa medida foi monitorada por um fluorímetro de placa de 96 poços, com fenda de excitação ajustada para λ_{ex} 380 nm e emissão λ_{em} 460 nm. Nas determinações, as placas foram mantidas em compartimento termostaticado (27°C). As enzimas foram pré-ativadas com DTE (2,0 mM) por 5 min. Em seguida foram adicionados 5 μL da solução a ser testada (extrato ou substância pura) deixando-se a placa em pré-incubação por 5 min. Em seguida foram

adicionados 10 μ M do substrato Z-FRMCA, realizando-se a leitura em tempo real. Os ensaios com as catepsinas K e B foram realizados em fluorímetro GEMINI – XS, com placa de ELISA preta de 96 poços e com volume final de 200 μ L.

3.6.2. Ensaios de Citotoxicidade *in vitro*

As análises de citotoxicidade foram realizadas no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (UFC), sendo responsável pelos testes Kristiana Cerqueira Mousinho. Essas análises foram realizadas através do método do MTT, o qual vem sendo utilizado no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (Skehan *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato.

Foi descrito primeiramente por Mosman em 1983 e modificado por Alley em 1996, tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

As linhagens utilizadas, MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon - humano) e SF-295 (sistema nervoso central), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (USA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidos em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As células foram plaqueadas na concentração de $1,0 \times 10^5$ céls./100 μ L, para células aderidas. As substâncias foram acrescidas em concentrações de 5 μ g/mL (dose única). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37° C. Antes do término do período de incubação, foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 200 μ L da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO em espectrofotômetro de placa a 550 nm.

Os resultados foram analisados segundo suas médias e respectivos desvios-padrão no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi analisada a partir de dois experimentos realizados em duplicata.

3.6.3. Ensaio Antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no Laboratório de bioensaios do grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), aplicando-se os testes de susceptibilidade para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), segundo as normas descritas pelo NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS, 2003) e adaptação das normas descritas pelo NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS, 2002).

Os testes foram realizados em placas de 96 poços (ELISA), onde diluições seriadas em triplicatas das amostras e antibióticos de referência foram preparadas usando caldo Mueller-Hinton para o crescimento das bactérias e caldo Sabouraud para leveduras. As amostras foram transferidas para as placas de microdiluição depois de dissolvidas no solvente adequado: DMSO para amostras polares e Tween 80 para amostras de média polaridade e apolares, e caldo seletivo de crescimento microbiano numa concentração inicial de 500 µg/mL para as amostras testadas. Os inóculos microbianos foram preparados nestes meios e a concentração ajustada frente ao tubo 0,5 McFarland de turbidez padrão (10^8 unidades formadoras de colônias – UFC/mL) e respectivamente diluídos nas razões de 1:10 no caldo para o procedimento de microdiluição.

Porções de 5 µL de cada suspensão microbiana foram transferidas para todos os poços da placa de microdiluição contendo 100 µL da amostra a ser testada ou do antibiótico de referência (controle). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 18 a 24 horas. Após o crescimento e leitura dos resultados foram realizadas as sementeiras do meio líquido contido nos poços que apresentaram inibição no crescimento do microrganismo. A sementeira foi realizada em placas de Petri com o ágar específico para o microrganismo, confirmando o efeito bacteriostático ou bactericida da amostra. Depois da retirada do material para sementeira, as placas de Elisa foram reveladas com 10 µL do revelador de crescimento microbiano – resazurina, que muda de coloração (azul para vermelho) quando há o crescimento do microrganismo, tornando as culturas dos mesmos avermelhadas.

A concentração inibitória mínima (CIM) nestes ensaios foi considerada a menor concentração da amostra que impediu visivelmente o crescimento microbiano.

3.7. Análises por RMN

As análises por RMN foram feitas nos equipamentos BRUKER DRX 400 (9,4 Tesla) e BRUKER ARX 200 (4,7 Tesla). As amostras foram solubilizadas de acordo com suas polaridades em CDCl_3 , acetona- d_6 ou MeOD.

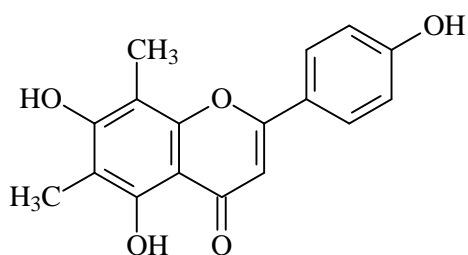
3.8. Análise por CG-MS

A análise por CG-MS foi realizada no equipamento QP 5000 Shimadzu, utilizando-se coluna AT-5 MS (30 m x 0,25 mm), filme de 0,25 μm de espessura e o modo de ionização por impacto eletrônico a 70 e.V. A temperatura do injetor foi mantida 250 °C e a do detector a 280 °C. Foi injetado o volume de 1 μL de amostra solubilizada em acetato de etila grau HPLC no modo split. Para a análise da mistura de esteróides foi utilizada a seguinte programação de temperatura: 150 °C (3 min); 6°C/min até 280 °C; 280 °C (20 min).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Substâncias Isoladas

O estudo fitoquímico de *Miconia ferruginata* possibilitou o isolamento e identificação de 7 metabólitos secundários e à proposta de dois isômeros para um oitavo.

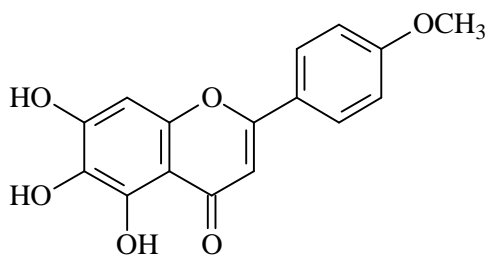


5,7,4'-trihidroxi-6,8-dimetilflavona (F1)

Massa: 3,4 mg

Isolamento: p. 33 e p. 35

Identificação: p. 41

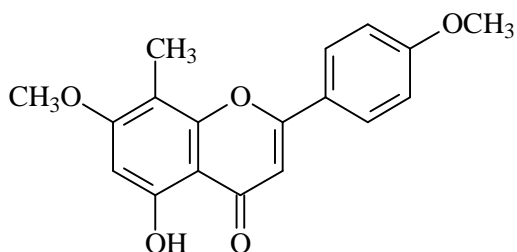


5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona (F2)

Massa: 34,2 mg

Isolamento: p. 32 e p. 34

Identificação: p. 47

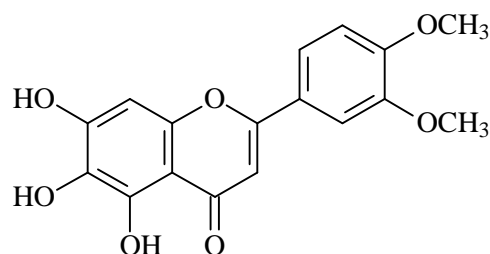
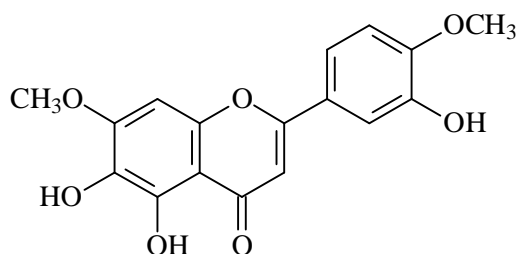


5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-8-metilflavona (F3)

Massa: 0,8 mg

Isolamento: p. 27

Identificação: p. 52

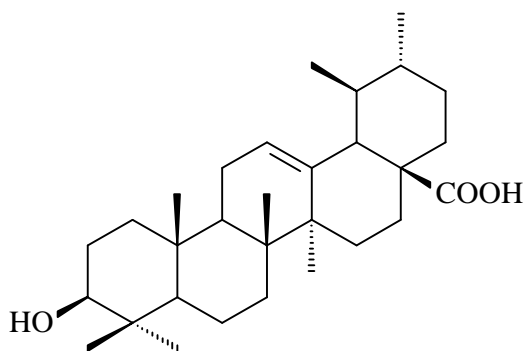


Isômeros propostos para a substância F4

Massa: 0,9 mg

Isolamento: p. 31

Identificação: p. 57

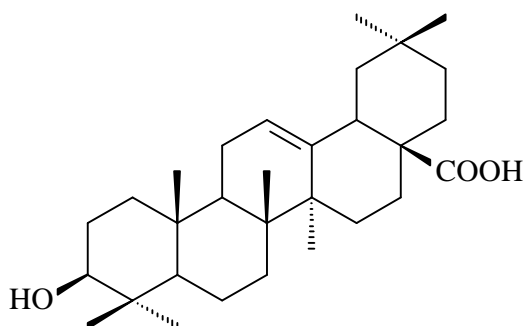


Ácido ursólico (T1)

Massa: 63 mg (em mistura)

Isolamento: p. 28

Identificação: p. 60

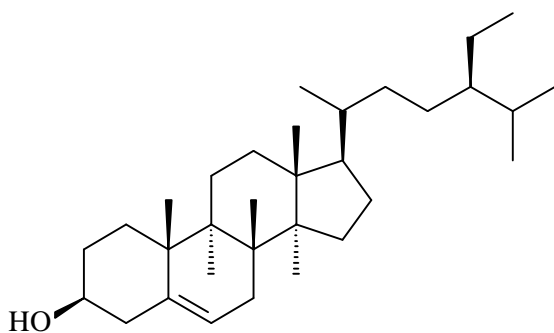


Ácido oleanólico (T2)

Massa: 63 mg (em mistura)

Isolamento: p. 28

Identificação: p. 60

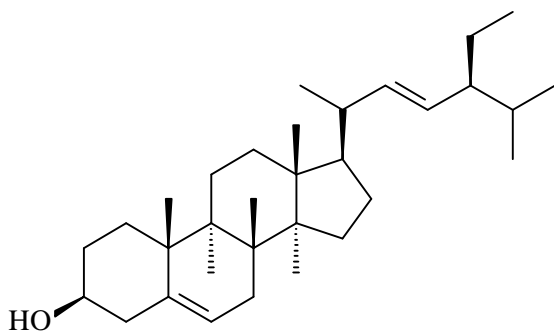


β-sitosterol (E1)

Massa: 6,2 mg (em mistura)

Isolamento: p. 30

Identificação: p. 63



Estigmasterol (E2)

Massa: 6,2 mg (em mistura)

Isolamento: p. 30

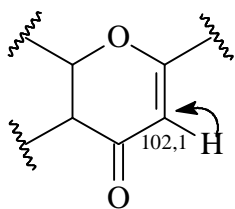
Identificação: p. 63

4.2. Identificação da substância F1

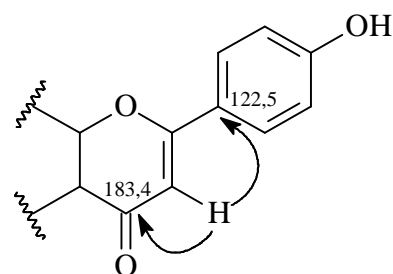
A substância **F1** foi isolada da fração em acetato de etila como cristais amarelos em forma de agulha. Esta substância foi identificada através da análise de experimentos de RMN em uma e duas dimensões.

No espectro de ^1H (Figura 4.1, p. 45) foi observada a presença de dois dubletos, em um sistema AA'BB' de acoplamento de spin, na região de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em δ_{H} 7,86 e δ_{H} 6,93, integrados para dois hidrogênios cada, com constante de acoplamento de 8,4Hz. Neste mesmo experimento, observou-se um singlete em δ_{H} 6,54; integrando para um hidrogênio e dois singletos intensos de hidrogênios metílicos em δ_{H} 2,32 e δ_{H} 2,09 integrando para três hidrogênios cada. Estas observações sugeriram a presença de uma flavona contendo um substituinte na posição C-4' e um anel A completamente substituído.

No mapa de contorno de HSQC (Figura 4.2, p. 45), pôde-se observar a correlação do singlete em δ_{H} 6,54 com um sinal de carbono em δ_{C} 102,1; caracterizando o hidrogênio H-3 de uma flavona. No experimento de HMBC (Figura 4.3, p. 46), observou-se a correlação deste singlete com os carbonos em δ_{C} 122,5 e δ_{C} 183,4 atribuídos aos carbonos C-1' e C-4, respectivamente.

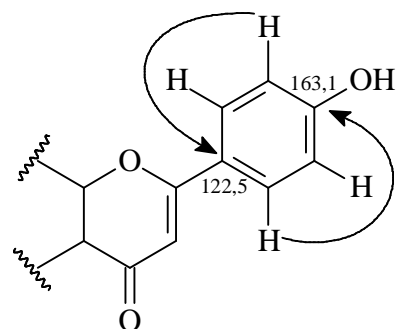
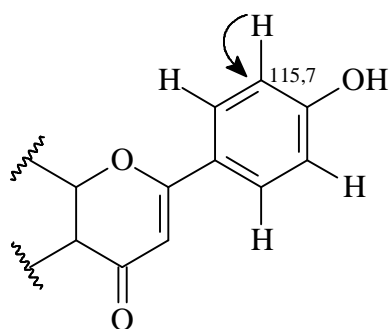


HSQC

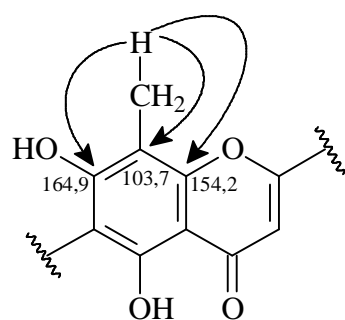
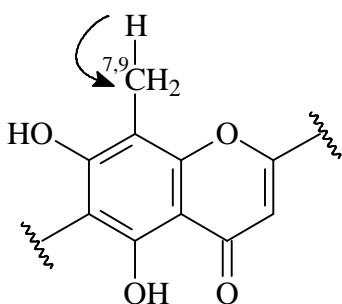


HMBC

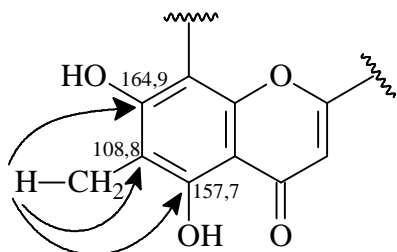
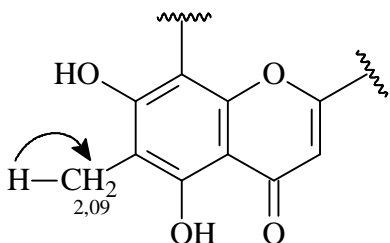
No experimento de HSQC observou-se a correlação do dubleto em δ_{H} 6,92 (H-3'/5') com o sinal de carbono em δ_{C} 115,7; referente aos carbonos C-3'/5'. O experimento de HMBC mostrou a correlação do hidrogênio em δ_{H} 6,92 (H-3'/5') com o sinal de carbono em δ_{C} 122,5 (C-1'). Neste mesmo experimento foi observada a correlação do dubleto em δ_{H} 7,85 (H-2'/6') com o sinal de carbono em δ_{C} 163,1 correspondente ao carbono C-4'.



O hidrogênio metílico em δ_H 2,32 mostrou correlação, no experimento de HSQC, com o sinal de carbono em δ_C 7,9; correspondente ao carbono da metila ligada ao C-8. No mapa de contorno HMBC este hidrogênio correlacionou-se com os sinais de carbono em δ_C 103,7; δ_C 154,2 e δ_C 164,9; referentes aos carbonos C-8, C-9 e C-7, respectivamente.

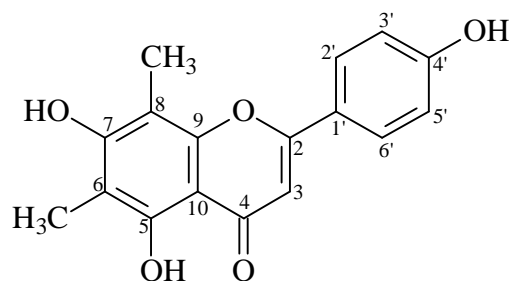


O segundo sinal de hidrogênio metílico, com deslocamento de 2,09 ppm, mostrou correlação com sinais de carbono em δ_C 108,8; δ_C 157,7 e δ_C 164,9; referentes aos carbonos C-6, C-5 e C-7, respectivamente, o que confirmou a ligação desta metila ao carbono C-6.



A presença de uma hidroxila em C-5 foi confirmada com a obtenção do espectro em acetona deuterada (Figura 4.4, p. 46). A análise dos dados e a comparação com os dados obtidos por YOUSSEF *et al.* (1998) permitiram identificar a substância **F1** como

a flavona 5,7,4'-trihidroxi-6,8-dimetilflavona, isolada anteriormente de *Syzygium afternifolium* (RAO e RAO, apud YOUSSEF, RAMADAM e KHALIFA, 1991) e *Panocratium maritimum* (YOUSSEF, RAMADAM e KHALIFA, 1991).



5,7,4'-trihidroxi-6,8-dimetilflavona

A Tabela 4.1 mostra os dados espectroscópicos da flavona em comparação com os dados da literatura.

Tabela 4.1. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 5,7,4'-trihidroxi-6,8-dimetilflavona

H/C	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	$\delta_{\text{H lit}}^{(c)}$	$\delta_{\text{C}}^{(b)*}$	$\delta_{\text{C lit}}^{(d)}$
2			ND	159,7
3	6,54 (s)	6,77 (s)	102,1	102,4
4			183,4	182,0
5			157,7	155,9
5-OH	13,22 (s)	13,12 (s)		
6			108,8	103,4
7			164,9	163,2
8			103,7	101,8
9			154,2	152,3
10			ND	106,9
1'			122,5	121,5
2'/6'	7,85 (d)	7,93 (d)	ND	128,2
3'/5'	6,92 (d)	6,94 (d)	115,7	115,9
4'			163,1	160,9
6-CH ₃	2,09 (s)	2,02 (s)	ND	8,2
8-CH ₃	2,32 (s)	2,28 (s)	7,9	7,9

(a) MeOD, 400MHz; (b) MeOD, 100MHz; (c) DMSO, 400MHz; (d) DMSO, 100MHz

* valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e HMBC; ND: não determinado

A C-alquilação dos flavonóides pode acontecer de duas formas distintas; a primeira se dá através da ligação de um açúcar diretamente ao núcleo flavonoídico, enquanto a segunda envolve a ligação de diferentes grupos alquila, geralmente do grupo metila, a um dos carbonos do flavonóide.

Os primeiros trabalhos envolvendo o isolamento de flavonóides C-metilados se referem a espécies de *Pinus* (Pinaceae) e à *Lonchitis tisserantii* (LEBRETON e VOIRIN, 1967), nas quais se encontrou a 6-C-metilcrisina; às espécies do gênero *Matteuccia*, das quais foi isolada a flavona 6,8-di-C-metilada matteucinol (FUYSE, 1929 citado por HARBORNE, 1967) e às espécies de *Eucalyptus*, onde foram encontrados a eucaliptina e a sideroxilina (WOLLENWEBER e KOHORST, 1981).

WOLLENWEBER e JAY (1988) e WOLLENWEBER (1994) listaram as famílias nas quais os flavonóides C-metilados já foram encontrados. As famílias que mais contribuíram com esse tipo de flavonóide foram Myrtaceae e Ericaceae. Podem também ser citadas as famílias Pteridaceae, Pinaceae, Agavaceae, Liliaceae, Annonaceae, Clusiaceae, Didieriaceae, Nyctaginaceae, Fabaceae, Meliaceae, Platanaceae e Asteraceae. Na maioria destas famílias, com exceção de Myrtaceae e Ericaceae, os flavonóides C-metilados geralmente são encontrados em apenas um gênero e num reduzido número de espécies (BOHM, 1998). A presença de flavonóides C-metilados é relatada pela primeira vez no gênero *Miconia* e provavelmente também na família Melastomataceae.

Dos flavonóides C-metilados listados por WOLLENWEBER e JAY (1988) e WOLLENWEBER (1994), nenhum apresentou C-metilação no anel B. A metilação nos carbonos C-6 e C-8, e em ambas as posições, são mais comuns, enquanto que a metilação no carbono C-3 é de rara ocorrência.

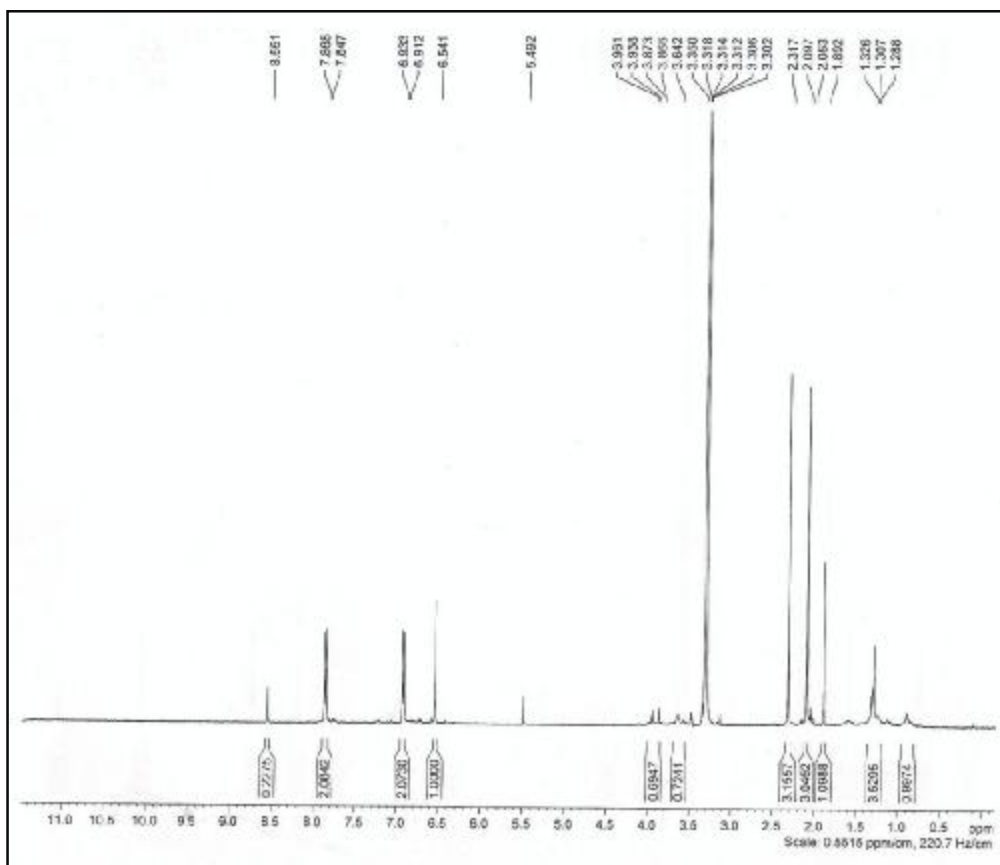


Figura 4.1. Espectro de RMN ^1H da substância **F1** (MeOD, 400 MHz)

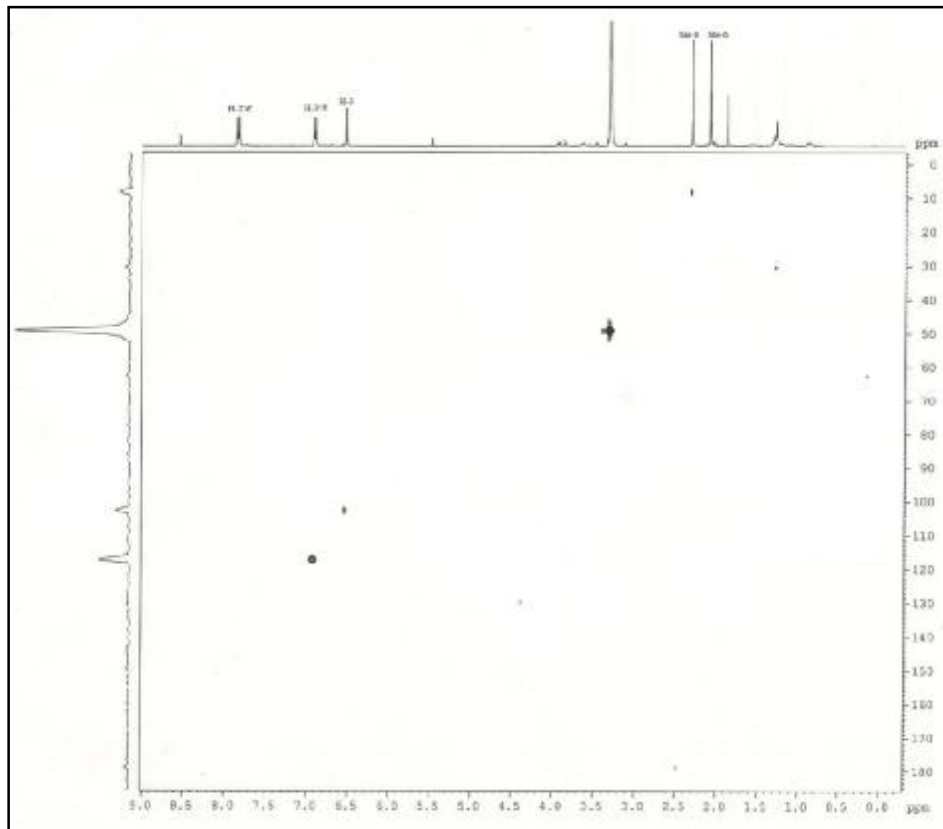


Figura 4.2. Mapa de contorno de HSQC da substância **F1** (MeOD, 400MHz)

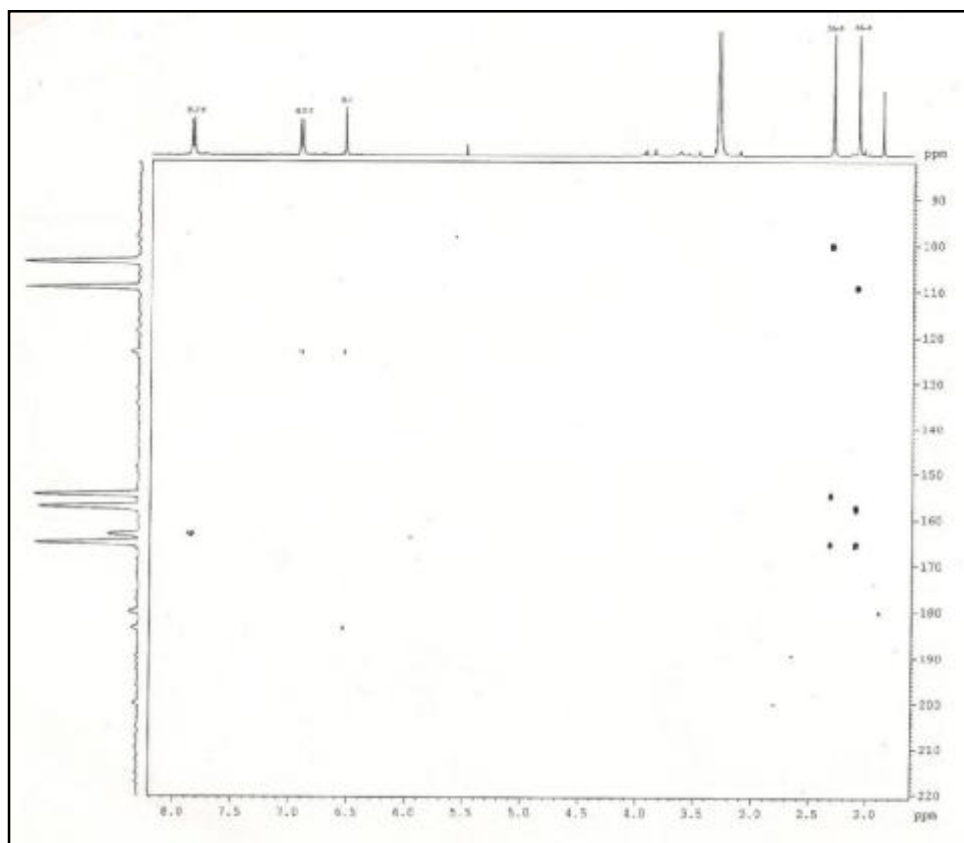


Figura 4.3. Mapa de contorno de HMBC da substância **F1** (MeOD, 400MHz)

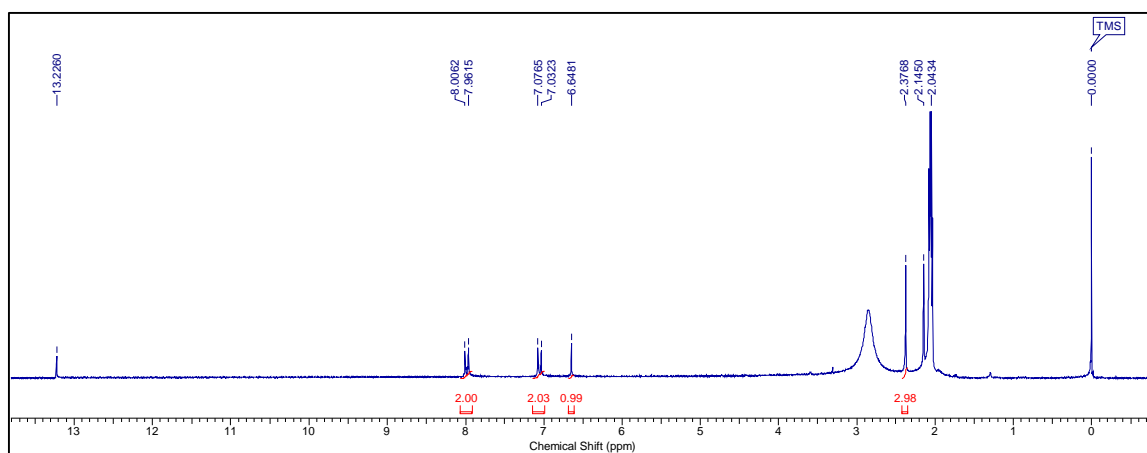


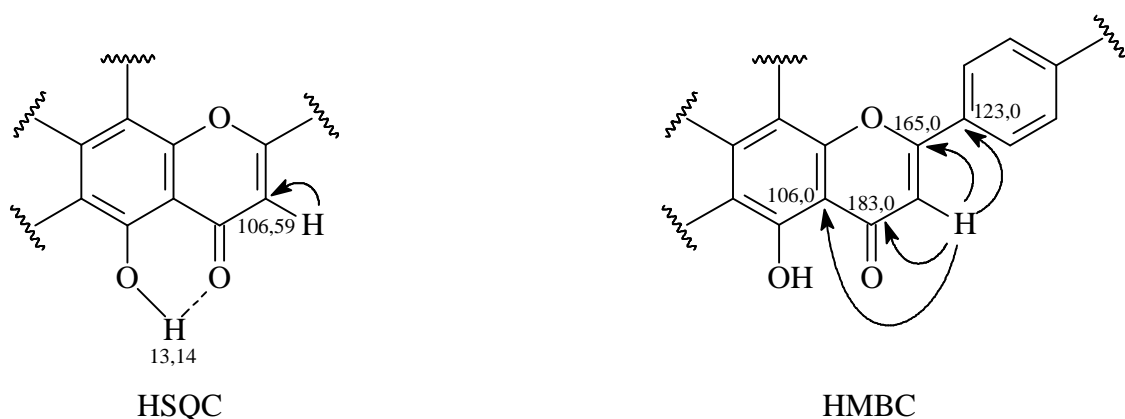
Figura 4.4. Espectro de RMN ^1H da substância **F1** (acetona- d_6 , 200MHz)

4.3. Identificação da substância F2

A substância **F2** foi isolada das frações acetato de etila e diclorometânica. Esta substância foi identificada através da análise de experimentos de RMN em uma e duas dimensões.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 4.5, p. 50) foi observada a presença de dois dubletos na região de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,96 e δ_{H} 7,03, integrados para dois hidrogênios cada, com constante de acoplamento de 8,4Hz. Neste mesmo experimento, observaram-se três singletos em δ_{H} 6,79, δ_{H} 6,68 e δ_{H} 3,98, integrando respectivamente para um, um e três hidrogênios, sendo o último sinal referente aos hidrogênios metílicos ligados a um heteroátomo. Observou-se ainda um singlete em δ_{H} 13,14, característico de flavonóides contendo um grupo hidroxila na posição C-5. Estas observações sugeriram a presença de uma flavona contendo um substituinte na posição C-4' e um anel A tri-substituído.

No mapa de contorno de HSQC (Figura 4.6, p. 51), pôde-se observar que o singlete em δ_{H} 6,68 apresentava correlação com um sinal de carbono em δ_{C} 106,59; o que é característico do hidrogênio H-3 de uma flavona. No experimento de HMBC (Figura 4.7, p. 51), observou-se a correlação deste singlete com os carbonos em δ_{C} 106,0; δ_{C} 123,0; δ_{C} 165,0 e δ_{C} 183,0 atribuídos aos carbonos C-10, C-1', C-2 e C-4, respectivamente.



No mapa de contorno de HMBC a correlação do singlete em δ_{H} 6,79 com o sinal de carbono em δ_{C} 156,5 referente ao carbono C-9 sugeriu a ligação deste hidrogênio ao carbono C-8. Ainda neste experimento, este hidrogênio apresentou correlação com os

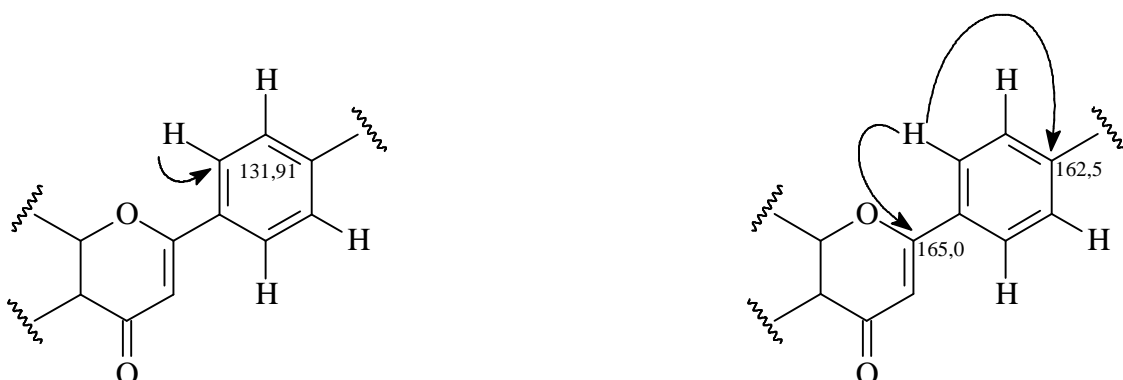
sinais de carbono em δ_C 106,0; δ_C 108,0 δ_C 164,0 e δ_C 183; atribuídos aos carbonos C-10, C-8, C-7 e C-4 respectivamente.



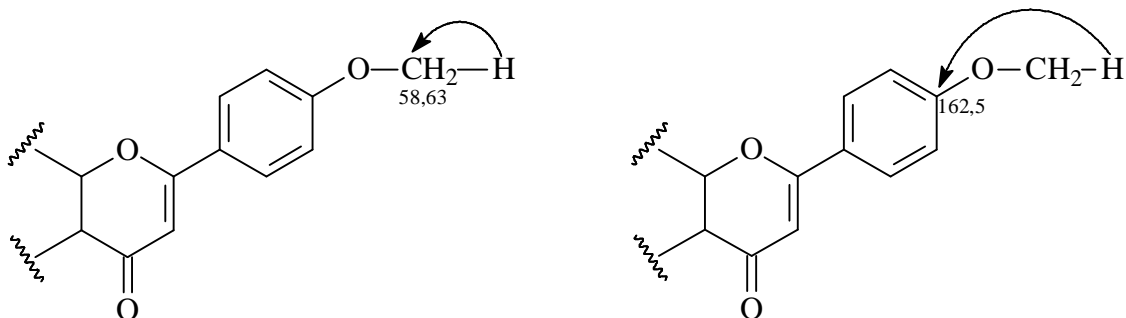
O dupletto em δ_H 7,03 (H-3'/5') mostrou correlação com o sinal de carbono em δ_C 118,9; referente aos carbonos C-3'/5' (HSQC, Figura 4.6, p. 51), enquanto no experimento de HMBC foi observada a correlação destes hidrogênios com os carbonos em δ_C 123,0 e δ_C 162,5; referentes aos carbonos C-1' e C-4'.



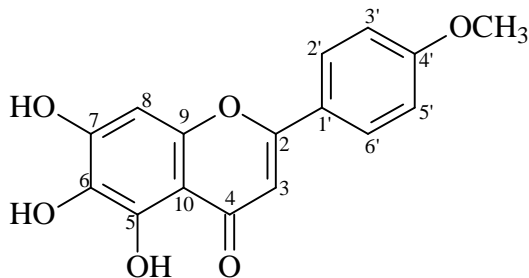
No experimento de HSQC observou-se a correlação do dupletto em δ_H 7,96 (H-2'/6') com o sinal de carbono em δ_C 131,90; referente aos carbonos C-2'/6'. No experimento de HMBC pôde-se observar a correlação destes hidrogênios (H-2'/6') com os sinais de carbono em δ_C 162,5 (C-4') e δ_C 165,0 (C-2).



No mapa de contorno de HSQC (Figura 4.6, p. 51), pôde-se observar que o singlete em δ_H 3,98 correlacionava com um sinal de carbono em δ_C 58,63. No experimento de HMBC o singlete da metoxila em δ_H 3,98 mostrou correlação com um sinal de carbono em δ_C 162,5; atribuído ao carbono C-4'.



Com as informações obtidas nos experimentos de RMN pôde-se concluir que a substância **F2** tratava-se da 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona. A Tabela 4.2 mostra os dados espectroscópicos desta flavona.



5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona

Tabela 4.2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{C} ^{(b)*}
2		165
3	6,68 (s)	106,59
4		184,00
5		ND
5-OH	13,14 (s)	
6		ND
7		164,00
8	6,79 (s)	92,60
9		156,00
10		106,00
1'		123,00
2'/6'	7,96 (d)	131,91
3'/5'	7,03 (d)	118,90
4'		162,50
4'-OCH₃	3,98 (s)	58,63

(a) acetona, 400MHz; (b) acetona, 100MHz

* valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e HMBC; ND: não determinado

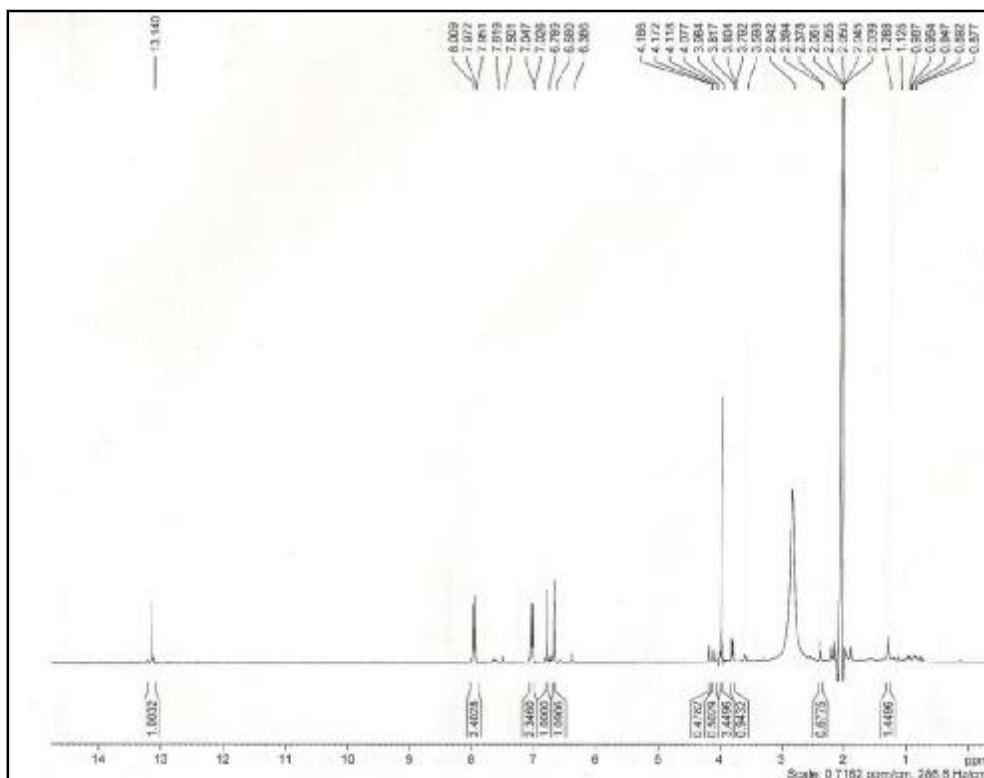


Figura 4.5. Espectro de RMN ^1H da substância **F2** (acetona d_6 , 400MHz)

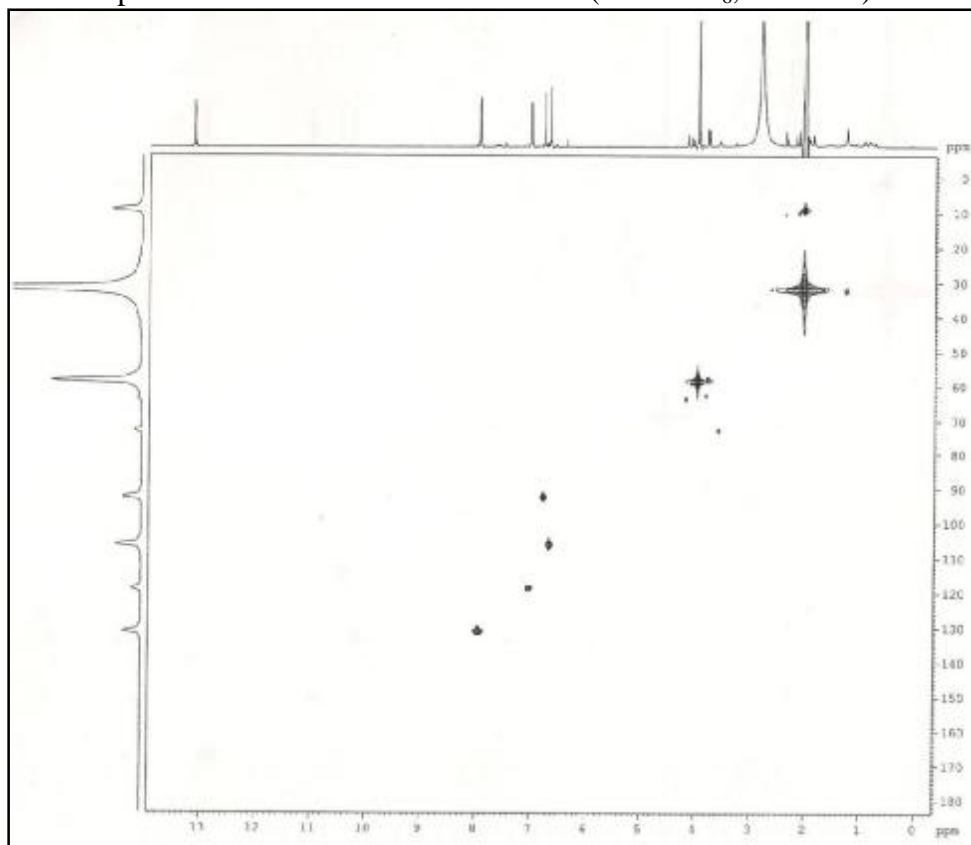


Figura 4.6. Mapa de contorno de HSQC da substância **F2** (acetona d_6 , 400MHz)

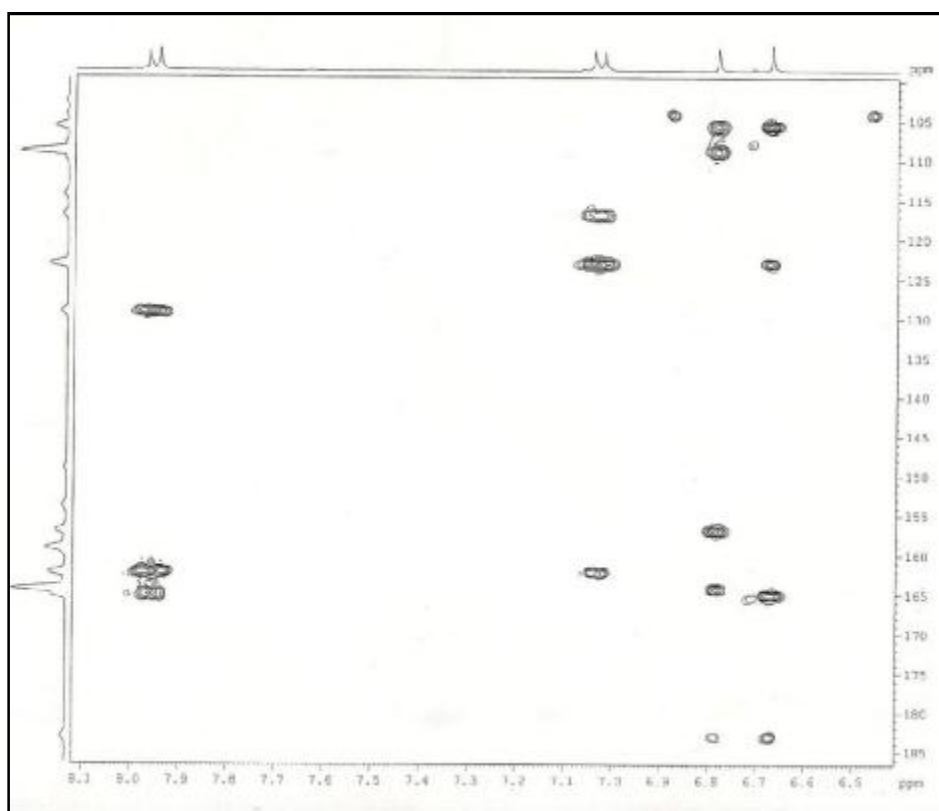


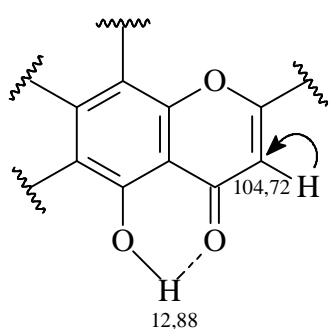
Figura 4.7. Mapa de contorno de HMBC da substância **F2** (acetona d_6 , 400MHz)

4.4. Identificação da substância F3

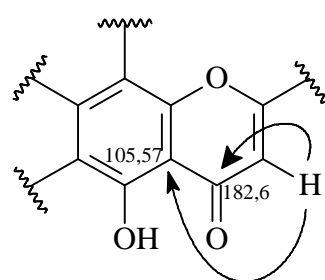
A substância **F3** foi isolada da fração hexânica do extrato etanólico da folhas de *Miconia ferruginata*. O composto foi identificado em mistura através da análise dos espectros de RMN ^1H , HSQC e HMBC.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 4.8, p. 56) foi observada a presença de dois dubletos, em um sistema AA'BB' de acoplamento de spin, na região de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em δ_{H} 7,02 e δ_{H} 7,85; integrados para dois hidrogênios cada, com constante de acoplamento de 8,4Hz. Neste mesmo experimento, foram observados dois singletos em δ_{H} 6,60 e δ_{H} 6,50 integrados para um hidrogênio cada e dois singletos em δ_{H} 3,93 e δ_{H} 3,89 referentes aos hidrogênios metílicos da metoxila aromática. Observou-se ainda um singlete intenso de hidrogênio metílico em δ_{H} 2,12 integrando para três hidrogênios e um singlete em δ_{H} 12,88; característico de flavonóides contendo um grupo hidroxila na posição C-5.

No mapa de contorno de HSQC (Figura 4.9, p. 56), pôde-se observar que o singlete em δ_{H} 6,60 apresentava correlação com um sinal de carbono em δ_{C} 104,72; o que é característico do hidrogênio H-3 de uma flavona. No experimento de HMBC (Figura 4.10, p. 57), observou-se a correlação deste singlete com os carbonos em δ_{C} 105,57 e δ_{C} 182,6 atribuídos aos carbonos C-10 e C-4, respectivamente.



HSQC



HMBC

No experimento de HSQC a correlação do singlete em δ_{H} 6,50 com um sinal de carbono em δ_{C} 89,47 sugeriu a ligação deste hidrogênio ao carbono C-6. No mapa de contorno de HMBC este sinal apresentou correlação com os sinais de carbono em δ_{C}

105,57; δ_C 109,08 e δ_C 156,18; atribuídos aos carbonos C-10, C-8 e C-5 respectivamente.



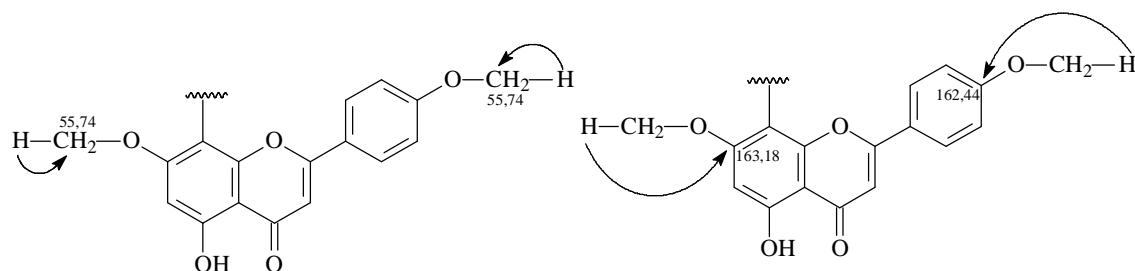
No experimento de HSQC observou-se a correlação do dupletto em δ_H 7,85 (H-2'/6') com o sinal de carbono em δ_C 128,30; referente aos carbonos C-2'/6'. No experimento de HMBC pôde-se observar a correlação destes hidrogênios (H-2'/6') com os sinais de carbono em δ_C 128,03 (C-2'/6') e δ_C 162,44 (C-4').



O dupletto em δ_H 7,02 (H-3'/5') mostrou correlação com o sinal de carbono em δ_C 114,43; referente aos carbonos C-3'/5' (HSQC, Figura 4.9, p. 56), enquanto no experimento de HMBC foi observada a correlação destes hidrogênios com o carbono em δ_C 162,44; referente ao carbono C-4'.



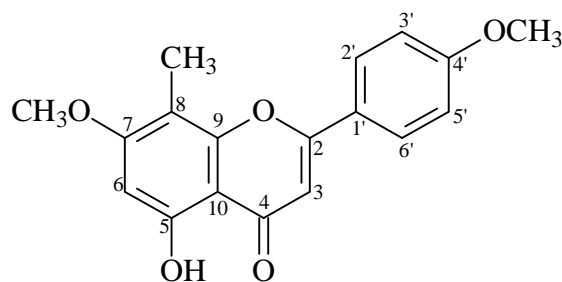
No mapa de contorno de HSQC (Figura 4.9, p. 56), pôde-se observar que os singletos em δ_H 3,93 e δ_H 3,89 correlacionavam com um sinal de carbono em δ_C 55,74, indicando que as metoxilas não estavam *orto* dissubstituídas. No experimento de HMBC o singlete da metoxila em δ_H 3,93 mostrou correlação com um sinal de carbono em δ_C 163,18, atribuído ao carbono C-7, enquanto o singlete da metoxila em δ_H 3,89 apresentou correlação com um sinal de carbono em δ_C 162,44, referente ao carbono C-4'.



No HSQC o sinal do hidrogênio metílico em δ_H 2,12 apresentou correlação com um sinal de carbono em δ_C 6,94, referente ao carbono CH₃-8. No mapa de contorno de HMBC foi possível observar, além das correlações com os carbonos C-8 e C-7, correlação com um sinal de carbono em δ_C 158,47 atribuído ao carbono C-9, confirmando a ligação da metila ao C-8.



Com as informações obtidas nos experimentos de RMN pôde-se concluir que a substância **F3** tratava-se da 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-8-metilflavona. A Tabela 4.3 mostra os dados espectroscópicos desta flavona.



5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-8-metilflavona

A ocorrência natural da 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-8-metilflavona foi proposta pela primeira vez por EL-GHORAB *et al.*, 2003, em um trabalho com as folhas de *Eucalyptus camaldulensis*. Além desta, a única literatura disponível para esta substância é datada de 1966 e descreve um método sintético para seu preparo (JAIN, SARPAL, SESHADRI, 1966 apud EL-GHORAB *et al.*, 2003).

Tabela 4.3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-8-metilflavona

H/C	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	$\delta_{\text{C}}^{(b)*}$
2		ND
3	6,60 (s)	104,72
4		182,6
5		156,18
5-OH	12,88 (s)	
6	6,50 (s)	89,47
7		163,18
8		109,08
9		158,47
10		105,57
1'		ND
2'/6'	7,85 (d)	128,30
3'/5'	7,02 (d)	114,43
4'		162,44
7-OCH₃	3,93 (s)	55,74
4'-OCH₃	3,89 (s)	55,74
8-CH₃	2,12 (s)	6,94

(a) CDCl_3 , 400MHz; (b) CDCl_3 , 100MHz

* valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e HMBC; ND: não determinado

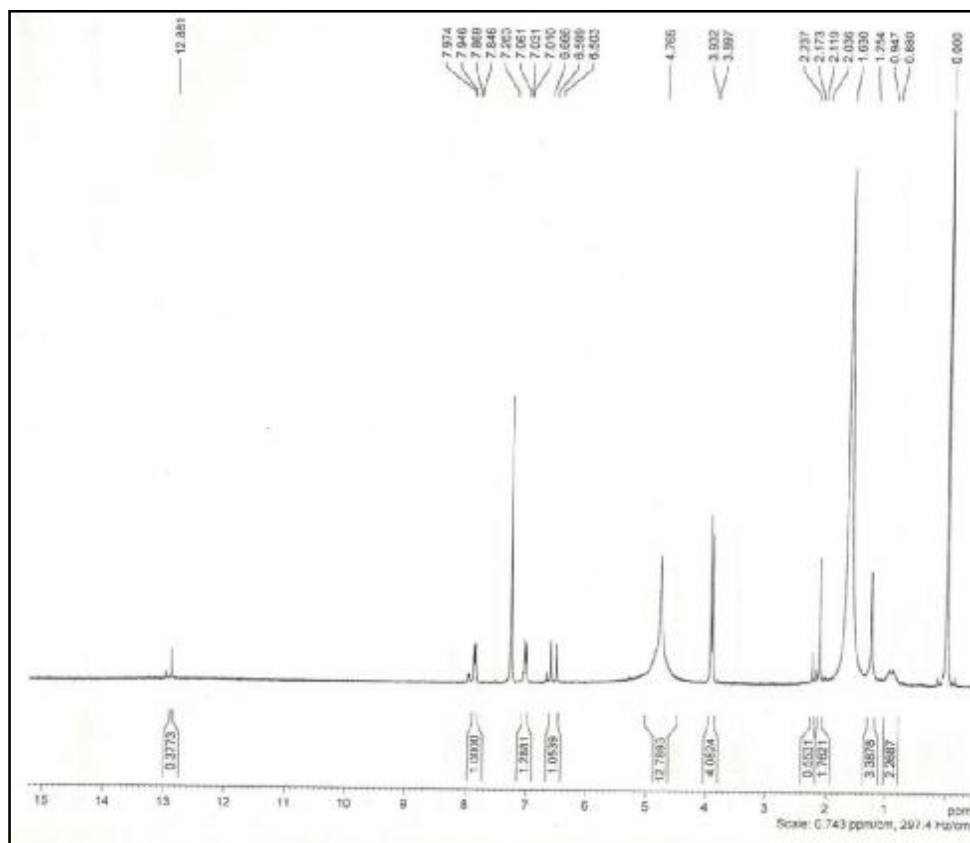


Figura 4.8. Espectro de RMN ^1H da substância **F3** (CDCl_3 , 400 MHz)

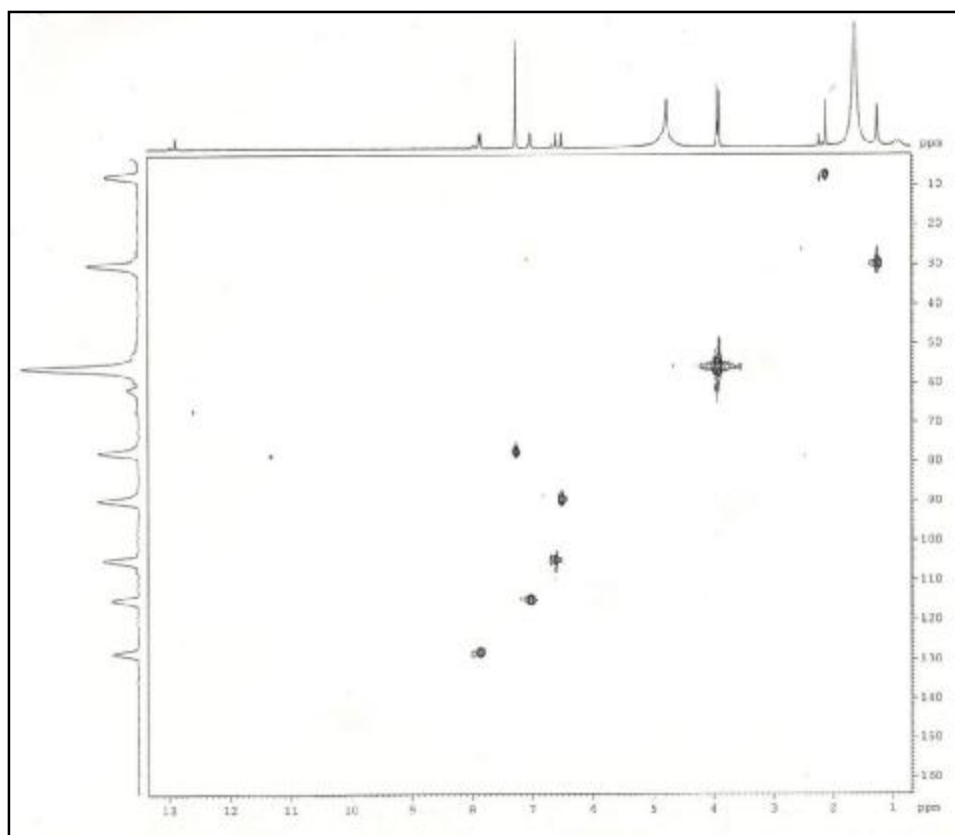


Figura 4.9. Mapa de contorno de HSQC da substância **F3** (CDCl_3 , 400MHz)

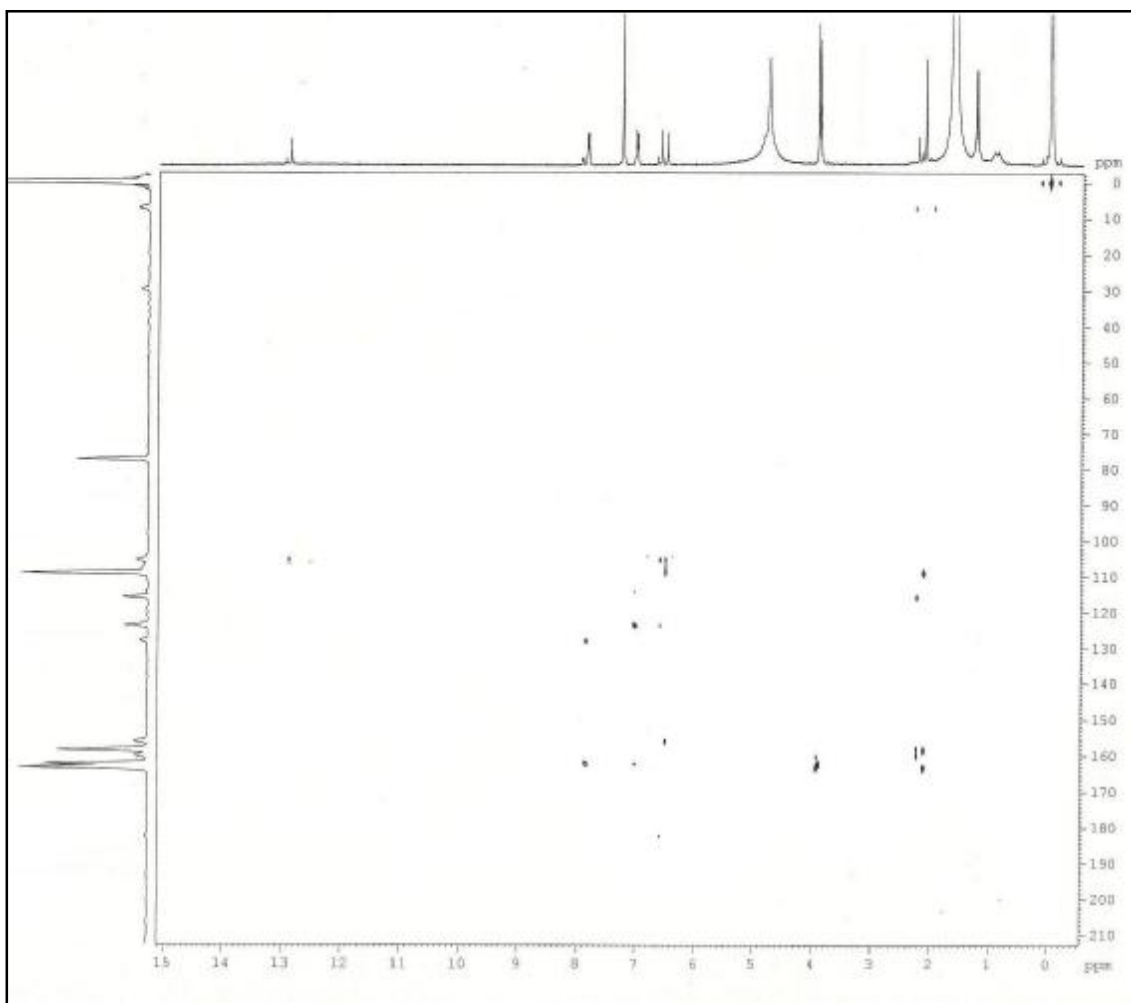


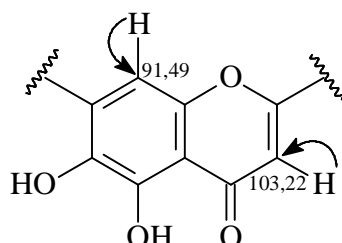
Figura 4.10. Mapa de contorno de HMBC da substância **F3** (CDCl₃, 400MHz)

4.5. Identificação da substância **F4**

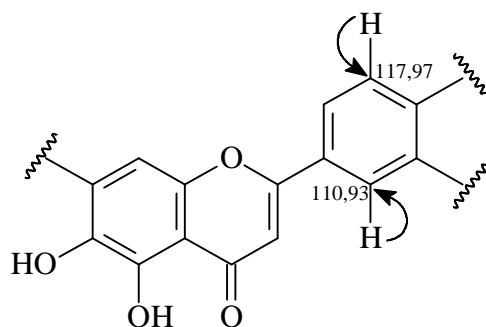
A substância **F4** foi parcialmente identificada através de experimentos de RMN em uma e duas dimensões. No espectro de RMN ¹H (Figura 4.12, p. 59) observou-se um duplo dubleto em δ_H 7,54 (1H, dd, J = 8,4; 2,4Hz), um dubleto em δ_H 7,47 (1H, d, J = 2,8Hz) e outro em δ_H 6,87 (1H, d, J = 8,8Hz). Esta multiplicidade sugeriu que o anel B do flavonóide apresentava dois substituintes *orto* um ao outro. Neste experimento foi observada também a presença de dois singletos referentes a hidrogênios aromáticos em δ_H 6,75 e δ_H 6,64 e dois singletos referentes a hidrogênios metálicos ligados a heteroátomos em δ_H 3,97 e δ_H 3,95. Estes sinais sugeriram a presença de três oxidações no anel A.

No mapa de contorno de HSQC (Figura 4.13, p. 59), pôde-se observar que os singletos em δ_H 3,97 e δ_H 3,95 apresentavam correlação com um sinal de carbono em δ_C

56,97 indicando que as metoxilas não são *orto* dissustituídas. Neste mesmo experimento foi observado que o singlete em δ_H 6,75 correlacionava com um sinal em δ_C 91,49; sugerindo que este sinal fosse referente ao hidrogênio H-8. Foi observada também a correlação do singlete em δ_H 6,64 com um sinal de carbono em δ_C 103,22; referente ao carbono C-3.



Pôde-se observar ainda a correlação do dubleto em δ_H 7,47 com o sinal em δ_C 110,93; atribuído ao C-2'; e do dubleto em δ_H 6,87 com o sinal em δ_C 117,97; referente ao C-5'.



A partir destes dados, dois isômeros foram propostos para a substância **F4** (Figura 4.11, p. 58)

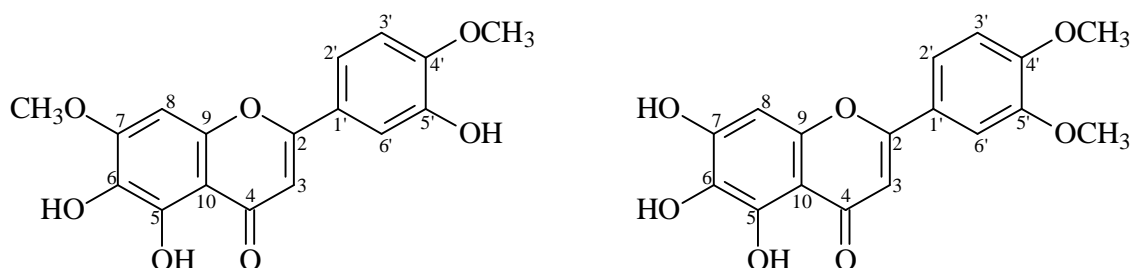


Figura 4.11. Estrutura dos isômeros propostos para a substância **F4**

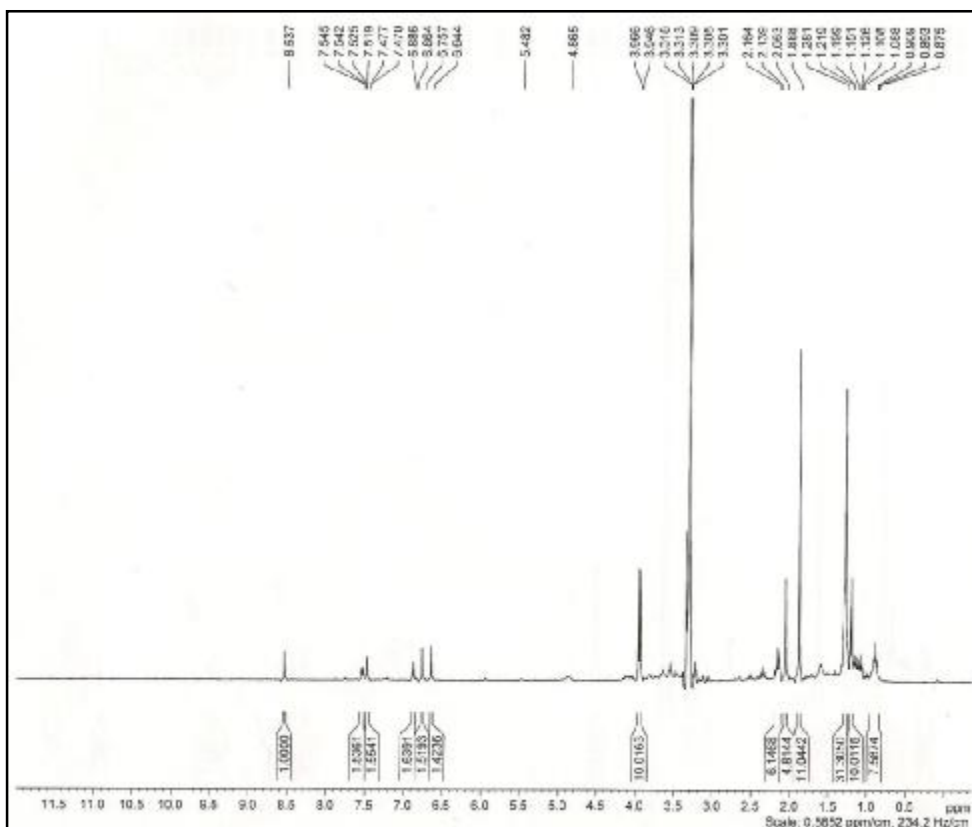


Figura 4.12. Espectro de RMN ^1H da substância **F4** (MeOD, 400MHz)

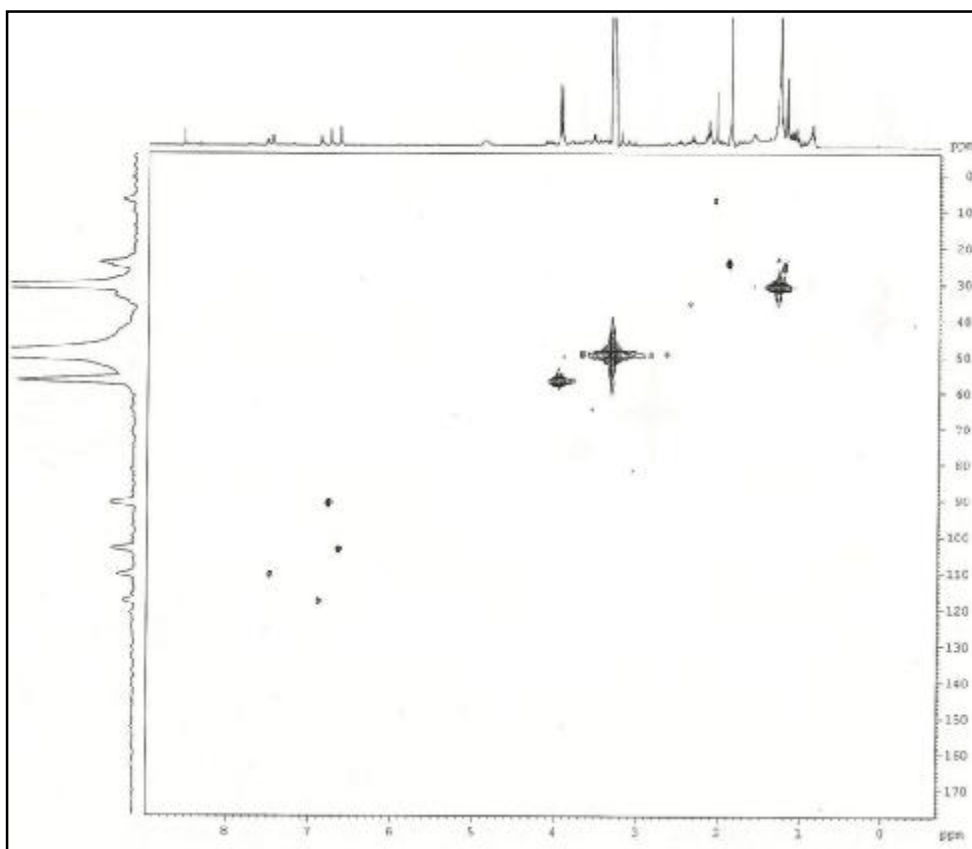


Figura 4.13. Mapa de contorno de HSQC da substância **F4** (MeOD, 400MHz)

4.6. Identificação das substâncias T1 e T2 em mistura

Do extrato etanólico, partição hexânica, de folhas de *M. ferruginata*, após várias etapas cromatográficas em sílica, foi obtida a fração HA 8.3, a qual se mostrou como um pó branco e amorfo e uma única mancha roxa na CCDA, usando-se CH₂Cl₂:Acetona 95:5.

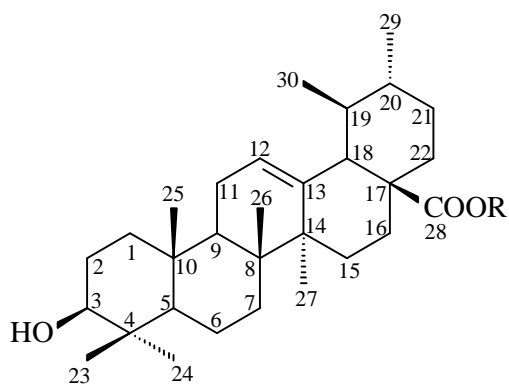
Esta amostra apresentou sinais característicos de triterpenos no espectro de ¹H (Figura 4.17, p. 63), sendo submetida à reação de metilação com diazometano, a fim de ser analisada por CG-MS.

O espectro de RMN ¹H da amostra metilada (Figura 4.14, p. 61) mostrou sinais centrados em δ_H 5,22 e δ_H 5,21, referentes aos H-12 olefínicos característicos dos esqueletos ursânicos e oleanânicos, sugerindo que a amostra tratava-se de uma mistura destes triterpenos. Os sinais referentes ao H-3 carbinólicos apareceram centrados em δ_H 3,20 e δ_H 3,16 (m), e os sinais referentes aos H metílicos entre δ_H 1,10-0,69. Foi observada ainda a presença de dois singletos em δ_H 3,59 e δ_H 3,57; relativos aos hidrogênios metoxílicos.

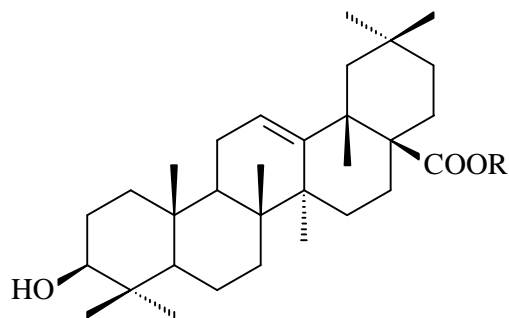
O mapa de contorno de HSQC (Figura 4.15, p. 62) mostrou a correlação do hidrogênio em δ_H 5,22 com o sinal de carbono em δ_C 122,59; referente ao carbono vinílico C-12 do esqueleto oleanânico. O sinal em δ_H 5,21 correlacionou com o carbono em δ_C 125,80; característico do C-12 do esqueleto ursânico.

A presença do carbono carbinólico foi observada com deslocamento químico em δ_C 79,28 característico da configuração β em torno do C-3 (JUNGES et al., 2000), e a presença de carbonila típica de éster metílico C-28, em δ_C 178,03.

A partir desses dados e pelos sinais de carbono projetados no HMBC (Figura 4.16, p. 62) pôde-se concluir que a substância **T1** era o ácido ursólico em mistura com a substância **T2**, ácido oleanólico, presente em menor quantidade. A reação de metilação da amostra levou à formação dos ésteres ursolato e oleanolato de metila, **T1'** e **T2'**, respectivamente.



R=H, ácido ursólico (**T1**)
 R=CH₃, ursolato de metila (**T1'**)



R=H, ácido oleanólico (**T2**)
 R=CH₃, oleanolato de metila (**T2'**)

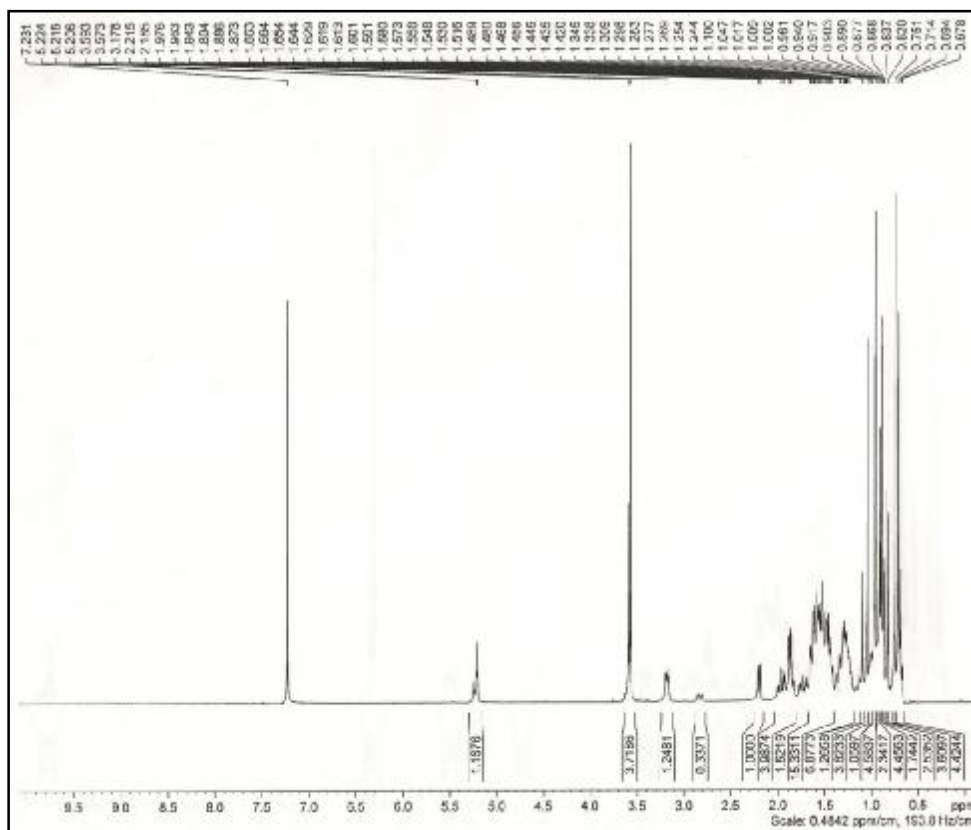


Figura 4.14. Espectro de RMN ¹H da mistura de **T1'** e **T2'** (CDCl₃, 400MHz)

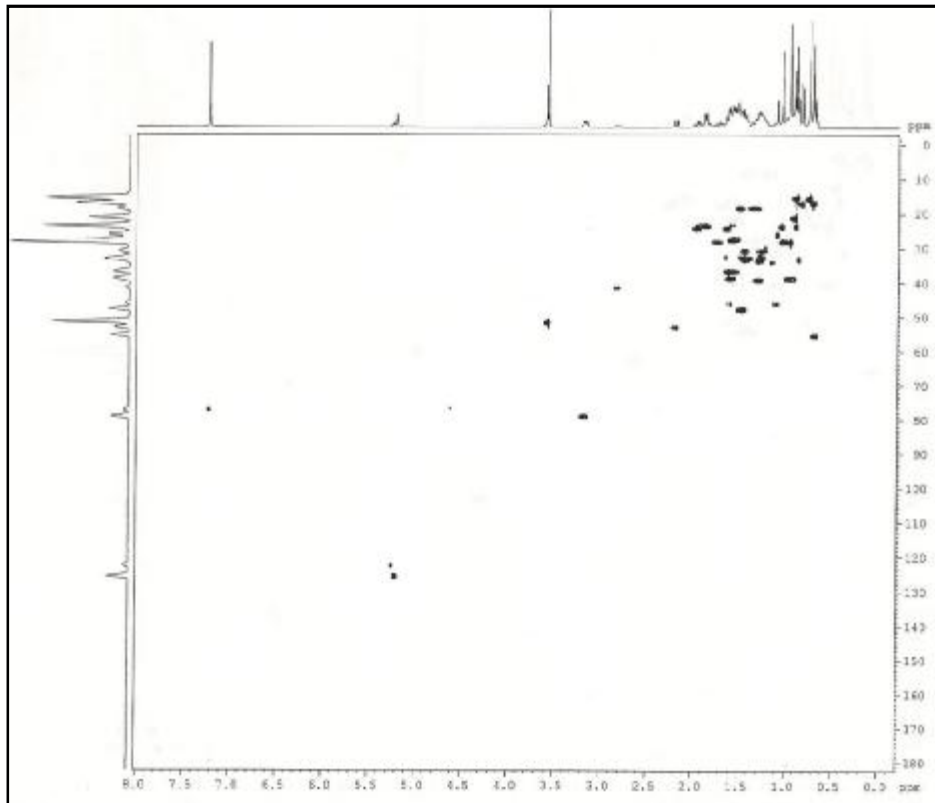


Figura 4.15. Mapa de contorno de HSQC da mistura de **T1'** e **T2'** (CDCl_3 , 400MHz)

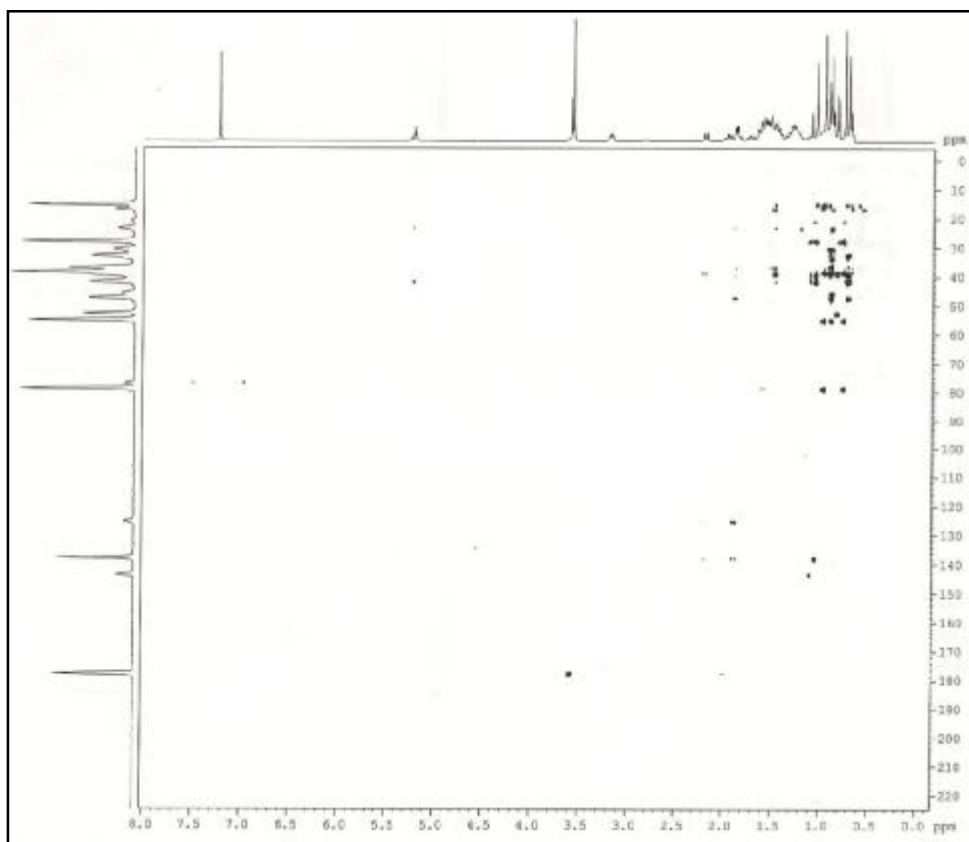


Figura 4.16. Mapa de contorno de HMBC da mistura de **T1'** e **T2'** (CDCl_3 , 400MHz)

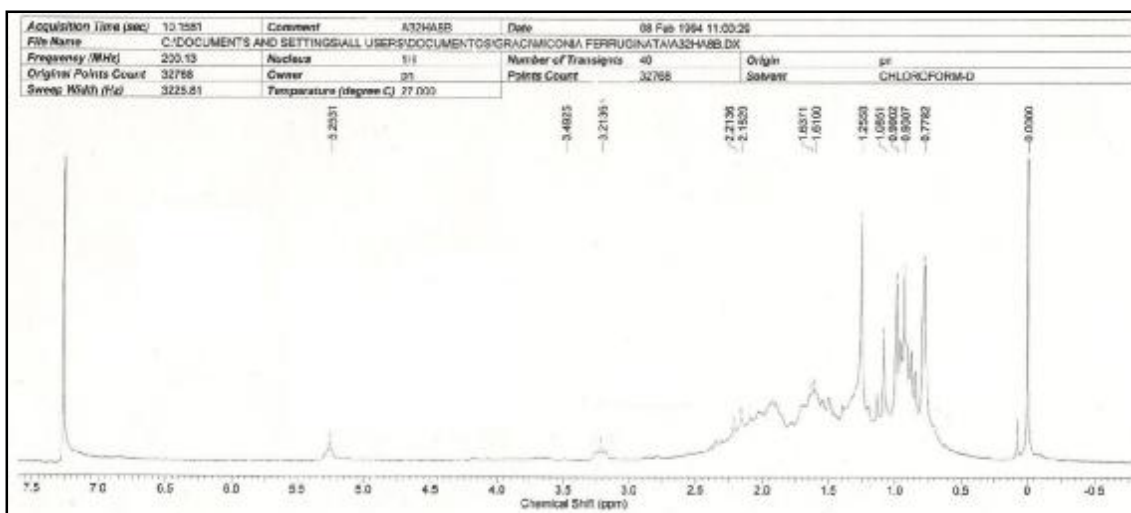
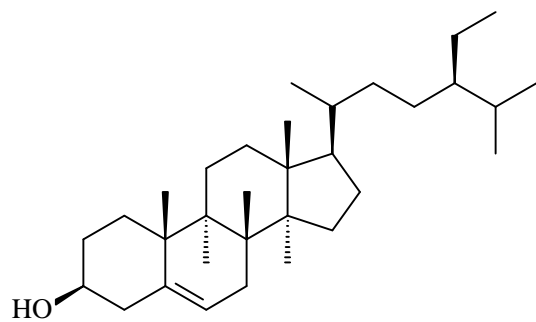


Figura 4.17. Espectro de RMN ¹H da mistura de **T1** e **T2** (CDCl₃, 200MHz)

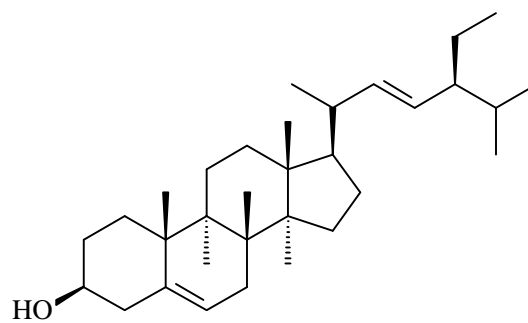
4.7. Identificação das substâncias **E1** e **E2** em mistura

As substâncias **E1** e **E2** foram obtidas da fração acetato de etila (MFFE-AD), conforme descrito no item 3.5.2 (p. 30). A identificação destes esteróides foi realizada através de dados de RMN ¹H e CG-EM.

No espectro de RMN ¹H (Figura 4.18, p. 64) observou-se a presença de um dubleto largo em δ_H 5,34 (H-6), de sinais de hidrogênios vinílicos em δ_H 5,14 (dd, $J = 8,9$ e 15 Hz), δ_H 5,07 (dd, $J = 8,9$ e 15 Hz) atribuídos aos hidrogênios H-22 e H-23 da cadeia lateral do estigmasterol; um multipletto em δ_H 3,55 característico dos hidrogênios H-3 dos esteróides sitosterol e estigmasterol. Pôde-se verificar ainda a presença de um grande número de sinais referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos na região entre δ_H 0,68 – 2,41 característicos do esqueleto esteroidal. Para a confirmação dos compostos presentes na mistura foi realizada análise por CG-MS. As estruturas destas substâncias foram confirmadas através dos picos referentes aos íons moleculares com m/z 414 e 412 (Figura 4.19, p. 65), os quais apresentam as massas moleculares esperadas C₂₉H₅₀O e C₂₉H₄₈O para sitosterol (**E1**) e estigmasterol (**E2**), respectivamente. A Figura 4.20 (p. 66) traz uma proposta de fragmentação do sitosterol.



β -sitosterol



Estigmasterol

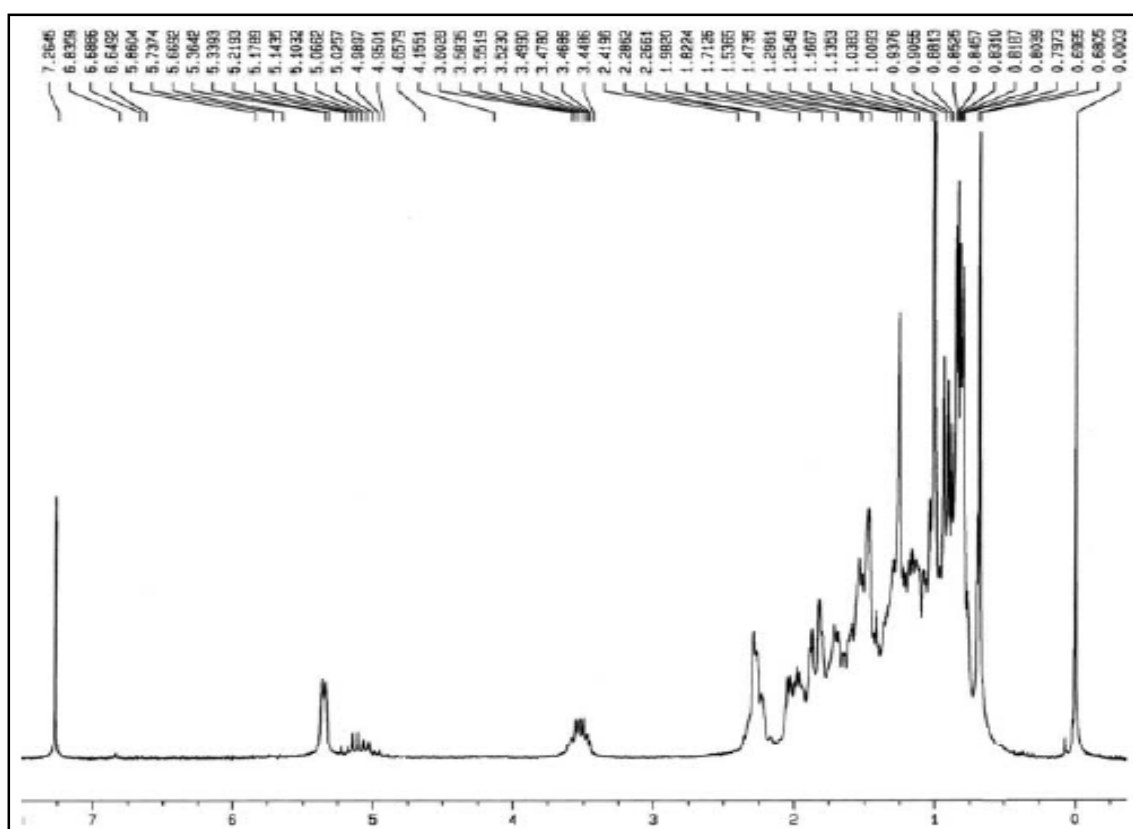


Figura 4.18. Espectro de RMN ^1H da mistura **E1** e **E2** (CDCl_3 , 400MHz)

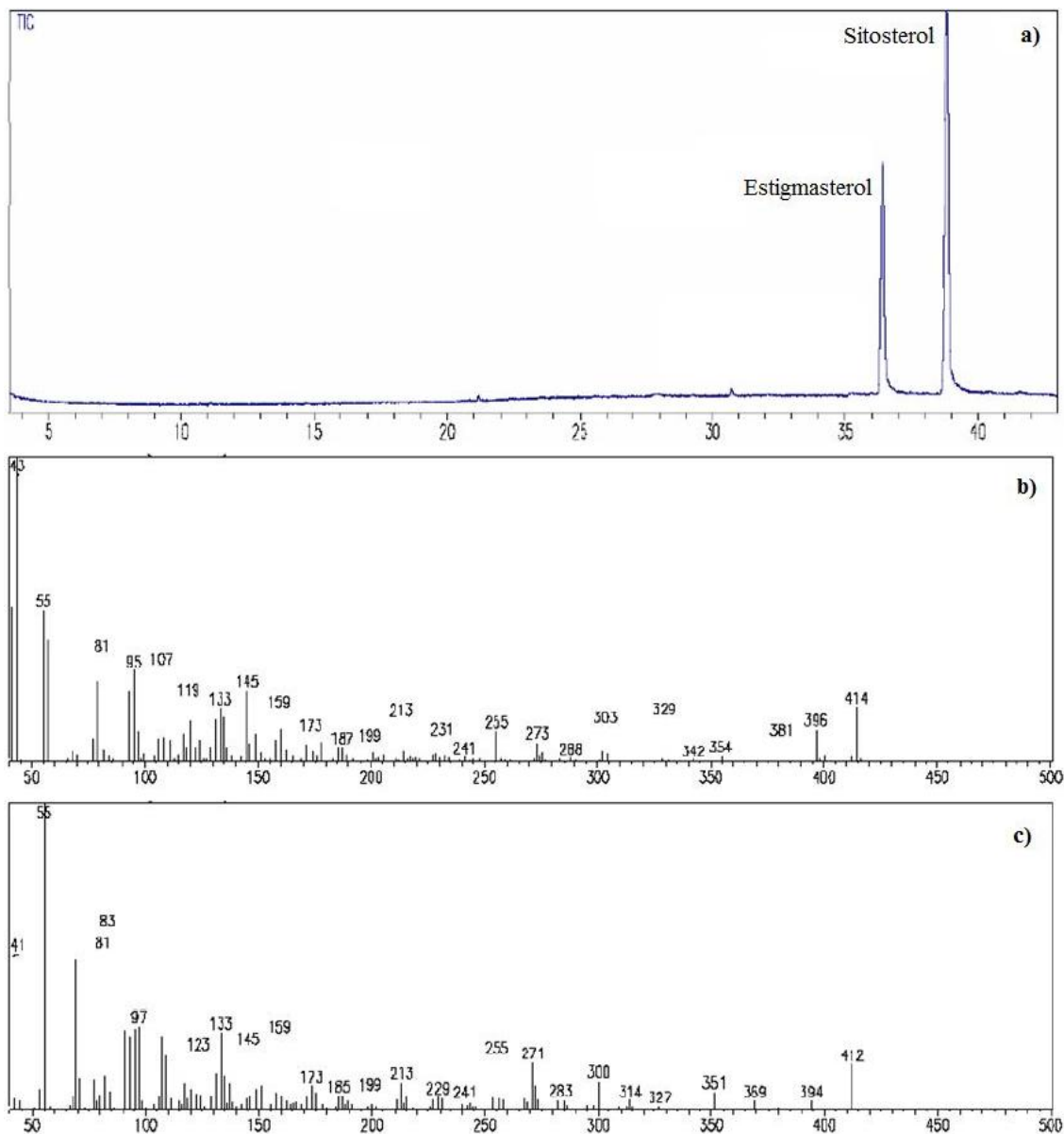


Figura 4.19. Cromatograma da mistura de esteróides (a) e espectro de massas do sitosterol (b) e do estigmasterol (c)

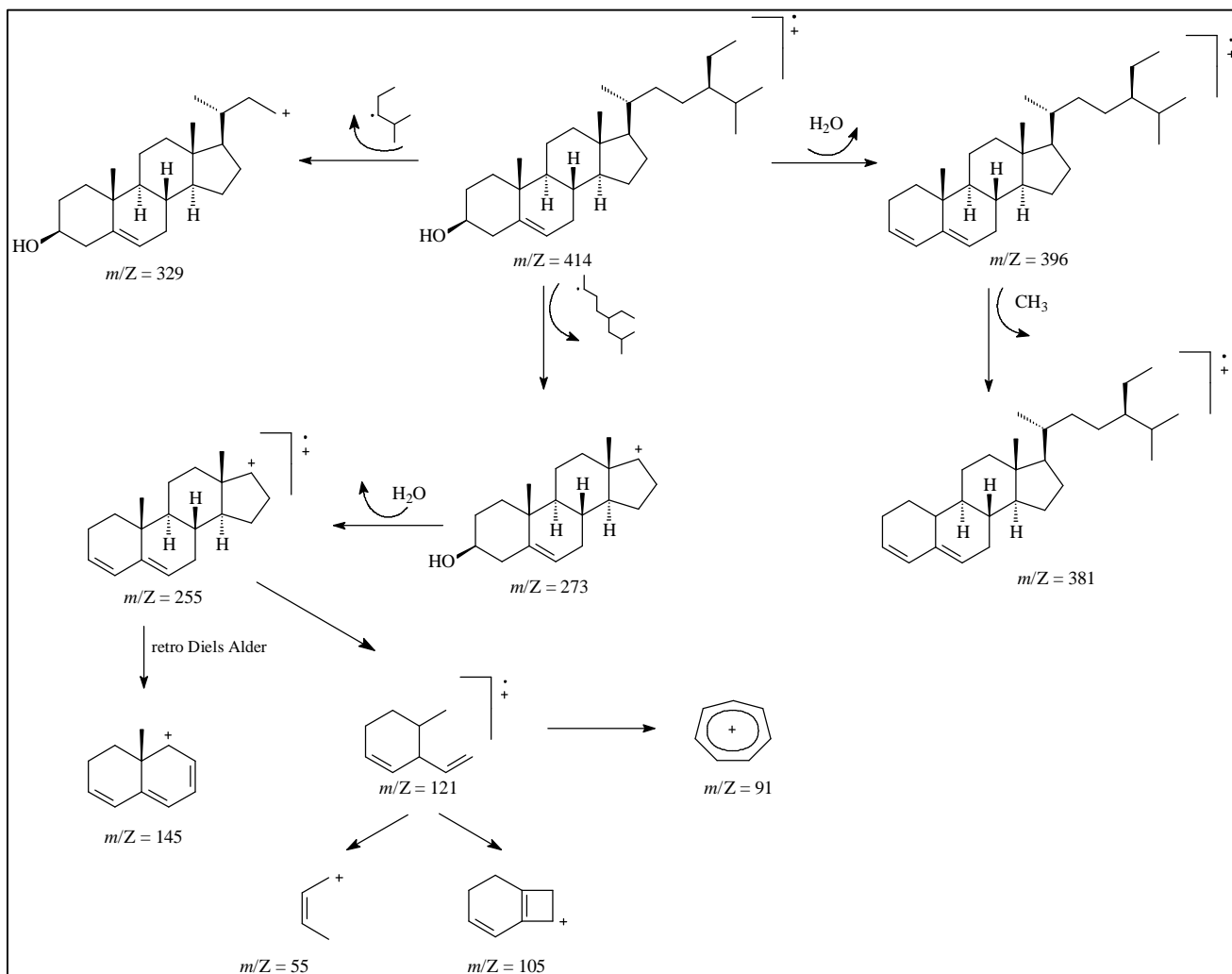


Figura 4.20. Proposta de fragmentação do sitosterol
 Fonte: SIMOTE, 2006.

4.8. Atividades Biológicas

4.8.1. Ensaio de Inibição Enzimática

O extrato bruto etanólico, bem como as frações e substâncias obtidas deste extrato, foram submetidos a ensaios de inibição enzimática das catepsinas B e K. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Inibição das catepsinas B e K pelo extrato e frações de *M. ferruginata*
% de inibição a 20 mg/mL

Amostra	Cat B	Cat K
MFFE	87,60 (+/- 0,70)	78,44 (+/- 0,20)
MFFE-H	82,68 (+/- 0,76)	38,05 (+/- 4,27)
MFFE-D	97,40 (+/- 0,09)	83,67 (+/- 0,61)
MFFE-A	96,06 (+/- 0,14)	83,55 (+/- 0,93)

Das amostras testadas, todas inibiram mais de 75% das enzimas, exceto a fração hexânica, que apresentou 38,05% (+/- 4,27) de inibição da catepsina K.

Da fração hexânica foi isolada a mistura dos triterpenos ácido ursólico (**T1**) e ácido oleanólico (**T2**), conforme descrito no item 3.5.1 (p. 28). Na concentração de 125 μ M essa mistura apresentou 79,39% (+/- 0,19) de inibição frente à catepsina B, $IC_{50} = 13,02 \mu$ M (+/- 0,33) (Figura 4.21) e 10,79% (+/- 4,92) de inibição frente à catepsina K.

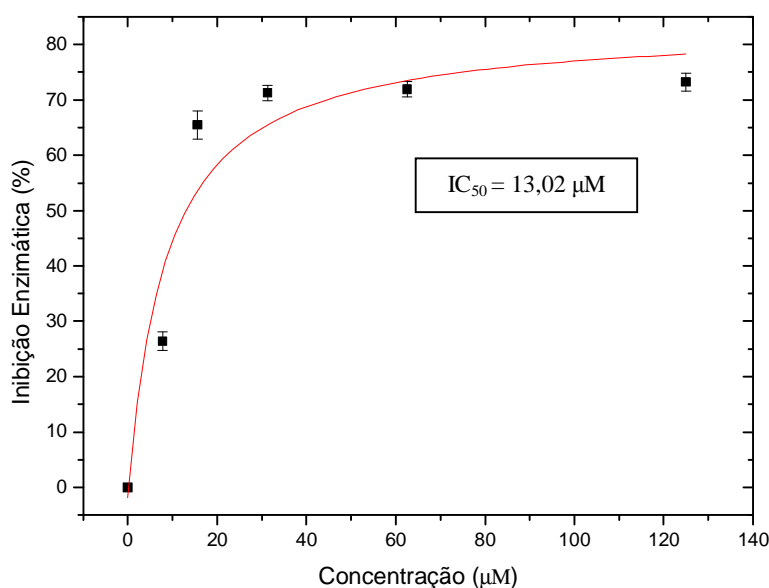


Figura 4.21. IC_{50} da mistura dos ácidos ursólico e oleanólico sobre a catepsina B

A mistura dos ácidos ursólico e oleanólico foi submetida à reação de metilação com diazometano, como descrito no item 3.1 (p. 25), com o objetivo de se verificar a modificação das atividades avaliadas. Desta reação foram obtidos os ésteres oleanolato (**T1'**) e ursolato (**T2'**) de metila (p. 61), os quais foram testados frente às catepsinas.

A diminuição da polaridade das moléculas induzida pela mudança do grupo ácido pelo grupamento éster levou à diminuição da porcentagem de inibição frente à catepsina B para 39,37% (+/- 0,60) na concentração 125 µM. Frente à catepsina K o comportamento foi o oposto. A mudança realizada na molécula levou ao aumento de inibição de 10,79% para 75,09% (+/- 1,47), $IC_{50} = 1,42 \mu\text{M}$ (+/- 0,04) (Figura 4.22).

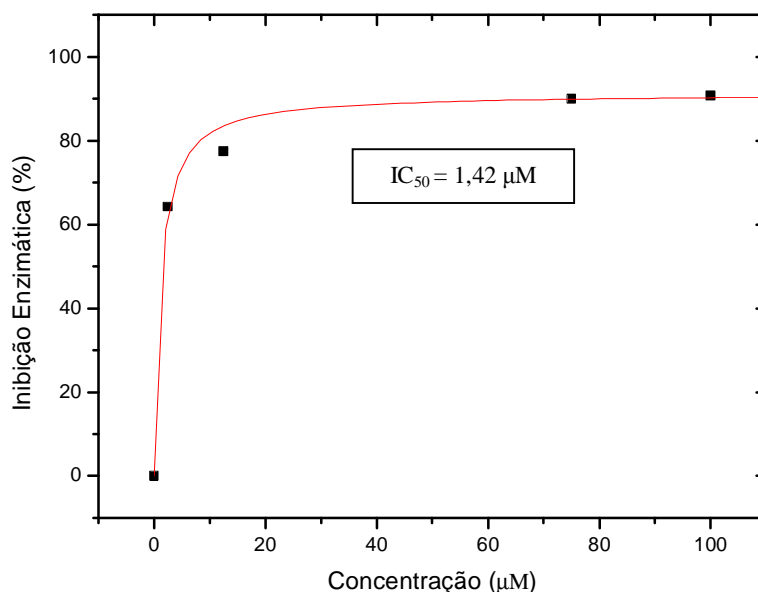


Figura 4.22. IC_{50} da mistura de ursolato e oleanolato de metila sobre a catepsina K

Na Tabela 4.5 se apresentam os resultados obtidos para ambas as misturas, **T1 + T2** e **T1' + T2'**.

Tabela 4.5. Inibição das catepsinas B e K pelas misturas **T1, T2** e **T1', T2'**

Amostra	% de inibição a 125 µM		IC_{50} (µM)
	Cat B	Cat K	
T1 + T2	79,39% (+/- 0,19)	10,79% (+/- 4,92)	13,02 (+/- 0,33)*
T1' + T2'	39,37 (+/- 0,60)	75,09% (+/- 1,47)	1,42 (+/- 0,04)**

Cat: Catepsinas.

* IC_{50} Cat B; ** IC_{50} Cat K

Os triterpenos apresentam uma variedade de propriedades medicinais, desde antiinflamatórios, antibacterianos, fungicidas, antivirais, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais. Devido à grande diversidade estrutural apresentada por esta classe, seu

estudo tem despertado grande interesse na tentativa de novas e reais aplicabilidades (POTOCKA, 2003).

SEVERINO (2008) realizou a busca por produtos naturais como inibidores específicos de enzimas, dentre elas, a catepsina K, evidenciando as diferenças de atividade ocasionadas pela posição das metilas dos carbonos 19 e 20. Quando ambas as metilas estão posicionadas no carbono 20 (ácido oleanólico), o composto apresentou 28% de inibição, e quando posicionadas nos carbonos 19 e 20 (ácido ursólico), não possuiu atividade.

A Tabela 4.6 (p. 69) mostra a porcentagem de inibição de alguns triterpenos (Figura 4.23, p. 69) testados por SEVERINO (2008) frente às catepsinas K, V, L e S, na concentração de 25 μ M.

Estudos com *Artocarpus altilis* (Moraceae) mostram flavonas preniladas como potenciais inibidores da catepsina K (PATIL *et al.*, 2002b). De *Taxodium mucronatum* (Taxodiaceae) e de *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae) foram isoladas biflavonas com expressiva ação inibitória frente às catepsinas B e K (ZENG *et al.*, 2006). As demais amostras não foram testadas devido a pouca quantidade de massa.

Das frações diclorometânica e acetato de etila foram isoladas as flavonas 5,7,4'-trihidroxi-6,8-dimetilflavona (**F1**, p. 33 e p. 35) e 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona (**F2**, p. 32 e p. 34). Estas flavonas não apresentaram inibição considerável. A substância **F1** inibiu 53,08% (+/- 0,56) da catepsina B e 30,93% (+/- 2,41) da catepsina K, enquanto a substância **F2** apresentou 17,94% (+/- 2,77) de inibição da catepsina K e 55,59% (+/- 5,20) de inibição da catepsina B.

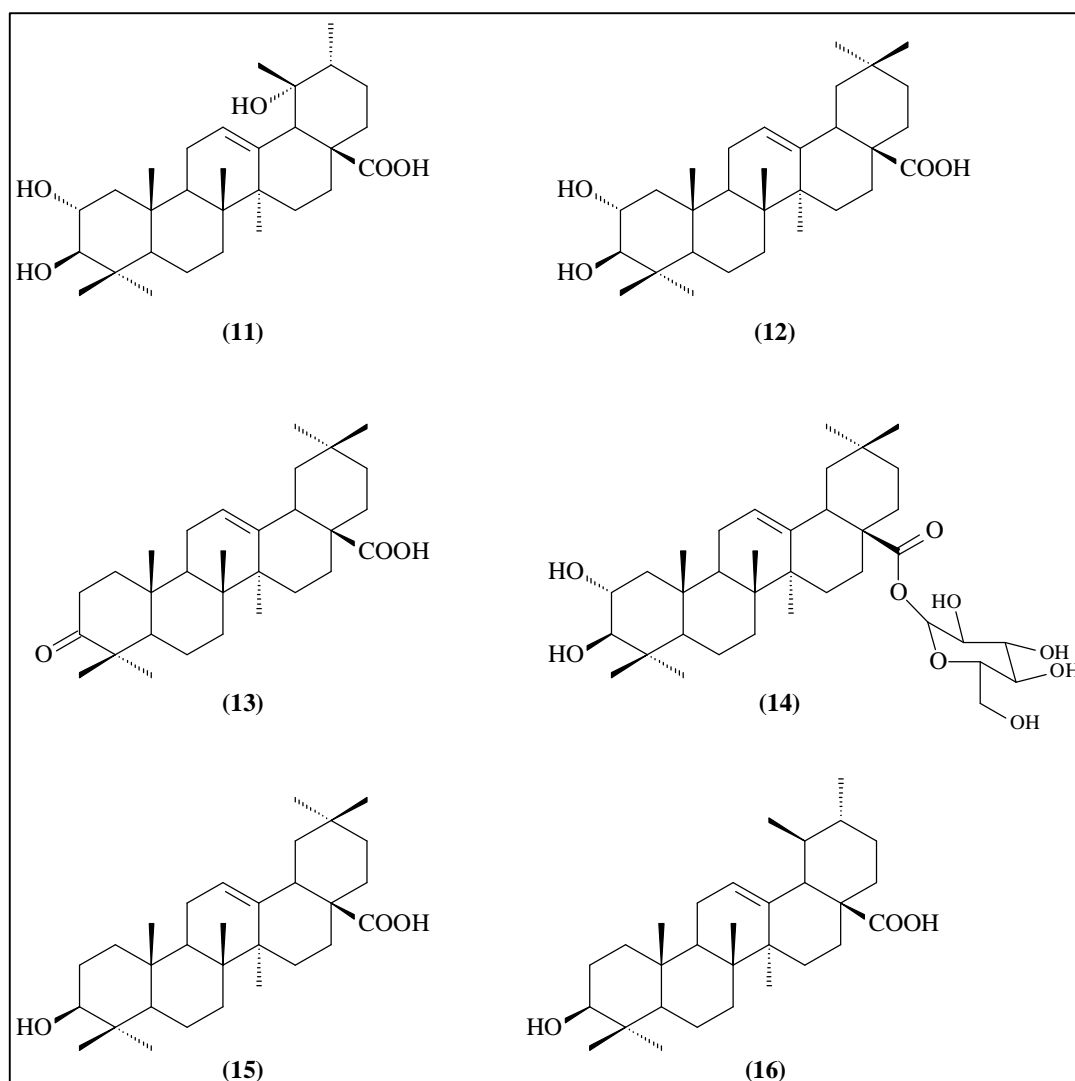


Figura 4.23. Triterpenos testados nas catepsinas K, V, L e S

Tabela 4.6. Porcentagem de inibição de alguns triterpenos

Amostra	% de inibição (25 μ M)			
	Cat K	Cat V	Cat L	Cat S
11	0	34	0	6
12	0	0	0	0
13	0	16	0	7
14	0	18	0	0
15	28	70	46	0
16	9	89	36	6

Fonte: SEVERINO, R.P; 2008.

4.8.2. Ensaios de Citotoxicidade *in vitro*

Os triterpenos metilados, ursolato e oleanolato de metila (**T1'** e **T2'**), foram testados em concentração única de 5 µg/mL nas linhagens MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon) e SF-295 (SNC). As atividades citotóxicas da amostra estão apresentadas na Tabela 4.7, com seus respectivos desvios-padrão.

Tabela 4.7. Porcentagem de inibição dos triterpenos metilados (**T1'** e **T2'**)

Amostra	Linhagem celular		
	MDA-MB-435	HCT-8	SF-295
T1' e T2'	98,10 (+/- 2,88)	98,57% (+/- 0,24)	69,89% (+/- 9,93)

São considerados relevantes valores de potencial de inibição do crescimento tumoral maiores que 90%.

A citotoxicidade da mistura de triterpenos na forma ácida foi calculada a fim de verificar se a modificação estrutural no carbono C-28 levaria à variação na inibição do crescimento das células tumorais. A flavona **F2** também teve sua citotoxicidade testada. Foi observado que a forma ácida dos triterpenos levou à diminuição da atividade citotóxica frente às três linhagens, conforme apresentado na Tabela 4.8. As demais substâncias não foram testadas devido a pouca quantidade de massa.

Tabela 4.8. Porcentagem de inibição dos triterpenos ácidos (**T1** e **T2**)

Amostra	Linhagem celular		
	MDA-MB-435	HCT-8	SF-295
T1 e T2	15,08% (+/- 6,66)	40,59% (+/- 0,49)	32,98% (+/- 8,82)
F2	15,65% (+/- 4,99)	35,73% (+/- 2,50)	26,39% (+/- 2,06)

4.8.3. Ensaios Antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos, realizados através do método de susceptibilidade para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), descritos no item 3.6.3 (p. 37), foram aplicados à flavona **F2**, à mistura dos ácidos ursólico e oleanólico (**T1** e **T2**) e à mistura de ursolato e oleanolato de metila (**T1'** e **T2'**), com o objetivo de verificar

possíveis modificações nos resultados provocadas pela mudança do grupamento ácido pelo grupamento éster. As demais substâncias não foram submetidas ao ensaio por não apresentarem massa suficiente.

Os valores de concentração mínima inibitória foram determinados pela leitura visual após revelação com resazurina, um indicador de óxido-redução que tem sido utilizado para avaliar a viabilidade de células microbianas (MONTEJANO, GERVALDO, BERTOLOTTI, 2005). A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) de cor azul é oxidada na presença de células viáveis a resofurina, substância de coloração vermelha (PALOMINO *et al.*, 2002).

As substâncias testadas foram acompanhadas do controle do solvente (controle negativo) e controle dos antibióticos padrões (controle positivo), controle de precipitação e controle de proliferação, evitando possibilidade de resultados falso-negativo ou falso positivo. A Tabela 4.9 mostra os resultados da atividade antimicrobiana da mistura dos triterpenos na forma ácida frente aos microrganismos testados.

Tabela 4.9. Concentração mínima inibitória dos triterpenos **T1** e **T2** e dos antibióticos de referência frente aos microrganismos

Amostra	Microrganismos	Antibióticos de referência	CMI (mg/mL)	
			Antibiótico	Amostra
	<i>B. subtilis</i>	Vancomicina	0,0469	500
	<i>E. coli</i>	Tetraciclina	3,125	500
T1 e T2	<i>S. aureus</i>	Tetraciclina	0,75	250
	<i>P. aeruginosa</i>	Tetraciclina	1,5625	500
	<i>C. albicans</i>	Nistatina	6,25	NH

NH: não houve inibição

A mistura dos ácidos ursólico e oleanólico (**T1** e **T2**) apresentou ação bacteriostática frente ao *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A concentração inibitória mínima para *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foi igual a 500 µg/mL e para *S. aureus* igual a 250 µg/mL. No caso da *Candida albicans* a mistura **T1** e **T2** não foi ativa. Os triterpenos metilados e a flavona **F2**, testados na concentração inicial de 500 µg/mL foram inativos contra os microrganismos citados na Tabela 4.9.

5. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico de *Miconia ferruginata* levou ao isolamento e identificação de 2 esteróides, 2 triterpenos, 3 flavonóides e à proposta de 2 isômeros para um quarto flavonóide. Dois dos flavonóides são do tipo C-metilados, de rara ocorrência na natureza. Pelo que se sabe até o presente momento, todos os flavonóides estão sendo relatados pela primeira vez na família Melastomataceae.

Das substâncias testadas quanto ao potencial biológico, a mistura isomérica dos ácidos ursólico e oleanólico e a mistura de seus derivados semi-sintéticos, ursolato e oleanolato de metila, se mostraram os mais promissores. No ensaio de inibição enzimática da catepsina B e no ensaio antimicrobiano, os triterpenos na forma ácida se mostraram mais ativos do que na forma metilada. A mistura dos ácidos ursólico e oleanólico apresentou $IC_{50} = 13,02 \mu M$ sobre a catepsina B. Frente à catepsina K foi observado comportamento inverso; a forma ácida não apresentou inibição enzimática considerável, enquanto a forma metilada apresentou $IC_{50} = 1,42 \mu M$. No ensaio de citotoxicidade os triterpenos na forma metilada apresentaram inibição superior a 90% nas linhagens tumorais do melanoma (MDA-MB-435) e câncer de cólon (HCT-8). Na forma ácida as porcentagens de inibição não foram consideráveis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGEH, J.E.; HUANG, X.; SATTLER, I.; SWAN, G.E.; DAHSE, H.; HAER ELOFF, J.N. *J. Ethnopharmacol.* **110**: 56, 2007.
- ANTOUN, M.K.; GERENA, L.; MILHOUS, W.K. "Screening of the flora os Porto Rico for potential antimalarial bioactives". *Intern. J. Pharmacog.*, **4**: 255-258, 1993.
- AKIHISA, T.; NAKAMURA, Y.; TAGATA, M.; TOKUDA, H.; YASUKAWA, K.; UCHIYAMA, E.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. *Chem. Biodivers.* **4**: 224, 2007.
- BARREIRO, E.J. e FRAGA, C.A.M. "Química Medicinal-as bases moleculares da ação dos fármacos". ARTMED Editora, 2001.
- BARROS, M.T.P., NASSER, E.F., CÂNDIDO, T.F., FERREIRA, W.A., PAULA, A.C.C.F.F. "Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas de *Miconia ligustroides* e *Miconia chamissois* (Melastomataceae)". In: *I Simpósio de Pesquisa e V SEMIC – Seminário de Iniciação Científica da UNIFENAS*, 2006.
- BILENKER, J.H.; FLAHERTY, K.T.; ROSEN M.; DAVIS L.; GALLAGHER M.; STEVENSON, J.P. et al. "Phase I trial of combretastatin A-4 phosphate with carboplatin". *Clin Cancer Res*, **11**: 1527-1533, 2005.
- BOHM, B.A. "*Introduction to Flavonoids*". Harwood Academic Publishers, 1998.
- BROMME, D. e KALETA, J. "Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design". *Current Pharmaceutical Design*, **8**: 99-110, 2002.
- CALDERÓN, A.I.; TERREAUX, C.; GUPTA, M.P.; HOSTETTMANN, K. *Fitoterapia*, **74**: 378–383, 2003.
- CATALDO, A.M. e NIXON, R.A. "Enzymatically activity lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**: 3861-3865, 1990.
- CELOTTO, A.C.; NAZARIO, D.Z.; CUNHA, W.R.; SPESSOTO M.A ; MARTINS, C.H.G. "Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species". *Brazilian Journal of Microbiology*, **34**: 339-340, 2003.
- CHAN, W.R., SHEPPARD, V., MEDFORD, K.A., TINTO, W.F., REYNOLDS, W.F., MCLEAN, S. "Triterpenes from *Miconia stenostachya*" *J. Nat. Prod.*, **55** (7): 963-966, 1992.
- CIPAK, L.; GRAUSOVA, L.; MIADOKOVA, E.; NOVOTNY, L.; RAUKO, P.; *Arch. Toxicol.* **80**: 429, 2006.
- CRAGG, G.M; NEWMAN, D. J. "Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources". *Can. Investigation*, **17**: 153-163, 1999.

- CRAGG G.M.; NEWMAN D.J. "Plants as a source of anti-cancer agents". *J. Ethnopharmacol*, **100**: 72-79 2005.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. "A tale of two tumor targets: topoisomerase I and tubulin. The Wall and Wani contribution to cancer chemotherapy". *J Nat Prod*, **67**: 232-244, 2004.
- 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 trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species". *Phytother. Res.* **20**: 474-478 (2006).
- DALLA VECHIA, L.; GNOATTO, S.C.B.; GOSMANN, G. "Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante". *Química Nova*, **32** (5): 1245-1252, 2009.
- DEWICK, P.M. "*Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*". New York: John Wiley, 2^a ed., p. 507, 2001.
- EL-GHORAB, A.H.; EL-MASSRY, K.F.; MARX, F.; FADEL, H.M. "Antioxidant activity of Egyptian *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* leaf extracts". *Nahrung/Food*, **47**: 41-45, 2003.
- ENGERS, R.; GABBERT, H. E. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **126**: 682- 692, 2000.
- FERNANDES, P.; CABRAL, J. M. S. "Phytosterols: Applications and recovery methods". *Bioresource Technology*, **98**: 2335-2350, 2007.
- GABBERT, H. E.; MEIER, S.; GERHARZ, C. D.; HOMMEL, G. *Int. J. Cancer*, **49**: 203-207, 1991.
- GATTUSO, G., BARRECA, D., GARGIULLI, C., LEUZZI, U., CARISTI, C. "Flavonoid Composition of *Citrus* Juices". *Molecules*, **12**: 1641-1673, 2007.
- GELB, B.D.; MOISSOGLU K.; ZHANG, J.; MARTGNETTI, J.A.; BROMME, D.; DESNICK, R.J. "Cathepsin K: isolation and characterization of the murine cDNA and genomic sequence, the homologue of the human pycnodysostosis gene". *Biochem Mol Med*, **59**: 200- 6, 1996.
- GOTTESMAN, M.M.; *Annu. Rev. Med.* **53**: 615, 2002.
- GOTTLIEB, O. e KAPLAN, M.A. "Das plantas medicinais aos fármacos naturais". *Ciência Hoje*, **15** (89): 51-555, 1993.
- GUNATILAKA, A.A.L., BERGER, J.M., EVANS, 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 the Suriname rainforest". *J. Nat. Prod.*, **64**, 2-5, 2001.

- HARBORNE, J.B. “*Comparative Biochemistry of the Flavonoids*”. Academic Press, 1967.
- HARMAND, P. O.; DUVAL, R.; DELAGE, C.; SIMON, A.; *Int. J. Cancer* , 114, 2005.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. “*Princípios Ativos de Plantas Superiores*”. EdUFSCar, 1ªed, 9-36, 2003.
- IWU, M.W.; DUNCAN, A.R.; OKUNJI, C.O. “New antimicrobials of plant origin. In: Janick, J.. (ed.) *Perspectives on New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, 457-462, 1999.
- JAIN, A. C.; SARPAL, P. O.; SESHADRI, T. R. *Ind. J. Chem.* **4**: 481-492, 1966.
- JEONG, J.; YOON, C.; JEONG, C.; LEE, Y.; CHANG, Y.; KIM, C. “Inhibitory Activity of *Drynariae rhizoma* Extracts on Cathepsin Having Bone Resorption Activity”. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, **26** (3): 373–385, 2004.
- JUNGES, M.J.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, M.F.G.S.; FILHO, E.R.; FRUHAUF, M.; BARAÑANO, A.G. “Triterpenos ursânicos e oleanônicos isolados do caule de *Eugenia florida* DC”. *Revista de Pesquisa e Pós-Graduação*”, **01**: 13-30, 2000.
- KASSI, E.; PAPOUTSI, Z.; PRATSINIS, H.; ALIGIANNIS, N. ; MANOUSSAKIS, M.; MOUTSATSOU, P.; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **133**: 493, 2007.
- KOMINAMI, E.; KUNIO, I.; KATUNUMA, N. “Activation of the intramyofibril autophagic-lysosomal system in muscular-dystrophy”. *Am. J. Pathol.*, **127**: 461-466, 1997.
- LEBRETON, P.; JAY, M.; VOIRIN, B. “Sur l’analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes”. *Chim. Anal.*, **49** (7): 375-383, 1967.
- LEONARD, J.; LYGO, B. e PROCTER, G. “*Advanced Practical Organic Chemistry*”, 2ªed. London, Blackie Academic & Professional, p. 103, 1995.
- LEUNG, A.Y.; FOSTER, S. “*Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drug and cosmetics*”. 2ª ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1996.
- LI, J.; GUO, W. J.; YANG, Q. Y.; *World J. Gastroenterol.* **8**: 493, 2002.
- LIM, I.; MEROUEH, S.O.; LEE, M.; HEEG, M.J.; MOBASHERY, S. “Strategy in Inhibition of Cathepsin B, A Target in Tumor Invasion and Metastasis”. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 10271-10277, 2004.
- LIN, L.; CHEN, P. e HARNLY, J.M. “New Phenolic Components and Chromatographic Profiles of Green and Fermented Teas”. *J. Agric. Food. Chem.*, **56**: 8130-8140, 2008.

- MANKANI, K.L.; KRISHNA, V.; MANJUNATHA, B.K.; VIDYA, S.M.; SINGH, S.D.; MANOHARA, Y.N.; KUPPAST, I.J. *J. Nat. Remedies*, **6**: 147, 2006.
- MANS, DR.; ROCHA, AB.; SCHWARTSMANN, G. “Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: Targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds”. *Oncologist*, **5**: 185-98, 2000.
- MARTINS, A.B., SEMIR, J., GOLDENBERG, R., MARTINS, E. “O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. no Estado de São Paulo”. *Acta Bot. Bras.* **10**: 267– 316, 1996.
- MEYER, J.Y. “Observations on the reproductive biology of *Miconia calvescens* DC (Melastomataceae), an alien invasive tree on the Island of Tahiti (South Pacific Ocean)”. *Biotropica*, **30**: 609-624, 1998.
- MILLER R.A. Podophyllin. *International Journal of Dermatology*, **24** (8): 491-498, 1985.
- MIZUSHINA, Y.; IIDA, A.; OHTA, K.; SUGAWARA F.; SAKAGUCHI, K.; *Biochem. J.*, **350**: 757, 2000.
- MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G.; “The excited-states quenching of resazurin and resorufin and resurin byp-benzoquinones in polar solvents”. *Dyes Pigm.*, **64**: 117, 2005.
- NCCLS. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; 2th ed., Norma Aprovada (M27-A2)*. NCCLS/CLSI, Wayne, Pennsylvania - Estados Unidos, 2002.
- NISBET, L.J.; MOORE, M. “Will natural products remain a important source of drug research for the future?”. *Curr Opin. Biotechnol.*, **8** (6): 708-712, 1997.
- OVESNÁ, Z.; KOZICS, K.; SLAMENOVÁ, D.; *Mutat. Res.* **600**: 131, 2006.
- PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F.; *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**: 2720, 2002.
- PATIL, A.D., FREYER, A.J., LILLMER, L., OFFEN, P., TAYLOR, P.B., VOTTA, B.J.; JOHNSON, R.K. “A new dimeric dihydrochalcone and a new prenylated flavones from bud covers of *Artocarpus altilis*: potent inhibitors of cathepsin K”. *J. Nat. Prod.*, **65**: 624-627, 2002a.
- PATIL, A.D., FREYER, A.J., CARTE, B., TAYLOR, P.B., JOHNSON, R.K., FAULKNER, D.J. “Haploscleridamide, a novel tryptamine-derived alkaloid from a sponge of the order Haplosclerida: an inhibitor of cathepsin K”. *J. Nat. Prod.*, **65**: 628-629, 2002b.
- PATOCKA, J. “Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification”. *Journal of Applied Biomedicine*, **1**: 7-12, 2003.

- PHILLIPSON, G. W.; ANDERSON, A. C.; *J. Ethnopharmacol.*, **25**: 61, 1998.
- PINTO, A.C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. “Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas”. *Quím. Nova*, **25**. São Paulo, 2002.
- RAO, J.R.; RAO, R.S. *Indian Journal of Chemistry*, 30B: **66**, 1991.
- RATES, S. M. K. *Plants as source of drugs*. *Toxicon*, **39**: 603-613, 2001.
- RENNER, S.S. “Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae”. *Nord. J. Bot.* **13**: 519-540, 1993.
- RIOS, J.L. e RECIO, M.C. “Medicinal plants and antimicrobial activity”. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**: 80-84, 2005.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. “Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology” Baltimore: Willians & Wilkins, 1997.
- ROCHA, A.D.; DE OLIVEIRA, A.B.; DE SOUZA FILHO, J.D.; LOMBARDI, J.A.; BRAGA, F.C. *Phytother. Res.* **18**: 463, 2004.
- RODRIGUES, J., DA SILVA, M.A., DOS SANTOS, L.C., VILEGAS, W. “Isolamento e identificação dos flavonóides presentes nas folhas de *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae)”. In: *30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Águas de Lindóia-SP, 2007a.
- RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; DOS SANTOS, L.C., VILEGAS, W. “An unusual C₆-C₆ linked flavonoid from *Miconia cabucu* (Melastomataceae)”. *Phytochemistry*, **68**: 1781–1784, 2007.
- ROMERO, R. “Revisão taxonômica de *Microlicia* sect. *Chaetostomoides* (Melastomataceae)”. *Revista Brasileira de Botânica*, **26** (4): 429-435, 2003.
- ROMERO, R.; MARTINS, A.B. “Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil”. *Revista Brasileira de Botânica*, **25** (1): 19-24, 2002.
- SÁNCHEZ, M.; THEODULOZ, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I.; YANEZ, T.; RODRIGUEZ, J.A. *Life Sci.* **79**: 1349, 2006.
- SEVERINO, R.P. “Busca de produtos naturais como inibidores específicos de enzimas”. Programa de Pós Graduação em Química - UFSCar 2008. Tese de Doutorado.
- SIERADSKI K., ROBERTS R.B., HABER S.W., TOMASZ A. “The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection”. *N. Engl. J. Med.*, **340**: 517–523, 1999.
- SIQUEIRA, J.M.; PETERS, R.R.; GAZOLA, A.C.; KREPSKY, P.B.; FARIAS, M.R.; GILES, A.; DE BRUM-FERNANDES, A.J.; RIBEIRO DO VALLE, R.M. *Life Sci.* **80**: 1382, 2007.

SLOANE, B.F.; MOIN, K.; LAH, T. "Biochemical and molecular aspects of selected cancers". *Academic Press*, San Diego, 411-466, 1994.

SPESSOTO, M.A., FERREIRA, D.S., CROTTI, A.E.M., SILVA, M.L.A., CUNHA, W.R., "Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae)". *Phytomedicine*, **10**: 606–609, 2003.

SRIVASTAVA, V.; SINGH, N.A.; KUMAR, J.K.; GUPTA, M.M; KHANUJA, S.P.S. "Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads". *Bioorg Med Chem*, **13**: 5892-5908, 2005.

TANIGUCHI, S.; IMAYOSHI, Y.; KOBAYASHI, E.; TAKAMATSU, Y.; ITO, H.; HATANO, T.; SAKAGAMI, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; SUGITA, D.; SHIMURA, S.; YOSHIDA, T.; *Phytochemistry* **59**: 315, 2002.

TIAN, Z.; LIN, G.; ZHENG, R. X.; HUANG, F.; YANG, M. S.; XIAO, P. G.; *World J. Gastroenterol.*, **12**: 874, 2006.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers". *Biochem. Biophys. Acta*, **1477**: 98-11, 2000.

TURK, V.; TURK, B.; GUNCAR, G.; TURK, D.; KOS, J. "Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen presentation and cancer". *Adv. Enzyme Regul.*, **42**: 285-303, 2002.

TURK, D. e GUNCAR, G. "Lysosomal cysteine protease (cathepsins): promising drug targets". *Acta Cryst.*, (D59), 203-213, 2003.

VASCONCELOS, M.A.L; ROYO, V.A.; FERREIRA, D.S.; CROTTI, A.E.M.; ANDRADE E SILVA, M.L.; CARVALHO, J.C.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R. Z. *Naturforsch.* **61c**: 477-482, 2006.

VILLASENOR, I.M.; CANLAS, A.P.; FAUSTINO, K.M.; PLANA, K.G. *J. Ethnopharmacol.* **92**: 53, 2004.

WALL, M.E.; WANI, M.C. "Camptothecin and taxol: from discovery to clinic". *J Ethnopharmacol*, **51**:239-54, 1996.

WAGNER, H. "Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe". *Pharmazeutische Biologie*, Band 2, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart, 1999.

WANG, S.; HUANG, K. "Determination of Flavonoids by high-Performance Liquid Chromatography and capillary electrophoresis". *Journal of Chromatography A*, **1032**: 273-179, 2004.

WOLLENWEBER, E.; KOHORST, G. "Epicuticular Leaf Flavonoids from Eucalyptus-Spp and from Kalmia-Latifolia". *Zeitschrift fuer Naturforschung Section C Journal of Biosciences*, **36**: 913-5, 1981.

WOLLENWEBER, E.; JAY, M. "Flavones and flavonols". In: HARBORNE, J. B. *The flavonoids: advances in research since 1980*. 1st ed., London. Chapman and Hall, 233-302, 1988.

WOLLENWEBER, E. (1994), In: *The Flavonoids Advances in Research since 1986* (Harborne, J. B., ed.). Chapman and Hall, London.

YASUDA, Y.; KALETA, J.; BROMME, D.; "The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for design of new therapeutics". *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**: 973-993, 2005.

WU, Z.J.; OUYANG, M.A.; WANG, C.Z.; ZHANG, Z.K.; SHEN, J.G. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 1712, 2007.

YOUSSEF, D.T.A.; RAMADAN, M.A.; KHALIFA, A.A. "Acetophenones, a chalcone, a cromone and flavonoids from *Pancratium maritimum*". *Phytochemistry*, **49** (8): 2579-2583, 1998.

YU, D.; SAKURAI, Y.; CHEN, C.H.; CHANG, F.R.; HUANG, L.; KASHIWADA, Y.; LEE, K.H. *J. Med. Chem.* **49**: 5462, 2006.

YOSHIKAWA, M.; MORIKAWA, T.; YAMAMOTO, K.; KATO, Y.; NAGATOMO, A.; MATSUDA, H. *J. Nat. Prod. Res.* **68**: 1360, 2005.

ZENG, G.Z., PAN, X.L., TAN, N.H., XIONG, J., ZHANG, Y.M., "Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K". *European Journal Medicinal Chemistry*, **41**: 1247-1252, 2006.

ZHANG Y.; JIAO J.; LIU C.; WU X.; ZHANG Y. "Isolation and purification of four flavones C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography". *Food Chemistry* **107**: 1326-1336, 2008.

SITES: <http://www.who.int/cancer/en/>, acessado em novembro de 2009.

<http://www.emea.europa.eu/pressoffice/chmp.htm>, acessado em novembro de 2009.