



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**“ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE *HIMATANTHUS*
SUCUUBA”**

Mestranda: Aimê Almeida de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva

**MANAUS
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Dissertação de Mestrado

Título do Plano de Trabalho:

**“ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE *HIMANTHUS
SUCUUBA*”**

Orientanda: Aimê Almeida de Oliveira

Bolsista FAPPEAM

Ingresso no Curso: Agosto de 2010.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva

Área de concentração: Química Orgânica

Linha de pesquisa: Fitoquímica

**Manaus
2013**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

O48a	<p>Oliveira, Aimêe Almeida de Análise fitoquímica dos extratos e frações obtidos de <i>Himatanthus</i> sucuuba / Aimêe Almeida de Oliveira. - 2013. 93 f. : il. color. ; 31 cm. Dissertação (mestrado em Química) — Universidade Federal do Amazonas. Orientador: Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva.</p> <p>1. Química vegetal 2. Apocynacea 3. Fitoquímicos 4. Química orgânica I. Silva, Jefferson Rocha de Andrade, orientador II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p> <p>CDU (2007): 581.19(043.3)</p>
------	--

AIMÊE ALMEIDA DE OLIVEIRA

ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE *HIMANTHUS SUCUUBA*

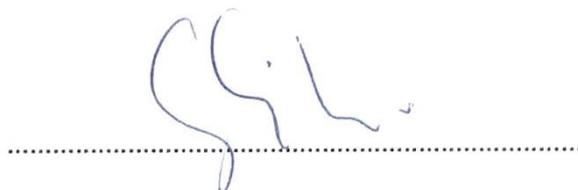
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como requisito necessário para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Orgânica.

Aprovada em: 19 de Julho de 2013.

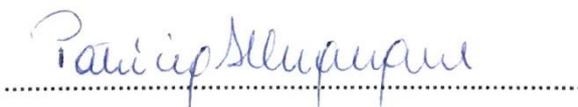
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva – Presidente (UFAM)



Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Belém Pinheiro – Membro (UFAM)



Prof.ª Dr.ª Patrícia Melchionna Albuquerque – Membro (UEA)

E tudo ficou tão claro, e o que era raro ficou comum...

Engenheiros do Havaii

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, garra e coragem a mim concedidos para vencer mais esta etapa.

Aos meus pais, que nunca colocaram objeção alguma aos meus anseios pessoais e profissionais, e me proporcionaram uma maravilhosa formação.

Ao Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva pela confiança, credibilidade e orientação.

À Dr. Ana Claudia Fernandes Amaral pelas contribuições a este trabalho.

Ao Héctor Henrique Ferreira Koolen pelas contribuições a esta trabalho, pelo apoio, companheirismo e incentivo nos momentos difíceis. Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza pela compreensão, apoio, orientação pessoal e a amizade dedicada.

Aos colegas e amigos do “LabCro” pelo companheirismo e incentivo em todas as etapas deste árduo processo.

Ao doutorando Felipe Moura Araújo da Silva pela ajuda sempre que necessária.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais – UFAM pelas horas de trabalho juntos.

Ao Programa de Pós-graduação em Química e a FAPEAM pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

OBRIGADA!

Resumo

A família Apocynaceae apresenta uma grande diversidade de metabólitos secundários, com potencial biológico e farmacêutico, o que tem despertado grande interesse nos estudos de seus gêneros. O gênero *Himatanthus* possui treze espécies que estão amplamente distribuídas na região norte do Brasil. A espécie da região amazônica, *Himatanthus sucuuba*, é latexcente, arbórea, cujo tronco é ereto e a casca rugosa, popularmente conhecida como sucuba, sucuuba ou janaguba. O látex, cascas e folhas são utilizados na medicina popular como antitumoral, antifúngico, antianêmico, vermífugo e no tratamento de gastrites e artrites. No presente estudo as raízes de *H. sucuuba* foram utilizadas para a obtenção dos extratos hexano, diclorometano e metanol. Do extrato hexano foi isolada a mistura dos cinamatos de lupeol, α e β -amirina. O extrato diclorometano foi submetido a fracionamento cromatográfico fornecendo os iridóides plumericina, isoplumericina, plumieridina e o esteróide sitosterol. Do extrato metanol foram isoladas, após sucessivos fracionamentos, o iridóide plumierídeo, e os terpenos acetato de lupeol e a mistura dos ácidos ursólico e oleanólico. A atividade antioxidante foi avaliada por meio da capacidade de sequestro do radical estável 2,2- difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), utilizando quercetina como padrão. O extrato metanol das raízes secas/parte diclorometano foi o extrato com melhor atividade antioxidante com a concentração de CS_{50} em 244, 56 $\mu\text{g/mL}$. No teste de toxicidade frente à *Artemia salina* o extrato hexano obtido da raiz fresca, apresentou a atividade mais pronunciada 111,06 $\mu\text{g/mL}$. A quantificação de iridóides em diferentes espécies do gênero *Himatanthus* comprovou a presença do plumierídeo constituinte majoritário em todas as espécies analisadas. As análises de diferentes amostras realizadas pela cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLUE-EM) conduziu à identificação dos iridóides 15-desmetilplumierideo e plumierídeo, presentes apenas nos frutos verdes da espécie *H. sucuuba*.

Palavras-chave: Apocynaceae; *Himatanthus sucuuba*; iridóides.

Abstract

The family Apocynaceae presents a wide variety of secondary metabolites with potential biological and pharmaceutical activities, which has attracted great interest in studies of their genres. The genus *Himatanthus* has thirteen species that are widely distributed in northern Brazil. The species of the Amazon region, *Himatanthus sucuuba* is a latex containing tree, whose trunk is erect and rough skin, popularly known as sucuba, sucuuba or janaguba. The latex, barks and leaves are used in folk medicine as antitumor, antifungal, anti-anemic, anthelmintic and for treatment of gastritis and arthritis. In the present study the roots of *H. sucuuba* were used to obtain hexane, dichloromethane and methanol extracts. From the hexane extract was isolated the mixture of lupeol cinnamates, α and β -amyrin. The dichloromethane extract was subjected to fractionation providing the iridoids plumericine, isoplumericine, plumieridine and the steroid sitosterol. From the methanol extract were isolated after successive fractionations, the iridoid plumieride and the terpenes lupeol acetate and the mixture of ursolic and oleanolic acids. The antioxidant activity was evaluated by sequestration capacity of the stable radical 2,2 - diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) using quercetin as standard. The methanol extract of the dried roots / the dichloromethane extract was better with antioxidant activity with the concentration of CS50 in 244.56 mg/mL. The toxicity test on *Artemia salina* hexane extract obtained from the fresh root, showed activity more pronounced at 111.06 mg/mL. Quantification of iridoids in different species of the genus *Himatanthus* proved the presence of plumieride as the major constituent in all analyzed species. The analysis of different samples analyzed by ultra efficient liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS) led to the identification of iridoid 15-desmethylplumieride and plumieride, present only in the green fruits of the species *H. sucuuba*.

Keywords: Apocynaceae; *Himatanthus sucuuba*; iridoids.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	XII
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. <i>Himatanthus sucuuba</i> (Spruce) Woodson.....	17
1.2 Metabólitos secundários.....	20
1.2.1 Iridóides.....	20
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. EXPERIMENTAL	25
3.1. Materiais Utilizados.....	25
3.2. Coleta e Preparo dos Extratos.....	27
3.2.1. Raízes	27
3.2.2. Frutos.....	30
3.3. Análise dos extratos	31
3.3.1. Teste antioxidante - DPPH	31
3.3.2. Teste frente à <i>Artemia salina</i>	32
3.3.3. Extrato hexano das raízes frescas – EHRF	33
3.3.4. Extrato diclorometano das raízes frescas – EDRF	34
3.3.5. Extrato diclorometano das raízes secas – EDRS	35
3.3.6. Extrato metanol das raízes secas/aquoso – EMRSA	36
3.3.7. Análises CLAE.....	37
3.3.8. Frutos.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Avaliação do potencial antioxidante	40
4.2. Teste de atividade frente à <i>Artemia salina</i>	41
4.3. Identificação das frações isoladas	42
4.4. Análises CLAE.....	76
4.5. Análise dos frutos de <i>H. sucuuba</i>	79
5. CONCLUSÃO.....	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

Lista de figuras

Figura 1. Espécie <i>Catharanthus roseus</i>	15
Figura 2. Alcalóides isolados de <i>Himatanthus lancifolius</i>	17
Figura 3. Espécie <i>Himatanthus sucuuba</i> . Fonte: Arquivo pessoal.	18
Figura 4. Estruturas químicas dos iridóides e triterpenos isolados de <i>Himatanthus sucuuba</i>	19
Figura 5. Esquema da via biossintética dos terpenos (modificado de DEWICK, 2002).21	
Figura 6. Mecanismo de ciclização do geraniol (Modificado de DEWICK, 2002).	22
Figura 7. Mecanismo de formação do iridotrial (Modificado de DEWICK, 2002).	23
Figura 8. Mecanismo de formação da secologanina (Modificado de DEWICK, 2002). 23	
Figura 9. Raízes de <i>Himatanthus sucuuba</i> (Fonte: Arquivo Pessoal).	28
Figura 10. Fluxograma para a obtenção dos extratos.	28
Figura 11. Fluxograma para a obtenção dos extratos.	29
Figura 12. Frutos coletados da espécie <i>H. sucuuba</i>	30
Figura 13. Cistos incubados em solução salina.	32
Figura 14. Amostras submetidas a iluminação artificial.	33
Figura 15. Fluxograma do isolamento das amostras HS 1 e HS 2.	34
Figura 16. Fluxograma do isolamento das amostras HS 3 e HS 4.	35
Figura 17. Fluxograma do isolamento da amostra HS 5.	36
Figura 18. Fluxograma do isolamento das amostras HS 6, HS 7 e HS 8.	37
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da amostra HS 1.....	42
Figura 20. Estrutura química dos triterpenos cinamato de lupeol, α e β-amirina.....	43
Figura 21. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da amostra HS 2.	44
Figura 22. Cinamoil.....	45
Figura 23. Cromatograma das substâncias com tempos de retenção em 27.87 e 28.36 minutos.	46

Figura 24. Espectros de massas das substâncias isoplumericina (t_R 27.87 min.) e plumericina (t_R 28.36 min.)	47
Figura 25. Proposta de fragmentação para o pico m/z 258.....	47
Figura 26. Proposta de fragmentação para o pico m/z 230.....	48
Figura 27. Proposta de fragmentação para o pico m/z 193.....	48
Figura 28. Proposta de fragmentação para o pico m/z 139.	49
Figura 29. Espectro de RMN de 1H da substância HS 3.	49
Figura 30. Acoplamentos dos hidrogênios H-6 e H-7.	50
Figura 31. Ampliação do espectro de RMN 1H nas regiões de δ 5,50 - 6,10 ppm.....	50
Figura 32. Ampliação do espectro de RMN 1H nas regiões de δ 3,40 – 4,05 ppm.	51
Figura 33. Ampliação do espectro de RMN 1H nas regiões de δ 1,95 – 2,45 ppm.	52
Figura 34. Estrutura do iridóide plumericina e isoplumericina.	53
Figura 35. Espectro de Massas de HS 4 por APCI-MS(+).	54
Figura 36. Espectro de RMN de 1H da substância HS 4.	55
Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C da substância HS 4.	55
Figura 38. Ampliação do espectro de RMN de 1H nas regiões de δ 4,30 – 6,50.	56
Figura 39. Ampliação do espectro de RMN de 1H nas regiões de δ 1,20 – 4,00 ppm. ..	57
Figura 40. Estrutura do núcleo ciclopentenodihidropirano	57
Figura 41. Ampliação do espectro de RMN de 1H nas regiões de δ 6,90 – 7,65 ppm. ..	58
Figura 42. Mapa de correlação de longa de distancia 1H - ^{13}C	59
Figura 43. Correlações de longa de distancia 1H - ^{13}C para o núcleo ciclopentenodihidropirona.	59
Figura 44. Correlações de HMBC para o restante do esqueleto plumérico.	60
Figura 45. Estrutura do iridóide plumieridina.	62
Figura 46. Espectro de massas (EI-MS) da substância HS 5.....	63
Figura 47. Espectro de RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) da amostra HS 5.	64
Figura 48. RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) da amostra HS 5.	65
Figura 49. DEPT 135° do espectro de ^{13}C da amostra HS 5.	65

Figura 50. Estrutura do sitosterol.	67
Figura 51. Ampliação do espectro de RMN ¹ H na região de 4,45 a 4,78 ppm.	68
Figura 52. Ampliação do espectro de RMN ¹ H na região de 5,0 a 7,6 ppm	69
Figura 53. Estrutura do iridóide plumierídeo.	70
Figura 54. Espectro de massas da amostra HS 7.	71
Figura 55. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, em clorofórmio- <i>d</i>) da amostra HS 7.	72
Figura 56. Estrutura do acetato de lupeol.	72
Figura 57. Espectro de massas (IE-TOF) da amostra HS 8.	73
Figura 58. Esquema das fragmentações da amostra HS 8.	74
Figura 59. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, solvente CDCl ₃) da amostra HS 8.	74
Figura 60. Estrutura do ácido ursólico.	75
Figura 61. Estrutura do ácido oleanólico.	75
Figura 62. Cromatograma dos padrões dos iridóides.	77
Figura 63. CCD dos padrões e extratos dos frutos verdes e maduros de <i>H. sucuuba</i>	79
Figura 64. Cromatograma do iridóide plumierídeo.	80
Figura 65. Cromatogramas dos extratos dos frutos verdes.	81
Figura 66. Cromatograma do extrato das raízes de <i>H. sucuuba</i>	82

Lista de tabelas

Tabela 1. Tabela dos extratos obtidos das raízes de <i>H. sucuuba</i>	29
Tabela 2. Resultado do teste antioxidante.	40
Tabela 3. Resultado do teste de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	41
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H da amostra HS 2.....	45
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H da amostra HS 3 em comparação com os dados da plumericina e isoplumericina descritos na literatura (SILVA et al., 1998).	52
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de HS 4 em comparação com os dados da plumieridina descritos na literatura (BOROS et al., 1991).....	60
Tabela 7. Dados de RMN de ^{13}C e DEPT 135° de HS 5 em comparação com os dados descritos na literatura (NASSER, 2007).....	66
Tabela 8. Dados de RMN ^1H de HS 6 em comparação com os dados descritos na literatura (SILVA, 2000).	69
Tabela 9. Tabela das equações regressivas dos padrões.....	76
Tabela 10. Tabela das espécies analisados do gênero <i>Himatanthus</i>	78

Lista de Abreviaturas e símbolos

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC	Cromatografia em Coluna
MPLC	Cromatografia Líquida de Média Pressão
CLUE-EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
MS	Mass spectrometry
EM	Espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
MHz	Megahertz
J	Constante de acoplamento
HMBC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
°C	Graus Celsius
eV	Eletrovolts
Hz	Hertz
ppm	Parte por milhão
δ	Deslocamento químico
DP	Desvio padrão
TFA	Ácido trifluoroacético
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
t _R	Tempo de retenção
MeOD	Metanol deuterado

α	Alfa
β	Beta
C-18	Carbono octadecyl
AcOEt	Acetato de etila
MeOH	Metanol
CL ₅₀	Concentração letal para 50 % dos indivíduos
DMSO	Dimetilsulfóxido
CS ₅₀	Capacidade de sequestro para 50%
Abs	Absorbância
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
DPPH	Radical 2,2-Difenil-picrilhidrazil
FMP	Fruto maduro polpa
FMC	Fruto maduro casca
FVP	Fruto verde polpa
FVS	Fruto verde semente
FVC	Fruto verde casca
EMRSD	Extrato metanol raiz seca/parte diclorometano
EMRSA	Extrato metanol raiz seca/parte aquosa
EMRS	Extrato metanol raiz seca
EMRF	Extrato metanol raiz fresca
EDRS	Extrato diclorometano raiz seca
EDRF	Extrato diclorometano raiz fresco
EHRS	Extrato hexano raiz seca
EHRF	Extrato hexano raiz fresca
AM	Amazonas
APCI	A Ionização Química a Pressão Atmosférica

IE	Impacto eletrônico
V	Volts
Kv	Quilovolts
ESI	Ionização por eletrospray
TOF	Analisador de massas por tempo de voo

1. Introdução

A família Apocynaceae pode ser considerada uma das mais importantes fontes vegetais de constituintes químicos utilizados na medicina moderna. No Brasil ocorrem 41 gêneros e aproximadamente 400 espécies (JUDD et al., 2009; VAN DEN BERG, 1993).

As espécies vegetais dessa família são objetos de estudos químicos, botânicos e farmacêuticos, destacando-se na etnofarmacologia por seu uso no tratamento de doenças do sistema nervoso central (*Bonafousia albiflora*), articulações (*Bonafousia disticha*) e sistema cardiovascular (*Catharanthus roseus*) (GRENAND et al., 1987). Dentre as classes químicas mais encontradas na família destacam-se os alcalóides, glicosídeos cardiotônicos e iridóides (DI STASI, C.L. & HIRUMA-LIMA, 2002).

Catharanthus roseus (Figura 1) é muito estudada por possuir alcalóides bisidólicos (catharanthamina, vincaleucoblastina e leurocristina), responsáveis pela atividade antitumoral (BRANDÃO, et al., 2010; EL-SAYED et al, 1981).



Figura 1. Espécie *Catharanthus roseus*.

(Modificada de <http://digilander.libero.it/ipdid/photos/catharanthus-roseus.htm>)

Outro gênero pertencente à família Apocynaceae de grande relevância química e farmacológica é o gênero *Himatanthus*, este gênero é exclusivo da América do Sul e morfologicamente é conhecido por possuir folhas simples, com lâminas inteiras, sua nervação é pinada com as nervuras secundárias unindo-se a arcos proeminentes. Os fragmentos da casca do caule têm formato plano, superfície irregular, exibindo fendas mais ou menos profundas na superfície externa (MARATTO et al., 2002).

O gênero *Himatanthus* possui quatorze espécies, sendo elas: *H. obovatus*, *H. stenophyllus*, *H. drasticus* (*H. fallax*), *H. lancifolius* (*H. fallax*), *H. fallax*, *H. phagedaenicus*, *H. articulatus* (*H. sucuuba*), *H. speciosus*, *H. sucuuba*, *H. bracteatus* (*H. speciosus*), *H. tarapotensis*, *H. semilunatus* e *H. attenuatus* (SPINA, 2004). Este gênero também se destaca por incluir espécies popularmente utilizadas como plantas medicinais e que possuem grande diversidade de compostos farmacologicamente ativos, entre eles alcaloides indólicos, iridóides e ésteres triterpênicos (DI STASI, C.L. & HIRUMA-LIMA, 2002; MARATTO et al., 2002). Dentre essas espécies podemos destacar a *H. lancifolius* utilizada no tratamento de doenças da pele, asma, sífilis, estimulante de contrações uterinas e para regulação menstrual. Dois alcalóides a uleína (1) e desmetoxiaspidospermina (2) (FRANÇA et al., 2000) já foram isolados. O látex exsudado de *H. articulatus* é utilizado como antifúngico, antibacteriano e no tratamento de úlceras, tumores, inflamações, sífilis, câncer e malária. Do seu látex dessa espécie já foram isolados cinamatos de α e β -amirna, cinamato de lupeol, acetato de lupeol e cicloartenol (REBOUÇAS, et al, 2012).

H. sucuuba é amplamente utilizada na medicina popular em diferentes localidades na Amazônia, Peru e Colômbia. O látex exsudado das cascas de *H. sucuuba* é utilizado no tratamento de infecções da pele e coceiras, enquanto que as folhas são utilizadas

contra problemas de intestino e na expulsão de vermes (SILVA et al., 2003; DI STASI, C.L. & HIRUMA-LIMA, 2002).

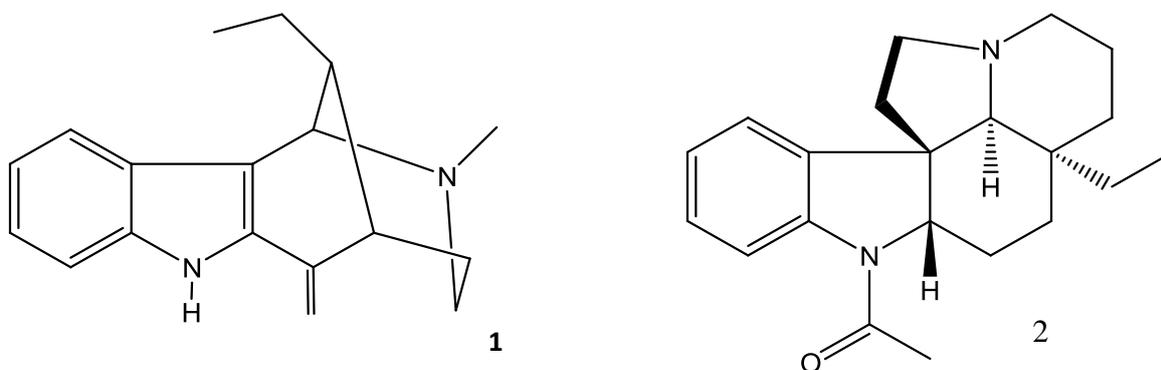


Figura 2. Alcalóides isolados de *Himatanthus lancifolius*.

1.1. *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson

H. sucuuba (Figura 3) é uma espécie vegetal encontrada no Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Bolívia e Brasil, é popularmente conhecida como sucuuba, sucuba ou janaguba. Seu látex é utilizado pela população como antiinflamatório, analgésico, no tratamento de tumores, úlcera e tuberculose. Suas cascas são utilizadas para o tratamento de úlceras, como analgésico e antitussígeno (REBOUÇAS et al, 2012; SILVA et al, 2010; SOARES et al, 2010; MIRANDA et al., 2000; ELISABETSKY & CASTILHOS, 1990; VAN DEN BERG, 1993). E possuem atividade leishmanicida comprovada (CASTILLO et al, 2007).



Figura 3. Espécie *Himatanthus sucuuba*. Fonte: Arquivo pessoal.

Do látex da *H. sucuuba* já foram isolados os iridóides fulvoplumierina, plumericina (3) e isoplumericina (4) (que possuem atividade antifúngica, antibiótica e citotóxica), além de isoplumierídeo, desmetilplumierídeo (5), plumierídeo (6) e desmetilisoplumierídeo (REBOUÇAS et al., 2012; SILVA, et al., 2003; SILVA, 2000; VILEGAS et al., 1992; HAMBURGER, et al., 1991). Os triterpenos cinamato de lupeol (7), cinamato de α -amirina (8), cinamato de β -amirina e acetato de lupeol (9) também são encontrados nas cascas e no látex de *H. sucuuba* (possuem atividades anti-inflamatória e analgésica) (MIRANDA et al., 2000), e também são encontradas substâncias fenólicas, como o ácido gálico, catecol, quercitrina e miricetrina (REBOUÇAS et al, 2012; SILVA, 2000).

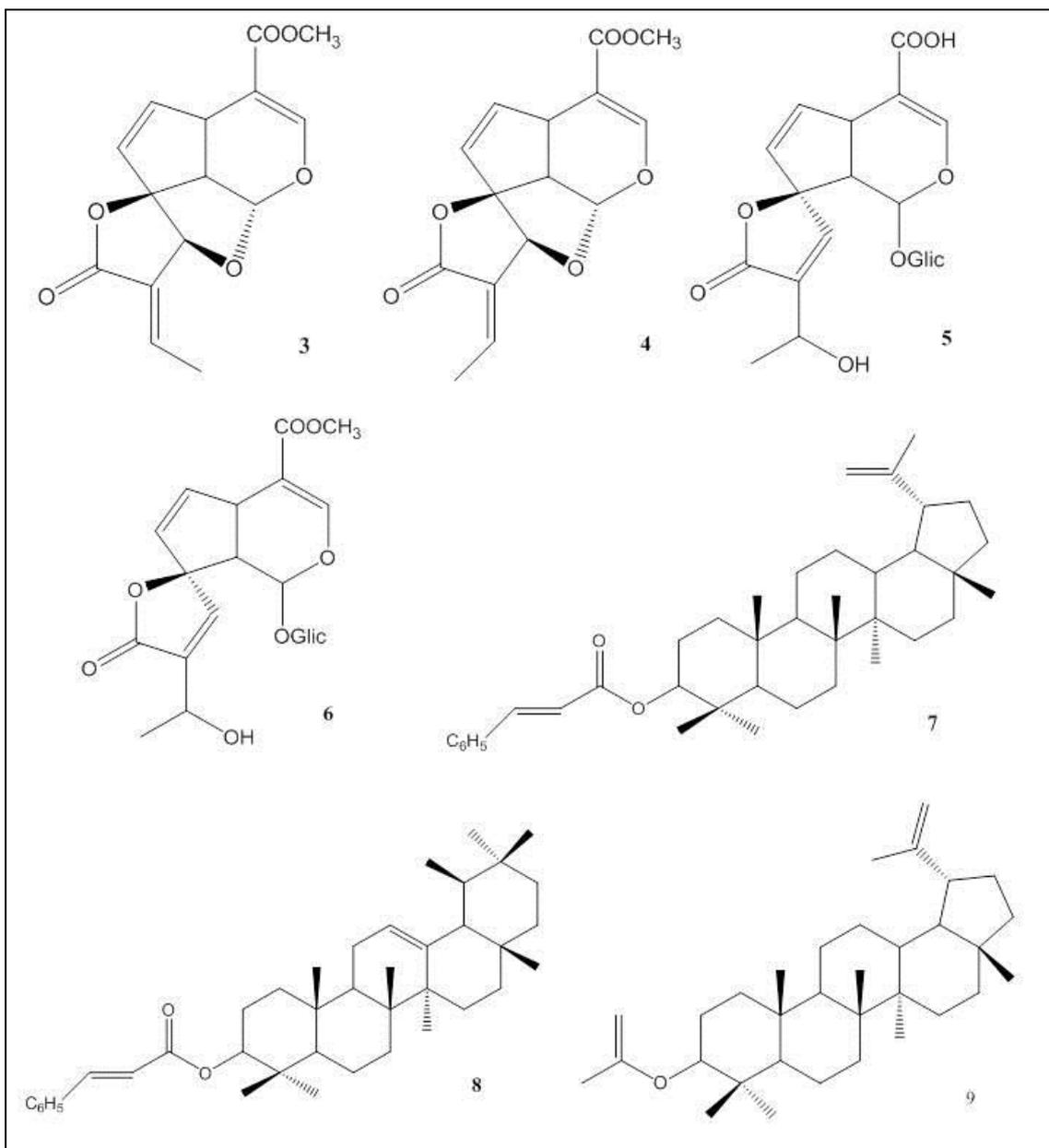


Figura 4. Estruturas químicas dos iridóides e triterpenos isolados de *Himatanthus sucuba*.

1.2 Metabólitos secundários

As células vegetais produzem dois tipos distintos de metabólitos, os primários que estão presentes em todos os sistemas vivos e são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do organismo, e os secundários que são produtos resultantes de metabolismos específicos (FERREIRA, V. F. & PINTO, A. C., 2010; LOBO, 2007; GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P., 2007; DEWICK, 2002).

A maior parte dos metabólitos presentes nas plantas faz parte dos metabólitos primários, pois estes desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de nutrientes. Podemos destaca-los como os polissacarídeos, açúcares, proteínas e graxas (FERREIRA, V. F. & PINTO, A. C., 2010; LOBO, 2007; GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P., 2007; DEWICK, 2002).

Os metabólitos secundários existentes nas plantas não são necessariamente vitais para a sua vida, porém são de grande importância para a comunicação das espécies, na atração de organismos benéficos como polinizadores e na defesa contra ataques de herbívoros ou outros predadores. Ainda, os metabólitos secundários possuem ação protetora em relação ao estresse provocado por mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à UV e deficiência de nutrientes (FERREIRA, V. F. & PINTO, A. C., 2010; LOBO, 2007; GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P., 2007; DEWICK, 2002). Esses metabólitos podem ser divididos em três classes principais: os terpenos, os compostos fenólicos e os alcalóides.

1.2.1 Iridóides

Os terpenos são derivados de unidades de isoprenos (C_5), no entanto, estes não estão envolvidos na sua biossíntese. Duas vias biossintéticas diferentes podem dar origem aos isoprenos, a via do mevalonato, que tem como intermediário o ácido

mevalônico, e a via do fosfato de deoxixilulose, descoberta recentemente. A condensação “cabeça-calda” entre as unidades de dimetilalil pirofosfato e o isopentenil pirofosfato, catalisada por enzimas, forma a cadeia de geranyl pirofosfato que é precursora dos monoterpenos (DEWICK, 2002).

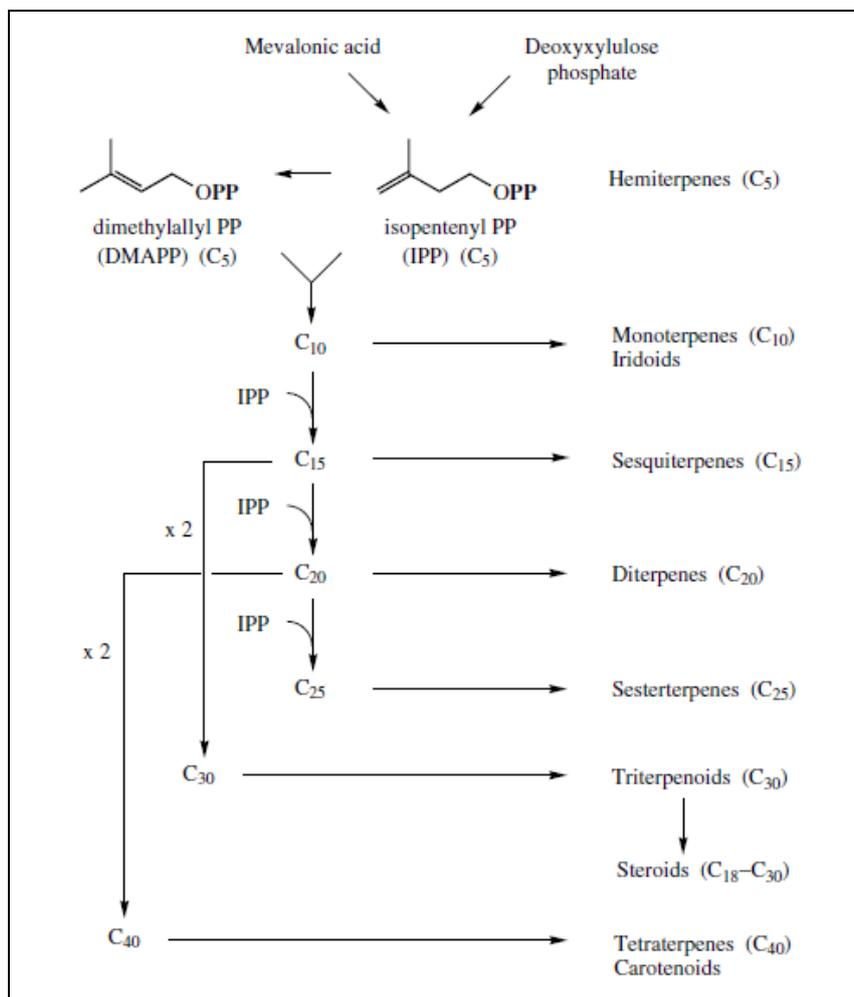


Figura 5. Esquema da via biossintética dos terpenos (modificado de DEWICK, 2002).

Os iridóides são monoterpenos com esqueleto iridano, que é constituído de um anel ciclopentano fundido a um heterocíclico oxigenado de seis membros. O mecanismo de formação do iridóide ocorre a partir do geraniol de uma maneira diferente da que ocorre para os monoterpenos. A etapa de ciclização é fundamental para o esqueleto,

pois acontece devido ao ataque de um hidreto, facilitando a ciclização do geraniol, formando a estrutura iridodial (Figura 6) (DEWICK, 2002).

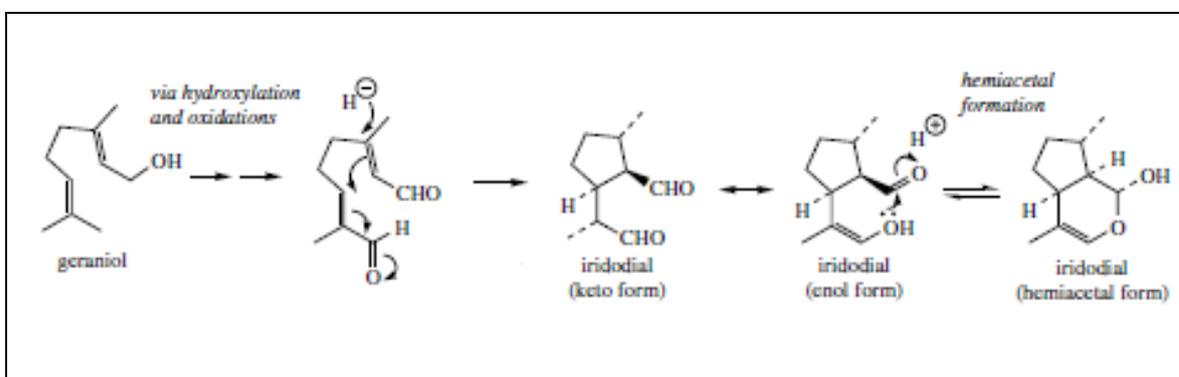


Figura 6. Mecanismo de ciclização do geraniol (Modificado de DEWICK, 2002).

A estrutura iridotrial é formada a partir de sucessivas oxidações, em que o hemiacetal conduz a produção do anel heterocíclico (Figura 7). Porém, os iridóides também podem ser encontrados na forma glicosilada, neste caso, o processo envolve uma sequência de reações em que o grupo aldeído é oxidado e metilado formando assim a deoxiloganina, que após reações de hidroxilação origina a loganina (DEWICK, 2002).

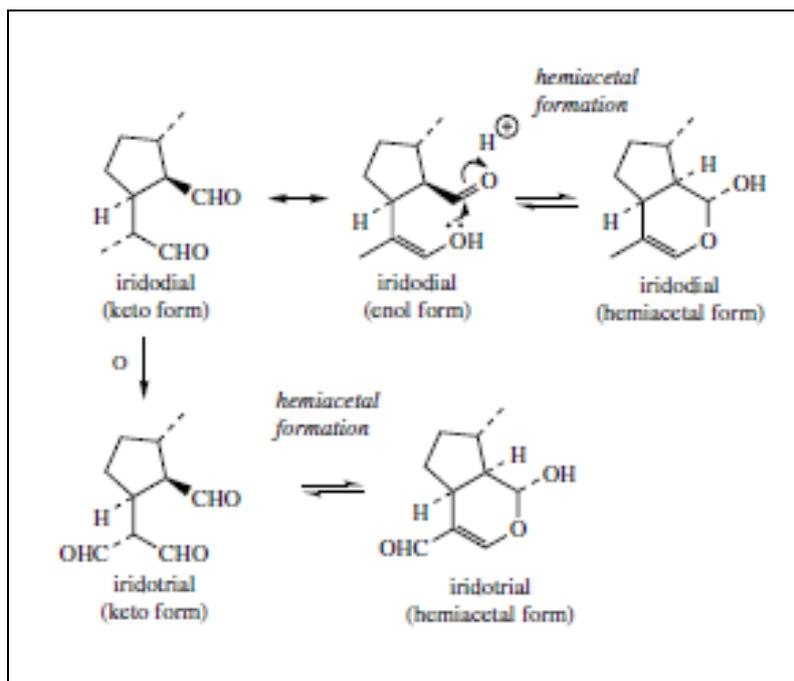


Figura 7. Mecanismo de formação do iridotrial (Modificado de DEWICK, 2002).

A loganina é um intermediário chave na biossíntese de outros iridóides. A secologanina, por exemplo, é produzida após a clivagem do ciclopentano da loganina (Figura 8) (DEWICK, 2002).

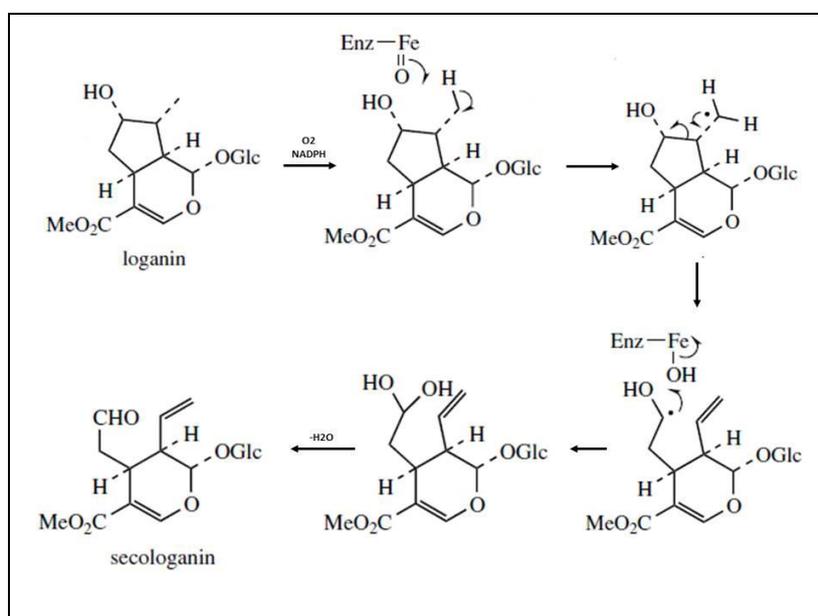


Figura 8. Mecanismo de formação da secologanina (Modificado de DEWICK, 2002).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Realizar o estudo fitoquímico das raízes e frutos da espécie *Himatanthus succuba*.

2.2. Objetivos específicos

- Obter extratos a partir das raízes e frutos de *H. succuba*;
- Aplicar técnicas cromatográficas e espectrométricas na avaliação e fracionamento dos extratos e frações obtidos;
- Aplicar métodos espectrométricos e espectroscópicos para a identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas;
- Testar a atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas.

3. Experimental

3.1. Materiais Utilizados

Cromatografia em Camada Delgada – CCD

Utilizaram-se cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 e RP-18, ambas com 0,2 mm de espessura da Merck. Os reveladores empregados foram radiação ultravioleta (254 e 365 nm), vanilina sulfúrica e glutamato monossódico.

Cromatografia em Coluna – CC

Utilizaram-se colunas de vidro de tamanhos variados, dependendo das quantidades de amostras a serem fracionadas.

Cromatografia líquida de média pressão – MPLC

Utilizou-se o aparelho Büchi Switzerland, com bomba Manager C-615 e Module C-601 e *Coletor de fração* C-660. Fase estacionária: C18 (Merck); Fase móvel: Metanol e Água (TFA 0,05%) em diferentes proporções; Fluxo: 2,5 mL/min.

Cromatografia com fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas - CG-EM

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent Technologies 6896 N, nas seguintes condições: Coluna capilar: HP-5 MS (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano) com dimensões de 30 m x 25 mm x 0,25 µm; Injetor: 250°C; Impacto de elétrons: 70 eV; Gás de arraste: Hélio; Vazão: 1,5 mL/min; Injeção com divisão de fluxo: 20/1; Programa de Temperatura: 70°C - 305°C (5°C min⁻¹). Plataforma de Métodos Analíticos da Fiocruz, Rio de Janeiro.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

As análises foram efetuadas em um sistema integrado a um detector de feixe de diodos (DAD - Shimadzu SPD-M10Avp) na região de 200 a 600 nm e fluxo de 1

mL/min. Todas as análises em CLAE foram efetuadas em coluna de fase reversa, C-18, coluna Shimpack 4,6mm x 15 cm , partícula de 5µm, marca Shimadzu.

Os solventes, metanol ou acetonitrila, utilizados nas diferentes análises por CLAE foram de alta qualidade – grau CLAE/UV – TEDIA. A água foi obtida por destilação em sistema Milli-q. Os solventes foram filtrados em filtro 0,45 µm (Millipore®) antes da utilização. Plataforma de Métodos Analíticos da Fiocruz, Rio de Janeiro.

Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas – CLUE - EM

As separações cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Acquity Ultraperformance LC (Waters®) equipado com um sistema de bombas binárias. As análises foram realizadas utilizando uma coluna BEH Acquity UPLC (C18) com dimensões: 50 mm X 2.1 mm, 1.7 µm de partícula. Espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo modelo Quattro Micro API (Waters®). Foi utilizada uma fonte de eletrospray (ESI) do tipo Z-spray. Faixa de scan: 250 a 600 *Daltons*; voltagem no capilar: 3kV; temperatura da fonte: 150 °C, fluxo de gás no cone: (80L/h), fluxo de gás de dessolvatação: (800 L/h); Temperatura de dessolvatação 350 °C. Gás Nitrogênio (pureza >99%) foi utilizado como gás de nebulização. Processador *software* MassLynx v4.1. Laboratório Dalton de Espectrometria de Massas - Unicamp, Campinas.

Espectros de massas – EM

Espectrômetro de Massas Synapt HDMS – Waters – analisador por tempo de voo (TOF), método de ionização por *eletrospray* – ESI, nas seguintes condições: Voltagem no capilar: 3 kV; Voltagem no cone: 40-10 V; Voltagem no cone extrator: 4 V; Energia

de colisão: 6-35 eV; Processador de dados: Software MassLinx 4.1. Laboratório Dalton de Espectrometria de Massas - Unicamp, Campinas.

Espectrômetro de Massas GCT Premier – Waters – analisador por tempo de voo (TOF), método de ionização por Impacto de Elétrons – IE. Laboratório Dalton de Espectrometria de Massas - Unicamp, Campinas.

Espectrômetro de Massas LCQ *fleet* – Thermo – analisador *ion-trap*, método de ionização por Ionização Química em Pressão Atmosférica – APCI, nas seguintes condições: Voltagem no capilar: 10 V; Voltagem no cone: 40-10 V; Fluxo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (Central Analítica) – UFAM – Manaus.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho Bruker de 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C - Plataforma de Métodos Analíticos da Fiocruz, Rio de Janeiro.

Para outros experimentos de RMN foram utilizados equipamentos modelo ARX-250 e DRX-400 (Bruker) de 250 e 400 MHz para ^1H , respectivamente, e 100 MHz para ^{13}C . As análises envolvendo estes equipamentos foram realizadas no Laboratório de RMN do Instituto de Química da Unicamp, Campinas.

3.2. Coleta e Preparo dos Extratos

3.2.1. Raízes

As raízes de *H. sucuuba* (Figura 9) foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, situada no Km 26 da Rodovia AM-010. O material foi comparado com o ponto de GPS e a uma exsicata catalogada sob o número 180453 do herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Parte do material vegetal foi moído fresco (1,038

Kg), e o restante (0,790 Kg) foi seco em estufa com circulação de ar a 60 °C e posteriormente triturado para obtenção dos extratos.



Figura 9. Raízes de *Himatanthus sucuuba* (Fonte: Arquivo Pessoal).

Extrações sucessivas do material vegetal foram efetuadas por maceração em frasco tipo Mariote com solventes de polaridade crescente, por um período de 5 dias para cada solvente. Após filtração, os solventes foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório para obtenção dos extratos brutos.

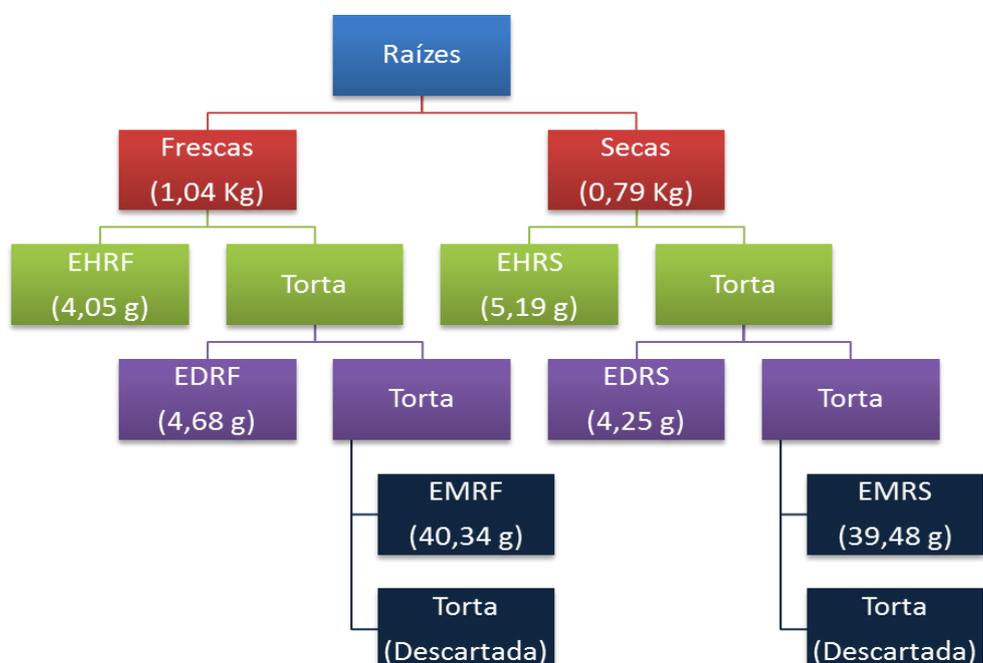


Figura 10. Fluxograma para a obtenção dos extratos.

O extrato metanol (EMRS) foi submetido a uma extração líquido-líquido utilizando água:metanol (8:2) e diclorometano, gerando duas frações, que após a remoção do solvente utilizando evaporador rotatório sob pressão reduzida, foram codificadas como EMRSA e EMRSD:

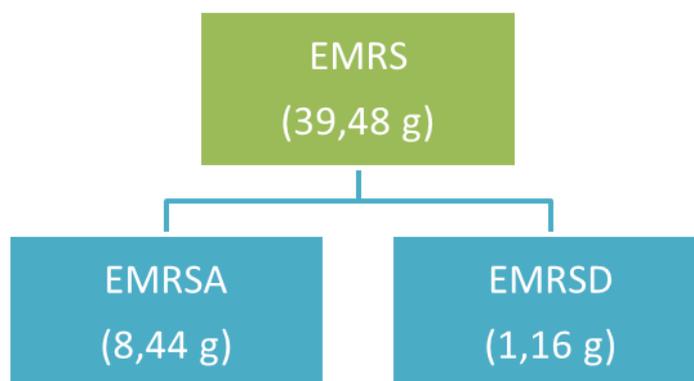


Figura 11. Fluxograma para a obtenção dos extratos.

Tabela 1. Tabela dos extratos obtidos das raízes de *H. sucuba*.

Extratos obtidos a partir das raízes de <i>H. sucuba</i>		
Extratos	Descrição dos extratos	Massa (g)
EHRF	Extrato hexano das raízes frescas.	4,05
EDRF	Extrato diclorometano das raízes frescas.	4,68
EMRF	Extrato metanol das raízes frescas.	40,34
EHRS	Extrato hexano das raízes secas.	5,19
EDRS	Extrato diclorometano das raízes frescas.	4,25
EMRSA	Extrato metanol das raízes secas/aquoso.	8,44
EMRSD	Extrato metanol das raízes secas/diclorometano.	1,16

3.2.2. Frutos

Os frutos foram coletados no setor sul do Campus da Universidade Federal do Amazonas. Sendo estes, verdes e maduros (Figura 12) e com aproximadamente 20 cm de comprimento.



Figura 12. Frutos coletados da espécie *H. sucuba*.

Os frutos verdes foram separados em casca (271,32 g), semente (225,00 g) e polpa (304,14 g). Posteriormente, foram macerados com uma solução hidroalcolica (Metanol:Água 8:2), originando os extratos FVC (5,76 g), FVS (8,44 g) e FVP (6,32 g), respectivamente.

Os frutos maduros foram separados em casca (94,90 g) e polpa (186,12 g). Posteriormente, foram macerados com uma solução hidroalcolica (Metanol:Água 8:2), originando os extratos FMC (2,55 g) e FMP (0,68 g), respectivamente.

3.3. Análise dos extratos

3.3.1. Teste antioxidante - DPPH

A atividade antioxidante foi realizada segundo metodologia descrita por MENSOR e colaboradores (2001) com modificações, monitorando o consumo do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) através do decréscimo da absorbância de soluções em diferentes concentrações. As medidas da absorbância foram feitas em um espectrofotômetro UV-Vis Termoplate TP-reader, tendo como controle positivo quercetina comercial. Um volume de 30 µL de quercetina foi adicionado a um dos 96 poços de uma placa de Eliza, em seis concentrações diferentes (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 µg/mL), seguidos de 170 µL de etanol, proporcionando a leitura do branco. Em seguida, foram adicionados 100 µL de DPPH e a leitura da absorbância da mistura reacional foi realizada a 517 nm após 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para os extratos EHRF, EMRF, EHRS, EDRS, EMRSA e EMRSD. O controle negativo foi preparado apenas utilizando 200 µL de etanol e 100 µL de DPPH. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem da capacidade de sequestro (%CS), determinada pela seguinte equação:

$$\%CS = 100 - \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

A CS₅₀ foi determinada por interpolação da curva de calibração: capacidade de sequestro versus a absorbância da amostra.

3.3.2. Teste frente à *Artemia salina*

O bioensaio com *A. salina* foi baseado na técnica descrita por Meyer e colaboradores (1982) com modificações. Em um aquário de vidro, os cistos de *A. salina* (10 mg) foram incubados na solução salina (38 g de sal marinho sintético dissolvidos em 1L de água destilada), sob iluminação artificial a 28°C (Figura 13). Após 24 horas foram transferidos os náuplios (primeiro estágio larval) para outro aquário contendo solução salina e mantendo-os em nova incubação por mais 24 horas, sob iluminação artificial de 28°C. Após a segunda incubação, obtêm-se apenas o estágio de metanáuplios dos microcrustáceos.



Figura 13. Cistos incubados em solução salina.

Foram preparadas, em triplicata, soluções dos extratos a serem testados em seis concentrações diferentes (1000, 750, 500, 250, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$), utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. Essas soluções foram adicionadas em tubos contendo 5 mL de solução salina com 10 larvas de *A. salina* em estágio metanáuplios. As amostras foram submetidas a iluminação artificial durante 24 horas (Figura 14), após esse período foram contabilizadas as larvas vivas e mortas (indivíduos imóveis e/ou depositados no fundo do tubo). Foram utilizados dois controles negativos: solução

salina e solução de DMSO 1% e como controle positivo Lapachol, ambos contendo 10 larvas de *A. salina* em estágio metanúplios. Todas as análises foram realizadas em triplicata.



Figura 14. Amostras submetidas a iluminação artificial.

A partir dos valores dos microcrustáceos vivos e mortos em cada concentração testada, determinou-se a CL_{50} (com 95% de confiança) através do método PROBIT de análise. As amostras testadas quanto a sua toxicidade foram os extratos EHRF, EDRF, EMRF, EHRS, EDRS, EMRSA e EMRSD.

3.3.3. Extrato hexano das raízes frescas – EHRF

O extrato hexano (400 mg) foi fracionado em coluna com gel de sílica (220-440 mesh) eluído com hexano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade. Obteve-se 14 frações, que após a análise por CCD em gel de sílica, observou-se que as frações 3 (20,0 mg) e 10 (9,8 mg) apresentaram um único spot, indicando a presença de uma única substância. As frações foram codificadas como HS 1 e HS 2, respectivamente.

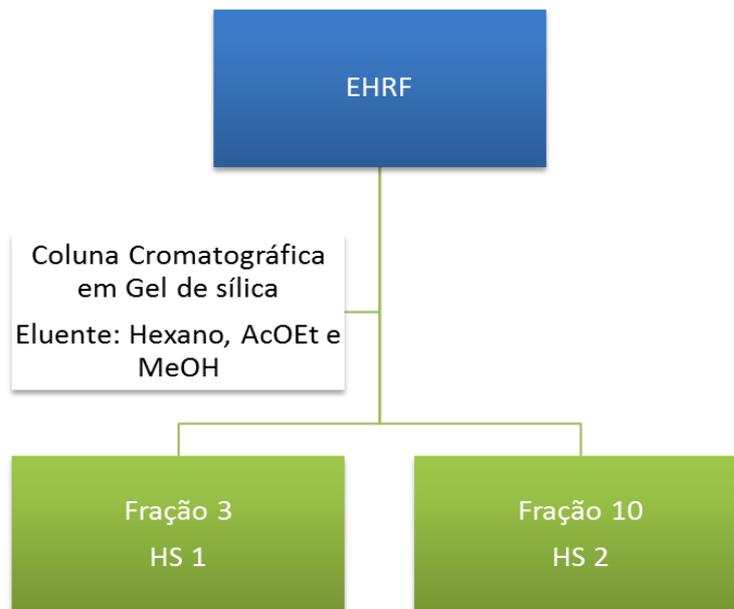


Figura 15. Fluxograma do isolamento das amostras HS 1 e HS 2.

3.3.4. Extrato diclorometano das raízes frescas – EDRF

O extrato diclorometano (4,7 g) foi fracionado em coluna com gel de sílica (70-230 mesh), eluída com diclorometano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade. Após a análise por CCD em gel de sílica das 49 frações obtidas, as que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram reunidas. A fração 2 forneceu uma mistura codificada HS 3. A fração 8 apresentou um precipitado na amostra líquida, que foi submetido a lavagens com hexano e acetato de etila para purificação do mesmo, sendo codificado HS 4.

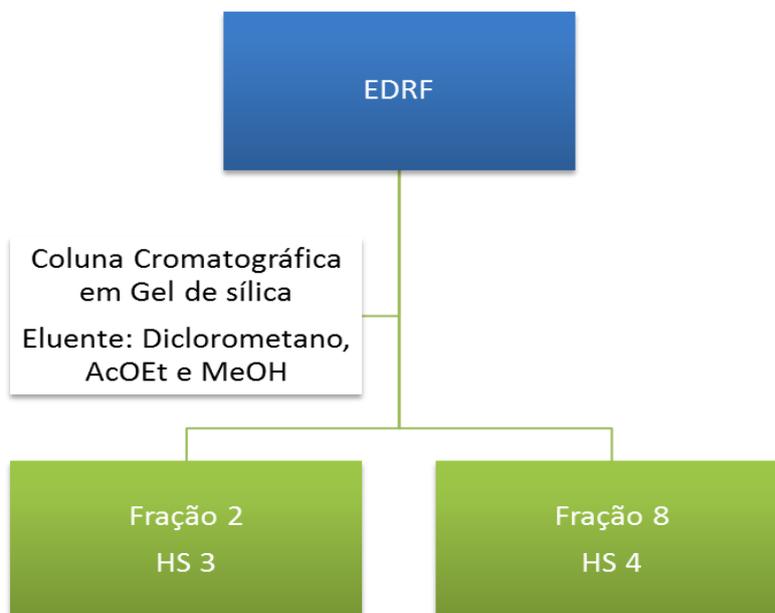


Figura 16. Fluxograma do isolamento das amostras HS 3 e HS 4.

3.3.5. Extrato diclorometano das raízes secas – EDRS

O extrato diclorometano (4,0 g) foi submetido ao fracionamento cromatográfico em coluna, utilizando como fase estacionária gel de sílica (70-230 mesh) e como fase móvel diclorometano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade. A análise por CCD em sílica das 38 frações obtidas levou a reunião das frações de 13 a 23 (115,8 mg), que foram submetidas a um novo fracionamento cromatográfico em coluna utilizando gel de sílica (70-230 mesh) e como fase móvel hexano, acetato de etila e metanol, fornecendo 25 frações. A fração 7 apresentou um único “spot” quando analisada em CCD em gel de sílica e foi codificada como HS 5.

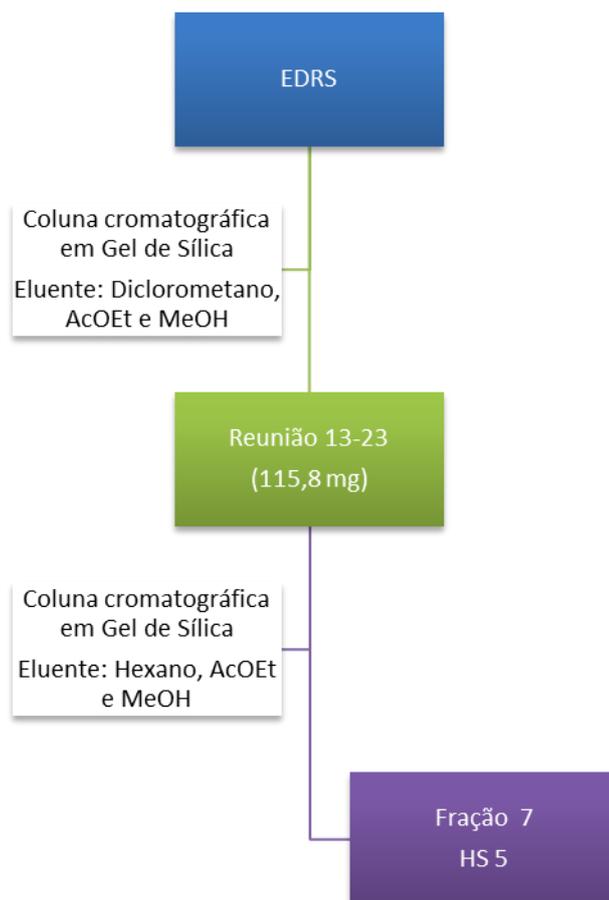


Figura 17. Fluxograma do isolamento da amostra HS 5.

3.3.6. Extrato metanol das raízes secas/aquoso – EMRSA

Após análise do extrato EMRSA (4,0 g) em CCD - RP-18, este foi fracionado por permeação em gel de Sephadex LH-20, utilizando como fase móvel os solventes água e etanol em diferentes proporções, dando origem a 46 frações.

A fração 24 (100,0 mg) após análise por CCD em RP-18 foi submetida a um novo fracionamento em coluna (MPLC) utilizando como fase estacionária C-18 e tendo como fase móvel metanol e água (TFA 0,05%) em diferentes proporções, dando origem a 7 frações codificadas AB. A fração AB 7 foi analisada e apresentou um único spot em CCD - RP-18 e foi codificada como HS 6.

As frações de 25 a 29 (311,0 mg) foram reunidas após análise por CCD em RP-18 e codificadas 25-29. Posteriormente, 25-29 foi submetida a um novo fracionamento em coluna (MPLC) utilizando como fase estacionária C-18 e tendo como fase móvel metanol e água (TFA 0,05%) em diferentes proporções, dando origem a 55 frações.

Após análises por CCD em RP-18 as frações semelhantes foram reunidas e codificadas, de 18 a 19 (HS 7) e a fração 54 (HS 8).

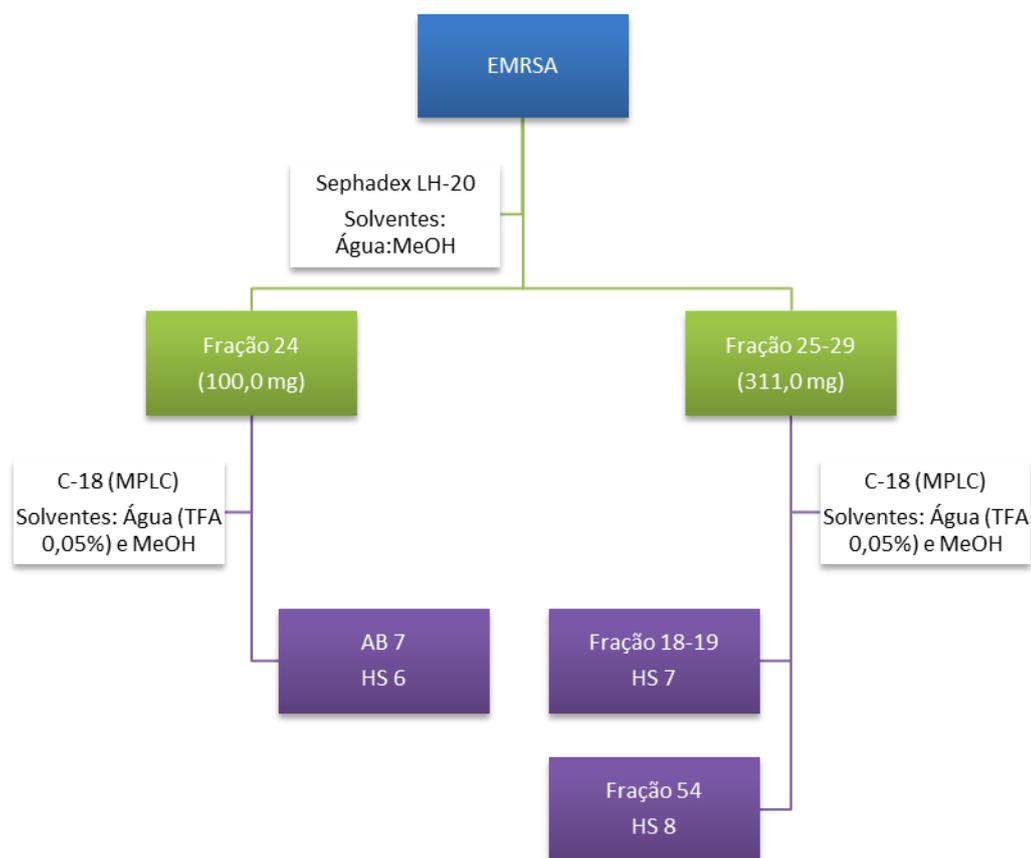


Figura 18. Fluxograma do isolamento das amostras HS 6, HS 7 e HS 8.

3.3.7. Análises CLAE

As análises dos extratos e padrões foram realizadas utilizando uma coluna de C-18 e como fase móvel acetonitrila:água (TFA 0,05%), em composição gradiente de 5% a 25% de acetonitrila em 20 minutos, 25% de acetonitrila por 5 minutos, 25% a 40% de acetonitrila em 15 minutos e de 40% a 70% em 20 minutos. Utilizando uma injeção de

20 µL com fluxo de 1mL/min, com monitoramento em 230 nm. Solventes de grau HPLC e água Milli-Q foram utilizadas nos estudos cromatográficos.

Os padrões utilizados foram previamente isolados e identificados pelo grupo de pesquisa. Os iridóides, o plumierídeo, a plumieridina e a mistura de plumericina e isoplumericina foram solubilizados utilizando Água:Metanol (1:1) e preparados em uma solução estoque.

Os extratos das várias partes vegetais das diferentes espécies, como *H. drasticus*, *H. obovatus*, *H. bracteatus* e *H. sucuuba* foram obtidos no banco de extratos do grupo de pesquisa. Foram retirados 30 mg de todos os extratos e solubilizados em 1 mL de metanol. Posteriormente esses extratos foram centrifugados e analisados nas condições cromatográficas acima.

3.3.8. Frutos

Análise por cromatografia em camada delgada – CCD

Os extratos FVC, FVS, FVP, FMC e FMP foram analisados por cromatografia em camada delgada utilizando-se cromatofolhas de alumínio com gel de sílica 60 (Merck). Foram utilizados os padrões de açúcares rhamnose, sacarose, galactose e arabinose. Como eluente cromatográfico utilizou-se a mistura de n-butanol, ácido acético e água (8:3:2). O revelador utilizado foi vanilina sulfúrica.

Análises por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrômetro de massas – CLUE-EM

As separações cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Acquity Ultraperformance LC (Waters®) equipado com um sistema de bombas binárias. As análises foram realizadas utilizando uma coluna BEH Acquity UPLC (C18) com dimensões: 50 mm X 2.1 mm, 1.7 µm de partícula. O método cromatográfico empregado consistiu do gradiente crescente listado a seguir: 5 - 100% de acetonitrila em

um gradiente crescente em quatorze minutos, com fluxo de 0,4 mL/min. Os solventes utilizados foram água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila pura (B). O sistema de CLUE está acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo modelo Quattro Micro API (Waters®). Foi utilizada uma fonte de eletrospray (ESI) do tipo Z-spray. As análises de EM foram adquiridas no modo positivo de polaridade devido a natureza das substâncias da amostra. Os dados foram obtidos no modo SCAN usando uma faixa de 250 a 600 *Daltons*. As condições de ionização da fonte foram: voltagem no capilar: 3kV; temperatura da fonte: 150 °C, fluxo de gás no cone: (80L/h), fluxo de gás de dessolvatação: (800 L/h); Temperatura de dessolvatação 350 °C. Gás Nitrogênio (pureza >99%) foi utilizado como gás de nebulização. Os dados obtidos foram processados no software MassLynx v4.1.

Preparo das amostras

Os extratos dos frutos, extrato metanol das raízes frescas e o iridóide plumierídeo isolado neste trabalho foram utilizados para as análises cromatográficas e espectrométricas. De cada extrato foi retirado 1 mg e solubilizado em 1 mL da solução metanol, água e ácido fórmico (9:9:1).

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação do potencial antioxidante

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante dos extratos estão dispostos na Tabela 2 e foram expressos em capacidade de sequestro (CS_{50}), que é a concentração do extrato necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a CS_{50} e maior a sua atividade antioxidante. O padrão utilizado para a determinação da atividade antioxidante foi a quercetina comercial que apresentou CS_{50} igual a $3,28 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$. O extrato que apresentou melhor resultado foi o extrato metanol das raízes secas/parte diclorometano (EMRSD) com CS_{50} em $265,62 \mu\text{g/mL}$, indicando a baixa capacidade de sequestro do radical pelas substâncias presentes nesses extratos.

Tabela 2. Resultado do teste antioxidante.

Extratos	$CS_{50} \pm DP$ ($\mu\text{g/mL}$)
EHRF	$2638,36 \pm 0,49$
EMRF	$10541,53 \pm 0,56$
EHRS	$2118,01 \pm 0,58$
EDRS	$1438,48 \pm 0,75$
EMRSA	$849,55 \pm 0,55$
EMRSD	$265,62 \pm 0,12$

DP (desvio padrão).

4.2. Teste de atividade frente à *Artemia salina*

Os resultados do ensaio de toxicidade foram expressos em CL_{50} (que é a concentração letal para 50% dos indivíduos, com intervalo de confiança de 95%) e estão dispostos na Tabela 3. Os extratos hexano das raízes frescas (EHRF), metanol das raízes secas/parte diclorometano (EMRSD) e hexano das raízes secas (EHRS) mostraram toxicidade nas concentrações de 111,0 $\mu\text{g/mL}$, 276,0 $\mu\text{g/mL}$ e 380,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os extratos metanol das raízes frescas (EMRF) e metanol das raízes secas/parte aquosa (EMRSA) apresentaram CL_{50} 1079,2 e 1012,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo consideradas atóxicas (Meyer et al., 1982).

Tabela 3. Resultado do teste de toxicidade frente à *Artemia salina*.

Amostras	CL_{50} $\mu\text{g/mL}$
EHRF	111,1
EDRF	866,8
EMRF	1059,2
EHRS	380,8
EDRS	707,0
EMRSA	1012,3
EMRSD	276,0
Lapachol	30,1

4.3. Identificação das frações isoladas

Amostra HS 1

A substância codificada como HS 1 (20,0 mg) foi isolada do extrato hexano obtido das raízes frescas de *H. succuba* na forma de um sólido amorfo de coloração branca.

O espectro de RMN ^1H (Figura 19) de HS 1 apresenta sinais na região entre δ 7,35 e 7,55 ppm que são característicos de hidrogênios de anel aromático. O par de sinais duplos observados em δ 7,68 ppm ($J=16,0$ Hz) e δ 6,45 ppm ($J=16,0$ Hz) indicaram a presença de uma ligação dupla com configuração *E* (Silva, 2000; Silva et al., 1998). Dois multipletos em δ 4,64 e δ 4,49 ppm foram atribuídos a hidrogênios olefínicos característicos do grupo isopropenila (Silva, 2000; Silva et al., 1998). A região do espectro entre δ 0,8 e 1,16 ppm apresentou vários sinais característicos de hidrogênios metílicos.

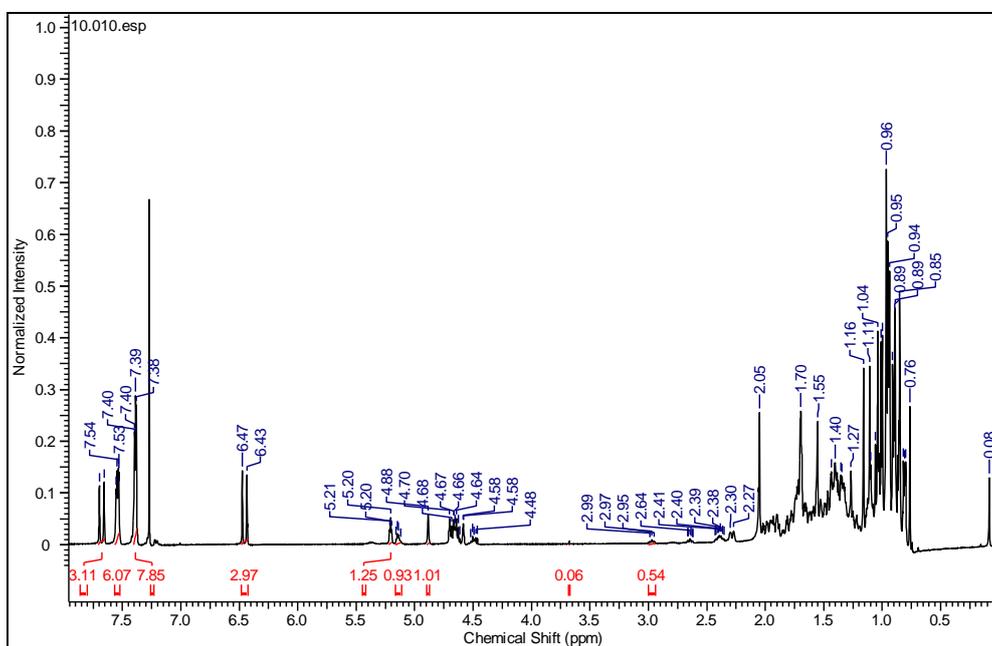


Figura 19. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da amostra HS 1.

A análise dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT- 135° e 90° forneceu vários sinais de carbono como δ 128,1 (C-2' e C-6'), 128,9 (C-3' e C-5'), 130,1 (C-4') e 134,7 ppm

(C-1') o que confirmou a unidade cinamoíla. Dois pares de deslocamentos químicos em 124,4 (CH) e 139,7 (C) ppm e 121,7 (CH) e 145,2 (C) ppm, correspondem as ligações duplas dos esqueletos ursano e oleanano, respectivamente, enquanto os sinais correspondentes a ligação dupla de triterpenos com o esqueleto lupano ocorre em δ 109,4 (CH₂) e 151,0 (C) ppm.

A partir desses resultados e por comparação com dados descritos na literatura (Silva, 2000; Silva et al., 1998), é possível afirmar que a amostra HS 1 é uma mistura constituída por cinamatos de lupeol, α e β -amirina (Figura 20).

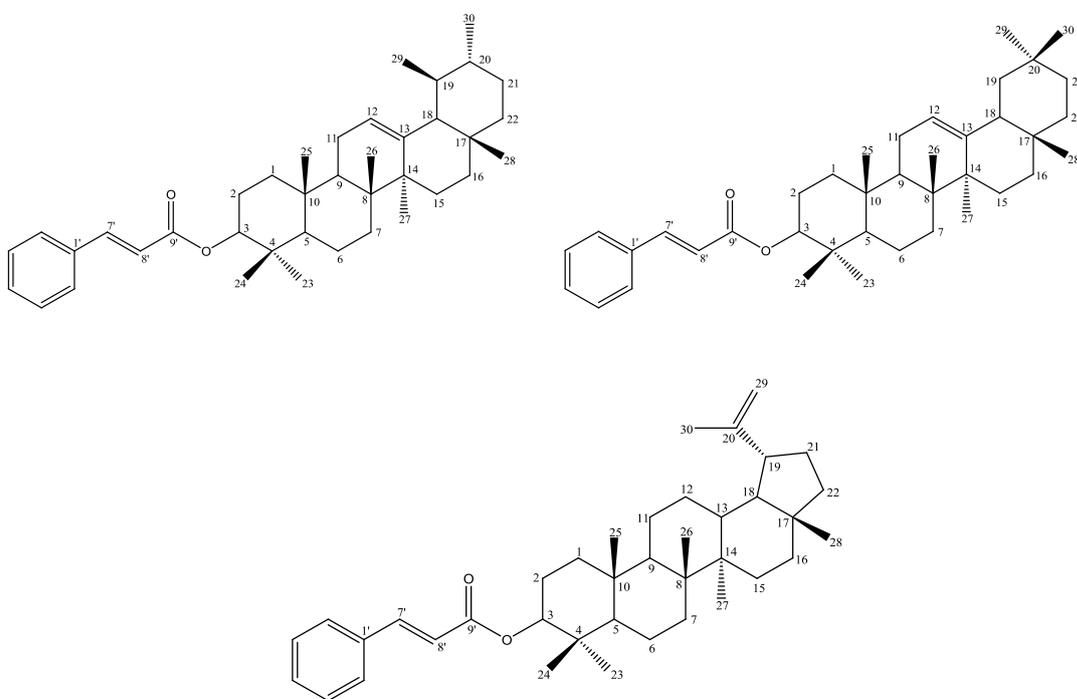


Figura 20. Estrutura química dos triterpenos cinamato de lupeol, α e β -amirina

Amostra HS 2

A amostra HS 2 (8,0 mg) foi isolada do extrato hexano obtido das raízes frescas de *H. succuba* na forma de um sólido amorfo de coloração branca, este sólido foi submetido a análise utilizando RMN ^1H e ^{13}C .

Ao analisar o espectro de RMN ^{13}C e DEPT-135° foi possível observar um sinal em 52,6 ppm característico de grupo metoxila. Sinal em 165,6 ppm referente a um carbono de grupo carbonila, e sinais em 128,4 e 130,9 ppm característicos de anel aromático. Observou-se também, um sinal em 19,6 ppm, o que indicou a presença do grupo metila na estrutura.

O espectro de RMN ^1H (Figura 21) forneceu dois sinais na região de aromáticos, entre 7,02 e 7,41 ppm. Um sinal simples em 3,90 ppm característico de hidrogênio do grupo metoxila.

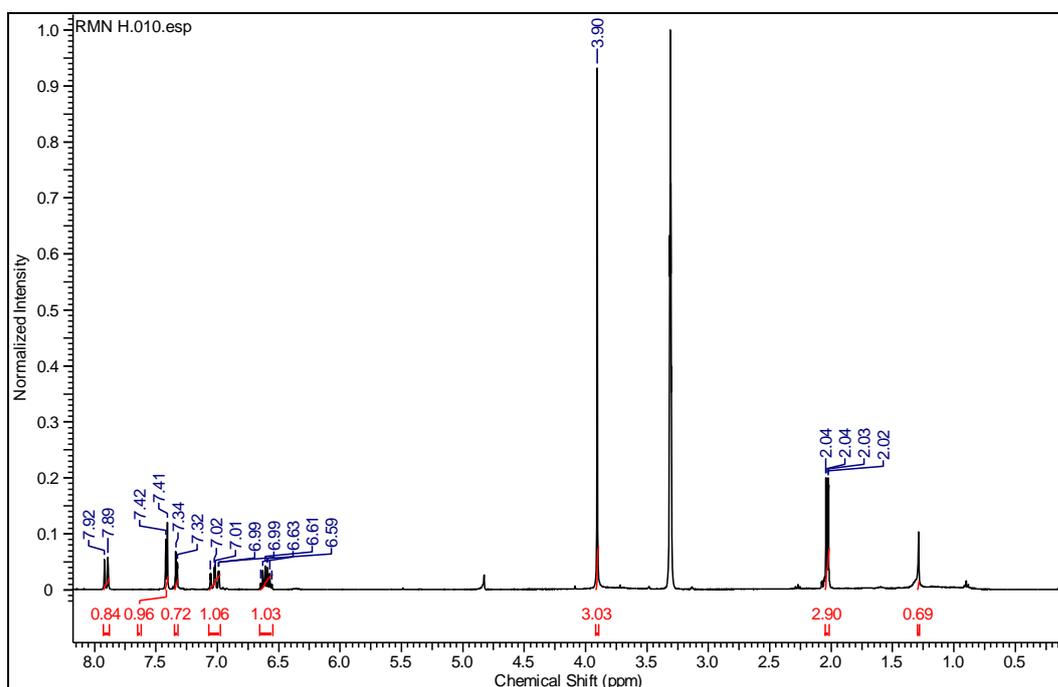


Figura 21. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra HS 2.

São observados sinais característicos do grupo cinamoil pela presença de dois sinais duplos em 7,9 (d, $J = 11,8$ Hz) e em 6,6 ppm (m, 1H). Segue a abaixo uma

proposta estrutural para a amostra HS 2 (Figura 22) baseado em dados presentes na literatura (Tabela 4) (SILVA, 2000; SIQUEIRA, 1999). Porém, esse resultado não é conclusivo.

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H da amostra HS 2.

Sinais observados	δ (ppm) RMN ^1H J(Hz)	δ (ppm) RMN ^{13}C / DEPT 135°
1	---	138,0 / C
2	7,02 (m; 1H)	128,4 / CH
3	---	138,4 / C
4	7,33 (dd, J=1,2; 5,3; 1H)	132,0 CH
5		
6	7,41 (d, J=5,3; 1H)	130,9 / CH
7	7,41 (d, J=5,3; 1H)	144,6 / CH
8	6,60 (m; 1H)	
9	---	165,6 / C
10	2,03 (dd, J=1,3; 7,0; 3H)	19,6 / CH_3
-OCH ₃	3,90 (s, 3H)	52,6 / CH_3

Dados obtidos em aparelho de 400 MHz em CD_3OD .

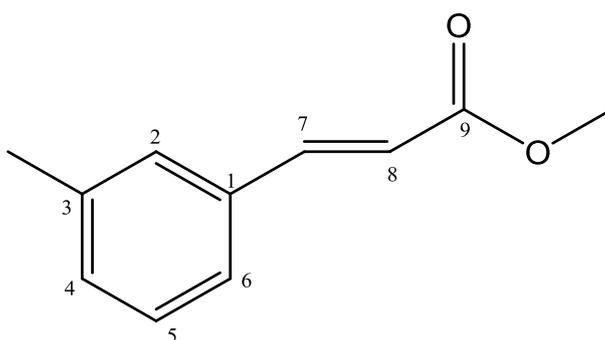


Figura 22. Cinamoil

Amostra HS 3

A substância codificada como HS 3 (10,4 mg) foi isolada do extrato diclorometano obtido das raízes frescas de *H. sucuuba*, na forma de um sólido amorfo de coloração branca. Este sólido foi submetido à análise por CG-EM, onde foi possível observar no cromatograma (Figura 23) a presença de apenas duas substâncias com tempos de retenção (t_R) em 27,87 e 28,36 minutos.

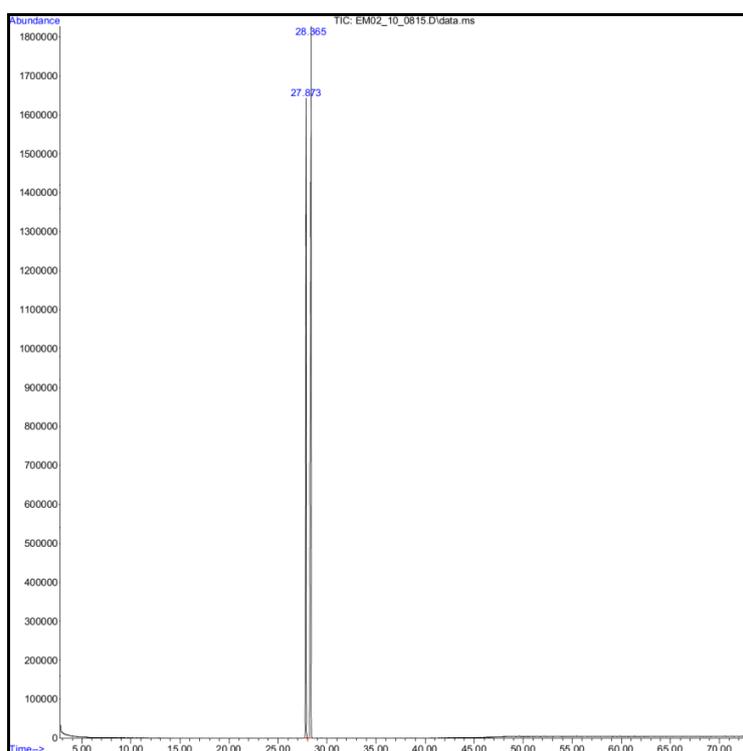


Figura 23. Cromatograma das substâncias com tempos de retenção em 27.87 e 28.36 minutos.

Os espectros de massas (Figura 24) obtidos pela técnica de impacto de elétrons para as substâncias detectadas entre 27 e 28 minutos, apresentaram o mesmo íon molecular em m/z 290 $[M]^+$ compatível com a fórmula molecular de $C_{15}H_{14}O_6$.

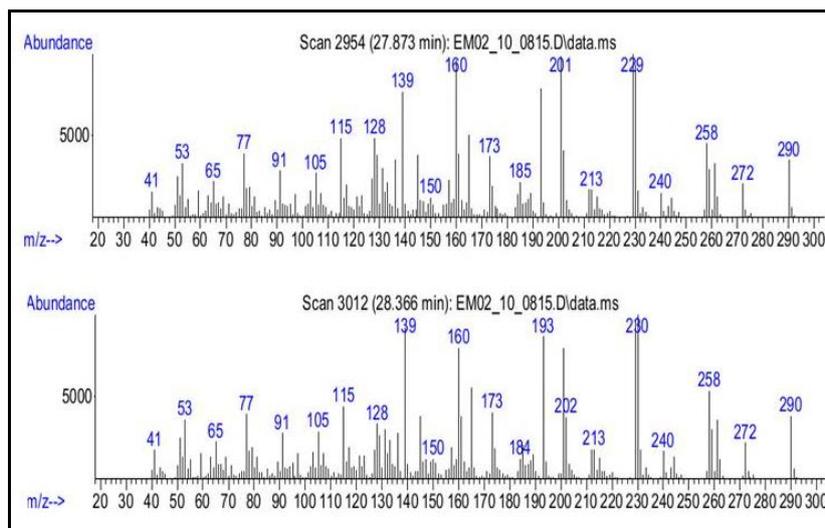


Figura 24. Espectros de massas das substâncias isoplumericina (t_R 27.87 min.) e plumericina (t_R 28.36 min.)

De acordo com dados de comparação da biblioteca do aparelho, a amostra HS 3 é uma mistura dos iridóides plumericina e isoplumericina, classe de metabólitos muito comuns isolados da espécie. Por meio do espectro de massas foram observados fragmentos para as substâncias em m/z 258 que é proveniente da perda de $-MeOH$ (Figura 25), e em m/z 230 proveniente da perda de $-HCO_2CH_3$ (Figura 26).

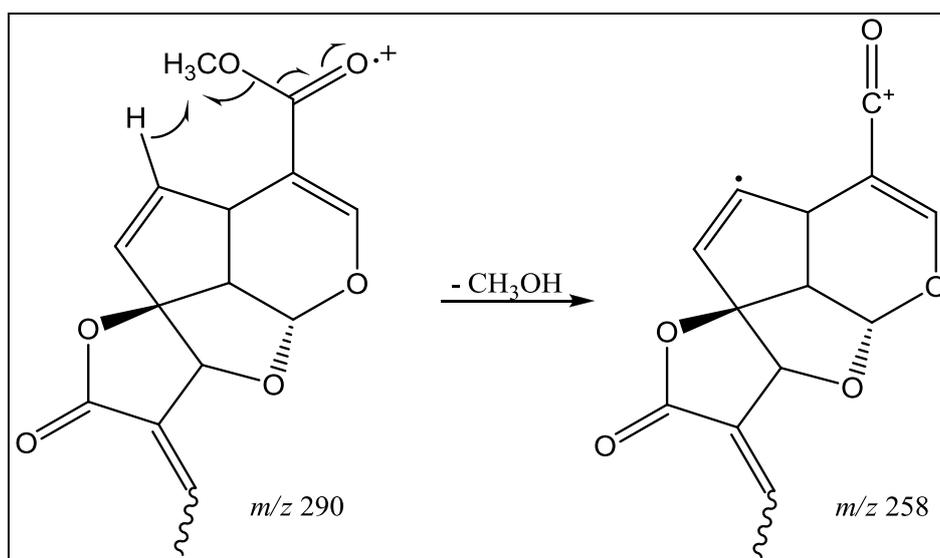


Figura 25. Proposta de fragmentação para o pico m/z 258.

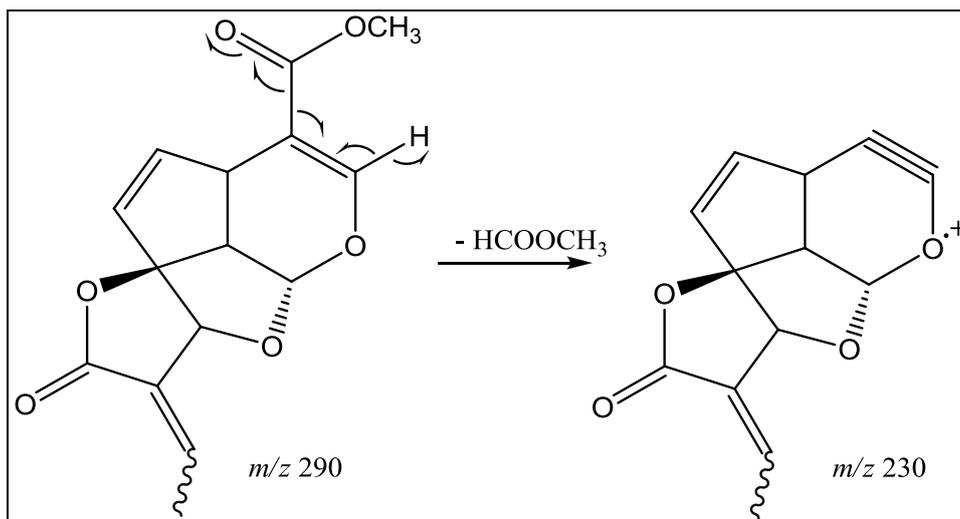


Figura 26. Proposta de fragmentação para o pico m/z 230.

O pico observado em m/z 193 foi resultante da perda do anel da lactona (Figura 27) e o íon em m/z 139, que foi observado em maior abundância para o iridóide plumericina (t_R 28.36 min.) (POPOV & HANDJIEVA, 1983), ocorre devido a clivagem do ciclopenteno (Figura 28).

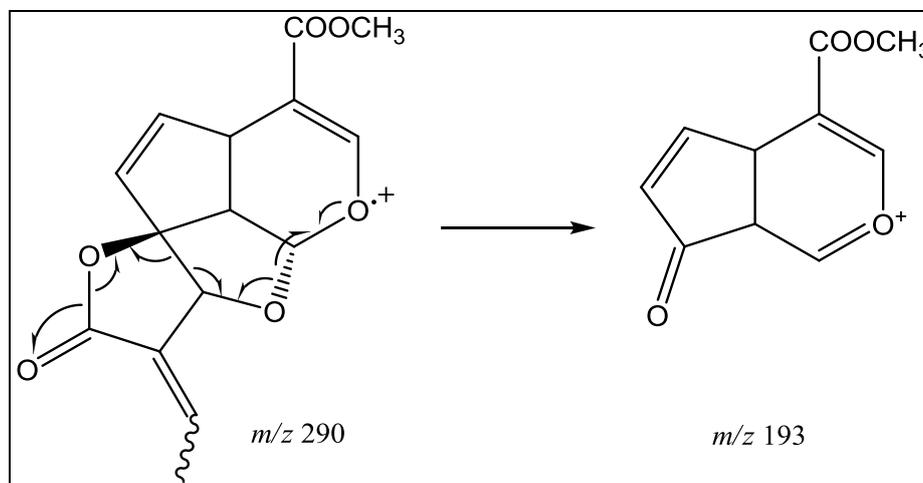


Figura 27. Proposta de fragmentação para o pico m/z 193.

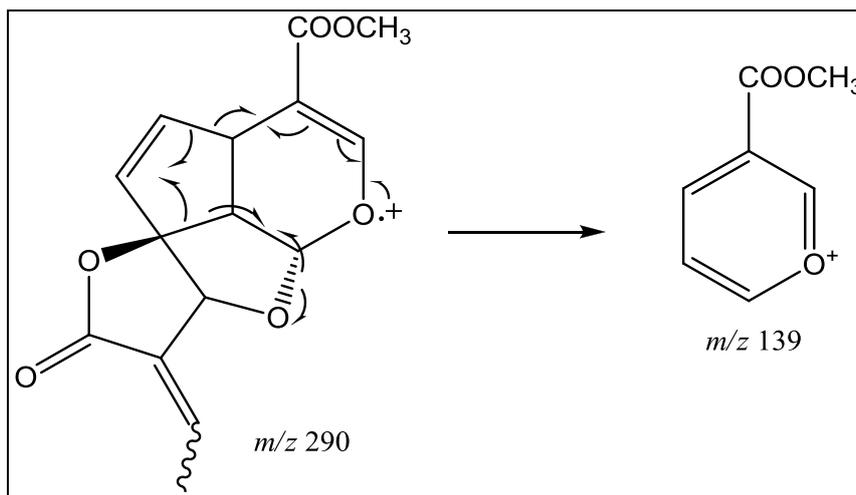


Figura 28. Proposta de fragmentação para o pico m/z 139.

No espectro de RMN ^1H (Figura 29) da amostra HS 3 são observados sinais de hidrogênios metílicos, olefínicos e carbinólicos.

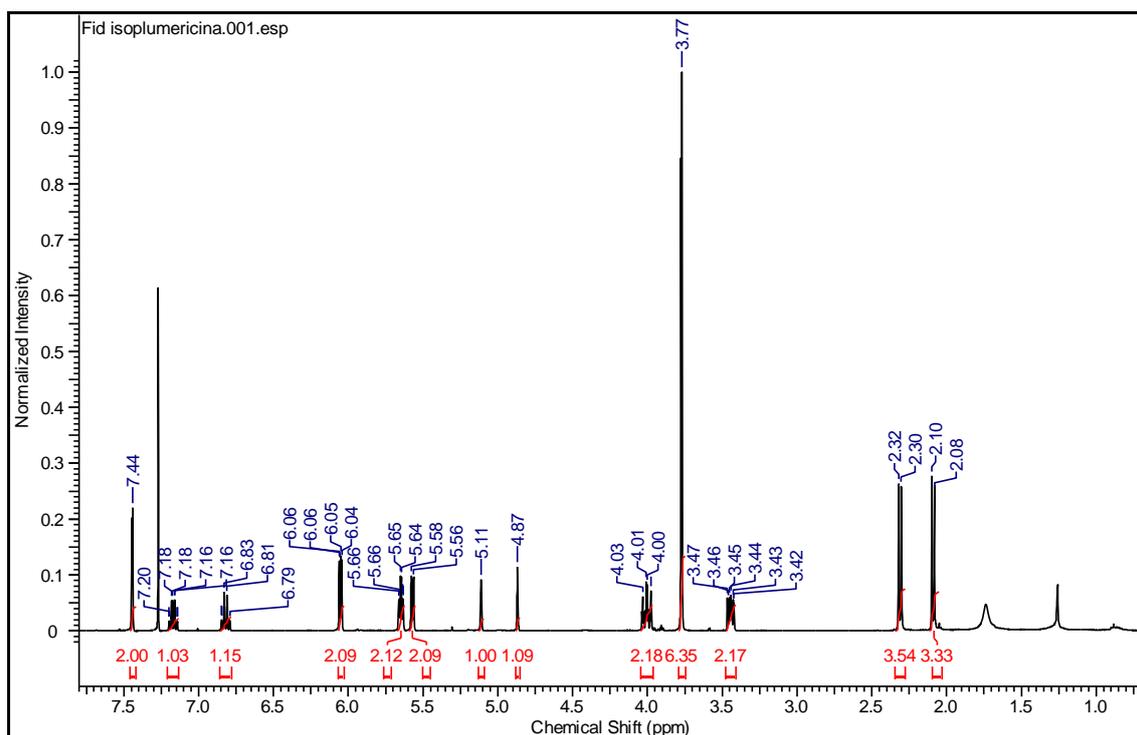


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H da substância HS 3.

Na região entre δ 5,50 – 6,10 (Figura 31) foram observados sinais em δ 5,65 (ddd, $J = 2,4; 5,2; 5,1$ Hz) referente ao hidrogênio H-7 acoplado com os hidrogênios H-6, H-5

e H-9, e em δ 6,05 (dd, $J = 2,1; 5,3$ Hz) referente ao hidrogênio H-6 acoplado com os hidrogênios H-5 e H-7 (Figura 30).

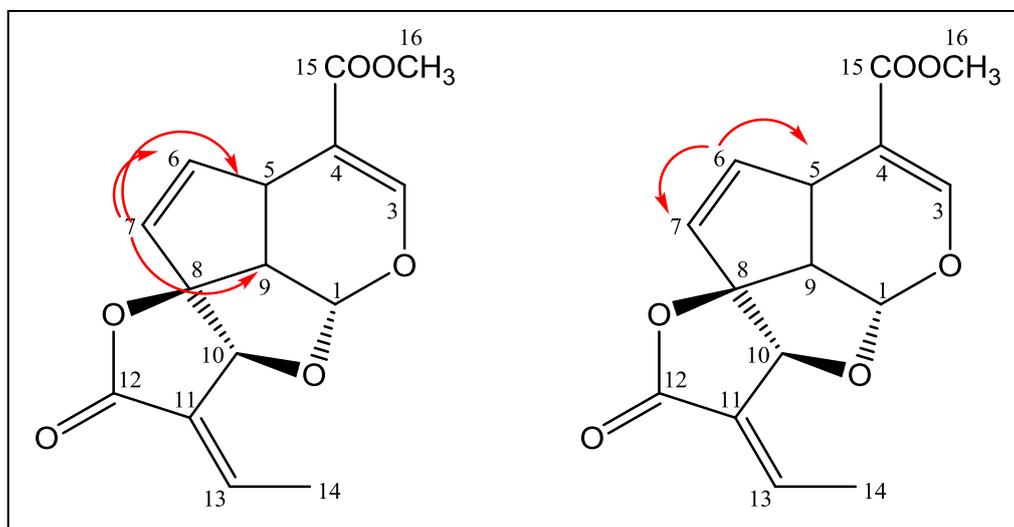


Figura 30. Acoplamentos dos hidrogênios H-6 e H-7.

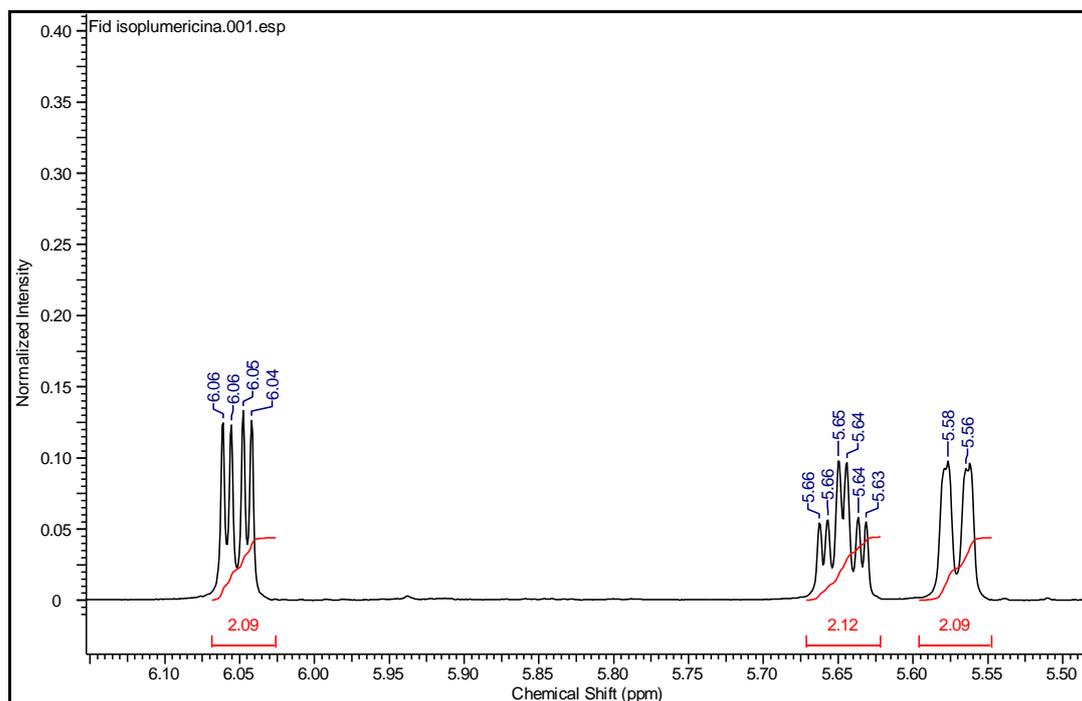


Figura 31. Ampliação do espectro de RMN ^1H nas regiões de δ 5,50 - 6,10 ppm.

Os sinais simples em δ 7,44 e 7,45 foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos (H-3) de cada molécula e os em δ 3,77 e 3,78 corresponderam aos hidrogênios do grupo

metoxila. Os sinais em δ 3,44 (m) e δ 4,01 (m) foram atribuídos aos hidrogênios H-9 e H-5, respectivamente, em junção do anel (Figura 32).

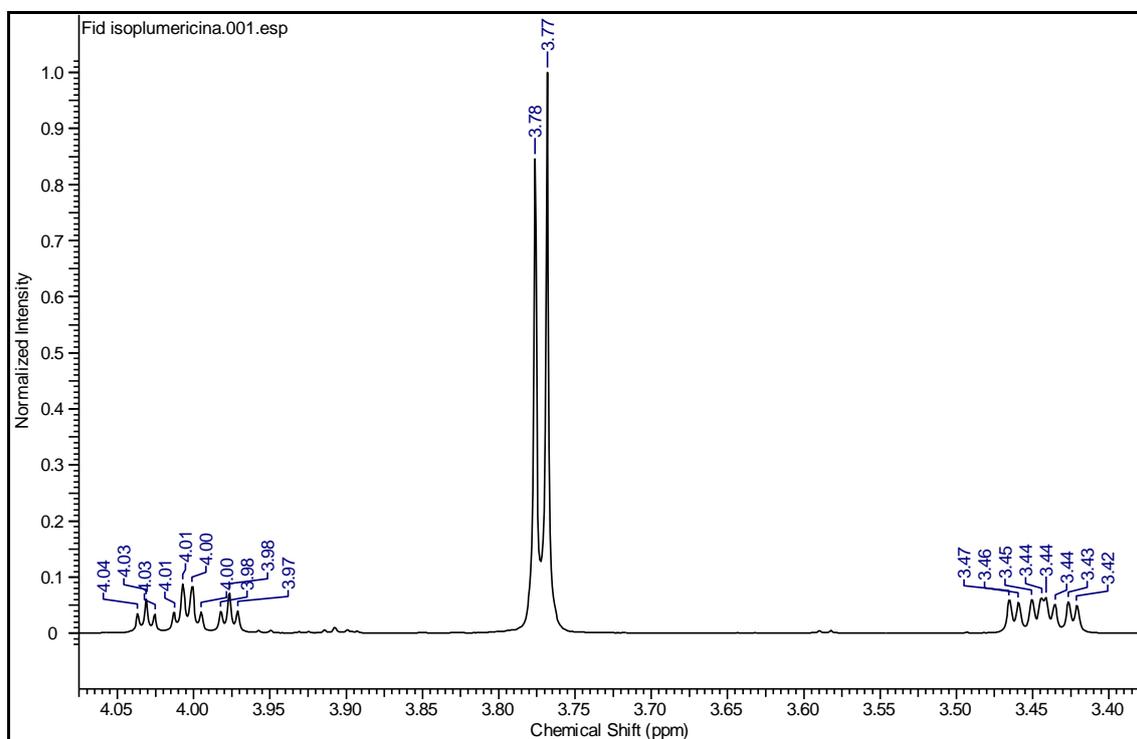


Figura 32. Ampliação do espectro de RMN ^1H nas regiões de δ 3,40 – 4,05 ppm.

O sinal duplo em δ 5,57 (d, $J = 6,7$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono metínico (H-1) que está acoplado com o H-9. Os sinais duplos em δ 2,10 (d, $J = 7,2$ Hz) e δ 2,32 (d, $J = 7,2$ Hz) (Figura 33) correspondem aos hidrogênios metílicos do C-14 que acoplam com os hidrogênios do C-13.

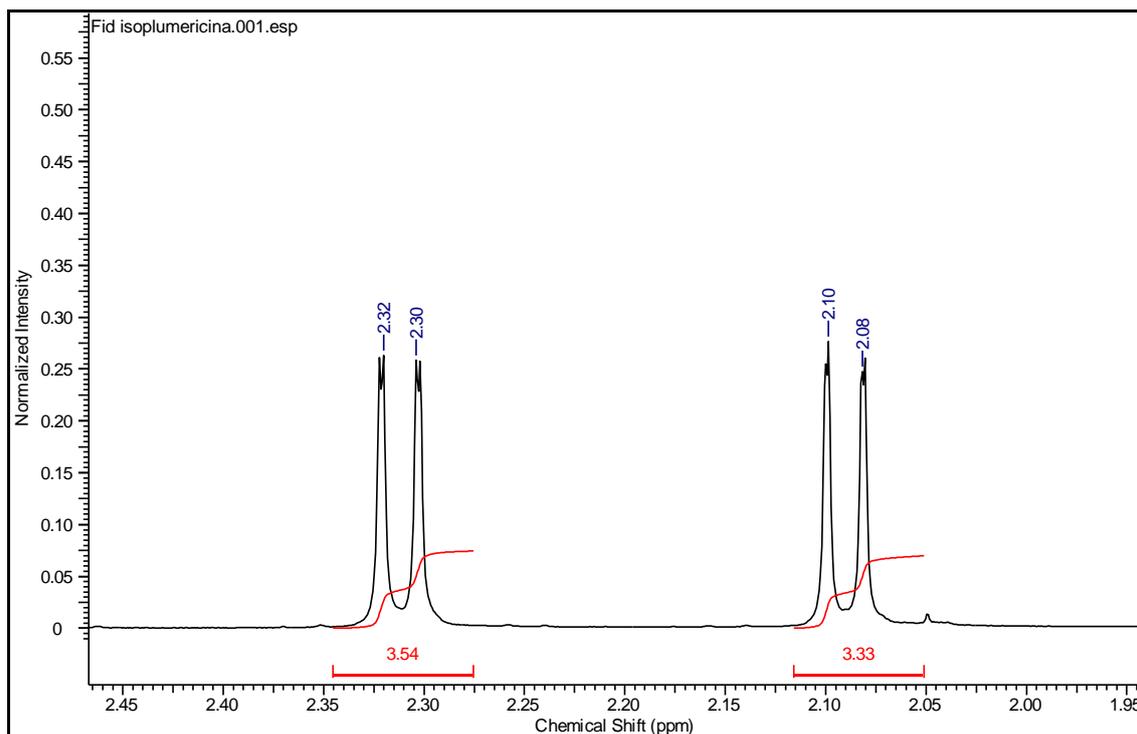


Figura 33. Ampliação do espectro de RMN ^1H nas regiões de δ 1,95 – 2,45 ppm.

A análise dos dados de RMN ^1H quando comparados com a literatura (SILVA et al., 1998) (Tabela 5), confirmam que a amostra HS 3 é uma mistura constituída dos iridóides plumericina e isoplumericina (Figura 34).

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H da amostra HS 3 em comparação com os dados da plumericina e isoplumericina descritos na literatura (SILVA et al., 1998).

H	Plumericina ¹	Isoplumericina ¹	Amostra HS 1 ²
H-1	5,56 (d, J=6,0)	5,56 (d, J=6,0)	5,57 (d, J=6,72)
-	-	-	-
H-3	7,42 (s)	7,42 (s)	7,44 (s) ^a 7,45 (s) ^b
-	-	-	-
H-5	4,0 (m)	4,0 (m)	4,01 (m)
H-6	6,04 (dd, J=2,0; 5,0)	6,04 (dd, J=2,0; 5,0)	6,05 (dd, J=2,16; 5,36)
H-7	5,64 (dd, J=2,0; 5,0)	5,64 (dd, J=2,0; 5,0)	5,65 (ddd, J=2,40; 5,20; 5,18)
-	-	-	-

H-9	3,42 (dd, J=9,0;6,0)	3,42 (dd, J=9,0;6,0)	3,42 (m)
H-10	5,30 (sl)	5,30 (sl)	4,87 (s) ^a 5,11 (s) ^b
-	-	-	-
-	-	-	-
H-13	7,14 (dq, J=1,0; 7,0)	6,80 (dq, J=1,0; 7,0)	7,17 (qd, J=1,6; 7,26) ^a 6,82 (qd, J=1,0 ;7,38) ^b
H-14	2,01 (d, J=7,0)	2,01 (d, J=7,0)	2,10 (d J=7,24) ^a 2,32 (d, J=7,24) ^b
-	-	-	-
COOCH ₃	3,76 (s)	3,76 (s)	3,77 (s) 3,78 (s)

¹Dados obtidos em aparelho de 300 MHz em CDCl₃. ²Dados obtidos em um aparelho de 400 MHz, em CDCl₃; J(Hz).^aDados obtidos para plumericina. ^bDados obtidos para isoplumericina.

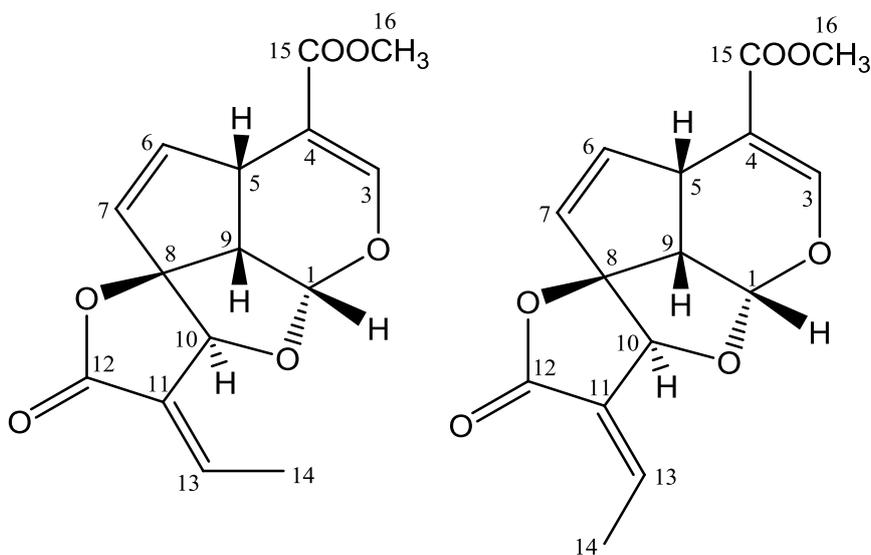


Figura 34. Estrutura do iridóide plumericina e isoplumericina.

Amostra HS 4

A substância codificada HS 4 foi isolada do extrato diclorometano das raízes frescas de *H. sucuuba* como um sólido amorfo de coloração branca. O espectro de massas (Figura 35) para a amostra HS 4 apresentou o pico do íon molecular m/z 309 $[M+H]^+$, compatível com a fórmula molecular de $C_{15}H_{16}O_7$.

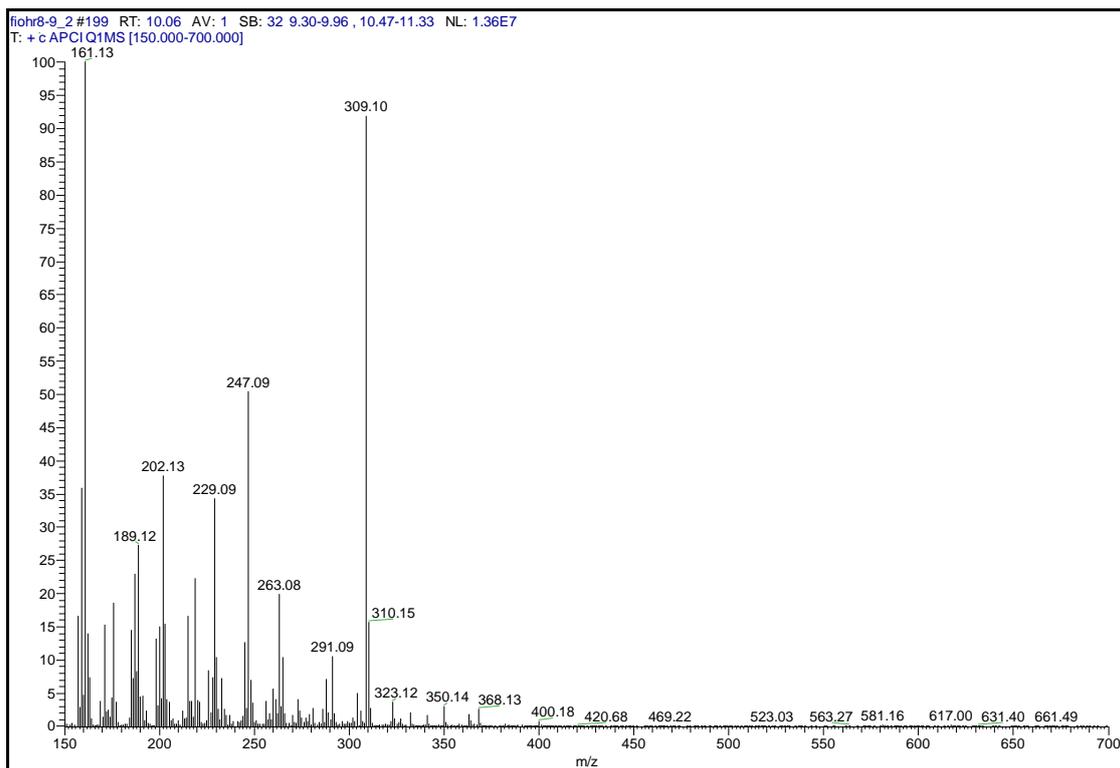


Figura 35. Espectro de Massas de HS 4 por APCI-MS(+).

No espectro de RMN 1H (Figura 36) da substância HS 4 são observados sinais de hidrogênios metílicos, olefínicos e carbinólicos.

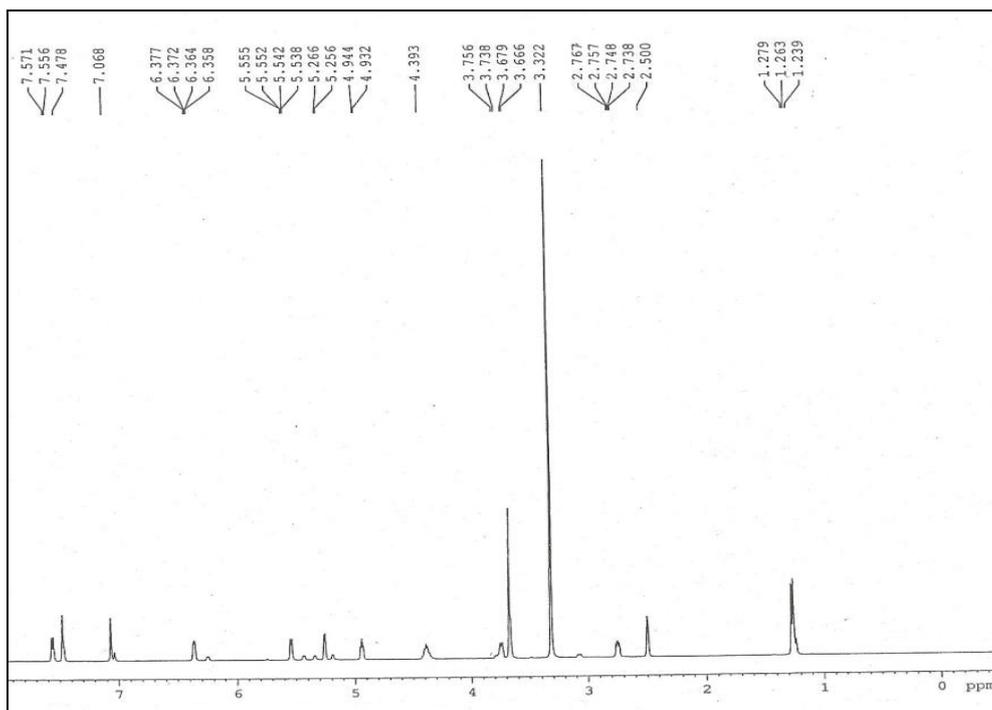


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H da substância HS 4.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 37) apresentou carbonos metílicos, metínicos, carbinólicos e carbonílicos.

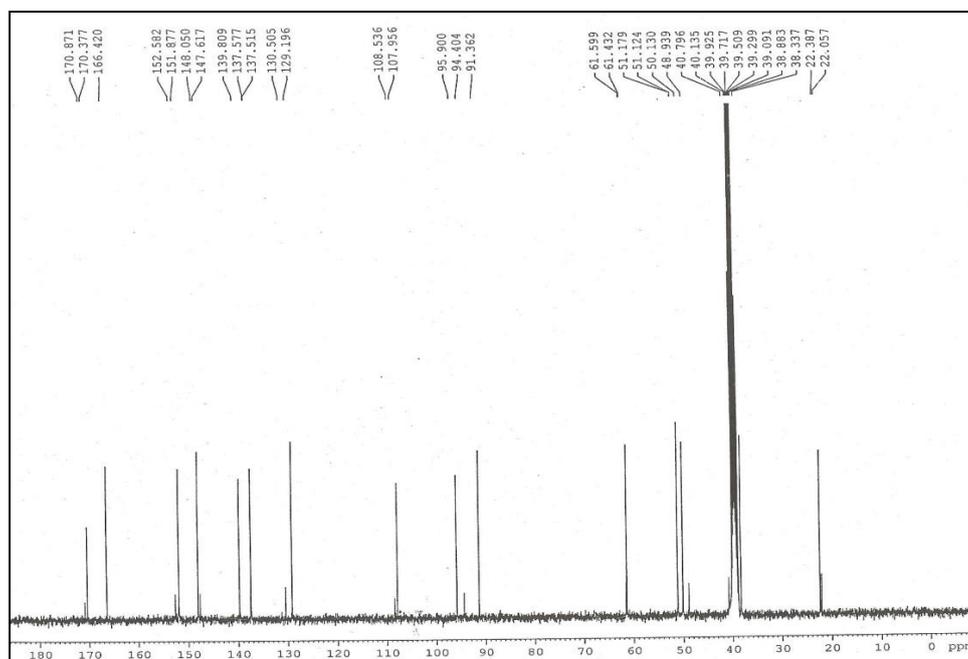


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C da substância HS 4.

Nas ampliações do espectro de RMN ^1H nas regiões de δ 4,30 – 6,50 (Figura 38) são observados sinais em δ 5,55 (d, $J = 5,4$ Hz) e δ 6,37 (d, $J = 5,4$ Hz) referentes aos hidrogênios olefínicos vicinais (H-7 e H-6, respectivamente).

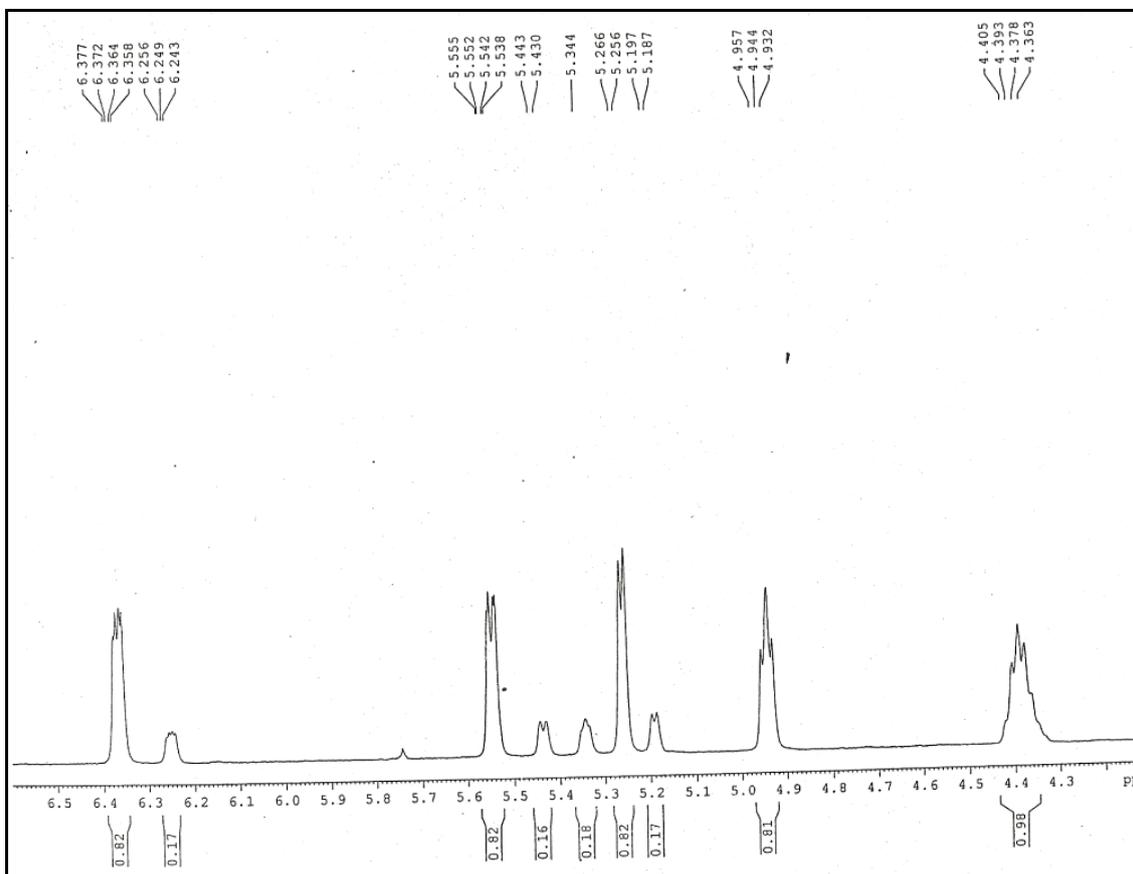


Figura 38. Ampliação do espectro de RMN de ^1H nas regiões de δ 4,30 – 6,50.

O hidrogênio metínico em δ 2,75 (dd, $J = 4,0$ e 7,6 Hz) apresenta acoplamento com o hidrogênio carbinólico em 4,94 (d, $J = 4,0$ Hz).

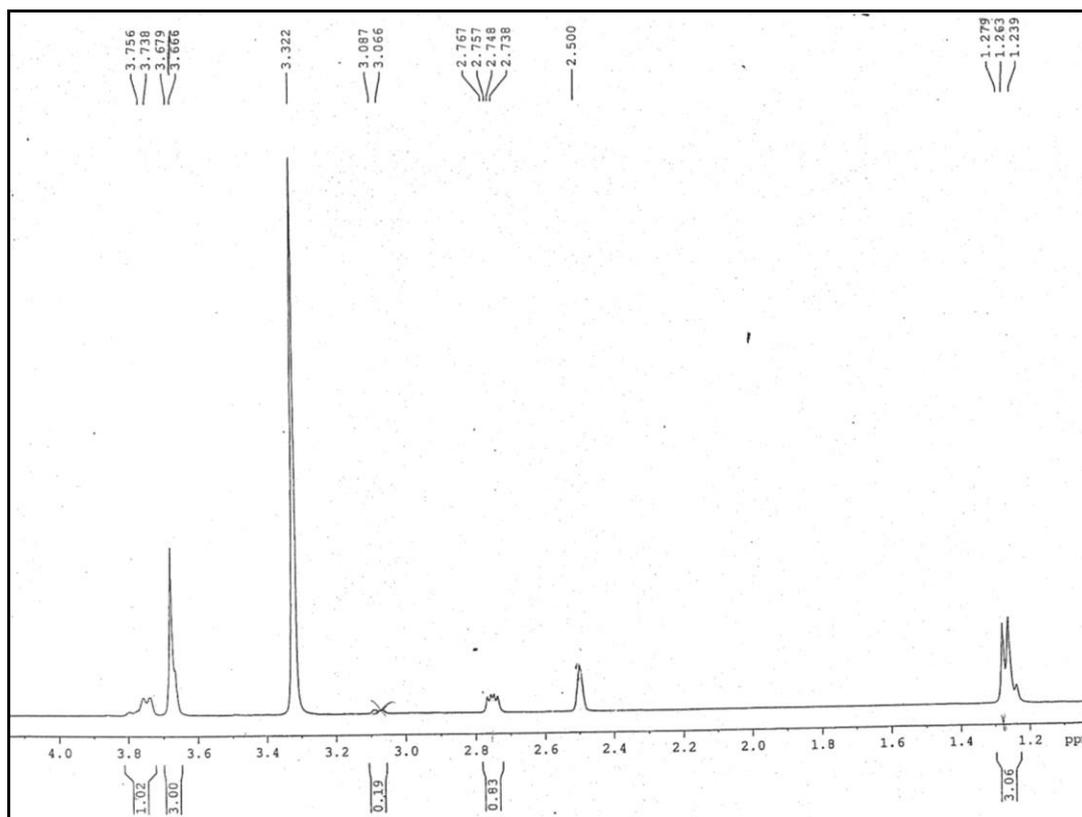


Figura 39. Ampliação do espectro de RMN de ^1H nas regiões de δ 1,20 – 4,00 ppm.

Os sinais simples em δ 7,47 e 3,68 foram relacionados aos hidrogênios olefínicos e aos hidrogênios do grupo metoxila, respectivamente. Esses sinais, juntamente com os demais hidrogênios assinalados foram associados com a estrutura de um grupo ciclopentenodihidropirano típico de esqueletos de iridóides (Figura 40) (SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, et al., 2001).

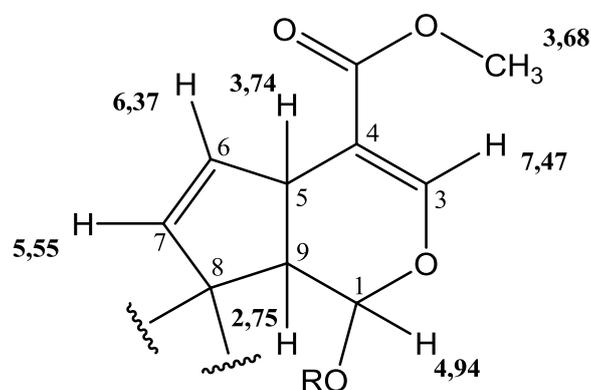


Figura 40. Estrutura do núcleo ciclopentenodihidropirano

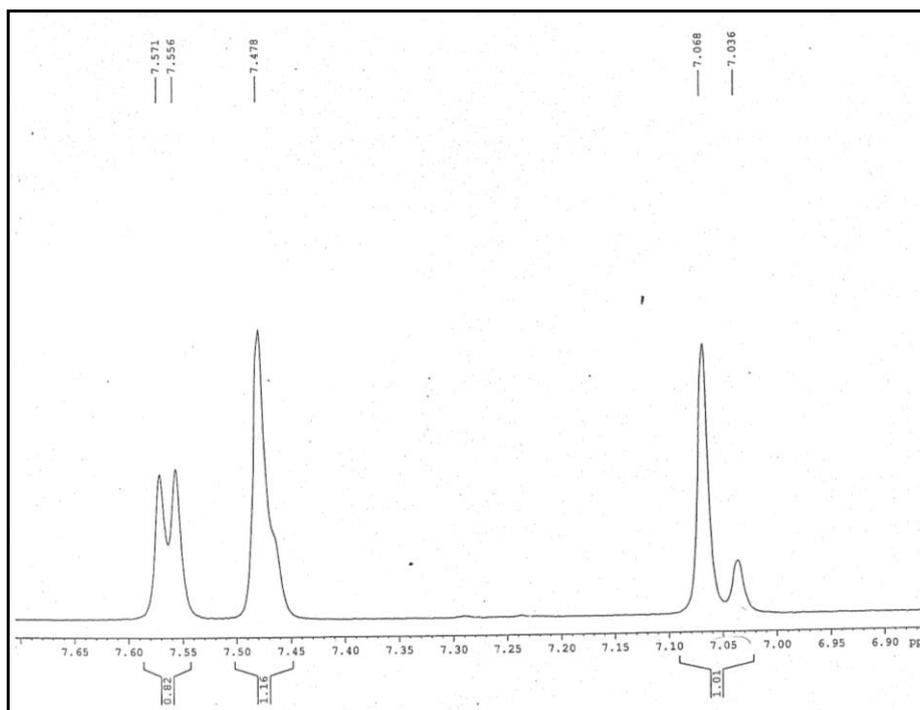


Figura 41. Ampliação do espectro de RMN de ^1H nas regiões de δ 6,90 – 7,65 ppm.

As correlações ^1H - ^{13}C a longa distância observadas no mapa de correlações de HMBC (Figura 42) foram observadas para os sinais olefinicos em δ 5,55 (H-7) com os carbonos δ 38,3 (C-5), 139,8 (C-6), 95,9 (C-8) e 50,1 (C-9) e de δ 6,37 (H-6) com C-5, C-8 e com o carbono em δ 129,2 (C-7). O hidrogênio em δ 3,74 (H-5) apresentou correlação com os carbonos em δ 151,9 (C-3), δ 107,9 (C-4), C-6, C-7 e C-8 ao passo que o outro sinal metínico em δ 2,75 (H-9) apresentou correlação com δ 91,4 (C-1), C-4, C-5 e C-8, o que corrobora com a afirmação de que estes hidrogênios estão ligados aos carbonos das junções entre os anéis ciclopenteno e diidropirano do esqueleto básico dos iridóides. O hidrogênio em δ 4,94 (H-1) correlacionou com C-3 e C-5, ao passo que o hidrogênio em δ 7,47 (H-3) acoplou com C-1, C-4, C-5, C-9 e com o carbono em δ 166,4 (C-15). Apenas o sinal em δ 3,68 (H-16) além de H-3 apresentou correlação com C-15 indicando que um éster metílico estaria ligado a C-4 (Figura 43).

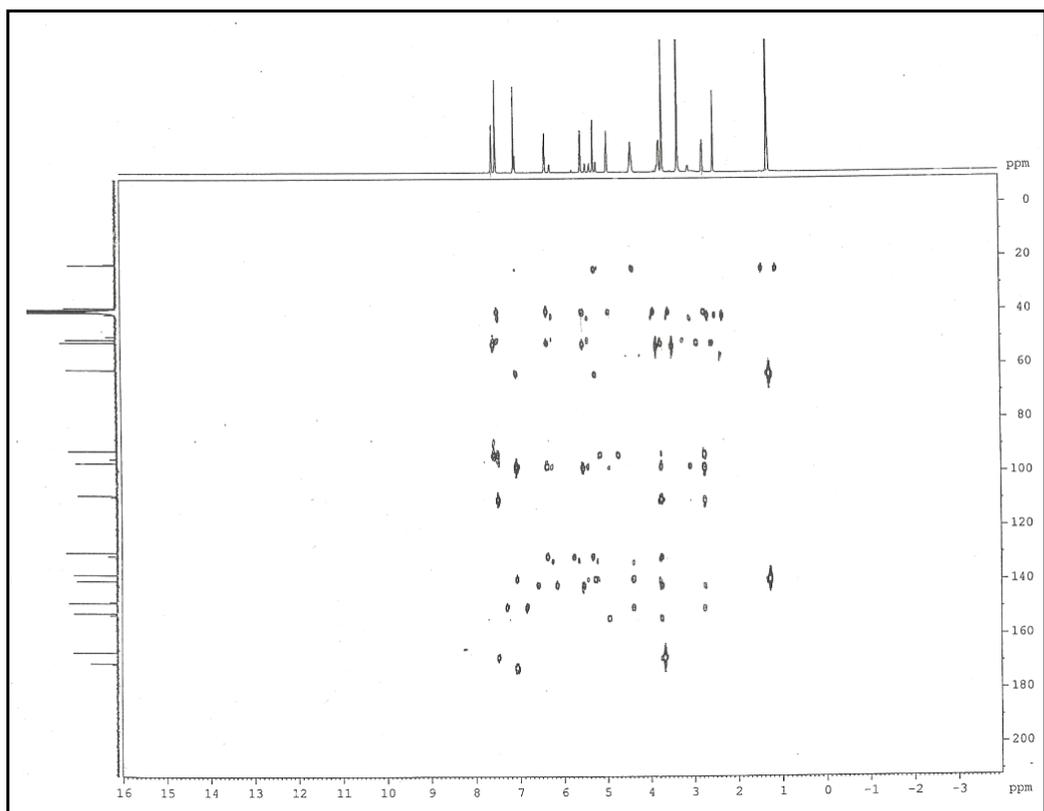


Figura 42. Mapa de correlação de longa de distancia $^1\text{H}-^{13}\text{C}$.

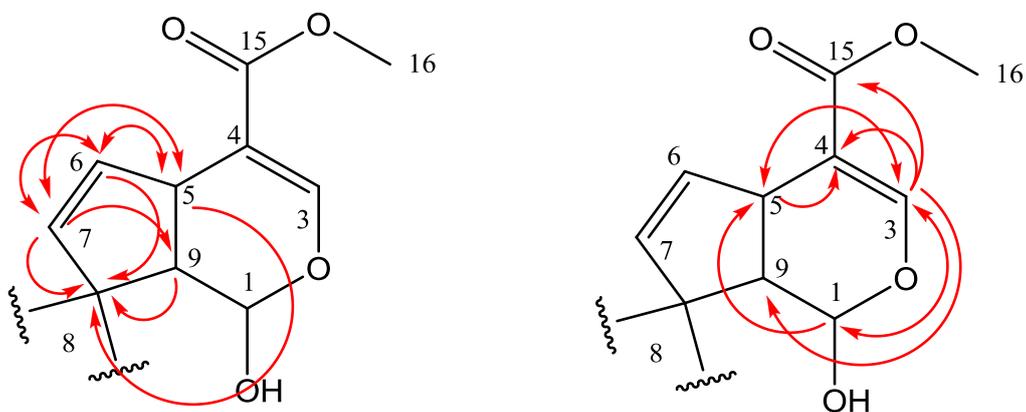


Figura 43. Correlações de longa de distancia $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ para o núcleo ciclopentenodihidropirano.

O hidrogênio em δ 7,07 (H-10) não presente no anel ciclopentenodihidropirano apresentou correlação chave no mapa de HMBC com C-8, além de δ 137,5 (C-11), δ 170,4 (C-12) e δ 61,4 (C-13). O deslocamento típico de hidrogênios olefínicos deste sinal, bem como o sinal de hidrogênio carbinólico em δ 4,38 (q, $J = 5,7$ Hz) e que

possui correlação com C-10 (δ 148,0) levaram a suposição de um iridóide de esqueleto do tipo plumérico (Figura 44) (SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, et al., 2001), o qual possui uma junção de anéis do tipo *spiro* em C-8, esta evidência foi suportada pelas correlações por HMBC observadas. A presença de um hidrogênio metílico em δ 1,26 (d, $J = 5,7$ Hz) acoplando com H-13 (δ 4,38) juntamente com as correlações de ambos com δ 137,5 (C-11) e δ 170,4 (C-12) (Figura 44) pertencentes a um sistema carbonílico α,β -insaturado, confirmaram o esqueleto plumérico.

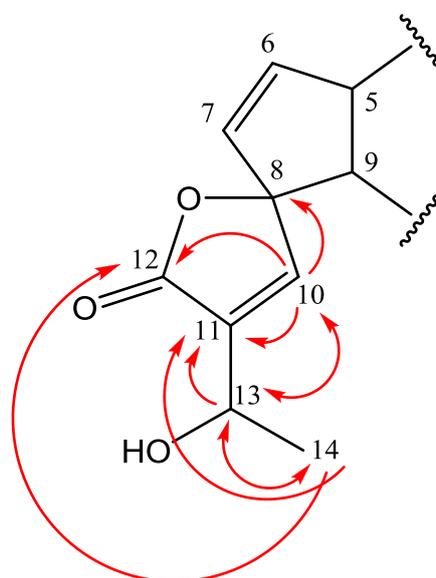


Figura 44. Correlações de HMBC para o restante do esqueleto plumérico.

A comparação dos dados de RMN de HS 4 com dados descritos na literatura (Tabela 6) levaram a identificação desta substância como sendo o iridóide plumieridina (Figura 45).

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de HS 4 em comparação com os dados da plumieridina descritos na literatura (BOROS et al., 1991).

HS 4 ¹	Plumieridina ² (BOROS et al,
-------------------	--

1991)

Posição	¹ H	HSQC/ ¹³ C	HMBC	¹ H
1	4,94(d, J=4,0)	91,36	C3, C5	5,33(d, J = 4,0)
2	-	-	-	-
3	7,47(s)	151,87	C1, C4, C5, C9, C15	7,47(d, J = 2,0)
4	-	107,95	-	-
5	3,74 (bq, J=7,2)	38,33	C3, C4, C6, C7, C8	3,94 (bq, J = 8,0)
6	6,37 (dd, J=5,4)	139,80	C5, C7, C8	6,38(td, J = 6,0)
7	5,55 (d, J=5,4)	129,19	C5, C6, C8, C9	5,33 (d, J = 6,0)
8	-	95,90	-	-
9	2,75 (dd, J= 4,0 e 7,6 Hz)	50,13	C1, C4, C5, C8	3,10(q, J = 8)
10	7,07 (s)	148,05	C8, C11, C12, C13	7,29(q, J = 1,0)
11	-	137,55	-	-
12	-	170,37	-	-
13	4,38 (q, J=5,7)	61,43	C10, C11, C14	4,82(bq, J = 7,0)
14	1,26 (d, J=6,4)	22,38	C11, C12, C13	1,47(d, J = 7,0)
15	-	166,42	-	-
OCH ₃	3,68 (s)	51,15	C15	3,53

¹Dados obtidos em um aparelho de 400 MHz para RMN ¹H e 100 MHz para RMN ¹³C, solvente DMSO-*d*₆, J(Hz). ²Dados obtidos em um aparelho de 100 MHz para RMN ¹H, solvente piridina-*d*.

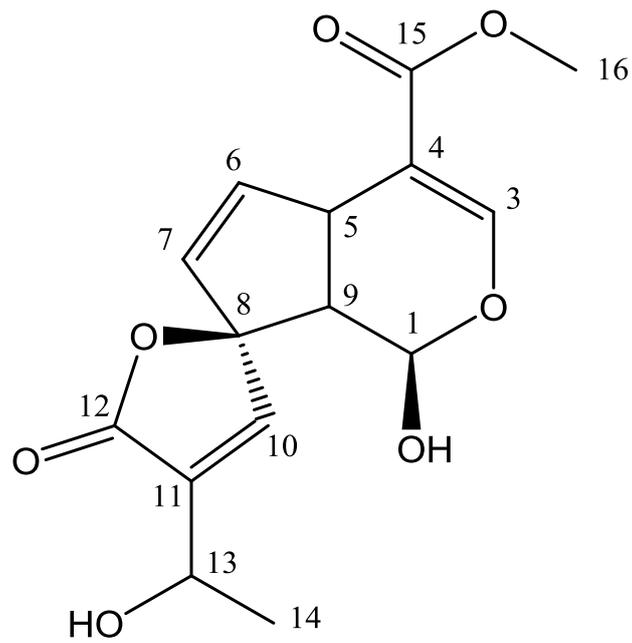


Figura 45. Estrutura do iridóide plumieridina.

Amostras HS 5

A substância codificada HS 5 foi isolada a partir do refração das frações provenientes do extrato diclorometano das raízes secas de *H. succuba* no formato de um sólido de coloração branca.

No espectro de massas (Figura 46) foi possível observar o íon molecular em m/z 414, compatível com a fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$. Com a análise do espectro de massas é possível observar padrões de fragmentação no esqueleto esteroidal. O primeiro caso ocorre com a formação do íon base m/z 396 decorrente da perda de água $[M-18]^+$. O pico em m/z 255 é característico do íon formado pela perda da cadeia lateral e o pico em m/z 213 corresponde a saída da cadeia lateral mais três átomos de carbono (DIEKMAN & DJERASSI, 1967).

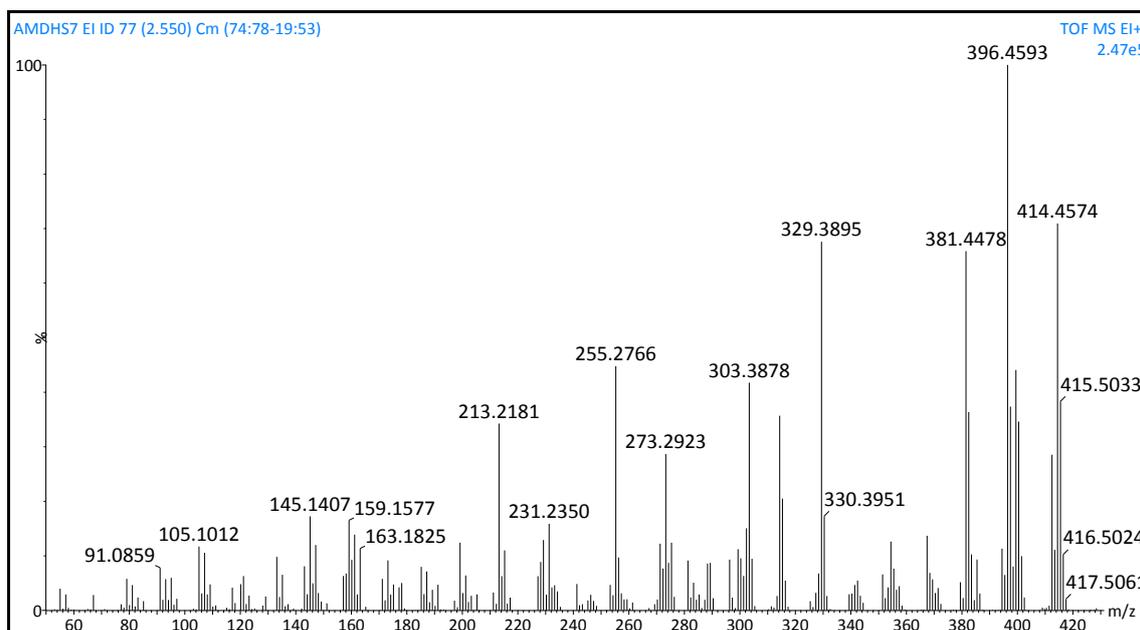


Figura 46. Espectro de massas (EI-MS) da substância HS 5.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 47) da amostra HS 5 são observados sinais de hidrogênios metílicos além de sinais referentes aos hidrogênios metínicos, metilênicos, olefínicos e carbinólicos.

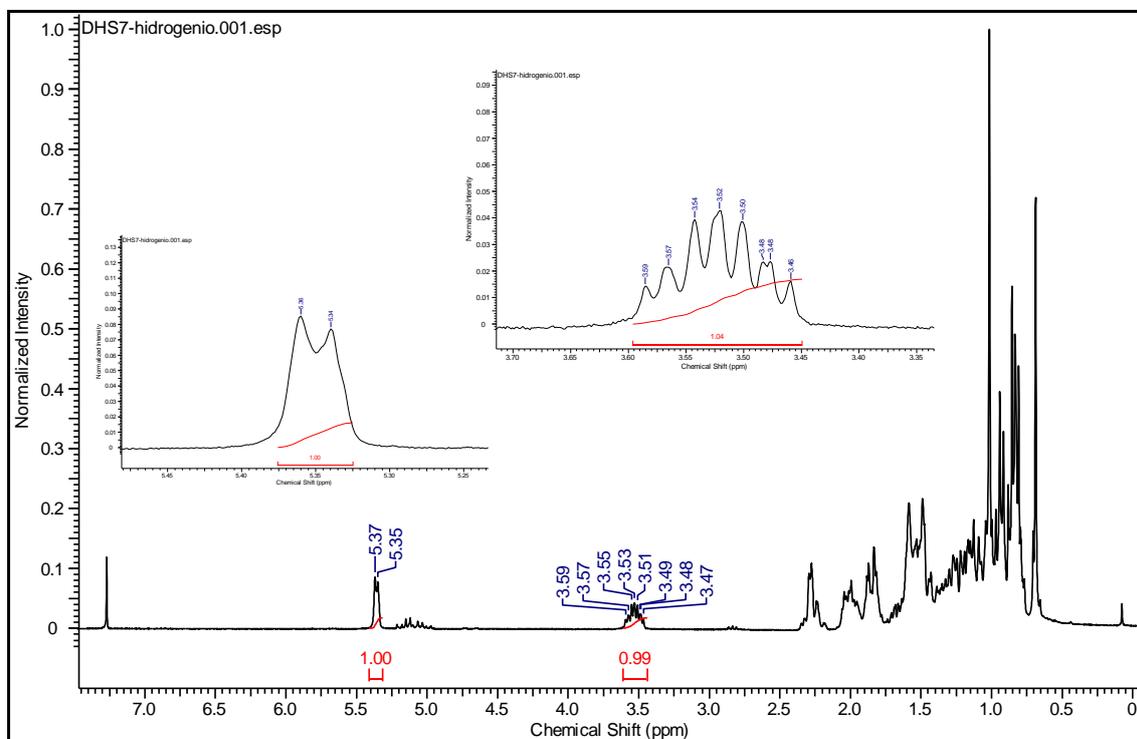


Figura 47. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da amostra HS 5.

A presença de vários sinais sobrepostos característicos de grupos metilas na região mais blindada mostrou perfil espectral de HS 5 de estrutura esteroidal (FAIZI et al., 2001). A amostra apresentou sinais de hidrogênios olefínicos em δ 5,35 (d, $J=5,0$ Hz, H-6), hidrogênios carbinólicos δ 3,53 (m, H-3) e o acúmulo de sinais na região entre δ 0,6 - 2,4 foram referentes aos vários hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos existentes.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 48) e o DEPT 135° (Figura 49) da amostra HS 5 indicaram a presença de 29 átomos de carbono, sendo o sinal δ 71,8 referente a um carbono carbinólico (C-3), dois sinais de carbono sp^2 em δ 140,8 e δ 121,7 referentes à

C-5 e C-6 da insaturação do esqueleto esteroidal e dois sinais de carbonos metálicos em δ 11,9 e δ 12,0.

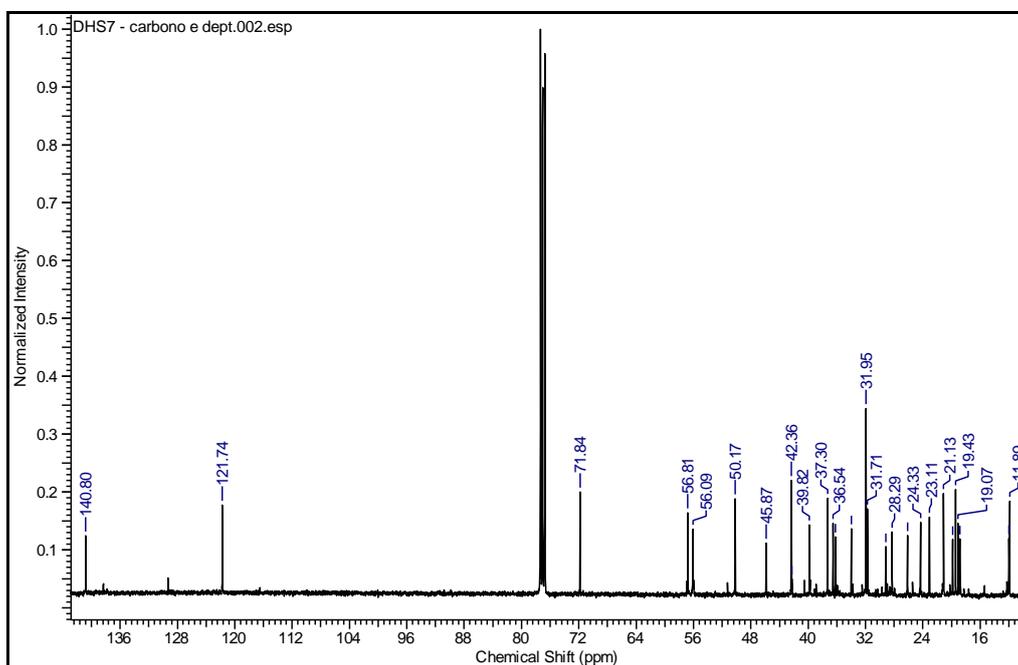


Figura 48. RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da amostra HS 5.

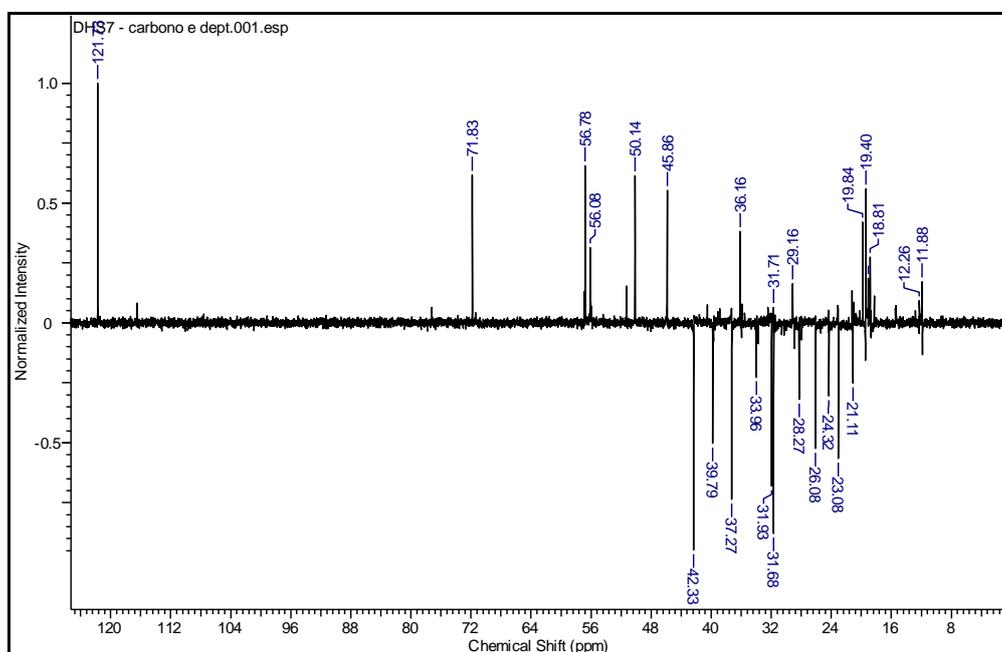


Figura 49. DEPT 135° do espectro de ^{13}C da amostra HS 5.

Comparando os dados espectrais com dados coletados da literatura (DE-
EKNAMKUL, W. & POTDUANG, B. 2003.; NASSER, 2007) (Tabela 7), é possível
afirmar que a amostra HS 5 é o sitosterol (Figura 50).

Tabela 7. Dados de RMN de ^{13}C e DEPT 135° de HS 5 em comparação com os dados descritos na literatura (NASSER, 2007).

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹	^{13}C -DEPT 135° ¹	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ²
	HS 3		NASSER, 2007
1	37,30	CH ₂	37,22
2	31,71	CH ₂	31,63
3	71,84	CH	71,80
4	42,30	CH ₂	42,19
5	140,80	---	140,72
6	121,74	CH	121,71
7	31,95	CH ₂	31,87
8	31,95	CH	31,87
9	50,20	CH	50,10
10	36,54	---	36,48
11	21,13	CH ₂	21,07
12	39,82	CH ₂	39,66
13	42,40	---	42,26
14	56,81	CH	56,85
15	24,33	CH ₂	24,34
16	28,30	CH ₂	28,91
17	56,10	CH	55,93
18	11,90	CH ₃	12,03

19	19,43	CH ₃	19,39
20	36,20	CH	36,12
21	18,82	CH ₃	18,76
22	34,00	CH ₂	33,91
23	26,13	CH ₂	26,02
24	45,90	CH	45,81
25	29,20	CH	29,11
26	19,90	CH ₃	19,80
27	19,10	CH ₃	19,01
28	23,11	CH ₂	23,04
29	12,01	CH ₃	11,97

¹ Dados obtidos em aparelho de 400 MHz para ¹H e 100 MHz para o ¹³C, CDCl₃. ² Dados obtidos em aparelho de 125 MHz, CDCl₃.

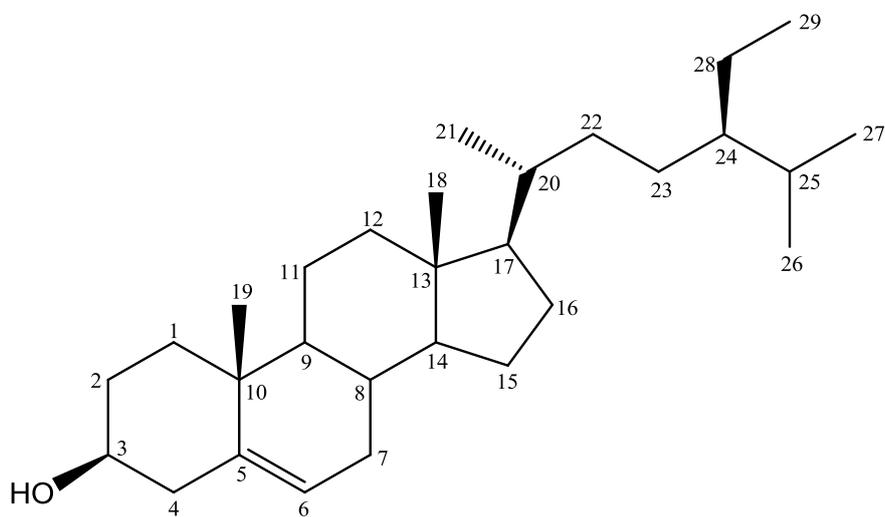


Figura 50. Estrutura do sitosterol.

Amostra HS 6

A substância codificada HS 6 foi isolada a partir do refração da fração 24, proveniente do extrato metanol das raízes secas de *H. sucuba* parte aquosa, na forma de um sólido com coloração escura.

No espectro de RMN ^1H obtido em CD_3OD , é possível observar um sinal duplo em δ 1,41 ppm ($J=6,5$ Hz) característico de hidrogênios metílicos. Um sinal simples em δ 3,75 ppm referente aos hidrogênios do grupo metoxila e a presença de sinais entre δ 3,0 e 4,5 ppm atribuídos aos hidrogênios da unidade glicosídica determinada como β -glicose devido a presença de um sinal duplo em δ 4,67 ppm ($J=8,0$ Hz) atribuído ao hidrogênio anomérico ($\text{H}-1'$) (SILVA, 2000) (Figura 51).

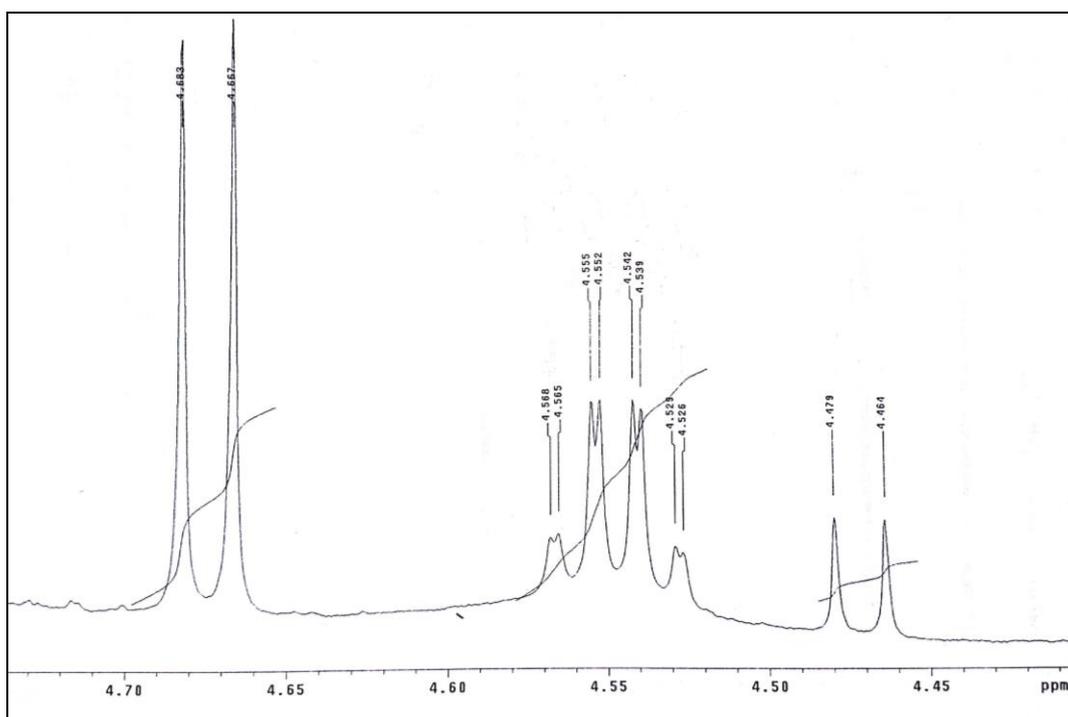


Figura 51. Ampliação do espectro de RMN ^1H na região de 4,45 a 4,78 ppm.

O sinal duplo com deslocamento químico em 5,27 ppm ($J=5,0$ Hz) referente ao hidrogênio do carbono metínico e um conjunto de duplos dubletos em δ 5,51 (dd, $J=5,5$; 2,0 Hz) e δ 6,46 ppm (dd, $J=5,5$; 2,5 Hz) (Figura 52) são característicos de hidrogênios do esqueleto de iridóides (SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, et al., 2001).

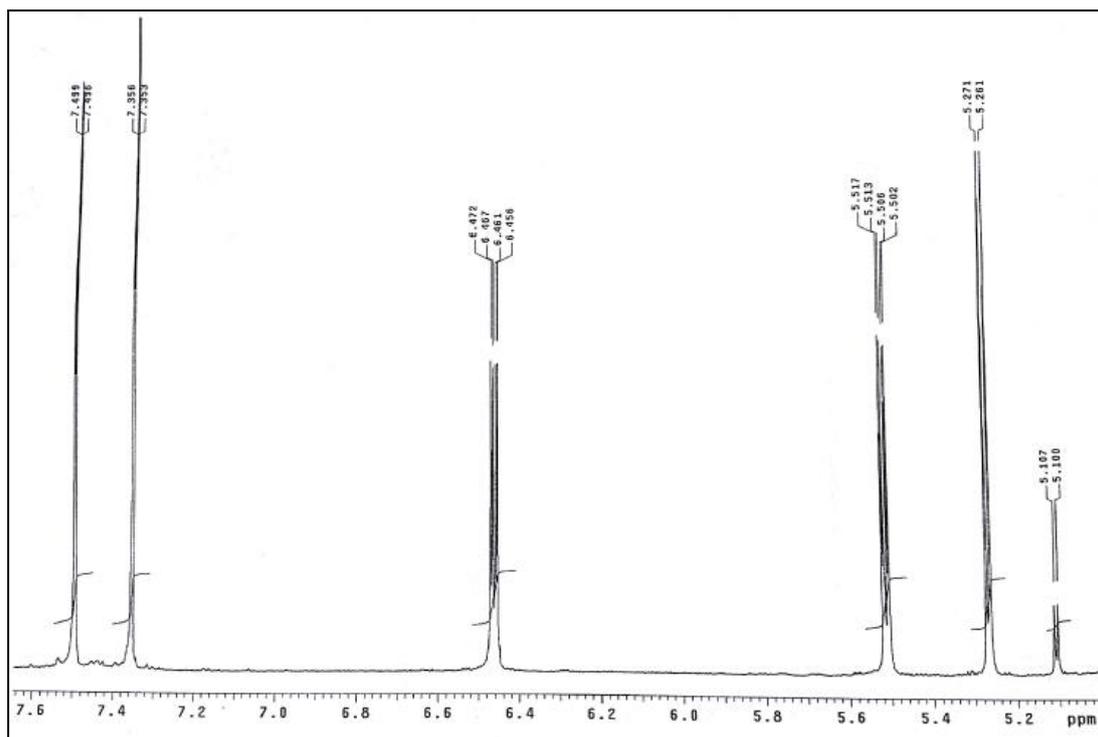


Figura 52. Ampliação do espectro de RMN ^1H na região de 5,0 a 7,6 ppm

Na Figura 52 é possível observar dois sinais duplos em δ 7,35 ppm (H-3, $J=1,5$ Hz) característico do núcleo ciclopentanodihidropirano e δ 7,50 ppm (H-10, $J=1,5$ Hz) correspondente ao hidrogênio de ligação dupla (SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, et al., 2001). Comparando os dados espectrais com dados coletados da literatura (SILVA, 2000) (Tabela 8), é possível afirmar que a amostra HS 6 é o iridóide plumierídeo (Figura 53).

Tabela 8. Dados de RMN ^1H de HS 6 em comparação com os dados descritos na literatura (SILVA, 2000).

Posição	Plumierídeo [†] (Silva, 2000)	HS 6 [‡]
1	5,45 (d, $J=4,9$)	5,27 (d, $J=5,0$)

3	7,55(d, J=1,2)	7,35 (d, J=1,5)
5	4,10(m)	3,92 (m)
6	6,65(dd, J=5,5; 2,3)	6,46 (dd, J=5,5; 2,5)
7	5,70(dd, J=5,8; 2,3)	5,51 (dd, J=5,5; 2,0)
9	3,14(dd, J= 7,8; 4,9)	2,94 (dd, J= 7,75; 5,0)
10	7,70 (d, J=1,7)	7,50 (d, J=1,5)
13	4,75 (qd, J=6,0; 1,5)	4,55 (qd, J=6,5; 1,5)
14	1,61 (d, J=6,3)	1,41 (d, J=6,5)
OCH₃	3,94 (s)	3,75 (s)
1'	4,86 (1H, J=8,0)	4,67 (d, J=8,0)

[†]Dados obtidos em um aparelho de 200 MHz para RMN ¹H solvente CD₃OD, J(Hz). [‡]Dados obtidos em um aparelho de 500 MHz para RMN ¹H, CD₃OD, J(Hz).

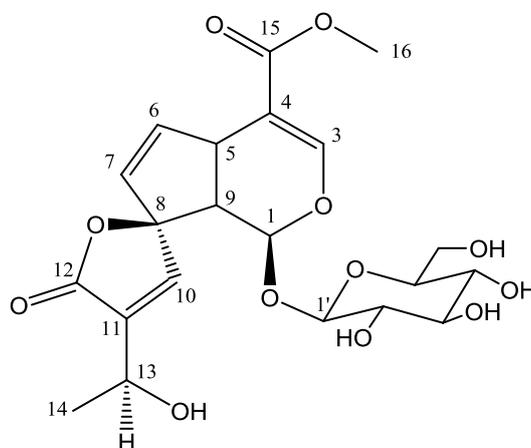


Figura 53. Estrutura do iridóide plumierídeo.

Amostra HS 7

A substância HS 7 foi isolada a partir do refractionamento de 25-29, proveniente do extrato metanol das raízes secas de *H. succuba* parte aquosa, na forma de sólido com coloração amarela.

O espectro de massas (Figura 54) apresentou um pico em m/z 468, compatível com a fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_2$. Os fragmentos no espectro foram característicos do esqueleto lupano. O fragmento m/z 189 originou de varias possibilidades de rompimento de ligações. O fragmento m/z 408 foi originado a partir do rearranjo de McLafferty (PAVIA, et al., 2010), proveniente do íon molecular m/z 468.

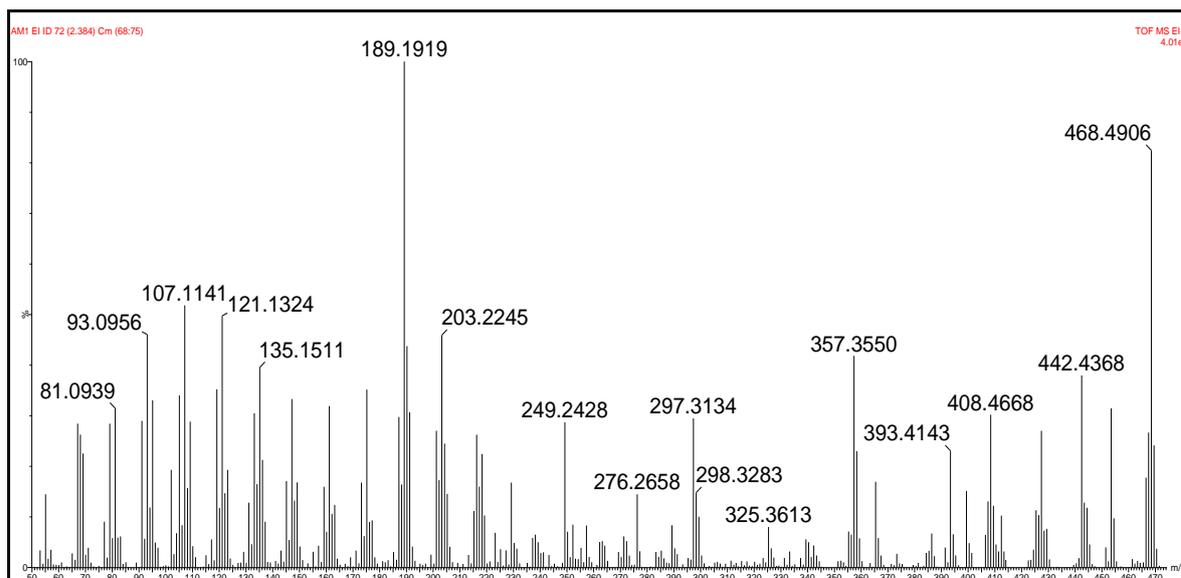


Figura 54. Espectro de massas da amostra HS 7.

No espectro de RMN de 1H (Figura 55) da amostra HS 7 foram observados dois singletos em δ 4,75 (H-29a) e δ 4,62 (H-29b) atribuídos aos hidrogênios da dupla C-29.

Em δ 2,01 foi possível observar um singlete intenso correspondente aos hidrogênios do grupo metila da função acetato.

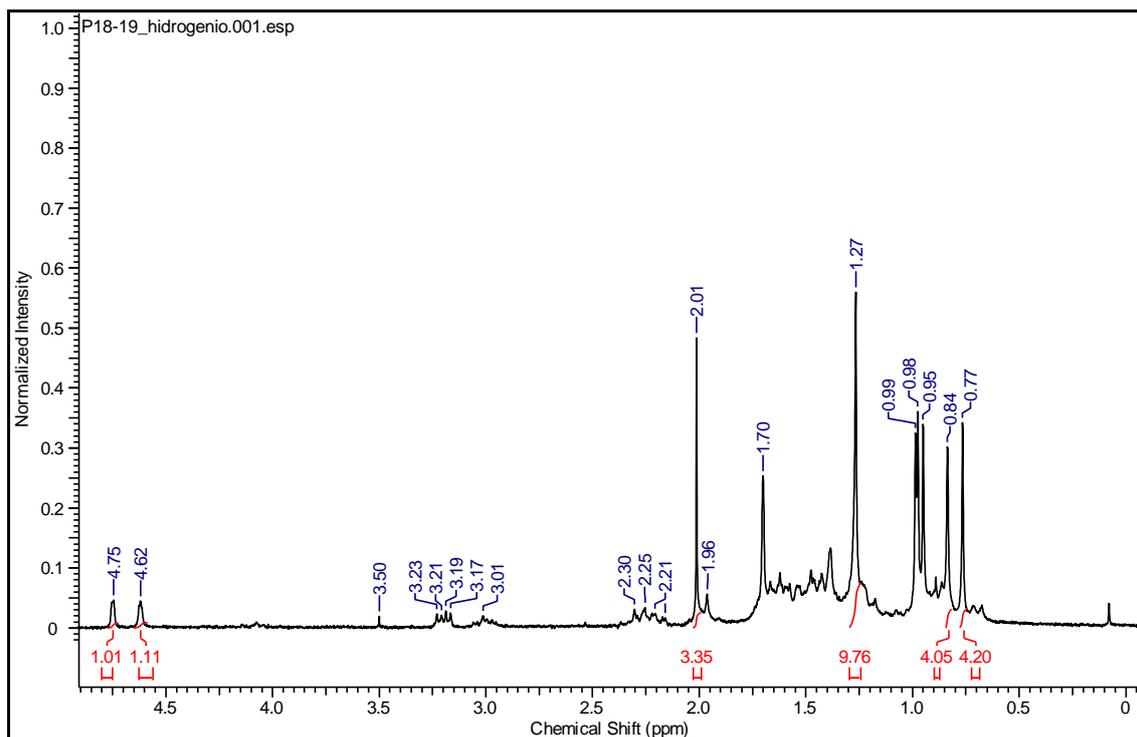


Figura 55. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, em clorofórmio-*d*) da amostra HS 7.

A comparação dos dados de RMN de ^1H e de massas da amostra HS 7 com dados previamente descritos na literatura (SILVA et al., 1998) levaram a identificação deste como sendo o triterpeno acetato de lupeol (Figura 56).

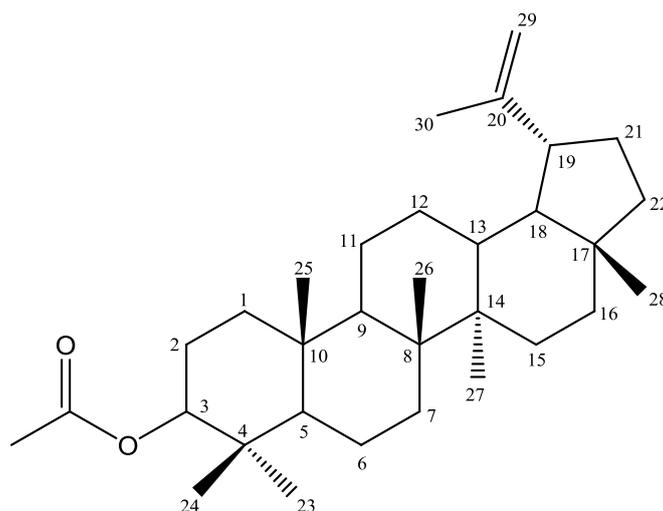


Figura 56. Estrutura do acetato de lupeol.

Amostra HS 8

A substância codificada HS 8 foi isolada do fracionamento das frações 25-29 provenientes do extrato metanol das raízes secas de *H. succuba* parte aquosa, na forma de um sólido amorfo de coloração branca.

O espectro de massas (Figura 57) obtido pela técnica de inserção direta por impacto de elétrons para a amostra HS 8 apresentou fragmentos em m/z 248 e m/z 203 e o íon molecular em m/z 456 $[M]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$.

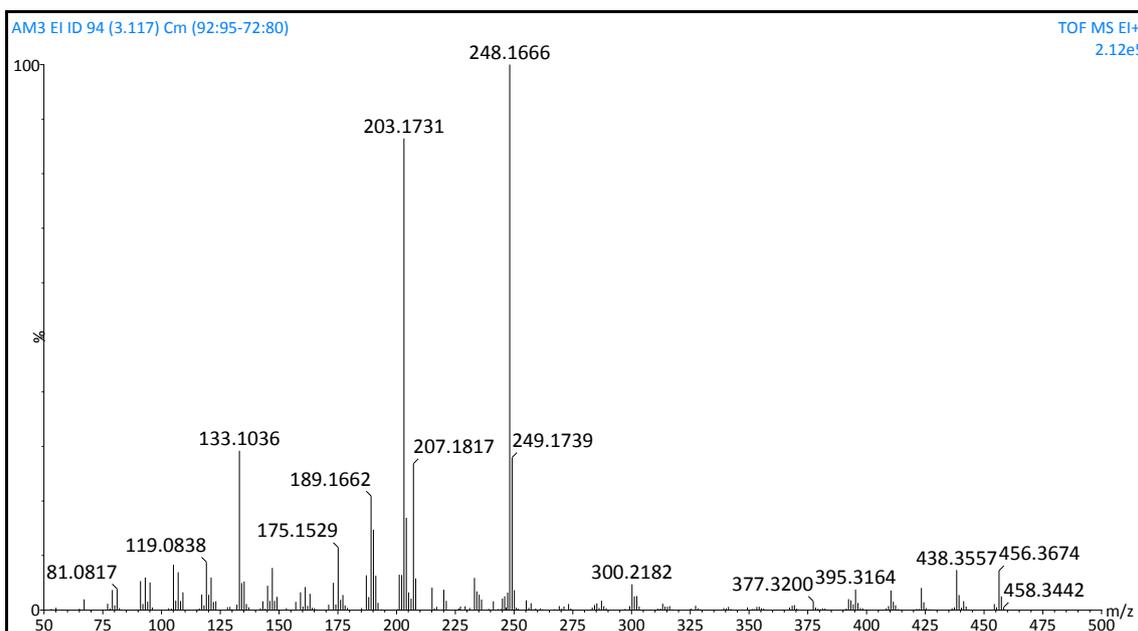


Figura 57. Espectro de massas (IE-TOF) da amostra HS 8.

A ausência do pico base em m/z 189 sugeriu que a amostra HS 8 é uma mistura de triterpenóides ácidos com esqueletos do tipo ursano e oleanano (GALOTTA, 1998). Os fragmentos em m/z 411, proveniente da perda de $COOH$ e m/z 203 foram indicativos de que o grupo carboxila está localizado nos anéis D ou E da amostra (BUDZIKIEWICZ, et al., 1963), a representação da fragmentação está apresentada na Figura 58.

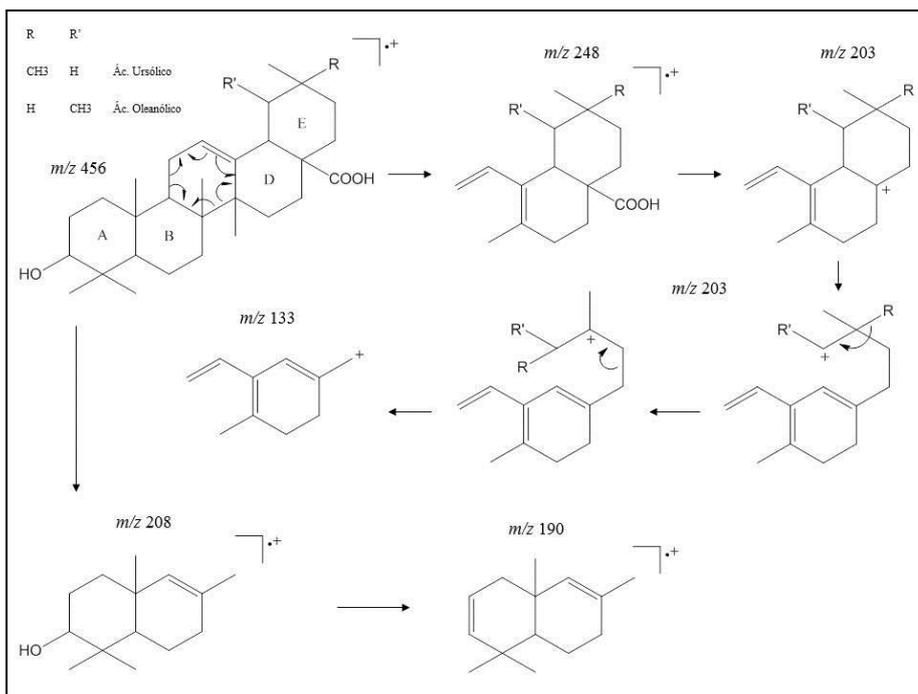


Figura 58. Esquema das fragmentações da amostra HS 8.

No espectro de RMN ^1H (Figura 59) foi observado um congestionamento de sinais na região mais blindada do espectro, característico de triterpenos.

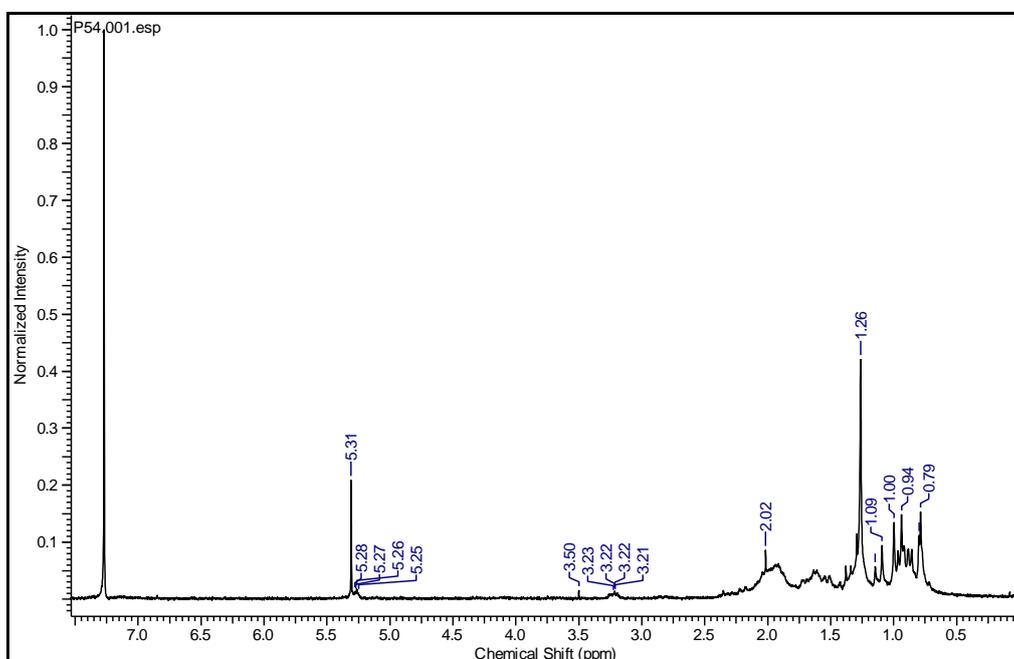


Figura 59. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, solvente CDCl_3) da amostra HS 8.

O espectro apresentou vários sinais entre δ 0,79 – 1,09 ppm referentes aos hidrogênios metílicos, um sinal em δ 5,31ppm referente aos hidrogênios olefinicos e um multiplete em δ 3,22 ppm característico de hidrogênios oximetínicos (SILVA, 2007).

O conjunto de dados espectrais permitiu a identificação da amostra HS 8, após comparação com dados da literatura, como uma mistura dos triterpenos ácido ursólico (Figura 60) e ácido oleanólico (Figura 61).

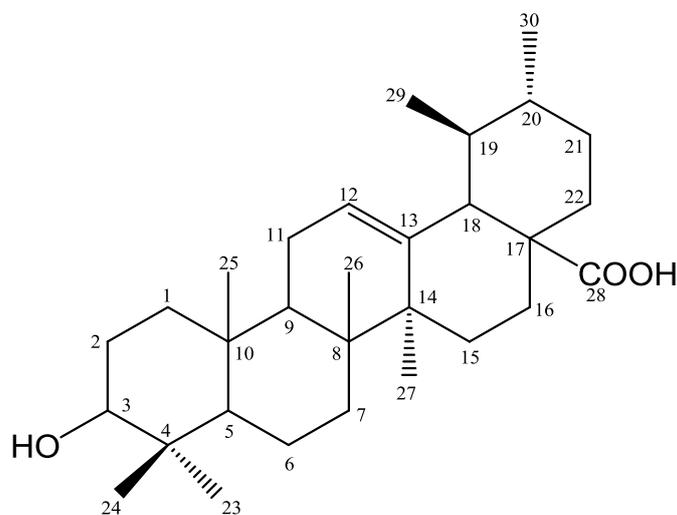


Figura 60. Estrutura do ácido ursólico.

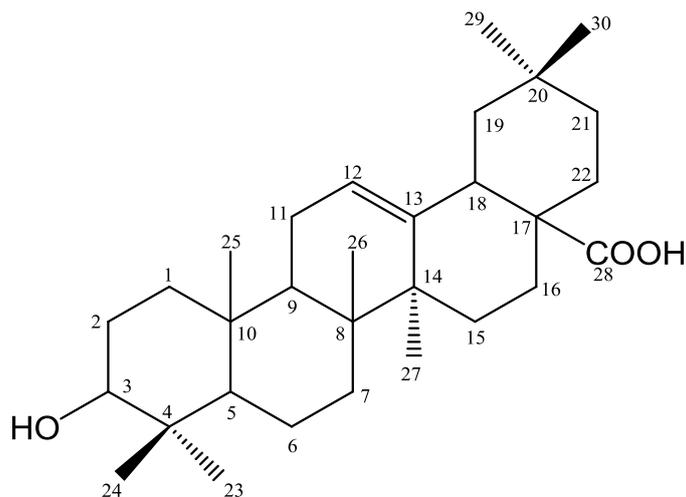


Figura 61. Estrutura do ácido oleanólico.

4.4. Análises CLAE

Os padrões utilizados foram previamente isolados e identificados acima: plumierídeo, plumieridina e mistura de plumericina e isoplumericina. Essas substâncias foram solubilizadas utilizando água:metanol (1:1), e cinco concentrações diferentes (1,0 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,0625 mg/mL e 0,03125 mg/mL) foram preparadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Após a obtenção dos cromatogramas (Figura 62) as curvas de calibração foram traçadas. Através destas, foi possível a obtenção das equações regressivas da reta ($y = mx + b$) e os coeficientes de correlação (R) de cada curva (Tabela 9). Este coeficiente indica uma correlação positiva, ou seja, uma proporcionalidade entre o aumento da concentração e o aumento da área porcentual da substância.

Tabela 9. Tabela das equações regressivas dos padrões.

Substância	Tempo de retenção (minutos)	Equação de regressão	R
Plumierídeo	14.41	$y = 71,675x + 27,024$	0,8910
Plumieridina	17.40	$y = 59,796x + 11,915$	0,9444
Plumericina	26.60	$y = 25,891x + 6,1031$	0,9537
Isoplumericina	27.50	$y = 38,225x + 12,321$	0,9407

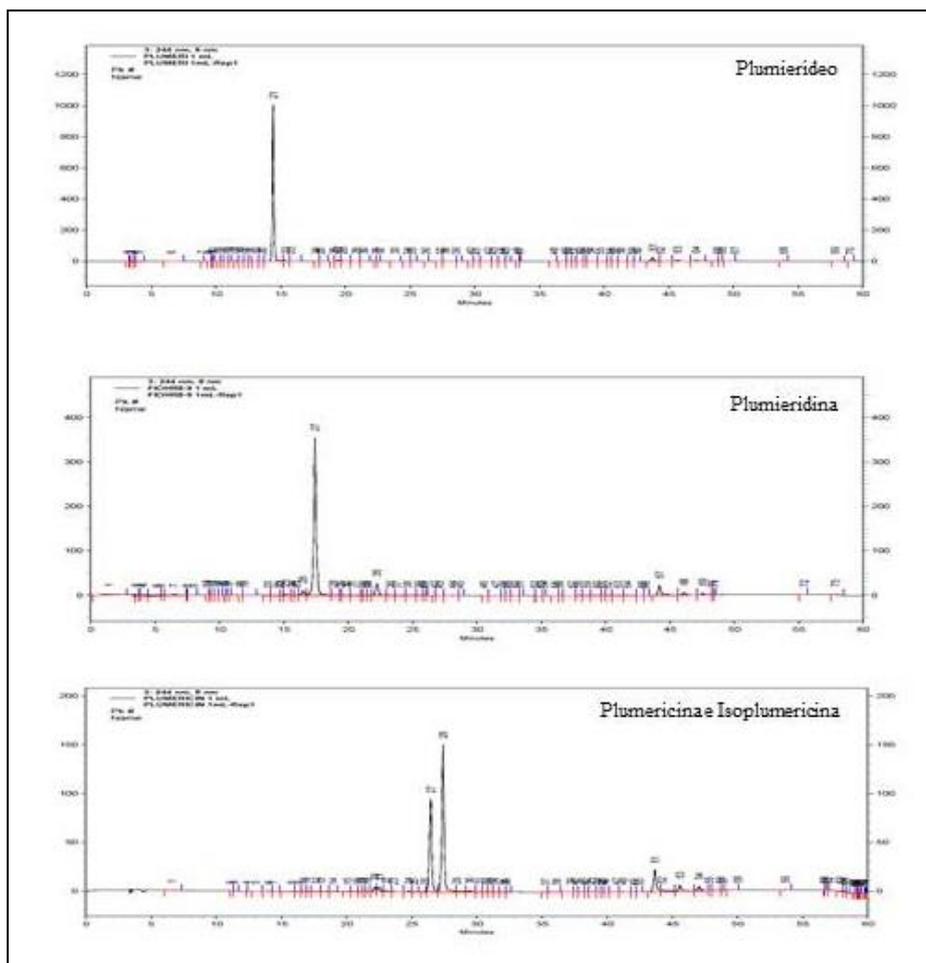


Figura 62. Cromatograma dos padrões dos iridóides.

As análises foram realizadas com extratos de diferentes espécies do gênero *Himatanthus*. O extrato do fruto de *H. drasticus* apresentou em sua composição uma concentração considerável do iridóide plumierídeo ($t_R= 14,4$ minutos) de 0,356 mg/mL. Nos frutos e cascas da espécie *H. sucuuba* essa concentração foi um pouco menor, de 0,283 e 0,267 mg/mL, respectivamente. Outro iridóide encontrado em concentração razoável nas raízes e cascas de *H. sucuuba* nas concentrações de 0,282 e 0,207 mg/mL, respectivamente, foi o iridóide plumieridina ($t_R=17,4$ minutos). A identificação de outros iridóides nas demais espécies foi observada em concentração relativamente baixa, como a isoplumericina ($t_R=27,5$ minutos), identificada no extrato hexano das folhas de *H. sucuuba*. Essas análises comprovaram o iridóide plumierídeo como substância majoritária em todas as espécies analisadas, e mesmo em baixa concentração,

substâncias com atividades farmacológicas comprovadas (exemplo: isoplumericina, que possui atividade citotóxica e leishmanicida (CASTILLO et al, 2007; MIRANDA et al., 2000)) são identificadas nas demais espécies estudadas do gênero *Himatanthus*. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Tabela das espécies analisados do gênero *Himatanthus*.

Extrato	Área %	Concentração (mg/mL)	Padrão
Cascas (<i>H. bracteatus</i>)	40,041	0,182	Plumierídeo
Frutos (<i>H. drasticus</i>)	52,576	0,356	Plumierídeo
Sementes (<i>H. drasticus</i>)	28.434	0,020	Plumierídeo
Cascas (<i>H. obovatus</i>)	29,628	0.036	Plumierídeo
Cascas (<i>H. sucuuba</i>)	46.190	0.267	Plumierídeo
Frutos (<i>H. sucuuba</i>)	47.284	0.283	Plumierídeo
Folhas (<i>H. sucuuba</i>)	29.480	0.034	Plumierídeo
Raiz (<i>H. sucuuba</i>)	28.799	0.282	Plumieridina
Cascas da raiz (<i>H. sucuuba</i>)	24.289	0.207	Plumieridina
Cascas (<i>H. drasticus</i>)	28.439	0.020	Plumierídeo
Extrato hexano/folhas (<i>H. sucuuba</i>)	17.331	0.131	Isoplumericina
Extrato hexano/raízes (<i>H.</i>	12.929	0.016	Isoplumericina

4.5. Análise dos frutos de *H. sucuuba*

Cromatografia em camada delgada (CCD)

Através da análise por CCD dos extratos dos frutos (FVC, FVS, FVP, FMC e FMP) e padrões (Figura 63) foi observada a presença de açúcares. A sacarose, um açúcar comum em plantas foi observado em todos os extratos. As manchas verdes foram associadas à revelação característica dos iridóides, classe química comum no gênero (BRANCO & HEGGIE, 2007). Esses resultados preliminares são promissores e serão utilizados para estudos posteriores com esse órgão vegetal de *H. sucuuba*.

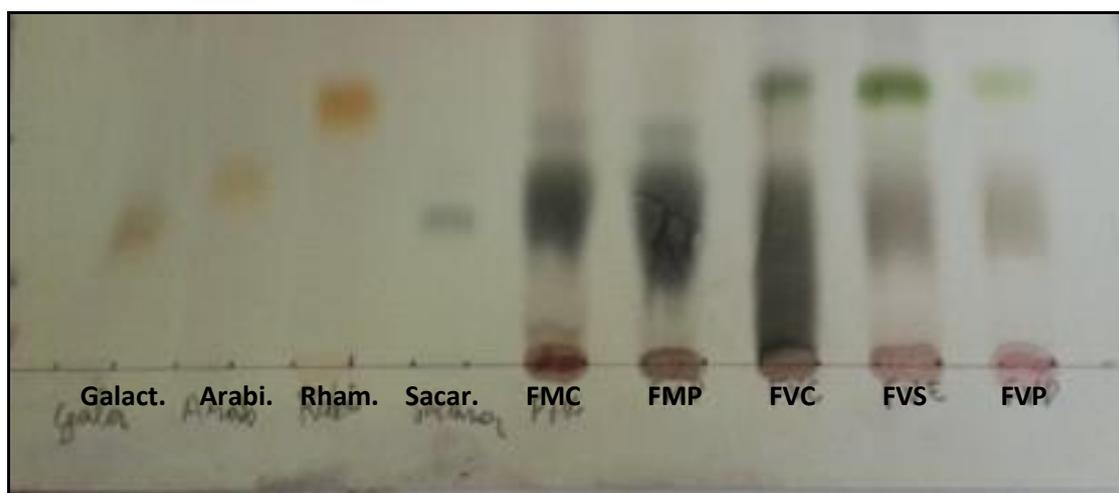


Figura 63. CCD dos padrões e extratos dos frutos verdes e maduros de *H. sucuuba*.

Análises CLUE-EM

O método desenvolvido utilizando a técnica de CLUE-EM proporcionou à análise dos iridóides dos frutos de *H. sucuuba*. As condições aplicadas conduziram a uma boa separação de picos que foram identificados pelos espectros de massas obtidos, e seus respectivos íons moleculares e fragmentações características de iridóides em todos os

extratos. O cromatograma obtido para o iridóide plumierídeo apresentou apenas um pico com tempo de retenção de 1,96 minutos, seu espectro de massas (EM) apresentou fragmentações características do iridóide (m/z 471 $[M+H]^+$; m/z 309 (100%); m/z 291 (61%), característico da perda de glicose no iridóide) (Figura 64).

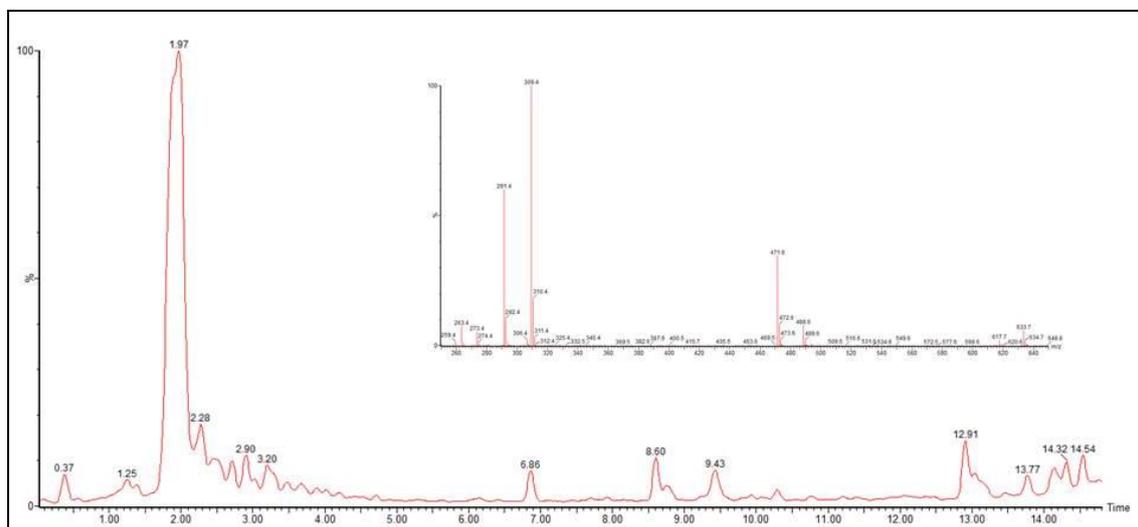


Figura 64. Cromatograma do iridóide plumierídeo.

Ao analisar os cromatogramas dos frutos de *H. succuba* foi possível observar através do tempo de retenção e do padrão de fragmentação a presença do iridóide plumierídeo apenas nos extratos dos frutos verdes (Figura 65). Nos cromatogramas dos extratos dos frutos verdes também foi identificado outro iridóide com o tempo de retenção menor ($t_R = 1,09$ minutos), o 15-desmetilplumierideo (m/z 457 $[M+H]^+$; m/z 295 (100%) perda de uma glicose desidratada; m/z 277). Esses iridóides tem o mesmo esqueleto principal, porém diferem apenas em seu substituinte ligado ao carbono C-4. O iridóide 15-desmetilplumierídeo possui um grupo ácido $-COOH$, sendo o primeiro a eluir, devido a maior interação com a fase móvel, quando comparado ao outro iridóide (SILVA et al., 2007).

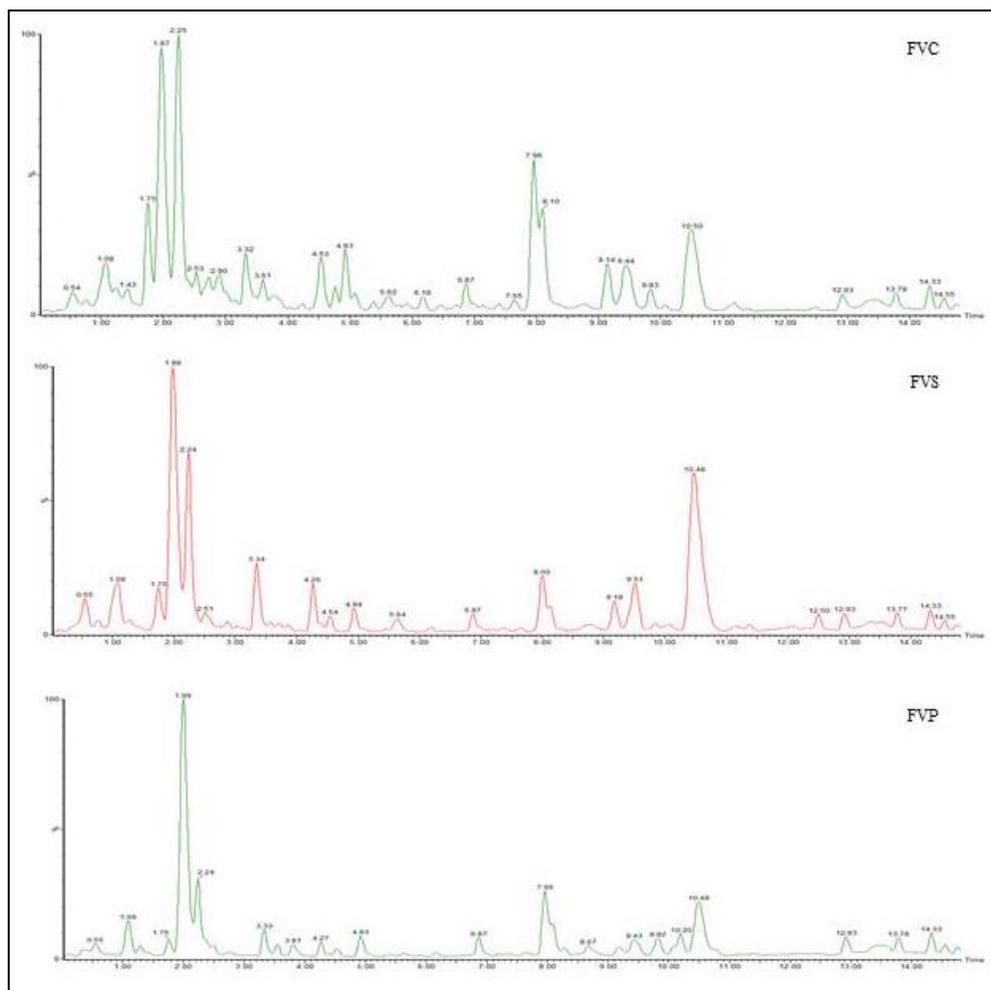


Figura 65. Cromatogramas dos extratos dos frutos verdes.

A análise do cromatograma do extrato das raízes de *H. sucuuba* (Figura 66) possibilitou a identificação dos iridóides plumierídeo (tR = 1,96 minutos, m/z 471 [M+H]⁺; m/z 309 (100%); m/z 291 (61%)) e do seu isômero isoplumierídeo (tR = 2,32 minutos, m/z 471 [M+H]⁺; m/z 309 (100%); m/z 291 (61%)) que foram diferenciados devido aos seus respectivos tempos de retenção. Isso ocorre devido a estereoquímica presente no carbono C-8, pois na estrutura do isoplumierídeo o oxigênio está mais próximo do H-1, diminuindo a polaridade da estrutura.

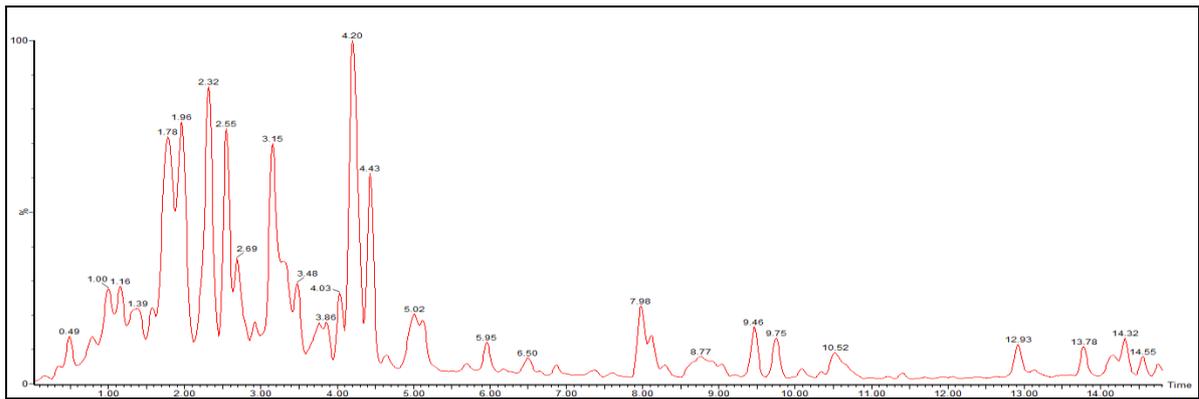


Figura 66. Cromatograma do extrato das raízes de *H. sucuba*.

A avaliação dos perfis cromatográficos dos frutos e raízes de *H. sucuba* foi de grande importância, pois permite uma comparação direta entre diferentes partes de uma mesma espécie vegetal com o objetivo de identificar substâncias com atividades biológicas comprovadas e aplicações etnofarmacológica existentes.

5. Conclusão

Himatanthus sucuuba, alvo deste trabalho de pesquisa, é encontrada na Amazônia, mais especificamente no estado do Amazonas. Possui ampla utilização na medicina popular e apresenta diversas classes de metabólitos secundários na constituição química de suas partes vegetativas. O estudo fitoquímico dessa espécie proporcionou o isolamento e a identificação dos iridóides plumericina, isoplumericina, plumieridina e plumierídeo, classe de metabólitos muito comum em espécies do gênero, e os terpenos cinamatos de lupeol, α e β -amirina, sitosterol, acetato de lupeol, ácidos ursólico e oleanólico.

Os valores obtidos para a atividade antioxidante do extrato metanol das raízes secas/diclorometano ($CS_{50}=265,62 \mu\text{g/mL}$) indicaram pouca atividade antioxidante do extrato, sugerindo a baixa capacidade de sequestro do radical pelas substâncias presentes no extrato.

O teste com *Artemia salina*, os extratos EHRF, EMRSD e EHRS com as concentrações letais de 111,0, 276,0 e 380,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, foram considerados moderadamente ativos.

A substância predominante nos diferentes extratos analisados das espécies *H. drasticus*, *H. bracteatus*, *H. obovatus* e *H. sucuuba*, foi o iridóide plumierídeo. Além deste, foram identificados o iridóide isoplumericina e plumieridina, sendo o último inédito na espécie *H. sucuuba*.

Através da análise por CLUE-EM foi possível à identificação dos iridóides 15-desmetilplumierideo e plumierídeo, presentes apenas nos frutos verdes da espécie *H. sucuuba*, o que indica uma nova fonte de estudos e obtenção desses metabólitos.

6. Referências Bibliográficas

- ALBAGLI, S. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. *Parcerias Estratégicas*, n. 12, p. 5-19, 2001.
- ARAUJO, A. S. Análise e tipificação de diferentes amostras de cerveja através de espectrometria de massas por ionização *electrospray*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2005.
- BEZERRA, M. Z. B.; CAMPELO, P. A.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A.; BRAZ FILHO, R. Constituintes químicos isolados de três espécies do gênero *Sclerolobium*. *Química Nova*, v. 17, n. 3, p. 205-209, 1994.
- BOROS, C. A.; STERMITZ, F. R. Iridoids. An Updated Review, Part II. *Journal of Natural Products*. v. 54, n. 5, p. 1173-1246, 1991.
- BRANCO, P. S. & HEGGIE, W. Fotossíntese. In: LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. *Biossíntese de produtos naturais*. IST Press, Instituto superior técnico, Lisboa. cap. 2, p. 57-72, 2007.
- BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, n.6, v.33, p.1359-1369, 2010.
- BUDZIKIEWICS, H.; WILSON, J.M.; DJERASSI, C. Mass spectra of pentacyclic triterpenes. *Journal of American Chemical Society*, n. 85, p. 3688-3699, 1963.
- CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A.; LOCK, O.; LEMESRE, J.-L.; GORNITZKA, H.; SAUVAIN, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, n. 112, p. 410-414, 2007.

- CHAVES, D. S. A.; COSTA, S. S.; ALMEIDA, A. P.; FRATTANI, F.; ASSAFIM, M.; ZINGALI, R. B. Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. *Química Nova*, v.33, n. 1, p.172-180, 2010.
- DE-EKNAMKUL, W.; POTDUANG, B. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry*, v. 62, p. 389-398, 2003.
- DEWICK, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 2nd ed. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, 2002.
- DIEKMAN, J.; DJERASSI, C. Mass spectrometry of some steroid trimethylsilyl ethers. *Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems*. CXXV, v. 32, p. 1005-1012, 1967.
- DI STASI, C.L.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Ed. Unesp, 375, 2002.
- ELISABETSKY, E.; CASTILHOS, Z. C. Plants used as analgesics by Amazonian caboclos as a basis for selecting plants for investigation. *International Journal of Crude Drug Research*, n. 28, p. 309-320, 1990.
- EL-SAYED, A.; CORDELL, G. A. *Catharanthus* alkaloids. XXXIV. Catharanthamine, a new antitumor bisidole alkaloid from *Catharanthus roseus*. *Journal of Natural Products*. v. 44, n. 3, p.289-293, 1981.
- FAIZI, S.; ALI, M.; SALEEM, R.; BIBI, I.; BIBI, S. Spectral assignments and reference data. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 39, p. 399-405, 2001.
- FRANÇA, O. O.; BROWN, R. T.; SANTOS, C. A. M. Uleine and demethoxiaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. *Fitoterapia*, n.71, p.208-210, 2000.

- FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A Fitoterapia no mundo atual. *Química Nova*, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.
- GALOTTA, A. L. Q. A. Estudo fitoquímico de *Mucoa duckei* (MARKGRAF) Zarucchi (Apocynaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas, 1998.
- GARCIA, E. S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. *Caderno de Saúde Pública*, v. 11, n. 3, p. 491-492, 1995.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GRENAND, P.; MORETI, C.; JACQUEMIN, H. Pharmacopées traditionnelles en Guyane. Institut François de Recherche Scientifique Pour Le Développement en Coopération, 1987.
- HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A. RUANGRUNGSI, N. Traditional medicinal plants of Thailand. XVII. Biologically active constituents of *Plumeria rubra*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 33, p. 289-292, 1991.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. 3 ed. Artmed, Porto Alegre, 2009.
- LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. *Biossíntese de produtos naturais*, Instituto Superior Técnico, 2007.
- LOBO, A. M. Métodos de estudos biossintéticos. In: LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. *Biossíntese de produtos naturais*, Instituto Superior Técnico, p. 11-56, 2007.
- MAGALHÃES, C.; SANTOS, J. L. C.; SALEM, J. I. Automação de coleções biológicas e informações sobre a biodiversidade da Amazônia. *Parcerias e Estratégias*, n. 12, p. 295-312, 2001.

- MALIK, S.; CUSIDÓ, R. M.; MIRJALILI, M. H.; MOYANO, E.; PALAZÓN, J.; BONFILL, M. Production of the anticâncer drug taxul in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 23-34, 2011.
- MARTINS, R. T.; ALMEIDA, D. B.; MONTEIRO, F. M. R.; KOWACS, P. A.; RAMINA, R. Opioid receptors to date. *Sociedade Brasileira para o estudo da dor*, v. 1, n. 13, p. 75-79, 2012.
- MENSOR LL, FABIO SM, GILDOR GL, ALEXANDER SR, TEREZA CD, CINTIA SC, SUZANE GL. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, n.15, p.127-130, 2001.
- MEYER BN, FERRIGNI NR, PUTNAM JE, JACOBSEN LB, NICHOLS DE, MCLAUGHLIN JL. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Medica*, n.45, p. 31-34, 1982.
- Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade brasileira. Disponível em: <http://www.mma.gov.br>. Acesso em: 19 de agosto de 2012.
- MIRANDA, A. L. P.; SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; PARRINI, J. S. Antiinflammatory and analgesic activities of the látex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. *Planta Medica*, v.66, p.284-286, 2000.
- MOREIRA, M. A. B.; ZARBIN, P. H. G.; CORACINI, M. D. A. Ferormônios associados aos coleópteros-praga de produtos armazenados. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 472-477, 2005.
- NASSER, A. L. M. Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Qualea ssp* (Vochysiaceae). Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, 2007.

- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, p. 311-335, 2012.
- OLIVEIRA, A. V.; VESENTINI, J. W. *A Amazônia*. Ed. Atica, São Paulo, 1997.
- PACKER, J. F.; DA LUZ, M. M. S. Método para a avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, n. 17, v. 1, p. 102-107, 2007.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. *Introdução à espectroscopia*. 4ª ed. [Trad.: Pedro Barros] – São Paulo. Editora: Cengage Learning, 2010.
- PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Química Nova*, n. 4, v. 32, p. 987-995, 2009.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; PEPORINE, N. L.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. *Química Nova*, São Paulo, v.25, supl.1, p.45-61, 2002.
- PIRES, A. M.; ARAÚJO, P. S. Percepção de risco e conceitos sobre medicinais, fitoterápicos e medicamentos alopáticos entre gestantes. *Revista Baiana de Saúde Pública*, v.35, n.2, p.320-333, 2011.
- POPOV, S. S.; HANDJIEVA, N. V. Mass spectrometry of iridoids. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 2, p. 481-514, 1983.
- REBOUÇAS, S. de O.; SILVA, J. da; GROFF, A. A.; NUNES, E. A.; IANISTCKI, M.; FERRAZ, A. de B. F. The antigenotoxic activity of latex from *Himatanthus articulatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, n. 22, v. 2, p. 389-396, 2012.

- SAMPAIO-SANTOS, M. I.; KAPLAN, M. A. C. Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 12, n. 2, p. 144-153, 2001.
- SCHMIDT, B. M.; RIBNICKY, D. M.; LIPSKY, P. E.; RASKIN, I. Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. *Natural Chemical Biology*, v. 3, n. 7, p. 360-366, 2007.
- SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; AMARAL, A. C. F. Cytotoxicity and antibacterial studies of iridoids and phenolic compounds isolated from the latex of *Himatanthus sucuuba*. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 43, p. 7357-7360, 2010.
- SILVA, V. C. Estudo químico e biológico da espécie de Rubiaceae. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Araraquara-SP, 2007.
- SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; SILVEIRA, C. V.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C. Quantitative determination by HPLC of iridoids in the bark and latex of *Himatanthus sucuuba*. *Acta Amazonica*, v.37, n.1, p.119-122, 2007.
- SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; SIANI, A. C.; REZENDE, C. M.; FELCMAN, J.; PINTO, A. C. Contribution to the study of *Himatanthus sucuuba*: latex macromolecule, microelements and carbohydrates. *Acta Amazonica*, v.33, n.1, p.105-110, 2003.
- SILVA, J. R. A. Contribuição ao estudo do látex de *Himatanthus sucuuba*: aspectos químicos e farmacológicos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.
- SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; YOUNG, C. M.; BOLZANI, V. S. Ésteres

triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. Química Nova, v.21, n.6, p.702-704, mai. 1998.

- SPINA, A. P. Estudo taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae – Plumerieae). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- SOARES, D. C.; ANDRADE, A. L. S.; DELORENZI, J. C.; SILVA, J. R. A.; FREIRE-DE-LIMA, L.; FALCÃO, C. A. B.; PINTO, A. C.; ROSSI-BERGMANN, B.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* latex against *Leishmania amazonenses*. Parasitology International, p. 173-177, 2010.
- SOUZA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; FILHO, J. M. B.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.
- VAN DEN BERG, M. E. Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático. CNPq/PRU/MPEG, p.212, Belém, Brasil, 1993.
- VANDERLEI, M.F.; SILVA, M.S.; GOTTLIEB, H.E.; Braz-Filho, R. Iridoids and triterpenes from *Himatanthus phagedaenica*: the complete assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of two iridoid glycosides. Journal of Brazilian Chemical Society 2, p.51-55, 1991.
- VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; CROTTI, A. E. M. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. Química Nova, v. 31, n. 4, p. 840-853, 2008.

- VILEGAS, J. H. Y.; HACHICH, E. M.; GARCIA, M.;BRASILEIRO, A.; CARNEIRO, M. A. G.; CAMPOS, V. L. B. Antifungal compounds from Apocynaceae species. *Revista Latinoamericana de Química*, n. 23, p. 44-45, 1992.
- www.arvores.brasil.nom.br/florin/agonia.htm às 9 horas em 14 de março de 2011.