

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

TONNY CLEY CAMPOS LEITE

**Estudo químico e farmacológico biomonitorado de sete espécies
do gênero *Miconia* (Melastomataceae)**

Recife

2016

Leite, Tonny Cley Campos	Estudo químico e farmacológico biomonitorado de sete espécies do gênero <i>Miconia</i> (Melastomataceae)	2,5 cm espaço reservado para etiqueta de localização	Doutorado PPGIT UFPE 2016

TONNY CLEY CAMPOS LEITE

**Estudo químico e farmacológico biomonitorado de sete
espécies do gênero *Miconia* (Melastomataceae)**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da
Universidade Federal de Pernambuco, para a
obtenção do Título de Doutor em Inovação
Terapêutica**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva

**Recife
2016**

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Leite, Tonny Cley Campos

Estudo químico e farmacológico de sete espécies do gênero *Miconia* (Melastomataceae) / Tonny Cley Campos Leite— Recife: O Autor, 2016.

95 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui bibliografia e anexo

1. Química vegetal 2. Melastomataceae I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orientadora) II. Título

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-306

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: LEITE, Tonny Cley Campos

Título: Estudo químico e farmacológico biomonitorado de sete espécies do gênero

Miconia (Melastomataceae)

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 31/05/2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR(A)

Prof. Dr Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR(A)

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISAS E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Maria Eduarda de Larrazábal

VICE-DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha esposa que sempre esteve comigo durante todos os momentos felizes e tristes.

AGRADECIMENTOS

A professora Teresinha Gonçalves da Silva pela orientação, por acreditar em mim mesmo sem me conhecer e me permitir explorar outras áreas quando isso era possível.

A professora Márcia Nascimento pela coorientação, parceria e amizade em todos os momentos.

A professora Norma Gusmão pelas dicas na atividade antimicrobiana.

Ao Botânico Earl Celestino de Oliveira Chagas por toda aperriacação para mais coletas durante estes quatro anos.

A técnica Eliete da central analítica do DQF da UFPE pela ajuda e paciência nas análises de RMN.

A Jaciana, pelo apoio e palavras incentivadoras e todos do BIOFARMATOX por me acolherem tão bem no laboratório.

As amigas Lais e Beth por me ajudarem na adaptação ao Doutorado e Recife.

Aos amigos John, Jéssica e Marlon por me aceitarem do jeito que sou e pelo privilégio da sua companhia.

Aos meus orientandos da pesquisa Rodrigo, Flavio, Elias, Izaqueu e Gustavo.

A UFPE, ao programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica e ao secretário Paulo por contribuir na minha formação.

A FACEPE pela bolsa concedida

Nenhuma luta haverá jamais de me
embrutecer, nenhum cotidiano será
tão pesado a ponto de me esmagar,
nenhuma carga me fará baixar a
cabeça. Quero ser diferente, eu
sou, e se não for, me farei.

CAIO FERNANDO ABREU

RESUMO

LEITE, T.C.C. Estudo químico e farmacológico biomonitorado de sete espécies do gênero *Miconia* (Melastomataceae). **2016. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil**

O gênero *Miconia* é composto por aproximadamente 1000 espécies, contudo apenas quinze já foram estudadas. Dentre as atividades biológicas descritas do gênero destacam-se ação antimicrobiana, antitumoral, antinociceptiva e antioxidante. Do ponto de vista químico destaca-se a presença de terpenoides e flavonoides. O presente trabalho teve como objetivo estudar as propriedades antimicrobianas e citotóxicas de espécies de *Miconia*. Para isto foram coletadas sete espécies: *M. amigurensis*, *M. ciliata*, *M. holosericea*, *M. hypoleuca*, *M. minutiflora*, *M. mirabilis* e *M. prasina*. Os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico destas espécies foram avaliados frente a nove microrganismos pelo método de difusão em ágar com disco de papel e microdiluição em caldo para obtenção da sua Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Microbicida (CMM). Além disso a atividade citotóxica destas espécies foi avaliada através do método MTT frente a quatro linhagens de células cancerígenas e duas linhagens de macrófagos murinos. No estudo fitoquímico determinou-se o perfil dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando-se reveladores específicos para cada classe de metabólitos secundários. Como resultado da difusão em ágar selecionou-se seis microrganismos que foram testados na microdiluição e nesta destacaram-se os extratos em acetato de etila de *M. amigurensis* e *M. prasina* ativos numa concentração de 60 µg/mL, e os extratos metanólicos de *M. holosericea* e *M. mirabilis* ativos nesta mesma concentração. Já na atividade citotóxica destacaram-se os extratos hexânico e acetato de etila de *M. holosericea* e *M. hypoleuca* por que conseguiram inibir o crescimento de três linhagens de células cancerígenas com uma inibição superior a 70 % e não foram tóxicos para as duas linhagens de macrófagos murinos. O perfil fitoquímico demonstrou a presença no geral de terpenos no extrato hexânico, terpenos e cumarinas no extrato acetato de etila e flavonoides e taninos no extrato metanólico. Para o estudo fitoquímico escolheu-se duas espécies que se destacaram na atividade biológica e do extrato hexânico da espécie *M. hypoleuca* resultou na identificação de oito triterpenos α-amirina, β-amirina, α-amirona, ácido ursólico, ácido oleanólico, lupeol, urs-12-en-3,11-diona, 3-hidróxi-urs-12-en-11-ona e um esteroide β-sitosterol, mais dois esteroides em identificação. Já o extrato AcOEt isolou-se 2 flavonoides em identificação e do extrato hexânico da espécie *M. holosericea* isolou-se 5 triterpenos e 3 esteroides que estão em identificação. Estes resultados evidenciam que as relevantes atividades encontradas estão relacionadas aos triterpenos e esteroides presentes em alta concentração nestas espécies.

Palavras-chave: Melastomataceae, *Miconia*, fitoquímica.

ABSTRACT

LEITE, T.C.C. Chemical and pharmacological activity of species of *Miconia* (Melastomataceae). 2016. Thesis (Ph.D.) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

The *Miconia* genus consists of about 1000 species, yet only fifteen have been studied. So this work was to study the chemical and biological properties of species of *Miconia*. For this seven species were collected: *M. amacurensis*, *M. ciliata*, *M. holosericea*, *M. hypoleuca*, *M. minutiflora*, *M. mirabilis* and *M. prasina*. The extracts of these species were evaluated against nine microorganisms by diffusion method in agar microdilution and to obtain their CMI and CMM. In addition, the cytotoxic activity of these species was assessed by the MTT method front four cancer cell lines and two lines of murine macrophages. In the phytochemical study we determined the profile of the extracts by TLC and were chosen two species that have excelled in biological activity. As a result of the agar diffusion was selected six microorganisms were tested in microdilution and this stood out the extracts in EtOAc *M. amacurensis* and *M. prasina* active at a concentration of 60 µg/mL, and MeOH extracts of *M. holosericea* and *M. mirabilis* active in the same concentration. In the cytotoxic activity stood out the less polar extracts of *M. holosericea* and *M. hypoleuca*. The phytochemical profile showed a predominance of terpenoids. The phytochemical study of the hexane extract of *M. hypoleuca* species resulted in the isolation of eight triterpenoids α-amyrin, β-amyrin, α-amirona, ursolic acid, oleanolic acid, lupeol, urs-12-en-3,11-dione, 3 -hydroxy-urs-12-en-11-one and one steroid β-sitosterol steroid two steroids in the identification phase. But the AcOEt extract isolated two flavonoids in the identification phase and the hexane extract of the species *M. holosericea* isolated triterpenes 5 and 3 steroids that are being identified. These results show that the relevant activities found are related to triterpenoids and steroids present in high concentration in these species.

Keywords: Melastomataceae, *Miconia*, phytochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Distribuição das espécies de <i>Miconias</i> nos biomas	26
Figura 02	Distribuição geográfica das espécies de <i>Miconia</i> no Brasil	27
Figura 03	Fotos das espécies de <i>Miconia</i> estudadas neste trabalho	28
Figura 04	Incidência de câncer no mundo no ano de 2012	38
Figura 05	Fluxograma da metodologia de extração das espécies de Melastomataceae	41
Figura 06	Fluxograma da metodologia de isolamento do extrato hexânico de <i>M. hypoleuca</i>	55
Figura 07	Esquema geral da fragmentação de triterpenos pentaciclicos do tipo ursano e oleanano e os fragmentos comuns obtidos	57
Figura 08	Estrutura dos compostos isolados da fração 42	57
Figura 09	Estrutura dos compostos isolados da fração 43	59
Figura 10	Esquema geral da fragmentação de esteroides	61
Figura 11	Estrutura dos triterpenos isolados da fração 47	64
Figura 12	Estrutura dos compostos isolados da fração 49	66
Figura 13	Fragmentos comuns aos triterpenos	66
Figura 14	Estrutura do β -sitosterol	69
Figura 15	Fluxograma da metodologia de isolamento do extrato AcOEt de <i>M. hypoleuca</i>	69
Figura 16	Fluxograma da metodologia de isolamento do extrato hexânico de <i>M. holosericea</i>	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Atividades biológicas de espécies de <i>Miconia</i>	29
Tabela 02	Compostos isolados de espécies de <i>Miconia</i>	32
Tabela 03	Classes e respectivos reveladores do perfil fitoquímico	45
Tabela 04	Rendimento dos extratos de espécies de Melastomataceae	47
Tabela 05	Halos de inibição (mm) dos extratos de espécies de <i>Miconia</i>	48
Tabela 06	Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Microbicida (CMM) em mg/mL dos extratos de espécies de <i>Miconia</i>	49
Tabela 07	Avaliação da citotoxicidade dos extratos de espécies de <i>Miconia</i> frente a linhagens de células cancerígenas e macrófagos murinos	51
Tabela 08	Perfil fitoquímico dos extratos de espécies de <i>Miconia</i>	53
Tabela 09	Avaliação da citotoxicidade das frações do extrato hexânico de <i>M. hypoleuca</i> frente a linhagens de células cancerígenas	54
Tabela 10	Dados de ^{13}C RMN da fração 43 [101 MHz, piridina-d ₅ , δ (ppm)] e da alfa-amirina [CDCl ₃ , δ (ppm)]	60
Tabela 11	Dados de ^{13}C RMN da fração 47 [125 MHz, piridina-d ₅ , δC (ppm)] e dos ácidos oleanólico e ursólico [piridina-d ₅ , δC (ppm)]	63
Tabela 12	Dados de ^{13}C RMN da fração 51 [101 MHz, piridina-d ₅ , δ (ppm)] e do β-sitosterol [CDCl ₃ , δ (ppm)]	68
Tabela 13	Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Microbicida (CMM) em mg/mL das frações do extrato hexânico de <i>M. holosericea</i>	71

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

¹H-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
¹³C-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
AcOEt - Acetato de etila
AlCl₃ – Cloreto de Aluminio
CC - Cromatografia em Coluna
CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CCDp - Cromatografia em Camada Delgada preparativa
CG - Cromatografia Gasosa
CDCl₃ - Clorofórmio deuterado
CD₃OD - Metanol deuterado
CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CHCl₃ - Clorofórmio
CH₂Cl₂ – Diclorometano
CI₅₀ – Concentração inibitória
CIM - Concentração Inibitória Mínima
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLCsg - Cromatografia Líquida em coluna recheada com sílica gel
CLCsp - Cromatografia Líquida em coluna recheada com sephadex LH-20
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CLV - Cromatografia Líquida no Vácuo
CMH - Caldo Muller Hinton
CMM - Concentração Microbicida Mínima
CO₂ – Dióxido de carbono
CPGsp - Cromatografia por Permeação em Gel recheada com sephadex LH-20
DEPT - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO - Dimetilsulfóxido
DMSO *d*₆ – Dimetilsulfóxido deuterado
EM - Espectrometria de Massas
EtOH – Etano
FeCl₃ – Cloreto de Ferro 3
HEX - Hexano

H₂OEtOH – Hidroalcóolico
HEp-2 – Linhagem celular de carcinoma de laringe humano
HL-60 – Linhagem celular de leucemia promielocítica aguda humana
IARC - International Agency for Research of Cancer
IBOPE - Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística
IC – Intervalo de Confiança
IDH - Índice de Desenvolvimento Humano
IMA - Instituto de Meio Ambiente do Estado de Alagoas
INCA – Instituto Nacional do Câncer
IV - Espectroscopia de Infravermelho
IQ-USP – Instituto de Química da Universidade de São Paulo
J774.A1 – Linhagem celular de macrófagos murinos
KOH – Hidróxido de potássio
MCF-7 – Linhagem celular de câncer de mama humano
MeOH – Metanol
MTT - [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium]
NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
NCI-H292 – Linhagem celular de carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano
OMS – Organização Mundial de Saúde
PIB – Produto Interno Bruto
QPN – Química de produtos naturais
RAW 264.7 – Linhagem celular de macrófagos murinos
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RPMI - Meios Roswell Park Memorial Institute
TMS – Tetrametilsilano
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UFPE - Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco
UFPEDA - Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
UV - Espectroscopia no Ultravioleta
VIS – Visível
WHO - *World Health Organization*

LISTA DE SÍMBOLOS

g – Grama

°C – Graus Celsius

mg - Miligrama

mL – Mililitro

μ L – Microlitro

μ g – Micrograma

μ m – Micrometro

nm – nanômetro

λ - Comprimento de onda

J - Constante de acoplamento

δ - Deslocamento químico

MHZ - Megahertz

m/z – Relação massa sobre carga

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Geral	20
2.2. Específicos	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Histórico de utilização de plantas no ocidente.....	21
3.2 Plantas medicinais como alternativa terapêutica e modelo para novos medicamentos	22
3.3 Biodiversidade e biomas brasileiros	23
3.4 Corredor de biodiversidade.....	24
3.4.1 Corredor de Biodiversidade do Nordeste	24
3.5 A família Melastomataceae	25
3.5.1 Ecologia de Melastomataceae	25
3.6 O gênero <i>Miconia</i> (Melastomataceae)	26
3.6.1 Atividades biológicas descritas de espécies do gênero <i>Miconia</i>.....	28
3.6.2 Compostos isolados de espécies do gênero <i>Miconia</i>.....	32
3.7 Infecção.....	35
3.8 Câncer	36
3.8.1 Impacto econômico e social do câncer.....	36
3.8.2 Epidemiologia do câncer	37
3.8.3 Tratamento.....	37
4 METODOLOGIA	37
4.1 Material vegetal.....	39
4.2 Obtenção dos extratos.....	39
4.3 Atividade antimicrobiana.....	39
4.3.1 Microrganismos	39
4.3.2 Método de difusão em disco	40
4.3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM).....	40
4.4 Atividade citotóxica.....	41
4.5 Perfil fitoquímico	42
4.6 Estudo químico.....	44

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Obtenção dos extratos.....	44
5.2 Atividade antimicrobiana.....	46
5.3 Atividade citotóxica.....	49
5.4 Perfil fitoquímico	51
5.5 Estudo químico	53
5.5.1 <i>Miconia hypoleuca</i>	53
5.5.1.1 <i>Extrato hexânico</i>	53
5.5.1.1.1 Elucidação estrutural dos compostos isolados	54
5.5.1.1.1.1 Fração 42	54
5.5.1.1.1.2 Fração 43	54
5.5.1.1.1.3 Fração 44	54
5.5.1.1.1.4 Fração 47	54
5.5.1.1.1.5 Fração 49	58
5.5.1.1.1.6 Fração 51	58
5.5.1.2 <i>Extrato Acetato de Etila (AcOEt)</i>	66
5.5.2 <i>Miconia holoserícea</i>	67
5.5.2.1 Extrato hexânico.....	67
6 CONCLUSÃO	72
7 PERSPECTIVAS.....	74
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO ESPECTROS	84

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o surgimento de bactérias resistentes a antibióticos tem despertado o interesse de pesquisas para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas, uma vez que a velocidade do surgimento da resistência bacteriana a diversos antibióticos e agentes quimioterápicos é bem maior que a velocidade da introdução de novos agentes antimicrobianos na terapêutica. Este contexto implica relevante limitação às opções de tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública (WANNMACHER, 2004).

Por outro lado, embora a resistência bacteriana não seja algo relevante na terapêutica do câncer, outros fatores são preponderantes para a descoberta de novos agentes quimioterápicos. Estes fatores são o surgimento elevado de novos casos de câncer principalmente em países com menor nível socioeconômico, e que por isso dispõem de menores recursos para o tratamento dessa patologia. Também é importante mencionar que a baixa eficácia de determinados agentes quimioterápicos aliada a elevada toxicidade fez surgir uma crescente busca por novos agentes mais seletivos e mais eficazes (WHO, 2015).

Por estas razões, a busca por novos medicamentos a partir de espécies vegetais se tornou uma alternativa cada vez mais promissora, pois a velocidade com que se lançam novos fármacos baseados exclusivamente nas transformações estruturais seguidas de síntese e semi-síntese não se mostrou tão satisfatória quanto as indústrias farmacêuticas acreditavam (ATANASOV et al., 2015).

Alem disso a utilização de plantas medicinais na atualidade ganha importância crescente, pois a sociedade moderna vem adquirindo consciência de que o modelo de exploração dos recursos naturais com vistas unicamente à obtenção do lucro já não mais satisfaz a sua necessidade, e como consequência, produz sérios danos ao meio ambiente. Outros fatores também estão envolvidos como os menores custos da terapia com plantas medicinais, a menor percentagem de efeitos adversos associados à utilização de plantas e a tendência mundial de aproximação ao meio natural (MACIEL et al., 2002).

Neste sentido, Melastomataceae é uma família botânica promissora para estudos de investigação biológica e fitoquímica porque possui elevado número de espécies e que historicamente tem sido pouco estudada, o que configura menos de 1 % do número total de espécies da família (LEITE, 2009).

Outra preocupação é ecológica, visto que esta família se distribui no Brasil predominantemente nos biomas mais ameaçados (GOLDENBERG, 2000). Além disso, é característica peculiar desta família a tendência ao endemismo e a consequente biossíntese única presente nas espécies o que configura para a Química de Produtos Naturais (QPN) um amplo campo de pesquisa para a descoberta de novas moléculas (LEITE, 2009).

Miconia é o maior gênero em número de espécies de Melastomataceae com mais de mil espécies. No Brasil ocorrem 287 espécies de *Miconia*, e destas 122 são endêmicas. No Nordeste estão presentes 74 espécies, Pernambuco e Alagoas são os estados com maior percentagem com aproximadamente 35 % (26) e 25 % (19). O bioma preferencial das espécies de *Miconia* presentes em Pernambuco e Alagoas é a Mata Atlântica (FORZZA et al., 2010).

Também é importante mencionar que em Pernambuco restam apenas 2,5 % da vegetação nativa de Mata atlântica, o que corresponde a $\frac{1}{4}$ do percentual nacional, logo isto aumenta a relevância do estudo, pois este bioma é considerado uma das 34 zonas mundiais prioritárias de conservação devido ao seu elevado grau de biodiversidade (hotspots) (LIMA, 1998; PORTAL MS, 2011).

Das sete espécies vegetais avaliadas neste trabalho: *M. amigurensis*, *M. ciliata*, *M. holosericea*, *M. hypoleuca*, *M. minutiflora*, *M. mirabilis* e *M. prasina*, apenas *M. minutiflora* já foi estudada quanto as suas propriedades antimicrobianas do extrato etanólico como também foi avaliado o perfil fitoquímico e a atividade fotoprotetora e os doseamentos de flavonoides, taninos e fenólicos. As demais espécies não foram alvo de nenhum tipo de estudo tanto de natureza química como biológica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo químico e farmacológico de sete espécies do gênero *Miconia* (Melastomataceae).

2.2 Objetivos específicos

- Coletar as espécies: *M. amacurensis*, *M. ciliata*, *M. holosericea*, *M. hypoleuca*, *M. minutiflora*, *M. mirabilis* e *M. prasina* (Melastomataceae);
- Obter extratos brutos em hexano, acetato de etila e metanol;
- Avaliar a atividade citotóxica de extratos brutos e frações frente as linhagens de células tumorais humanas NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão), HEp-2 (carcinoma de laringe), HL-60 (leucemia promielocitica aguda) e MCF-7 (câncer de mama) e de macrófagos murinos J774.A1 e RAW 264.7;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos e frações e/ou produtos isoladas frente as bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*; bactérias gram-negativas: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa*; bactéria álcool-ácido-resistente *Mycobacterium smegmatis* e a levedura *Candida albicans*;
- Determinar o perfil fitoquímico dos extratos;
- Isolar, purificar e caracterizar estruturalmente os constituintes químicos das espécies que apresentarem melhor atividade biológica.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Histórico de utilização de plantas no ocidente

Nas sociedades antigas, a doença era vista também com um componente mitológico, pois em alguns casos era tratada como um castigo divino, contudo ainda assim os curandeiros tratavam os doentes com ervas além das preces. Ainda que inicialmente a escolha destas ervas se devesse ao completo acaso como a semelhança entre o órgão doente e a forma da folha empregada, com o decorrer dos anos este processo contínuo de experimentação baseado na tentativa e erro produziu um amplo conhecimento sobre o uso plantas na terapêutica (FERRO, 2006).

Há extensos relatos sobre o uso de plantas medicinais na terapêutica em importantes civilizações como os egípcios, os sumérios e os babilônicos. Nesta época, as informações sobre sua utilização foram difundidas por características peculiares do modo de produção dominante, pois o modo de produção escravista e a consequente necessidade de guerras para a aquisição de novos escravos, fez com que a cultura do vencido fosse sempre mesclada com a cultura do vencedor e isto incluía a utilização de plantas na terapêutica, o que possibilitou, na época, a grande difusão do conhecimento sobre esta terapia (TOMAZZONI, 2004).

Na idade média o conhecimento ocidental permaneceu sob a égide da igreja e isto incluía o conhecimento sobre plantas, mas, mesmo assim, diversas espécies vegetais tiveram seu conhecimento documentado, principalmente as relacionadas ao universo cristão, e isto culminou com a construção de grandes herbários em algumas cidades europeias (GURIB, 2006).

O advento do renascimento que inferiu um novo paradigma de pensamento, ocasionou a ruptura do modelo de pensamento médico estabelecido, ligado ao conhecimento popular, e fez surgir um novo modelo de cunho mais científico e isto implicava também a utilização de medicamentos em que se conhecia adequadamente sua composição.

Este novo contexto produziu a tendência na utilização de Fármacos obtidos de elementos químicos metálicos como o arsênio, mercúrio e enxofre, porém a maioria da população ainda utilizava a fitoterapia como alternativa terapêutica mais viável (RAI; ACHARYA; RIOS, 2011).

Este modelo de pensamento se manteve dominante até o começo do século XIX, e combinado a evolução das ciências, possibilitou um contexto propício para o nascimento da química farmacêutica; e isto significava que então a indústria era capaz de sintetizar os medicamentos no laboratório, como também compreender de modo mais claro a farmacodinâmica e farmacocinética destes medicamentos. Logo, a síntese química passa a ser o modo hegemônico de produção de medicamentos e a tendência principal de consumo (ARAÚJO, 2002).

Este modelo perdurou por décadas até a sociedade constatar a alta incidência de eventos associados aos efeitos adversos dos medicamentos sintéticos, bem como o elevado custo desta terapêutica e a consequente exclusão de grande parcela da mesma. Somado a tudo isto, outros fatores contribuíram com a revalorização dos medicamentos à base de plantas que deste momento em diante aumentou constantemente até os dias atuais (FERREIRA, 1998).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) detectou que a maioria dos países ocidentais que utilizavam os medicamentos sintéticos como o principal recurso terapêutico de sua assistência farmacêutica não foram capazes de propiciar as condições mínimas necessárias para manter um nível básico de saúde a sua população (QUEIROZ, 2000).

Logo a partir disto, a OMS concluiu que o investimento em medicina tradicional é a forma mais racional para contemplar as deficiências observadas nestes países, até por que grande parcela da população dos mesmos utiliza os recursos naturais, em especial as plantas como o único recurso acessível (WHO, 1998).

3.2 Biodiversidade e biomas brasileiros

O Brasil está relacionado no topo da lista dos 17 países detentores da maior biodiversidade do planeta, onde o número de espécies presentes chega a expressivos 20 % do número total de espécies da terra, o que corresponde a aproximadamente a 1,8 milhão de espécies. Da flora brasileira já foram descritas 45.835 espécies, sendo 680 algas, 32.715 angiospermas, 1.519 de briófitas, 30 gimnospermas e 1.239 samambaias e licófitas, isto representa apenas 11 % de toda a flora existente (BRASIL, 2015).

Esta diversidade está localizada prioritariamente em biomas altamente

ameaçados como o cerrado, segundo maior bioma brasileiro, que ocupa 21 % do território nacional e caracteriza-se como a mais diversificada savana tropical do mundo. Isto tudo com taxa de endemismo próxima a 50 % de suas espécies vegetais e apenas 2 % do seu território está protegido sob a forma de unidades de conservação (BRASIL, 2007).

A Caatinga, único bioma exclusivo do Brasil, ocupa 11 % do território nacional, sendo o bioma mais ameaçado pelas ações antrópicas e apenas 5 % está protegido pelas unidades de conservação. Já a mata atlântica, é o bioma que está em maior contato com a população brasileira e por isso também é um dos mais degradados. Cerca de 120 milhões de brasileiros (62 %), em 18 estados, vivem em áreas de mata atlântica, mas, mesmo assim, apenas 7 % de suas florestas se mantém conservadas, mesmo sabendo que aproximadamente 35 % de todas as espécies vegetais brasileiras estão presentes neste bioma (HAUFF, 2010).

Importantes estudos atuais relacionam a qualidade de vida da população de determinado local com a cobertura vegetal limítrofe, através da manutenção de fontes e nascentes e consequentemente da disponibilidade de água para as cidades. Outros fatores são a regulação do clima local pela pluviosidade, temperatura e umidade e a disponibilidade de alimentos através da manutenção da fertilidade do solo. Um dos modos de contribuir na preservação da flora local é conhecendo suas potencialidades sejam elas econômicas, terapêuticas ou socioculturais (LEWINSOHN; PRADO, 2000).

3.3 Corredor de biodiversidade

Fundamentalmente, o conceito de corredor de biodiversidade é um determinado espaço geográfico onde há a presença de uma área de vegetação que liga diferentes fragmentos vegetacionais, ou unidades de conservação. Este conceito é atualmente utilizado como uma estratégia da biologia da conservação para a manutenção da biodiversidade em paisagens fragmentadas e tem como objetivo reconectar os diversos espaços compostos por um mosaico de usos e ocupação da terra integrando desde as áreas de mata nativas como as que sofreram ação antrópica como no caso de cultivo e pastagem, e também parques e reservas em centros urbanos (BRASIL, 2002; TABARELLI; PINTO; LEAL, 2009).

3.4.1 Corredor de Biodiversidade do Nordeste

Com cerca de 5,6 milhões de hectares o corredor de biodiversidade do Nordeste abrange os estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. Do total original restaram menos de 4 %, contudo este percentual restante abriga cerca de 68 % das espécies de aves que ocorrem na mata atlântica, como também 8 % de todas as plantas vasculares. Este corredor é composto por 71 unidades de conservação, sendo que 36 estão no estado de Pernambuco, 23 em Alagoas, 08 na Paraíba e 02 no Rio Grande do Norte (ARRUDA; ARRUDA; SÁ, 2004).

3.4 A família Melastomataceae

Melastomataceae é a sétima maior família botânica em diversidade e a segunda em ocorrência dentre as angiospermas. Segundo Clausing e Renner (2001) ela é composta por aproximadamente 170 gêneros e 4.500 espécies. No Brasil estão presentes aproximadamente 1.500 espécies, o que corresponde a 30 % do total de espécies conhecidas (BAUMGRATZ et al., 2015).

Esta família tem distribuição predominantemente tropical e ocorre em todos os biomas característicos desta zona, contudo a maioria das espécies está distribuída no novo mundo onde são abundantes e ecologicamente importantes, destacando-se a América do Sul, Malásia e Indochina, considerados centros de diversidade da família. Nestes locais há elevada ocorrência de gêneros endêmicos em biomas específicos. No Brasil o bioma predominante é a mata atlântica que contem aproximadamente 50 % do total de espécies desta família (GOLDENBERG et al., 2008)

As espécies de Melastomataceae normalmente tem porte arbustivo até arbóreo, raramente herbáceo. Com folhas opostas, inteiras ou serreadas geralmente revestidas de tricomas, sua nervação é tipicamente curvinérvea, com as nervuras secundárias emergindo de um mesmo ponto da base para percorrer a periferia do limbo foliar de modo perpendicular até convergir no ápice juntamente a nervura principal. As flores são actinomorfas, diclamídeas, bissexuadas, tetrâmeras ou pentâmeras. Os frutos em geral são capsulares, bagas em algumas espécies, com sementes diminutas e numerosas e com formato variado (RAPINI, 2007; JUDD

et al., 2009).

3.4.1 Ecologia de Melastomataceae

Existe um mutualismo entre as espécies vegetais de Melastomataceae e as aves que se alimentam de frutos (frugíferas), pois as aves se beneficiam quando utilizam os frutos como fonte de nutrientes, e como elas deixam as sementes intactas acabam por dispersar as mesmas beneficiando com isso as plantas na competição pelos recursos essenciais como luz, água e nutrientes, bem como, dos locais de intensa predação (SNOW, 1981; STILLES; ROSSELLI; 1993).

Diversas espécies de melastomataceae tem potencial para serem empregadas para recuperar ecossistemas degradados, uma vez que são espécies pioneiras normalmente encontradas em clareiras, em ambientes fragilizados de solos pobres, e por isso algumas espécies já são empregadas com este fim (CRUZ, 2009).

Algumas espécies de Melastomataceae são utilizadas com o objetivo paisagístico, destacando-se neste caso os gêneros *Tibouchina* com as espécies *T. fothergillae*, *T. moricantiana*, *T. granulosa*, *T. heteromalla*, *T. mutabilis*, *T. pulchra*, *T. reitzii*, *T. trichopoda* e *T. sellowiana*. As espécies empregadas têm diferentes hábitos, desde árvores, arbustos até ervas (GOLDENBERG, 1998, BORTOLINI et al, 2009).

3.5 O gênero *Miconia*

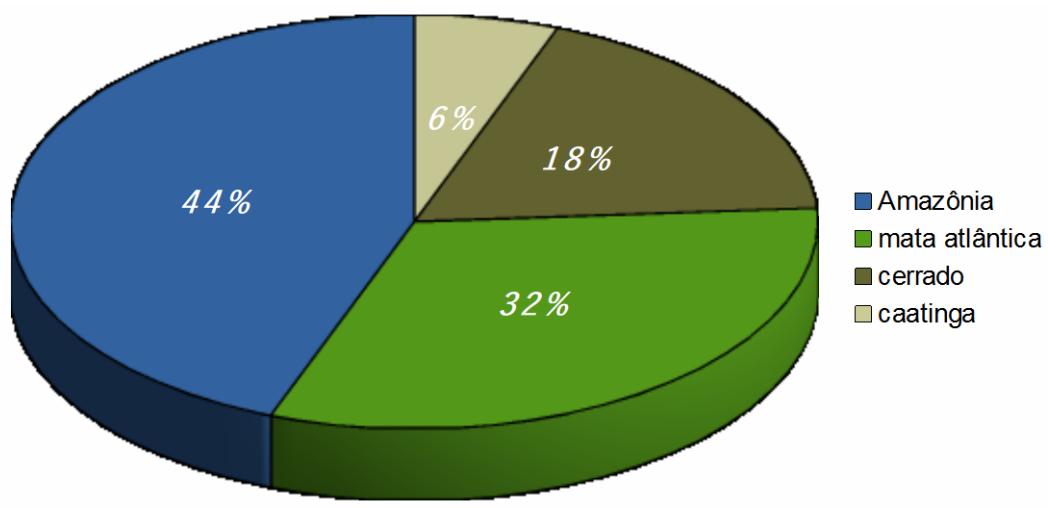
Miconia é o maior gênero botânico da família Melastomataceae, composto por cerca de mil espécies no mundo. No Brasil ocorrem 282 espécies, sendo que 125 destas são endêmicas. Elas estão distribuídas nos biomas amazônia, caatinga, cerrado e mata atlântica (Figura 01) e em todos os estados brasileiros (Figura 02). No bioma mata atlântica, selecionado para obtenção das espécies vegetais estudadas neste trabalho (Figura 03), são encontrados quase 45 % das espécies ocorrentes no Brasil (CHAGAS, 2012, BAUMGRATZ et al., 2015).

Ecologicamente este gênero se destaca pelo mesmo motivo da família que é a alimentação de pássaros frugívoros, sendo que algumas espécies se alimentam basicamente de frutos de *Miconia*, já que estes são suculentos, pequenos e numerosos (LOISELLE; BLAKE, 1999). Outro fim ecológico é a recuperação de

áreas degradadas, pois são espécies apropriadas ao reflorestamento por serem pioneiras e de rápido crescimento (SILVA; TABARELLI, 2000).

Outros usos são a produção de carvão vegetal a partir do caule e o consumo dos frutos na alimentação das comunidades tradicionais, embora geralmente estes sejam de tamanho pequeno e ainda há utilização ornamental (SCHUCH; SIMINSKI; FANTINI, 2008).

Figura 01: Distribuição de espécies de *Miconia* nos biomas brasileiros



Fonte: GOLDENBERG, 2015.

3.5.1 Atividades biológicas descritas de espécies do gênero *Miconia*

Apesar da existência de grande número de espécies e de sua ampla distribuição pantropical no mundo e no Brasil, *Miconia* ainda é um gênero pouco estudado tanto do ponto de vista químico como farmacológico, onde o número de espécies estudadas não corresponde a um centésimo do número de espécies existentes. As espécies já estudadas estão descritas na Tabela 01.

Figura 02: Distribuição geográfica do gênero e das espécies utilizadas de *Miconia* no Brasil.

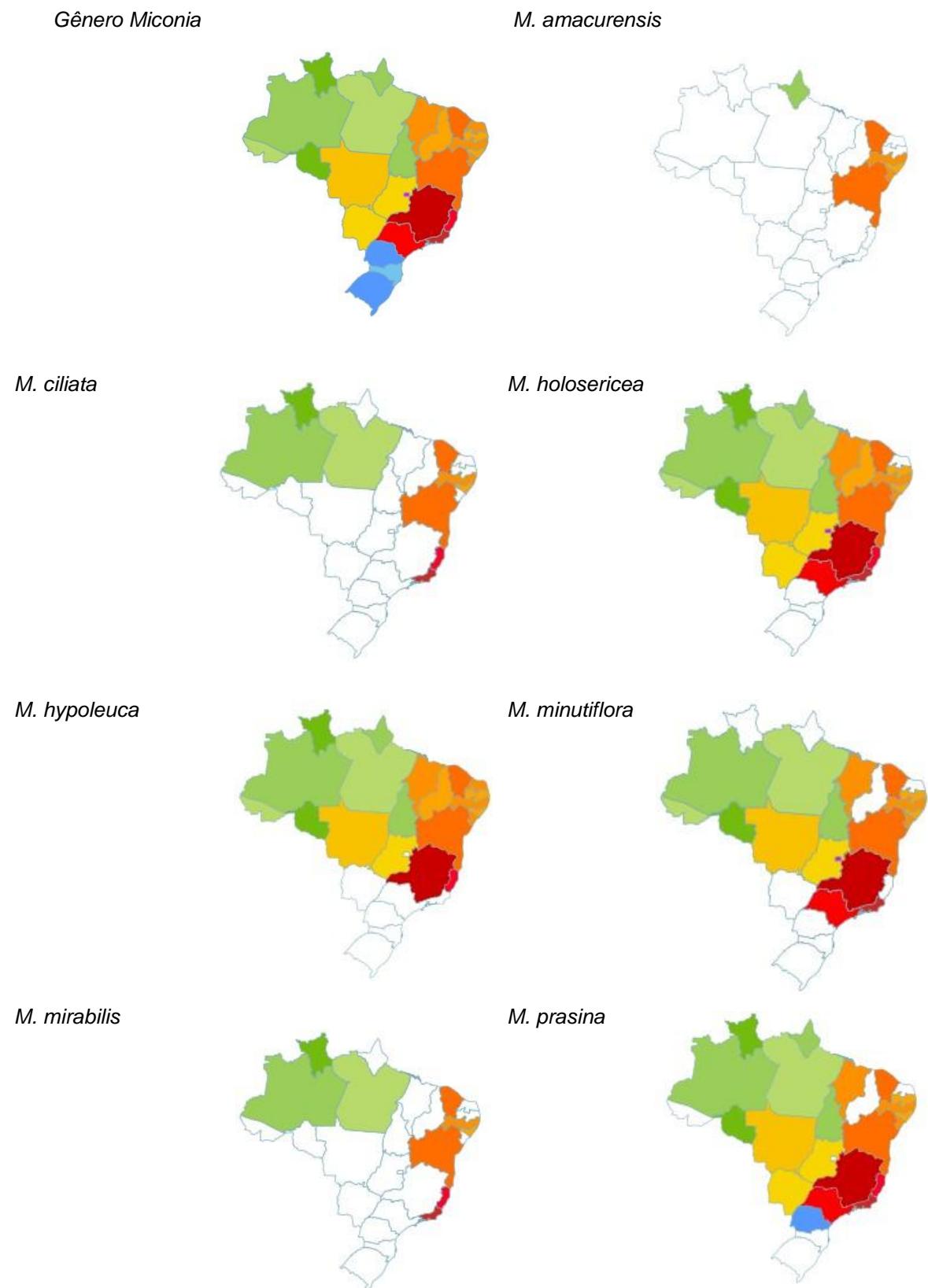
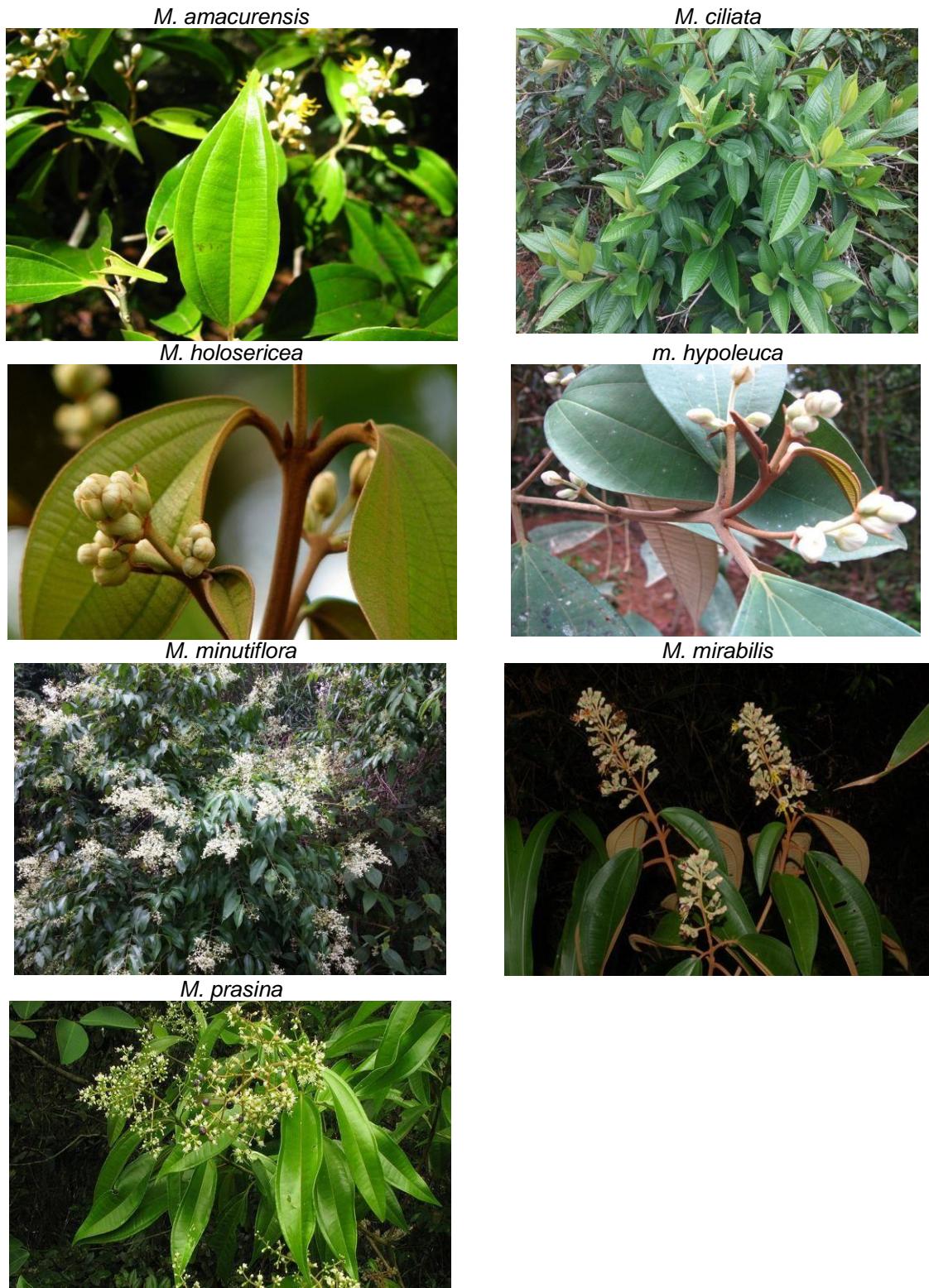


Figura 03: Espécies de *Miconia* estudadas neste trabalho



Fonte: AUTOR, 2015; CEPAN, 2011

Tabela 01: Atividades biológicas de espécies de *Miconia*

Espécie vegetal	Atividade descrita	In vitro/ in vivo	Detalhe/modelo	Extrato/ composto	Referência
<i>M. albicans</i>	Antioxidante	<i>in vitro</i>	DPPH	CHCl ₃ ; MeOH	Pieroni et al., 2011
<i>M. albicans</i>	Antinociceptiva	<i>in vivo</i>	Contorção abdominal, ác. Acético, camundongos	CH ₂ Cl ₂ ; ác. ursólico; ác. oleanólico.	Vasconcelos et al., 2006
<i>M. albicans</i> <i>M. cabucu</i> <i>M. rubiginosa</i> <i>M. stenostachya</i>	Anticlastogênica	<i>in vivo</i>	Micronúcleo	CHCl ₃ ; MeOH.	Serpeloni et al., 2008
<i>M. albicans</i> <i>M. cabucu</i> <i>M. rubiginosa</i> <i>M. stenostachya</i>	Anti-mutagênica e mutagênica	<i>in vitro</i>	Ensaio clonogênico, extratos associados a doxorrubicina para avaliar anti-mutagenicidade	CHCl ₃ ; MeOH; H ₂ OEtOH.	Serpeloni et al., 2011
<i>M. albicans</i> <i>M. cabucu</i> <i>M. rubiginosa</i> <i>M. stenostachya</i>	Citotoxicidade	<i>in vitro/</i> <i>in vivo</i>	Ensaio clonogênico utilizando Linhagem de fibroblastos de pulmão de hamster chinês	CHCl ₃ ; MeOH; H ₂ OEtOH.	Serpeloni et al., 2011
<i>M. albicans</i> <i>M. cabucu</i> <i>M. rubiginosa</i> <i>M. stenostachya</i>	Citotoxicidade	<i>in vivo</i>	Relação entre os PCE e os NCE na medula óssea de camundongos submetidos aos extratos	CHCl ₃ ; MeOH.	Serpeloni et al., 2008
<i>M. albicans</i> , <i>M. rubiginosa</i> <i>M. stenostachya</i>	Microbicida	<i>in vitro</i>	Disco difusão	Hexano; CH ₂ Cl ₂ ; EtOH.	Celotto et al., 2003

Tabela 01: Atividades biológicas de espécies de *Miconia* - continuação

<i>M. alypifolia</i>	Antioxidante	<i>In vitro</i>	ABTS	apigenina-7-O-glicosídeo; canferol-3-O-diglicosídeo; canferol-3-O-galactosídeo; queracetina-3-O-galactosídeo.	Mancini et al., 2008
<i>M. calvescens</i>	Microbicida	<i>in vitro</i>	Disco difusão	CHCl ₃ ; MeOH.	Bardon et al., 2007
<i>M. fallax</i>	Anti-carcinogênica	<i>in vivo</i>	Inibição lesão pré-cancerígena induzida por DMH	ác. ursólico; ác. oleanólico.	Furtado et al., 2008
<i>M. fallax</i>	Antinociceptiva	<i>in vivo</i>	Hot plate e Contorção abdominal, ác. Acético, camundongos	EtOH	Silva et al., 2002
<i>M. fallax</i>	Citotoxicidade	<i>in vitro</i>	Citotoxicidade frente a linhagem HeLA	EtOH; ác. ursólico; ác. oleanólico.	Cunha et al., 2008
<i>M. fallax</i> <i>M. stenostachya</i>	Tripanocida	<i>in vivo</i>	Formas tripomastigotas <i>T. cruzi</i>	CH ₂ Cl ₂ ; ác. ursólico; ác. oleanólico; ác. sumaresinólico.	Cunha et al., 2003b
<i>M. langsdorffii</i>	Leishmanicida	<i>in vitro</i>	Promastigota <i>L. amazonensis</i>	H ₂ OEtOH; ác. ursólico; ác. oleanólico.	Peixoto et al., 2011
<i>M. lepidota</i>	Citotoxicidade	<i>in vitro</i>	Células murinas, Carcinoma de pulmão	AcOEt; MeOH.	Gunatilaka et al., 2001
<i>M. lepidota</i>	Fungicida	<i>in vitro</i>	Método difusão em ágar, frente a várias cepas de leveduras	AcOEt; MeOH.	Gunatilaka et al., 2001

Tabela 01: Atividades biológicas de espécies de *Miconia* - continuação

<i>M. ligustroides</i>	Bactericida	<i>in vitro</i>	Microdiluição em caldo, frente a 5 microrganismos	CHCl ₃ ; ác. ursólico; ác. oleanólico.	Cunha et al., 2010
<i>M. ligustroides</i>	Antinociceptiva	<i>in vivo</i>	Contorção abdominal, ác. acético, camundongos	Hexano; CH ₂ Cl ₂ ; EtOH.	Cunha et al., 2003a
<i>M. myriantha</i>	Inibição de proteases	<i>in vitro</i>	Inibição da protease aspártica de <i>C. albicans</i>	EtOH; ác. elágico; ác. gálico; 3 flavonoides glicosilados;	Li et al., 2001
<i>M. rubiginosa</i>	Antinociceptiva	<i>in vivo</i>	Contorção abdominal, ác. Acético, camundongos	Hexano; CH ₂ Cl ₂ ; EtOH.	Spessoto et al., 2003
<i>M. rubiginosa</i> , <i>M. stenostachya</i> <i>M. cabucu</i>	Microbicida	<i>in vitro</i>	Difusão em disco	CHCl ₃ ; MeOH;	Rodrigues et al., 2008
<i>M. salicifolia</i>	Microbicida	<i>in vitro</i>	Microdiluição em caldo	EtOH	Bussmann et al., 2010
<i>M. sellowiana</i> <i>M. ligustroides</i>	Tripanocida	<i>in vitro/ in vivo</i>	Frente a formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> em linhagens celulares e camundongos (Swiss)	CH ₂ Cl ₂ ; ác. ursólico; ác. hidoursólico; ác. oleanólico; ác arjunólico; ác. máslico.	Cunha et al., 2006
<i>Miconia</i> sp	Inibição da acetilcolinesterase	<i>in vitro</i>	Ensaio espectrofotométrico para determinação da IC ₅₀ da enzima	MeOH	Nino et al., 2006

CH₂Cl₂: extrato diclorometano, CHCl₃: extrato clorofórmico, EtOH: extrato etanólico, MeOH: extrato metanólico, H₂OEtOH: extrato hidroalcóolico, PCE: eritrócito policromático, NCE: eritrócito normocromático. DMH: 1,2-dimetilhidrazina.

3.5.2 Compostos isolados de espécies do gênero *Miconia*

O gênero *Miconia* segue a correspondência biossintética da família Melastomataceae, uma vez que prioritariamente foram isolados terpenoides e flavonoides, notadamente em maior quantidade como nos demais gêneros de melastomataceae, em contrapartida como compostos menos comuns a família há presença de quinonas.

Tabela 02: Compostos isolados de espécies de *Miconia*

Espécie vegetal	Extrato/ Técnicas de Isolamento e identificação	Composto	Referência
<i>M. albicans</i>	Hexano CH ₂ Cl ₂ / CLCsg, IV, EM, RMN	3β-hidroxi-olean-12-en-28-oato de metila; 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila; 3-O-β-D-glicopiranosil sitosterol; ác. arjunólico; α-amirina; β-amirina;	Macari et al., 1990
	Hexano/ CG-EM	β-sitosterol; campesterol; estigmasterol; lupeol.	Crevelin et al., 2006
	CHCl ₃ MeOH/ CPGsp, CLCsg, CLAE, RMN	3-(E)- <i>p</i> -cumaroil-α-amirina α-amirina; ác. epi-Betulílico; ác. epi-ursólico; ác. ursólico; quercetina; quercetina-3-O-glicosídeo; rutina;	Pieroni et al., 2011
	CH ₂ Cl ₂ CLCsg, CLAE, RMN	ác. oleanólico; ác. ursólico.	Vasconcelos et al., 2006
<i>M. alypifolia</i>	MeOH/ CPGsp CLAE, RMN	apigenina-7-O-glicosídeo; canferol-3-O-diglicosídeo; canferol-3-O-galactosídeo; quercetina-3-O-galactosídeo	Mancini et al., 2008
<i>M. cabucu</i>	MeOH/ CLCsg, CLAE, EM, RMN	5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona-(6-C-6")-5"- hidroxi-3",4",7"-trimetoxiflavona; ác. gálico; quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosil-(2→1)- O-β-D-xilopiranosídeo; quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosídeo; miricetina-3-O-α-L-ramnopiranosídeo; quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo;	Rodrigues et al., 2007

		canferol-3-O-β-D-(6"-cumaril)-glicopiranosídeo.	
	Hexano/ CG-EM	α-amirina; β-amirina; β-sitosterol; estigmasterol; lupeol.	Crevelin et al., 2006
<i>M. fallax</i>	CH ₂ Cl ₂ EtOH/ CLV, CLAE, RMN	ác. oleanólico; ác. oleanonico; ác. sumaresinólico; ác. ursólico.	Cunha et al., 2008
<i>M. langsdorffii</i>	H ₂ OEtOH; CLV, CLCsp, CLAE, EM, RMN	ác. ursólico; ác. oleanólico; e derivados sintéticos.	Peixotto et al., 2011
<i>M. lepidota</i>	AcOEt CLCsg, CPGsp, EM, RMN	2-metóxi-6-heptil-1,4-benzoquinona; 2-metóxi-6-metil-1,4-benzoquinona; 2-metóxi-6-etil-1,4-benzoquinona; 2-metóxi-6-butil-1,4-benzoquinona; 2-metóxi-6-decil-1,4-benzoquinona; 2-metóxi-6-nonadecil-1,4-benzoquinona; 2-metóxi-6-benzil-1,4-benzoquinona; 2-metóxi-5-(1-hidroxipentil)-1,4-benzoquinona; Primina.	Gunatilaka et al., 2001
<i>M. ligustroides</i>	Hexano/ CG-EM	α-amirina; β-amirina; β-sitosterol; estigmasterol.	Cunha et al., 2003a; Crevelin et al., 2006
	CH ₂ Cl ₂ / CLV, CLAE, EM, RMN	ác. arjunólico; ác. oleanólico; ác. ursólico.	Cunha et al., 2006
<i>M. myriantha</i>	EtOH/ CLCsg, EM RMN	3,3'-di-O-metil ác. elágico-4-O-β-D-xilopiranosídeo; ác. elágico; ác. gálico; mattucinol-7-O-[4",6"-O-(S)-hexahidroxidifenil]-β-D-glicopiranosídeo; mattucinol-7-O-[4",6"-di-O-galoil]-β-D-glicopiranosídeo; mattucinol-7-O-β-D-glicopiranosídeo.	Li et al., 2001
<i>M. pepericarpa</i>	Hexano/ CG-EM	α-amirina; β-amirina; β-sitosterol; acetato de α-amirina; acetato de β-amirina; campesterol; estigmasterol; friedelina; lupeol.	Crevelin et al., 2006
<i>M. prasina</i>	MeOH/	7-O-α-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-	Tarawneh et

	CLV, CLAE, EM, RMN, UV.	glicopiranosilmatteucinol; desmetoximatteucinol; farrerol; matteucinol; miconiosídeo B; miconiosídeo C.	al., 2014
<i>M. rubiginosa</i>	Hexano/ CG-EM	α -amirina; β -amirina; β -sitosterol; lupeol. ác. gálico; casuarictina; epicatequina; quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo; quercetina-3-O- β -arabinofuranosídeo; quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo; quercetina-3-O- β -arabinopiranosídeo; quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo; quercetina-3-O- α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- β -galactopiranosídeo; canferol-3-O- β -galactopiranosídeo schizandrisideo	Crevelin et al., 2006
	Água/ CLAE, EM, RMN		Rodrigues et al., 2011
<i>M. sellowiana</i>	Hexano/ CG-EM	α -amirina; β -amirina; β -sitosterol; campesterol; estigmasterol; lupeol.	Crevelin et al., 2006
	CH ₂ Cl ₂ / CLV, CLAE, EM, RMN	ác. 2- α -hidroxiursólico; ác. maslico; ác. ursólico.	Cunha et al., 2006
<i>M. stenostachya</i>	AcOEt/ CLCsg, RMN	ác. sumaresinólico; ác. 3-epi-sumaresinólico.	Chan et al., 1992
	CH ₂ Cl ₂ / CLV, CLAE, RMN	ác. gipsogênico; ác. sumaresinólico.	Cunha et al., 2003b
	EtOH/ CLCsg, CCDp RMN	ác. arjunólico; ác. bartogênico; estigmast-4-eno-3,6-diano matteucinol; matteucinol-7-O- β -apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D- glicopiranosídeo; miconiosídeo A; miconiosídeo B.	Zhang et al., 2003

CCDp: Cromatografia em Camada Delgada preparativa; CG: Cromatografia Gasosa; CLAE: Cromatografia Líquida de Alta eficiência; CLCsg: Cromatografia Líquida em coluna recheada com sílica gel; CLCsp: Cromatografia Líquida em coluna recheada com sephadex LH-20; CLV: Cromatografia Líquida no Vácuo; CPGsp: Cromatografia por Permeação em Gel recheada com sephadex LH-20; RMN: Ressonância Magnética Nuclear; EM: Espectrometria de Massas; IV: Espectroscopia de Infravermelho; UV: espectroscopia no ultravioleta.

3.6 Plantas medicinais como produto terapêutico

Dados globais demonstram que 80 % da população mundial vivem em países que apresentam baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) contra 20 % que vivem em países com alto IDH. Contudo, relacionando estes dados com a porcentagem de utilização dos medicamentos pela população mundial, verifica-se que estes 20 % mais ricos consomem cerca de 85 % dos medicamentos industrializados. Portanto os 80 % da população restante consomem apenas 15 % dos medicamentos industrializados produzidos no mundo (FERRO, 2006). No Brasil, segundo o IBOPE, as classes A e B que representam aproximadamente um quarto da população, são responsáveis pelo consumo de quase metade dos medicamentos comercializados no país. Dividindo o país por regiões, conclui-se que o Sudeste consome metade dos medicamentos comercializados no Brasil (IBOPE, 2013).

A desigualdade do consumo dos medicamentos industrializados é consequência da falta de acesso da população mais pobre a este tipo de medicamento, e como resultado a população recorre às plantas como único recurso terapêutico disponível (DI STASI, 1996).

Além de alternativa terapêutica, as plantas também são utilizadas como uma estratégia eficaz na descoberta de novos fármacos, visto que o número de candidatos a fármaco pode ser superior a 20.000 moléculas testadas para cada substância que efetivamente se torna um medicamento (FERREIRA, 1998).

Com o emprego de ferramentas dirigidas como a etnofarmacologia, ou a modificação estrutural de modelos vegetais este número pode diminuir drasticamente, e isto significa menor tempo em diversas etapas do processo. Mais além, isto representa uma economia na faixa de milhões de dólares, que é o custo efetivo para se colocar um fármaco no mercado (PAIM, 2000).

3.7 Infecção

As infecções têm elevado impacto sobre o sistema de saúde de praticamente todos os países, e os menos favorecidos social e economicamente são os mais impactados. Dentre as infecções, citando como exemplo apenas as do trato aéreo

superior, estas foram as principais causas de morte em países de baixa renda no ano de 2011 segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), e também foram responsáveis nestes países por 11,3 % dos óbitos totais. Ampliando este universo para todos os países, as infecções do trato aéreo superior são a terceira causa de mortalidade da população mundial, sendo responsável aproximadamente por 6 % dos óbitos (WHO, 2012).

Embora a descoberta dos antibióticos tenha se dado ao acaso, anteriormente já existia o interesse nestas substâncias, uma vez que teorias já relacionavam a existência de algumas patologias com a presença de um microrganismo no indivíduo acometido por esta patologia. Pesquisas posteriores acabaram por confirmar esta hipótese (LEWIS, 2013).

A elevada demanda de antibióticos ocasionada devido a primeira e principalmente a segunda guerra mundial, e o conhecimento adquirido sobre as infecções, possibilitaram o surgimento de diversos antibióticos derivados das bactérias do gênero *Streptomyces* e fungos dos gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium*, além de outros derivados de outros gêneros. Este contexto promissor, aliado às teorias que relacionavam a presença de doenças unicamente a presença dos microrganismos ao nosso redor fez surgir uma demanda crescente na população para utilização indiscriminada dos antimicrobianos (DAVIES; DAVIES, 2010).

O resultado disto foi a insurgência disseminada de resistência, consequência da pressão seletiva que eliminava as estirpes sensíveis e deixava apenas as resistentes. Este fator, associado ao uso equivocado acentuou os casos de resistência e foi se agravando por décadas até o surgimento de estirpes microbianas multirresistentes, no qual os antimicrobianos disponíveis se mostraram ineficazes. Isto culminou num cenário preocupante, pois o surgimento de resistência é muito superior quando comparado ao surgimento de novos antimicrobianos (RIFFEL, 2002).

Desta forma, as plantas medicinais ganharam importância neste novo contexto de demanda por novos antimicrobianos e isto se expressa no número de artigos publicados sobre atividade antimicrobiana de plantas medicinais que quase triplicou na última década (RIOS; RECIO, 2005).

3.8 Câncer

Câncer compreende um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento contínuo e desordenado de células. Estas células têm capacidade de invadir e destruir tecidos e órgãos adjacentes, podendo se espalhar para outras partes, formando metástases. A ocorrência do câncer é de etiologia multifatorial, e pode ter origem na combinação de vários fatores como os externos ou ambientais que estão relacionados ao modo de vida, e incluem comportamentos inadequados do ponto de vista da medicina como o tabagismo, inatividade física, alimentação imprópria, excesso de peso, consumo excessivo de álcool, exposição prolongada a radiações ionizantes e a agentes infecciosos específicos (INCA, 2016; WHO, 2015).

Estes fatores normalmente podem estar relacionados às predisposições internas que incluem alterações do aparato genético que se expressam por seguidas mutações em genes supressores de tumor, reparadores do DNA e oncogenes, normalmente relacionados a proteção contra as agressões externas (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

3.8.1 Impacto econômico e social do câncer

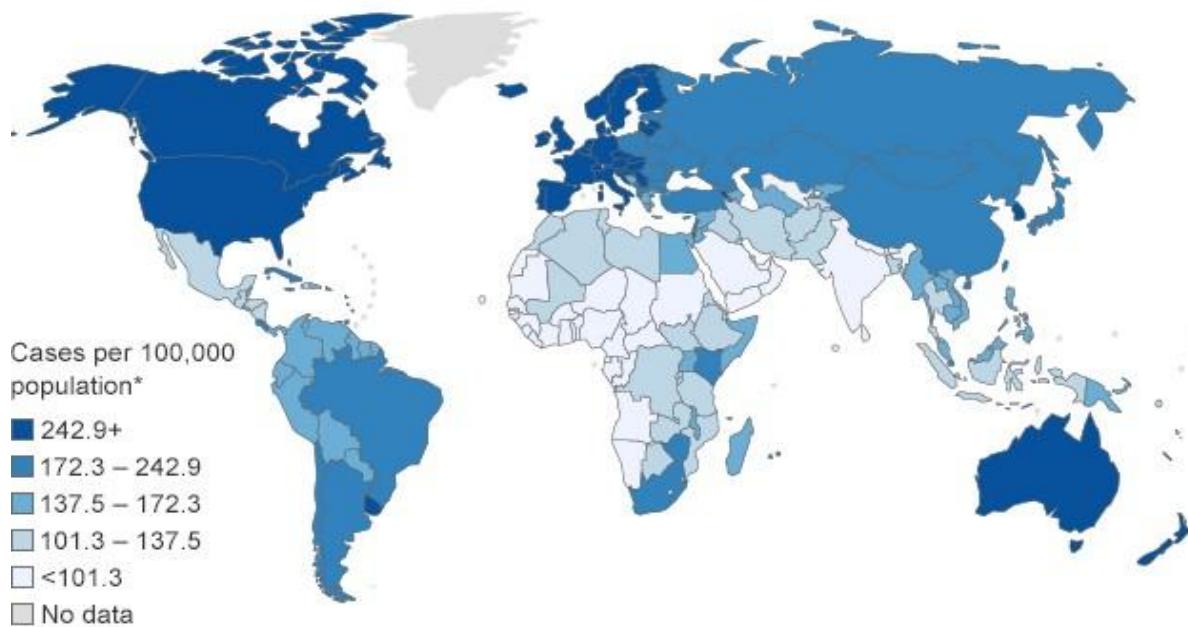
O câncer é a patologia que mais impacta os sistemas de saúde dos países a nível global. Os gastos relacionados a esta doença estão na ordem de 2 (dois) trilhões de dólares, ou 1,5 % do Produto Interno Bruto (PIB) mundial. Este volume é tão representativo que esta patologia é tema de debate em fóruns econômicos mundiais. Apenas na Europa foram gastos, segundo a Sociedade Europeia de Oncologia Médica, 324 bilhões de dólares no ano de 2012 com o câncer. Destes, 50 bilhões foram gastos com o câncer de pulmão e 13 bilhões com o câncer de mama (IARC, 2015).

Além dos gastos econômicos, o câncer também produz consequências sociais aos portadores desta patologia. Estas envolvem desde o maior gasto percentual com saúde da família do doente, como também da diminuição representativa do salário em virtude da patologia (redução de 40 % do valor bruto), diminuição da probabilidade de conseguir emprego após cinco anos do diagnóstico e baixa autoestima consequência do estigma desta patologia (MARIN, 2015).

3.8.2 Epidemiologia do câncer

O câncer configura-se como um importante problema de saúde pública com elevada incidência em países com populações envelhecidas como a Europa e a América do Norte como fica demonstrado na figura a seguir que apresenta a incidência de câncer no globo no ano de 2012. Outro aspecto relevante é a mortalidade pela patologia já que neste ano foram 8,2 milhões de mortes por câncer o que se configura como a segunda causa de morte no mundo. Importante também é mencionar que grande parte destas mortes se dá em países pobres, pois 70 % delas são na Ásia, África, América do sul e América central. Estas mortes se devem, em grande parte, as limitações de recursos destes países com relação a prevenção, diagnóstico e tratamento (WHO, 2012).

Figura 04: Incidência de câncer no mundo no ano de 2012



Fonte: IARC, 2015.

Dentre os diversos tipos se destacam, segundo a mortalidade, o câncer de pulmão, fígado, estômago, cólon e mama. Já segundo a morbidade, são representativos o câncer de mama, cólon e reto nas mulheres e pulmão, próstata e cólon nos homens (IARC, 2015). No Brasil estima-se 596 mil novos casos da doença em 2016, sendo aproximadamente 301 mil para mulheres e 295 mil para homens. Destacando-se o câncer de pele, próstata e mama (INCA, 2016).

3.8.3 Tratamento

Os protocolos clínicos de tratamento atuais para o câncer são específicos para determinado tipo e envolvem várias modalidades terapêuticas como a radioterapia, a quimioterapia e a cirurgia. A terapêutica visa curar o câncer ou, pelo menos, prolongar a vida do paciente com qualidade (WHO, 2015).

Tanto a radioterapia como a quimioterapia têm em comum o fato de terem baixa especificidade para as células cancerígenas, o que representa elevado números de efeitos adversos associados a estas terapêuticas. Sendo assim, a busca por novos agentes quimioterápicos tem como objetivo, além da destruição do tumor, descobrir fármacos com menos efeitos adversos, e os produtos naturais são importantes modelos na busca por estes novos agentes (CRAGG; NEWMANN, 2013).

4. METODOLOGIA

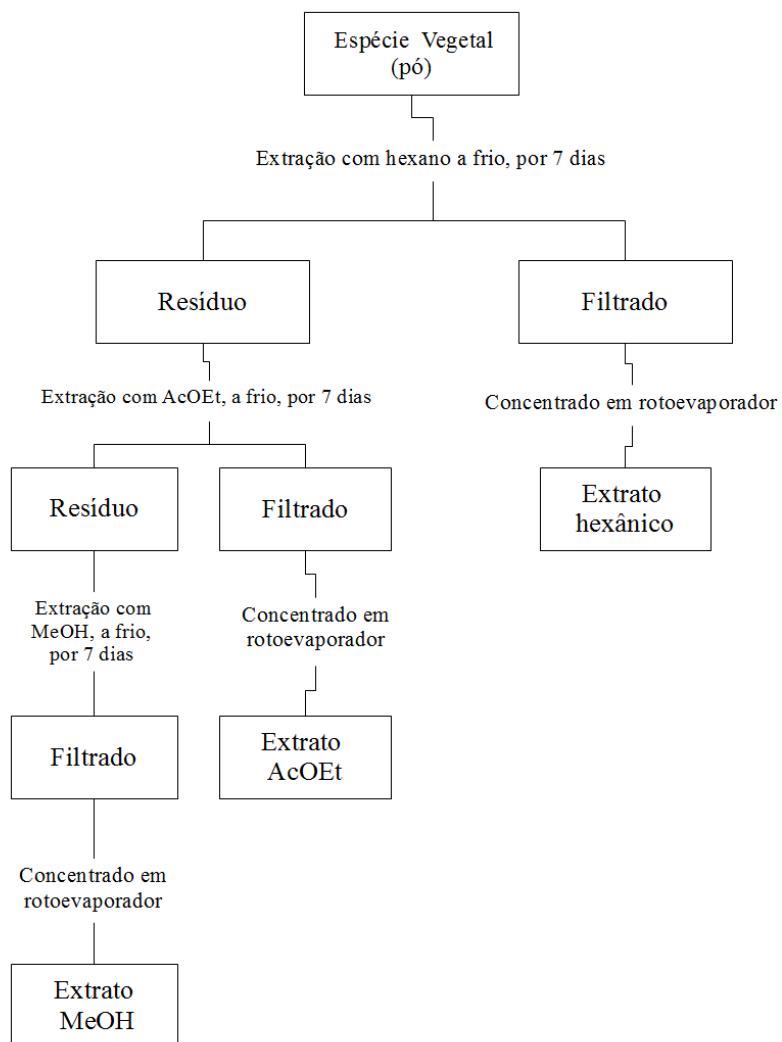
4.1 Material vegetal

Todas as espécies vegetais empregadas neste trabalho foram coletadas em áreas do corredor de biodiversidade de mata atlântica do Nordeste. A escolha das espécies foi em virtude da importância ecológica que estas espécies desempenham no ambiente em que estão presentes. No estado de Alagoas, no ano de 2012, nos municípios de Flexeiras, Maceió, Murici, Rio Largo e Satuba foram coletadas as folhas de seis espécies de *Miconia*: *M. amacurensis*, *M. holosericea*, *M. hypoleuca*, *M. minutiflora*, *M. mirabilis* e *M. prasina*. Estas espécies foram identificadas pelo botânico MSc. Earl Celestino de Oliveira Chagas, do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA-AL). Já a espécie *M. ciliata* foi coletada no estado de Pernambuco, ano de 2015, município Barreiros, e identificada pela botânicia Angélica Ferreira da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Por último foi preparada uma exsicata de cada espécie coletada e foram depositadas no Herbário do Instituto de Meio Ambiente do Estado de Alagoas (IMA-MAC): *M. amacurensis* (MAC 52.184), *M. holosericea* (MAC 43.139), *M. hypoleuca* (MAC 50.129), *M. minutiflora* (MAC 50.397), *M. mirabilis* (MAC 44.990), *M. prasina* (MAC 50.398) e Herbário Vasconcelos Sobrinho, Universidade Federal Rural de Pernambuco (PEUFR): *M. ciliata* (52.387).

4.2 Obtenção dos extratos

As folhas das espécies coletadas foram secas por 3 dias (72 h) em estufa com temperatura controlada (50 °C) e renovação constante de ar. As mesmas foram moídas em moinho de facas obtendo-se: *M. amacurensis* (1.000 g), *M. ciliata* (2.000 g), *M. holosericea* (1.800 g), *M. hypoleuca* (1.200 g), *M. minutiflora* (2.000 g), *M. mirabilis* (331 g), *M. prasina* (2.000 g). O material de cada espécie foi extraído segundo a Figura 05, por maceração num período de 7 dias em temperatura ambiente e protegida da luz. Os solventes utilizados foram hexano, acetato de etila e metanol.

Figura 05: Fluxograma da metodologia de extração das espécies de *Miconia* estudadas



4.3 Atividade Antimicrobiana

4.3.1 Microrganismos

As linhagens de bactérias e do fungo leveduriforme utilizados foram obtidos da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Para este ensaio foram utilizadas quatro bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 06), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138); três bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Serratia*

marcescens (UFPEDA 398) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39); uma álcool-ácido-resistente: *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71) e a levedura *Candida albicans* (UFPEDA 1007).

4.3.2 Método de difusão em disco

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pela metodologia de difusão em ágar, utilizando discos de papel de filtro com diâmetro de 6 mm, conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) para se conhecer o perfil de atividade dos extratos. Para este ensaio foram utilizados alíquotas de 10 µL dos extratos na concentração de 300 mg/mL para impregnar os discos de papel. Os extratos hexânico e acetato de etila foram solubilizados em DMSO/água destilada estéril e o metanólico em água destilada estéril e então esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm. Uma suspensão do microrganismo-teste ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) para bactérias e ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL) para leveduras foi determinada através da comparação visual com um padrão na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland e 0,1 mL foi espalhado sobre a superfície de meio sólido AMH (Ágar Müller–Hinton) em placa de Petri de (15 x 90 mm). Posteriormente foram adicionados sobre as placas inoculadas os discos impregnados com os extratos. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para bactérias e a 28 °C por 48 h para leveduras. Após incubação foram realizadas as medições dos halos de inibição do crescimento microbiano quantificado em mm. Como controle positivo se utilizou eritromicina para bactérias e nistatina para leveduras. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os mesmos repetidos duas vezes.

4.3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

Após conhecer o perfil de inibição dos extratos, foi realizado o ensaio de susceptibilidade pela metodologia da microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) segundo o *National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS* (2002; 2003). A determinação da CIM foi feita em placas de 96 poços estéreis, próprias para microdiluição.

Inicialmente, foi adicionado em cada poço 90 µL do meio Caldo Muller Hinton (CMH) e posteriormente, a partir da terceira coluna (A3), adicionou-se 90 µL do extrato na concentração de 16 mg/mL. Esta alíquota foi homogeneizada e transferida para a quarta coluna (A4) e assim por diante até a décima segunda coluna (A12), que recebe o extrato na concentração de 0,03 mg/mL. Esta última alíquota (90 µL) depois de homogeneizada é descartada. Por último, foi adicionado 10 µL da suspensão do microrganismo preparada conforme o método anterior. Logo, cada poço recebeu como volume final de 100 µL (90 µL de meio e extrato e 10 µL do microrganismo). As placas com o meio, extrato e microrganismo foram incubadas por 24 horas (37 °C) para bactérias e 48 horas (28 °C) para leveduras. Posteriormente foram adicionados 30 µL de rezasurina (0,1 mg/mL) para análise quantitativa do crescimento microbiano nos poços e determinação da atividade antimicrobiana relativa de cada diluição das amostras. Para a determinação da CMM repicou-se uma alíquota de 5 µL, das concentrações que apresentaram atividade na placa do CIM, em placas de Petri contendo AMH. Estas placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para bactérias e 28 °C por 48 horas para leveduras. A CMM foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do AMH.

4.4 Atividade citotóxica

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium], que se baseia na capacidade da enzima succinato desidrogenase, presente no ciclo de Krebs e ativa nas mitocôndrias viáveis para converter o sal tetrazolium, de cor amarela em cristais de formazan, de cor purpura (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983).

As linhagens de células utilizadas foram NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HEp-2 (carcinoma de laringe humana), J774.A1 e RAW 264.7 (macrófagos murinos) mantidas em meio de cultura Meio Eagle Modificado por Dulbecco, HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e MCF-7 (câncer de mama humano) mantidas em meio de cultura Meio Roswell Park Memorial Institute. Os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % da solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida as amostras dissolvidas em DMSO (1 %) foram adicionadas aos poços na concentração final de 50 µg/mL. Após 72 h de reincubação foram adicionados 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a porcentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism* 5.0.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras com atividade relevante (95 a 100 % de inibição), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 70 a 95 %) e sem atividade (inibição de crescimento menor que 70 %) (RODRIGUES et al., 2014).

4.5 Perfil fitoquímico em cromatografia

A análise do perfil fitoquímico foi feita por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) segundo WAGNER e BLADT (2001) e WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al., (2008). Como fase estacionária foram utilizadas placas com sílica gel F₂₅₄ e como fase móvel hexano, acetato de etila e metanol nas proporções: extrato hexânico (Hex:AcOEt-7:3), extrato acetato de etila (Hex:AcOEt-6:4), e extrato metanólico (Hex:AcOEt:MeOH-2:6:2).

Os extratos na concentração de 5 mg/mL foram aplicados na base da placa de sílica e colocados para eluir na cuba cromatográfica com os eluentes. As placas com determinados reveladores (tabela 03) foram observadas em câmara ultravioleta nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm e os aspectos visíveis foram desenhados, outros reveladores exigiram aquecimento a 100 °C até o aparecimento das bandas coloridas que foram observadas no visível e ultravioleta.

Tabela 03: Classes de metabólitos e os respectivos reveladores do perfil fitoquímico

CLASSE	REVELADOR	COLORAÇÃO	UV/VIS
Alcaloides	Dragendorff	Laranja	VIS
	Mayer	Branco	VIS
	Wagner	Marrom	VIS
Antraquinonas	KOH 5%	Laranja-avermelhadas	UV/VIS
	KOH 5%	Verde-azuladas	UV/VIS
Cumarinas	AlCl ₃	Amarelo-esverdeado	UV
	Anisaldeído-sulfúrico	Amarelo	VIS
	Sulfato cérico	Amarelo	VIS
Flavonoides	Anisaldeído sulfúrico	Vermelho-amarronzadas	VIS
Óleos essenciais	Liebermann-Burchad	Rosa/roxo: triterpenos, Azul/verde: esteroides	VIS
	Vanilina-sulfúrica	Roxo: terpenos	VIS
Taninos	FeCl ₃	Preto	VIS

AlCl₃: cloreto de alumínio, FeCl₃: cloreto férrego, KOH: hidróxido de potássio.

4.6 Estudo químico

O isolamento dos compostos dos extratos ativos foi realizado por métodos cromatográficos. Para os extratos hexânicos foram realizadas cromatografias em coluna aberta com fase fixa sílica gel 60 G (70-230 mesh) e fase móvel hexano:acetato de etila em modo gradiente de polaridade crescente, isto tanto para os extratos como para as frações obtidas.

Para o extrato acetato de etila foi realizada inicialmente uma cromatografia em coluna aberta com fase estacionária composta por Sephadex LH 20 e MeOH como fase móvel. Posteriormente as frações obtidas foram submetidas a sucessivas cromatografias em coluna com sílica gel 60 G (70-230 mesh), utilizando-se como fase móvel hexano, acetato de etila e metanol em diferentes proporções.

Além da cromatografia em coluna empregou-se no isolamento dos compostos a recristalização das frações que se apresentaram semi-purificadas e a cromatografia em camada delgada para monitorar as frações obtidas da coluna, como também para certificar o isolamento dos compostos.

A análise estrutural dos compostos isolados foi realizada por métodos espectrométricos: ¹H-RMN e ¹³C-RMN e espectrometria de massas. Os espectros de ¹H-RMN foram obtidos a 300 MHz e os de ¹³C-RMN a 75 MHz em um aparelho Varian Unity Plus-300. O TMS foi utilizado como padrão interno. As análises foram realizadas na central analítica do Departamento de Química Fundamental da

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

A análise da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas foi realizada na central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) em um cromatógrafo gasoso modelo CG-ms QP5050 A, marca Shimadzu, com fonte impacto de elétrons e analisador quadrupolo. As colunas utilizadas foram CarbolWAX e 5 %metil-fenil silicone. As condições de corrida foram: temperatura do forno 70 °C com um aumento de 4 °C/min até 280 °C, quando alcançada a temperatura a mesma foi mantida durante 15 min. O gás transportador foi hélio, com uma velocidade de fluxo constante de 1,4 mL/min. A temperatura da fonte de ionização foi mantida a 280 °C, a energia de ionização 70 eV e a corrente de ionização 0,7 kV. Os espectros de massa foram registados em 30-450 m/z.. Os componentes individuais foram identificados pelo seu espectro de massa correspondentes a 70 eV.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos extratos

Os extratos obtidos pela maceração têm seus rendimentos apresentados na Tabela 04. Avaliando as espécies observa-se um comportamento uniforme da maioria, com exceção para *M. ciliata* e *M. prasina* que tiveram rendimento superior comparadas com as demais. Analisando outros trabalhos com *Miconias* extraídas por maceração pode-se inferir que estes resultados estão de acordo com a literatura uma vez que Cunha et al. (2003a) trabalhando com *M. ligustroides* obteve os rendimentos: extrato hexânico (0,8 %), diclorometano (0,5 %) e etanólico (1,1 %). Já Barroso (2015) trabalhando com *M. ferruginata* obteve os rendimentos: extrato hexânico (5 %), acetato de etila (1,6 %).

Tabela 04: Rendimento dos extratos das espécies de *Miconia* estudadas

Espécie vegetal/extrato	Hex (%)	AcOEt (%)	MeOH (%)
<i>M. amacurensis</i>	0,6	2,3	3,2
<i>M. ciliata</i>	2,5	4,0	6,0
<i>M. holoserícea</i>	0,8	1,8	3,3
<i>M. hypoleuca</i>	0,7	1,3	3,7
<i>M. minutiflora</i>	0,7	1	3,3
<i>M. mirabilis</i>	0,5	0,8	4,1
<i>M. prasina</i>	2	1,7	7,7

Hex: hexano, AcOEt: acetato de etila, MeOH: metanol.

5.2 Atividade antimicrobiana

A Tabela 05 apresenta os halos de inibição em milímetros para o crescimento dos microrganismos testados com os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico das sete espécies de *Miconia*. A partir dos resultados obtidos, observa-se que o extrato hexânico não foi ativo, contudo pode-se inferir que esta falta de atividade está relacionada às limitações do método e não propriamente a ausência de compostos com esta propriedade. Esta é a maior limitação do ensaio, visto que o meio em que a substância teste deve se difundir é um meio polar e o extrato hexânico é apolar, logo há uma má difusão do extrato no meio, então estes extratos se restringem ao disco, não inibindo o crescimento do microrganismo e com isso não apresentando atividade.

Tabela 05: Halos de inibição em milímetros (mm) dos extratos de espécies de *Miconia* frente a microrganismos

Microrganismo /Extrato	GRAM-POSITIVO				GRAM-NEGATIVO			AAR	FUNGO
	01	06	16	138	39	224	398	71	1007
<i>M. amacurensis</i> hexano	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. ciliata</i> hexano	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. holoserícea</i> hexano	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. hypoleuca</i> hexano	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. minutiflora</i> hexano	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. mirabilis</i> hexano	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. prasina</i> hexano	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<hr/>									
<i>M. amacurensis</i> AcOEt	9,7 ±0,6	13,3 ±0,6	12,3 ±0,6	ND	ND	ND	ND	12,3 ±0,6	
<i>M. ciliata</i> AcOEt	18,3 ±0,3	23,1 ±0,3	12,5 ±1,0	ND	15,3 ±0,3	ND	ND	21,7 ±0,3	23,1 ±1,0
<i>M. holoserícea</i> AcOEt	13,3 ±0,6	17,7 ±0,6	11,3 ±1,2	ND	ND	ND	ND	ND	16,0 ±1,0
<i>M. hypoleuca</i> AcOEt	12,3 ±0,6	15,3 ±1,5	8,00 ±0,0	ND	ND	ND	ND	ND	13,3 ±0,6
<i>M. minutiflora</i> AcOEt	10,7 ±1,2	16,0 ±1,0	9,3 ±0,6	ND	ND	ND	ND	ND	12,7 ±0,6
<i>M. mirabilis</i> AcOEt	14,7 ±0,6	14,3 ±0,6	10,7 ±0,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. prasina</i> AcOEt	13,3 ±0,6	20,0 ±1,0	12,3 ±1,2	ND	ND	ND	ND	12,7 ±0,6	24,7 ±0,6
<hr/>									
<i>M. amacurensis</i> MeOH	19,7 ±0,6	24,7 ±0,6	10,0 ±1,0	ND	13,0 ±1,0	ND	ND	24,7 ±0,6	20,7 ±1,2
<i>M. ciliata</i> MeOH	20,3 ±0,3	22,7 ±0,3	8,3 ±0,3	ND	11,6 ±0,3	ND	ND	9,3 ±0,6	12,7 ±1,0
<i>M. holoserícea</i> MeOH	19,7 ±0,6	22,3 ±0,6	9,3 ±0,6	ND	12,0 ±0,0	ND	ND	24,7 ±0,6	22,7 ±0,6
<i>M. hypoleuca</i> MeOH	20,0 ±0,0	23,7 ±0,6	12,0 ±2,0	ND	12,0 ±0,0	ND	ND	23,7 ±1,2	19,3 ±1,5
<i>M. minutiflora</i> MeOH	13,7 ±0,6	22,0 ±0,0	12,3 ±0,6	ND	8,7 ±0,6	ND	ND	16,3 ±0,6	21,7 ±1,5
<i>M. mirabilis</i> MeOH	14,0 ±0,0	24,3 ±0,6	13,0 ±0,0	ND	ND	ND	ND	21,3 ±1,2	22,0 ±0,0
<i>M. prasina</i> MeOH	7,3 ±0,6	14,7 ±1,1	8,7 ±1,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND

01: *S. aureus*, 06: *M. luteus*, 16: *B. subtilis*, 138: *E. faecalis*, 39: *P. aeruginosa*, 224: *E. coli*, 398: *S. Marcencens*, 71: *M. smegmatis*, 1007: *C. Albicans*, Hex: hexano, AcOEt: acetato de etila, MeOH: metanol, ND: não detectado.

A atividade dos extratos metanólicos foi superior em número de espécies inibidas e também mostraram maior espectro de atividade, pois conseguiram inibir o crescimento de bactérias gram-positivas (*S. aureus*, *M. luteus* e *B. subtilis*), gram-negativa (*P. aeruginosa*), álcool-ácido-resistente (*M. smegmatis*) e fungo leveduriforme (*C. albicans*), enquanto que o extrato acetato de etila foi ativo no

geral apenas frente as bactérias gram-positivas.

No teste de difusão em ágar, o diâmetro do halo de inibição não foi considerado para o estudo, já que a metodologia da difusão em ágar com disco de papel foi utilizada apenas como parâmetro para determinar o perfil de inibição dos extratos. Logo todos os microrganismos que foram inibidos pela difusão em ágar com disco de papel foram avaliados pela metodologia de microdiluição para determinação da sua CMI e CMM.

A Tabela 06 apresenta a CMI e a CMM dos extratos das sete espécies de *Miconia*. Observa-se que os extratos mostraram atividade frente a todos os microrganismos testados o que contrasta com os resultados da difusão em que somente os extratos mais polares foram ativos.

Tabela 06: Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Microbicina (CMM) em mg/mL dos extratos de espécies de *Miconia*.

CIM/CMM Microrgan. /Extrato	GRAM POSITIVA				AAR* 71	FUNGO 1007
	01	06	16	39		
<i>M. amacurensis</i> Hexano	1/8	2/8	1/16	2/8	1/2	1/2
<i>M. ciliata</i> Hexano	2/2	0,12/0,5	2/8	0,5/2	2/4	2/8
<i>M. holoserícea</i> Hexano	0,25/4	2/4	0,12/0,25	4/16	1/8	1/2
<i>M. hypoleuca</i> Hexano	2/16	0,5/8	1/8	2/8	1/2	1/4
<i>M. minutiflora</i> Hexano	2/8	1/8	1/8	2/4	2/8	2/4
<i>M. mirabilis</i> Hexano	1/8	0,5/4	0,5/4	1/8	0,5/2	2/2
<i>M. prasina</i> Hexano	0,5/8	1/8	0,5/4	1/4	1/2	1/4
<hr/>						
<i>M. amacurensis</i> AcOEt	0,5/8	0,06/0,25	0,25/1	1/2	0,5/1	0,5/1
<i>M. ciliata</i> AcOEt	0,25/1	0,06/0,12	2/2	0,25/1	0,5/4	1/4
<i>M. holoserícea</i> AcOEt	0,25/4	0,25/2	2/16	2/16	1/2	1/2
<i>M. Hypoleuca</i> AcOEt	½	1/8	1/32	2/4	0,5/1	2/2
<i>M. minutiflora</i> AcOEt	1/16	2/8	1/16	2/4	0,25/1	1/2
<i>M. mirabilis</i> AcOEt	1/8	2/16	2/8	0,5/2	2/4	2/4
<i>M. prasina</i> AcOEt	0,25/2	0,06/0,5	0,25/2	1/2	0,5/0,5	0,12/1
<hr/>						
<i>M. amacurensis</i> MeOH	0,25/2	0,25/0,25	2/2	0,5/1	0,25/0,25	0,5/1
<i>M. Ciliata</i> MeOH	0,25/0,25	0,06/0,12	4/8	0,5/2	2/8	1/4
<i>M. holoserícea</i> MeOH	0,25/4	0,06/2	2/4	0,5/2	0,25/0,5	0,5/8
<i>M. Hypoleuca</i> MeOH	0,25/2	1/2	2/4	0,5/0,5	0,5/0,5	1/2

<i>M. minutiflora</i> MeOH	0,5/1	1/8	4/4	1/1	0,5/0,5	1/8
<i>M. mirabilis</i> MeOH	0,5/2	0,06/1	1/1	0,5/0,5	0,25/0,5	0,5/2
<i>M. prasina</i> MeOH	2/4	2/8	8/32	8/16	8/16	16/16

01: *S. aureus*, 06: *M. luteus*, 16: *B. subtilis*, 138: *E. faecalis*, 39: *P. aeruginosa*, 224: *E. coli*, 398: *S. Marcencens*, 71: *M. smegmatis*, 1007: *C. Albicans*, Hex: hexano, AcOEt: acetato de etila, MeOH: metanol, AAR: álcool-acido resistente.

Analizando-se de maneira geral não é possível definir uma polaridade de extrato que se sobressai sob os demais, mas com relação a morfologia microbiana pode se inferir que as bactérias gram-negativas foram inibidas em concentrações superiores quando comparadas as gram-positivas.

Segundo diversos autores em microbiologia dentre eles Rios e Recio (2005) um extrato pode ser considerado promissor para futuros estudos de investigação quando se apresenta ativo numa concentração inferior a 0,1 mg/mL, logo a partir deste parâmetro destacam-se os extratos em acetato de etila de *M. amacurensis*, *M. ciliata* e *M. prasina* que se mostraram ativos numa concentração de 0,06 mg/mL frente a *M. luteus*, como também os extratos metanólicos de *M. ciliata*, *M. holosericea* e *M. mirabilis* ativos frente ao mesmo microrganismo nesta concentração.

Comparando os resultados obtidos com outras espécies de *Miconia*, pode-se perceber uma atividade superior da maioria das *Miconias* avaliadas neste estudo, uma vez que estas apresentaram CMI inferior a 1 mg/mL frente a maioria dos microrganismos. Contudo os trabalhos que avaliaram a atividade antimicrobiana de miconias geralmente obtiveram CMI igual ou superior a este valor como nos casos de *M. Cabucu*, *M. stenotachya* e *M. rubiginosa* (BUSSMANN et al., 2010, RODRIGUES et al., 2008).

5.3 Atividade Citotóxica

A Tabela 07 apresenta o resultado da avaliação da citotoxicidade dos extratos de espécies de *Miconia* frente as linhagens de células tumorais humanas HEp-2 (carcinoma de laringe humana), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HL-60 (leucemia promielocitica aguda), MCF-7 (câncer de mama) e as linhagens de macrófagos murinos (J774.A1 e RAW 264.7).

Todos os extratos testados apresentaram atividade frente a uma linhagem

cancerígena, pois segundo a escala empregada todos inibiram alguma linhagem com valores de inibição variando entre 70 a 90 %, o que se configura como atividade moderada.

Comparando as linhagens cancerígenas observa-se que os extratos acetato e hexano de todas as espécies avaliadas foram mais ativos frente a HEp-2, pois todos inibiram esta linhagem com porcentagem de inibição superior a 70 %. Já a linhagem HL-60 também se mostrou sensível a maioria destes extratos, pois apenas o extrato hexano de *M. prasina* e *M. minutiflora* inibiram o crescimento desta linhagem em porcentagem inferior a 70 %.

Tabela 07: Avaliação da citotoxicidade de extratos de espécies de *Miconia* frente a linhagens de células cancerígenas e macrófagos murinos

Extrato	% de inibição					
	NCI-292	HL-60	MCF-7	HEP-2	J774.A1	RAW 264.7
<i>M. amacurensis</i> Hexano	22,70	71,37	50,72	90,87	35,40	49,98
<i>M. holosericea</i> Hexano	58,16	95,43	76,17	91,67	91,50	73,81
<i>M. hypoleuca</i> Hexano	75,67	99,54	39,74	92,31	27,70	NT
<i>M. minutiflora</i> Hexano	16,12	48,74	50,38	88,07	32,50	74,73
<i>M. mirabilis</i> Hexano	32,83	89,77	58,27	89,69	35,20	69,13
<i>M. prasina</i> Hexano	23,03	61,05	56,06	93,76	31,40	55,74
<i>M. amacurensis</i> AcOEt	27,70	91,79	51,36	89,00	78,40	90,44
<i>M. holosericea</i> AcOEt	60,26	94,82	72,62	92,17	90,40	98,78
<i>M. hypoleuca</i> AcOEt	86,49	100,00	30,84	93,02	69,10	NT
<i>M. minutiflora</i> AcOEt	91,35	96,57	43,44	95,16	84,40	92,85
<i>M. mirabilis</i> AcOEt	18,49	90,13	68,02	91,55	88,60	96,05
<i>M. Prasina</i> AcOEt	20,86	93,46	62,20	89,84	73,80	87,04
<i>M. amacurensis</i> MeOH	33,42	32,69	62,54	28,80	55,60	19,58
<i>M. holosericea</i> MeOH	53,03	100,00	42,48	82,39	26,20	54,96
<i>M. hypoleuca</i> MeOH	65,56	68,67	40,80	56,73	49,70	NT
<i>M. minutiflora</i> MeOH	12,83	32,42	37,56	47,62	8,80	36,50
<i>M. mirabilis</i> MeOH	22,37	19,52	39,37	24,88	31,40	9,85
<i>M. Prasina</i> MeOH	22,37	8,07	48,30	30,79	61,10	35,73

HEp-2 (carcinoma de laringe humana), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e MCF-7 (câncer de mama), J774.A1, RAW 264.7 (macrófagos murinos); Hex: hexano, AcOEt: acetato de etila, MeOH: metanol, NT: não testado.

As demais linhagens por outro lado só foram inibidas com porcentagem superior a 70 % pelo extrato hexânico em uma única espécie vegetal e pelo extrato acetato em duas espécies. Pode se atribuir tal fato a resistência natural de determinada linhagem frente aos agentes testados.

Com relação as linhagens celulares de macrófagos murinos pode se perceber no geral uma menor inibição no crescimento destas células quando comparadas as linhagens cancerígenas, já que ficou claro nos extratos hexânico e metanólico valores de inibição inferiores a 70 % em praticamente todas as espécies e isto é indicativo de baixa toxicidade destes extratos.

Avaliando os extratos por polaridade pode se perceber uma clara atividade superior dos extratos hexânico e acetato, já que apenas o extrato metanólico de *M. holosericea* conseguiu inibir o crescimento de, pelo menos, duas linhagens cancerígenas com porcentagem superior a 70 %. Pode se atribuir tal fato a presença majoritária dos terpenos encontrados no perfil fitoquímico dos extratos hexânico e acetato.

Dentre os resultados apresentados observa-se que se destacam as espécies *M. holosericea* e *M. hypoleuca*, pois as mesmas conseguiram inibir o crescimento de três linhagens cancerígenas tanto no extrato hexânico quanto no extrato acetato.

5.4 Perfil fitoquímico

A Tabela 08 apresenta as classes de compostos presentes nos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico das espécies de *Miconia* estudadas.

A partir do perfil apresentado e dos trabalhos realizados com o gênero *Miconia* pôde-se perceber uma tendência na biossíntese das determinadas classes de metabólitos secundários no gênero, e isto fica evidente por que nenhuma espécie apresentou alcaloides e saponinas em nenhum extrato. Por outro lado, todas apresentaram terpenoides no extrato hexânico e cumarinas no extrato acetato. Praticamente todas as espécies apresentaram taninos e flavonoides no extrato metanólico.

Com relação a variedade de compostos de uma mesma classe, observou-se um claro padrão na biossíntese de diversos terpenoides que se apresentaram sob a forma de diversas manchas com *Rf* distintos, mas que tinham em comum a presença da coloração referente aos terpenos com os reveladores específicos.

Tabela 08: Perfil fitoquímico dos extratos de espécies de *Miconia*

Ext/composto	Alcaloide	quinona	Cumarina	Flavonoide	Tanino	Terpenoide	Saponina
<i>M. amacurensis</i>							
Hexano	-	-	-	-	-	++	-
AcOEt	-	-	+	+	-	+	-
MeOH	-	-	-	+	+	-	-
<i>M. ciliata</i>							
Hexano	-	-	-	-	-	++	-
AcOEt	-	-	-	-	-	++	-
MeOH	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. holosericea</i>							
Hexano	-	-	-	-	-	++	-
AcOEt	-	-	+	+	+	+	-
MeOH	-	-	-	+	+	-	-
<i>M. hypoleuca</i>							
Hexano	-	-	+	-	-	++	-
AcOEt	-	-	+	+	-	+	-
MeOH	-	-	-	+	+	-	-
<i>M. minutiflora</i>							
Hexano	-	-	-	-	-	++	-
AcOEt	-	-	+	-	-	+	-
MeOH	-	-	-	+	+	-	-
<i>M. mirabilis</i>							
Hexano	-	-	-	-	-	+	-
AcOEt	-	-	+	-	-	+	-
MeOH	-	-	-	+	+	+	-
<i>M. prasina</i>							
Hexano	-	-	-	-	-	+	-
AcOEt	-	-	+	+	-	+	-
MeOH	-	-	-	+	+	+	-

Hex: hexano, AcOEt: acetato de etila, MeOH: metanol; ND: não foi detectada a presença desta classe de compostos, PRES: o extrato apresentou esta classe de compostos.

Estes dados estão de acordo a literatura, uma vez que vários artigos com espécies de *Miconia* mostram clara tendência ao isolamento de esteroides e triterpenos como, por exemplo, em Chan et.al. (1992) no qual foram isolados três triterpenos de *M. stenotachia*. Macari et al. (1990) isolaram outros três triterpenos diferentes de *M. albicans*, ou ainda no trabalho descrito por Crevelin et al. (2006)

em que foram isolados nove triterpenos e esteroides de cinco espécies de *Miconia*.

5.5 ESTUDO QUÍMICO

A partir dos resultados das atividades biológicas escolheu-se as espécies *M. holosericea* e *M. hypoleuca* para dar prosseguimento no estudo químico. Esta escolha justifica-se por que ambas apresentaram melhores resultados na atividade citotóxica ou na atividade antimicrobiana comparando com as demais espécies de *Miconia*.

5.5.1 *Miconia hypoleuca*

5.5.1.1 *Extrato hexânico*

O fracionamento do extrato em hexano foi realizado por cromatografia líquida em coluna aberta recheada com sílica gel, obtendo-se 130 frações (Figura 06, pág. 55). Em seguida, as frações semelhantes foram reunidas após análise por CCD, o que resultou em 49 frações e destas após purificação, obtiveram-se 17 frações. As frações que tinham peso superior a 50 mg, foram avaliadas quanto a sua capacidade de inibir o crescimento de linhagens de células cancerígenas, o resultado desta análise encontra-se na Tabela 09.

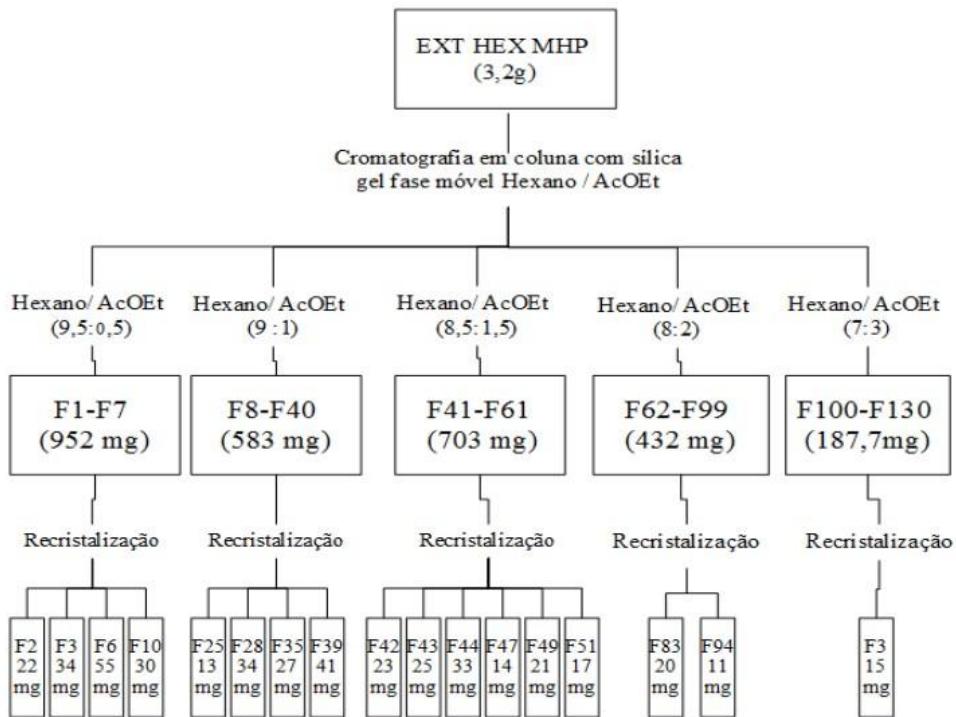
As 07 frações foram purificadas dando origem a 8 triterpenos e 3 esteroides, alguns destes já foram identificados e os demais estão em fase de identificação por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM).

Tabela 09: Avaliação da citotoxicidade das frações do extrato hexânico de *M. hypoleuca* frente a linhagens de células cancerígenas

<i>Miconia hypoleuca</i>	Linhagem/ Fração	MCF-7	NCI-H292	HEP-2	HL-60	J774
<i>Miconia hypoleuca</i>	HP 42	48,8	72,4	92,6	78,7	13,7
	HP 43	75,2	66,2	91,8	78,9	10,7
	HP 44	101,7	64,5	95,0	97,5	97,5
	HP 47	100,2	53,1	93,8	97,5	97,2
	HP 49	21,8	66,2	99,0	75,8	13,7
	HP 51	72,5	66,0	86,6	78,7	85,3
	HP 129	36,4	72,0	93,4	10,1	21,9

HEp-2 (carcinoma de laringe humana), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e MCF-7 (câncer de mama).

Figura 06: Fluxograma de fracionamento do extrato hexânico de *M. hypoleuca*



5.5.1.1.1 Elucidação estrutural dos compostos isolados

5.5.1.1.1.1 Fração 42

A fração 42 (23 mg) se apresentou como um sólido branco, solúvel em acetato de etila e que sob a Cromatografia em Camada Delgada apresentou-se como uma banda de coloração roxa e róseo-avermelhada nos reveladores anisaldeído e Liebermann-Burchadd, respectivamente, indicativa da presença de terpeno.

O composto presente nesta fração foi identificado por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) em comparação com dados da literatura.

O cromatograma obtido da cromatografia gasosa apresentou 4 picos majoritários (Apêndice A, pag. 85) e um tinha perfil de triterpeno com base em seu espectro de massas é ele o pico 19 com tempo de retenção de 68,8 minutos.

O pico 19 apresentou os fragmentos característicos e intensidades m/z 426 (5), m/z 411 (1), m/z 408 (0,7), m/z 393 (1), m/z 218 (100), m/z 203 (25), m/z 189

(24), m/z 133 (24), m/z 207 (12). O pico do íon molecular foi encontrado em m/z 426 seguido do pico m/z 411 [M-15] indicativo da perda de metila, do pico m/z 408 [M-18] indicativo da perda de água, do pico m/z 393 [M-15-18] indicativo da perda de metila e água, o pico base m/z 218 se deve a presença dos anéis CDE do fragmento A (Figura 07) seguido do pico m/z 203 referente ao fragmento 218-15, com a perda da metila em C-17 mais os picos m/z 189 [203-18] e m/z 133 são indicativos segundo Budzikiewicz (1963) e Djerassi (1962) de triterpenos do tipo oleanano e ursano insaturados em C-12 e com substituição apenas em C-17 (Figura 07, fragmento A).

O pico m/z 207 neste caso está relacionado aos anéis AB (Figura 08, fragmento A) dos triterpenos e está substituído com a hidroxila em C-3, a presença do pico m/z 393 indicando a perda de água contribui com esta afirmação. Logo a partir do exposto trata-se de uma amirina, e neste caso o que vai diferenciá-las é apenas a intensidade dos picos m/z 203 e m/z 189 e comparando os com dados com a literatura pode se perceber que na α -amirina os picos têm a mesma intensidade como pode ser observado. Logo este composto é o urs-12-en-3-ol que é a α -amirina (Figura 08) cuja formula molecular é $C_{30}H_{50}O$ e a massa 426 (FINGOLO et al., 2013).

Os triterpenos do tipo ursano, oleananos e lupanos são considerados agentes promissores para o tratamento do câncer, uma vez que tem boa atividade anticâncer e baixa toxicidade (VECHIA et al., 2009).

Dentre os triterpenos, o composto isolado nesta fração, a α -amirina é comum no reino vegetal e possui diversas atividades biológicas já descritas. Na literatura destacam-se a atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, anti-úlcera, tripanocidal, gastroprotetora, antialérgica e anti-nociceptiva. A α -amirina, já foi isolada anteriormente em espécies de *Miconia*: *M. albicans*, *M. cabucu*, *M. ligustroides*, *M. pepericarpa*, *M. rubiginosa* e *M. sellowiana* (CUNHA et al., 2003a; CREVELIN et al., 2006; PIERONI et al., 2011; VÁZQUEZ, 2012).

Com relação à atividade citotóxica da fração 42 a mesma apresentou inibição frente a três linhagens de células cancerígenas e ao mesmo tempo mostrou baixa toxicidade à linhagem de macrófagos murinos. Contudo, esta fração apresentou como terpeno apenas α -amirina que já tem seu potencial citotóxico bem documentado e considerado baixo quando comparado aos seus derivados (BARROS et al., 2011; LASZCZYK, 2009).

Figura 07: Esquema geral da fragmentação de triterpenos pentaciclicos do tipo ursano e oleanano e os fragmentos comuns obtidos

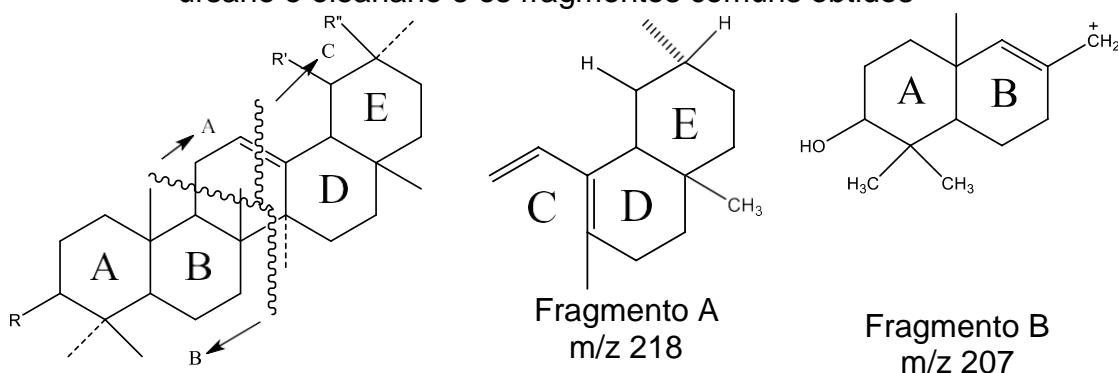
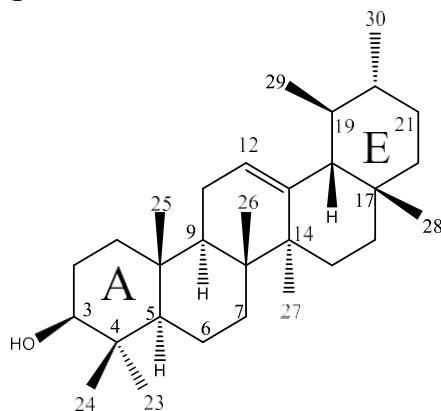


Figura 08: Estrutura da α -amirina



5.5.1.1.2 Fração 43

A fração 43 (25 mg) apresentou-se como um sólido branco, solúvel em acetato de etila e mostrou sob a cromatografia em camada delgada a presença de três bandas de coloração roxa e róseo-avermelhada nos reveladores anisaldeído e Liebermann-Burchard respectivamente, indicativo da presença de terpenos.

Estes compostos foram identificados por Espectrometria de Massas (EM). O cromatograma obtido da cromatografia gasosa apresentou 5 picos majoritários (Apêndice A, pag. 86) e três tinham perfil de triterpenos com base em seus espectros de massas são eles os picos 25, 27 e 41 com tempo de retenção de 66,5, 66,9 e 68,8 minutos respectivamente.

O pico 25 apresentou os fragmentos principais e intensidades m/z 426 (3), m/z 411 (1), m/z 408 (1), m/z 393 (1), m/z 218 (100), m/z 207 (7), m/z 203 (58), m/z 189 (21), m/z 133 (13). O pico do íon molecular foi encontrado em m/z 426 seguido

do pico m/z 411 [M-15] indicativo da perda de metila, do pico m/z 408 [M-18] indicativo da perda de água, do pico m/z 393 [M-15-18] indicativo da perda de metila e água, mais a presença do pico base m/z 218 referente, segundo Budzikiewicz (1963) e Djerassi (1962), ao fragmento correspondente aos anéis CDE (Figura 07, fragmento A), o pico m/z 203 referente ao fragmento [A-15], que é perda da metila em C-17, m/z 189 [203-18] e m/z 133 característicos de um triterpeno insaturado em C-12 do tipo oleano e ursano com substituição apenas em C-17 (Figura 07, fragmento A).

Outro pico importante presente é o m/z 207 relacionado aos anéis AB (Figura 07, fragmento B) dos triterpenos e está substituído com a hidroxila em C-3, a presença do pico m/z 393 indicando a perda de água contribui com esta afirmação.

Logo a partir dos dados pode-se inferir que se trata de uma amirina, e neste caso o que vai diferenciá-las é apenas a intensidade dos picos m/z 203 e m/z 189, na β -amirina o m/z 203 é duas vezes mais intenso que o m/z 189 (FINGOLO et al., 2013). Portanto este composto é Olean-12-en-3-ol ou β -amirina (Figura 09) cuja fórmula molecular é $C_{30}H_{50}O$ e a massa 426.

O pico 27 apresentou os fragmentos principais e intensidades m/z 424 (9), m/z 409 (5), m/z 218 (91), m/z 203 (29), m/z 189 (24), m/z 133 (24), m/z 205 (11). A presença do íon molecular em m/z 424, seguida da presença do pico m/z 409 [M-15] da perda da metila e da presença dos picos característicos m/z 218 (Figura 07, fragmento A), m/z 203 [218-15] (Figura 07, fragmento A), m/z 189 [203-18], e m/z 133 característicos de um triterpeno insaturado em C-12 do tipo oleano e ursano.

Outro pico importante presente é o m/z 205 relacionado aos anéis AB (Figura 07, fragmento B) dos triterpenos e somado a ausência de um pico com perda de água mais a presença do íon molecular m/z 424 indicam a ausência de uma hidroxila no carbono-3 e isso sugere se tratar do composto Urs-12-en-3-ona que é a α -amirona (Figura 09) de fórmula molecular $C_{30}H_{48}O$ e a massa 424.

O pico 41 apresentou os fragmentos principais e intensidades m/z 426 (3), m/z 411 (1), m/z 393 (1), m/z 218 (100), m/z 203 (58), m/z 189 (21), m/z 133 (13) estes picos e comparação com a literatura indicam se tratar novamente da α -amirina (Figura 09).

A α -amirina também foi identificada por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) através de 1H RMN e ^{13}C RMN. A análise do espectro de 1H RMN (Apêndice B, pag. 90) apresentou indícios da presença de triterpenos como

o multiplo em 3,48 ppm característico da presença de hidrogênio de carbono carbinólico (C-3), um multiplo em 5,24 ppm característico de hidrogênios de olefinas, além de uma grande concentração de sinais entre 0,8 e 2,1 ppm.

O espectro de ^{13}C RMN (Apêndice B, pag. 91) confirmou o indicativo da presença de triterpeno com a presença de trinta sinais e dentre eles a presença do carbono carbinólico (C-3) em 78,2 ppm, a presença da dupla entre C-12 e C-13, com sinais característicos de esqueletos do tipo ursano em 125,0 e 139,9 ppm. Isto comparado aos dados da literatura contidos na tabela 10 confirmam que o composto isolado é a α -amirina (Figura 09).

A β -amirina, já foi isolada anteriormente nas espécies de *Miconia*: *M. albicans*, *M. cabucu*, *M. ligustroides*, *M. pepericarpa*, *M. rubiginosa* e *M. sellowiana* (CUNHA et al., 2003a; CREVELIN et al., 2006; PIERONI et al., 2011, VÁZQUEZ, 2012).

A α -amirona nunca foi isolada no gênero *Miconia*, em Melastomataceae ela foi isolada pela primeira vez na espécie *Marcetia velutina*, apesar de fazer parte da via biossintética da α -amirina, este composto é incomum e por isso não há estudos sobre o potencial citotóxico do mesmo (LEITE, 2009).

Como esta fração apresentou resultados da citotoxicidade similares a fração 42, apenas a linhagem MCF7 foi inibida em porcentagem superior, não está claro se esta atividade se deve a α -amirona ou a α -amirina, contudo esta fração é também interessante, pois inibiu três linhagens de células cancerígenas com porcentagem superior a 70 % e ao mesmo tempo não foi tóxica à linhagem de macrófagos murinos.

Figura 09: Estrutura dos compostos isolados da fração 43

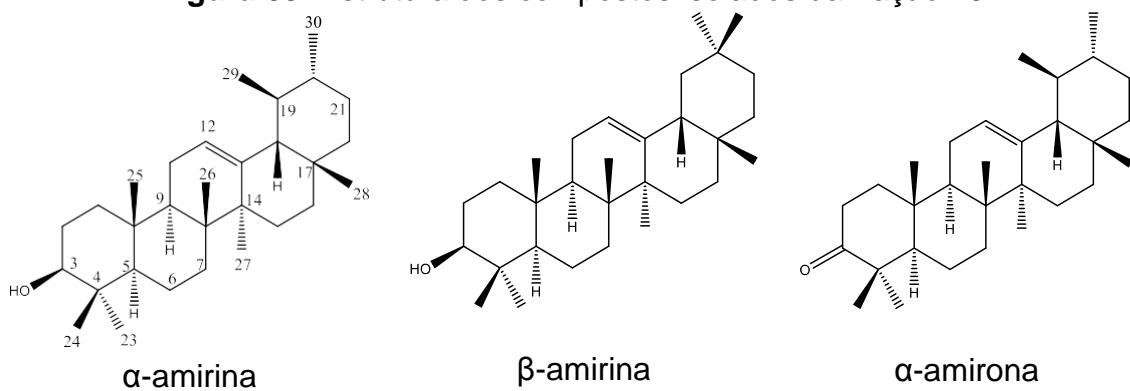


Tabela 10: Dados de ^{13}C RMN da fração 43 [101 MHz, piridina-d5, δ (ppm)] e da alfa-amirina [CDCl_3 , δ (ppm)] (MENDES; CRUZ; DAVID, 1999).

Posição	α -amirina	43
1	38,7	39,3
2	27,2	27,0
3	78,3	78,2
4	38,7	39,5
5	55,2	55,8
6	18,3	17,9
7	32,9	34,1
8	40,0	40,4
9	47,7	48,2
10	36,9	37,2
11	23	23,3
12	124,3	125,0
13	139,3	139,9
14	42,0	42,4
15	28,7	28,4
16	26,6	26,6
17	33,7	33,4
18	58,9	59,3
19	39,6	39,9
20	39,6	40,0
21	31,2	31,6
22	41,5	41,8
23	28,1	28,4
24	15,6	16,4
25	15,6	16,0
26	16,8	16,7
27	23,3	23,6
28	28,1	28,2
29	17,4	17,2
30	21,3	21,6

5.5.1.1.1.3 Fração 44

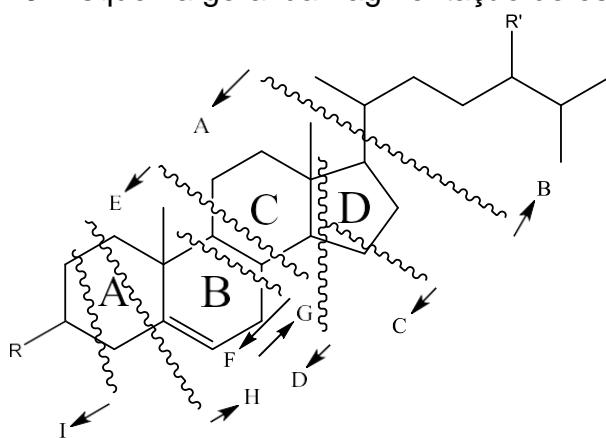
A fração 44 (33 mg) apresentou-se como um sólido branco, solúvel em acetato de etila e que demonstrou sob a cromatografia em camada delgada a presença de três bandas de coloração roxa e róseo-avermelhada nos reveladores anisaldeído e Liebermann-Burchadd respectivamente, indicativas da presença de terpenos

Os compostos foram identificados por Espectrometria de Massas (EM). O cromatograma obtido da cromatografia gasosa apresentou 5 picos majoritários (Apêndice A, pag. 87) e três tinham perfil de triterpenos com base em seus espectros

de massas são eles os picos 21, 32 e 38 com tempo de retenção de 57,3, 66,2, 68,3 minutos respectivamente.

A substância do pico 21 apresentou os fragmentos principais e intensidades m/z 428 (4), 413 (2) 410 (1), 315 (1), 287(6), 273 (2), 246 (10), 245 (21), 246 (10), 231 (7), 213 (1), 163(3). O espectro de massas mostrou um pico em m/z 428 correspondente ao ion molecular. Seguido dos picos m/z 413 [M-15] e m/z 410 [M-18] mais a presença do pico m/z 273 (Figura 10, fragmento A) referente a perda da cadeia lateral, seguido da presença do pico m/z 245 referente a perda da carbonila [273-28], ainda a presença dos picos característicos da fragmentação do anel D m/z 246, m/z 231 e m/z 213 (Figura 10, fragmentos C e D), o pico m/z 163 (Figura 10, fragmento E) referente a clivagem do anel C e também os picos m/z 315 [M-111]⁺ e m/z 287 [M-139]⁺ referentes a quebra do anel B (Figura 10, fragmento G) são indicativos da presença de um esteroide com insaturação em C-5 e hidroxila em C-3 com uma cadeia lateral de C₁₁H₂₃.

Figura 10: Esquema geral da fragmentação de esteroides



O pico 32 apresentou os fragmentos principais e intensidades m/z 426 (4), m/z 411 (2), m/z 218 (100), m/z 203 (56), m/z 189 (19), m/z 133 (14) estes picos quando comparados com a literatura indicam se tratar novamente da β -amirina.

O pico 38 apresentou os fragmentos principais e intensidades m/z 426 (6), m/z 411 (2), m/z 393 (1), m/z 218 (100), m/z 203 (28), m/z 189 (29), m/z 133 (30) estes picos quando comparados com a literatura indicam se tratar novamente da α -amirina.

5.5.1.1.4 Fração 47

Os compostos isolados da fração 47 (14 mg) apresentaram-se como um sólido branco, solúvel em acetato de etila e que demonstrou sob a cromatografia em camada delgada a presença de duas bandas de coloração roxa e róseo-avermelhada nos reveladores anisaldeído e Liebermann-Burchadd respectivamente, estas cores são indicativas da presença de triterpenos.

Estes compostos foram identificados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) através de ^1H RMN e ^{13}C RMN, além da comparação de dados com a literatura.

O espectro de ^1H RMN da fração 47 (Apêndice B, pag. 92) é típico de triterpenos e os sinais característicos como o singuleto em 3,27 ppm referente ao hidrogênio do carbono carbinólico em C-3, o singuleto largo em 5,3 ppm dos hidrogênios das olefinas, além de uma grande concentração de sinais entre 1,0 e 2,3 ppm.

O espectro de ^{13}C RMN (Apêndice B, pag. 93) indicou se tratar de uma mistura de três triterpenos visto que foram encontrados 70 sinais, e dentre eles os sinais do carbono carbinólico (C-3) de cada estrutura em 78,15 e 78,19 ppm, também estavam presentes os sinais da dupla em C-12 125,71; 127,9 ppm e C-13 139,33, 144,89 ppm. Estes sinais são indicativos da presença de esqueletos do tipo ursano e oleanano segundo Olea e Roque (1990). Outros sinais presentes em 180,24 e 179,95 ppm são referentes a função ácido carboxílico presente em ambos. Logo esses dados em conjunto com os obtidos a partir do espectro de ^1H RMN e a comparação com os dados da literatura presentes na tabela 11, permitiu identificar dois triterpenos: o ácido ursólico e o ácido oleanólico (Figura 11).

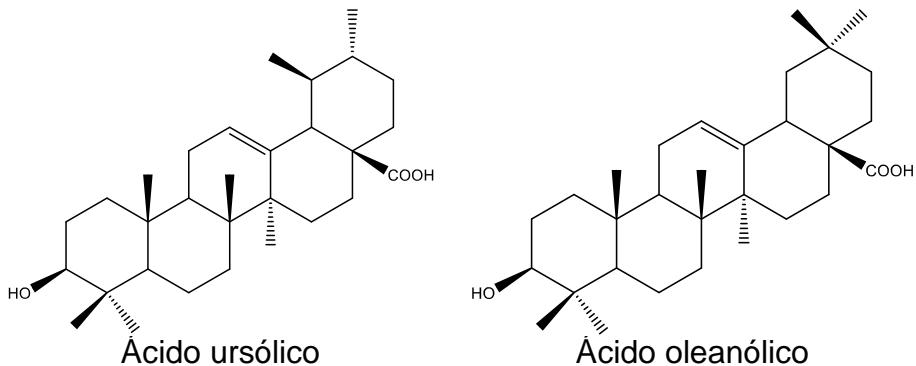
Nesta fração novamente foram isolados triterpenos comuns no reino vegetal, os ácidos ursólico e oleanólico são comumente isolados em mistura. Estes compostos já foram isolados anteriormente em diversas espécies de *Miconia*. O ácido ursólico: *M. albicans*, *M. fallax*, *M. langsdorffii*, *M. ligustroides*, *M. sellowiana*. Ácido oleanólico em: *M. albicans*, *M. fallax*, *M. langsdorffii*, *M. ligustroides*. Com relação a atividade citotóxica ambos já foram extensamente estudados com suas IC₅₀ já estabelecidas para mais de dez linhagens de células cancerígenas, algumas com resultados relevantes (CUNHA et al., 2003a; CREVELIN et al., 2006 LASZCZYK, 2009; CREVELIN et al., 2006; PIERONI et al., 2011, VECHIA, 2009).

A atividade citotóxica da fração 47 apresentou um percentual de inibição sempre superior a 90 % nas três linhagens cancerígenas. Contudo a mesma se mostrou tóxica para a linhagem de macrófagos murinos, com inibição de 97 % o que evidencia sua toxicidade e inabilita para testes futuros como um fármaco para este fim.

Tabela 11: Dados de RMN de ^{13}C da fração 47 [125 MHz, piridina-d5, δC (ppm)] e dos ácidos oleanólico e ursólico [piridina-d5, δC (ppm)] (AGRAWAL, JAIN, 1992, MOREIRA, 2000).

Posição	Ácido ursólico	47 I	Ácido oleanólico	47 II
1	39,4	39,4	38,9	39,0
2	28,1	28,1	28,2	28,3
3	78,1	78,2	78,0	78,1
4	39,1	39,1	39,4	39,5
5	55,8	55,8	55,8	55,8
6	18,8	18,8	18,8	18,8
7	33,6	33,6	33,3	33,3
8	40,0	40,0	39,8	39,8
9	48,0	48,1	48,2	48,1
10	37,3	37,3	37,4	37,5
11	23,6	23,6	23,8	23,8
12	125,7	125,7	122,5	122,6
13	139,3	139,3	144,8	144,8
14	42,5	42,5	42,0	42,0
15	28,7	28,7	28,3	28,6
16	24,9	24,9	23,8	23,8
17	48,0	48,1	46,7	46,7
18	53,6	53,6	42,0	42,0
19	39,5	39,5	46,7	46,5
20	39,4	39,4	31,0	31,0
21	31,1	31,1	34,3	34,2
22	37,5	37,5	33,3	33,2
23	28,8	28,8	28,7	28,8
24	16,6	16,6	16,5	16,6
25	15,7	15,7	15,5	15,6
26	17,5	17,5	17,5	17,5
27	23,9	23,9	26,2	26,2
28	179,9	179,9	180,2	180,2
29	17,5	17,5	33,3	33,3
30	21,4	21,4	23,8	23,8

Figura 11: Estrutura dos triterpenos isolados da fração 47



5.5.1.1.5 Fração 49

A fração 49 (21 mg) apresentou-se como um sólido branco, solúvel em acetato de etila e que demonstrou sob a CCD a presença de diversas bandas de coloração roxa e róseo-avermelhada nos reveladores anisaldeído e Liebermann-Burchard respectivamente, indicativas da presença de triterpenos.

Estes compostos foram identificados por CG-EM. O cromatograma obtido por cromatografia gasosa apresentou 7 picos majoritários (Apêndice A, pag. 88) e três tinham perfil de triterpenos com base em seus espectros de massas. Os picos são 45, 60 e 67 com tempo de retenção de 49,6, 55,7, 58,1 minutos respectivamente.

O pico 45 apresentou os fragmentos principais e intensidades m/z 426 (7), 365 (5), 218 (6), 207 (21) 203 (9), 189 (48). Este pico demonstrou a presença do íon molecular em m/z 426 seguido do pico m/z 365 [M-43-18] referente a perda da cadeia lateral (C_3H_7) e água mais a presença dos picos intensos m/z 218, m/z 203 [218-15], m/z 207 e m/z 189 (207- H_2O) referentes a clivagem do anel C e característicos de triterpenos do tipo lupeno com hidroxila em C-3. Adicionando-se a tudo isto a elevada intensidade dos picos m/z 189 e m/z 207 em comparação com a literatura a estrutura presente é o composto lupeol (lup-20(29)-en-3-ol) cuja fórmula molecular é $C_{30}H_{50}O$ e a massa 426 [Figura 12] (OGUNKOYA, 1981).

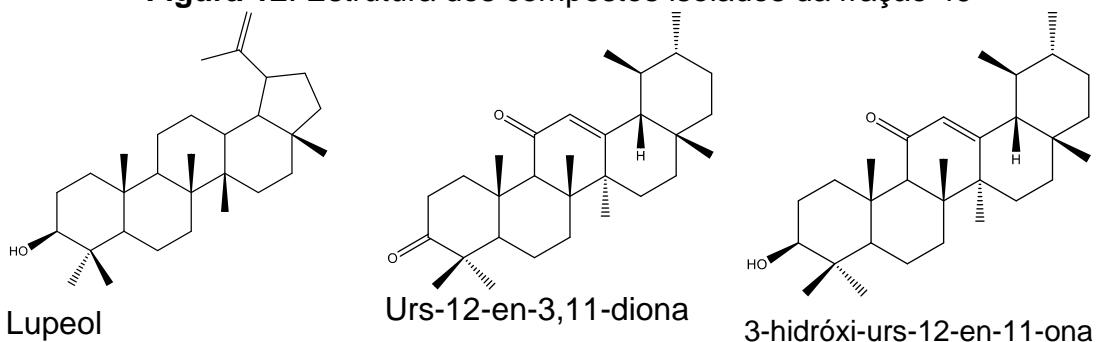
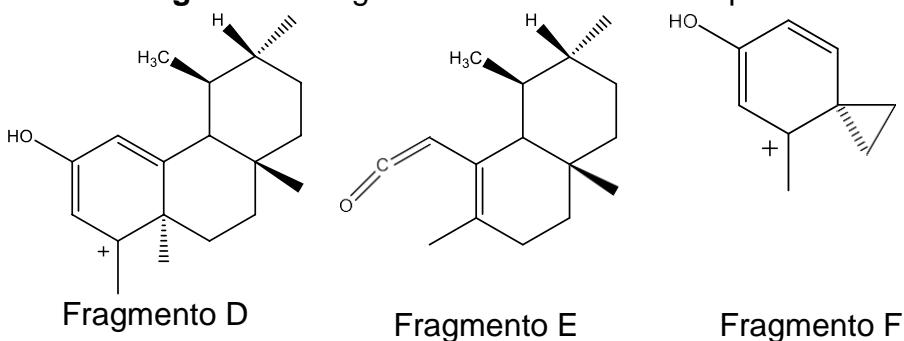
O pico 60 apresentou os fragmentos principais e intensidades m/z 438 (10), 423 (10), 410 (10), 273 (61), 232 (53), 135 (83). Este pico demonstrou a presença do íon molecular m/z 438, m/z 423 [M-15] referente a perda comum de metila, 410 [M-28] referente a perda da carbonila. Segundo Budzikiewicz (1963) os picos presentes m/z 273 e m/z 232 (Figura 13, fragmento D e E) são referentes aos anéis CDE com

carbonila em C-11 e insaturação em C-12 e m/z 135 (Figura 13, fragmento F) é referente ao anel C. Logo trata-se de um triterpeno do tipo ursano ou oleanano com insaturação em C-12 e carbonila em C-11, a presença do pico m/z 205 e ausência da perda de agua indica a presença de outra carbonila em C-3 e Segundo Branco et al. (2004) quando a intensidade do pico m/z 273 é maior que a do pico m/z 232 é indicativo de urseno. Portanto a estrutura é urs-12-en-3-11-diona cuja fórmula molecular é $C_{30}H_{46}O_2$ e a massa 438 (Figura 12).

O pico 67 apresentou os fragmentos principais e intensidades m/z 440 (11), 379 (11), 273 (52), 232 (34), 135 (70). Este pico demonstrou a presença do íon molecular m/z 440, m/z 379 [M-15-18-28] referente a perda comum de metila, água e carbonila. Segundo Budzikiewicz (1963) os picos presentes m/z 273 e m/z 232 (Figura 13, fragmento D e E) são referentes aos anéis CDE com carbonila em C-11 e instauração em C-12 e m/z 135 (Figura 13, fragmento F) é referente ao anel C. Logo trata-se de um triterpeno do tipo ursano ou oleanano com instauração em C-12 e carbonila em C-11, a perda de agua indica a presença de uma hidroxila em C-3 e Segundo Branco et al (2004) quando a intensidade do pico m/z 273 é maior que a do pico m/z 232 é indicativo de urseno. Portanto a estrutura é 3-hidróxi-urs-12-en-11-ona cuja fórmula molecular é $C_{30}H_{48}O_2$ e a massa 440 (Figura 12).

Os triterpenos isolados nesta fração 3-hidróxi-urs-12-en-11-ona e urs-12-en-3,11-diona ainda não foram isolados em Melastomataceae. Já o lupeol é bastante comum no reino vegetal e consequentemente em *Miconia*, ele já foi isolado nas espécies do gênero: *M. albicans*, *M. fallax*, *M. rubiginosa*, *M. sellowiana*. Com relação a atividade citotóxica apenas o lupeol já foi extensamente avaliado com sua IC₅₀ ou porcentagem de inibição (50 %) já documentada em mais de trinta linhagens diferentes de células cancerígenas. Já o 3-hidróxi-urs-12-en-11-ona e urs-12-en-3,11-diona embora não tenham estudos, a presença da função carbonila na posição C-11 é descrita como um centro de atividade citotóxica, que serviu de modelo para a síntese de diversos derivados com resultados relevantes (CUNHA et al., 2003a; CREVELIN et al., 2006; GALLO; SARASHINE, 2009; LASZCZYK, 2009; VECHIA, 2009; CSUK et al., 2010; PIERONI et al., 2011).

A fração 49 conseguiu inibir duas linhagens cancerígenas em porcentagem superior a 70 % e ainda apresentou baixa toxicidade para os macrófagos murinos, contudo, é necessário isolar os compostos da fração e testá-los separadamente uma vez que a atividade pode estar relacionada ao lupeol.

Figura 12: Estrutura dos compostos isolados da fração 49**Figura 13:** Fragmentos comuns aos triterpenos

5.5.1.1.6 Fração 51

A fração 51 (17 mg) apresentou-se como um sólido branco, solúvel em acetato de etila e que demonstrou sob CCD a presença de duas bandas de coloração roxa e róseo-avermelhada nos reveladores anisaldeído e Liebermann-Burchard respectivamente, estas cores são indicativas da presença de terpenos.

Estes compostos foram identificados por CG-EM. O cromatograma apresentou 4 picos majoritários (Apêndice A, pag. 89) e dois tinham perfil de terpenos com base em seus espectros de massas. Os picos são: 9 e 11 com tempo de retenção de 65,1 e 65,3 minutos respectivamente.

O pico 9 apresentou os fragmentos principais e intensidades m/z 414 (9), 399 (3), 396 (6), 381 (4), 371 (1), 329 (7), 303 (7), 273 (3), 246 (1), 232 (1), 231 (4), 213 (9), 163 (9), 145(18), 138 (1), 120 (8), 105 (23). Este pico demonstrou a presença do íon molecular em m/z 414 seguido do pico m/z 399 (M-15) referente a perda de metila característica, do pico m/z 396 (M-18) referente a perda de água, m/z 381 (M-15-18) referente a perda de metila e água, m/z 273 (Figura 10, fragmento A)

referente a perda da cadeia lateral. Estes ions sugerem a presença de um esteroide com cadeia lateral cuja formula molecular é $C_{10}H_{21}$ (WILLIE; DJERASSI, 1967, WILLIE, 1977).

Já os picos m/z 329 (M-85), 303 (M-111), 275 (M-139) referentes a clivagem do anel B (Figura 10, fragmento G) sugerem insaturação em C-5. Os picos m/z 246, 232 (anéis ABC), 231 (246-metila), 213 (231-H₂O) referentes a quebra do anel D (Figura 15, fragmento C e D), picos m/z 163, 145 referentes a quebra do anel C (Figura 15, fragmento E), e pico m/z 138, 120 (138-H₂O) e 105 (120-metila) referente a clivagem do anel B (Figura 10, fragmento F) sugerem apenas uma substituição em C-3 por uma hidroxila e confirmam a insaturação em C-5. Logo a partir destes dados o composto isolado é o β -sitosterol (Figura 14) de formula molecular $C_{29}H_{50}O$ (TOKES; JONES; DJERASSI, 1968, WILLIE, 1977).

Este composto também foi identificado por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN): 1H RMN e ^{13}C RMN. O espectro de 1H RMN (Apêndice B, pag. 94) apresentou indícios da presença de esteroides como os seis sinais das metilas entre 0,7 e 0,9 ppm: 0,71 (Me-18), 0,98 (Me-19), 0,89 (Me-21), 0,88 (Me-26), 0,92 (Me-27), 0,94 (Me-29). O multiplet em 3,8 ppm característico da presença de hidrogênio de carbono carbinólico (C-3) e um singleto largo em 5,0 ppm característico de hidrogênios de olefinas.

O espectro ^{13}C de RMN (Apêndice B, pag. 95) confirmou o indicativo da presença de esteroides com a presença de vinte e nove sinais e dentre eles a presença do carbono carbinólico (C-3) em 71,7 ppm, a presença de carbono olefínico com deslocamento de dupla entre C-5 e C-6, com sinais característicos de esqueletos do tipo ursano em 125,0 e 139,9 ppm. Isto comparado aos dados da literatura contidos na tabela 12 confirmam que o composto isolado é o β -sitosterol.

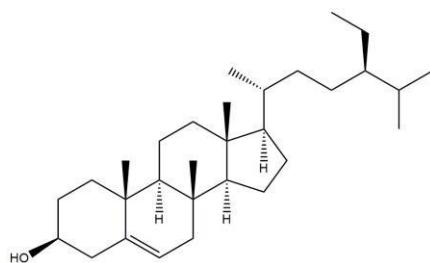
O pico 11 apresentou os fragmentos principais e intensidades m/z 416 (6), 396 (2), 289 (6), 161 (12), 124 (8), 109 (12). A presença do íon molecular em m/z 416 seguido do pico m/z 289 (Figura 10, fragmento A) referente a perda da cadeia lateral é um indicativo de um esteroide com cadeia lateral de formula molecular C_9H_{19} e que possui uma insaturação, uma carbonila e uma hidroxila. A presença dos picos m/z 161 (Figura 10, fragmento E) referente a clivagem do anel C e também dos picos m/z 124 e m/z 109 (Figura 10, fragmento F) referentes a clivagem do anel B que sugerem a presença da carbonila em C-3 seguido da insaturação em C-4. Elas também excluem a presença da hidroxila nos anéis A e B, a ausencia do

fragmento referente aos anéis ABC (Figura 10, fragmento C e D) é indicativo que a hidroxila está no anel C nas posições C-11 ou C-12. Logo estes dados são indicativos que se trata do composto 3-ceto-4-en-11-hidroxiesteróide ou 3-ceto-4-en-12-hidroxiesteróide (WILLIE; DJERASSI, 1967; TOKES; JONES; DJERASSI, 1968).

O composto isolado desta fração, o β -sitosterol é um dos esteróides mais comuns em plantas e já foi isolado em diversas espécies do gênero *Miconia*, como *M. albicans*, *M. cabucu*, *M. ligustroides*, *M. pepericarpa*, *M. rubiginosa*, *M. sellowiana*. Com relação a atividade citotóxica o β -sitosterol já foi extensamente avaliado e se mostrou bastante promissor nos ensaios de câncer de próstata e colón (MACARI et al., 1990; HOLTZ; FINK, AWAD, 1998; CUNHA et al., 2003a; CREVELIN et al., 2006; LASZCZYK, 2009; BASCAR et al., 2010; PIERONI et al., 2011, ATANASOV et al., 2015).

Tabela 12: Dados de ^{13}C RMN da fração 51 [101 MHz, piridina-d5, δ (ppm)] e do β -sitosterol [CDCl_3 , δ (ppm)] (MACARI, 1990).

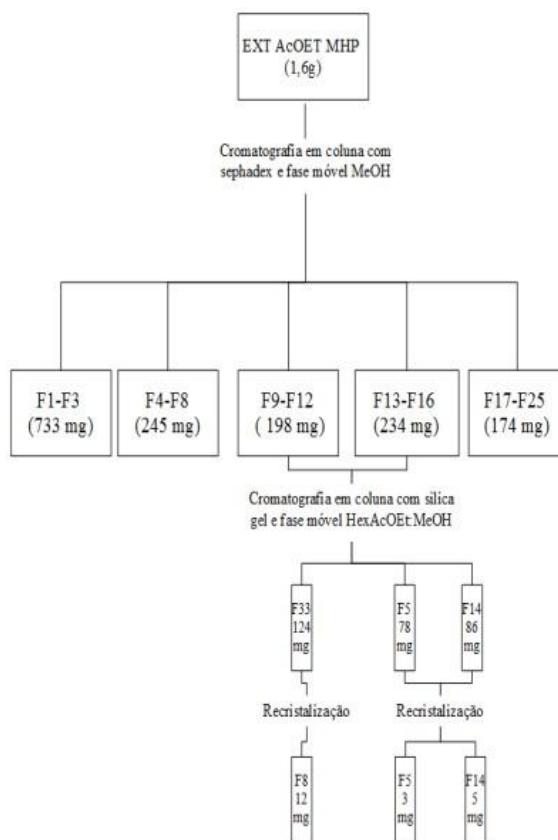
Posição	β -sitosterol	51
1	37,2	37,3
2	31,6	30,4
3	71,7	71,7
4	42,3	42,9
5	140,7	142,4
6	121,6	121,6
7	31,8	32,6
8	31,8	32,6
9	50,1	50,9
10	36,4	36,8
11	21,1	21,7
12	39,7	40,4
13	42,3	42,9
14	56,7	56,7
15	24,2	24,9
16	28,1	28,9
17	56,1	56,7
18	11,9	12,4
19	19,6	20,0
20	36,0	36,8
21	18,7	19,4
22	33,9	34,6
23	26,1	26,8
24	45,8	46,4
25	29,1	29,9
26	19,6	20,4
27	18,9	19,6
28	23,0	23,8
29	11,9	12,6

Figura 14: Estrutura do β -sitosterol

O resultado da atividade citóxica mostrou a eficácia desta fração com inibição de três linhagens de células cancerígenas, mas por outro lado demonstrou toxicidade frente aos macrófagos murinos.

5.5.1.2 Extrato Acetato de Etila (AcOEt)

O fracionamento do extrato Acetato de Etila (AcOEt) de *M. hypoleuca* por cromatografia líquida em coluna recheada com sephadex LH 20 produziu 75 frações (Figura 15) que após CCD e cromatografia líquida em coluna aberta recheada com sílica gel resultou em 5 frações, e estas por sua vez depois de purificadas originaram 3 compostos: 2 flavonoides (cristais amarelos) e um sólido amarelo não classificado, todos em fase de identificação por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear uni e bi-dimensional (RMN).

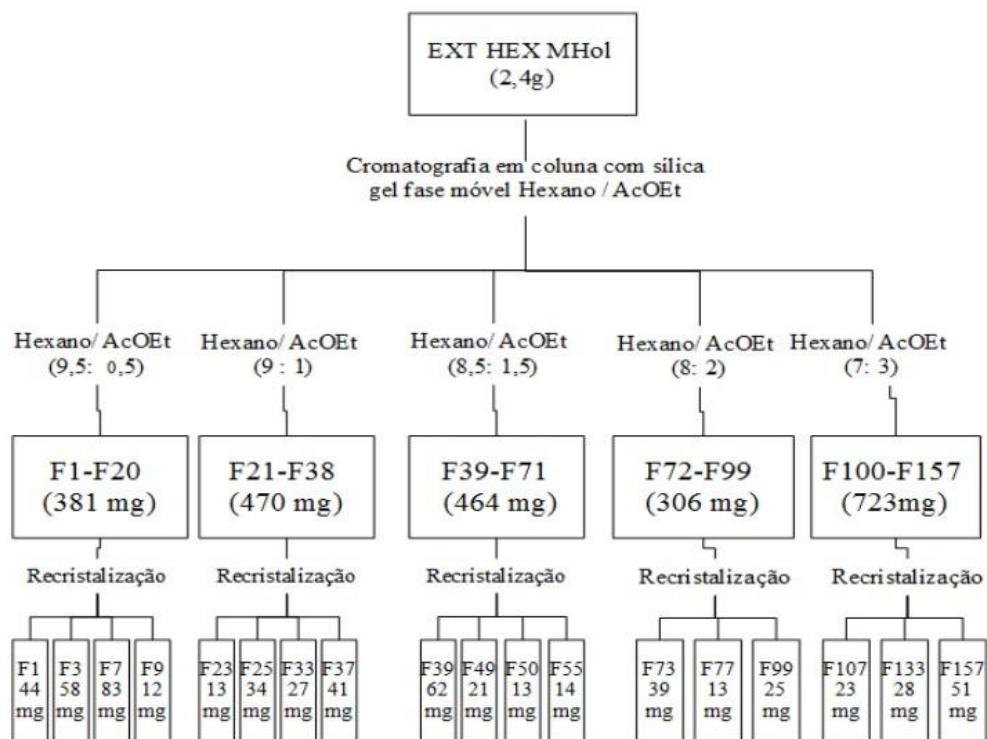
Figura 15: Fluxograma de isolamento do extrato AcOEt de *M. hypoleuca*

5.5.2 *Miconia holoserícea*

5.5.2.1 Extrato hexânico

O fracionamento foi realizado por cromatografia líquida em coluna aberta recheada com sílica gel, obtendo-se 157 frações (Figura 16), sendo que as semelhantes foram unidas após análise por CCD, o que resultou em 44 frações. Destas, após purificação obtiveram-se 18 frações, e oito foram escolhidas, de acordo com seu rendimento e perfil fitoquímico, para serem avaliadas quanto a sua capacidade de inibir o crescimento do microrganismo *Stafilococcus aureus* (UFPPEA 01), considerado um dos microrganismos padrões para ensaios bioguiados. O resultado desta análise apresenta-se na Tabela 13.

Figura 16: Fluxograma de isolamento do extrato hexânico de *M. holoserícea*



As 18 frações foram purificadas por centrifugação e recristalização dando origem a 5 triterpenos e 3 esteroides, que foram analisados por CG-EM e encontram-se em fase de identificação.

Tabela 13: CMI e CMM em $\mu\text{g/mL}$ das frações do extrato hexânico de *M. holosericea* frente a *S. aureus*.

Fração	CMI/CMM
<i>Miconia holosericea</i>	HOL 49
	HOL 55
	HOL 73
	HOL 77
	HOL 99
	HOL 107
	HOL 133
	HOL 157

6 CONCLUSÕES

As espécies de *Miconia* foram selecionadas para este estudo devido a importância ecológica que desempenham no meio em que estão inseridas e também por que sua prevalência é fundamental em biomas altamente ameaçados.

A avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da difusão em agar com disco de papel dos diferentes extratos das espécies de *Miconia* traçou um perfil de inibição para os extratos AcOEt e MeOH, pois foram mais eficazes na inibição de bactérias gram positivas (*S. aureus*, *M. luteus* e *B. subtilis*), os mesmos também inibiram uma gram-negativa (*Pseudomonas aeruginosa*), uma álcool-ácido-resistente (*M. smegmatis*) e um fungo leveduriforme (*C. albicans*).

A avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em caldo determinou a CMI e a CMM das sete espécies de miconias e a partir dele pode se inferir que as mesmas são mais eficazes contra as gram-positivas e também se destacaram pelo resultado *M. amacurensis*, *M. holosericea*, *M. mirabilis* e *M. prasina*.

A avaliação da atividade citotóxica pelo método do MTT demonstrou que os extratos com menor polaridade para todas as espécies foram mais ativos contra as linhagens cancerígenas e isto pode estar relacionado com a presença dos terpenoides. Nesta atividade, destacaram-se *M. holosericea* e *M. hypoleuca*, o que as selecionou para o estudo químico na busca do princípio ativo responsável por esta atividade.

O perfil fitoquímico demonstrou a presença de flavonoides nos extratos acetato e metanólico de algumas espécies, taninos nos metanólicos e terpenoides em todos os extratos hexânicos e em alguns extratos acetato com elevada diversidade nas várias bandas relacionadas.

O estudo químico das espécies selecionadas: *M. hypoleuca* e *M. holosericea* foi baseado nos resultados da atividade biológica, pois ambas se destacaram na atividade citotóxica e antimicrobiana respectivamente.

O estudo químico do extrato hexânico de *Miconia hypoleuca* permitiu a identificação por métodos cromatográficos de 8 triterpenos e 3 esteroides, triterpenos: α -amirina, β -amirina, α -amirona, ácido ursólico, ácido oleanólico, lupeol, urs-12-en-3,11-diona, 3-hidróxi-urs-12-en-11-ona e um esteroide β -sitosterol, mais dois esteroides em fase de identificação. Por RMN foram identificados 3 triterpenos

e 1 esteroide e por CG-EM foram identificados apenas os compostos majoritários que estão relacionados a atividade biológica, neste caso se excluiu os hidrocarbonetos e ácidos graxos.

Já o estudo químico do extrato acetato de etila de *M. hypoleuca* permitiu o isolamento por métodos cromatográficos de dois flavonoides que estão em fase de identificação.

O estudo químico do extrato hexânico de *M. holosericea* permitiu a caracterização por métodos cromatográficos de 5 triterpenos e 3 esteroides que estão em fase de identificação.

Cabe ressaltar também que das sete espécies avaliadas neste trabalho apenas *M. minutiflora* e *M. prasina* já possuíam algum tipo de registro científico relacionado.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho fomentam o estudo de novas espécies de *Miconia* que se mostraram ricas em compostos das classes dos terpenóides e que por isso demonstraram relevante resultado nas atividades testadas.

Para as espécies analisadas neste trabalho são necessários estudos posteriores com outras atividades biológicas como a antiparasitária, leischimanicida e antiflamatória pois estes poderiam ser relevantes uma vez que este gênero já apresentou resultados positivos para estas atividades e também estavam relacionados aos terpenóides. Também seria interessante avaliar a atividade antimicrobiana frente a linhagens de microrganismos isolados da clínica para avaliar seu real potencial contra amostras patogênicas locais.

Das frações do extrato hexânico de *M. hypoleuca* analisadas por CG-EM deve-se identificar os compostos minoritários. Do extrato acetato reisolar os flavonoides em maior quantidade e identifica-los. Já a espécie *M. holosericea* identificar os terpenos já analisados por CG-EM do extrato hexânico.

Acrescentar outros métodos na analise da atividade antioxidante já realizada por dois métodos DPPH e poder redutor e que apresentaram resultados relevantes e terminar o doseamento dos flavonoides e fenólicos que estão relacionados com esta atividade.

Selecionar variáveis significativas, por meio de Plackett-Burman, no processo de extração de fenólicos e flavonoides por diferentes métodos e otimizar a extração utilizando metodologia de superfície de resposta.

Estabelecer um perfil biossintético das espécies de *Miconia* pela técnica dos componentes principais e análise multivariada utilizando espectroscopia no infravermelho e espectroscopia no ultravioleta.

Também pode ser realizado o estudo químico de outras espécies deste trabalho uma vez que os resultados promissores aliados a característica de biossíntese particular da família poderiam resultar em novos compostos com elevada atividade biológica.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, P. K.; JAIN, D. ¹³C NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids. **Progress in NMR Spectroscopy**, v. 24, p. 1-90, 1992.

ALLEY, M. C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p. 589- 601, 1988.

ARAÚJO, M. **Das ervas medicinais à fitoterapia**. Cotia, SP: Ateliê, 2002.

ARRUDA, M. B.; ARRUDA, L. F.; SÁ, S. N. **Corredores Ecológicos**: uma abordagem integradora de ecossistemas no Brasil. Brasília, DF, IBAMA, 2004.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**. In press 2015.

BAUMGRATZ, J. F. A. et al. *Melastomataceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/> floradobrasil/FB161>. Acesso em: 29 Ago. 2015

BARDON, A. et al. Bioactive plants from Argentina and Bolivia. **Fitoterapia**, v. 78, p. 227-231, 2007.

BARROS, F. W. A. et al. Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 1268-1276, 2011.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa, MG: Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, v.3, 1986.

BARROSO, P. R. **Fitoquímica e atividades biológicas e Miconia ferruginata DC. (Melastomataceae)**. 2015. 255f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Universidade Federal do Vale de Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, 2011.

BASCAR, A. A. et al. Chemopreventive potential of β -sitosterol in experimental colon cancer model – na in vitro and in vivo study. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 24, p.2-10, 2010.

BORTOLINI, M. F. et al. Enraizamento de estacas caulinares de quatro espécies do gênero Tibouchina Aubl. (Melastomataceae Juss.) **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 14, n. 8, p. 187-192, 2009.

BRANCO, A.; PINTO, A. C.; BRAZ FILHO, R. Chemical constituents from *Vellozia graminifolia* (Velloziaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 76, n. 3, p. 505-518, 2004.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº9, de 23 de janeiro de 2007. Áreas prioritárias para conservação, uso sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira. Brasília, DF, **Série biodiversidade**, v. 31, 2007.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Sistema de Informação sobre a Biodiversidade brasileira, 2015. A biodiversidade brasileira. Brasília, DF, Disponível em: <<http://www.sibbr.gov.br/areas/?area=biodiversidade>>. Acesso em: 29 Ago. 2015.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Projeto Corredores Ecológicos, 2002. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/programas-e-projetos/projeto-corredores-ecologicos>>. Acesso em: 05 jan. 2016.

BUDZIKIEWICH, H.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems I. Steroid ketones. **Journal American Chemical Society**, v. 84, p. 1430-1439, 1961.

BUDZIKIEWICH, H.; WILSON, J.M.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems XXXII. Pentacyclic triterpenes. **Journal American Chemical Society**, v. 85, p. 3688-3699, 1963.

BUSSMANN, R. W. et al. Minimum inhibitory concentracions of medicinal plants used in northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 101-108, 2010.

CELOTTO, A. C. et al. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of the crude extracts of three miconia species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 339-340, 2003.

CENTRO DE PESQUISAS AMBIENTAIS DO NORDESTE (CEPAN). Guia de plantas. 2011. Disponível em: <<http://cepan.org.br/guia-plantas>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

CHAGAS, E. C. O. **O gênero miconia ruiz & pav. (Melastomataceae) na floresta atlântica do nordeste oriental**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

CHAN, W. R.; SHEPPARD, V.; MEDFORD, K. A. Triterpenes from *Miconia stenostachya*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 7. p. 963-966, 1992.

CLAUSING, G.; RENNER, S. S. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **American Journal of Botanic**, v. 88, n. 3, p. 486-498, 2001.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**, M02-A11. 11. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and Filamentous Fungi**. Approved standard: M27-A3 e M38-A2. Wayne (PA): CLSI, 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

CREVELIN, E. J. et al. Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 827-830, 2006.

CRUZ, G. A. S. **Diversidade genética populacional nas espécies pioneiras *Cyperus ligularis* L., *C. odoratus* L. (cyperaceae) e *Miconia prasina* (sw.) dc. (melastomataceae) ocorrentes em remanescentes da floresta atlântica de pernambuco detectada pelos marcadores moleculares daf e issr.** 2009. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

CSUK, R. et al. Synthesis of an antitumor active endoperoxide from 11-keto-b-boswellic acid. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3840-3843, 2010.

CUNHA, W. R. et al. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, n.2, p. 47-49, 2003a.

CUNHA, W. R. et al. In vitro trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Medica**, v. 69, p. 474-478, 2003b.

CUNHA, W. R. et al. A study of the *trypanocidal* activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Phytoterapy Research**, v. 20, p. 474-478, 2006.

CUNHA, W. R. et al. In vitro inhibition of tumor cell growth by *Miconia fallax*. **Pharmaceutical Biology**, v.46, p. 292-294, 2008.

CUNHA, W. R. et al. Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. **Pharmaceutical Biology**, v.48, n. 2, p. 166-169, 2010.

CUNHA, W. R. et al. Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n.2, p. 166-169, 2011.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**, Um Guia de Estudos Multidisciplinar. São Paulo: Ed. Universidade Paulista. 1996.

DJERASSI, C.; BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems: unsaturated pentacyclic triterpenoids. **Tetrahedron letters**, v.7, p. 263-270, 1962.

FERREIRA, S. H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2006.

FINGOLO, C. E.; SANTOS, T. S.; VIANNA FILHO, M. D.; KAPLAN, M. A. C. Triterpene Esters: Natural Products from Dorstenia arifolia (Moraceae). **Molecules**, v. 18, p. 4247-4256, 2013.

FORZZA, R. C.; et al. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010>>. Acesso em: 21 jun. 2013.

FURTADO, R. A. et al. Ursolic acid and oleanolic acid suppress preneoplastic lesions induce by 1, 2-dimethylhydrazine in rat colon. **Toxicologic pathology**, v. 36, n. 4, p. 576-580, 2008.

GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. Biological activities of lupeol. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**. v. 3, p. 46-66, 2009.

GOLDENBERG, R.; SHEPHERD, G. J. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in cerrado vegetation. **Plant Systematics and Evolution**, v. 211, p. 13-29, 1998.

GOLDENBERG, R. **O Gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae): I Listagens Analíticas, II Revisão Taxonômica da Seção *Hypoxanthus* (Rich. Ex DC.) Hook. f.** 2000. 259p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)-UNICAMP, Campinas, 2000.

GOLDENBERG, R. et al. Phylogeny of *Miconia* (Melastomataceae): patterns of stamen diversification in a mega- diverse neotropical genus. **International Journal of Plant Sciences**, v. 24, p. 315–327, 2008.

GOLDENBERG, R.; CADDAH, M.K. *Miconia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/> floradobrasil/FB9666>. Acesso em: 14 Dez. 2015

GUNATILAKA, A. A. L. et al. Isolation, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Bioactive Benzoquinones from *Miconia lepidota* from the Suriname Rainforest. **Journal of Natural Products**. v. 64, p. 2-5, 2001.

GURIB, A. F. Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine**, n. 27, p. 1-93, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HAUFF, S. N. **Representatividade dos ecossistemas da Caatinga nas Áreas Prioritárias e Unidades de Conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2010.

HELPAND, W. H.; COWEN, D. L. **Pharmacyan illustrated history**. New York: Harry N. Abrams, 1990.

HOLTZ, R. L. V.; FINK, C. S.; AWAD, A. B. β -sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells, **Nutrition and Cancer**, v. 32, n. 1, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE OPINIÃO PÚBLICA E ESTATÍSTICA (IBOPE). **Venda de medicamentos deve movimentar R\$ 70 bilhões no Brasil**. Abr. 2013. Disponível em: <<http://www.ibope.com.br/pt-br/relacionamento/imprensa/releases/Paginas/Venda-de-medicamentos-deve-movimentar-RS-70-bilhoes-no-Brasil.aspx>>. Acesso em: 31 ago. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Impacto do câncer**. 2016. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/forum_economico_mundial_discute_impacto_cancer>. Acesso em: 27 fev. 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FROM RESEARCH OF CANCER (IARC). **Globocan 2012: estimated cancer incidence mortality and prevalence worldwide in 2012**. World Health Organization, Lyon, 2015.

INTERNATIONAL AGENCY FROM RESEARCH OF CANCER (IARC). **Word cancer report 2014**. World Health Organization, Lyon, 2015.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática vegetal**: um enfoque filogenético. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

LASZCZYK, M. N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. **Planta Medica**, v. 75, p. 1549–1560, 2009.

LEITE, T. C. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana e estudo químico de espécies do gênero Marcketia (Melastomataceae)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I., **Biodiversidade brasileira: síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira**. Campinas: Unicamp, 2000.

LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 12, p. 371–387, 2013.

LI, X. C. et al. Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida* aspartic proteases. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1282-1285, 2001.

LIMA, M. L. F. C. A reserva da biosfera da mata atlântica em Pernambuco - Situação atual, ações e perspectivas. **Cadernos da Reserva Biosfera Mata Atlântica**. v. 1, n. 12, p. 02-42, 1998.

LOISELLE B. A.; BLAKE J. G. Dispersal of melastome seeds by fruit-eating birds of tropical forest understory. **Ecology**. v. 80, n. 01, p. 330-336, 1999.

MACARI, P. A. T, EMERENCIANO, V. P.; FERREIRA, Z. M. G. S. Identificação de

triterpenos de *Miconia albicans* Triana através de análise por microcomputador. **Química Nova**. v. 13, n. 4, p. 260-262, 1990.

MACIEL, M.A.M.; et al. A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MANCINI, E.; et al. Flavonoids of *Miconia alypifolia* and their antioxidant activity. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 452-460, 2008.

MARIN, C. As consequências económicas de câncer. **El mundo**, Madri, 25 out. 2015. Disponível em: <<http://www.elmundo.es/salud/2015/10/26/562a051htm>>. Acesso em: 30 nov. 2015.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpenicos isolados de *Byrsonima microphylla*. **Química Nova**. v. 22, n. 2, p.185-188, 1999.

MOREIRA, F. P. M. **Estudo fitoquímico de *Baccharis pseudotenuifolia*, *Baccharis ligustrina* e *Baccharis platypoda* e avaliação do potencial antimicrobiano**. 2000. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) -Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NCCLS. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras - M27-A2**. 2. ed. NCCLS, Wayne: USA, 2002.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically – M7-A6**. 6. ed. NCCLS, Wayne: USA, 2003.

NINO, J. et al. In vitro inhibition of acetylcolinesterase by crude plant extracts from Colombia flora. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 783-785, 2006.

OGUNKOYA, L. Application of mass spectrometry in strutural problems in triterpenes. **Phytochemistry**, v. 20, p. 121-126, 1981.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C . **Química Nova**. v. 13, n. 4, p. 278-281, 1990.

PAIM, A. C. B. **Recursos terapêuticos vegetais e automedicação**. 2000. Dissertação (Mestrado em Botânica) -Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2000.

PEIXOTO, J. A.; et al. Antileishmanial Activity of the Hydroalcoholic Extract of *Miconia langsdorffii*, Isolated Compounds, and Semi-Synthetic Derivatives. **Molecules**, v. 16, p. 1825-1833, 2011.

PIERONI, L.G.; et al. Antioxidant activity and phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. **Molecules**, v. 16, p. 9439-9450, 2011.

PORTAL MS, **Pernambuco tem apenas 2,5% da mata atlântica original**. 2011. Disponível em:<<http://www.portalms.com.br/cod=36482>>. Acesso em: 21 jun. 2013.

QUEIROZ, M. S. O itinerário rumo às medicinas alternativas: uma análise em representações sociais de profissionais da saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 2, 2000.

RAPINI, A. **Sistemática Vegetal**: Embriófitas. Feira de Santana: UEFS, 2007.

RAY, M.; ACHARYA D.; RÍOS, J. L. **Ethnomedicinal Plants**: Revitalization of Traditional Knowledge of Herbs. New Hampshire: CRC Press, 2011.

RIFFEL, A., L. F. et al. *In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. **Brazilian Journal Medicine and Biological Research**, v.35, p. 811-818, 2002.

RIOS, J. L.; RECIO, M. Medicinal plants and antimicrobial plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.80-4, 2005.

RODRIGUES, J. et al. An unusual C6-C6" linked flavonoid from *Miconia cabuçu*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1781-1784, 2007.

RODRIGUES, J. et al. Antimicrobial Activity of *Miconia* Species (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 1, p. 120-126, 2008.

RODRIGUES, J. et al. Secundary metabolites of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 7-8, p. 834-839, 2011.

RODRIGUES, F. A. R. et al. Mefloquine–Oxazolidine Derivatives: A New Class of Anticancer Agents. **Chemical Biology of Drug Design**, v. 83, p. 126–131, 2014.

SCHUCH, C.; SIMINSKI, A.; FANTINI, A. C. usos e potencial madeireiro do jacatirão-ácu (*miconia cinnamomifolia* (de candolle) naudin) no litoral de santa catarina. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 38, n. 4, p. 735-741, 2008.

SERPELONI, J. M. et al. In vivo evaluation of anticlastogenicity of extracts from medicinal plants of *Miconia* genus using the micronucleus test. **Semina**, v. 29, n. 1, p. 47-56, 2008.

SERPELONI, J. M. et al. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: an *in vitro* analysis. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 63, p. 499-504, 2011.

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic forest of northeast Brazil. **Nature**, v. 404, p. 72-74, 2000.

SILVA, M. L. A., et al. Evaluation of the analgesic activity of an ethanol extract of *Miconia fallax*. **Bulletino Chimico Farmaceutico**, v. 142, n. 2, p. 158-160, 2002.

SNOW, D. W. Tropical frugivorous birds and their food plants: a world survey. **Biotropica**, v. 13, p. 1-14, 1981.

SPESSOTO, M. A. et al. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, v. 10, p. 606-609, 2003.

STILES, F. G.; ROSSELLI, L. Consumption of fruits of the Melastomataceae by birds: how diffuse is coevolution?. **Vegetatio**, v. 107, n. 1, p. 57-73, 1993.

TABARELLI, M.; PINTO, S. R.; LEAL, I. R. Floresta atlântica nordestina: fragmentação, degeneração e perda da biodiversidade. **Ciência Hoje**, v. 44, n. 263, p. 36-41, 2009.

TARAWNEH, A. H. et al. Flavanones from *Miconia prasina*. **Phytochemistry letters**, v. 7, p. 130-132, 2014.

TOKES, L.; JONES, G.; DJERASSI, C. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. CLXI. Elucidation of the Course of the Characteristic Ring D Fragmentation of Steroids. **Journal American Chemical Society**, v. 90, p. 5465-5477, 1968.

TOMAZZONI, M. I. Subsídios para a introdução do uso de fitoterápicos na rede básica de saúde do município de Cascavel. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VASCONCELOS, M. A. L. et al. In vivo analgesic and antiinflammatory activities of ursolic acid and oleanoic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Journal of Bioscience**, v. 61, p. 477-482, 2006.

VÁZQUEZ, L. H.; PALAZON, P.; NAVARRO-OCAÑA, A. The pentacyclic triterpenes α - β -amyrins, a review of sources and biological activities. In **Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. Rijeka, Croatia, 2012.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, E. G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1245-1252, 2009.

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant drug analysis**: a thin layer chromatography atlas. 2 ed. Nova York: Springer, 2001.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. Nova York: CRC Press, 2008.

WANNMACHER L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?, **Uso racional de medicamentos**: temas selecionados. v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Bulletin of the world health organization: Regulatory situation of herbal medicines. **A worldwide review**, Geneva, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The top 10 causes of death**, 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Factos e números sobre o câncer**: nota descriptiva N° 297. 2015. Disponível em: <<http://www.cancer.int/cancer/about/facts/es/index.html>>. Acesso em: 23 de nov. 2015.

WYLLIE, S. G.; DJERASSI, C. Mass Spectrometry in Structural and tereochemical Problems. CXLVI. Mass Spectrometric Fragmentations Typical of Sterols with Unsaturated Side Chains. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 305-313, 1968.

ZHANG, Z; et al. Flavanone glycosides from *Miconia trailii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 39-41, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

TONNY CLEY CAMPOS LEITE

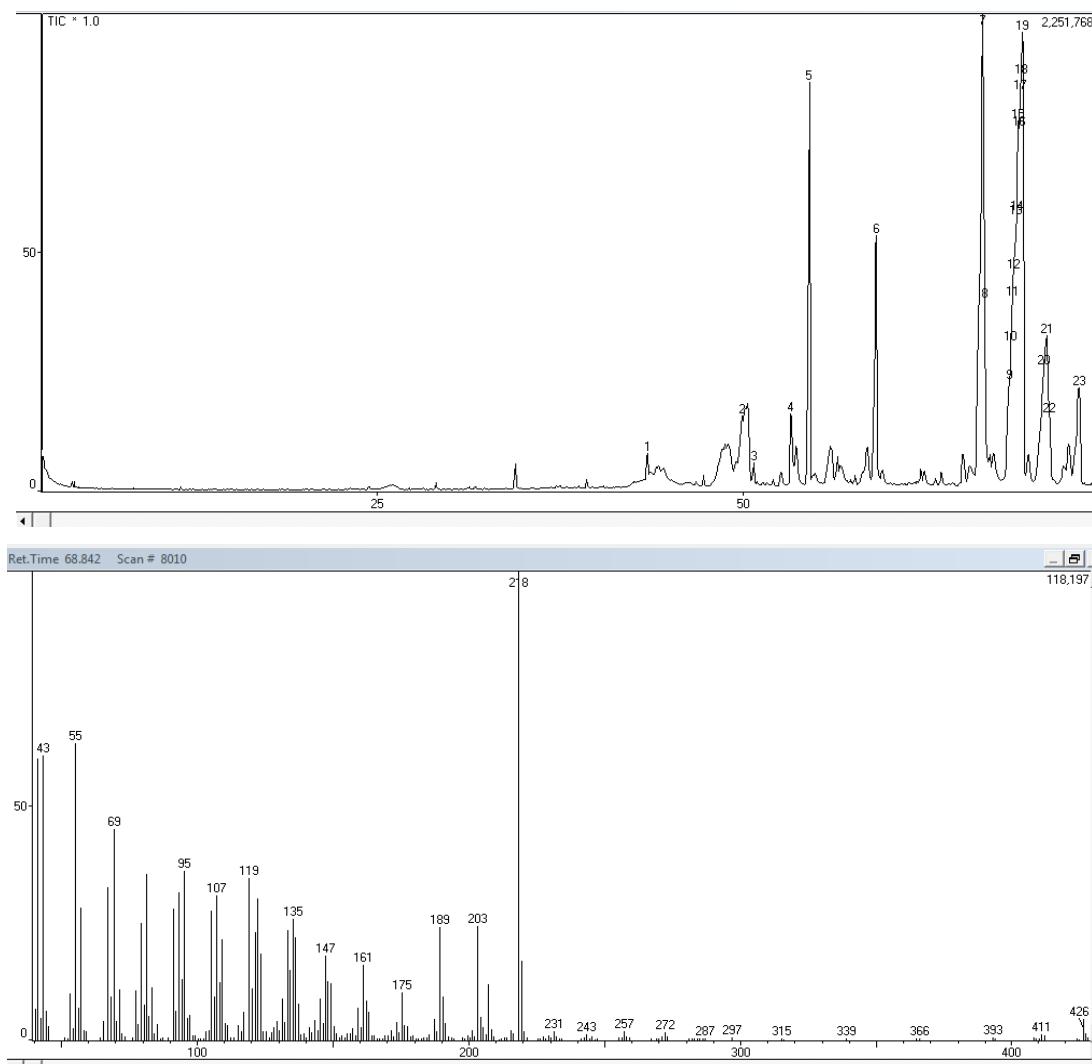
**Estudo químico e farmacológico biomonitorado de sete espécies
do gênero *Miconia* (Melastomataceae)**

**APÊNDICE
CROMATOGRAMAS E
ESPECTROS**

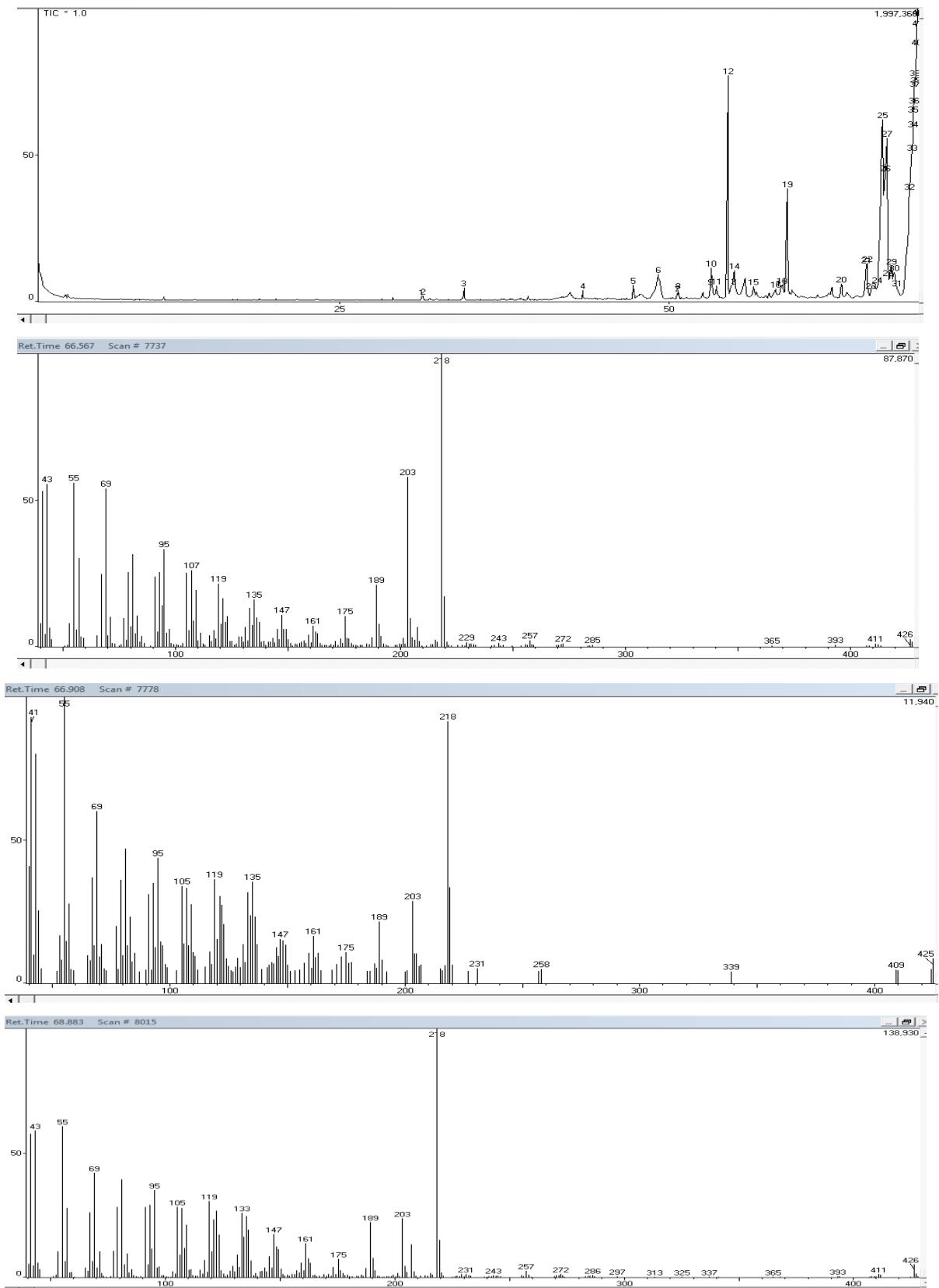
Recife
2016

APÊNDICE A – Cromatogramas e espectros de massas das frações analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) das folhas de *Miconia hypoleuca*

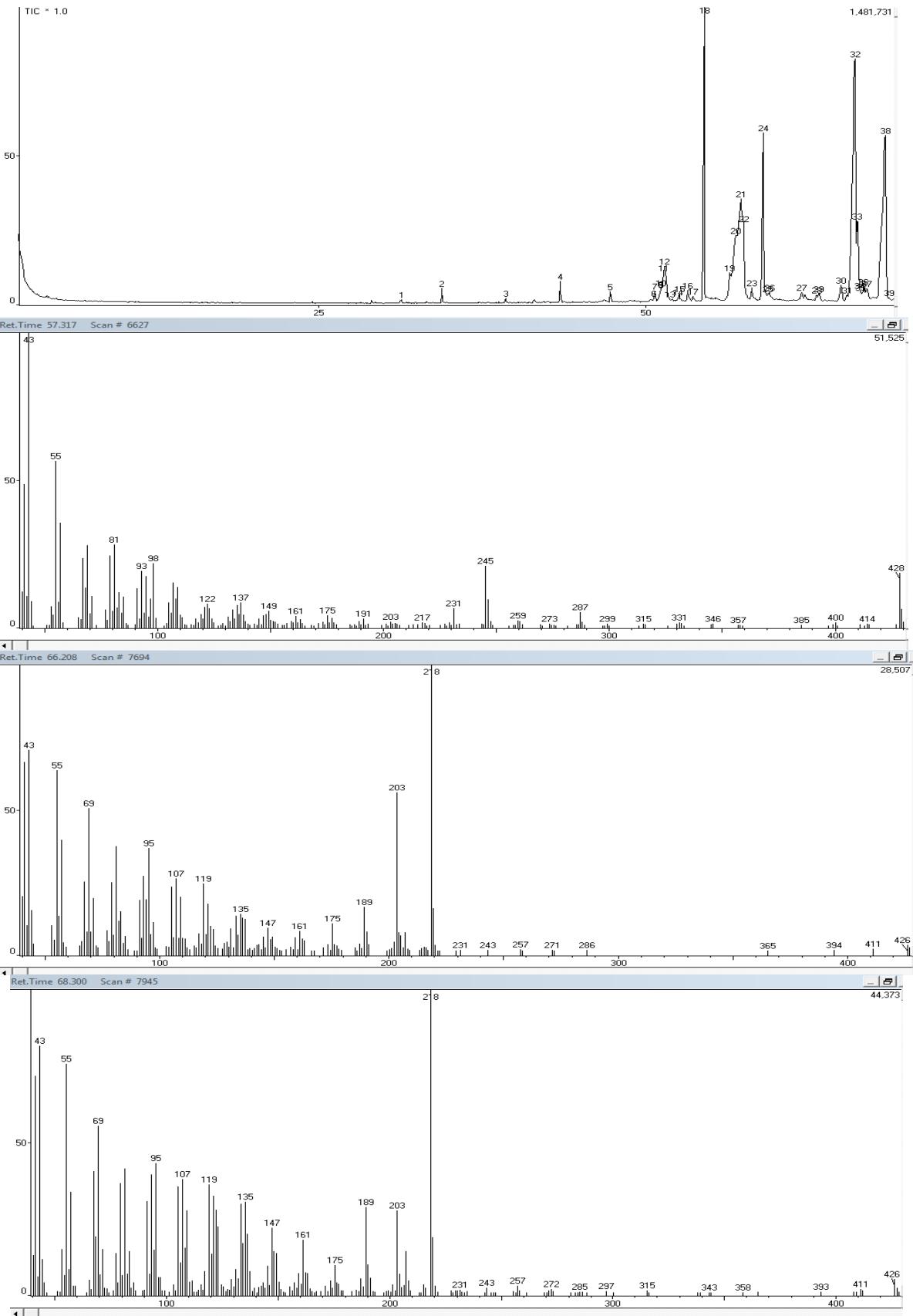
Cromatograma e espetro por CG-EM da amostra MHP 42



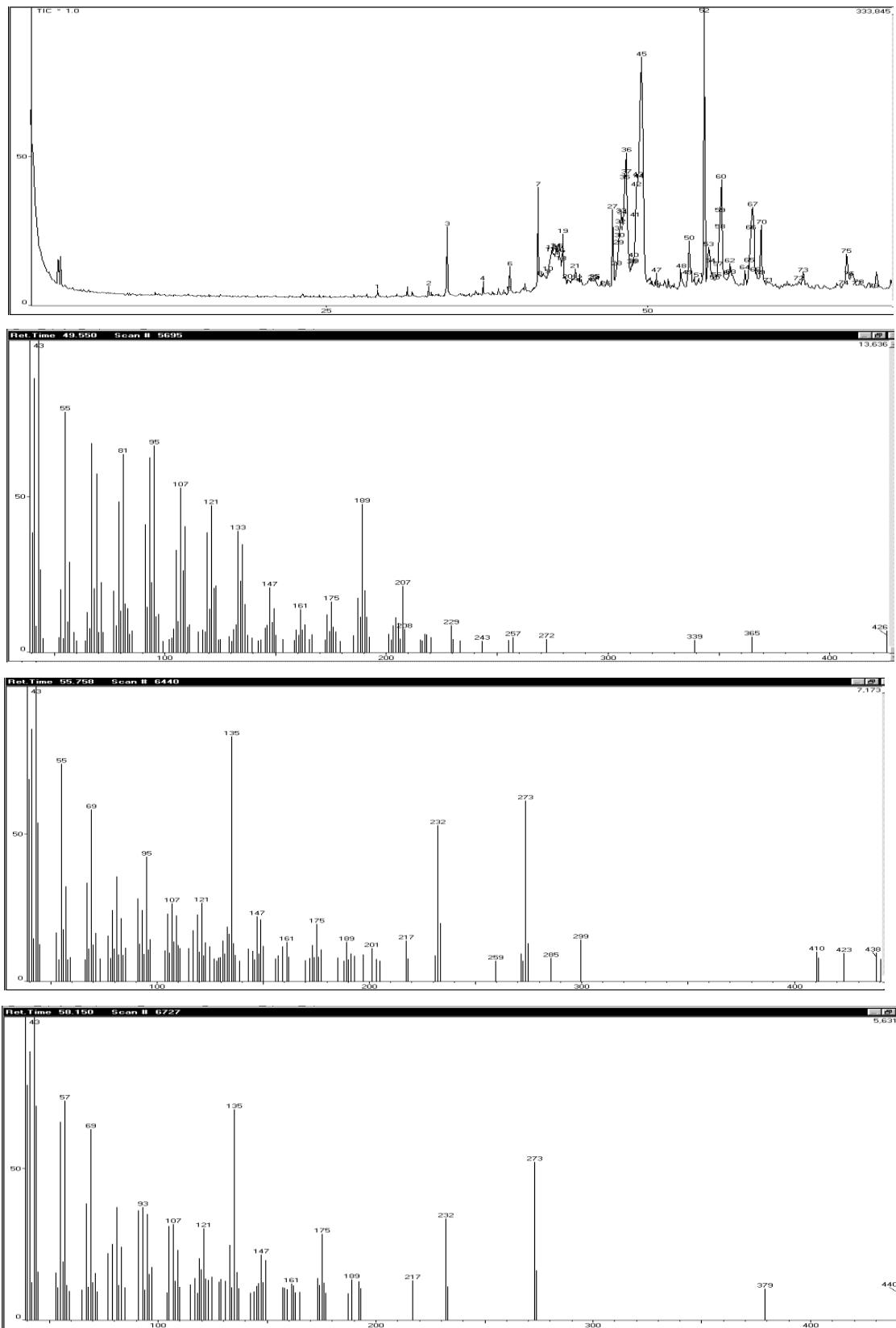
Cromatograma e espetros por CG-EM da amostra MHP 43



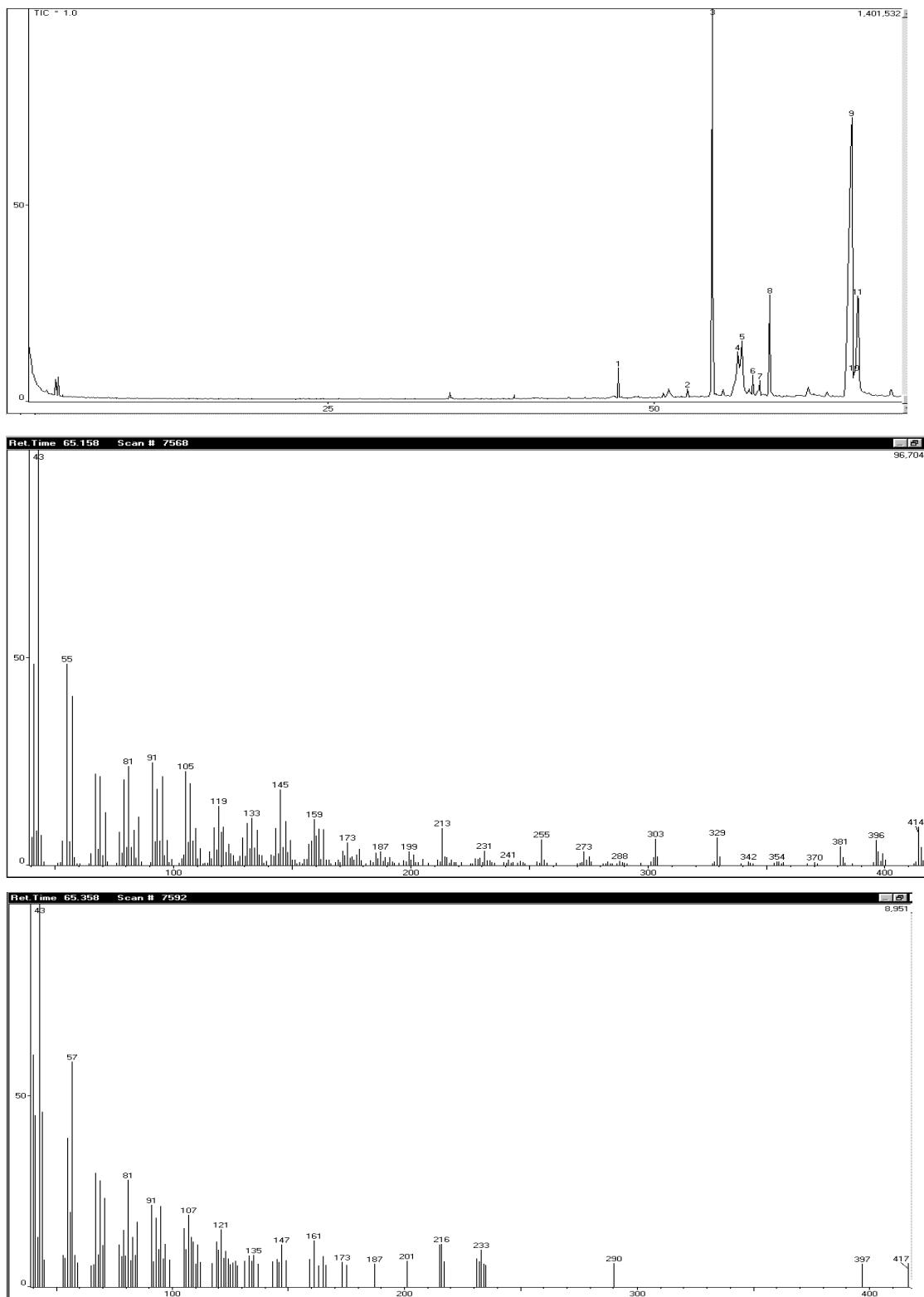
Cromatograma e espetros da CG-EM da amostra MHP 44



Cromatograma e espetros da CG-EM da amostra MHP 49

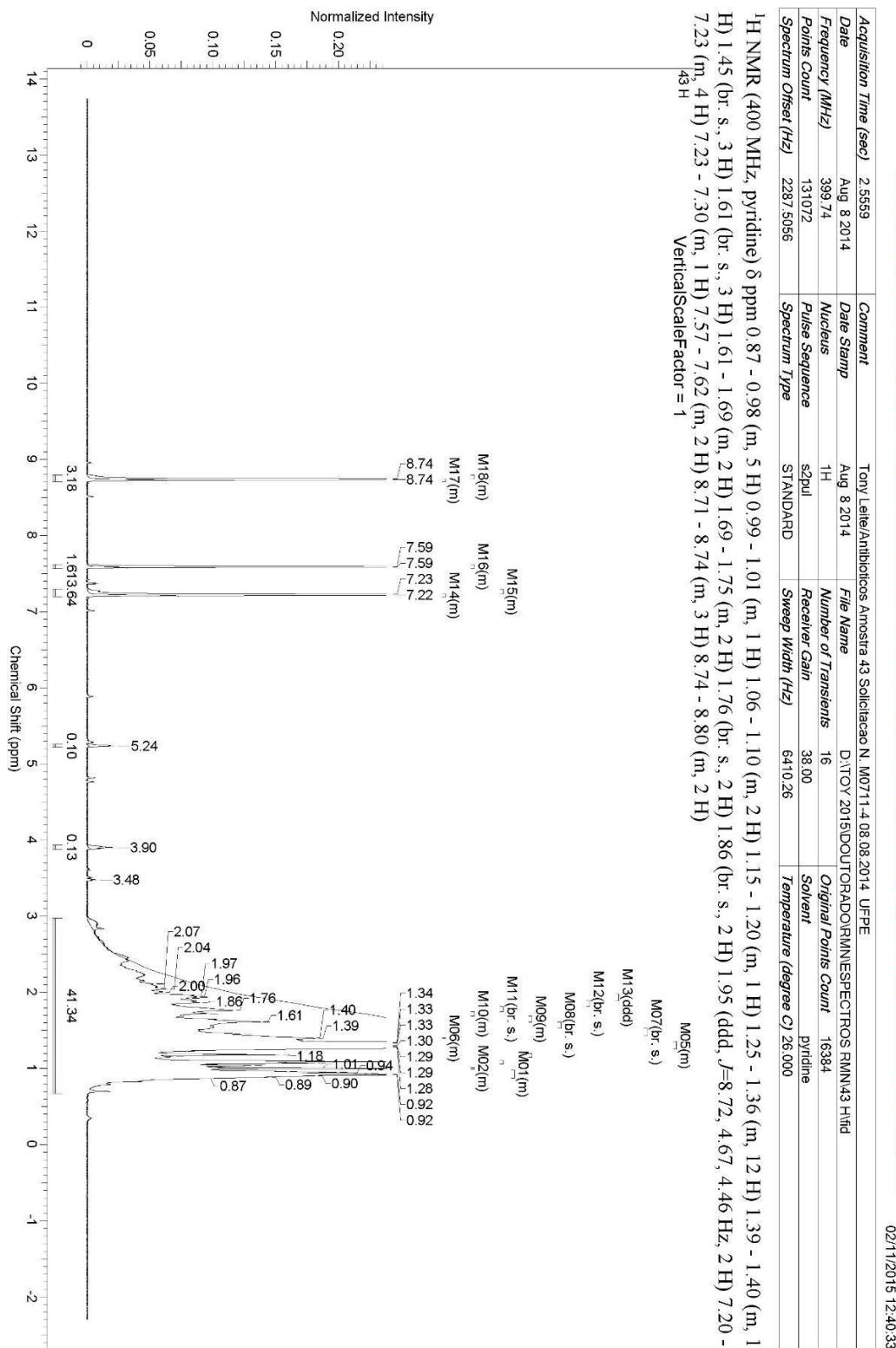


Cromatograma e espetros da CG-EM da amostra MHP 51

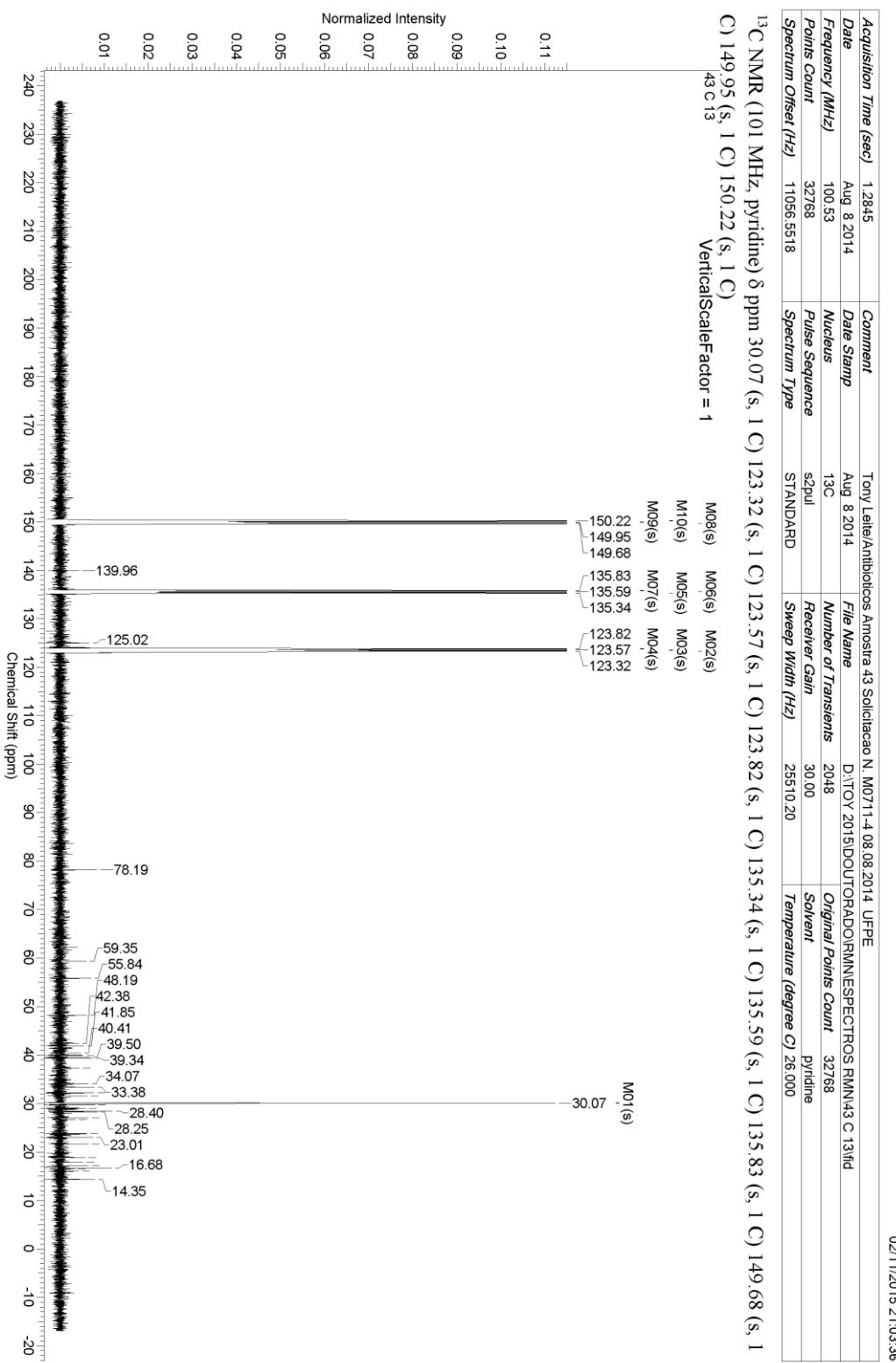


APÊNDICE B – Espectros de RMN das frações das folhas de *Miconia hypoleca*

Espectro de ^1H -RMN de 43, em piridina-d5.



Espectro de ^{13}C -RMN de 43, em piridina-d5.



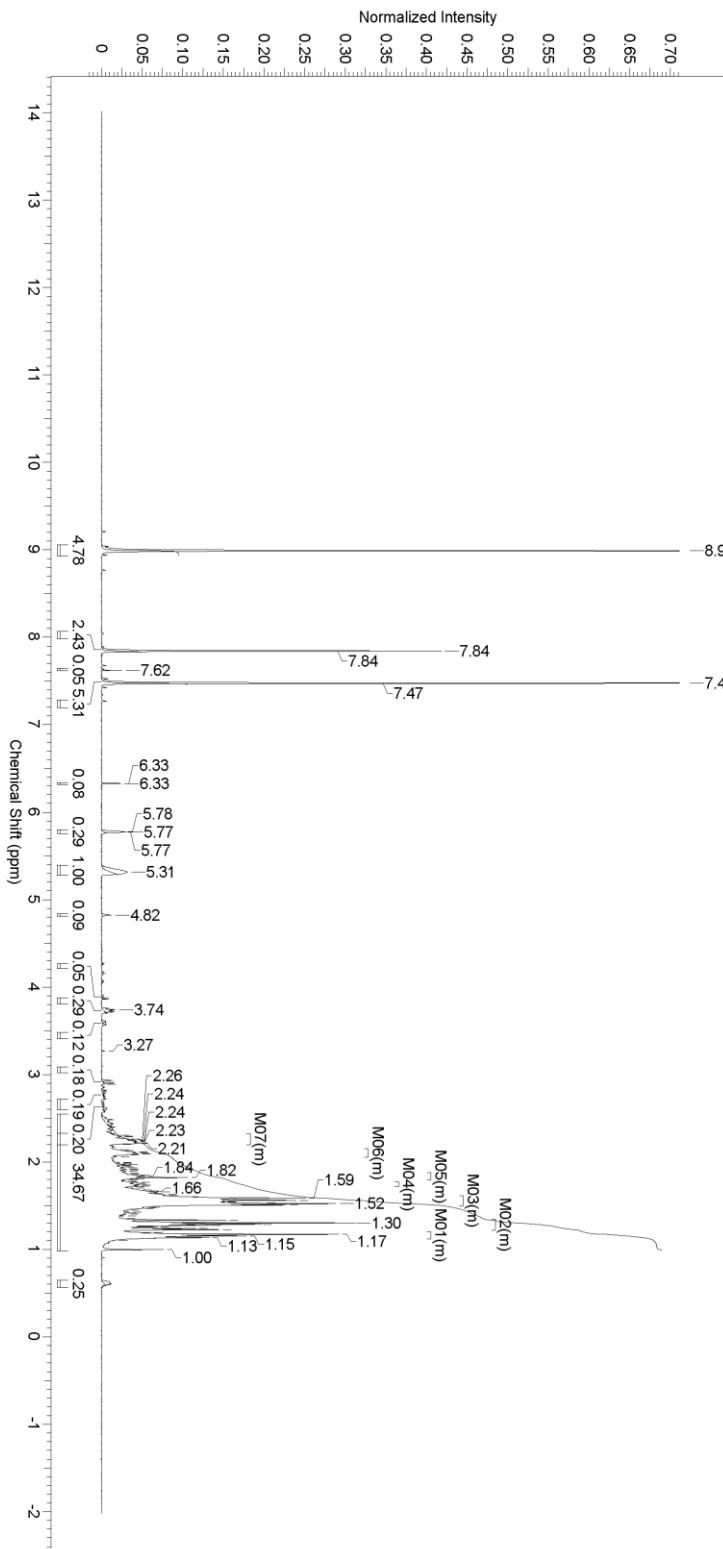
Espectro de ^1H -RMN de 47, em piridina-d5.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

03/11/2015 10:26:23

Acquisition Time (sec)	2.5559	Comment	Tony Leite/Antibioticos Amostra 47 Solictacao N. M0711-5 11.08.2014 UFPE
Date	Aug 11 2014	Date Stamp	Aug 11 2014
Frequency (MHz)	399.74	Nucleus	1H
Points Count	131072	Pulse Sequence	s2pul
Spectrum Offset (Hz)	2338.4761	Spectrum Type	STANDARD
		Sweep Width (Hz)	6410.26
		Temperature (degree C)	26.000

^1H NMR (400 MHz, pyridine) δ ppm 1.12 - 1.20 (m, 5 H) 1.22 - 1.34 (m, 7 H) 1.50 - 1.61 (m, 11 H) 1.72 - 1.77 (m, 2 H) 2.20 - 2.32 (m, 3 H) 7.45 - 7.54 (m, 7 H) 7.82 - 7.90 (m, 3 H) 8.93 - 9.06 (m, 6 H)

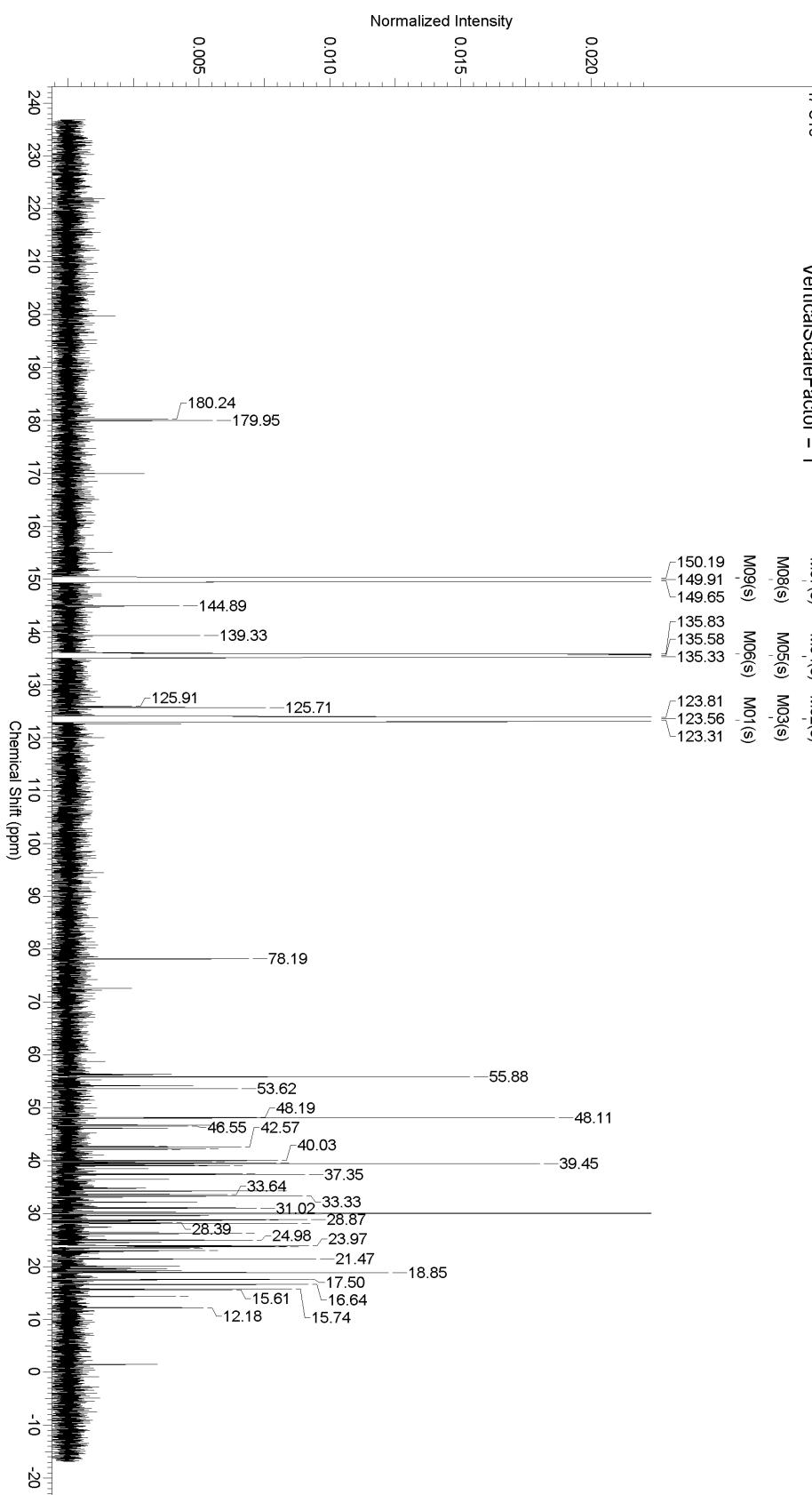


This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

03/11/2015 11:25:27

Acquisition Time (sec)	1.2845	Comment	Tony Lelie/Antibioticos Amostra 47 Solicitacao N. M0711-5-1108.2014 UFPE
Date	Aug 11 2014	Date Stamp	Aug 11 2014
Frequency (MHz)	100.53	Nucleus	¹³ C
Points Count	32768	Pulse Sequence	s2pul
Spectrum Offset (Hz)	11056.5518	Spectrum Type	STANDARD
			Sweep Width (Hz)
			25510.20
			Temperature (degree C)
			26.000

¹³C NMR (101 MHz, pyridine) δ ppm 123.31 (s, 1 C) 123.56 (s, 1 C) 123.81 (s, 1 C) 135.33 (s, 1 C) 135.58 (s, 1 C) 135.83 (s, 1 C) 149.65 (s, 1 C) 149.91 (s, 1 C) 150.19 (s, 1 C)



Espectro de ^1H -RMN de 51, em piridina-d5.

Tony Leite/Antibioticos
 Amostra 51
 Solicitacao N. M0711-1
 31.07.2014 UFPE

Sample Name:

Data Collected on:
 varian400-rnmr400

Archive directory:

Sample directory:

Fidfile: M0711.1.h

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)

Solvent: pyridine

Data collected on: Jul 31 2014

Temp. 26.0 C / 299.1 K

Operator: ricardo

Relax. delay 1 000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 2.556 sec

Width 6410.3 Hz

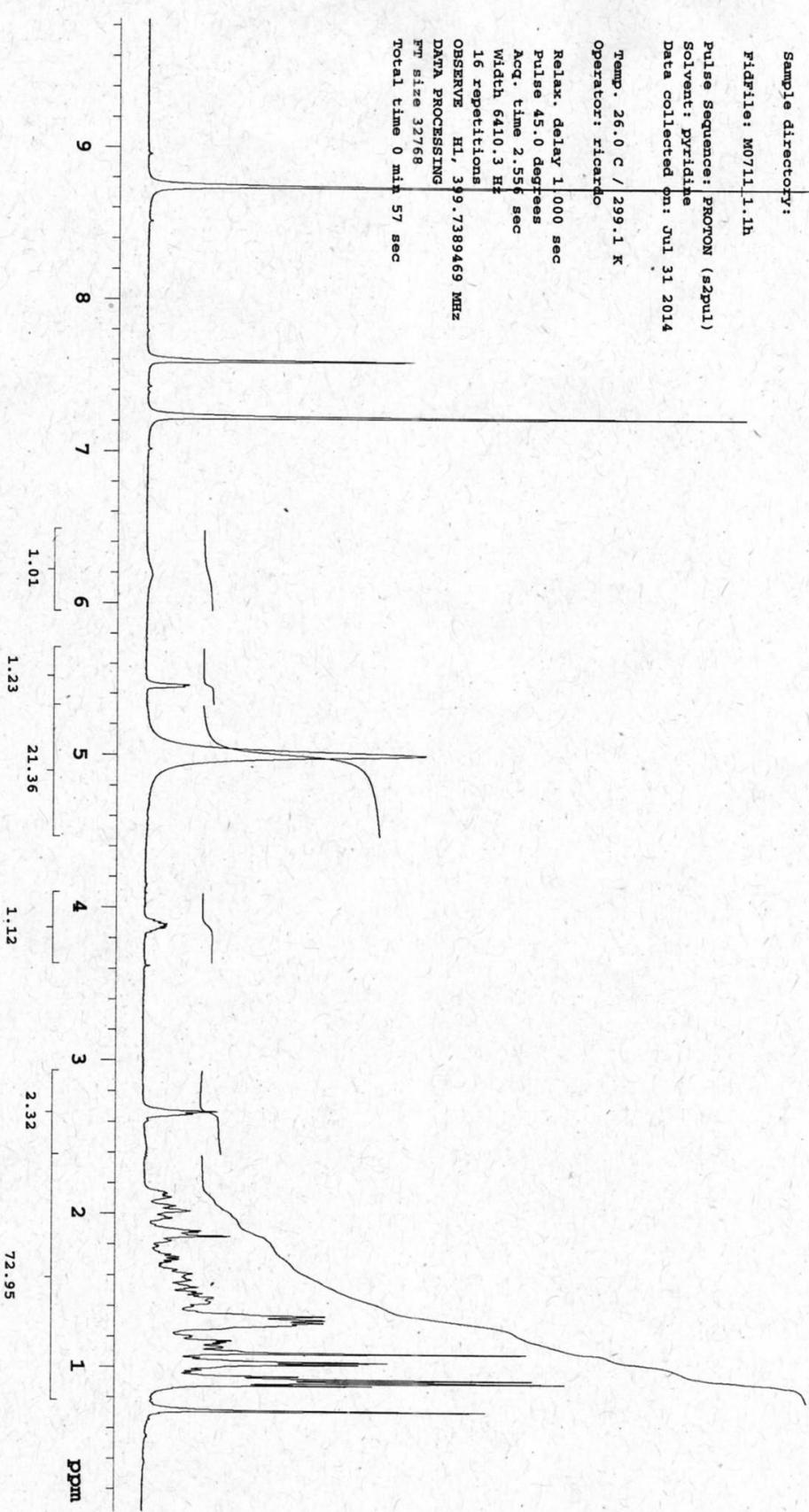
16 repetitions

OBSERVE H1, 399.7389469 MHz

DATA PROCESSING

FT size 32768

Total time 0 min 57 sec



Agilent
Technologies

Espectro de ^{13}C -RMN de 51, em piridina-d5