

ILMAR BERNARDO GRAEBNER

ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUIMICOS ISOLADOS DE PLANTAS
MEDICINAIS DA REGIÃO DO VALE DO PURUS NO ACRE (AMAZÔNIA)

TESE

UFSM

SANTA MARIA, RS - BRASIL

2003

ILMAR BERNARDO GRAEBNER

ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE PLANTAS
MÉDICINAIS DA REGIÃO DO VALE DO PURUS NO ACRE
(AMAZÔNIA).

TESE

UFSM
SANTA MARIA, RS - BRASIL
2003

**ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE
PLANTAS MEDICINAIS DA REGIÃO DO VALE DO
PURUS NO ACRE (AMAZÔNIA).**

por

ILMAR BERNARDO GRAEBNER

**Tese apresentada ao curso de pós-graduação em
química, área de química orgânica, da Universidade
Federal de Santa Maria (RS), como requisito parcial
para obtenção do grau de DOUTOR EM QUÍMICA.**

Santa Maria, RS, Brasil
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

a comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese intitulada

**ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE
PLANTAS MEDICINAIS DA REGIÃO DO VALE DO PURUS NO
ACRE (AMAZÔNIA).**

elaborada por

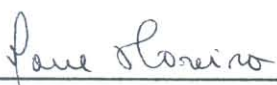
ILMAR BERNARDO GRAEBNER


como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em química

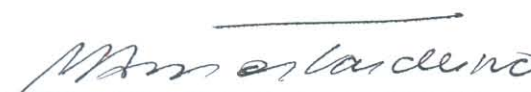
COMISSÃO EXAMINADORA:

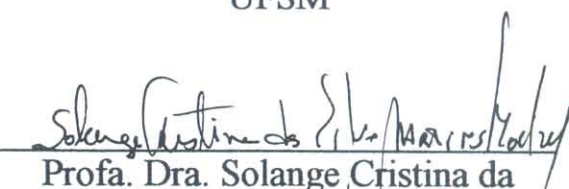

Prof. Dr. Ademir Farias Morel –

Orientador – UFSM


Prof. Dra. Jane de Jesus da
Silveira Moreira – FAG/PR


Prof. Dra. Ionara Irion Dalcol –
UFSM


Prof. Dr. Marco Aurélio
Mostardeiro – UNIJUÍ


Prof. Dra. Solange Cristina da
Silva Martins Hoelzel – UFSM

Santa Maria, 19 de dezembro de 2003

Dedico este trabalho
aos meus pais Bernardo e Helga que sempre estarão ao meu lado e
aos meus filhos: Marisa, Antonio Ítalo e Clareana.

Meus mais sinceros agradecimentos ao professor Ademir Farias Morel
pelo apoio e orientação por este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Na dificuldade de obter os resultados tive a felicidade de estar envolto de pessoas que reelevaram meu estímulo e a eles tenho meu profundo agradecimento. Contudo, como em todo caminho, existem as pessoas que ao tentarmos entendê-las, concluímos de que não convém compartilharmos egoísmos absurdos e, destas não tornarei meu comentário.

Agradeço aos reitores, pró-reitores, corpo administrativo e colegas da Universidade Federal do Acre, também em especial a COAPG e DCN, pelo crédito e contínuo incentivo e apoio muito importantes na distancia em que me encontrava.

Agradeço pela dedicação e préstimos durante estes sete anos, da Valéria e do Ademir na coordenação de pós-graduação em química.

Aos que foram colegas assim como dentre os demais: Eduardo, Mirian, Enrique, Gabriela, Marco Aurélio e Vinicius envolvido na obtenção de espectros de RMN . A Solange, Carla Porto, Claudia, pelos testes antimicrobianos; Adriana Flach e Euclésio Siminionato e pelos cromatogramas do CG.

Ao Wolmar Conrado, Sonia, Rafael, Carla, Janaína, Pablo, Elisa Flávio, Juliano, afilhada Djulia, Sélvio e Ingrid e familiares. Ao Leopoldo e madrinha Ingrid. Cláudio Martellet, Rosinha, Luciana, Marina, Osni Terencio, Jane, Osnizinho, Mateus. Pedro e Rosa Feltrin e familiares. Eron e Orlene (in memorian), Diogo e Ana Paula. Marcos Dessoy e Emília(in memorian). Sou grato também a Ana Paula e ao Gabriel de Andrade.

A minha irmã Ilva, Osvaldo, afilhada Sirlei, Alexandre, Lucas, Sueli, Joel e Luiza meu agradecimento pelo contínuo apoio.

Ao meu irmão Ildor, Ana, Frederico, Cristiane e Luciane minha gratidão pelo estímulo e amparo sempre disponível.

Agradecimentos a PICDT-CAPES pela concessão da bolsa que viabilizou a execução deste trabalho

RESUMO

TITULO: ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA REGIÃO DO VALE DO PURUS NO ACRE (AMAZÔNIA).

AUTOR: Ilmar Bernardo Graebner

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir Farias Morel.

O presente trabalho trata especialmente a extração, isolamento, identificação e atividade biológica de metabólitos secundários isolados dos tubérculos da espécie *Humirianthera ampla* Miers (Icacinaceae) e da casca do tronco da espécie *Himatanthus sucuuba* Spruce.(Apocynaceae)

Dos tubérculos da espécie *Humirianthera ampla*, os diterpenos Humirianthol (3,18:14,16-diepoxi-3,15-dihidroxi-7-pimareno-17,6 β -olida) (**18**) e acrenol (15,16-diol-3 β ,20-epóxi-3 α -hidroxi-9-epi-7 -pimareno-19,6 β -olida) (**19**) isolados e identificados em um trabalho anterior, tiveram seus centros estereogênicos definidos através da técnica de difração de raios X e pelo método Horeau. Ainda foram isolados e identificados os constituintes β -amirina (**37**), β -sitosterol glicosilado (**45**), plumerídeo glicosilado (**32**) e ácido glicoplumérico (1 β -O- β -D-glicopiranosilplumérico) (**33**).

Da casca da espécie *H. sucuuba*, foram isolados uma mistura de cinamato de α amirina e cinamato de α lupeol, allamandina A (**43**), plumericina (**44**) e o plumerídeo glicosilado (**32**).

As estruturas dos compostos isolados foram elucidadas por análises espectroscópicas e espectrométricas como: RMN ^1H , RMN ^{13}C (COSY, DEPT 135 $^\circ$, DEPT 90 $^\circ$, HMQC, HMBC e NOESY), EM-ESI, Infravermelho, difração de raios X, reações de derivatizações e comparação com dados existentes na literatura.

Os derivados acetilados dos diterpenos humirianthol (**18**) e acrenol (**19**), apresentaram considerável atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Sacharomyces cerevisiae*

A fração clorofórmica da casca da *Himatanthus sucuuba* apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Salmonella setubal*, e antifúngica contra *Candida albicans* e *Sacharomyces cerevisiae*. A mesma atividade foi observada para os metabólitos allamandina A (**43**) e plumericina (**44**), ambos metabólitos isolados desta fração.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Tese de Doutorado em Química
Santa Maria,RS, dezembro de 2003.

ABSTRACT

TITLE: ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA REGIÃO DO VALE DO PURUS NO ACRE (AMAZÔNIA).

AUTHOR: Ilmar Bernardo Graebner

ACADEMIC ADVISOR: Prof. Dr. Ademir Farías Morel

The present work describes especially the extraction, isolation and identification of the chemical compounds of the tuber of *Humirianthera ampla* Miers (Icacynaceae) and the barks of the *Himatanthus sucuuba* Spruce (Apocynaceae).

From the tuber of *H. ampla*, the diterpenes Humirianthol (3,18:14,16-diepoxi-3,15-dihydroxi-7-pimaren-17,6 β -olida) (**18**) and acrenol (15,16-diol-3 β ,20-epoxi-3 α -hydroxi-9-epi-7-pimaren-19,6 β -olida) (**19**), isolated and identified in the master studies, have their stereogenic centers defined at X ray technique and, at Horeau method. They were also isolated and identified β -amyrin (**37**), sitosterol glycoside (**45**), plumeride (**32**) and glicoplumeric acid (1 β -O-D-Glicopyranosilpluméric) (**33**).

From the barks of the *H. sucuuba* Wood were isolated one mixture the α -amyrin cinamate and α -lupeol cinamate, and allamandine-A (**43**), plumericin (**44**), and plumericin at to plumeride glycoside (**32**).

The structures of the isolated compounds were established by spectral analysis (^1H RMN, ^{13}C RMN, COSY, DEPT 135 $^\circ$, DEPT 90 $^\circ$, HMQC, HMBC e NOESY), Infrared, X ray and comparisons among closely related compounds.

Acetate derivatization from the diterpenes humirianthol and acrenol exhibited antifungic activity against *Candida albicans* and *Sacharomyces cervisiae*.

The chloroformic fraction from the barks of the *Himatanthus sucuuba* exhibits activity against *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Salmonella setubal* and antifungic activity against *Candida albicans* e *Sacharomyces cervisiae*. The allamandin A (**43**) and plumericin (**44**) exhibited activity equal to the chloroformic fraction.

SUMÁRIO

1 Introdução	01
1.1 Objetivos do trabalho	03
2 Revisão bibliográfica	04
2.1 Família Icacinaceae	04
2.1.1 Descrição do gênero <i>Humirianthera</i>	05
2.1.2 Estudos químicos realizados com a espécie e Gêneros similares	06
2.2 Família Apocynaceae	09
2.2.1 Estudos realizados com o Gênero <i>Himatanthus</i> e similares	10
3 Apresentação e discussão dos resultados	13
3.1 Estudo dos constituintes químicos de <i>Humirianthera Ampla</i> (Icacinaceae)	13
3.1.1 Definição da configuração absoluta de C-15 da estrutura do humirianthol 18 através do método Horeau	14
3.1.2 Definição da configuração relativa dos centros quirais do humirianthol através de estudos de Raios-X de 35	16
3.1.2.1 Correlações observadas no espectro NOESY de 18	17
3.1.3 Definição da configuração relativa dos centros quirais do metabólito acrenol (19) através de estudos de Raios-X do derivado acetilado 36	18
3.1.3.1 Correlações observadas no espectro NOESY de 19	18
3.1.4 Estudo da fração hexânica de <i>Humirianthera ampla</i>	21
3.1.4.1 Isolamento e identificação do metabólito AI-7 (37)	21
3.1.4.1.1 RMN ¹ H de AI-7 (37)	21
3.1.4.1.2 RMN ¹³ C de AI-7 (37)	22
3.1.4.1.3 Espectro RMN 2D COSY de AI-7(37)	25
3.1.4.1.4 Espectro RMN 2D HMQC AI-7 (37)	26
3.1.5 Estudo da fração acetato de etila de <i>H. ampla</i>	29
3.1.5.1 Isolamento e identificação do metabólito AI-2 (38)	29
3.1.5.1.1 Análise do espectro de absorção no Infravermelho de AI-2 (38)	29
3.1.5.1.2 Estudo de RMN ¹ H de AI-2 (38)	29
3.1.5.1.3 Estudo de RMN ¹³ C de AI-2 (38)	30
3.1.5.1.4 Estudo do espectro COSY de AI-2 (38)	32
3.1.6 Estudo da fração butanólica de <i>H. ampla</i>	36
3.1.6.1 Determinação estrutural do metabólito codificado como Ha-2 (32)	36
3.1.6.1.1 Análise do espectro de absorção no Infravermelho de Ha-2 (32)	36
3.1.6.1.2 Análise do espectro de massas de Ha-2 (32)	37
3.1.6.1.3 Estudo de RMN ¹ H de Ha-2 (32)	37
3.1.6.1.4 Estudo de RMN ¹³ C de Ha-2 (32)	39
3.1.6.1.5 Estudo do espectro DEPT 135 ⁰ de Ha-2 (32)	40
3.1.6.1.6 Estudo do espectro DEPT 90 ⁰ de Ha-2 (32)	41
3.1.6.1.7 Análise do espectro COSY. ¹ H- ¹ H de Ha-2 (32)	41
3.1.6.1.8 Análise do espectro HMQC de Ha-2 (32)	43
3.1.6.1.9 Análise do espectro HMBC de Ha-2 (32)	44
3.1.6.1.10 Análise do espectro NOESY de Ha-2 (32)	51
3.1.6.2 Ha-2 acetilado (39)	53
3.1.6.2.1 Análise estrutural através do RMN ¹ H de Ha-2 acetilado (39)	53
3.1.6.2.2. Análise estrutural através do RMN ¹³ C de Ha-2 acetilado(39)	54
3.1.6.3 Isolamento, identificação e determinação estrutural do metabólito Ha-1 (33)	56
3.1.6.3.1. Análise do espectro de massas de Ha-1 (33)	56
3.1.6.3.2. RMN ¹ H de Ha-1 (33)	57

3.1.6.3.3. Análise do espectro de RMN ¹³ C de Ha-1 (33)	58
3.1.6.3.4. Análise do espectro DEPT 135 ⁰ de Ha-1 (33)	59
3.1.6.4 Ha-1 Acetilado (40)	60
3.1.6.4.1. Estudo do espectro de RMN ¹ H de Ha-1 acetilado (40)	60
3.1.6.4.2. Estudo do espectro de RMN ¹³ C de Ha-1 acetilado(40)	62
3.1.6.4.3. Estudo do espectro de HMQC de Ha-1 acetilado(40)	63
3.1.6.5 Reação de metilação de Ha-1	65
3.1.6.5.1 Estudo de RMN ¹ H do metabólito Ha-1 metilado (32)	65
3.2 Estudo dos constituintes químicos da espécie <i>Himatanthus sucuuba</i> (Apocynaceae)	67
3.2.1 Estudo da fração hexânica de <i>Himatanthus sucuuba</i>	67
3.2.1.1 Estudo do espectro de RMN ¹ H de Hs- 4	67
3.2.1.2 Estudo do espectro RMN ¹³ C de Hs- 4	69
3.2.1.3 Estudo do espectro RMN 2D COSY de Hs-4	70
3.2.1.4 Estudo do espectro RMN 2D HMQC de Hs-4	70
3.2.2 Estudo da fração clorofórmica de <i>Himatanthus sucuuba</i>	73
3.2.2.1 Determinação estrutural do metabólito codificado como Hs-5 (43)	73
3.2.2.1.1 Análise do espectro de massas de Hs-5 (43)	73
3.2.2.1.2 Análise estrutural de Hs-5 (43) por RMN ¹ H	74
3.2.2.1.3 Análise estrutural de Hs-5 (43) por RMN ¹³ C	74
3.2.2.1.4 Análise dos espectros DEPT 135 ⁰ e DEPT 90 ⁰ de Hs-5	75
3.2.2.1.5 Análise do espectro COSY (¹ H- ¹ H) de HS-5 (43)	77
3.2.2.1.6 Análise do espectro de HMQC de Hs-5 (43)	78
3.2.2.1.7 Análise do espectro de HMBC de HS-5 (43)	79
3.2.2.1.8 Análise do espectro NOESY de Hs-5 (43)	81
3.2.2.1.9 Definição da configuração de C-3 de Hs-5 através do método de Horeau	84
3.2.2.2. Identificação estrutural do metabólito codificado como Hs-7 (44)	86
3.2.2.2.1 Análise do espectro de massas ESI de Hs-7 (44)	87
3.2.2.2.2 Análise do espectro de RMN ¹ H de Hs-7 (44)	87
3.2.2.2.3 Análise do espectro de RMN ¹³ C de Hs-7 (44)	89
3.2.2.2.4 Análise do espectro DEPT 135 ⁰ de Hs-7 (44)	90
3.2.2.2.5 Análise do espectro COSY de Hs-7 (44)	90
3.2.2.2.6 Análise do espectro HMQC de Hs-7 (44)	91
3.2.2.2.7 Análise do espectro de HMBC de Hs-7 (44)	91
3.2.2.2.8 Análise do espectro NOESY de Hs-7 (44)	92
3.3 Atividade antimicrobiana	95
4. Experimental	100
4.1 Instrumentos utilizados	100
4.2 Material e métodos cromatográficos	101
4.3 Material vegetal	102
4.3.1 Coleta do material da espécie <i>Humirianthera ampla</i>	102
4.3.2 Coleta do material da espécie <i>Himatanthus sucuuba</i>	104
4.3.3 Método Horeau	105
4.3.4 Acetilação de álcoois secundários e primários	106
4.3.5 Metilação do ácido carboxílico	106
4.3.6 Preparação de diazometano	106
4.4 Informações sobre as substancias estudadas	106
4.5 Atividade antimicrobiana	108
4.6 Teste de letalidade por <i>Artemia salina</i> (TLAS)	111
5. Conclusões	112
6. Referências bibliográficas	113

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1 Distribuição de alguns gêneros representativos da família Icacinácea distribuída nos quatro continentes	05
Figura 2 Arbusto de <i>Humirianthera ampla</i>	06
Figura 3 -Tubérculo de <i>H. ampla</i>	06
Figura 4 Estrutura de uma lactona	07
Figura 5 Foto de uma planta nova da espécie <i>Himatanthus sucuuba</i>	09
Figura 6 Reação de um álcool secundário com anidrido fenilbutírico racêmico	14
Figura 7 Regra de prioridade aplicada na regra de Horeau	15
Figura 8 Cromatograma do ácido fenilbutírico residual na forma de éster da reação de 18 com anidrido fenilbutírico	15
Figura 9 Estrutura obtida através do Raio X do humirianthol acetilado	16
Figura 10 Correlações observadas no experimento NOESY de 18	17
Figura 11 Espectro RMN 2D NOESY de AI-3 (18) em DMSO-d ₆ a 400 MHz	17
Figura 12 Correlações observadas no espectro NOESY de 19	19
Figura 13 Espectro de RMN 2D NOESY de AI-4 acetilado (19) em DMSO-d ₆ a 400MHz	19
Figura 14 Estrutura obtida pela difração de RAIOS X do acrenol acetilado (36)	20
Figura 15 Espectro de RMN ¹ H de AI-7 (37) em CDCl ₃ , 400MHz	21
Figura 16 Espectro de RMN ¹ H de AI-7 (37) em CDCl ₃ , 400MHz (expansão 0,8-2,4ppm)	22
Figura 17 Espectro de RMN ¹³ C de AI-7 (37) em CDCl ₃ , 100MHz	23
Figura 18 Espectro DEPT 135 ⁰ de AI-7 em CDCl ₃ , 100MHz	24
Figura 19 Espectro de DEPT 90 ⁰ de AI-7 em CDCl ₃ a 100MHz	24
Figura 20 Espectro COSY de AI-7 em CDCl ₃ a 400MHz	25
Figura 21 Espectro HMQC de AI-7 em CDCl ₃ a 400MHz	26
Figura 22 Espectro HMQC de AI-7 em CDCl ₃ , 400MHz (expansão 10,0-60,0 ppmx0,6-2,4ppm)	27
Figura 23 Espectro de Infravermelho de AI-2 (38) em pastilha de KBr	29
Figura 24 Espectro RMN ¹ H de AI-2 (38) em DMSO-d ₆ a 400MHz	30
Figura 25 Espectro RMN ¹³ C de AI-2 em DMSO-d ₆ a 100MHz.	31
Figura 26 Espectro RMN DEPT 135 ⁰ de AI-2 em DMSO-d ₆ a 100MHz.	31
Figura 27 Espectro RMN COSY de AI-2 em DMSO-d ₆ a 400MHz.	32
Figura 28 Espectro RMN COSY DE AI-2 em DMSO-d ₆ a 400MHz (expansão 0,5-2,5)	33
Figura 29 Espectro de absorção de Infra-Vermelho de Ha-2 (32)	36
Figura 30 Espectro de massa de baixa resolução EI de Ha-2 (32)	37
Figura 31 Espectro ¹ H de Ha-2 (32) em DMSO-d ₆ a 400MHz.	39
Figura 32 Espectro ¹³ C de Ha-2 em DMSO-d ₆ a 100MHz.	39
Figura 33 Espectro DEPT 135 ⁰ de Ha-2 em DMSO-d ₆ a 100MHz	40
Figura 34 Espectro DEPT 90 ⁰ de Ha-2 em DMSO-d ₆ a 100MHz	41
Figura 35 Correlações observadas no espectro COSY de Ha-2 (32)	42
Figura 36 Espectro COSY de Ha-2 em DMSO-d ₆ a 400MHz.	42
Figura 37 Espectro de HMQC de Ha-2 em DMSO-d ₆ a 400 MHz	43
Figura 38 Espectro HMQC de Ha-2 em DMSO-D ₆ a 400 MHz (expansão 2,0-4,5 X 35-85ppm)	44

Figura 39 Espectro HMBC de Ha-2 (32) em DMSO-d ₆ a 400 MHz (expansão 4,0-8,0ppm X 20-65ppm)	45
Figura 40 Espectro HMBC de Ha-2 em DMSO-d ₆ a 400 MHz. (expansão 1,0-5,5ppm X 65-115ppm)	46
Figura 41 Espectro HMBC de Ha-2 em DMSO-d ₆ a 400 MHz. (expansão 4,8-7,7ppm X 65-115ppm)	47
Figura 42 Espectro HMBC de Ha-2 em DMSO-d ₆ a 400 MHz (expansão 5,0-7,5 ppm X 125-175 ppm)	48
Figura 43 Espectro de HMBC de Ha-2 em DMSO-d ₆ a 400 MHz	49
Figura 44 Espectro NOESY de Ha-2 (32) em DMSO-d ₆ a 400 MHz	51
Figura 45 Espectro de RMN ¹ H e expansão de Ha-2 acetilado em CDCl ₃ a 400 MHz	53
Figura 46 Espectro de RMN ¹ H e expansão de Ha-2 acetilado em CDCl ₃ a 400 MHz	54
Figura 47 Espectro de RMN ¹³ C DE Ha-2 acetilado em CDCl ₃ a 100 MHz (expansão 166,0-171,0ppm)	55
Figura 48 Espectro de RMN ¹³ C DE Ha-2 acetilado em CDCl ₃ , a 400 MHz (expansão 14,0-21,1 ppm)	55
Figura 49 Espectro de massas ESI negativo de Ha-1 (33)	56
Figura 50 Espectro RMN ¹ H de Ha-1 em DMSO-d ₆ a 400 MHz	57
Figura 51 Espectro RMN ¹³ C de Ha-1 em DMSO-d ₆ a 100 MHz	58
Figura 52 Espectro de RMN ¹³ C de Ha-1 em DMSO-d ₆ a 100 MHz (expansão 127,8-174,0 ppm)	58
Figura 53 Espectro DEPT 135 ⁰ de Ha-1 em DMSO-d ₆ a 100 MHz	59
Figura 54 Espectro RMN ¹ H de Ha-1 acetilado em CDCl ₃ a 400 MHz	60
Figura 55 Comparação entre os espectros RMN ¹ H de Ha-1 e Ha-2 acetilados em CDCl ₃ a 400 MHz.	61
Figura 56 Comparação entre os espectros RMN ¹ H de Ha-1 e Ha-2 Acetilado	61
Figura 57 Comparação entre os espectros RMN ¹ H de Ha-1 e Ha-2 acetilado em CDCl ₃ a 400 MHz.	62
Figura 58 Espectro RMN ¹³ C de Ha-1 acetilado, comparado com a expansão da região de 167 a 179 ppm, em CDCl ₃ a 100 MHz	63
Figura 59 Espectro RMN 2D HMQC de Ha-1 acetilado em CDCl ₃ a 400 MHz	64
Figura 60 Reação de metilação com diazometano	65
Figura 61 Espectro de RMN ¹ H de Ha-1 metilado em DMSO-d ₆ a 400 MHz	66
Figura 62 Espectro de RMN ¹ H de Hs-4 em CDCl ₃ a 400 MHz	68
Figura 63 Espectro de RMN ¹ H expandido de Hs-4 em CDCl ₃ a 400 MHz	68
Figura 64 Espectro de RMN ¹³ C de Hs-4 em CDCl ₃ a 400 MHz	69
Figura 65 Espectro COSY de Hs-4 em CDCl ₃ a 400MHz	70
Figura 66 Espectro HMQC de Hs-4 em CDCl ₃ a 400MHz	71
Figura 67 Espectro de MASSAS de Hs-5 (43)	73
Figura 68 Espectro de RMN ¹ H de Hs-5 em DMSO-d ₆ a 400 MHz	74
Figura 69 Espectro RMN de ¹³ C de Hs-5 (43) em DMSO-d ₆ a 100MHz	75
Figura 70 Espectro RMN DEPT 135 ⁰ de Hs-5 em DMSO-d ₆ a 100MHz	76

Figura 71 Espectro RMN DEPT 90 ^o de Hs-5 em DMSO-d ₆ a 100MHz	76
Figura 72 Espectro COSY de Hs-5 em DMSO-d ₆ a 400MHz	77
Figura 73 Espectro HMQC de Hs-5 em DMSO-d ₆ a 400 MHz	78
Figura 74 Espectro HMBC de Hs-5 em DMSO-d ₆ a 400MHz (expansão 1,5-4,0 ppm X 20,0-175,00)	79
Figura 75 Espectro HMBC de HS-5 em DMSO-d ₆ a 400MHz (expansão 4,5-7,5 X 40,0-180,0).	80
Figura 76 Espectro HMBC de Hs-5 em DMSO-d ₆ a 400MHz	81
Figura 77 Espectro NOESY de Hs-5 em DMSO-d ₆ a 400MHz	82
Figura 78 Cromatograma do ácido fenilbutírico residual	84
Figura 79 Estrutura e configuração 2D proposta para allamandina-A (43)	85
Figura 80 Reação de Hs-5 na presença de piridina e ácido acético	86
Figura 81 Espectro de massas ESI de Hs-7 (44)	87
Figura 82 Espectro de RMN ¹ H de Hs-7 em CDCl ₃ a 400MHz	88
Figura 83 Espectro RMN ¹³ C de Hs-7 em CDCl ₃ a 100 MHz	89
Figura 84 Espectro DEPT 135 ^o de Hs-7 em CDCl ₃ a 100 MHz	89
Figura 85 Espectro COSY de Hs-7 em CDCl ₃ a 400 MHz	90
Figura 86 Espectro HMQC de Hs-7 em DMSO-d ₆ a 400 MHz	91
Figura 87 Espectro HMBC de Hs-7 em CDCl ₃ a 400 MHz	92
Figura 88 Espectro NOESY de HS-7 em CDCl ₃ a 400MHz	93

ÍNDICE DE ESQUEMAS

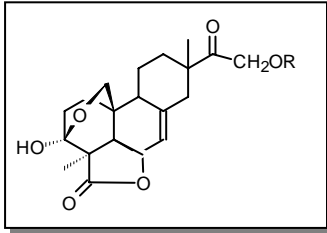
FLUXOGRAMA 1 Rota de análise fitoquímica dos tubérculos da <i>H. ampla</i>	103
FLUXOGRAMA 2 Rota de análise fitoquímica dos tubérculos da <i>H.sucuuba</i>	104

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Principais deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de β -amirina comparativo, obtidos em CDCl_3 através de RMN 400 MHz	28
Tabela 2 Principais deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de β -sitosterol glicosilado comparado com a literatura DMSO- d_6 a 400MHz e 100 MHz	35
Tabela 3 Deslocamentos químicos ^1H e ^{13}C de Ha-2 em DMSO- d_6 , 400MHZ	52
Tabela 4 Principais deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de cinamato de alfa amirina e cinamato de lupeol, comparativo com a literatura (CDCl_3 a 400MHz)	72
Tabela 5 Deslocamentos químicos ^1H e ^{13}C de Hs-5 (43) DMSO- d_6 , a 400 MHz	83
Tabela 6 Deslocamentos químicos ^1H E ^{13}C DE Hs-7 em CDCl_3 A 400MHz	94
Tabela 7-Atividade antimicrobiana diante frações, metabólitos e derivados dos metabólitos da <i>Humirianthera ampla</i>	97
Tabela 8-Atividade antimicrobiana diante frações, metabólitos e derivados dos metabólitos da <i>Himatanthus sucuuba</i>	98
Tabela 9 – Teste de letalidade por Artemia salina(TLAS)	99

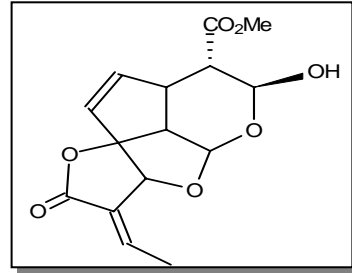
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CG	Cromatografia gasosa
COSY	Correlated spectroscopy
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO-d_6	Dimetil sulfóxido deuterado
EI	Ionização eletrônica
EM	Espectrometria de massas
EtOH	Etanol
ev	Elétron-volt
FAB	Fast atom bombardment
HETCOR	Heteronuclear Chemical Shift Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple-bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
$^nJ_{\text{CH}}$	Constante de acoplamento de ordem n entre carbono e Hidrogênio.
$^nJ_{\text{HH}}$	Constante de acoplamento de ordem n entre Hidrogênios.
m	Múltiplo
Me	Metil
MHz	Mega Hertz
m/z	Relação massa/carga
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celcius
pág.	Página
ppm	Parte por milhão
$\text{RMN } ^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
$\text{RMN } ^1\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbonos
Rf	Fator de retenção
s	singleto
t	tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UV	ultravioleta
V/V	Volume/volume
ESI	
CC	Cromatografia em coluna
P.A.	Para Análise

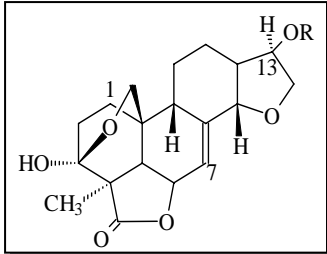


20 R=H Annonalida AI-1

41 R=Ac Annonalida acetilada.

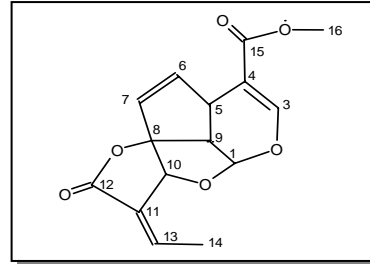


(43) Hs-5 Allamandina-A

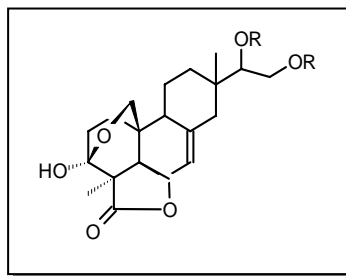


18 R=H Humirianthol AI-3

35 R=Ac Humirianthol acetilado.



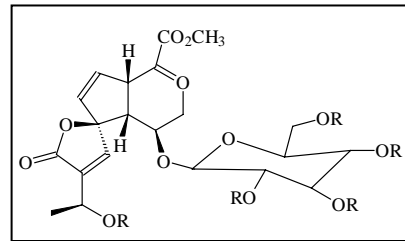
(44) Hs-7 Plumericina A



19 R=H Acrenol AI-4.

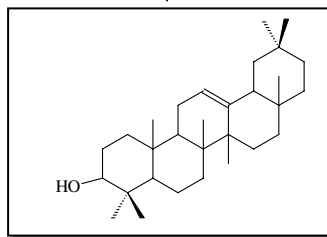
36 R=Ac Acrenol acetilado

42 R= Acrenol cetal.

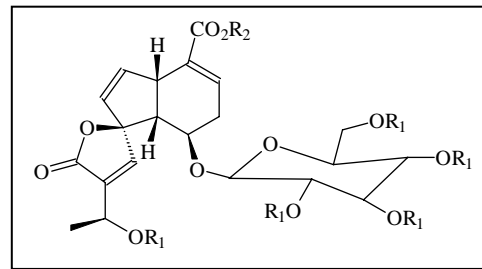


32 R=H Plumerideo glicosilado Ha-2.

39 R=Ac Plum. glic. acetilado



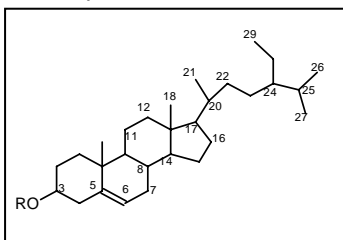
37 β -Amirina AI-7.



33 R₁=R₂=H Ácido glicoplumérico Ha-1.

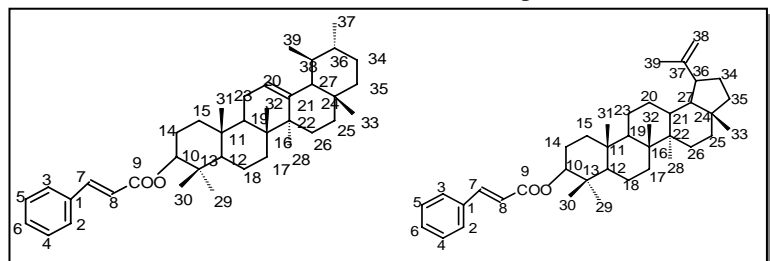
32 R₁=H R₂=Me Plum.glicosilado Ha-2

40 R₁=Ac R₂=H Ác. Glico plumér. Acetil.



17 R=H β - Sitosterol AI-2

45 R=Glic. β - Sitosterol glicosilado



Hs4 Cinamato de α -amirina + cinamato de lupeol.

1 Introdução.

Após a descoberta do taxol, e de sua atividade contra alguns tipos de câncer, associada ao insucesso da síntese orgânica na procura de medicamentos para a cura de doenças de nossa época, a comunidade científica internacional voltou a valorizar a natureza como uma fonte alternativa de substâncias com esse potencial. Substâncias obtidas da natureza podem desempenhar um papel importante na medicina moderna, como: i) fornecer medicamentos difíceis de serem produzidos por síntese, ou que sua síntese seja inviável economicamente, como é o caso dos glicosídeos cardiotônicos obtidos da *digitalis*, do antimalárico artemisinina, isolada de *Artemisia annua*¹, e do próprio taxol, isolado de *Taxus brevifolia*^{2,3}, ii) fornecer estruturas que não apresentem atividade biológica, mas que possam ser transformadas em substâncias bioativas, através de reações químicas ou bioquímicas, como no caso da transformação da bacatina em taxol, iii) fornecer estruturas interessantes como modelos para síntese em laboratório de medicamentos que apresentem atividades semelhantes às originais, como por exemplo, a transformação da cocaína em procaína⁴, iv) fornecer substâncias que apresentem algum tipo de atividade, mas que possam ser ligeiramente modificadas em substâncias mais ativas, e em alguns casos, menos tóxicas, como por exemplo, algumas variações da molécula da morfina⁵.

Uma estimativa mundial é de que 80% da população dos países, principalmente os subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, são quase completamente dependentes da medicina caseira, utilizando-se de plantas para suas necessidades primárias de saúde⁶. O Brasil, considerando-se principalmente os seus três principais Biomas, como a Floresta Amazônica, a Mata Atlântica e o Cerrado, podendo-se mencionar ainda a Caatinga Nordestina, é o detentor da maior parte desta fonte de produtos naturais, onde, possivelmente, substâncias de alto valor medicinal podem ser encontradas, e que ainda esperam pelas suas descobertas. Segundo Schultes⁷, a vegetação amazônica é extraordinariamente rica em espécies biodinâmicas, e que até o momento são escassamente conhecidas e exploradas em suas múltiplas potencialidades. Esta enorme potencialidade tem originado um grande interesse, principalmente por pesquisadores do dito primeiro mundo, em nossa flora e fauna.

O que se observa na literatura especializada, através de publicações em periódicos da área e em apresentação de resultados em simpósios e congressos internacionais, é o estudo por grupos de países estrangeiros de várias espécies nativas do Brasil, reconhecidas pelos povos indígenas ou por caboclos como medicinais, sem nenhuma citação de algum tipo de interação científica com grupos de pesquisa nacionais. Muitos destes trabalhos geram registros de patentes, sem benefício algum para o país de

onde o material foi coletado. Com esta preocupação, juntamente à justificativa de isolamento de novas substâncias naturais com atividade biológica, para este trabalho foram selecionadas plantas da Amazônia, utilizadas pela população como medicinais para uma série de enfermidades.

Por pertencer ao quadro de professores da Universidade Federal do Acre, o autor deste trabalho selecionou plantas desta região, pois há a pretensão de continuar, na instituição, com esta linha de pesquisa.

O núcleo de pesquisa em produtos naturais da UFSM (NPPN) vem, ao longo dos anos, contribuindo para o desenvolvimento da química de produtos naturais, através do isolamento, identificação estrutural, atividade biológica, e mais recentemente, síntese de produtos naturais isolados de plantas medicinais do Rio Grande do Sul. Esta pesquisa tem resultado em dissertações de mestrado, teses de doutorado, trabalhos de iniciação científica, participação em congressos e simpósios nacionais e internacionais, além de publicações em periódicos nacionais e internacionais⁸⁻¹².

Este trabalho, o primeiro realizado com plantas medicinais da Amazônia pelo grupo, trata-se de um estudo de isolamento e identificação estrutural de constituintes químicos das espécies *Humirianthera ampla* (Miers) da família Icacinaceae e *Himatanthus sucuba* (Woodson) da família Apocynaceae.

1.1 Objetivos do trabalho:

-Determinar as configurações relativas e/ou absolutas dos centros estereogênicos de metabólitos isolados das espécies *Humirianthera ampla* (Miers) da família Icacinaceae e *Himatanthus sucuuba* (Woodson) da família Apocynaceae, através de difração de raios-X, método de Horeau e RMN de ^1H (NOESY).

-Isolar, na forma pura, metabólitos secundários constituintes das espécies *Humirianthera ampla* e *Himatanthus sucuuba*, com o auxílio de técnicas cromatográficas.

-Identificar estruturalmente os metabólitos puros isolados das espécies em estudo, principalmente através de técnicas de RMN uni- e bidimensionais, mono e heteronucleares e espectrometria de massas (EI e ESI).

-Determinar e comparar as atividades biológicas, neste caso as atividades antibacterianas e antifúngicas, dos extratos brutos obtidos, das frações, dos metabólitos isolados puros das espécies em estudo, e de alguns derivados.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Família Icacinaceae.

O gênero *Humirianthera* pertence à família Icacinaceae, que segundo Cronquist¹³, se insere na ordem Celastrales, embora outros autores preferiram colocá-la, ou como Santalales¹⁴, como Sapindales¹⁵ ou como Rhamnales¹⁶.

O termo provém do latim Icacinaceae, derivado do gênero *Icacina*.

A família Icacinaceae compreende cerca de sessenta gêneros e aproximadamente quatrocentos e cinquenta espécies pantropicais, com pouca representação nas zonas temperadas. Na América, ocorrem reconhecidamente doze gêneros, dos quais oito podem ser encontrados na flora brasileira. O centro de dispersão das espécies americanas está situado na Amazônia, sendo que algumas espécies passaram a ser encontradas no norte do México¹⁷.

Os oito gêneros encontrados no Brasil são: *Citronella*, *Dendrobangia*, *Discophora*, *Emmotum*, *Humirianthera*, *Leretia*, *Pleurisanthes* e *Poraqueiba*.

Algumas espécies de plantas pertencentes aos gêneros *Poraqueiba*, *Humirianthera* e *Citronella*, são cultivadas no Brasil. Os tubérculos, bastante volumosos, de plantas do gênero *Humirianthera* são ricos em fécula, de onde se extrai amido, porém é tóxico e tem de ser lavado para eliminação de toxinas, antes de ser utilizado¹⁸. A espécie *Citronella gongonha*, do gênero *Citronella*, é utilizada na América do Sul como substituinte do chá-mate. De algumas espécies pertencentes ao gênero *Poraqueiba*, no Pará, são extraídos óleos e seus frutos são comestíveis¹⁹.

Geralmente são árvores, arbustos ou lianas, sendo que espécies pertencentes aos gêneros *Humirianthera*, *Leretia* e *Pleurisanthes*, apresentam-se como lianas de grande porte. As folhas são alternas, simples, sem estípulas, e podem ser glabras ou pilosas. As flores, unissexuadas ou hermafroditas, são dispostas em inflorescências terminais ou laterais (axilar, supra-axilar, extra-axilar) e, em geral, são articuladas ao pedicelo abaixo do cálice, que é curto, com sépalas imbricadas, livres ou concrecidas, entre si. As pétalas, geralmente cinco, são livres entre si. Possuem cinco estames livres entre si, alternados com as pétalas, eretos, com filetes geralmente carnosos, cilíndricos ou comprimidos, com ou sem pêlos; anteras dorsifixas ou basifixas, com quatro lóculos, rimosos. Em geral, ovário súpero, unilocular, com dois óvulos pendulos, colaterais, anátropos, em cada lóculo. Um estilete, freqüentemente acompanhado de rudimentos, curto ou longo, terminal mais ou menos excêntrico. Estigma capitado ou discóide. Fruto drupáceo, com epicarpo carnosos, geralmente oleaginoso, e endocarpo duro, lenhoso. Apresentam sementes com

endosperma carnosos, embrião muito reduzido, localizado, no ápice da semente ou bem desenvolvido, geralmente, com eixo radículo-hipocótilo longo²⁰.

A figura 1, a seguir, mostra alguns gêneros representativos da família Icacinaceae.

2.1.1 Descrição do gênero *Humirianthera*

O gênero *Humirianthera* apresenta as seguintes espécies: *Humirianthera ampla* (Miers); *H. crispula* (Howard); *H. duckei* (Huber); e *H. rupestris* (Ducke)²¹.

A espécie *Humirianthera ampla* é um arbusto comum na Amazônia (Figuras 2 e 3), onde é conhecido popularmente como mairá, mairã, surucuína ou surucucuína, e se distingue de outras espécies da família Icacinaceae por possuir um conetivo alargado, o qual se estende em laminas triangulares semelhantes a uma ponta de lança e tendo na base de duas asas as lojas da antera. Tem como centro de dispersão a Amazônia brasileira, e como utilidade, a aplicação do sumo como medicamento antifúngico²⁰. A massa obtida dos tubérculos, após intensa lavagem, é comestível¹⁸.

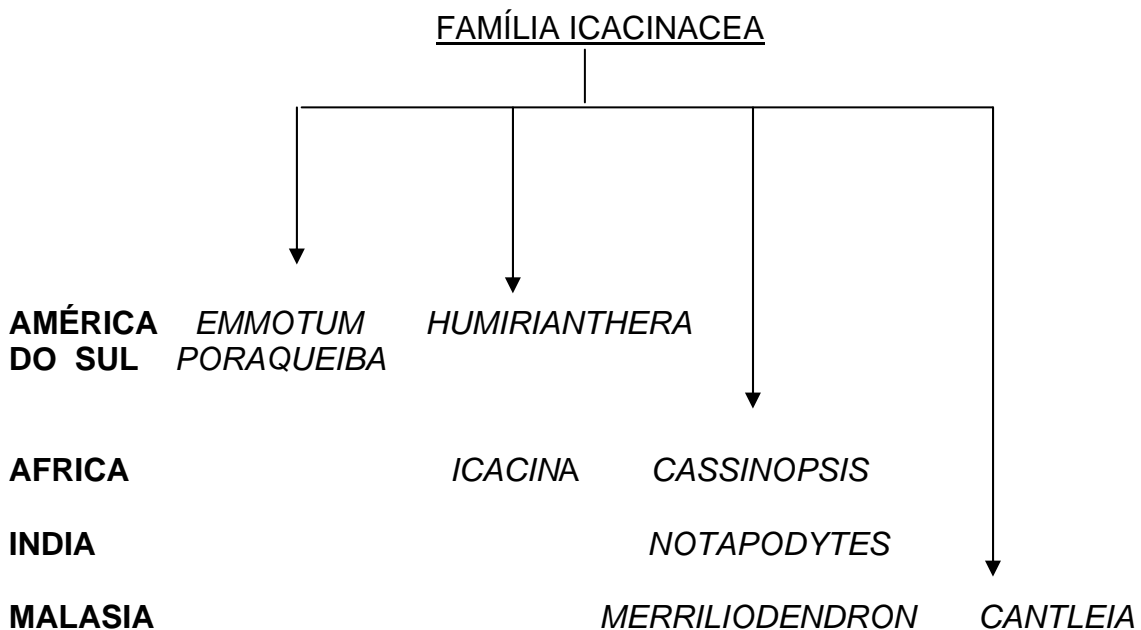


Figura 1 Distribuição de alguns gêneros representativos da família Icacinácea distribuídos nos quatro continentes.



Figura 2 - Arbusto de *Humirianthera ampla*



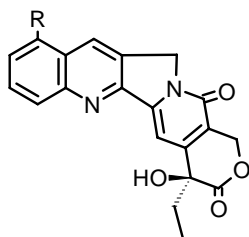
Figura 3 -Tubérculo de *H. ampla*

2.1.2 Estudos químicos realizados com a espécie e gêneros similares

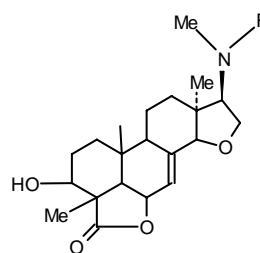
Algumas espécies pertencentes à família Icacinaceae são conhecidas por serem constituídas de metabólitos com atividade antitumorais, como os alcalóides camptotecina (**1**) e 9-metoxicamptotecina (**2**), isolados da espécie *Nothapodytes foetida*, da Índia²²⁻²⁴ e de *Merriliodendron megacarpun*, espécie encontrada na Malásia²⁵.

Sesquiterpenos aromáticos, como as emmotinas A (**3**), B(**4**), C(**5**) e D(**6**) respectivamente, foram isolados de *Emmotum nitens*, espécie coletada em Diamantina, MG²⁶.

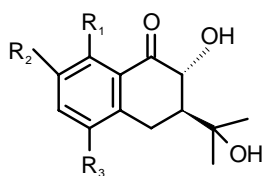
Das espécies *Icacina claenssensis* e *I. guesfeldti* foram isolados os alcalóides icaceína (**7**), N-metilicaceína (**8**) e icacina (**9**)^{27,28} além do metabólito denominado de icacinol²⁹ (**10**), também isolado e identificado em várias outras espécies do gênero *Humirianthera*.



- 1** R=H camptotecina
2 R=OMe 9-metoxicamptotecina

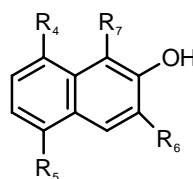


- 7** R=Me icaceína
8 R=H N-metilicaceína



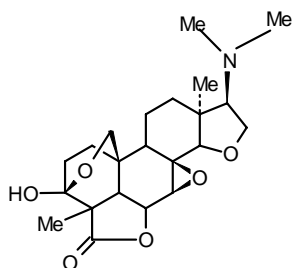
3 R₁=CH₂OMe
R₂=H R₃=Me (**emotina A**)

4 R₁=CH₂OMe
R₂=H R₃=CH₂OH (**emotina B**)

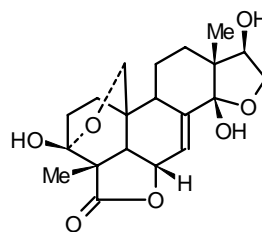


5 R₄= OH R₅=Me
R₆=CH(CH₃)₂ R₇= OH (**emotina C**)

6 R₄= OH R₅=Me
R₆=CH(CH₃)₂ R₇= OH (**emotina D**)



9 icacina



10 icacinol

Além de alcalóides, compostos diterpenóides foram isolados de espécies do gênero *Icacina*, da África, e de espécies do gênero *Humirianthera*, da Amazônia. Em ambos os gêneros, foram encontrados diterpenos pimaranos, com sistemas de anéis A-B similares e, em comum, uma lactona na estrutura (Figura 4).

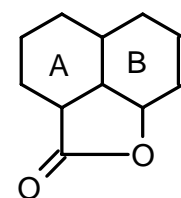
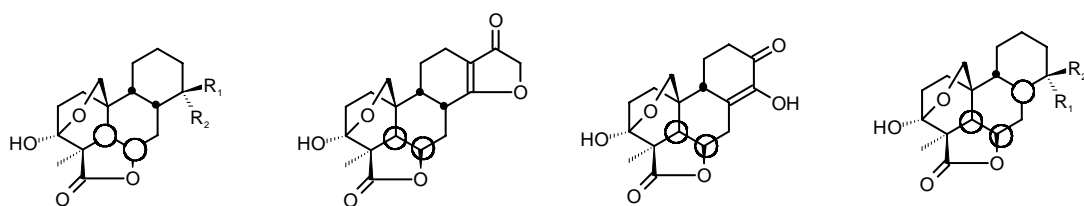


Figura 4

Em 1981, Zoghbi e colaboradores, estudaram as espécies *Humiriantheras ampla* e *H. rupestris*, de onde isolaram e identificaram vários metabólitos secundários^{30,31}. As substancias isoladas foram classificadas como diterpenóides γ -lactônicos, com estruturas contendo entre dezessete e dezenove carbonos, denominados de humiriantenolídeos A,B,C,D,E e F (**11-16**) respectivamente, além de β -sitosterol (**17**).



11 $R_1 + R_2 = O$
humiriantenolídeo (A)

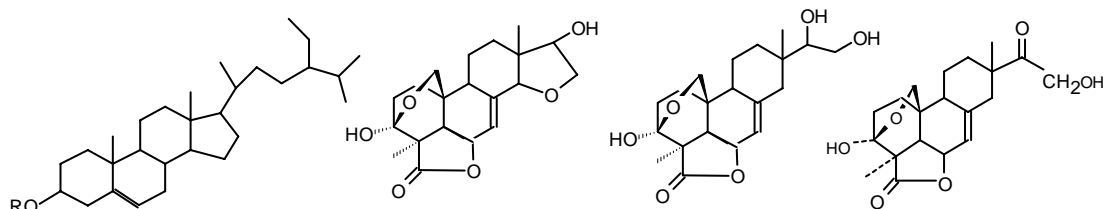
13 (C)

14 (D)

15 $R_1 + R_2 = O$
humiriantenolídeo (E)

12 $R_1 = H$ $R_2 = OH$
humiriantenolídeo (B)

16 $R_1 = H$ $R_2 = OH$
humiriantenolídeo (F)



17 $R=H$ sitosterol
38 $R=Glic$

18 humirianthol

19 acrenol

20 annonalida

Em 1998, em uma primeira etapa deste trabalho, os diterpenos humirianthol (**18**), acrenol (**19**) e annonalida (**20**) foram isolados da espécie *Humirianthera ampla*³². Os dois primeiros foram inéditos, enquanto que a annonalida tinha sido isolada anteriormente da *Annona coriacea*^{33,34}. A identificação estrutural das três substâncias foram discutidas exaustivamente através das análises de ressonância magnética nuclear^{32,35}.

β -Sitosterol glicosilado (**38**) (Sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo) exibiu atividade antinociceptiva para o modelo de dor induzida pela injeção intraplantar de formalina nas duas fases⁶³.

⊗ = Hidrogenio para cima do plano ○ = Hidrogenio para dentro do plano

2.2 Família Apocynaceae

A família Apocynaceae compreende cerca de 200 gêneros com mais de 2000 espécies de distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo o mundo. São plantas de hábito variado, ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras, na maioria latescentes, que vivem tanto nos campos como nas matas. Tem folhas em geral opostas, até opostas cruzadas e verticiladas, com estípulas rudimentares, inteiras. Flores pequenas e também grandes e vistosas, tipicamente pentâmeras, hermafroditas, diclamídeas. Corola perfeitamente gamopétala, infundibuliforme ou hipocrateriforme, de tubo longo. Androceu formado por cinco estames epipétalos, em geral de filetes curtos, alternos com os lobos da corola e apostos ao estigma. Ovário súpero bicarpelar e bilocular, com muitos óvulos. Carpelos separados, com um só estilete e um grande estigma em forma de carretel, e em geral com dois apículos. Fruto seco capsular ou indeiscente, ou então dois frutículos, secos, deiscentes. Sementes aladas (Aspidosperma), pilosas (Nerium) ou não (Allamanda)³⁶.

Segundo Engler³⁷, a espécie estudada neste trabalho tem a seguinte classificação: Reino: vegetal; Classe: Dicotiledônea; Sub-classe: Sympetalae; Ordem: Gentianales; Família: Apocynaceae; Espécie: *Himatanthus sucuuba*. (Figura 5).

Trata-se de uma árvore grande até 20 m de altura, de mata firme; folhas longo-pecioladas, ovais-oblongas; folículo geminado; flores grandes, brancas, aromáticas, dispostas em cimeiras terminais; frutos geminados, em forma de chifres; sementes aladas. Fornece madeira para construção civil, obras internas e carpintaria.

Figura 5 Foto de uma planta nova da espécie *Himatanthus sucuuba*.



A casca exsuda látex medicinal e venenoso, anti-helmíntico^{36,38}. Possui diversos nomes populares como: janaguba, sucuba, sucuúba, bellaco caspi.

O chá da casca da *Himatanthus sukuuba* é usado popularmente contra doenças como gastrites e úlceras estomacais, hemorróidas, anemia. O látex quando exsudado da casca é usado como emplastro contra pancadas; inflamações e na recuperação de ossos quando fraturados. Infusões, decocções e cataplasmas preparadas a partir da casca são usadas como vermífugos e laxativos e também contra artrites, tumores, furúnculos, hérnias e inchaços de pancadas.

2.2.1 Estudos realizados com o gênero *Himatanthus* e similares

O uso da casca do caule da *Himatanthus sukuuba* como medicinal na região tropical do Brasil é muito amplo. Porém são relativamente poucas as publicações encontradas referentes a esta espécie.

Em 1978, Perdue e colaboradores descreveram a análise fitoquímica do “bellaco caspi” coletado no Peru³⁹. Da fração hexânica obtida da planta, foi isolado a substância denominada de fulvoplumierina (**21**), que havia sido isolado anteriormente da casca da raiz da *Plumiera acutifolia*, da casca do caule da *Plumiera rubra*, e do molusco marinho *Nerita albicilla*⁴⁰. Este metabólito apresenta atividade antiinflamatória e é ativo no carcinoma epidermóide humano, além de ser antibacteriano. Tan e colaboradores, em 1991, estudaram e observaram que a fulvoplumierina é um composto ativo para inibir a transcriptase reversa no HIV-I com IC₅₀ com 45µg/mL⁴¹.

Endo e colaboradores, em 1994, isolaram de *H. sukuuba* dois pepsídeos, o ácido 2'-O-metilperlatólico (**22**) e ácido confluêntico (**23**), que apresentaram atividade inibidora da monoamina oxidase B. Foram isolados ainda o ácido β-dihidroplumericina (**24**), ácido vanílico, ácido *p*-coumárico, ácido *p*-hidroxibenzóico, plumericina (**25**) e isoplumericina (**26**)⁴².

Segundo Villegas *et al.* (1997), o extrato etanólico bruto seco da *Himatanthus sukuuba* do Peru, apresenta atividade cicatrizante, não apresentando toxicidade para matrizes prenhas e lactantes de ratas^{43,44}.

O cinamato de α-amirina (**27**), o cinamato de lupeol (**28**) e o acetato de lupeol (**29**) foram isolados da fração hexânica da *Himatanthus sukuuba* e apresentam atividade antiinflamatória⁴⁵. As α-amirinas e ácido cinâmico também foram isoladas da *Himatanthus articulata* por Hasegawa⁴⁶.

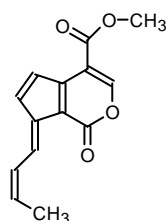
Da espécie *Himatanthus phagedaenica*, Vanderlei *et al.* (1991) isolaram e identificaram os iridóides plumericina, isoplumericina e allamandina (**30**), além dos iridóides glicosilados plumerídeo coumarato glicosilado (**31**), plumerídeo glicosilado (**32**), e sacarose (**34**)⁴⁷

Os metabólitos estigmasterol, sitosterol (**17**), cicloartenol, 3β-cinamato de α- amirina(**27**) + 3β-cinamato de β- amirina, 3β-acetato de β- amirina, 3β-cinamato de lupeol (**28**), 3β-acetato de lupeol (**29**) , ácido

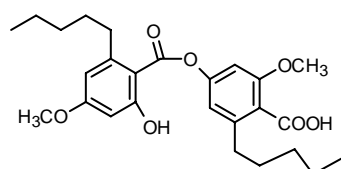
ursólico, metilmioinositol, ácido 1 β -O- β -D-glicopiranosilplumérico (33), 1 β -O- β -D-glicopiranosilplumérico (32), plumericina (25) e isoplumericina (26) foram isolados e identificados em 1998 de *Himatanthus articulata*⁴⁸

Iridóides lactônicos também são encontrados em algumas espécies do gênero *Plumeria*, como nas *Plumerias multiflora*, *P. acutifolia*, *P. lancifolia*, *P. acuminata* e *P. rubra*⁴⁹⁻⁵⁴. O iridóide plumerídeo glicosilado (32), isolado pela primeira vez da espécie *Plumeria acutifolia* por Boorsma, em 1894, assim como o ácido 1 β -O- β -D-glicopiranosilplumérico (33) tem sido encontrado em várias outras espécies do mesmo gênero.^{50,51,52}

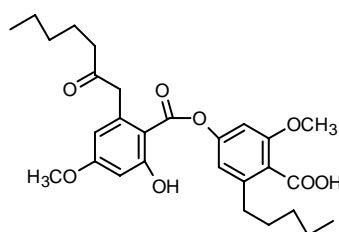
Das espécies *Allamanda cathartica* e *Allamanda schotti* foram isolados os iridóides allamandina, allamandicina, allamdina, plumericina e acetil allamandina⁵⁵⁻⁵⁷. Os iridóides possuem uma gama de bioatividades como por exemplo; atividade antifúngica, atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de inibir o desenvolvimento da *Micobacterium tuberculosis*-607⁴⁹.



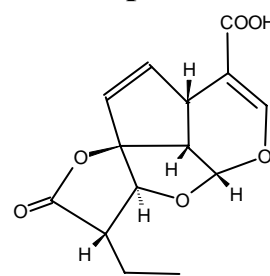
21 .
fulvoplumerina



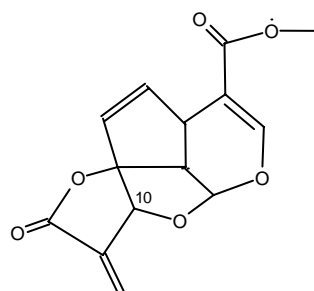
22
ácido 2'-O-metilperlatóico



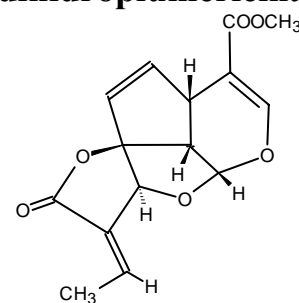
23
ácido confluêntico



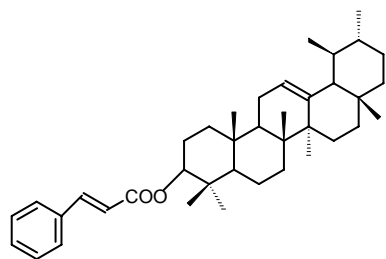
24
ácido β -dihidroplumericina



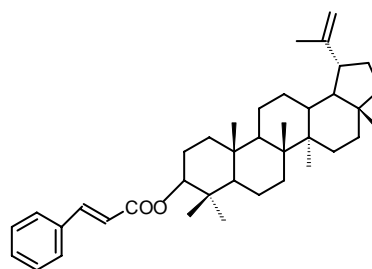
25
plumericina



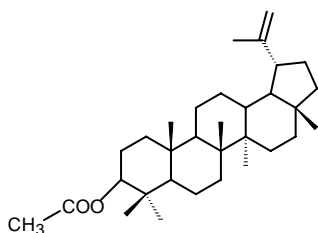
26
isoplumericina



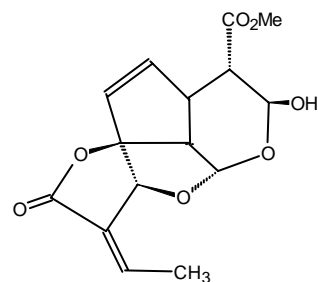
27
 α -amirina



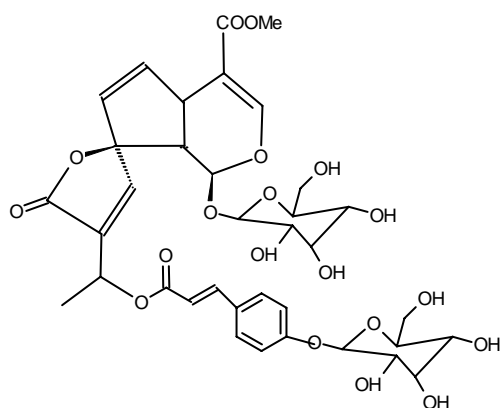
28
cinamato de lupeol



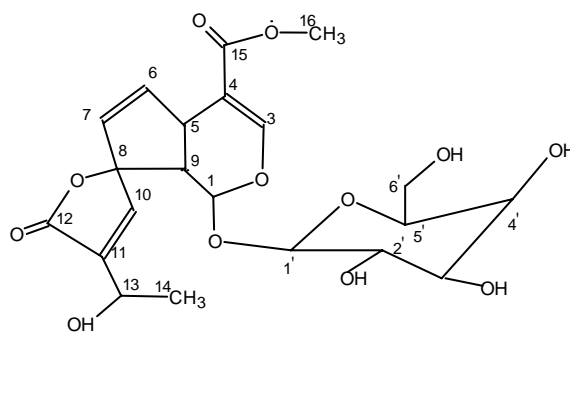
29
acetato de lupeol



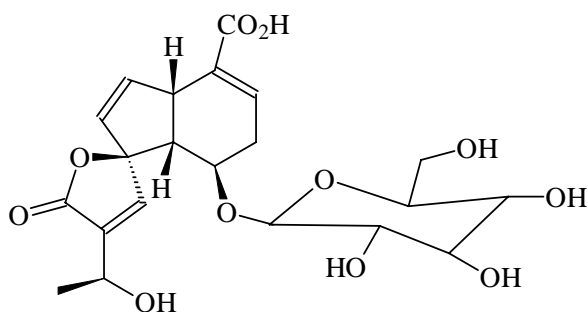
30
allamandina



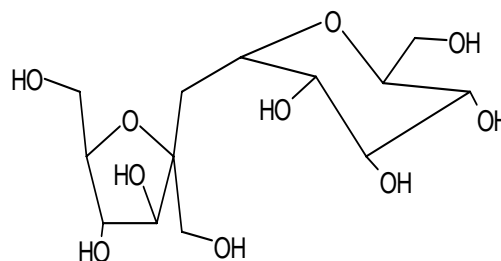
31
plumerídeo coumarato glicosilado



32
plumerídeo glicosilado



33
ácido 1 β -O- β -D-glicopiranosilplumérico



34
sacarose

3 Apresentação e discussão dos resultados.

As espécies *Humirianthera ampla* (Miers) da família Icacinaceae e a *Himatanthus sucuuba* (Woodson) da família Apocynaceae são plantas da região Amazônica conhecidas por surucuína e sucuba, respectivamente, e a ambas, nos costumes populares da região, são creditadas propriedades medicinais.

Em um estudo inicial, que resultou em uma tese de mestrado, o extrato etanólico bruto da espécie *Humirianthera ampla* foi estudada, com um interesse principal nos constituintes que deram reação positiva frente ao reagente de Dragendorff, com o intuito de isolamento de supostos alcalóides. Observou-se posteriormente que os metabólitos secundários responsáveis pela reatividade com Dragendorff tratavam-se de lactonas e não de alcalóides. Estas lactonas foram isoladas e suas estruturas identificadas³².

Como o estudo desta planta foi incompleto, pois muitas substâncias identificadas em CCD não foram isoladas, decidiu-se complementar este estudo com uma nova coleta de material. Desta vez, modificou-se o processo de extração, que em vez do procedimento ácido-base, realizou-se um fracionamento do extrato etanólico bruto em meio neutro, extração com solventes em ordem crescente de polaridade, como hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol, conforme mostra o fluxograma 1 da página 102. Os metabólitos isolados serão discutidos nesta parte do trabalho.

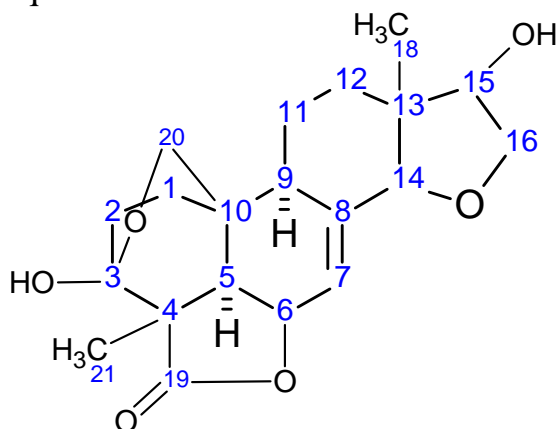
3.1 Estudo dos constituintes químicos de *Humirianthera ampla* (Icacynaceae).

No trabalho anterior de dissertação de mestrado, foram isolados e identificados três metabólitos da espécie *H. ampla*, sendo dois inéditos, que foram denominados humirianthol (3, 18 :14, 16 – diepoxi – 3, 15 - dihidroxi – 7- pimareno - 17, 6 β - olida) (18), e acrenol (15,16 – diol - 3 β ,20 – epóxi - 3 α - hidroxí – 9 – epi - 7 pimareno - 19,6 β - olida) (19), além do metabólitoannonalida (20). Este último havia sido isolado anteriormente da espécie *Annona coriaceae*. Os dois diterpenos (18 e 19) tiveram suas estruturas determinadas através de técnicas como a RMN de ¹H e ¹³C e EM. Dando continuidade a este estudo, em uma primeira fase deste trabalho de tese de doutorado, os metabólitos 18 e 19 tiveram suas estereoquímicas, absoluta (18) e relativa (19), determinadas. Para isso, utilizou-se de duas técnicas: método de Horeau e difração de Raios-X, associados aos experimentos NOESY. Além disso, estes metabólitos e alguns derivados foram posteriormente analisados quanto suas atividades antimicrobianas.

Para efeito de identificação numérica dos carbonos de **18** foi adotado a numeração utilizada na estrutura de difração de raios-X (figura 9) do produto acetilado (**35**).

3.1.1 Definição da configuração absoluta de C-15 da estrutura do Humirianthol (**18**) através do método do Horeau.

Apesar das técnicas utilizadas para a determinação estrutural destas substâncias permitirem elucidar a conectividade de todos os átomos na estrutura, não permitiram a determinação da configuração dos vários centros quirais de 18 e 19. Como na estrutura 18, um dos



18 - Humirianthol

centros quirais trata-se de um álcool secundário, objetivou-se, na continuidade deste trabalho, a determinação da configuração absoluta deste centro pelo método de Horeau.

O método de Horeau consiste na análise da razão enantiomérica do ácido fenilbutírico residual oriundo da reação de um álcool secundário quiral (ou amina primária quiral) com anidrido-2-fenilbutírico racêmico. Para isso, reage-se o álcool em estudo, em nosso caso **18**, com um excesso de anidrido fenilbutírico racêmico, conforme mostra a figura 6.

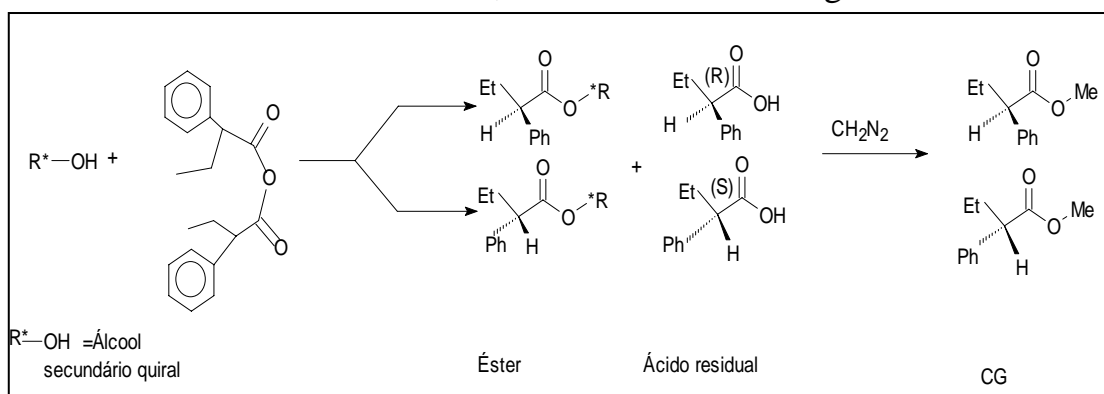


Figura 6 Reação de um álcool secundário com anidrido fenilbutírico racêmico.

O ácido fenilbutírico residual, na forma de seu éster metílico, é analisado através de CG enantiosseletiva. Após análise do cromatograma, observa-se o excesso de um dos ácidos enantioméricos. Com este dado, aplica-se a regra de Horeau adaptado para CG-enantiosseletiva⁵⁸, conforme a figura 7 abaixo.

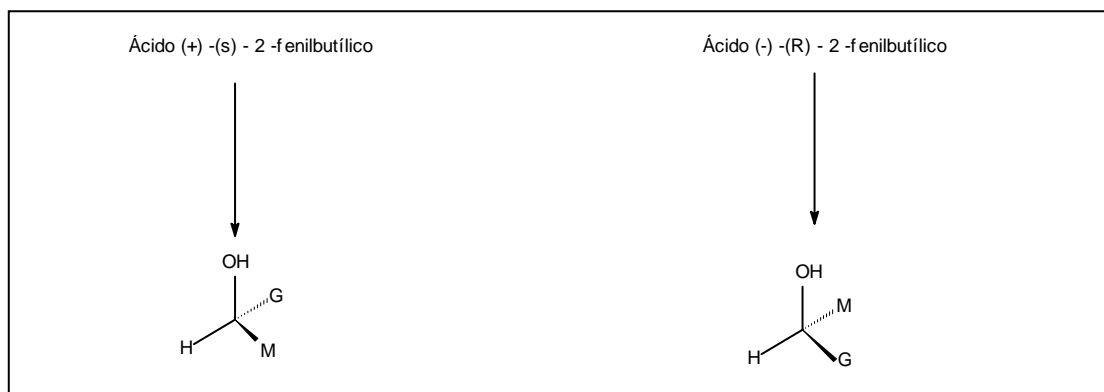


Figura 7 Regra de prioridades de acordo com o ácido residual.

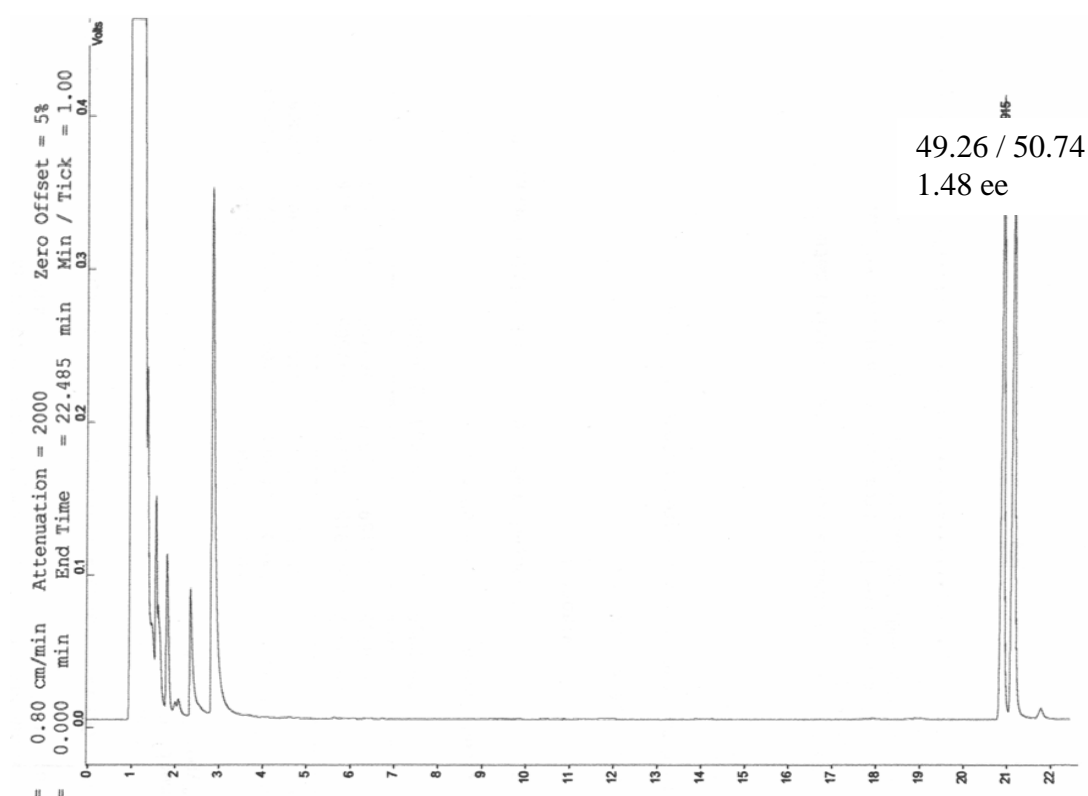


Figura 8-Cromatograma do ácido fenilbutírico residual (na forma de seu éster metílico) da reação de 18 com anidrido-2-fenilbutírico.

Quando o excesso do ácido observado corresponde ao enantiômero (+)-(S), a estereoquímica do álcool é aquela em que o substituinte maior (G) fica distante do observador, enquanto que o médio (M) fica próximo,

sendo o contrário quando o excesso é do enantiômero (-)-(R). Os ligantes OH e H ficam no plano, conforme pode ser observado na figura 8 acima. Aplicando-se a regra CIP, determina-se a configuração absoluta para este centro quiral. Desta maneira, chegou-se a conclusão que a configuração absoluta de C-15 em **18** é o (R).

3.1.2 Definição da configuração relativa dos centros quirais do Humirianthol através do estudo de raios-X de **35**.

A confirmação das configurações dos demais centros quirais de **18** foi possível através do estudo da difração de raios-X. Como **18** não formou cristais ideais para a realização da difração de raios-X, tentou-se obter cristais através de derivatizações.

Para isso, o álcool foi acetilado na presença de anidrido acético e piridina. O produto de acetilação (**35**), na presença de clorofórmio, originou cristais possíveis de serem analisados por este método.

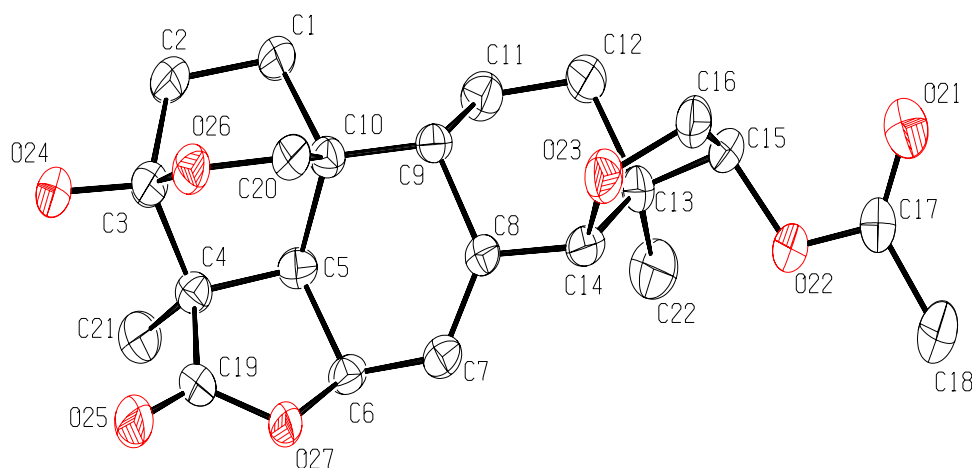


Figura 9- Estrutura obtida através da difração de raios- X do humirianthol acetilado (**35**).

A estrutura cristalográfica obtida através da difração de raios-X confirmou a existência do esqueleto pimarano compreendido por dois anéis saturados de seis membros e um anel de seis membros com uma dupla ligação, sendo que o anel A apresenta uma ponte 3-20 éter metilênica. Além disso, foi possível comprovar que a estrutura compreende ainda dois anéis furânicos. Importante neste método foi a possibilidade de se determinar as configurações relativas para os centros quirais da estrutura como sendo: *R* (3*u*, 4*l*, 5*l*, 6*u*, 9*l*, 10*u*, 13*l*, 14*l*, 15*u*).

3.1.2.1- Correlações observadas no espectro NOESY de 18

No espectro NOESY (figura 11) desta estrutura, o hidrogênio ligado ao C-15, cuja configuração absoluta foi determinada pelo método de Horeau, se encontra no plano α do sistema de anéis. Este hidrogênio não apresenta NOE com a metila em C-13. Esta metila apresenta uma correlação com o hidrogênio em C-14, portanto ambos se encontram na outra face (anti) da estrutura.(plano β). A não correlação de H-9 com H-5, e a correlação deste último com a metila em C-4 (CH₃-19), e com H-6, posicionam H-5, H-6 e CH₃-18 no plano α da estrutura. Demais correlações observadas no espectro NOESY podem ser observadas na figura 10.

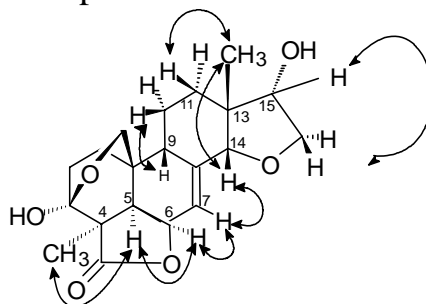


Figura 10 -Correlações observadas no experimento NOESY de 18.

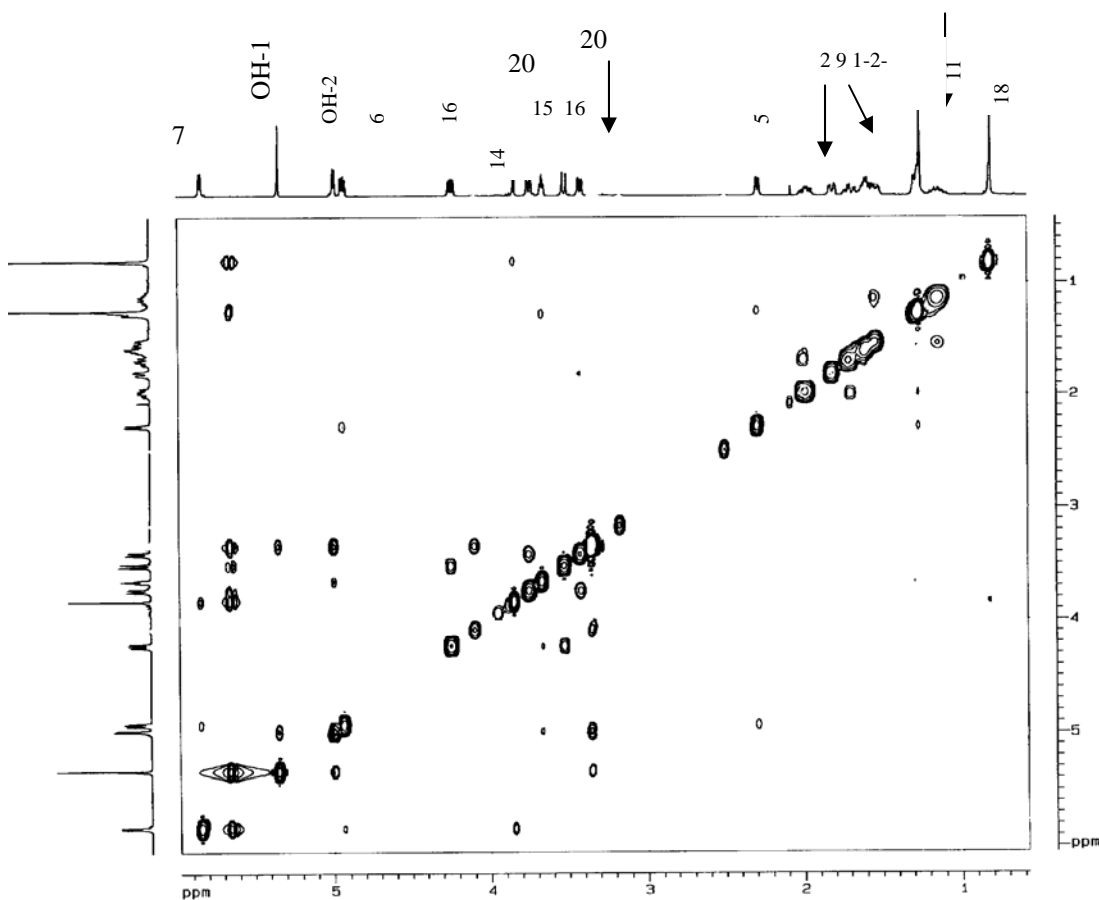


Figura 11- Espectro RMN 2D NOESY de Al-3 (18) em DMSO-d₆ a 400 MHz.

Considerando-se que a configuração do centro estereogênico C-15 foi determinada como sendo *R* de uma maneira absoluta pelo método de Horeau, conseqüentemente as configurações **3S**, **4R**, **5R**, **6S**, **9R**, **10S**, **13R**, **14R** e **15R** para os demais centros quirais foram consideradas também como absolutas, após análise das correlações espaciais no espectro NOESY, juntamente com os dados de Raio X.

3.1.3 Definição da configuração relativa dos centros quirais do metabólito acrenol (**19**) através de estudos de raios-X do derivado acetilado **36**.

Assim como **18**, o **19** (acrenol) não formou cristais que pudessem ser analisados por difração de raios-X. E, como no caso anterior, foi necessária sua derivatização com anidrido acético e piridina, o que originou um derivado diacetilado (**36**) (15,16 – diacetato - 3 β ,20 – epóxi - 3 α - hidroxí - 9 – epi - 7 pimareno - 19,6 β - olida), que após recristalização em CHCl₃/MeOH (10:1), formou cristais que foram utilizados para a análise de raios X.

A numeração atribuída aos carbonos de **19**, por conveniência, segue a numeração observada na estrutura de raio X de **36**.

A estrutura cristaloquímica obtida pela difração de raios-X de **36** mostrou uma constituição compatível com a obtida através dos métodos usuais de determinação estrutural. Com as informações cristaloquímicas, que estão descritos na parte experimental deste trabalho, determinou-se a configuração relativa dos centros quirais como sendo **R** (**3u**, **4l**, **5l**, **6u**, **9l**, **10u**, **13l**, **15l**).

3.1.3.1 Correlações observadas no espectro NOESY de **19**.

Esta estrutura, ao contrário da anterior, não teve nenhuma configuração absoluta determinada, portanto as oposições espaciais dos hidrogênios e metilas ligadas à centros estereogênicos foram determinadas, somente, como relativas. O espectro NOESY desta estrutura confirma o que foi observado pela análise de RX, que, H-5, H-6, C-17(CH₃) e C-18 (CH₃) se encontram no mesmo plano α , enquanto que H-9 se encontra em uma posição *anti*, ou seja, no plano β . As figuras **12** e **13** mostram as correlações observadas no espectro NOESY de **19**. Demais configurações foram assinaladas em analogia com **18**.

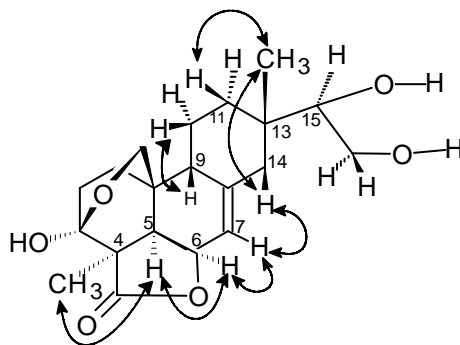


Figura 12 - Correlações observadas no espectro NOESY de 19.

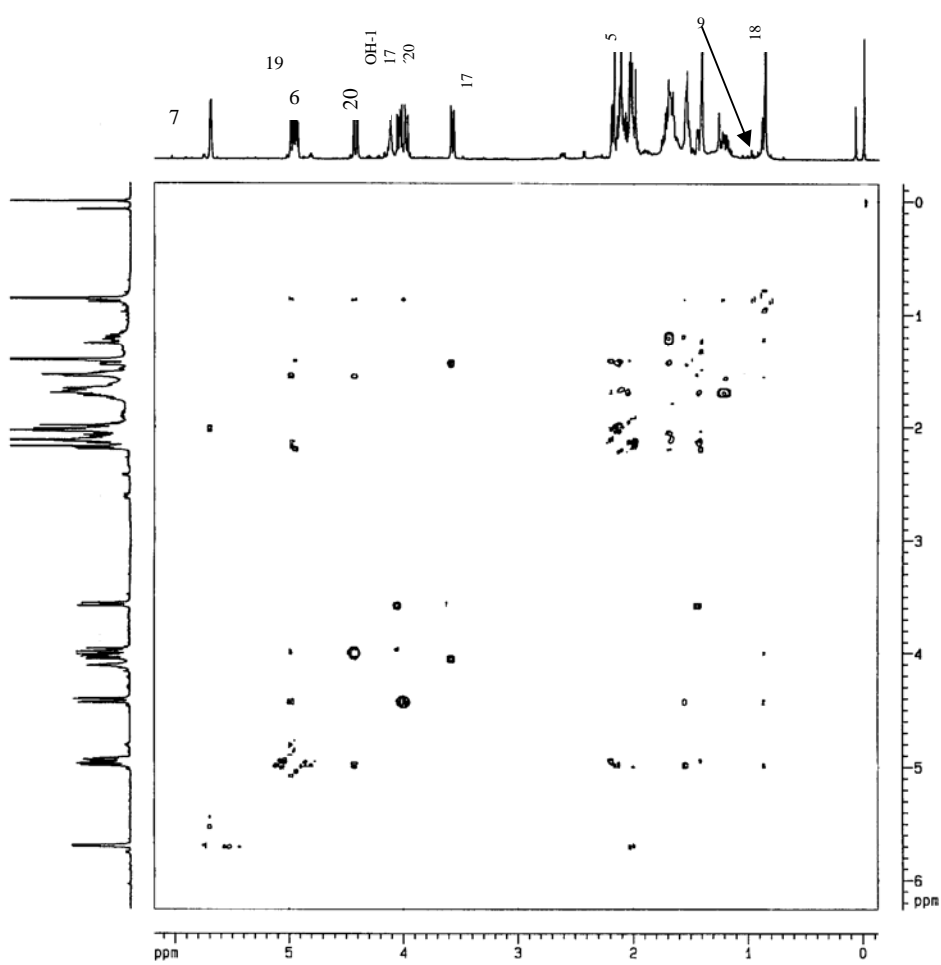


Figura 13- Espectro RMN 2D NOESY de Al-4 acetilado (19) em DMSO-d₆ a 400MHz.

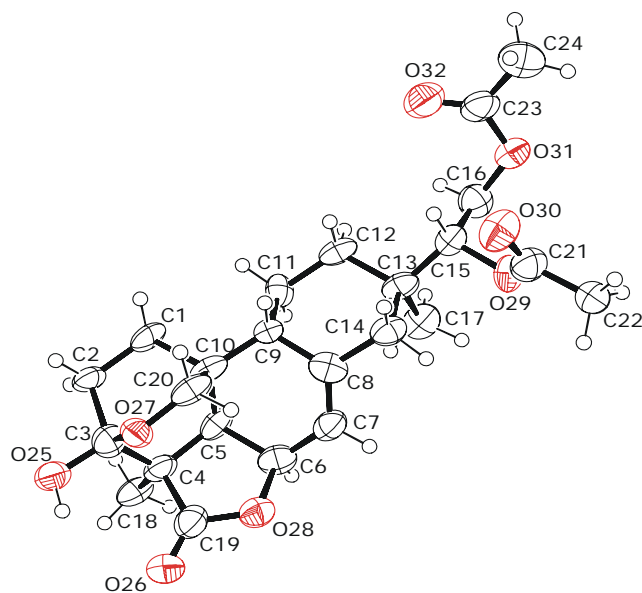


Figura 14. Estrutura obtida pela difração de raios X do Acenol acetilado (36).

3.1.4 Estudo da fração hexânica de *Humirianthera ampla*.

3.1.4.1 Isolamento e Identificação do metabólito AI-7 (37).

Em continuidade com o estudo dos metabólitos secundários de *H. ampla*, isolou-se, da fração hexânica neutra, um sólido branco que foi codificado de AI-7 (37). Este sólido foi recristalizado em etanol e mostrou-se puro quando analisado em CCD. Apresentou ponto de fusão de $212^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $[\alpha]_{\text{D}} = -51$ ($c=1$, CHCl_3). Estes dados, associados ao histórico de metabólitos secundários isolados de outras espécies de plantas da família, sugeriram tratar-se do triterpeno β -amirina. A falta de um padrão para comparação em CCD dificultou esta identificação. Para esta comprovação, uma amostra desta substância foi submetida às seguintes análises em RMN.

3.1.4.1.1 RMN ^1H DE AI-7 (37).

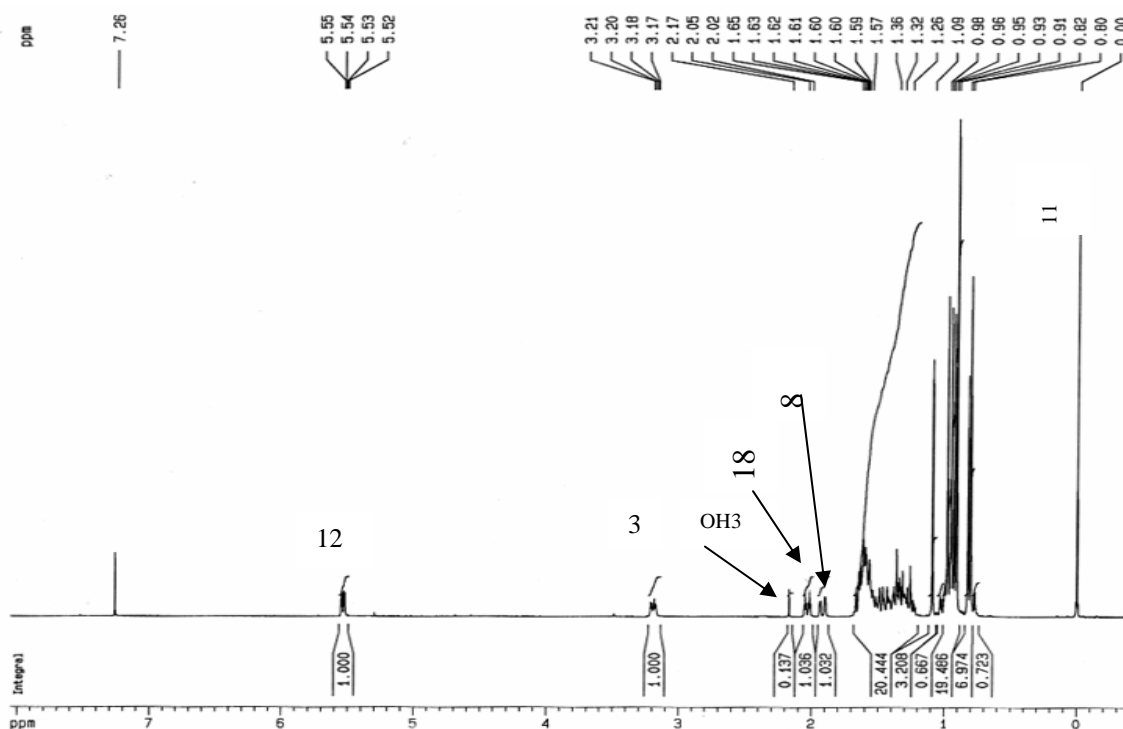


Figura 15 - Espectro de RMN ^1H de AI-7 (37) em CDCl_3 , 400MHz.

O espectro de hidrogênios desta substância (figura 15) foi pouco informativo em relação a sua estrutura. O espectro mostra que a substância é formada por vários hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos, todos ligados a carbonos alifáticos, que ressonam entre δ

0,5 e 2,0 ppm. A presença de um sinal em δ 5,5 ppm, com a integração para um hidrogênio, sugere que a estrutura apresenta apenas um hidrogênio olefínico. Além disso, um sinal próximo de 3,2 ppm, com integração para um hidrogênio, sugere a presença de um hidrogênio carbinólico, o que foi confirmado depois pelo espectro HMQC. Na expansão do espectro de ^1H (Figura 16), observa-se oito sinais, na forma de singletos, sugerindo a presença de oito grupos metílicos na estrutura. O sinal mais intenso em δ 0,9 ppm corresponde à posição de duas metilas geminais.

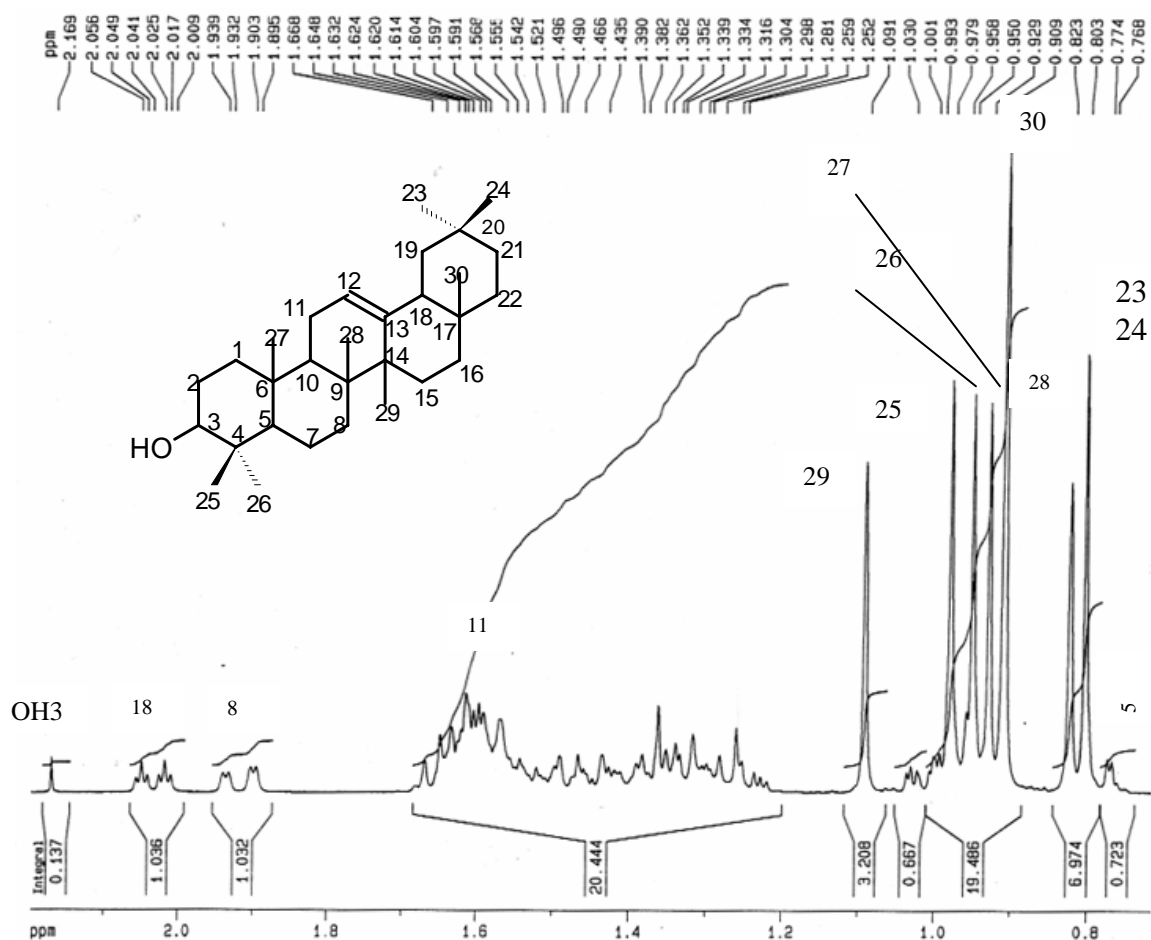


Figura 16- Espectro de RMN ^1H de AI-7 (37), em CDCl_3 a 400MHz (expansão 0,8-2,4ppm).

3.1.4.1.2 RMN de ^{13}C DE AI-7 (37).

Este espectro (figura 17) foi mais elucidativo quanto a estrutura de AI-7. Através do mesmo, associado com os espectros DEPT 135° (figura 18) e 90° (figura 19), chegou-se a conclusão de que a substância tratava-se realmente de um triterpeno, constituído por cinco carbonos metílicos

(DEPT 90⁰), dez carbonos metilênicos (DEPT135⁰), oito metílicos e sete carbonos desidrogenados. Os dois sinais em campo baixo, em δ 158,0 e 116,0 ppm, foram atribuídos aos dois carbonos olefínicos da estrutura, sendo um metínico (116,0 ppm) e o outro, que absorve a δ 158,0 ppm, um carbono desidrogenado, que desaparece no espectro Dept 135⁰. O carbono que absorve em δ 79,0 ppm trata-se a um carbono ligado a um oxigênio. Os carbonos metílicos, que foram suprimidos no espectro Dept 90⁰, aparecem como seis sinais, sendo dois sinais correspondentes, cada um, a duas metilas geminais. Na tabela 1 da página 26 são encontradas atribuições de sinais que contribuem para a identificação estrutural.

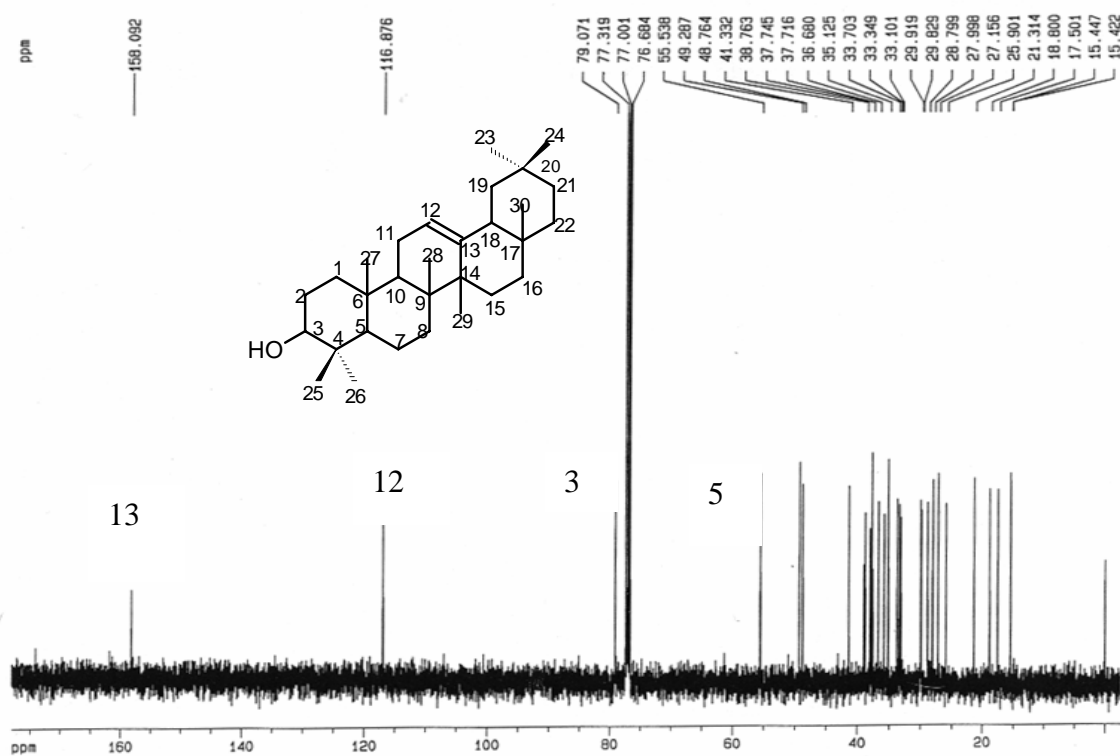


Figura 17 - Espectro de RMN ¹³C de AI-7 (37) em CDCl₃ a 100MHz.

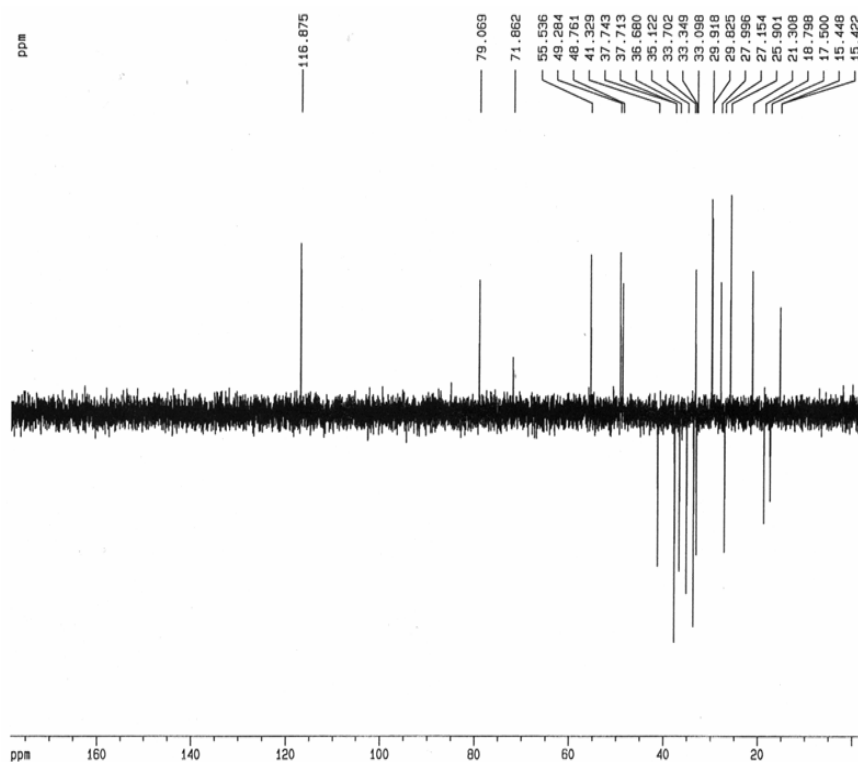


Figura 18 - Espectro de Dept 135^o DE AI-7 em CDCl₃ a 100MHz.

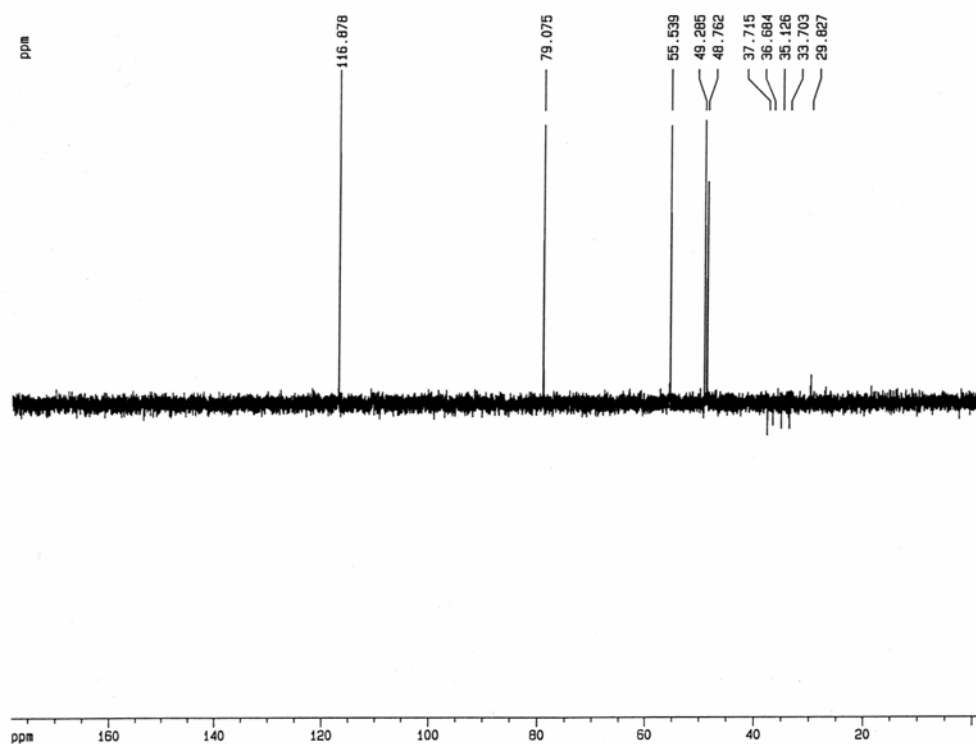


Figura 19- Espectro de Dept 90^o de AI-7 em CDCl₃ a 100MHz.

3.1.4.1.3 Espectro RMN 2D COSY de AI-7(37).

Através dos espectros COSY de AI-7 (figura 20) observa-se a correlação do hidrogênio olefínico H-12 (no caso de ser a estrutura de β -amirina) com os hidrogênios H-11 metilênicos. Além disso, H-12 mostra uma outra correlação, possivelmente com H-10, do tipo (W). Devido a sobreposição de sinais dos demais sistemas de spins, ficou difícil de se obter maiores informações deste espectro.

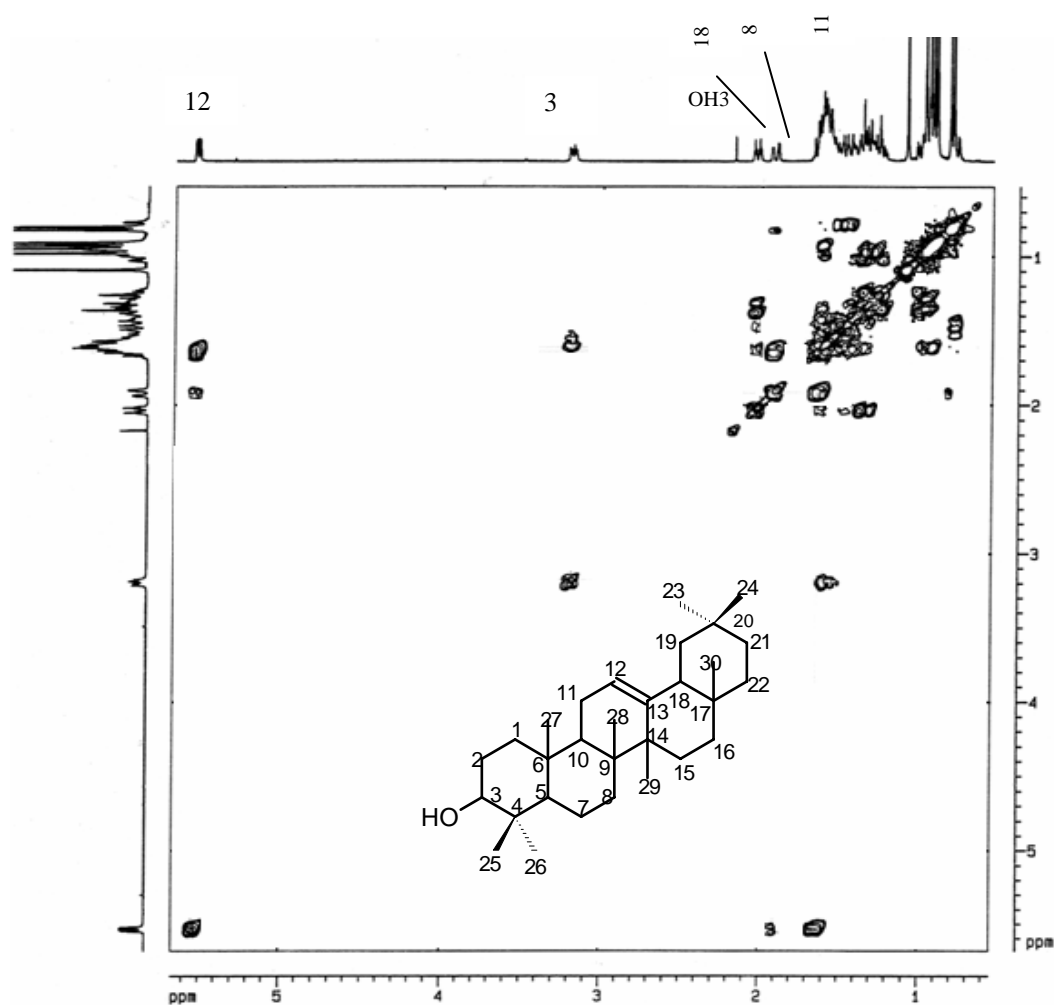


Figura 20 - Espectro COSY de AI-7 em CDCl_3 , 400MHz.

3.1.4.1.4 Espectro RMN 2D HMQC de AI-7 (37).

O espectro HMQC de AI-7 (Figura 21) forneceu poucas informações adicionais quanto a estrutura. Importante, neste espectro, foram as correlações do hidrogênio olefínico e do carbinólico com seus respectivos carbonos, em δ 118,8 e δ 79,0 ppm, respectivamente.

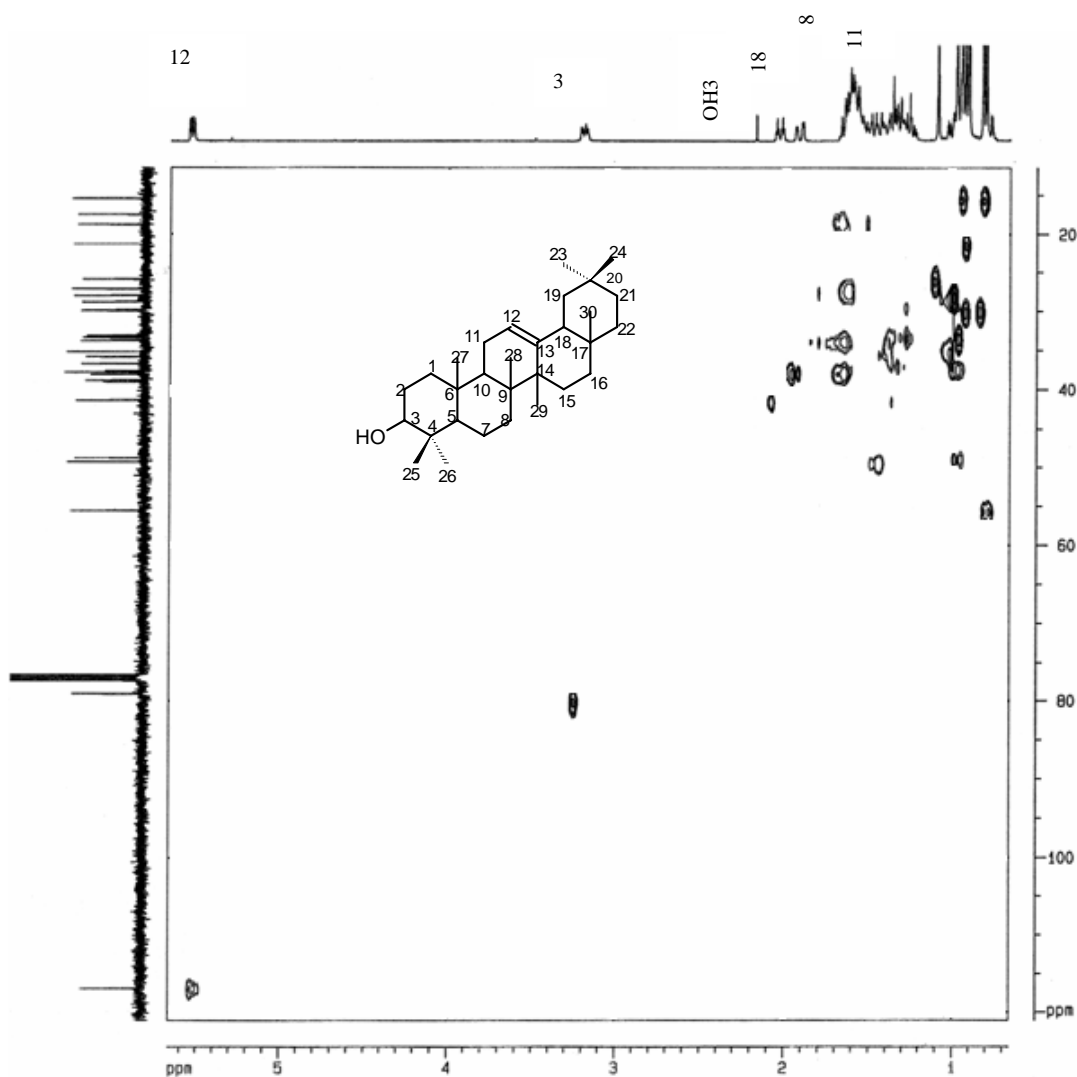


Figura 21- Espectros HMQC de AI-7 em CDCl_3 a 400MHz.

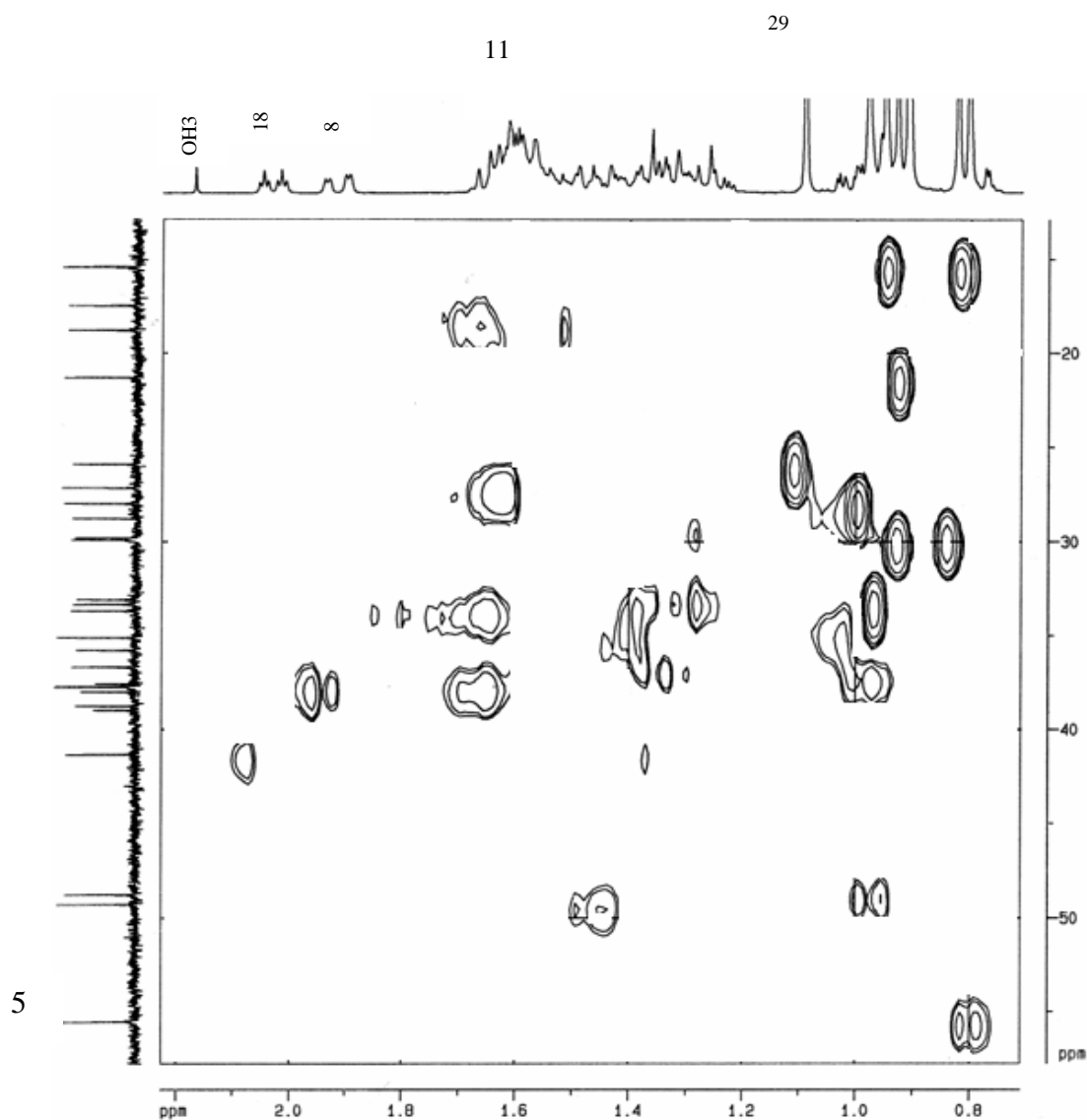
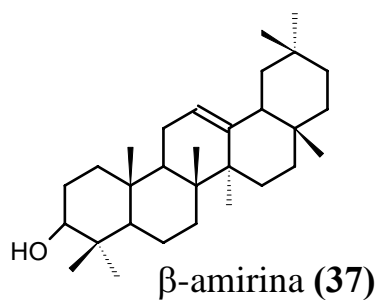


Figura 22- Espectros HMQC de AI-7 em CDCl_3 a 400MHz; (expansão 10,0-60,0 ppm x 0,6-2,4 ppm).

Os valores do ponto de fusão, da rotação ótica com os dados dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C do metabólito AI-7, associados às informações da literatura⁵⁹, corroboram com a estrutura (**37**) de β -amirina.



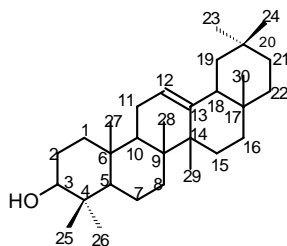


Tabela 1 Principais deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de β -amirina, comparado com dados da literatura (CDCl_3 , 400MHz).

N°	δH^*	δH	δC^*	δC
1			38,24	
2			23,62	25,90
3	4,53	3,15	80,95	79,07
4			37,66	
5			56,30	55,5
6			36,83	
7			18,18	17,50
8			32,56	
9			39,80	
10			47,57	49,28
11			23,47	
12	5,23	5,53	121,76	116,87
13			145,33	158,00
14			41,69	
15			28,33	
16			26,10	
17			32,41	
18			47,23	48,76
19			46,79	
20			31,00	
21			34,70	
22			37,13	
23	0,87	0,91	33,24	
24	0,87	0,91	23,62	21,30
25	0,87	0,97	27,99	
26	0,87	0,95	16,72	17,50
27	0,97	0,92	15,46	15,42
28	0,97	0,82	16,62	15,44
29	1,13	1,10	25,85	
30	0,83	0,80	26,87	
(OH 3)	2,17	2,17		

δH^* e δC^* deslocamentos químicos dos ^1H e ^{13}C observados da literatura⁵⁹.

3.1.5 Estudo da fração acetato de etila de *Humirianthera ampla*.

3.1.5.1 Isolamento e Identificação do Metabólito AI-2 (38).

Da fração acetato de etila, isolou-se um sólido branco opaco, que após ser recristalizado em etanol, apresentou um $Pf = 220^{\circ} C (\pm 3^{\circ} C)$. Este metabólito foi codificado inicialmente por AI-2 (38).

3.1.5.1.1 Análise do espectro de absorção no Infravermelho de AI-2 (38).

O espectro de IV de 38 (figura 23) mostrou uma banda intensa em $3421,7 \text{ cm}^{-1}$ sugerindo a presença de hidroxila (s) na estrutura.

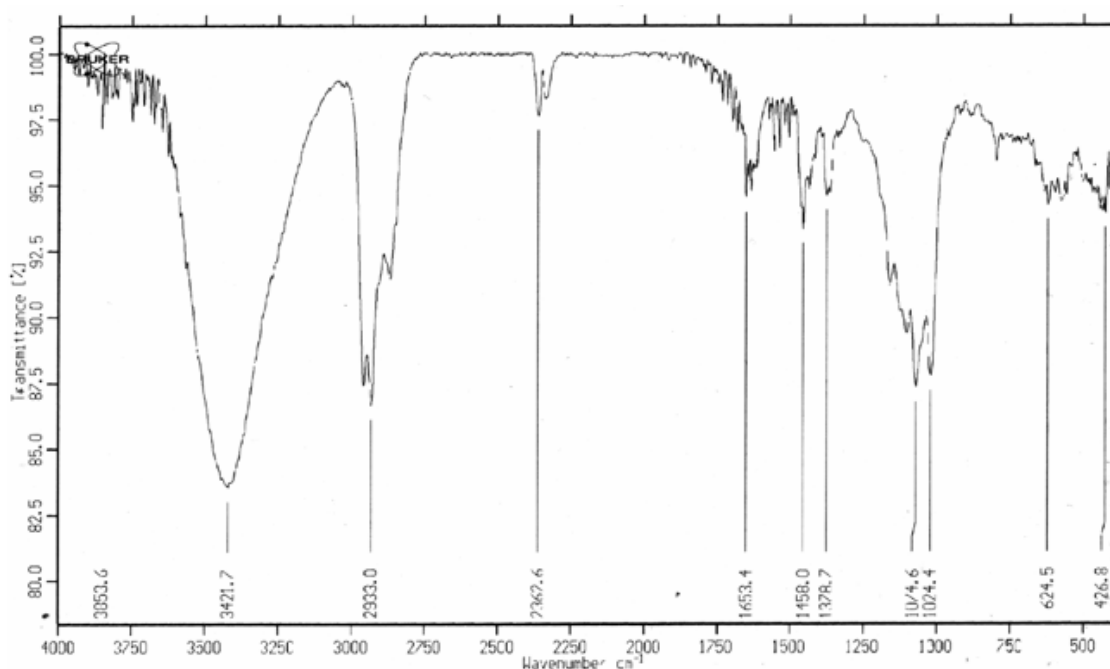


Figura 23- Espectro de Infravermelho de AI-2 (38) em pastilha de KBr.

3.1.5.1.2 Estudo de RMN de 1H AI-2 (38).

A análise do espectro de RMN de 1H deste metabólito (figura 24) mostra, entre $\delta 0,3-2,5$ ppm, vários hidrogênios, principalmente metílicos e metilênicos de difícil atribuição devido a sobreposição de sinais. Na região do espectro entre $\delta 3,0-5,0$ ppm são observadas várias ressonâncias de hidrogênios metínicos e hidroxílicos (desaparecem pela adição de D_2O), característicos da unidade de glicose. Portanto, através deste espectro,

juntamente com a análise do espectro de RMN de ^{13}C , sugeriu-se a estrutura de um metabólito glicosilado.

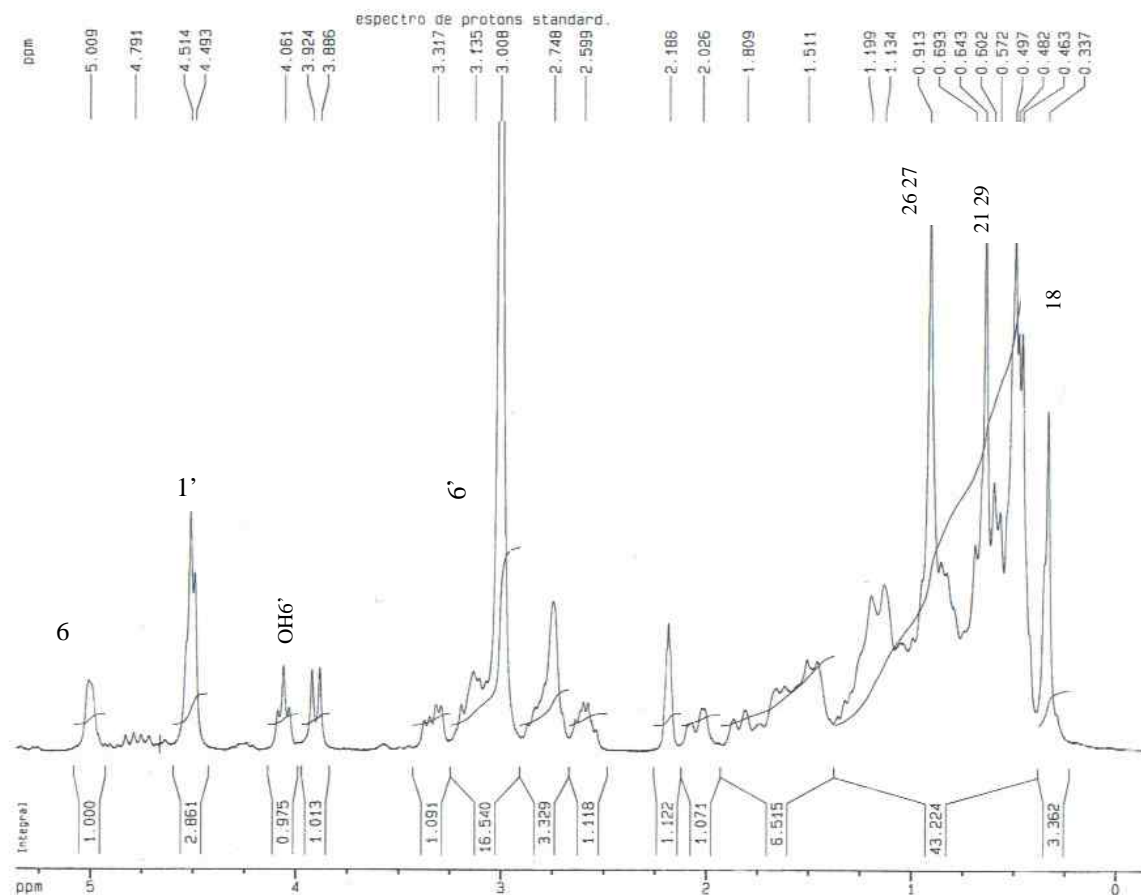


Figura 24 - Espectro RMN ^1H de AI-2 (38) em DMSO-d_6 , 400MHz.

3.1.5.1.3 Estudo de RMN de ^{13}C de AI-2 (38).

Através deste espectro (figura 25), foi possível observar, que além dos seis carbonos da glicose, a estrutura apresenta mais vinte e nove carbonos, caracterizando um esteróide glicosilado e não um triterpêno como se supunha originalmente. O espectro DEPT 135° (figura 26) mostra a presença de doze carbonos metilênicos, sendo um deles, o que absorve cerca de δ 60,0 ppm, correspondente ao único carbono metilênico da unidade de glicose. Além disso, observou-se que dois carbonos que absorvem em campo baixo (140,3 e 120,7 ppm) correspondem aos carbonos olefínicos internos da estrutura, sendo um deles desidrogenado. O carbono anomérico foi confirmado devido a típica ressonância próximo de

δ 100 ppm. A comparação entre os espectros mostrou que a estrutura é formada por apenas três carbonos desidrogenados.

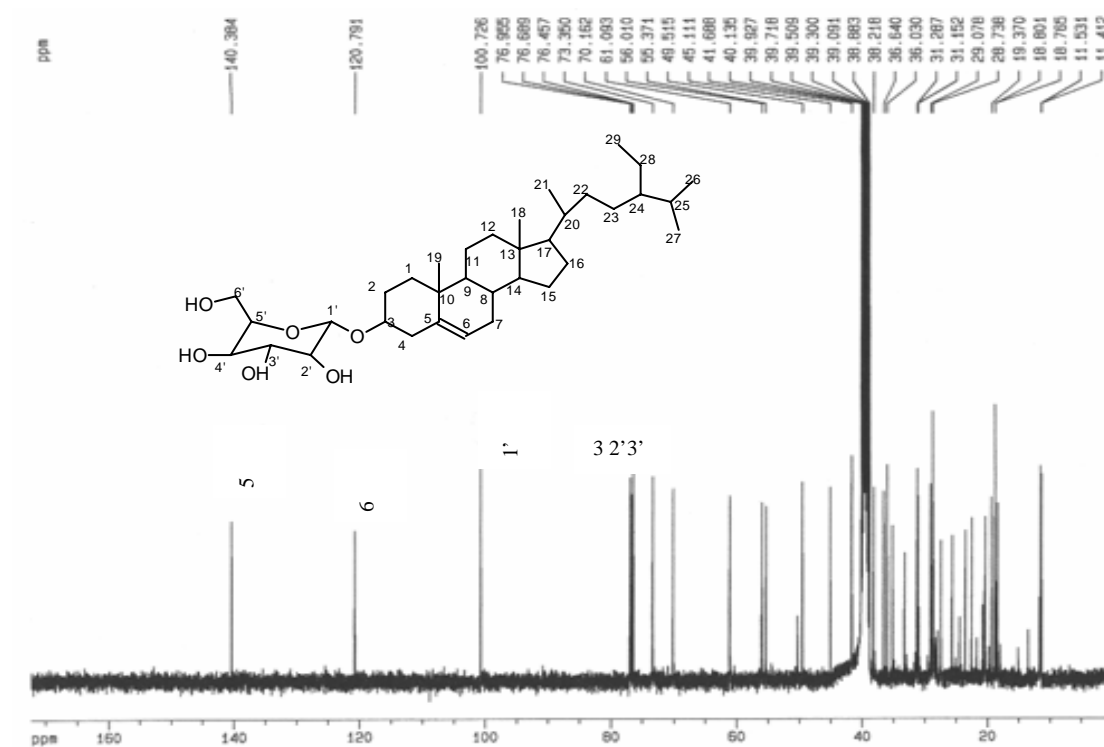


Figura 25- Espectro RMN ^{13}C de AI-2 em DMSO-d_6 a 100MHz.

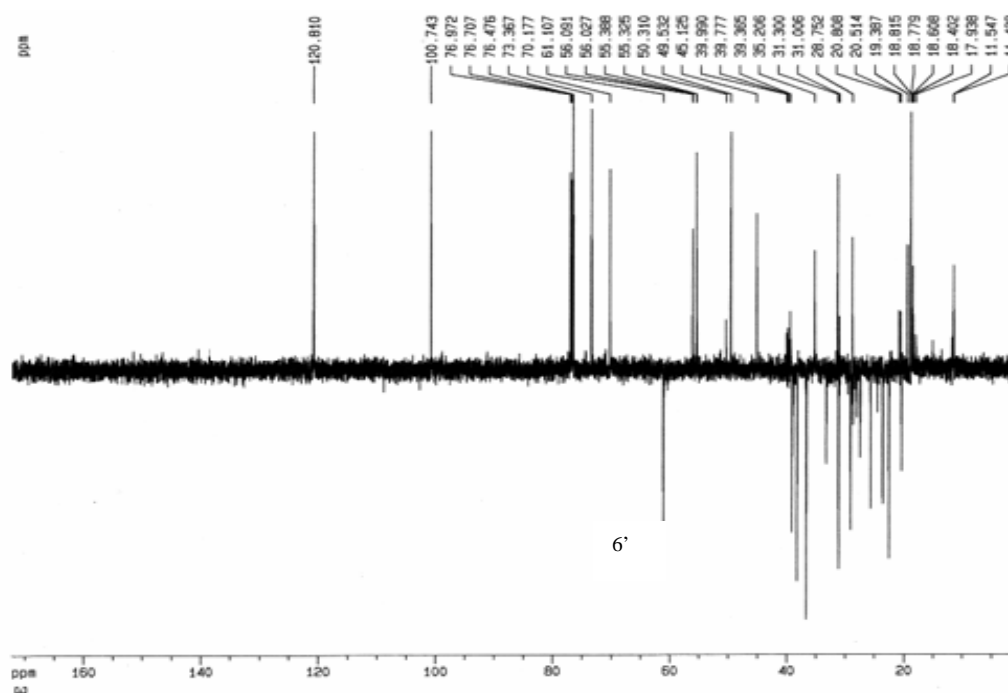
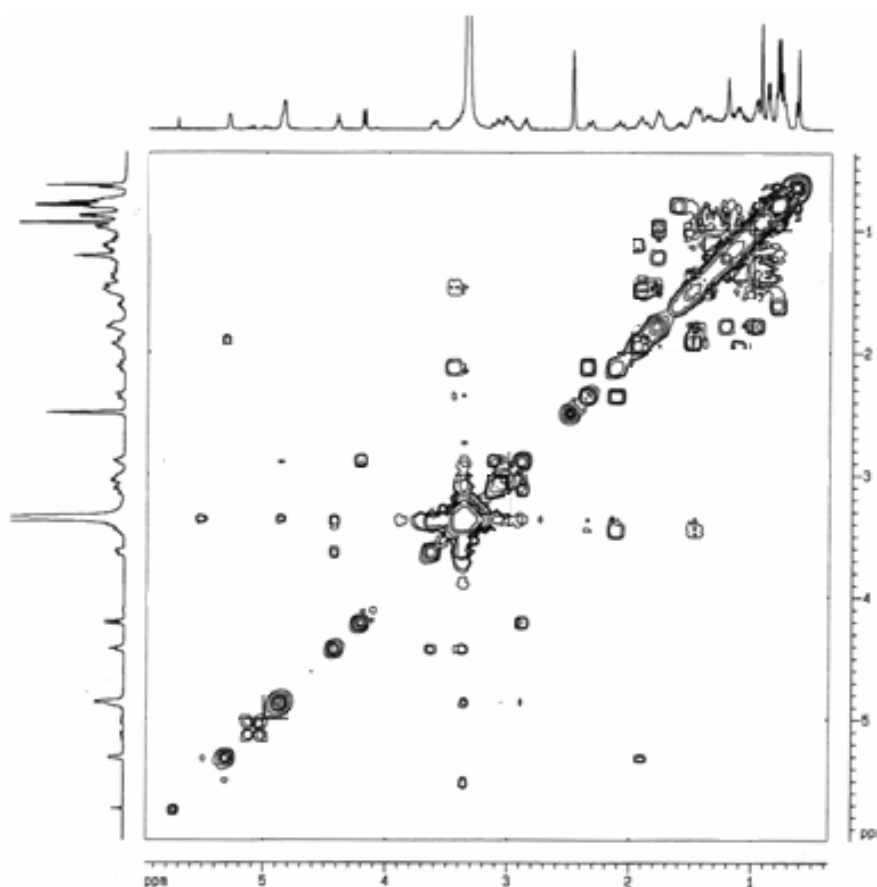


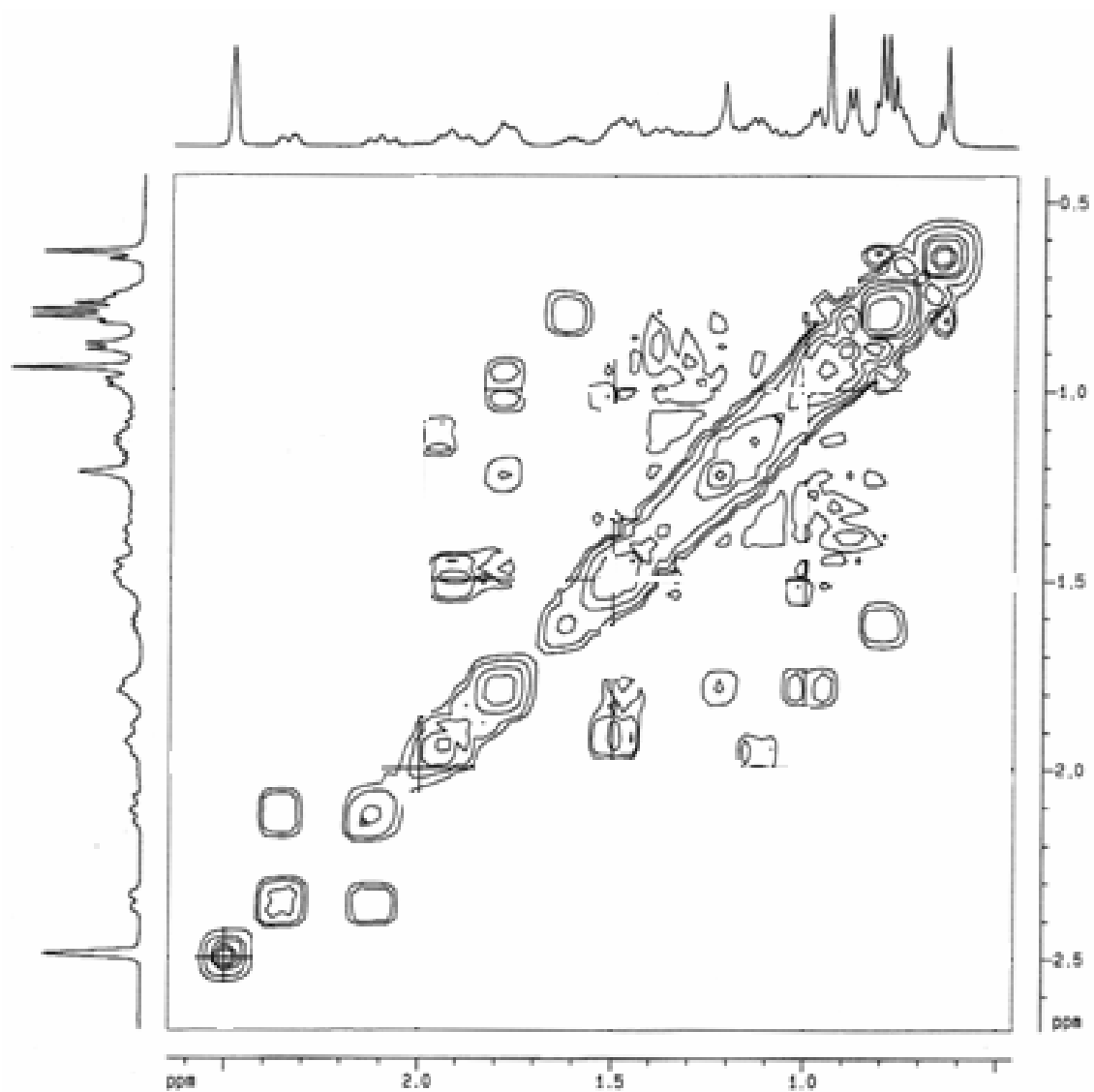
Figura 26- Espectro RMN ^{13}C de AI-2 em DMSO-d_6 a 100MHz.

3.1.5.1.4 Estudo do espectro COSY de AI-2 (38).

O espectro COSY (figuras 27 e 28) deste metabólito não foi muito elucidativo em relação à estrutura, devido a sobreposição de sinais. Entretanto, é possível identificar o sistema de spins formado pelos hidrogênios da unidade de glicose.

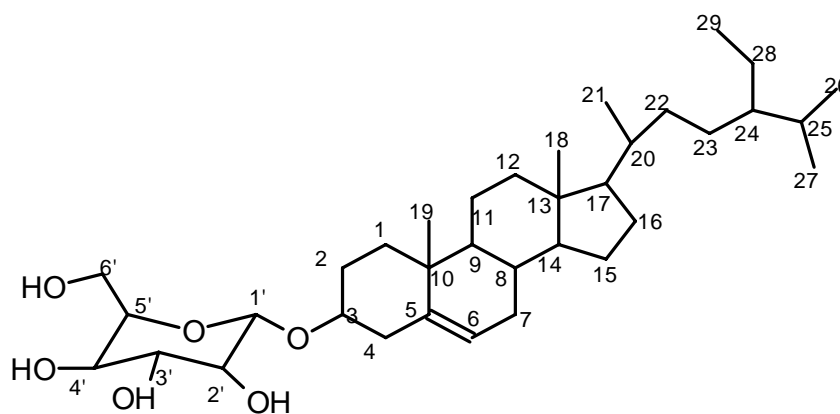


Figuras 27 - Espectro RMN COSY de AI-2 em DMSO-d₆ a 400MHz.



Figuras 28 - Espectro RMN COSY de AI-2 em DMSO-d₆ a 400MHz (expansão 0,5-2,5ppm).

Após análise dos dados dos espectros e comparado-os com dados da literatura⁶⁰, além da análise em CCD com uma amostra autêntica, concluiu-se que AI-2 corresponde ao metabólito sitosterol glicosilado (**38**) ($C_{35}H_{60}O_6$, PM=576,85), comum em diversas espécies de plantas. Este metabólito também foi identificado na fração neutra de acetato de etila da espécie *Himatanthus sucuuba*.



β -sitosterol glicosilado (38)

Tabela 2 Principais deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de β -sitosterol glicosilado comparado com a literatura (DMSO- d_6 , 400MHz e 100 MHz)

N.º	* δ ^1H ppm	δ ^1H ppm	* δ ^{13}C ppm	δ ^{13}C ppm
1			37,3	
2			30,1	
3			77,8	76,90
4			39,1	
5			140,7	140,30
6	5,30	5,09	121,7	120,70
7			26,1	
8			31,9	
9			50,1	
10			36,7	
11			21,0	
12			39,7	
13			42,3	
14			56,6	
15			24,3	
16			28,4	
17			56,0	
18	0,67	0,33	11,8	
19	0,93		18,8	
20			36,2	
21	1,01	0,60	19,0	
22			34,0	
23			31,9	
24			45,8	
25			29,2	
26	0,88	0,91	19,2	
27	0,89	0,91	19,8	
28			23,2	
29	0,86	0,60	11,9	
1'	4,40	4,49	102,3	100,70
2'	2,96		78,4	76,60
3'	3,15		78,3	76,40
4'	3,06		77,8	
5'	3,13		75,1	
6'	3,41/3,67	4,23/4,25	62,6	
2'OH	5,08			
3'OH	5,01			
4'OH	4,99			
6'OH	4,60			

* ^1H e * ^{13}C valores obtidos da literatura⁶⁰.

3.1.6 Estudo da fração butanólica de *Humirianthera ampla*.

3.1.6.1 Determinação estrutural do metabólito codificado como Ha-2 (32).

A fração solúvel em metanol da fração butanólica neutra de *Humirianthera ampla*, formou um precipitado cristalino alaranjado após adição de acetona. Após recristalização em metanol, apresentou-se como cristais incolores, na forma pura, confirmada através de CCD em diversos sistemas de solventes. Apresentou um ponto de fusão igual a 153°C , e no sistema eluente acetato de etila / metanol (8:2) apresentou um $R.f = 0,62$ e $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -118,73^{\circ}$ (c-0,759 MeOH). A substância foi codificada inicialmente de Ha-2. Para auxiliar a identificação estrutural de Ha-2 foram realizados espectros de IV, de massas e de RMN de ^1H e ^{13}C .

3.1.6.1.1 Análise do espectro de absorção no Infravermelho de Ha-2 (32).

O espectro de absorção no infravermelho da substância isolada (figura 29) apresentou uma absorção em $3388,1\text{ cm}^{-1}$ sugerindo a absorção de hidroxila(s), e em $1756,1$ e $1696,1\text{ cm}^{-1}$, de carbonilas.

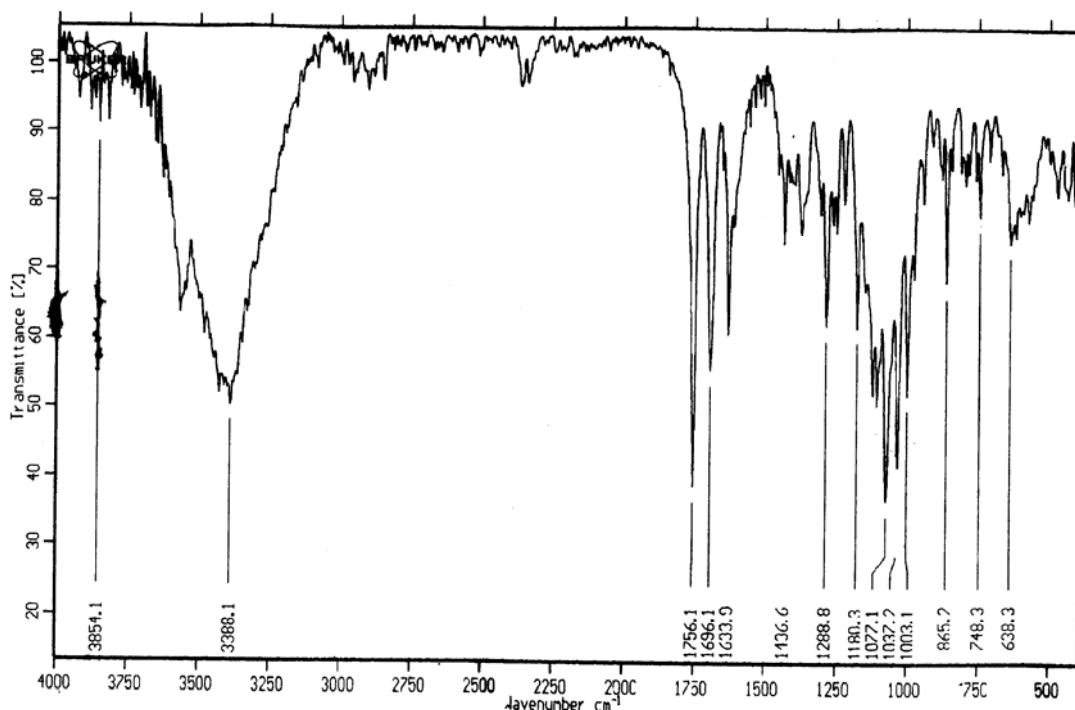


Figura 29 Espectro de absorção de Infravermelho de Ha-2 (32).

3.1.6.1.2 Análise do espectro de massas de Ha-2 (32).

No espectro de massa de baixa resolução EI da Figura 30 observa-se um fragmento $m/z = 308$ uma que corresponde a parte aglicona de Ha-2 [M^+ -glicose], o que está de acordo com a massa calculada de Ha-2 que é de 470 uma.

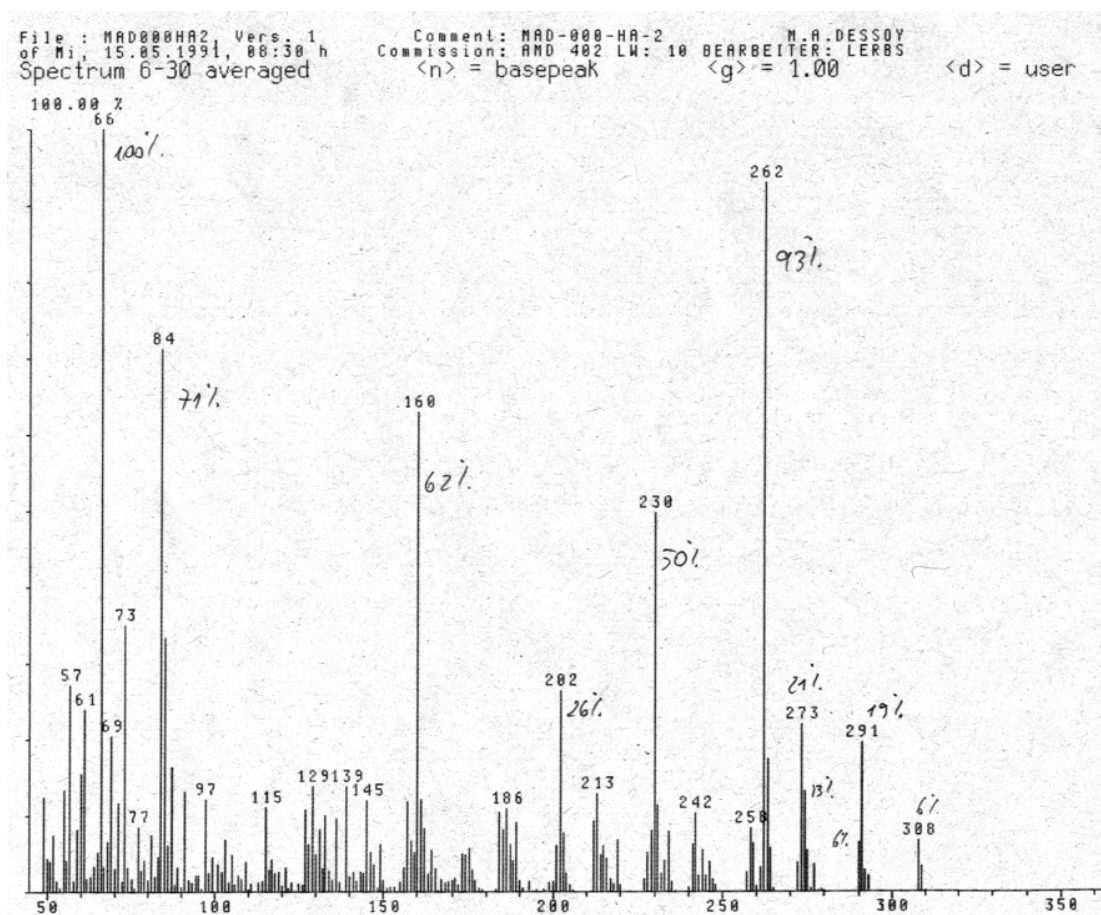


Figura 30 Espectro de massa de baixa resolução EI de Ha-2 (32).

3.1.6.1.3 Estudo de RMN de ^1H de Ha-2 (32).

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênios da substância Ha-2 foi medido em DMSO- d_6 devido a pouca solubilidade em outros solventes usuais em RMN. O espectro apresentou vários sinais entre δ 7,4 a 1,20 ppm. Neste espectro (figura 31), observa-se onze sinais, todos com integração para um hidrogênio, em δ 7,4; 7,2; 5,29; 5,16; 5,08; 5,0 e 4,99; 6,3; 5,5; 4,60 e 4,5 ppm, correspondentes aos hidrogênios metínicos da estrutura, dois hidrogênios diastereotópicos ligados a um carbono metilênico (confirmados pelo espectro HMQC) e dois sinais em 3,68 e 1,27 ppm, ambas na forma de singletos e com integração para três hidrogênios,

correspondentes à duas metilas. Além disso, foram observados cinco sinais de hidrogênios, sem correlações com carbonos no espectro HMQC, que foram atribuídos à cinco grupos hidroxilas. Pelos deslocamentos químicos destes hidrogênios, juntamente com suas multiplicidades, concluiu-se que a substância em análise apresenta uma glicose em sua estrutura. Os deslocamentos químicos de todos os hidrogênios da estrutura assim como suas constantes de acoplamento são encontrados na Tabela 3, página 56 da discussão de Ha-2. A estrutura que ilustra os espectros foi sugerida após a análise das informações de todos os espectros e comparação com a bibliografia específica.



Figura 31- Espectro ^1H de Ha-2 (32) em DMSO-d_6 a 400MHz.

3.1.6.1.4 Estudo de RMN de ^{13}C de Ha-2 (32).

Através do espectro de RMN ^{13}C de Ha-2 (figura 32), foram observados 21 sinais de carbonos ressonando entre δ 20,0 e 171,0 ppm. As ressonâncias observadas em δ 170,6 ppm e 166,3 ppm sugeriram que a estrutura é formada por duas carbonilas, que tanto poderiam ser de éster, ácido carboxílico ou de uma lactona. Como a substância deu, rapidamente, reação positiva frente ao reagente de Dragendorff, sugeriu-se que a estrutura possuía uma função lactona (δ 170,6 ppm), enquanto que a ausência de um hidrogênio de ácido carboxílico e a presença de uma metila de um grupo acetil no espectro de ^1H , sugeriu a presença de uma função éster (δ 166,3 ppm).

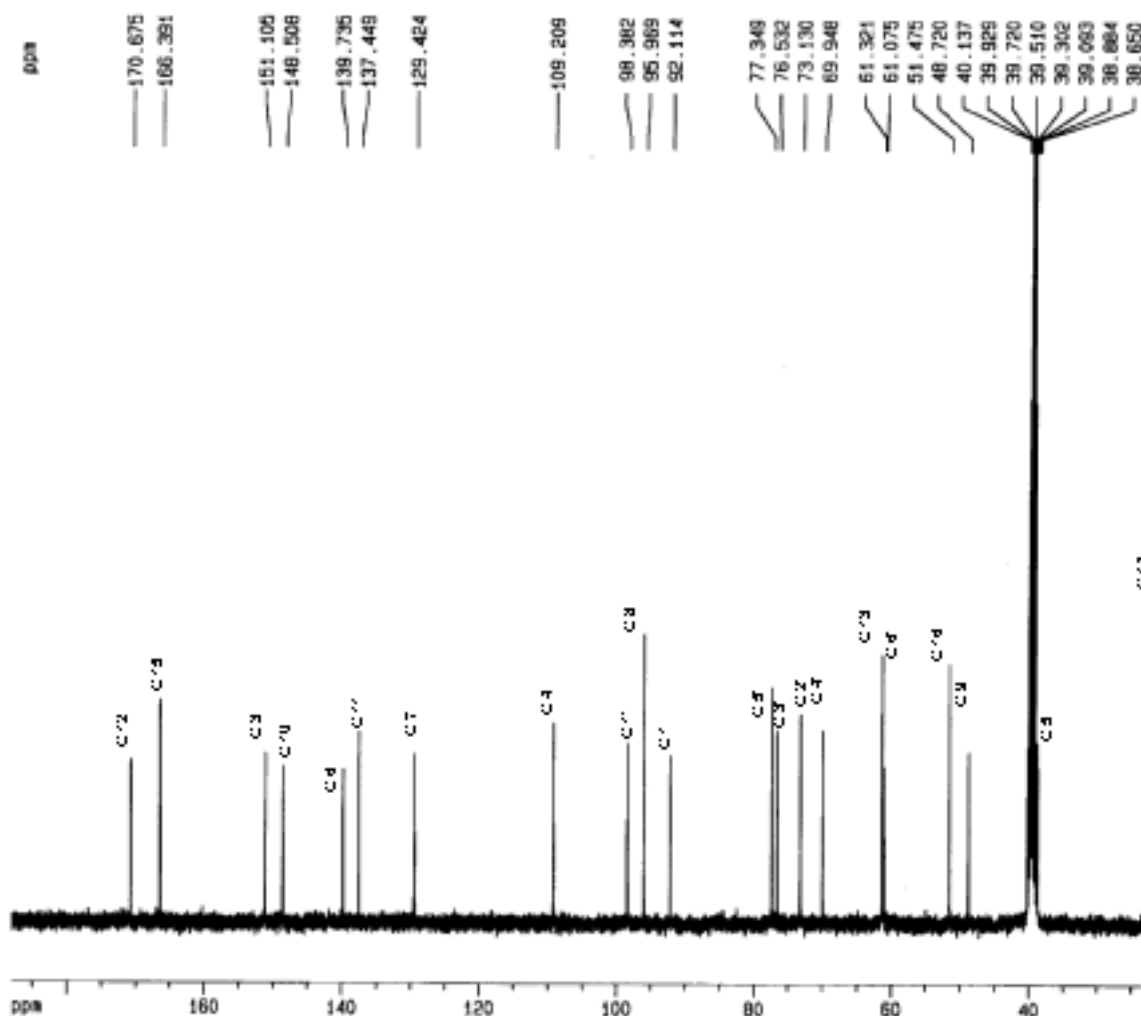


Figura 32 Espectro ^{13}C DE Ha-2 em DMSO- d_6 a 100MHz.

3.1.6.1.5 Estudo do espectro DEPT 135° de Ha-2 (32).

No espectro DEPT 135° (figura 33) observou-se a presença de apenas um carbono metilênico na estrutura correspondente ao C-6 da glicose. Além disso, observou-se 15 sinais positivos de carbonos metílicos e metínicos. A comparação deste espectro com o espectro totalmente desacoplado, mostra que a estrutura é formada por cinco carbonos quaternários.

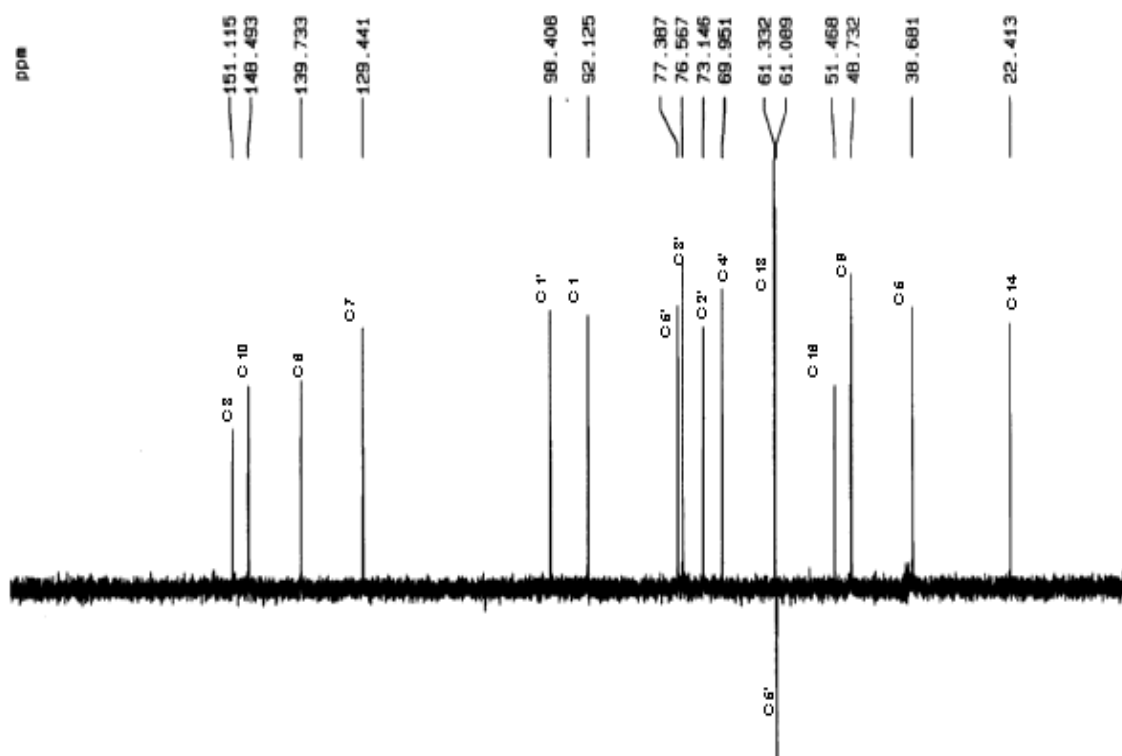
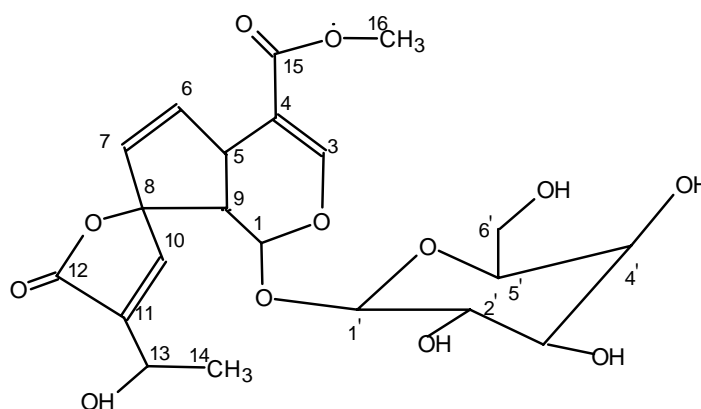


Figura 33 Espectro DEPT 135° DE Ha-2 em DMSO-d₆ a 100MHz.



(32)

3.1.6.1.6 Estudo do espectro DEPT 90° de Ha-2 (32).

O espectro DEPT 90° (figura 34) foi um complemento para o espectro DEPT 135. Através deste espectro pode-se concluir que dos quinze sinais com fase positiva observados no DEPT 135, treze correspondem à carbonos metínicos e apenas dois são metílicos.

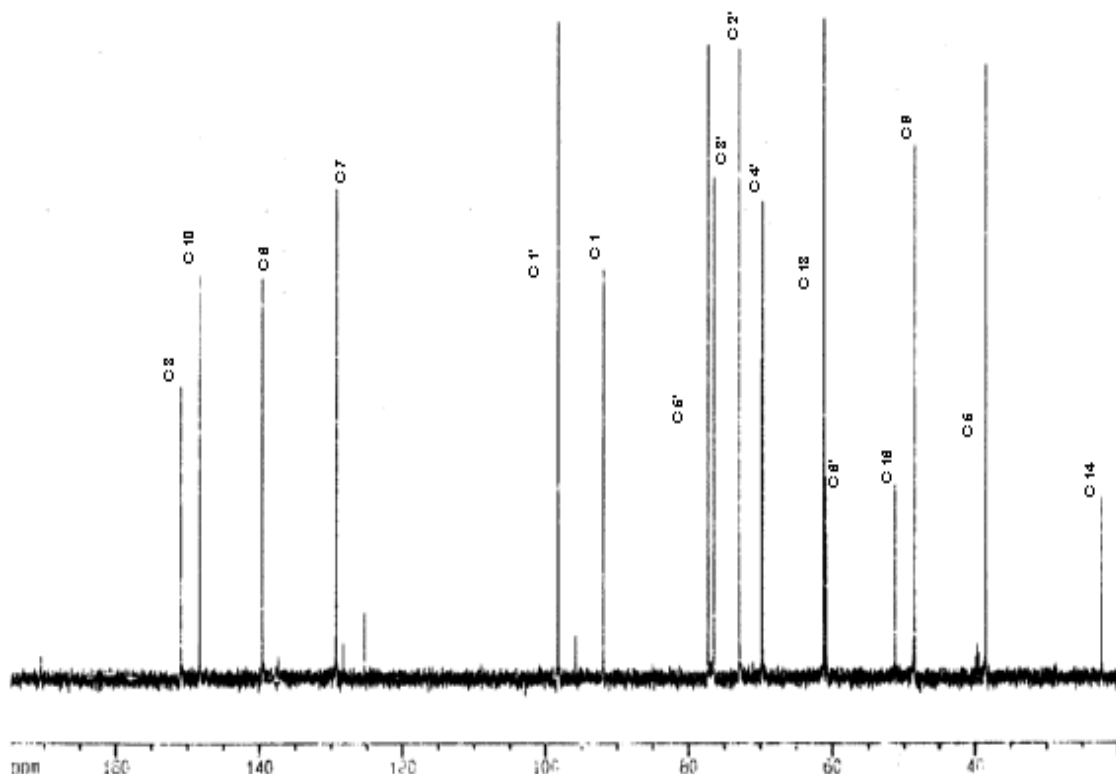


Figura 34 Espectro DEPT 90° de Ha-2 em DMSO-d₆ a 100MHz.

Espectros RMN 2D de Ha-2 (32).

Para auxiliar a elucidação de Ha-2, foram utilizadas técnicas de RMN 2D homo e heteronucleares.

3.1.6.1.7 Análise do espectro COSY ¹H-¹H de Ha-2 (32).

A análise dos espectros COSY de Ha-2 (figura 36) permitiu a identificação de três sistemas de spins na estrutura. Um dos sistemas de spins corresponde aos hidrogênios de uma glicose. Um outro sistema de spins envolve cinco hidrogênios metínicos não glicosídicos da estrutura,

como o hidrogênio que ressona em δ 5,15 ppm (H-1) que se correlaciona com o hidrogênio em δ 2,80 ppm, (H-9), que por sua vez se correlaciona com o hidrogênio que absorve em 3,30 ppm (H-5). Este último apresenta uma correlação com o sinal em 6,37 ppm (H-6), que se correlaciona com o hidrogênio que aparece em 5,50 ppm (H-7). O terceiro sistema de spins envolve hidrogênios de um grupo metil (C-14) que ressona em 1,27 ppm, um hidrogênio metínico (H-13) que ressona em 4,26 ppm e um grupo hidroxila (C13-OH), cujo hidrogênio ressona em 5,30 ppm. A figura 35, a seguir, mostra as principais correlações observadas no espectro COSY para a estrutura proposta para Ha-2.

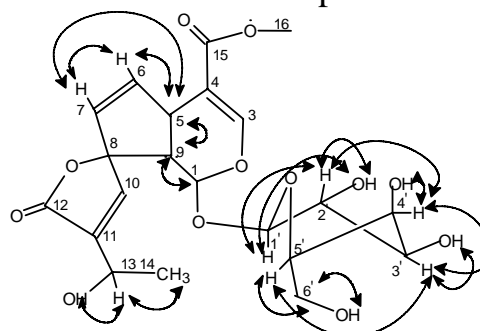


Figura 35- Correlações observadas no espectro COSY de Ha-2 (32).

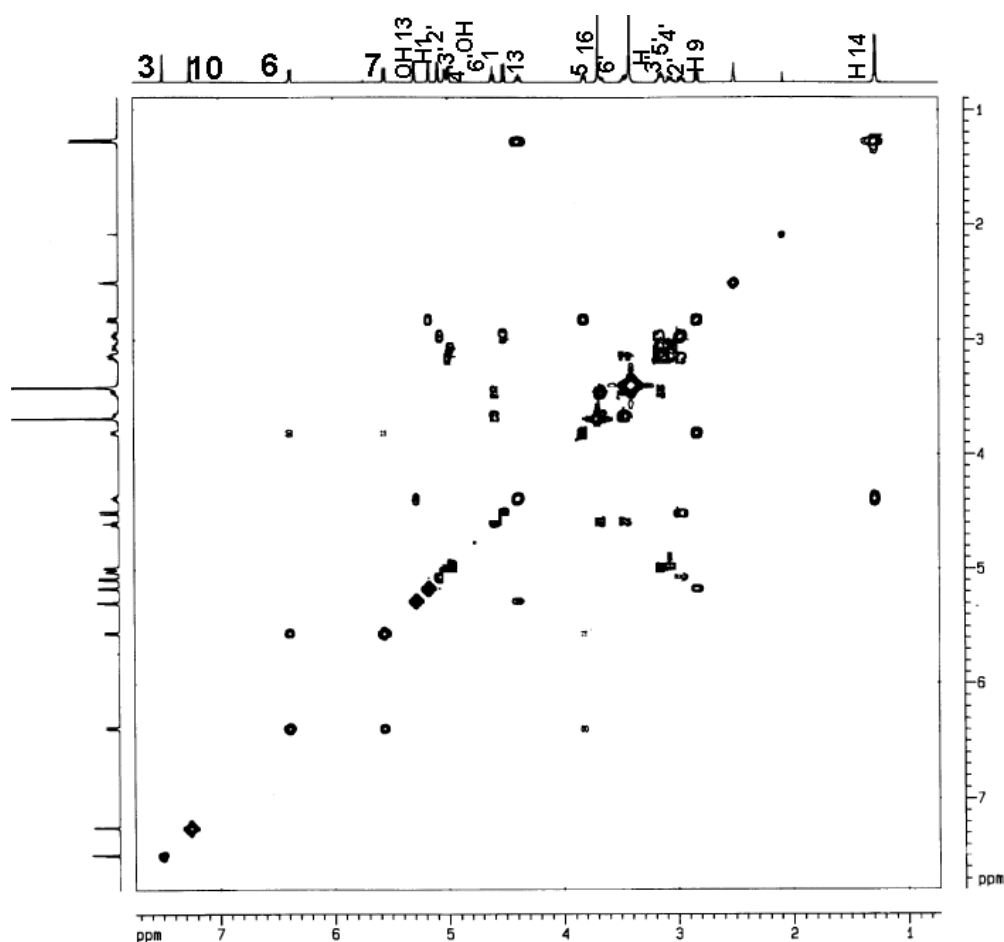


Figura 36- Espectro COSY de Ha-2 (32) em DMSO-d₆ a 400MHz.

3.1.6.1.8 Análise do espectro HMQC de Ha-2 (32).

O espectro de HMQC (figuras 37 e 38), que mostra correlações via $^1J_{C-H}$, foi útil para confirmar todas as atribuições feitas pelas técnicas anteriores, principalmente discriminar carbonos hidrogenados de não hidrogenados, como, por exemplo, os carbonos que ressonam em 92,0, 95,0 e 98,0 ppm. O segundo foi atribuído a um carbono não hidrogenado (C-8) ligado a oxigênio por não apresentar correlação neste espectro. Além disso, com o auxílio deste espectro, foi possível decidir que os hidrogênios que ressonam em δ 3,67 e 3,41 ppm, tratam-se dos dois hidrogênios diastereotópicos (H-6') da glicose, por se correlacionarem com apenas um carbono (61,0 ppm). Da mesma maneira foi possível distinguir os hidrogênios hidroxílicos da estrutura, por não apresentarem correlação com carbonos.

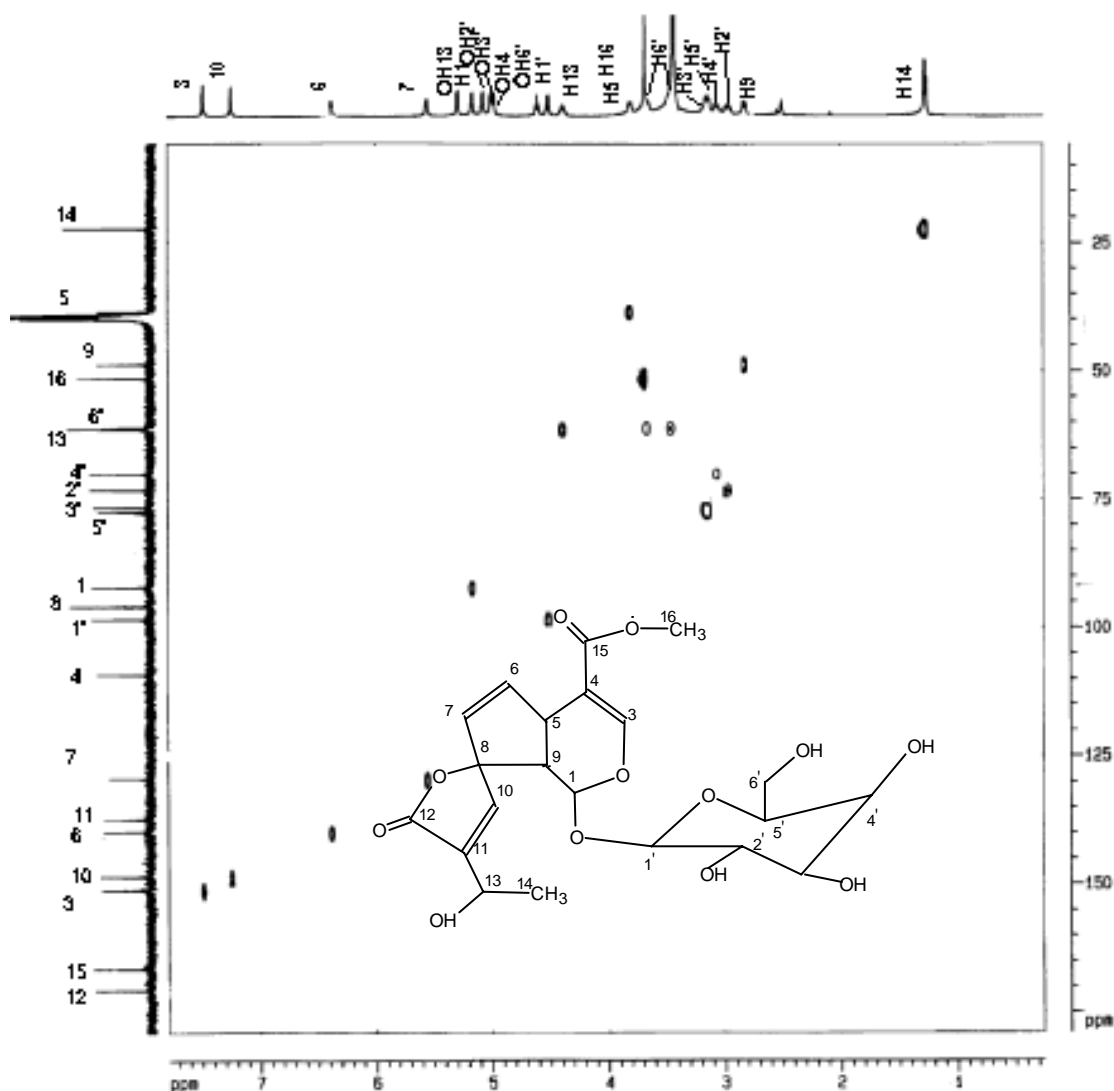


Figura 37- Espectro de HMQC de Ha-2 em DMSO-d₆ a 400 MHz.

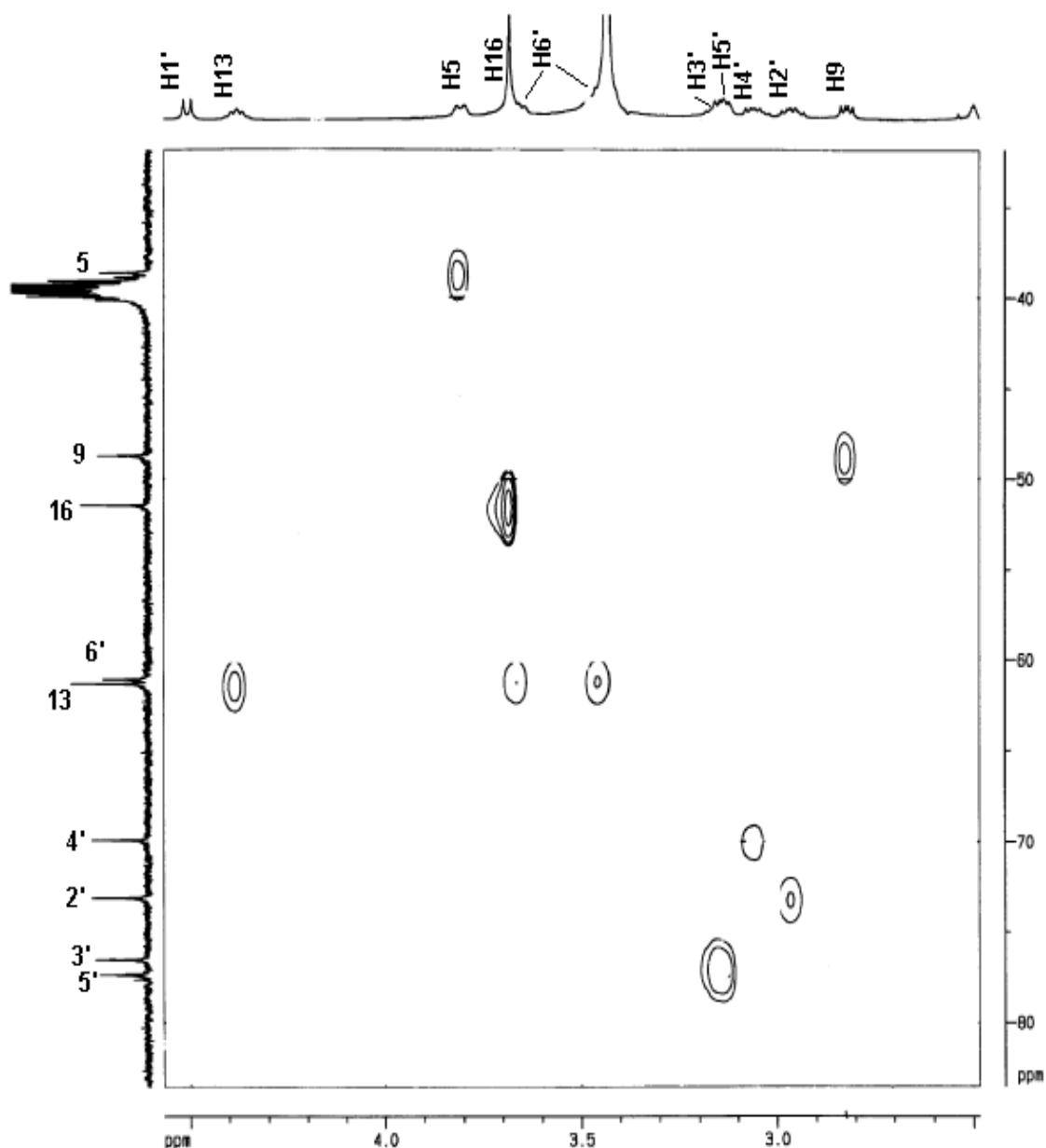


Figura 38- Espectro HMQC de Ha-2. em DMSO-d₆, 400 MHz (expansão 2.0-4.5 x 35-85ppm).

3.1.6.1.9 Análise do espectro HMBC de Ha-2 (32).

Através das correlações a longa distância ^1H - ^{13}C via ^2J e ^3J , pode-se definir com certeza toda a conectividade dos átomos e substituintes em Ha-2. Esta foi a técnica mais poderosa para se definir a posição dos carbonos desidrogenados e a posição correta dos substituintes no esqueleto principal.

Por exemplo, a correlação de H-10 com C-13 via 3J foi útil para fixar a cadeia lateral no anel lactônico em C-11 conforme pode ser observado no espectro da Figura 39. Neste mesmo espectro, pode-se observar as correlações de H-3, H-6 e H-7 com C-5 e C-9, importantes para comprovação da junção do anel diidropirano com o ciclopenteno.

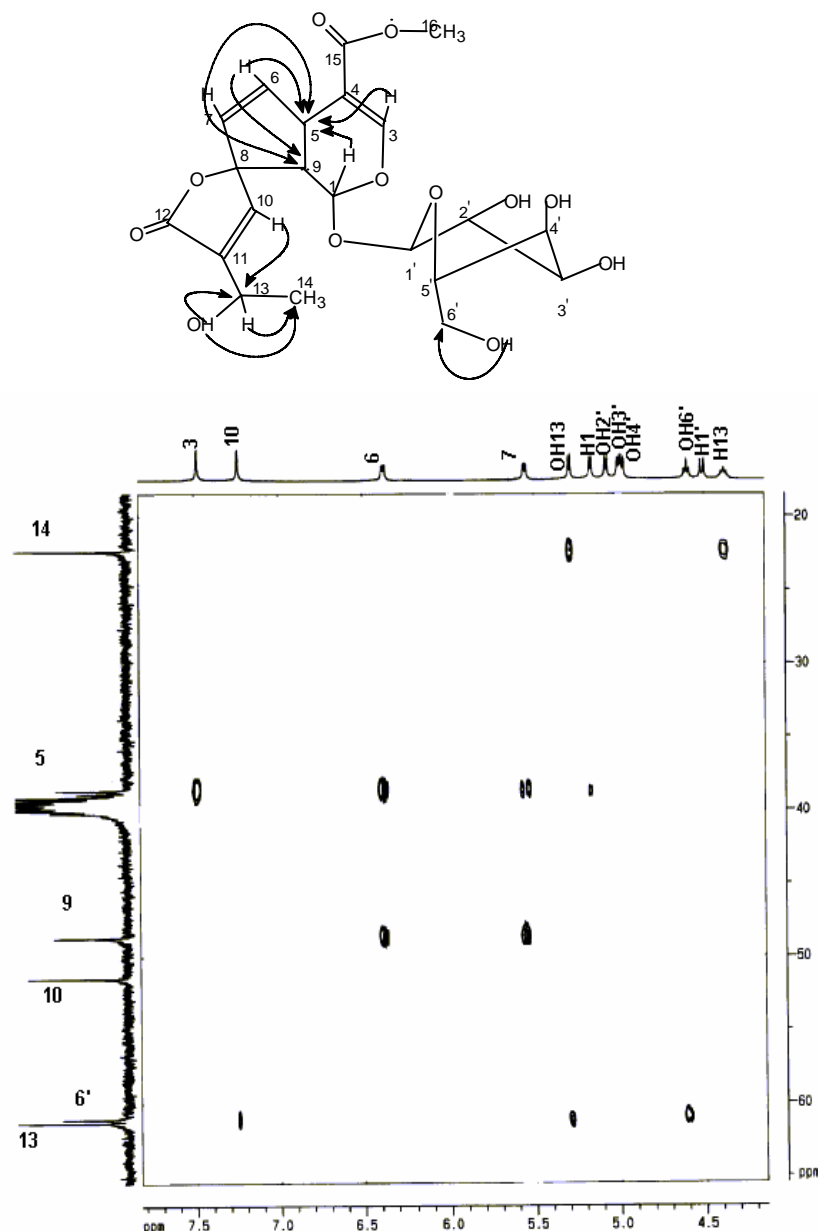


Figura 39- Espectro HMBC de Ha-2 (32), em DMSO- d_6 , 400 MHz (expansão 4.0-8.0ppm x 20-65 ppm).

O espectro da Figura 40, uma outra expansão, mostra a correlação de H-1' com C-1, importante para fixar a posição da glicose no esqueleto principal.

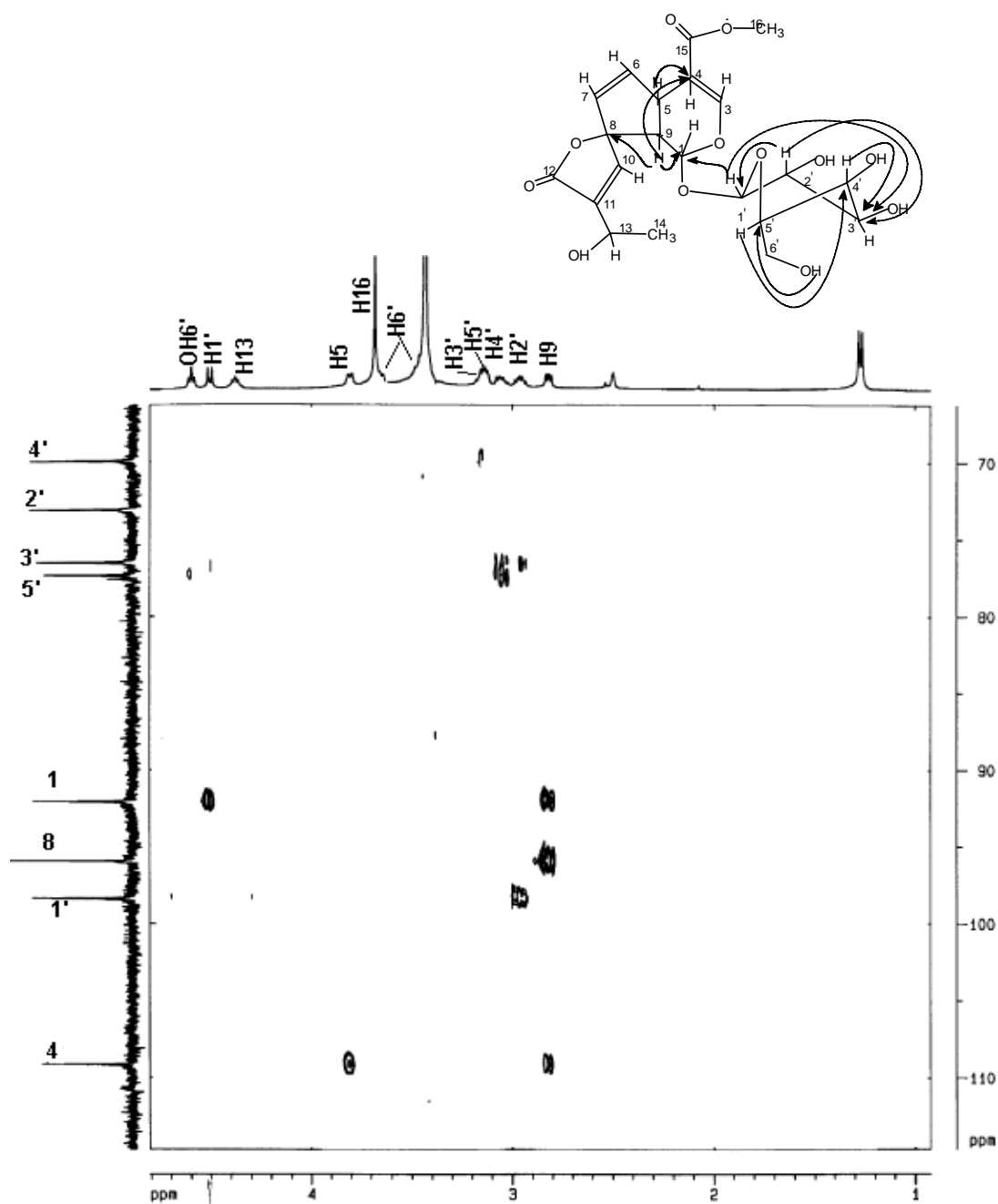


Figura 40 - Espectro HMBC de Ha-2 em DMSO- d_6 , 400 MHz (expansão 1.0-5.5ppm x 65-115ppm).

Neste mesmo espectro, observa-se a correlação de H-9 com C-8, que associado às correlações de H-6, H-7 e H-10 com C-8, observadas na Figura 41, comprova o carbono quaternário C-8 como sendo a ponte (carbono "spiro") entre o anel lactônico e o ciclopenteno da estrutura

iridóide. Além disso, através de H-3, ficam confirmados os deslocamentos químicos de C-4 e de C-1.

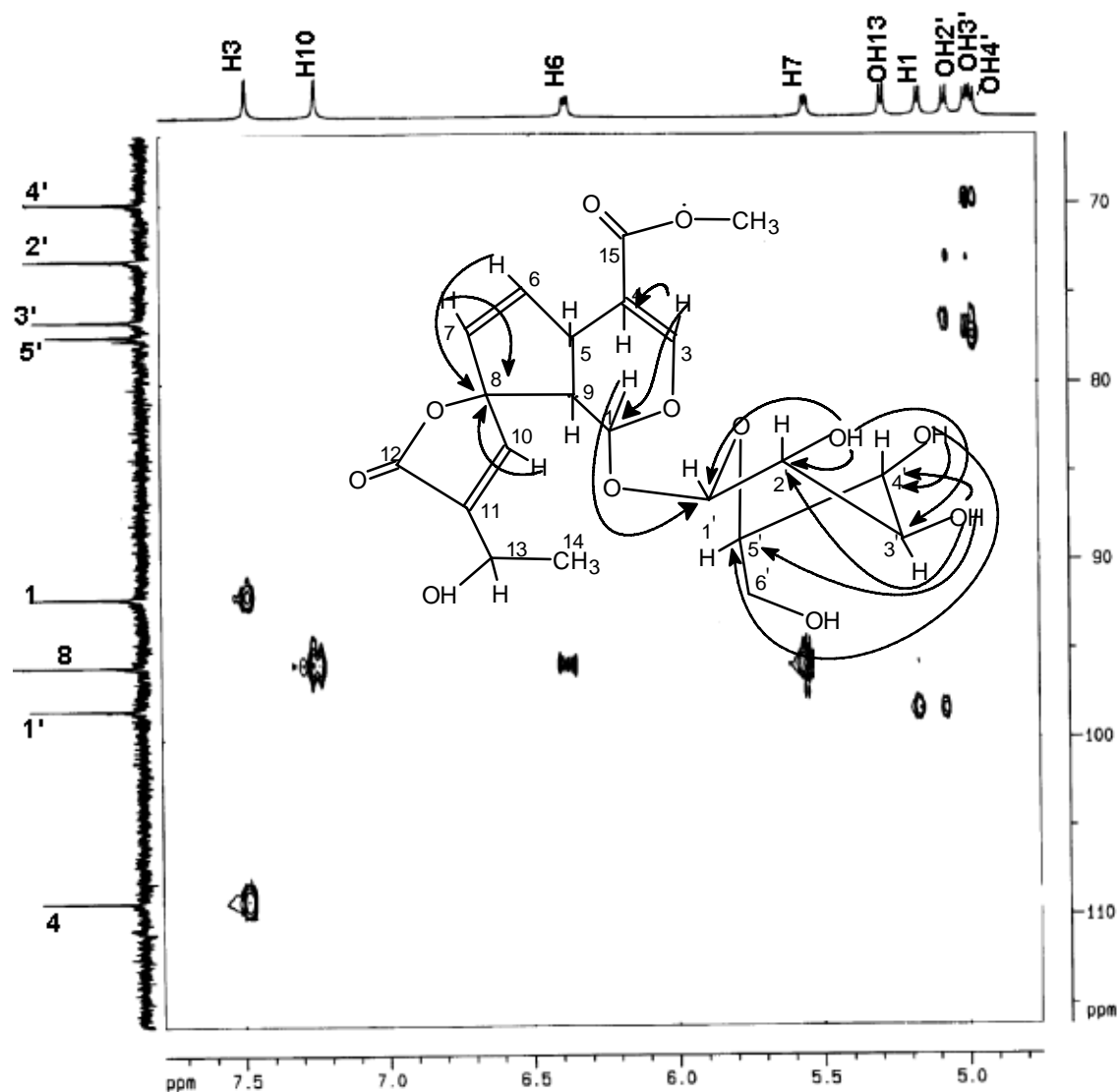


Figura 41- Espectro HMBC de Ha-2 em DMSO- d_6 a 400 MHz (expansão 4.8-7.7ppm x 65-115ppm).

No espectro da Figura 42 (expansão entre 5,0 e 7,5 ppm x 125-175ppm ppm) observa-se três correlações importantes para definir a estrutura. A primeira correlação ocorre entre H-3 com a carbonila à δ 166,0 ppm, possibilitando atribuir este valor a carbonila do éster e fixar a posição do grupo acetila ligada ao C-4. A segunda correlação importante ocorre entre H-10 e a carbonila que absorve em δ 170,0ppm, localizando a lactona na estrutura. Além disso, a correlação do hidrogênio da hidroxila que absorve em δ 5,15 ppm (C13) com o carbono desidrogenado que absorve em δ 137.0 ppm, confirma o substituinte 1-hidroxietil em C-11.

Demais correlações podem ser observadas no espectro HMBC total apresentado na Figura 43.

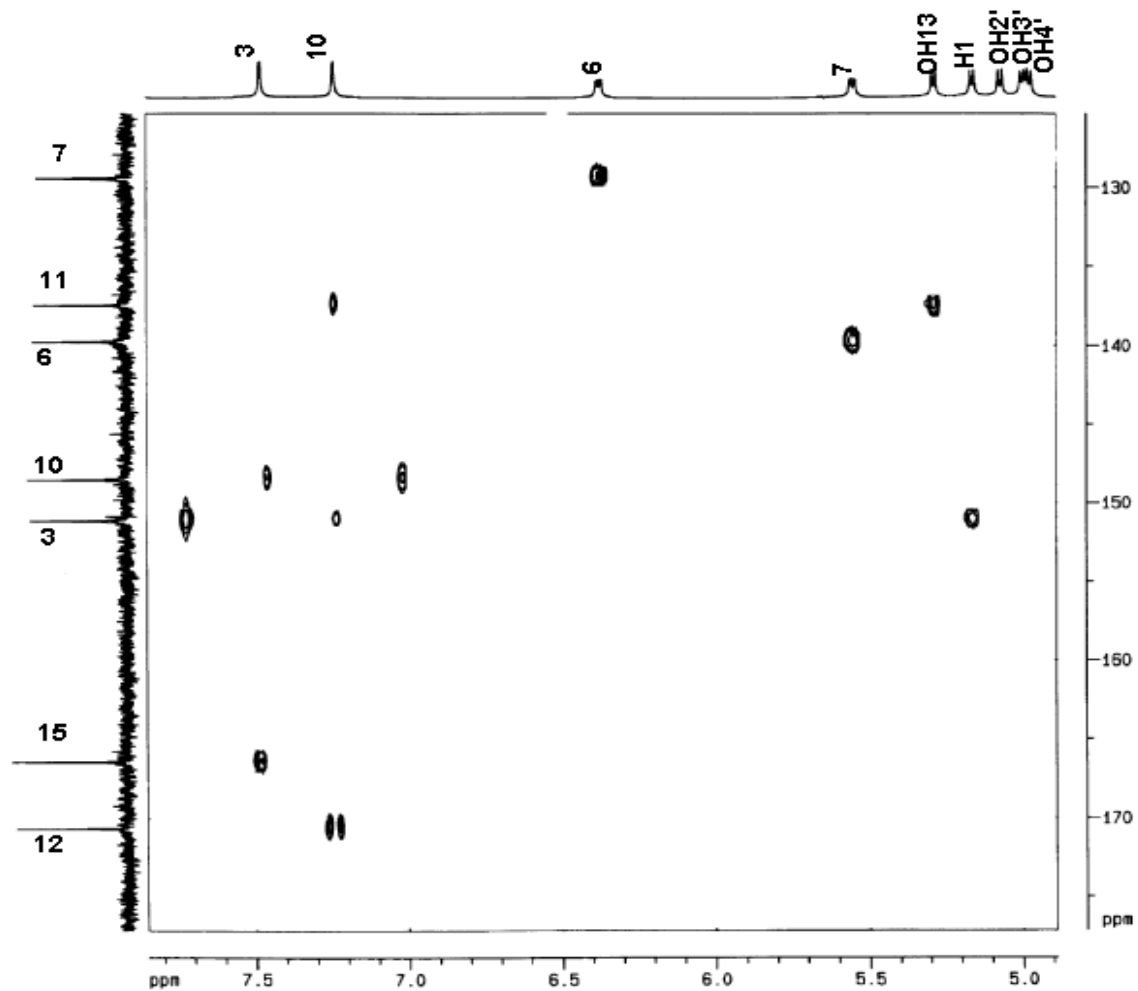


Figura 42 - Espectro HMBC de Ha-2 em DMSO-d₆ a 400 MHz (expansão 5,0-7,5 ppm x 125-175 ppm).

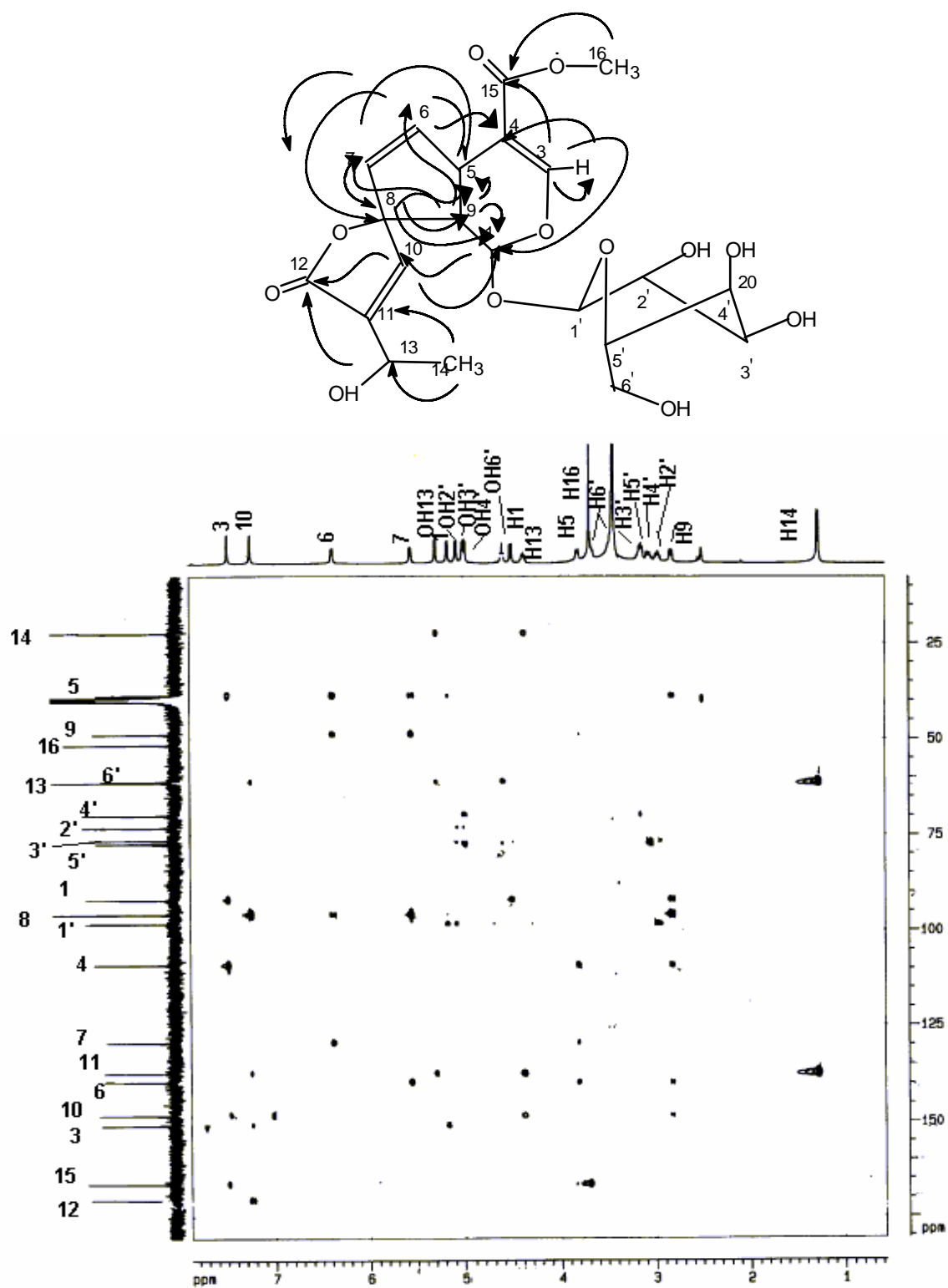
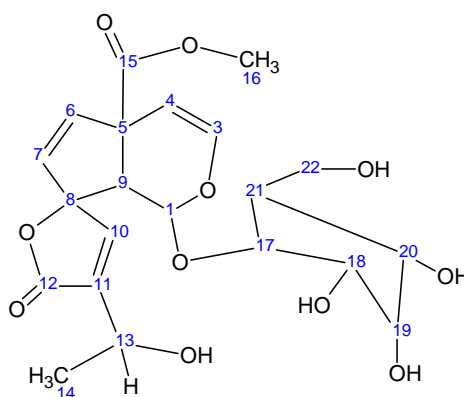


Figura 43 - Espectro HMBC de Ha-2 em DMSO-d_6 a 400 MHz.

Após todas estas análises, a estrutura **32** foi proposta para o metabólito Ha-2, que infelizmente, após uma revisão bibliográfica, verificou-se que tratava da mesma estrutura de um metabólito anteriormente isolado, e que foi denominado de plumerídeo glicosilado. Este mesmo metabólito foi mais tarde isolado da fração acetato de etila de *H. ampla* e, também foi encontrado no extrato acetato de etila de *Himatanthus succuuba*.



Plumerídeo glicosilado (32)

3.1.6.1.10 Análise do espectro NOESY de Ha-2 (32).

O espectro NOESY de Ha-2 (Fig. 44), permitiu a observação de algumas interações espaciais entre hidrogênios, como por exemplo, a interação do hidrogênio que ressona em δ 2,8 ppm (H-9), que se correlaciona com o hidrogênio a 3,8 ppm (H-5), o qual se correlaciona com o hidrogênio que aparece em δ 7,3 ppm (H-6), indicando que os três hidrogênios se encontram no mesmo plano da estrutura, em uma relação *syn*. H-1, que aparece em δ 5,2 ppm, não apresenta correlação com nenhum destes hidrogênios, indicando que o mesmo se encontra em uma posição *anti* aos demais. Este dado é importante para, associado a outro método, determinar a estereoquímica relativa ou absoluta destes centros estereogênicos. A estereoquímica relativa dos carbonos quirais C1, C5 e C9 foram assim determinadas como sendo **R(1*u*, 5*l*, 9*l*)**.

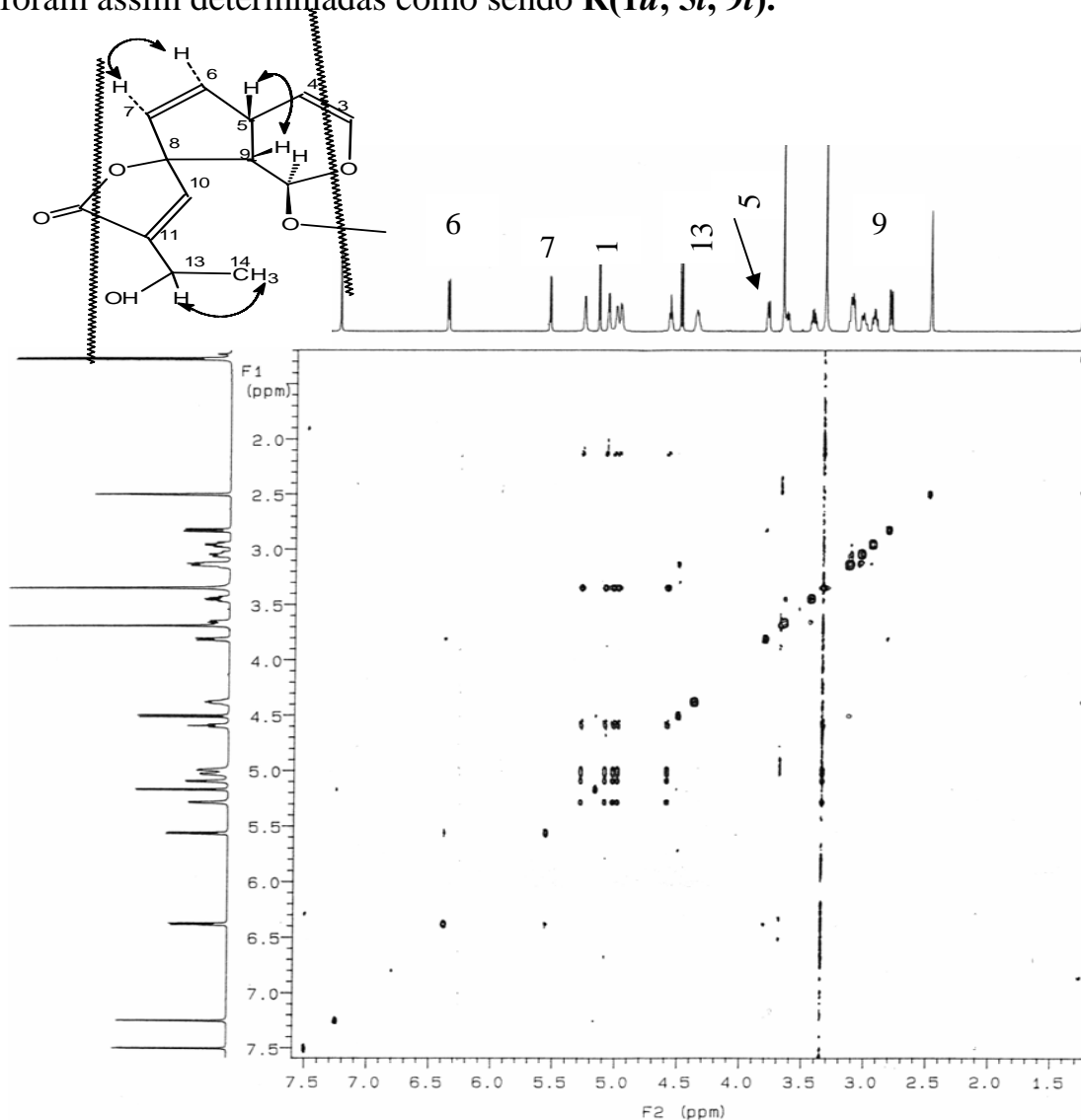


Figura 44- Espectro NOESY de Ha-2 (32) em DMSO- d_6 a 400 MHz.

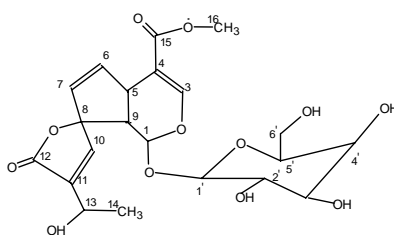


Tabela 3 Deslocamentos químicos ^1H e ^{13}C de Ha-2 (32) em DMSO-D_6 , 400MHz.

	$\delta\text{H}(\text{ppm})$	$\text{J}(\text{Hz})$	$\delta\text{C} (\text{ppm})$
1 CH	5,15 d	4,64	92,0
3 CH	7,48 d	1,6	150,0
4 C			109,0
5 CH	3,8 dd	1,6 6,6	38,0
6 CH	6,37 dd	2,36 6,36	139,0
7 CH	5,5 dd	5,4 1,48	129,0
8 C			95,0
9 CH	2,8 dd	4,6 4,6	48,0
10 CH	7,2 d	1,36	148,0
11 C			137,0
12 C			170,0
13 CH	4,36 m		61,3
14 CH₃	1,27 d	6,52	22,0
15 C			166,0
16 O-CH₃	3,68 s		51,0
1' CH	4,4 d	7,8	98,0
2' CH	2,96 m		73,0
3' CH	3,15 m		76,0
4' CH	3,06 m		69,0
5' CH	3,13 m		77,0
6' CH₂	3,41	3,41	61,0
	3,67 dd	4,39	
13 CH-OH	5,3 d	1,6	
2' CH-OH	5,08 d	5,2	
3' CH-OH	5,01 d	4,7	
4' CH-OH	4,99 d	5,3	
6' CH₂-OH	4,60 dd	3,0 3,0	

3.1.6.2 Ha-2 acetilado (39).

Com a finalidade de se comprovar inequivocamente a estrutura de Ha-2, e para se obter derivados para a comparação de atividades biológicas, este metabólito foi acetilado na presença de anidrido acético e piridina. O produto obtido foi purificado conforme é apresentado na parte experimental deste trabalho.

O produto acetilado de Ha-2, como era esperado, apresentou uma solubilidade superior ao material de partida, portanto os espectros de RMN foram realizados em clorofórmio deuterado. Estes espectros serviram para confirmar a estrutura e foram úteis para a elucidação estrutural de um outro metabólito, através da comparação dos espectros.

3.1.6.2.1 Análise estrutural através de RMN ^1H de Ha-2 acetilado (39).

Ao se comparar os espectros de hidrogênios do metabólito natural com o acetilado (Figuras 45 e 46), observa-se a presença de vários grupos metilas adicionais, com deslocamentos químicos entre δ 1,5 e 2,0 ppm, correspondentes aos quatro grupos acetilas da unidade de glicose e um grupo acetila da aglicona.

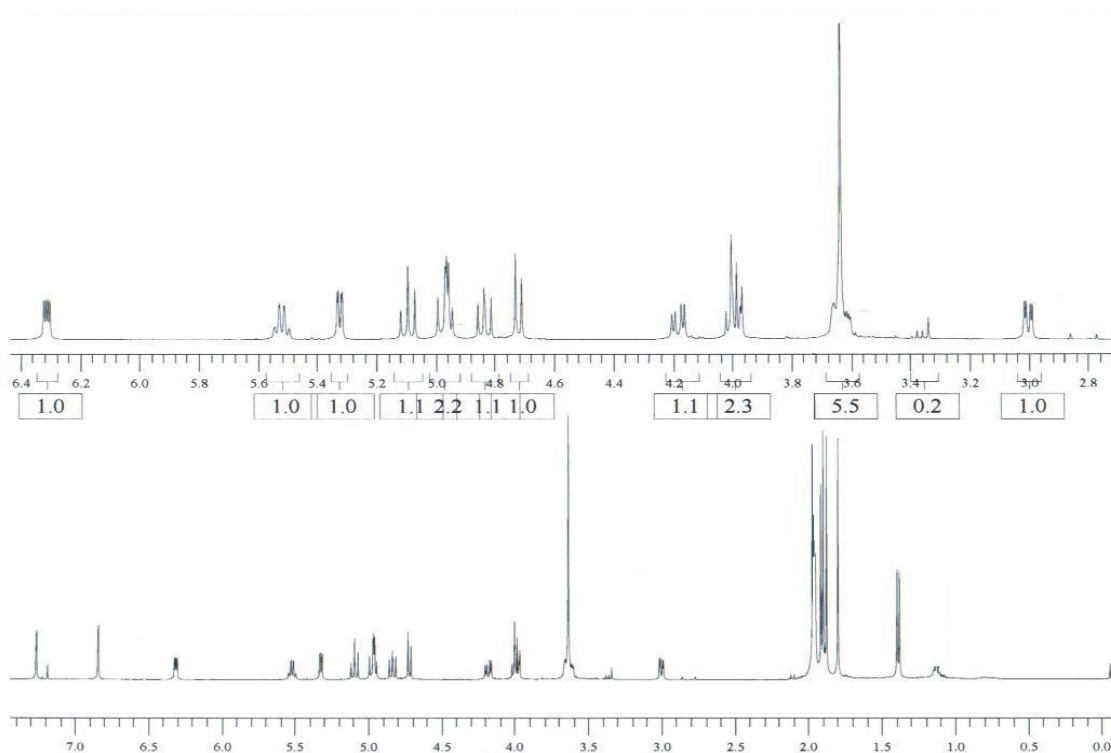


Figura 45- Espectro de RMN ^1H e expansão de Ha-2 acetilado em CDCl_3 a 400 MHz.

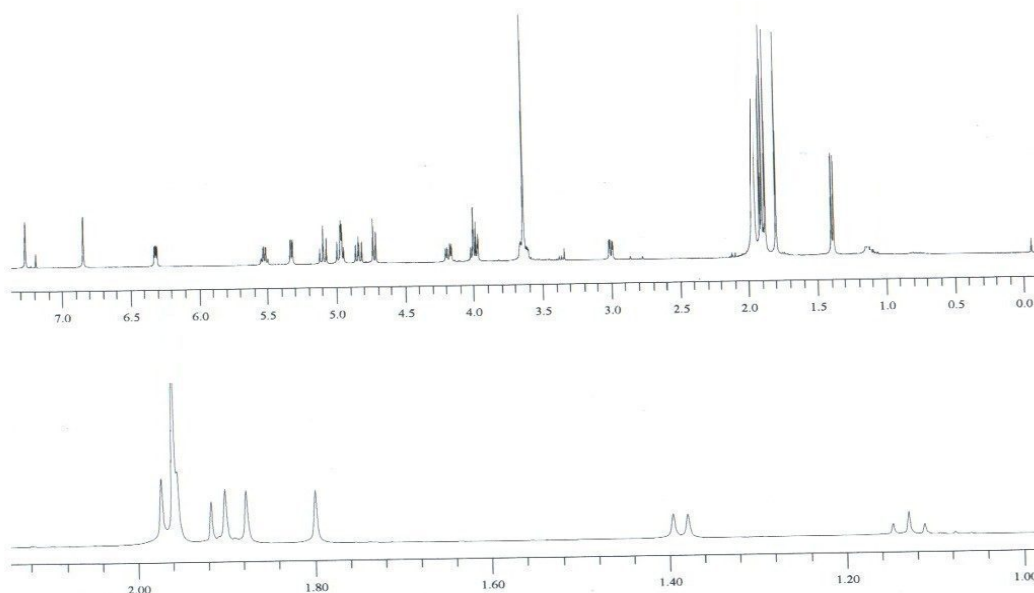
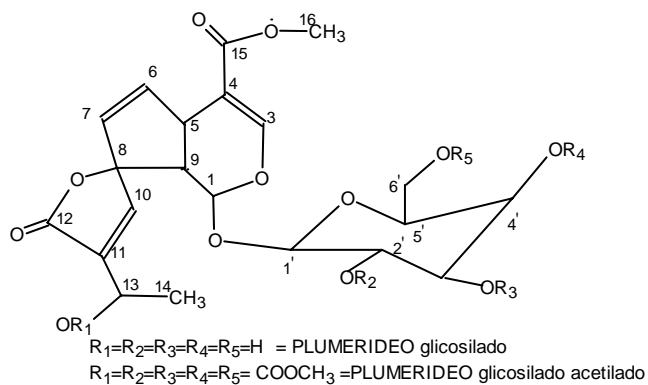


Figura 46- Espectro de RMN ^1H e expansão de Ha-2 acetilado em CDCl_3 a 400 MHz.

3.1.6.2.2 Análise estrutural através de RMN ^{13}C de Ha-2 acetilado (39).

Neste experimento, é interessante de se observar os espectros expandidos (Figuras 47 e 48), que mostram claramente os carbonos carbonílicos e metílicos dos grupos acetilas originados da reação.



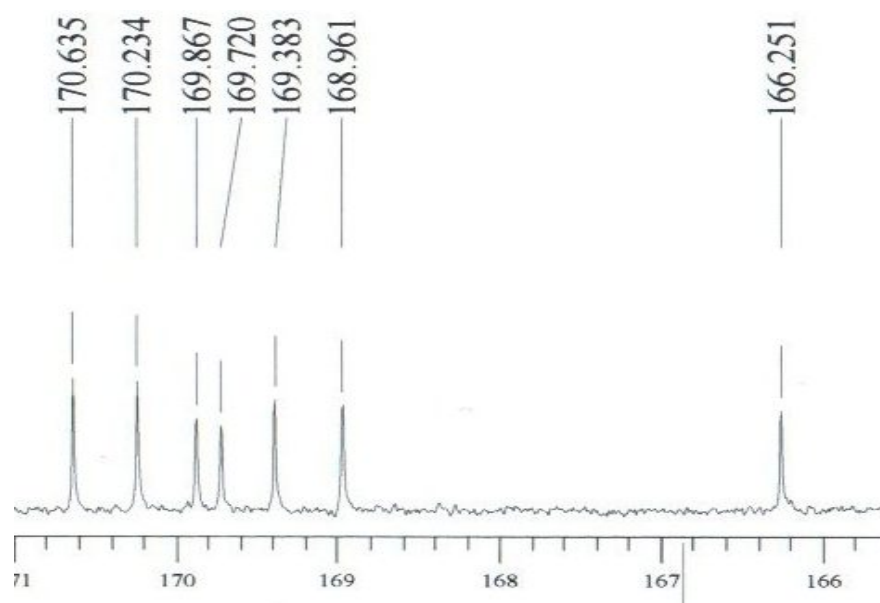


Figura 47- Espectro de RMN ^{13}C de Ha-2 acetilado em CDCl_3 a 400 MHz (expansão 166,0-171,0 ppm).

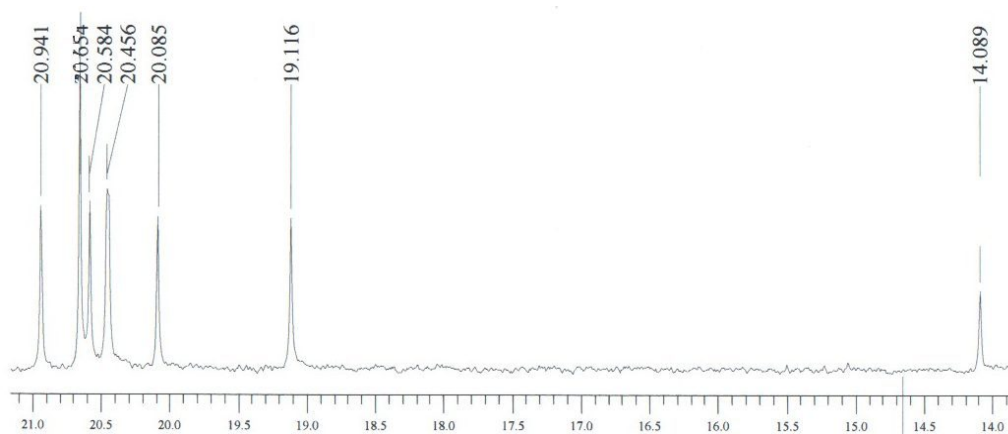


Figura 48- Espectro de RMN ^{13}C de Ha-2 acetilado em CDCl_3 , a 400 MHz (expansão 14,0-21,1ppm).

3.1.6.3 Isolamento, identificação e determinação estrutural do metabólito Ha-1 (33).

Parte da fração butanólica solúvel em metanol de *Humirianthera ampla*, além de Ha-2, foram observadas duas outras substâncias em CCD, com referenciais de deslocamento diferentes entre si. Uma delas, a substância com $R_f = 0,52$ (acetato de etila:metanol, 9:1), foi isolada através de técnicas cromatográficas conforme descritas na parte experimental, na forma de um sólido amorfo, e foi codificada como Ha-1.

3.1.6.3.1 Análise do espectro de massas de Ha-1 (33).

O espectro de massas ESI negativo de Ha-1(Figura 49) apresentou um pico $[M^+ - H]^-$ a $m/e = 455,11893$, correspondendo a uma massa calculada de 456,397 uma para o metabólito.

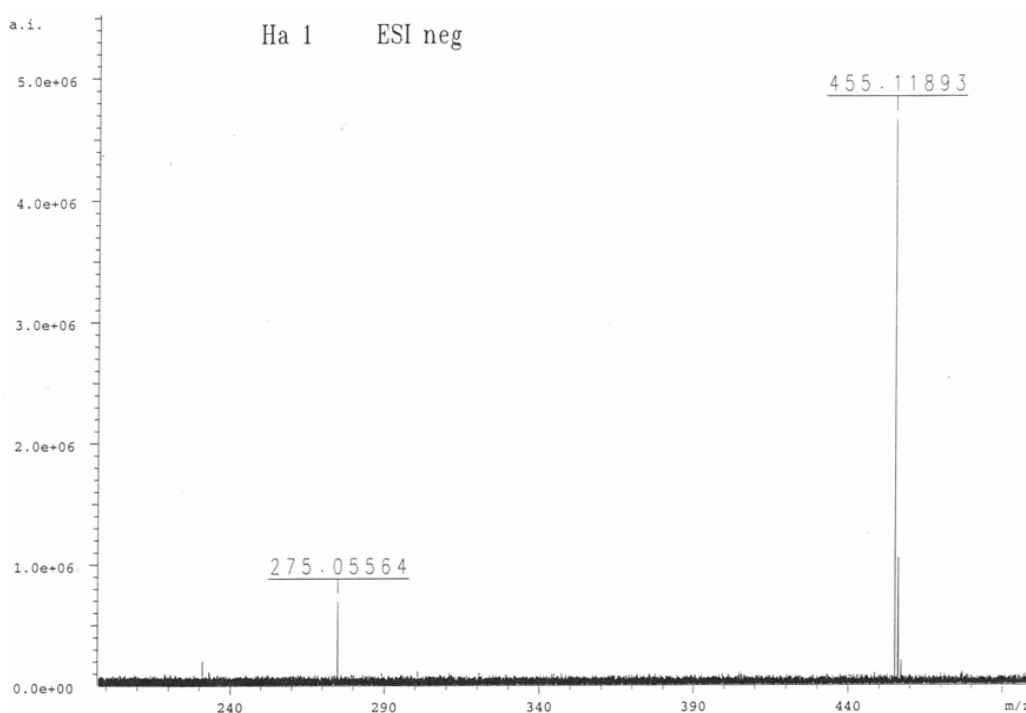


Figura 49- Espectro de massas ESI negativo de Ha-1(33)

3.1.6.3.2 RMN ^1H de Ha-1 (33).

O espectro de hidrogênios desta substância (Figura 50), medido em DMSO- d_6 devido a insolubilidade em solventes menos polares, mostrou deslocamentos químicos muito próximos aos encontrados para Ha-2, com uma diferença importante: a ausência dos hidrogênios metílicos do éster lateral. Associado a este fato, juntamente com a maior polaridade de Ha-1 comparada com Ha-2, e pela análise do espectro de massas, fez com que se suspeitasse, inicialmente, de uma carboxila livre em Ha-1.

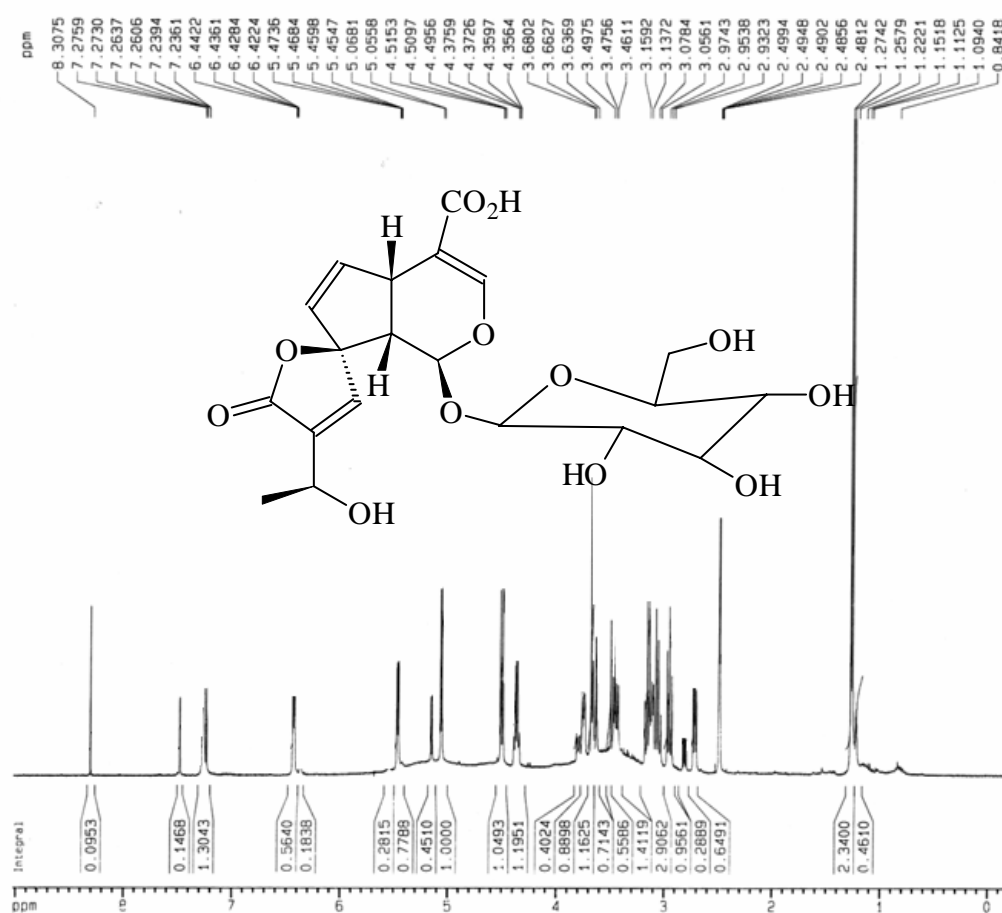


Figura 50- Espectro RMN ^1H de Ha-1(33) em DMSO- d_6 a 400 MHz.

3.1.6.3.3 Análise do espectro de RMN ^{13}C de Ha-1.

O espectro de ^{13}C de Ha-1 (figura 51) apresentou vinte sinais entre δ 20,0 e 171,0 ppm. Os sinais dos carbonos com deslocamentos entre δ 166,1 e 170,7 ppm, correspondem à carbonilas, sendo uma referente a uma função lactona e outra a uma função ácido carboxílico.

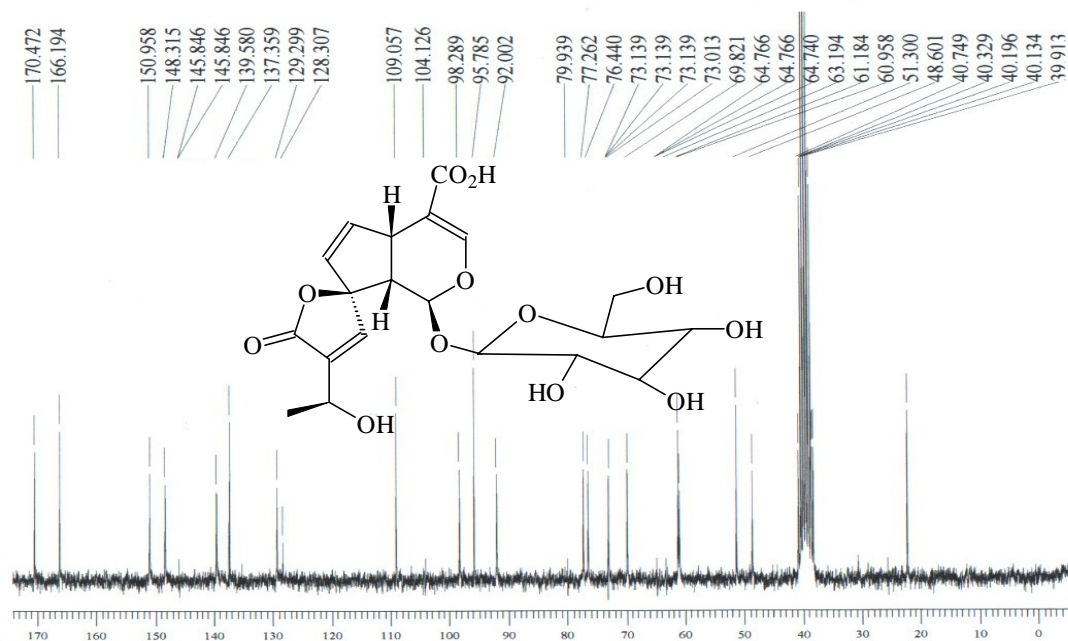


Figura 51- Espectro RMN ^{13}C de Ha-1(33) em DMSO- d_6 a 100 MHz.

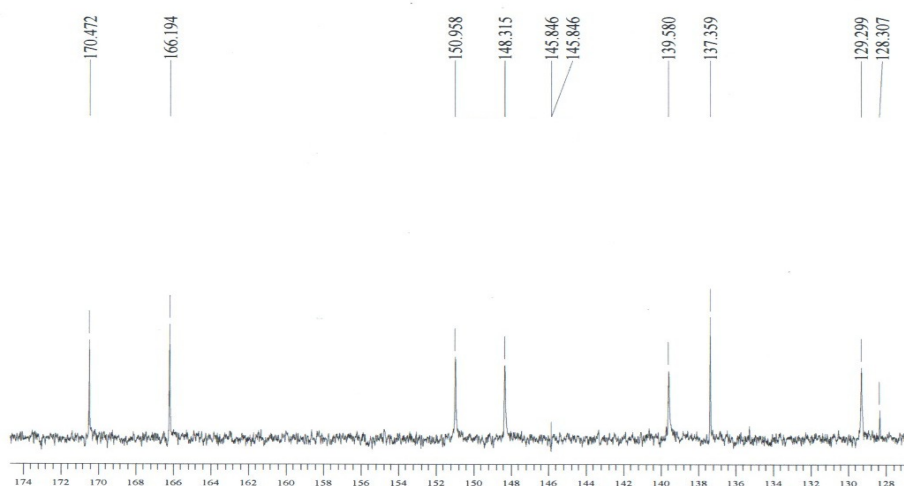


Figura 52- Espectro de RMN ^{13}C de Ha-1 em DMSO- d_6 a 100 MHz (expansão 127,8-174,0ppm).

3.1.6.3.4 Análise do Espectro DEPT 135⁰ de Ha-1 (33).

Através do experimento DEPT 135⁰ (figura 53), observa-se que a estrutura de Ha-1 é constituída de quinze sinais acima da linha base correspondentes aos deslocamentos químicos de uma metila e treze carbonos metínicos. Com a fase negativa, observa-se apenas um carbono metilênico, de uma unidade de glicose.

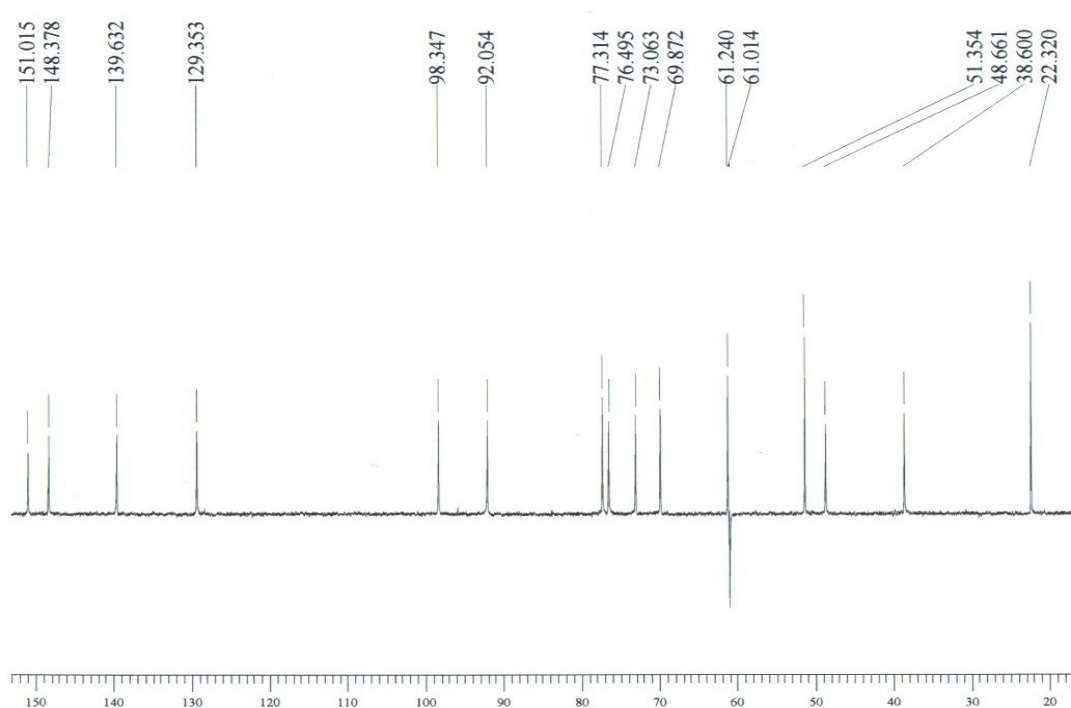


Figura 53- Espectro Dept 135⁰ de Ha-1 em DMSO-d₆ a 100 MHz.

Além disso, no espectro DEPT 135⁰ observa-se a ausência de cinco sinais, correspondentes aos carbonos não hidrogenados. Portanto, com estes dados pode-se propor a estrutura de Ha-1 como sendo muito próxima de Ha-2, constituída de cinco carbonos quaternários (5C), um carbono metilênico (1CH₂), um carbono metílico (1 CH₃) e quatorze carbonos metínicos (13 CH).

3.1.6.4 Ha-1 acetilado (40).

Devido a pouca solubilidade de Ha-1 e, por ser higroscópico, decidiu-se pela sua derivatização, neste caso, através de uma reação de acetilação. Desta maneira, obteve-se um produto derivatizado de fácil manuseio, principalmente no preparo de amostras em solventes menos polares para a RMN.

3.1.6.4.1 Estudo do espectro de RMN ^1H de Ha-1 acetilado(40).

Neste espectro (figura 54), medido em CDCl_3 , observou-se a presença de seis grupos metilas correspondentes aos grupos acetilas resultantes da reação de acetilação e uma metila já observada antes da reação. Este dado foi importante, comprovando que a estrutura é formada por cinco hidroxilas (ver expansão da Figura 55), sendo quatro hidroxilas da unidade de glicose e uma do sistema aglicona, como em Ha-2.

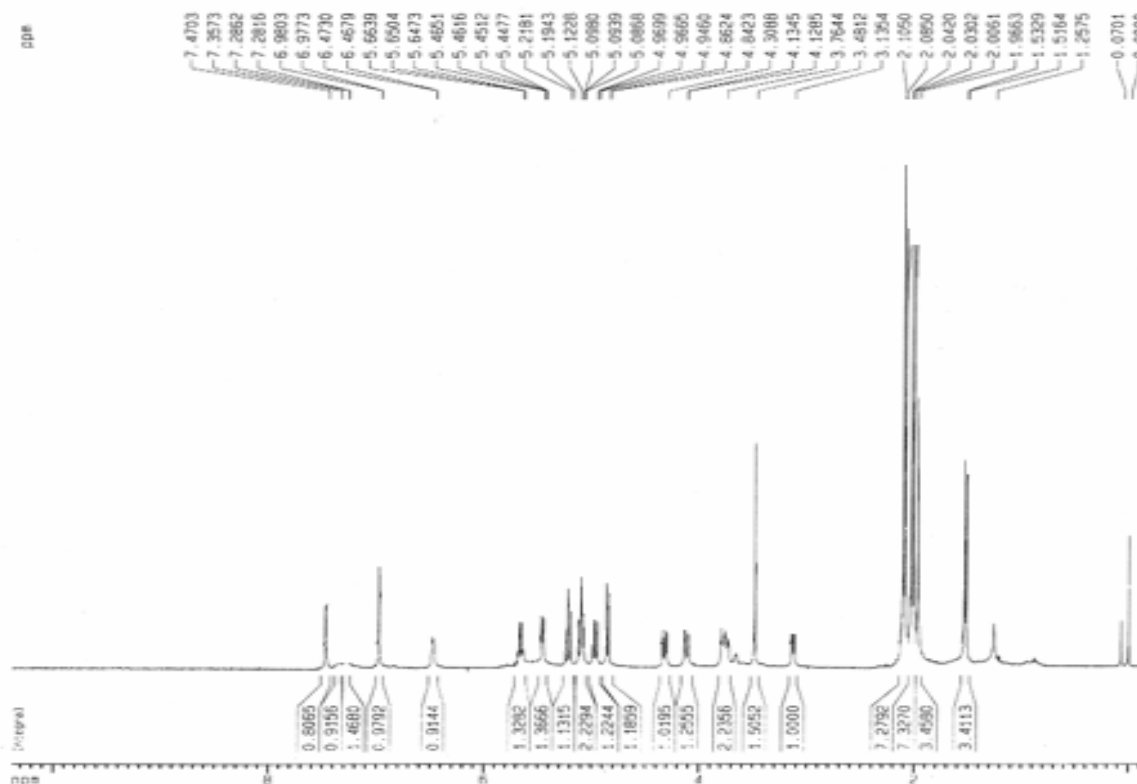


Figura 54 Espectro RMN ^1H DE Ha-1 acetilado em CDCl_3 a 400 MHz.

Para facilitar a identificação estrutural deste metabólito, foi importante uma comparação com os espectros de Ha -2 (Figura 55).

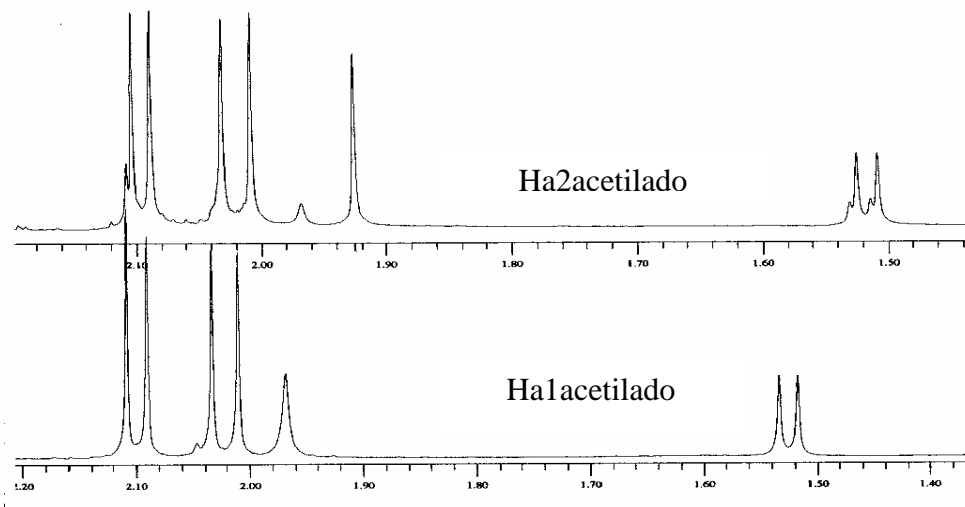


Figura 55- Comparação entre os Espectro RMN ^1H de Ha-1 e Ha-2 acetilado em CDCl_3 a 400 MHz.

O espectro da Figura 54 superior (região das ressonâncias dos grupos metilas) mostra a análise de uma amostra de Ha-2-acetilado contendo uma pequena impureza de Ha-1-acetilado, enquanto que abaixo se observa o espectro de Ha-1-acetilado puro. Esta comparação foi importante para a confirmação de que se tratam de metabólitos diferentes, porém com pequenas variações estruturais.

O espectro da Figura 55 foi importante para a comparação de que a estrutura de Ha-1 não tem o grupo metoxila, presente como em Ha-2.

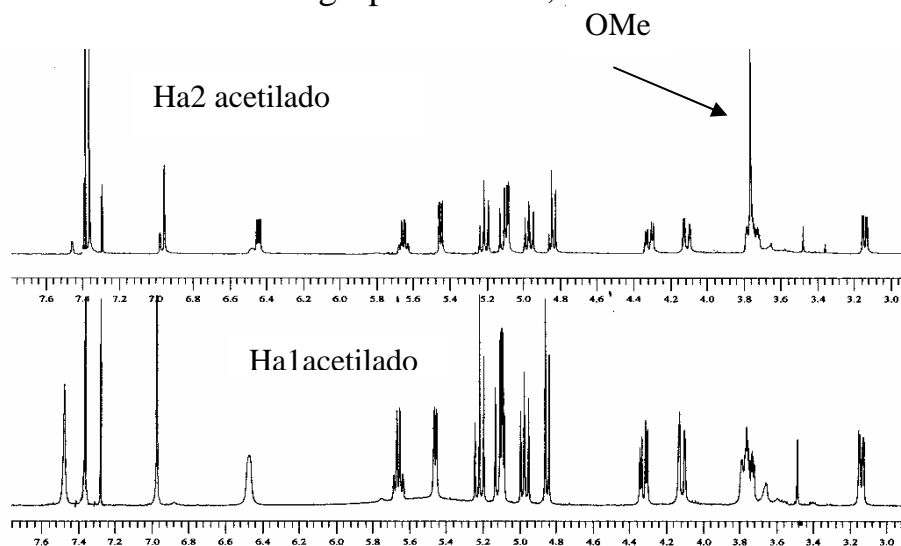


Figura 56 – Comparação entre os espectros RMN ^1H DE Ha-1 e Ha-2 acetilado

Além disso, a sobreposição de espectros mostra diferenças em deslocamentos químicos de alguns hidrogênios olefínicos, conforme pode ser observado na comparação da Figura 57.

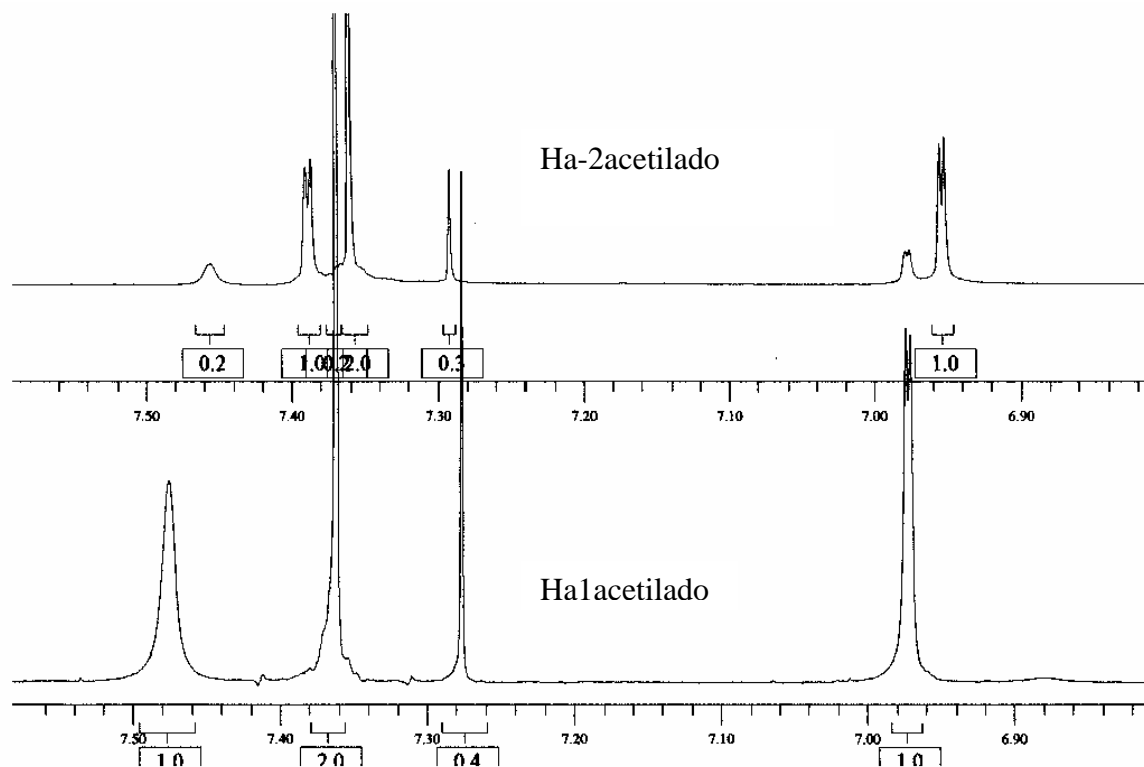


Figura 57 - Comparação dos espectros de RMN ¹H de Ha-1 e Ha-2 acetilado em CDCl₃ a 400 MHz.

3.1.6.4.2 Estudo do espectro de RMN ¹³C de Ha-1 acetilado (40).

Neste espectro, são observados no total 30 sinais, sendo que na região entre δ 160,0-171,0 ppm são observadas ressonâncias correspondentes à sete carbonilas, sendo cinco correspondentes às carbonilas dos grupos acetilas, uma da função lactona e a outra atribuída como sendo a carbonila de um ácido carboxílico. Importante de se observar no espectro foi a ausência da carbonila e do carbono metílico do éster em C-4, que em Ha-2 ressonam em δ 166,0 e em δ 51 ppm, respectivamente. Demais sinais de carbonos se assemelham muito com os sinais de carbonos da estrutura de Ha-2.

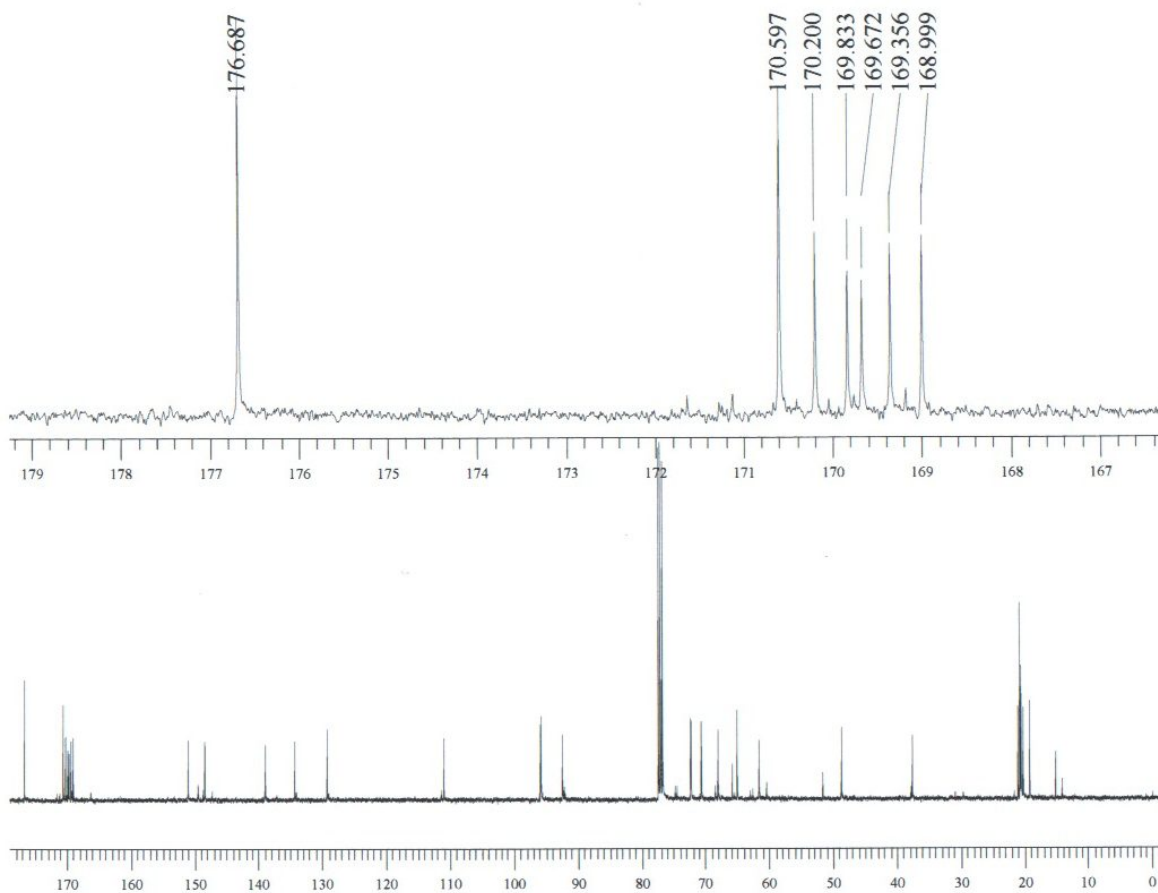


Figura 58- Espectro RMN ^{13}C DE Ha-1 acetilado comparado com expansão da região de 167 a 179 ppm em CDCl_3 a 100 MHz.

3.1.6.4.3 Estudo do espectro de HMQC de Ha-1 acetilado (40).

O espectro de HMQC mostra as correlações dos carbonos hidrogenados de Ha-1 acetilado. Observamos que o carbono C-14 em δ 19.14 ppm possui correlação com H-14 em δ 1.5 ppm; C-1, em δ 92.44 ppm, com H-1 δ 5.1 ppm ou ainda o carbono olefínico C-3, em δ 150.84 ppm, com H-3 em δ 7.43 ppm. As correlações são semelhantes às correlações do HMQC de plumerídeo glicosilado acetilado já analisados anteriormente, com exceção da correlação de C-16, em δ 52 ppm, com H-16, em δ 3.64 ppm, correspondente à metila do éster.

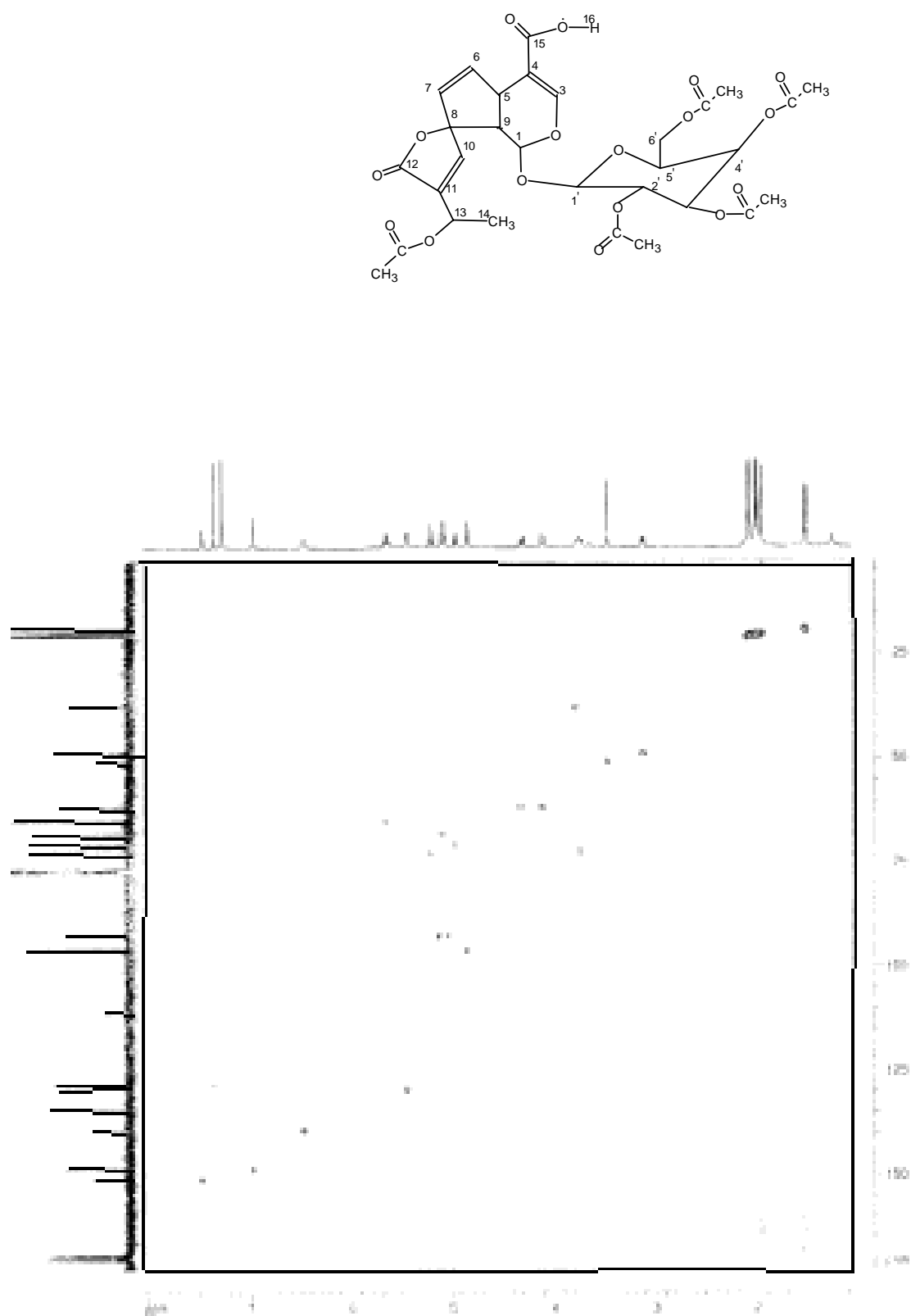


Figura 59- Espectro RMN 2D HMQC DE Ha-1 acetilado em CDCl₃ a 400 MHz.

3.1.6.5 Reação de metilação de Ha-1.

Uma maneira de comprovar a estrutura de Ha-1 como sendo a de um composto com uma função carboxila livre, uma pequena quantidade do metabólito foi tratado com diazometano em éter etílico conforme o figura 60. Após algumas horas sob agitação magnética e controle por CCD, observou-se o consumo do reagente e a formação de um produto de Rf superior, confirmando a presença de uma função ácido carboxílico na estrutura.

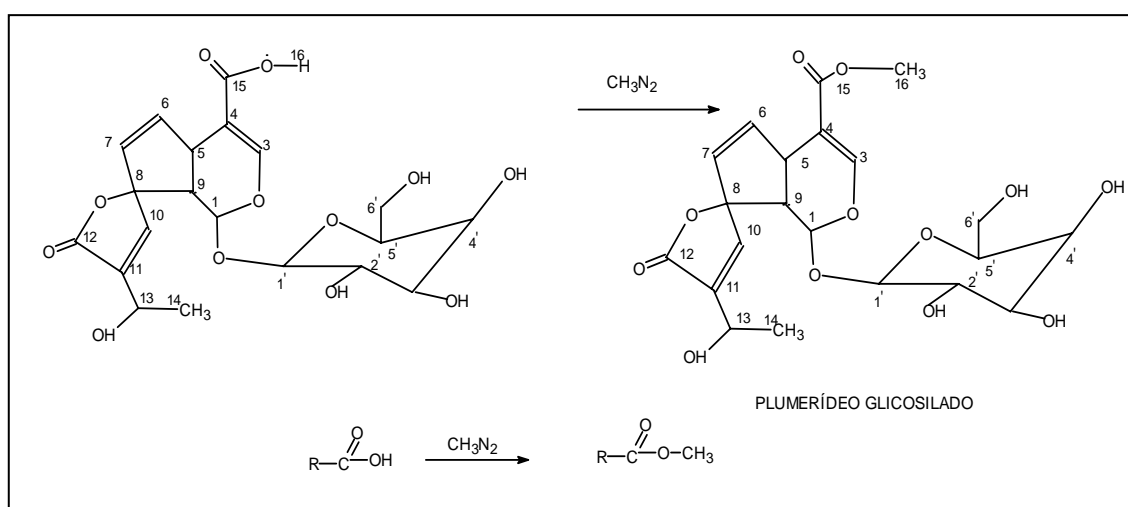


Figura 60 Reação de metilação com diazometano.

3.1.6.5.1 Estudo de RMN ^1H do metabólito Ha-1 metilado(32).

Este espectro (Figura 61) confirmou a reação de metilação, portanto a presença da função carboxila livre, através de um sinal em 3,8 ppm, na forma de um singlete, com integração para 3 hidrogênios.

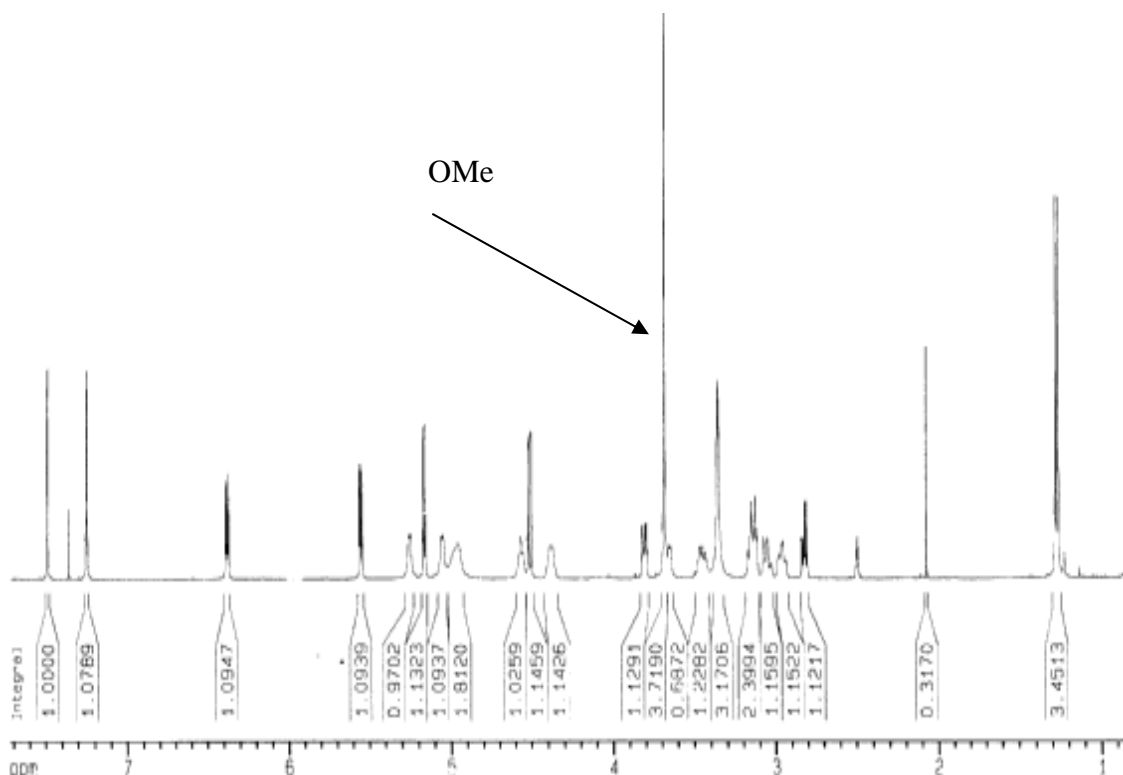


Figura 61 Espectro de RMN ^1H de Ha-1 metilado em DMSO-d_6 a 400 MHz.

A comparação em CCD deste produto de metilação com Ha-2, mostrou que se tratavam da mesma substância, sendo o grupo metila a única diferença entre os dois metabólitos. Infelizmente, este metabólito é conhecido, e tinha sido isolado anteriormente em 1990 por Kardono e colaboradores, da espécie *Pluméria rubra*. Entretanto, este metabólito foi isolado pela primeira vez como constituinte de uma planta da família Icacinaceae.

Como a estereoquímica de Ha-2 é conhecida como sendo. *R* (1*u*, 5*l*, 9*l*)., pode-se confirmar a estrutura **33** para Ha-1, com a mesma estereoquímica relativa.

3.2 Estudo dos constituintes químicos da espécie *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae).

A casca de *Himatanthus sucuuba* foi escolhida para este trabalho devido a sua grande utilização na medicina popular, na Amazônia, para diferentes doenças. A planta é conhecida na região do vale do Purus (Acre) por sucuba ou sucuuba. Neste trabalho, o extrato etanólico bruto da planta foi fracionado por solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol) conforme fluxograma 2 da página 103 e, suas frações analisadas conforme mostrado a seguir.

3.2.1 Estudo da fração hexânica de *Himatanthus sucuuba*

Neste trabalho, a fração hexânica da *Himatanthus sucuuba*, após evaporação, resultou em um produto sólido branco. A adição de etanol, à solução deste produto sólido branco solubilizado em clorofórmio, resultou na precipitação de outro material sólido, constituído por duas substâncias (CCD) de difícil separação (CC). Este precipitado obtido foi codificada como HS 4, e teve sua estrutura analisada através de RMN de ^1H e de ^{13}C .

A literatura^{45, 46} descreve que na fração hexânica desta planta, foram, anteriormente, detectadas as seguintes substâncias: cinamato de α -amirina, cinamato de lupeol e acetato de lupeol.

3.2.1.1 Estudo do espectro de RMN ^1H de HS 4.

O espectro de RMN ^1H desta amostra (figura 62 e 63) apresentou sinais de ressonância de hidrogênios na região entre 7,0 e 7,7 ppm, sugerindo hidrogênios aromáticos na estrutura. Além disso, apresentou ressonâncias na região de hidrogênios olefínicos, além de vários hidrogênios em campo alto, difíceis de serem atribuídos. Dois hidrogênios, que ressonam em 6,4 ppm em forma de dubletos, acoplando entre si (espectro COSY) com um $J = 16$ Hz, sugeriram dois hidrogênios olefínicos em uma relação *trans*, possivelmente de uma unidade cinamato da estrutura. Portanto, este analito, em concordância com a literatura, poderia ser tanto α -amirina ou lupeol, esterificados na forma de cinamato, (16) e (17), ou ambos. A região do espectro entre 0,6-1,6 ppm (Figura 63) mostra ressonâncias para uma série de grupos metilas, reforçando a possibilidade de se tratarem de duas substâncias.

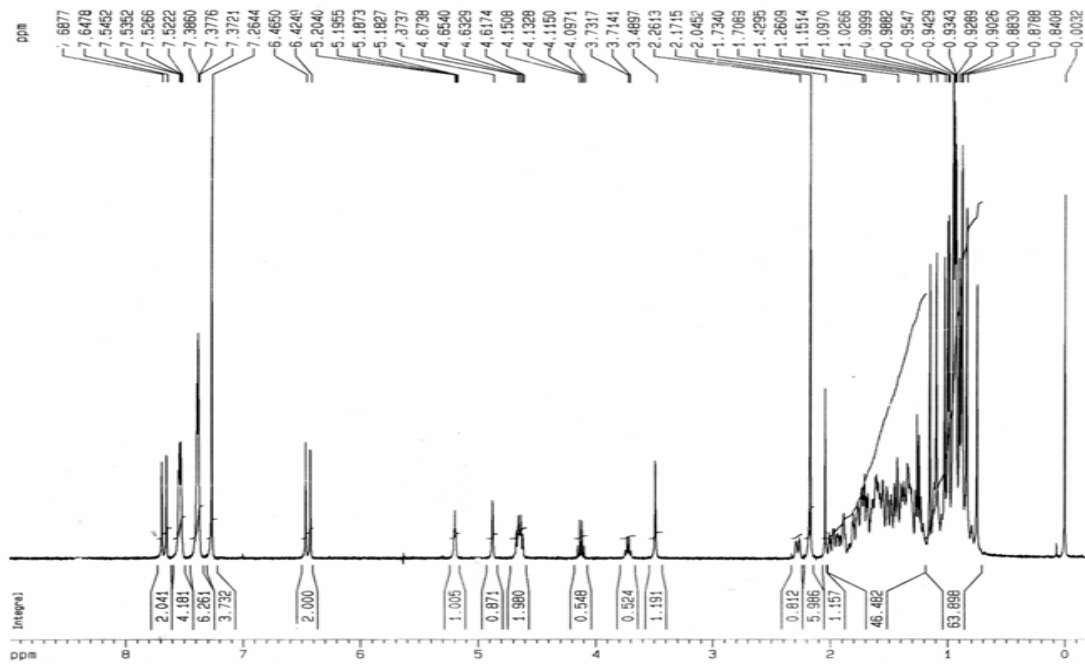


Figura 62- Espectro de RMN ^1H de Hs 4 em CDCl_3 a 400 MHz

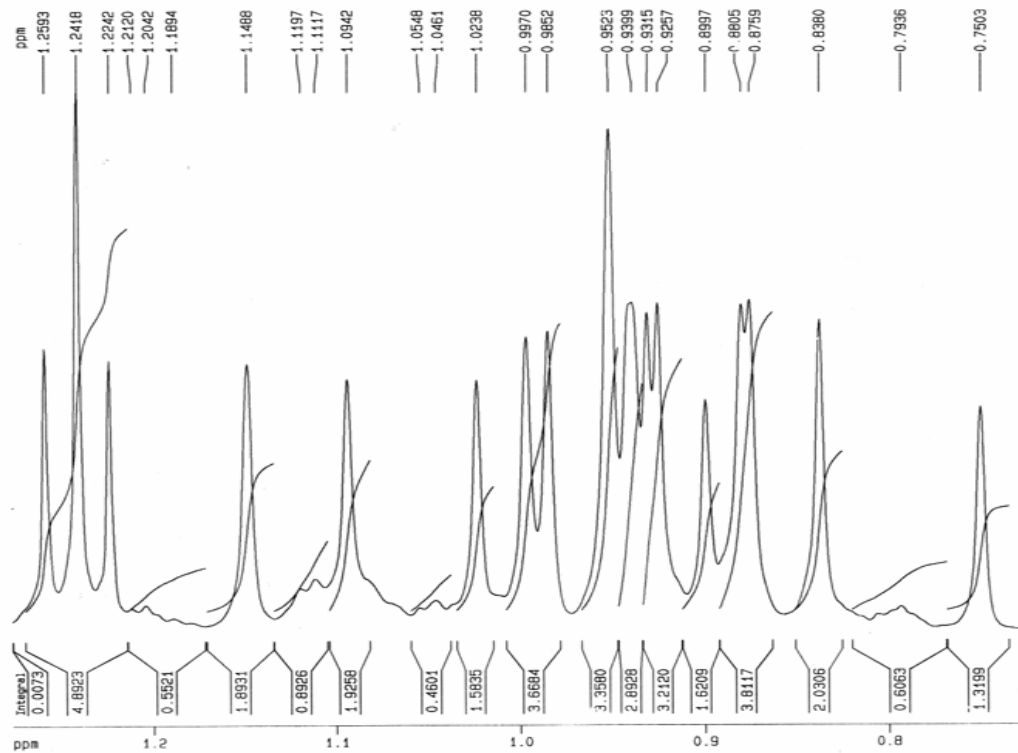


Figura 63- Espectro de RMN ^1H expandido de HS 4 em CDCl_3 a 400 MHz

3.2.1.2. Estudo do espectro RMN ^{13}C DE HS 4

O espectro de RMN ^{13}C (figura 64) apresentou, entre vários sinais, um sinal de absorção de um carbono de carbonila em 166,8 ppm, sugerindo a carbonila do cinamato. Além disso, os deslocamentos químicos em 118,8 e 144,0 ppm, de dois carbonos olefínicos, corroboram com a presença da unidade cinamato na estrutura. O deslocamento de um carbono metínico em 81,0 ppm sugere tratar-se de um carbono oxigenado, que neste caso seria o C-10 carbinólico, esterificado com o ácido cinâmico. A região do espectro em campo alto mostra uma série de sinais, principalmente de carbonos metílicos e metilênicos, o que sugere que a amostra trata-se, na realidade, de uma mistura de duas substâncias triterpênicas. Decidiu-se, por se tratarem de substâncias conhecidas, a não separação das mesmas.

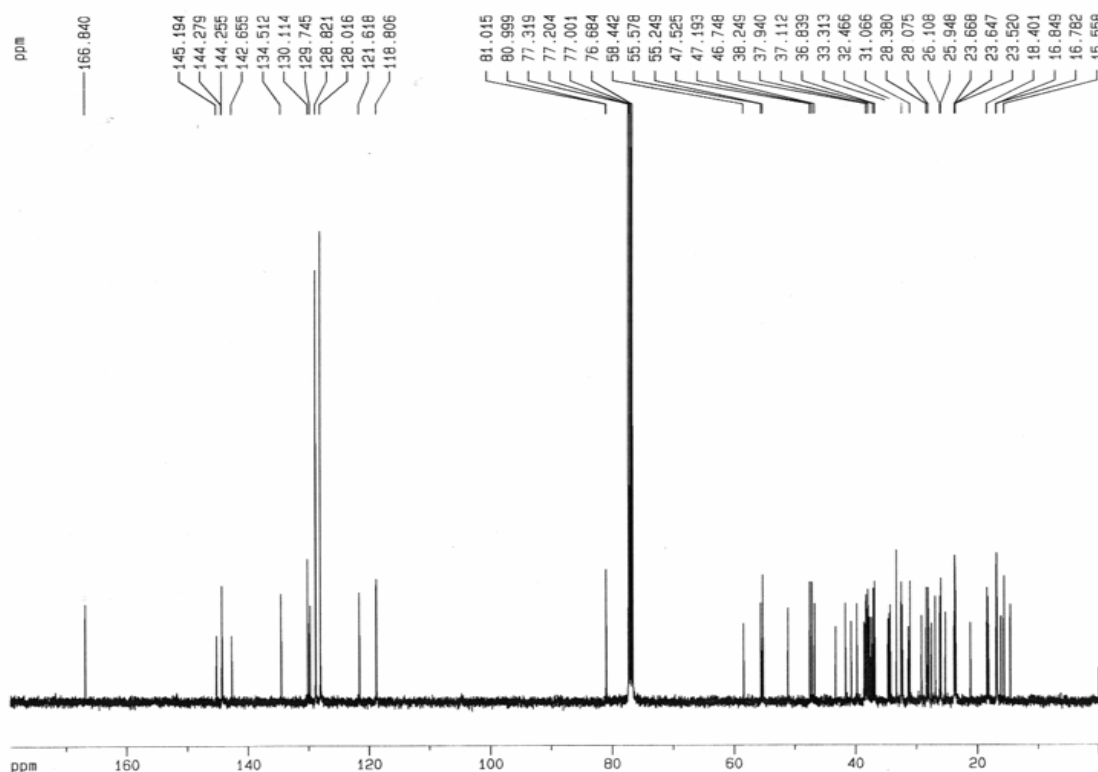


Figura 64- Espectro de RMN ^{13}C de HS 4 em CDCl_3 a 100 MHz.

3.2.1.3 Estudo dos espectros de RMN 2D COSY de HS 4

O espectro COSY da mistura (figura 65) foi útil apenas para identificar o sistema de spins da unidade cinamato das estruturas.

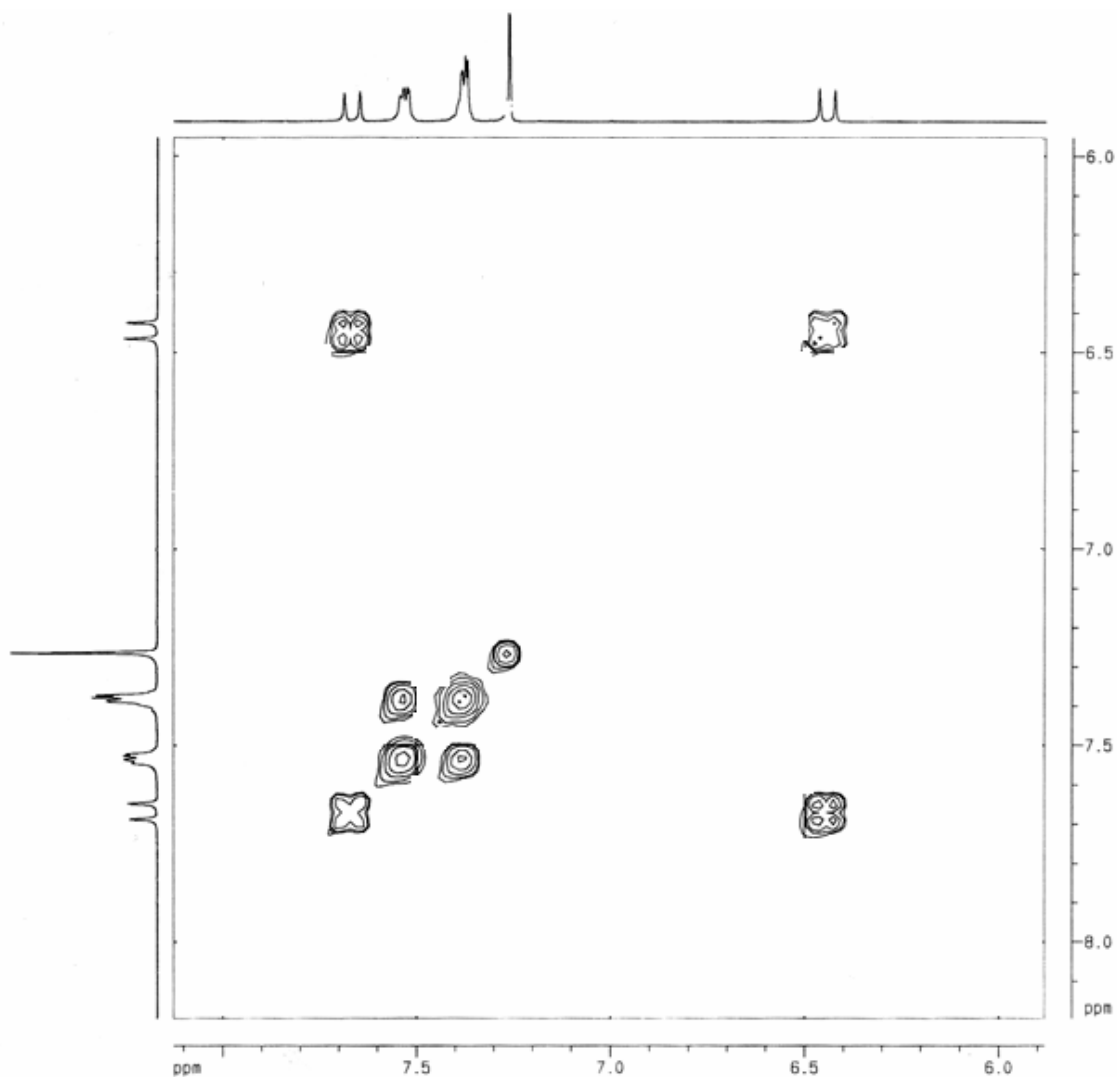


Figura 65- Espectro COSY de HS 4 em CDCl_3 a 400MHz.

3.2.1.4 Estudo do espectro de RMN 2D HMQC de HS 4

O espectro HMQC da mistura foi útil apenas para correlacionar hidrogênios com seus respectivos carbonos da parte mais desimpedida do espectro, conforme pode ser visualizado na Figura 66.

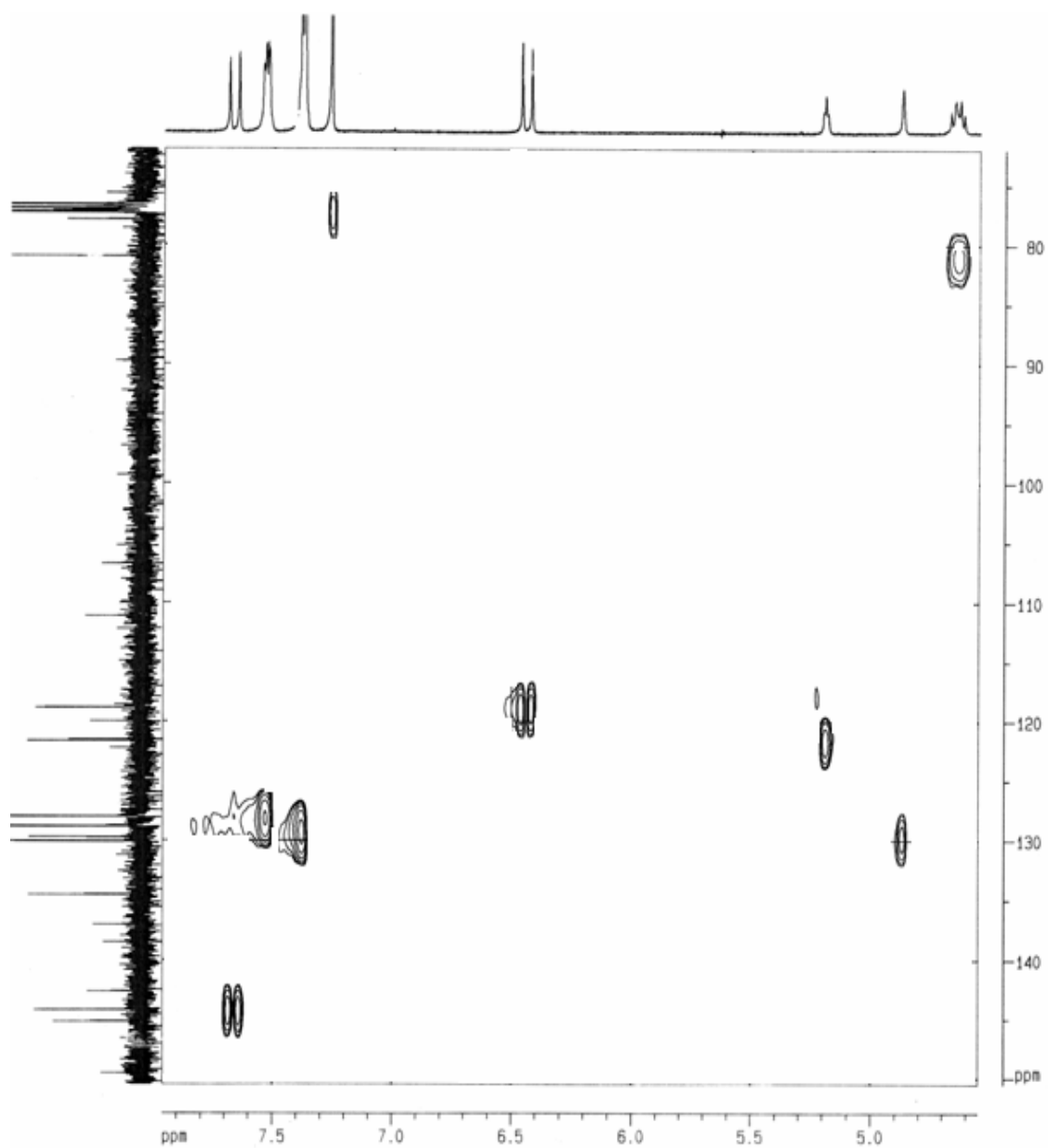
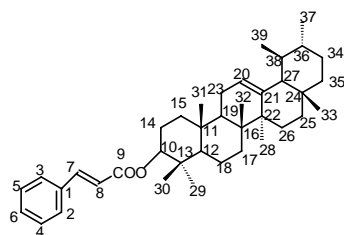
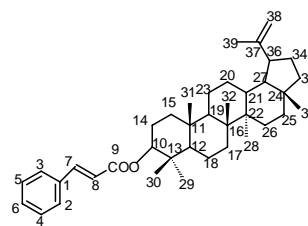


Figura 66- Espectro HMQC de HS 4 em CDCl_3 a 400MHz.



CINAMATO DE ALFA AMIRINA

(27)



CINAMATO DE LUPEOL

(28)

Tabela 4 Principais deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de cinamato de alfa amirina e cinamato de lupeol, comparativo com dados da literatura (CDCl_3 , 400MHz)

27					28			
N ^o	$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}^\#$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta\delta^{13}\text{C}^\#$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}^\#$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}^\#$
1			134.5	135				135.5
2	7.54	7.35	128.83	129.96	7.54	7.25		129.9
3			128.83	129.96				129.9
4			128.03	129.28				129.2
5			128.03	129.28	7.29	7.00		129.2
6	7.29	7.10		131.5		7.00		131.49
7	7.66	7.56	144.00	146.68	7.66	7.59	144.00	146.68
8	6.44	6.43	118.85	118.54	6.44	6.3	118.85	118.54
9			166.8	166.09			166.88	166.09
10	4.65	4.70	81	81.60	4.65	4.7	81.00	81.60
11								
12				56.26			56.26	
13								
14						1.8		
15						1.7		
20	5.19	5.31	121.6	116.72				
21			142.6	143.63				
19								
35								
36				38.34		2.5		
37							150.23	150.23
38				42.00	4.65	4.65	130.43	110.40
39					1.68			

$\delta^1\text{H}^\#$ e $^{13}\text{C}^\#$ deslocamentos químicos dos Hidrogênios e dos Carbonos observados da literatura.^{45,46}

3.2.2 Estudo da fração clorofórmica de *H. sucuuba*.

Desta fração, foram isolados os metabólitos codificados por Hs-5 e Hs-7.

3.2.2.1 Determinação estrutural do metabólito codificado como Hs-5(43).

Este metabólito, codificada inicialmente por Hs-5, foi obtida da fração clorofórmica neutra da espécie *Himatanthus sucuuba*, na forma de cristais incolores, após recristalização com metanol. A estrutura para Hs-5 foi proposta após análise de todos os espectros a seguir apresentados.

3.2.2.1.1 Análise do espectro de massas de Hs-5 (43).

O pico que se observa no espectro de massas da figura 67 do metabólito Hs-5 de 331.07934 $[M+Na]^+$ determina de que a massa do analito é 308.09464 uma.

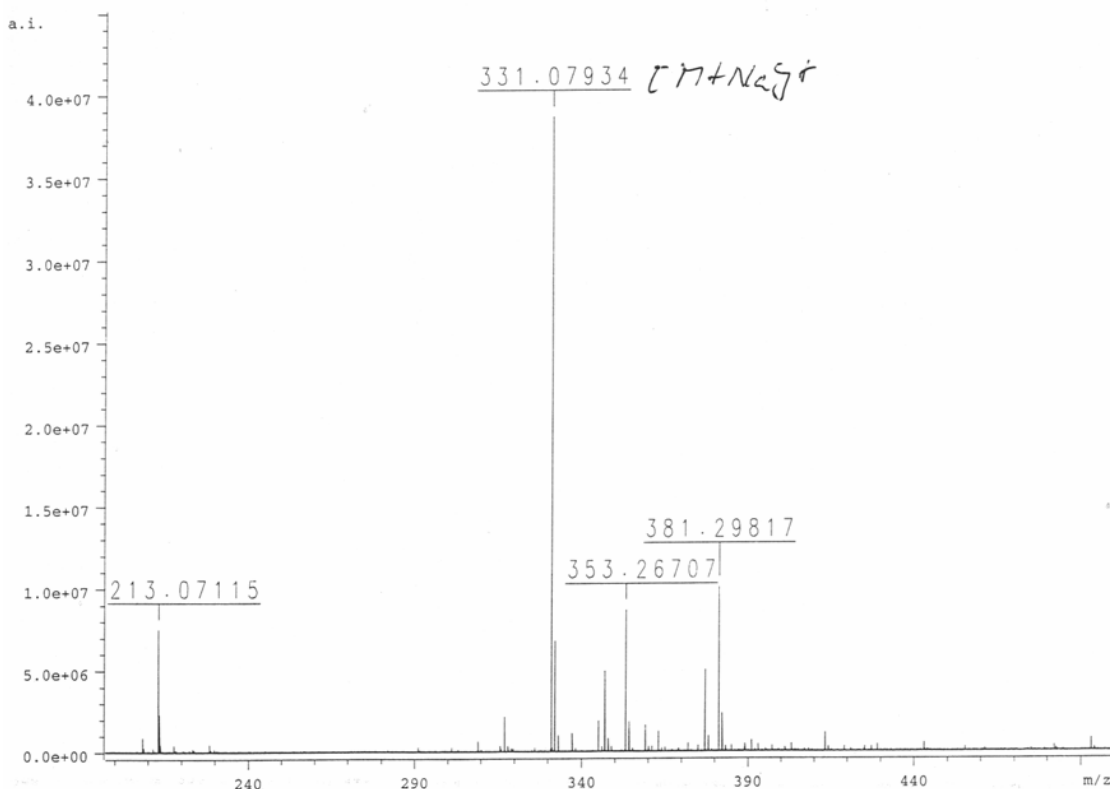


Figura 67- Espectro de massas de Hs-5 (43).

3.2.2.1.2 Análise estrutural de Hs-5 (43) por RMN de ^1H .

O espectro de ^1H de Hs-5 (figura 68) apresentou sinais de absorção com deslocamentos entre δ 1,96 a 6,98 ppm. Os sinais de ressonância em campo baixo, com deslocamentos em δ 6,98; 6,01, 5,95, 5,56 e 5,12 ppm, sugerem hidrogênios metínicos ligados a carbonos insaturados e/ ou oxigenados. O sinal observado em δ 3,69 ppm, na forma de um singlete, com integração para 3 hidrogênios, sugere a presença de uma metoxila, enquanto que a absorção em δ 1,96 ppm, com integração para 3 hidrogênios, sugere a presença de uma metila. Além disso, o espectro mostra um dubleto em δ 6,68 ppm, que após a análise do espectro HMQC (sem correlação com carbono), e pelo desaparecimento pela adição de uma gota de D_2O , sugeriu-se a presença de uma hidroxila, ligada a um carbono secundário.

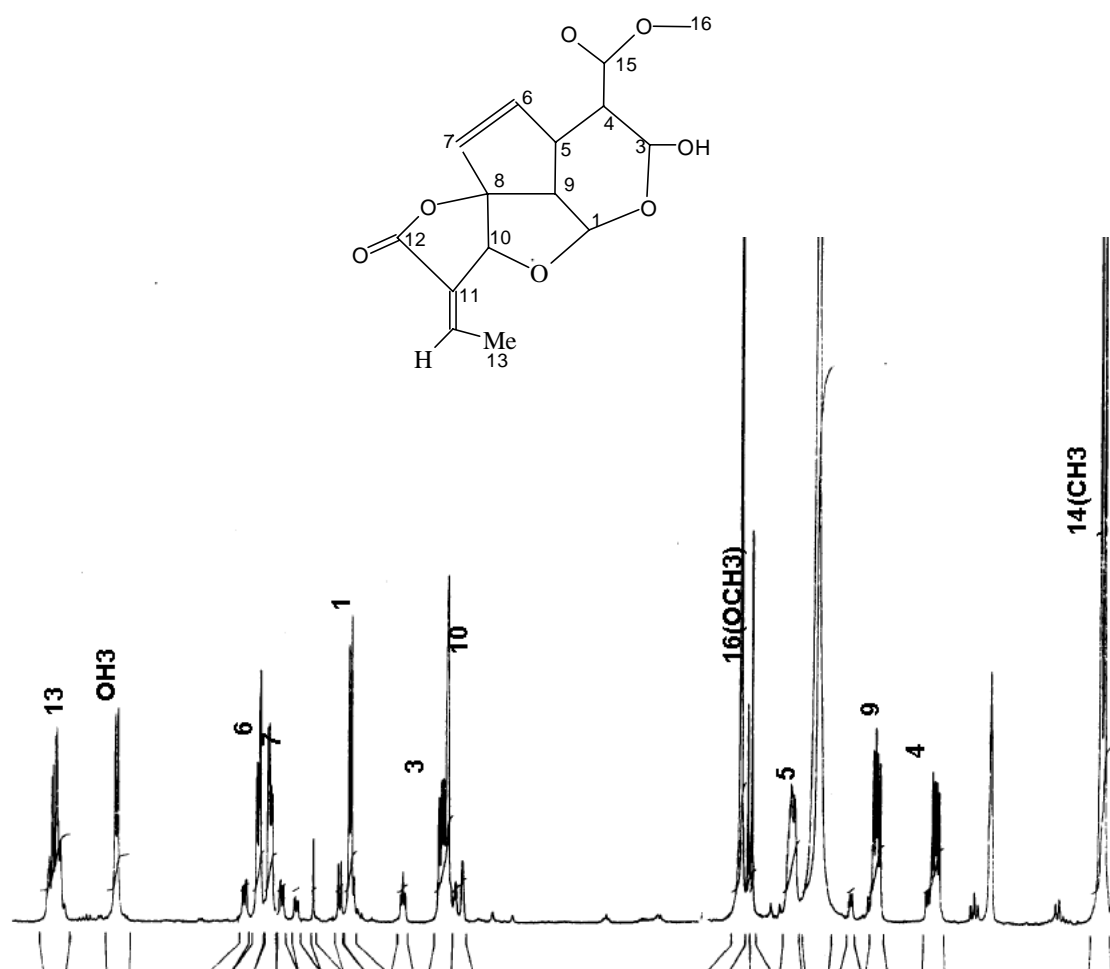


Figura 68- Espectro de RMN ^1H de Hs-5 em DMSO-d_6 a 400 MHz.

3.2.2.1.3 Análise estrutural de Hs-5 (43) por RMN ^{13}C .

A substância Hs-5 (43) demonstrou, através dos sinais de absorção no espectro de RMN ^{13}C (figura 69), estar estruturada com 15 carbonos, distribuídos entre δ 15,52 a 172,00 ppm.

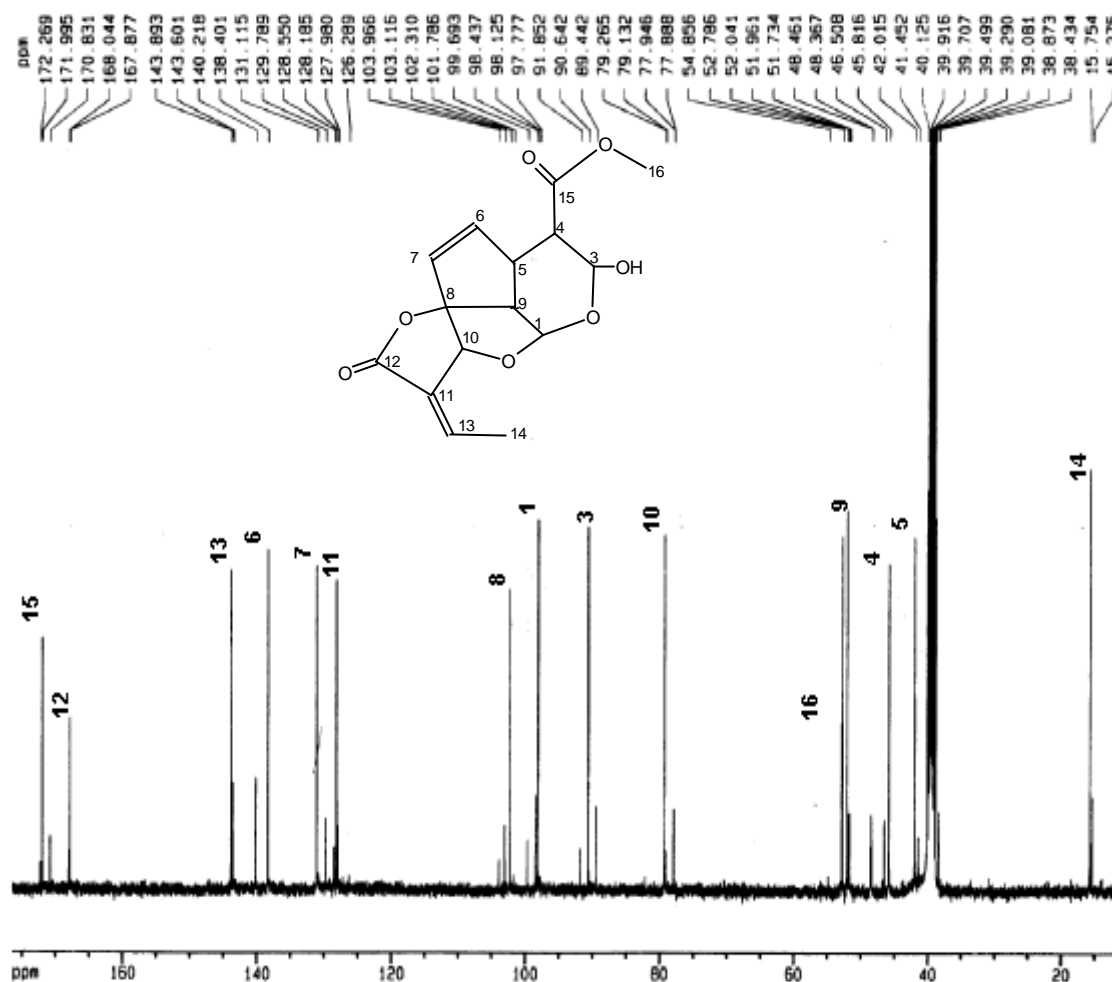


Figura 69- Espectro RMN de ^{13}C de Hs-5 (43) em DMSO- d_6 a 100MHz.

3.2.2.1.4 Análise dos espectros DEPT 135 $^\circ$ e DEPT 90 $^\circ$ de Hs-5 (43).

A análise conjunta dos espectros DEPT 90 $^\circ$ (Figura 71) e DEPT 135 $^\circ$ (Figura 70) de Hs-5 permitiram identificar os tipos de carbonos que compõe a estrutura da substancia.

O espectro DEPT 135 $^\circ$ foi importante para mostrar que a estrutura de Hs-5 não apresenta nenhum carbono metilênico. A associação deste espectro com o espectro DEPT 90 $^\circ$ mostrou que a estrutura é formada por nove carbonos metínicos, dois metílicos e quatro carbonos quaternários.

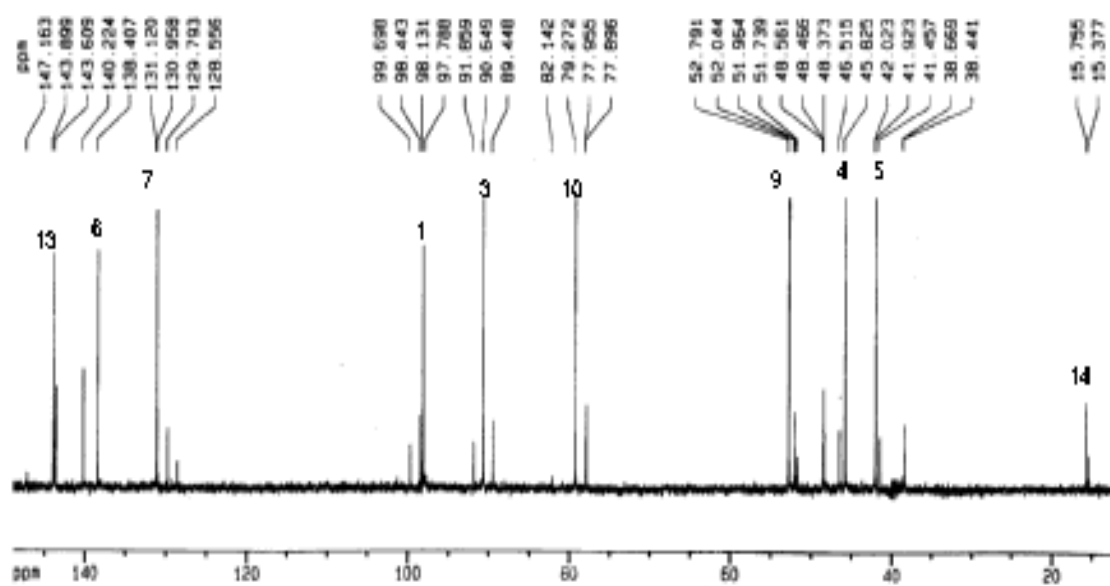


Figura 70- Espectro RMN DEPT 135° de Hs-5 em DMSO- d_6 a 100MHz.

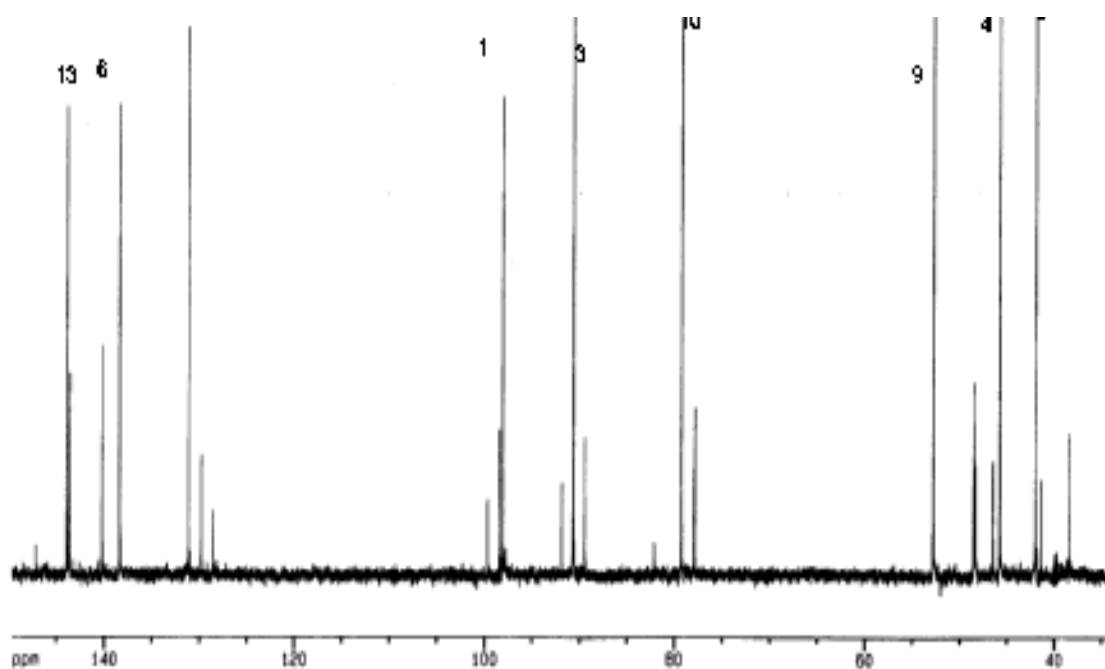


Figura 71- Espectro RMN DEPT 90° de Hs-5 em DMSO- d_6 a 100MHz.

3.2.2.1.5 Análise do espectro COSY (^1H - ^1H) de Hs-5.

O espectro COSY de Hs-5 (figura 72) mostra que a estrutura apresenta três sistemas de spins. O primeiro sistema é composto por cinco hidrogênios metínicos, além do hidrogênio hidroxílico. Este último, que absorve em 6,68 ppm, e que foi identificado pelo espectro HMQC, foi tomado como referência para a identificação deste sistema. Este hidrogênio apresenta correlação com H-3 que absorve em 6,68 ppm, que por sua vez se correlaciona com H-4, que absorve em 2,77 ppm, o qual correlaciona com H-5, que absorve em 3,56 ppm. Este último se correlaciona com H-9, em 3,06 ppm, que por sua vez mostra um pico de cruzamento com H-1, que absorve em 5,56 ppm, completando este sistema de spins. Possivelmente devido a problemas conformacionais, H-5 não mostra correlação com H-6. Por sua vez, H-6, que absorve em 6,01 ppm se correlaciona com H-7, que aparece em 5,95 ppm, completando o segundo sistema. O terceiro sistema de spins também é constituído por apenas dois sinais isolados, que são os hidrogênios de CH_3 -14 em 1,96 ppm, que se correlaciona com H-13, em 6,98 ppm.

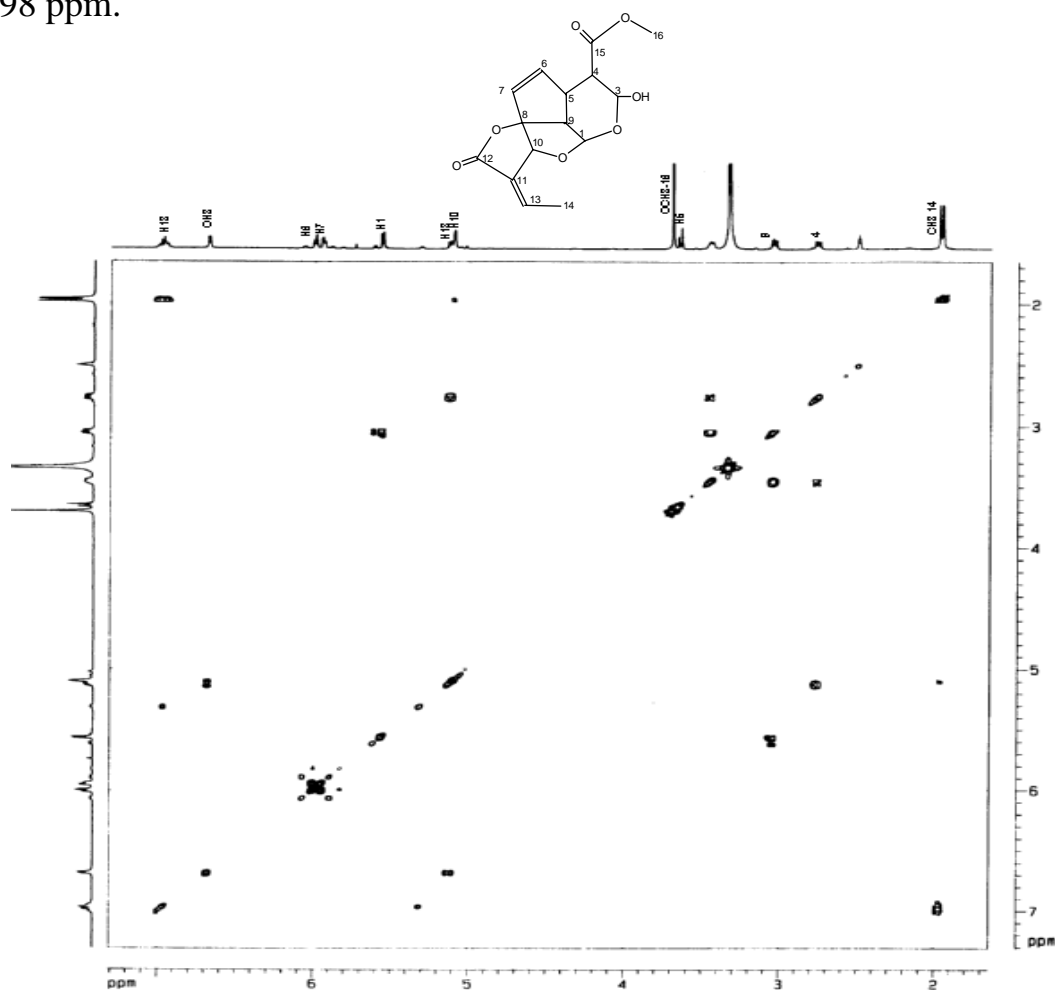


Figura 72- Espectro COSY de Hs-5 (43) em DMSO-d_6 a 400MHz.

3.2.2.1.6. Análise do espectro de HMQC de Hs-5 (43).

O espectro de HMQC de Hs-5 (figura 73) permitiu observar as correlações H-C (1J), auxiliando na determinação estrutural da substância. Este espectro foi importante para a identificar que o hidrogênio que absorve a δ 5,56 ppm está ligado ao C-1 (δ 98,12 ppm), que o hidrogênio que absorve em δ 5,12 ppm está ligado ao C-3 (δ 90,6 ppm), enquanto que o hidrogênio que absorve em δ 5,09 ppm, está diretamente ligado ao C-10 (δ 79,27 ppm), confirmando estarem estes hidrogênios ligados à carbonos oxigenados. Por outro lado, as correlações observadas entre os hidrogênios que absorvem em δ 6,01 e 5,95 ppm com C-6 (δ 138,4 ppm) e com C-7 (δ 131,1 ppm), respectivamente, identificam H-6 e H-7 como olefínicos.

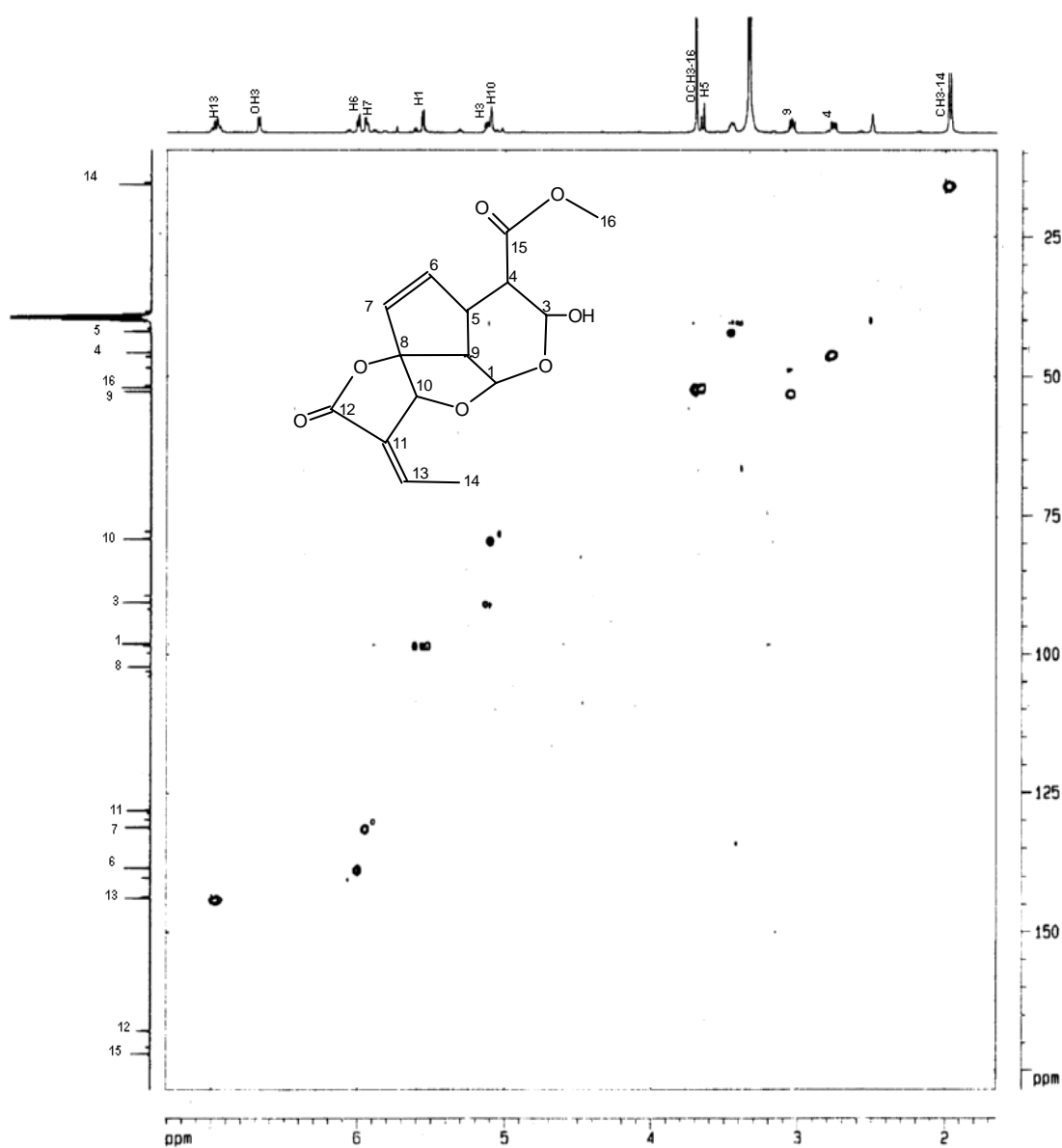


Figura 73- Espectro HMQC de Hs-5 em DMSO- d_6 a 400 MHz.

3.2.2.1.7 Análise dos espectros de HMBC de Hs 5 (43).

Estes espectros (figura 74, 75 e 76), juntamente com o HMQC, foram importantes para a identificação inequívoca da multiplicidade de todos os hidrogênios e carbonos da molécula. Algumas das correlações foram chaves para o esclarecimento da estrutura, como por exemplo, a correlação de H-3 com C-15, situando a posição do substituinte acetyl na estrutura, e de H-5 com C-6 e com C-7, H-7 com C-9 e de H-9 com C-6, confirmando a junção *cis* do ciclo diidropirano e ciclopenteno na estrutura.

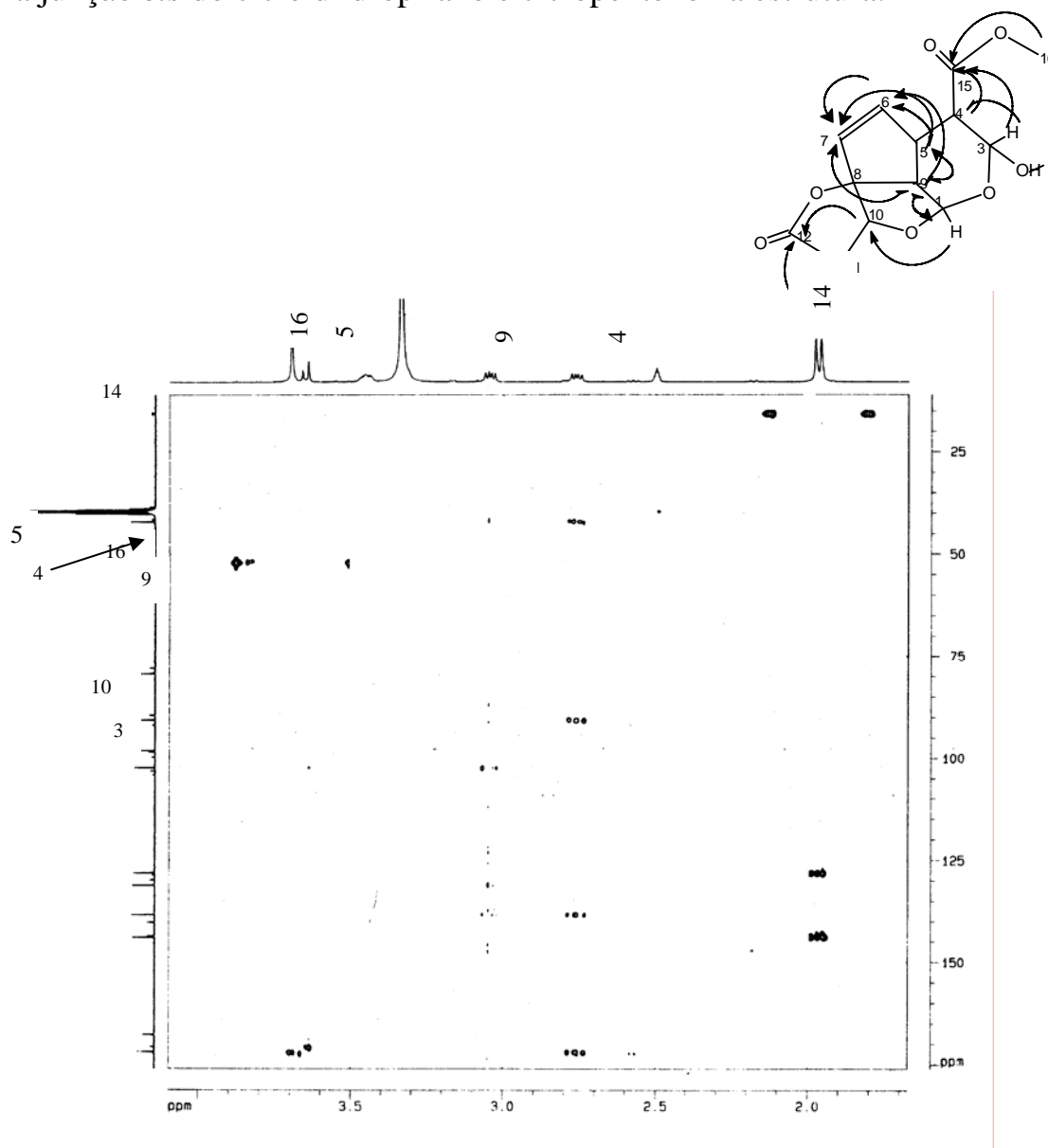


Figura 74- Espectro HMBC de Hs-5 (43) em DMSO- d_6 a 400MHz) (expansão).

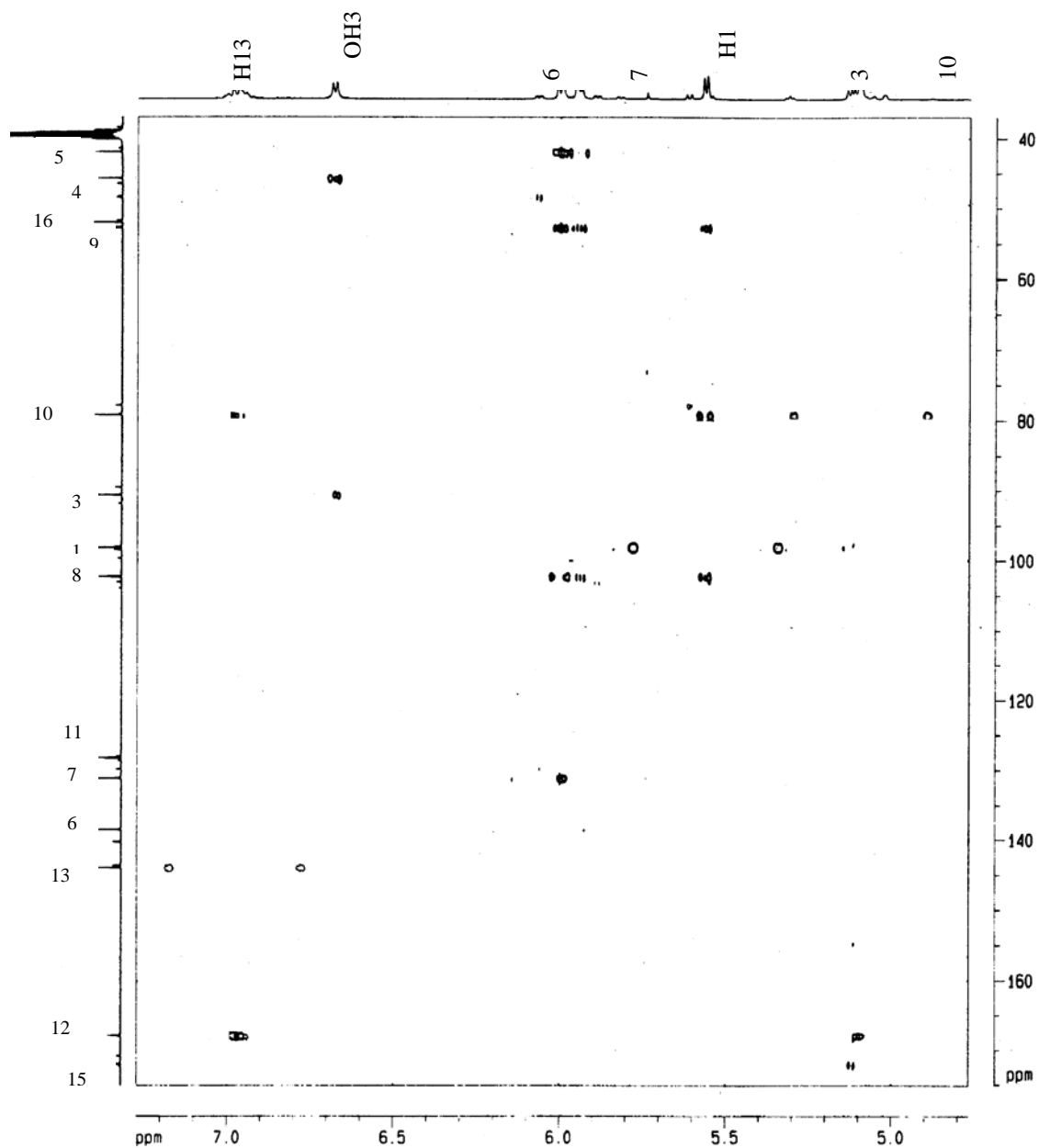


Figura 75- Espectro HMBC de Hs-5 em DMSO-d₆ a 400MHz (expansão 4,5-7,5 x 40,0-180,0).

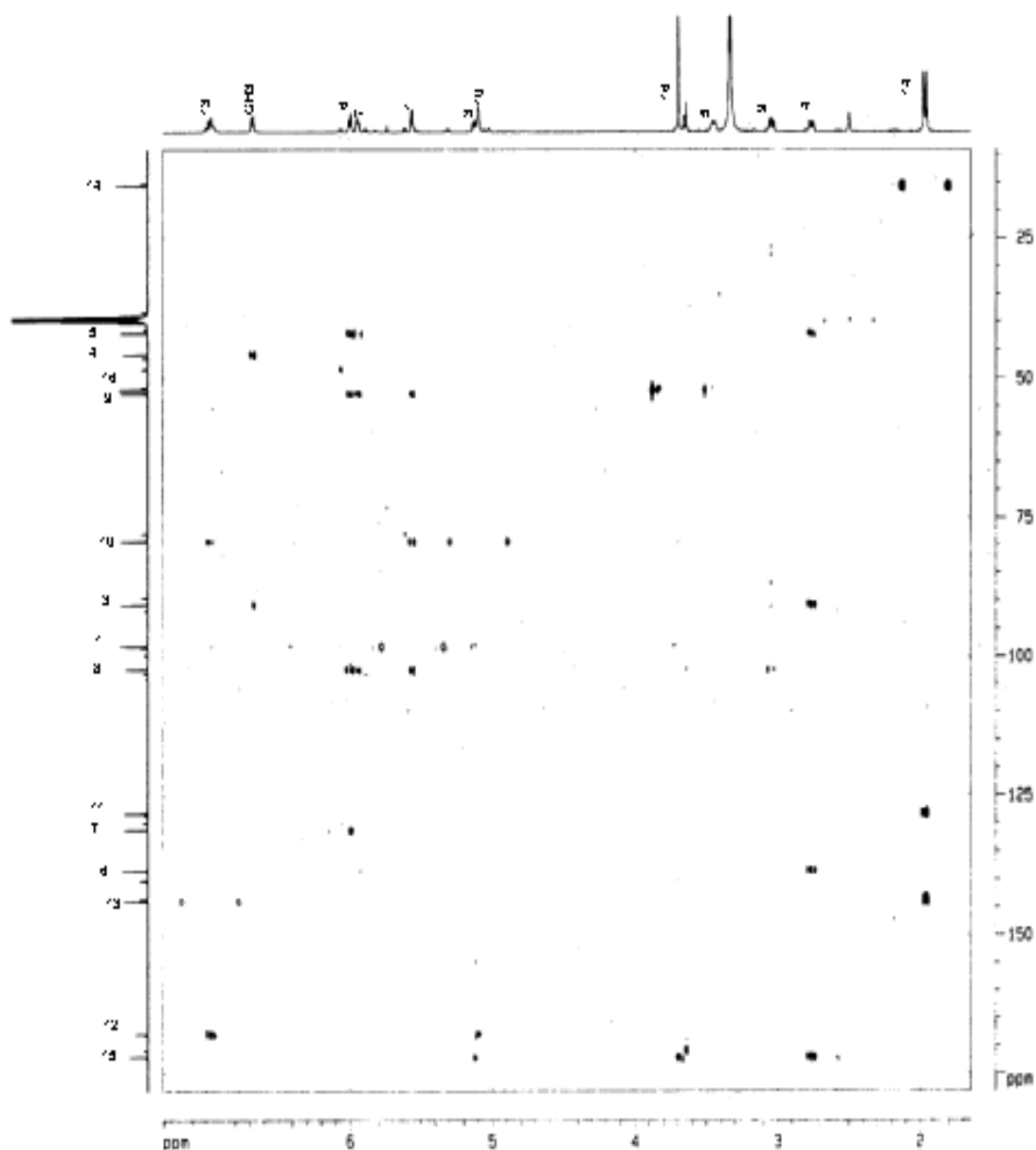


Figura 76- Espectro HMBC de Hs-5 em DMSO-d₆ a 400MHz.

3.2.2.1.8 Análise do espectro NOESY de Hs 5 (43).

O espectro NOESY de Hs-5 mostrou algumas correlações importantes para definição da posição espacial (configuração relativa) dos hidrogênios na estrutura. Por exemplo, as correlações entre H-3 com H-4, H-4 com H-5, que se correlaciona com H-9, e este último com H-1 ($\delta= 5.56$ ppm), definem que estes hidrogênios estão identicamente direcionados no

espaço (relação *cis*). A falta de correlação espacial destes hidrogênios com H-10 sugere que este último esteja em posição *anti* aos demais.

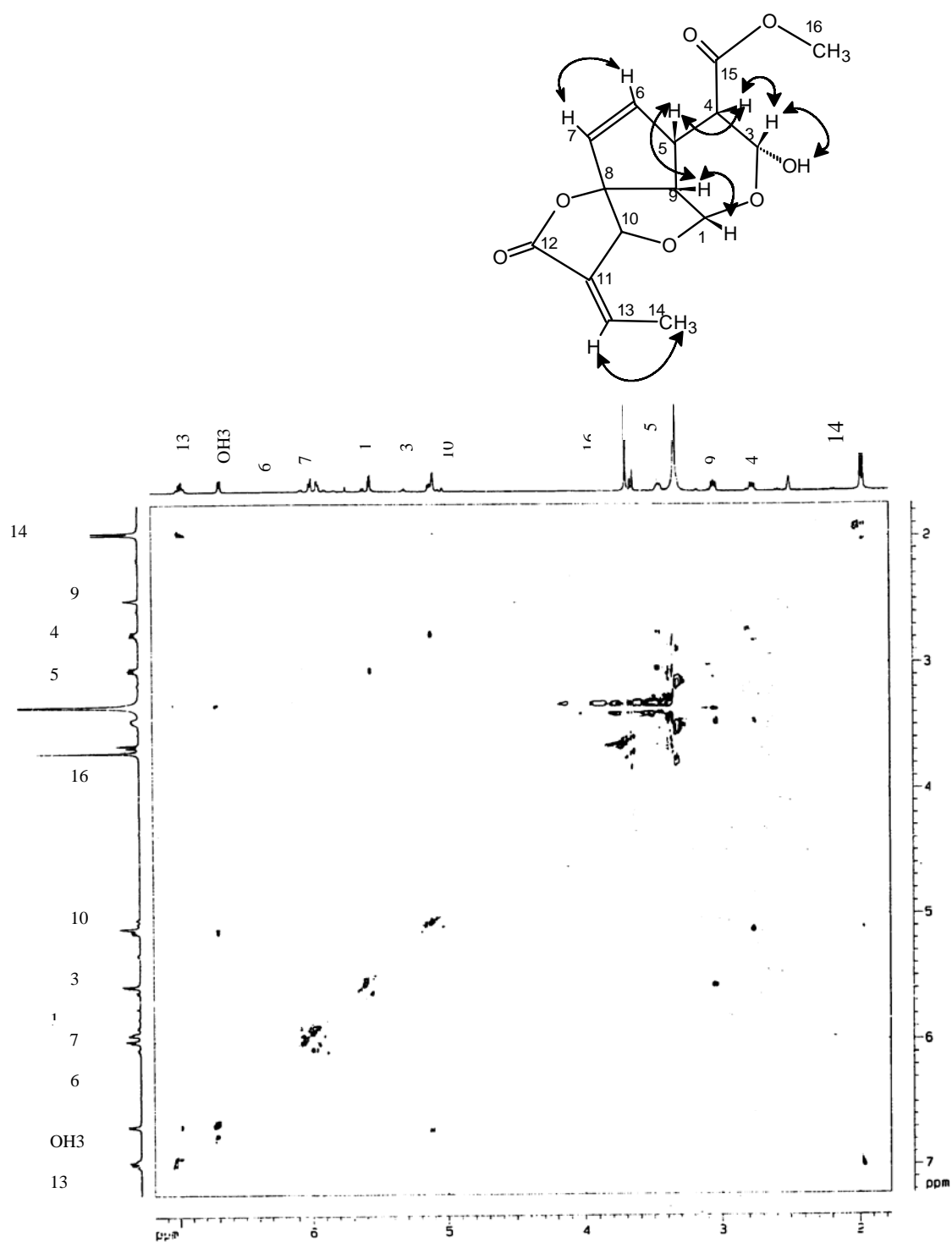


Figura 77- Espectro NOESY de Hs-5 (43) em DMSO-d₆ a 400MHz.

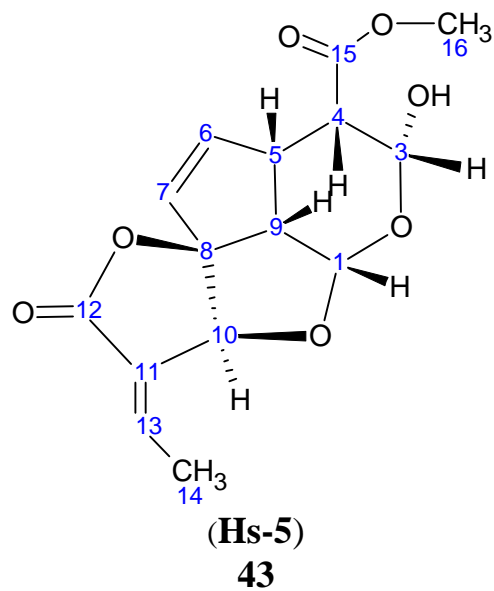


Tabela 5 Deslocamentos químicos ^1H e ^{13}C de Hs-5 (43) (DMSO- d_6 , 400 MHz).

N°	δH	δC
1	5,73	90,12
2		
3	5,12	90,6
4	2,77	45,74
5	3,46	41,52
6	6,01	138,4
7	5,95	131,1
8		102,3
9	3,06	52,78
10	5,09	79,3
11		128,2
12		167,87
13	6,98	143,8
14	1,96	15,52
15		172,00
16	3,69	52,8
OH	6,68	

3.2.2.1.9 Definição da configuração de C-3 de Hs-5 (43) através do método de Horeau.

Como mencionado anteriormente, através do espectro NOESY foi possível de se propor a estereoquímica relativa de alguns centros estereogênicos da molécula. Com a finalidade de se complementar esta parte, tentou-se, através do método de Horeau, se determinar a configuração absoluta de um centro, neste caso do álcool secundário, e, assim tornar absoluta a configuração dos demais centros. Para isso, a substância foi purificada através de CCD preparativa para eliminar a impureza observada no espectro de RMN de ^{13}C . Após, a substância foi esterificada com anidrido fenilbutírico racêmico, e o ácido fenil butírico residual, na forma de seu éster metílico, analisado através de cromatografia enantioseletiva, utilizando-se uma coluna cromatográfica empacotada com a fase 2,6-Me-3-Pe- β -CD, segundo modificação de König⁵⁸ e colaboradores discutida anteriormente.

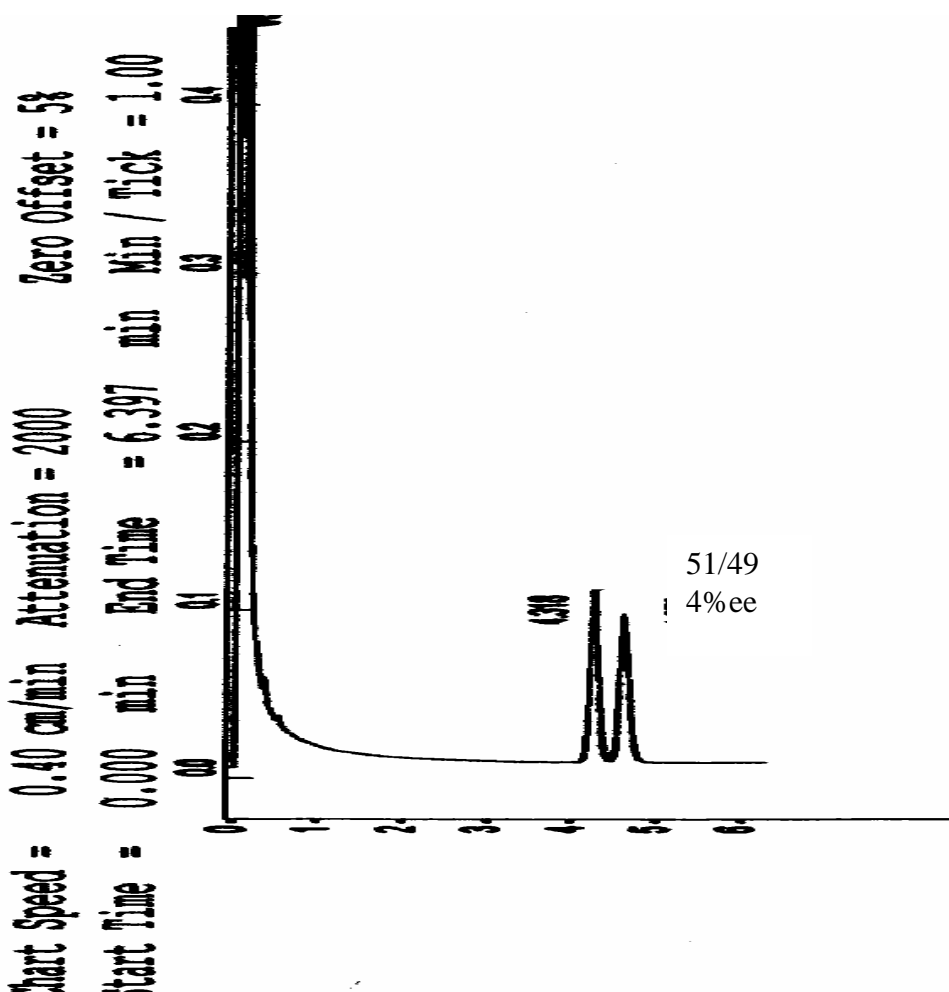


Figura 78- Cromatograma do ácido fenilbutírico residual da reação da Allamandina-A, na forma de seu éster metílico.

O excesso enantiomérico (4%) do ácido residual na forma de seu éster foi o (S)- fenilbutírico. Portanto, aplicando-se a regra de Horeau, chegou-se a conclusão que a configuração absoluta do centro estereogênico C-3 é “*R*”. Desta maneira, juntamente com o espectro NOESY, propomos que a estrutura deste metabólito apresenta a seguinte configuração: ***R*(1*u*,3*u*, 4*u*, 5*l*,9*u*, 10*u*)**. A configuração do carbono quaternário C-8 não foi determinada. A estrutura Hs-5 foi proposta para este metabólito, como sendo a de um diastereoisômero de allamandina (**30**), um iridóide lactônico com atividade antileucêmico, isolada anteriormente de *Allamanda cathartica* e *Allamanda schottii*^(44,45,46). Hs-5 apresenta uma rotação ótica $[\alpha]_D^{21} = +11,53$ (c 0,5157 MeOH) e ponto de fusão 233-235 °C, enquanto que a rotação ótica de allamandina é de $[\alpha]_D^{21} = +15$ (c 0,006 MeOH) e o ponto de fusão de 212-215°C. Esta diferença é pouca para reforçar a suposição de tratarem-se de dois diastereoisômeros. Maiores informações, como dados de raios-X de Hs-5 (**43**) ou uma amostra autêntica de allamandina (**30**) para comparação em CCD, serão necessárias para a comprovação de que se tratam de dois estereoisômeros e não da mesma substância. Neste trabalho, o metabólito aqui isolado será denominado de allamandina-A.

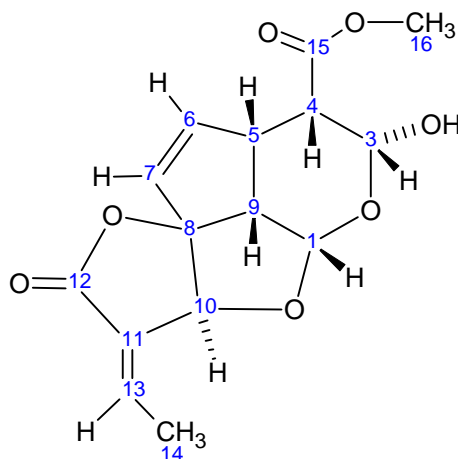


Figura 79- Estrutura e configuração proposta para allamandina-A (**43**)

3.2.2.2 Identificação estrutural do metabólito codificado como Hs-7 (44).

Este metabólito foi isolado da fração clorofórmica, na forma de um óleo de coloração levemente amarelada. A substância foi submetida à análise estrutural por RMN de ^1H e de ^{13}C , onde se observou que a amostra não era pura. Foi possível observar nos espectros, que a estrutura deste metabólito era próxima da estrutura de Hs-5, com a diferença que, no espectro de carbono-13, havia a ausência de um carbono oxigenado e a presença de dois carbonos olefínicos a mais, se comparado com a estrutura de H-5 (43).

Em paralelo, ao se tentar acetilar a hidroxila secundária de Hs-5 (anidrido acético/piridina) com a finalidade de tornar a estrutura mais solúvel para se realizar espectros em clorofórmio e, de se obter derivados para a análise de atividade biológica, obteve-se uma substância cujos espectros de ^1H e de ^{13}C mostraram, em vez de um produto acetilado, um produto originado de uma eliminação, cujos espectros eram coincidentes com os de Hs-7. Portanto, a estrutura de Hs-7 foi determinada através deste produto eliminado.

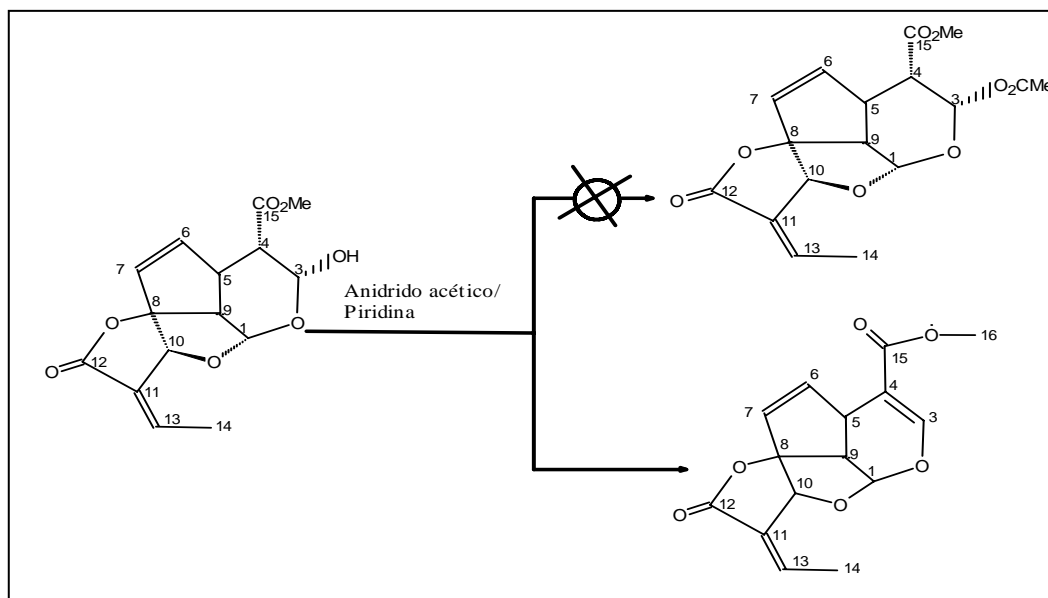


Figura 80 - Reação de Hs-5 na presença de piridina e ácido acético.

3.2.2.2.1 Análise do espectro de massas ESI de Hs-7 (44).

Neste espectro (figura 81), observou-se um pico $[M+Na]^+$ a 313.06841 uma, o que corresponde a uma massa de 290,6841 uma para a substância. Demais sinais observados no espectro, correspondem a “clusters” formados entre moléculas do anárito e átomos de sódio.

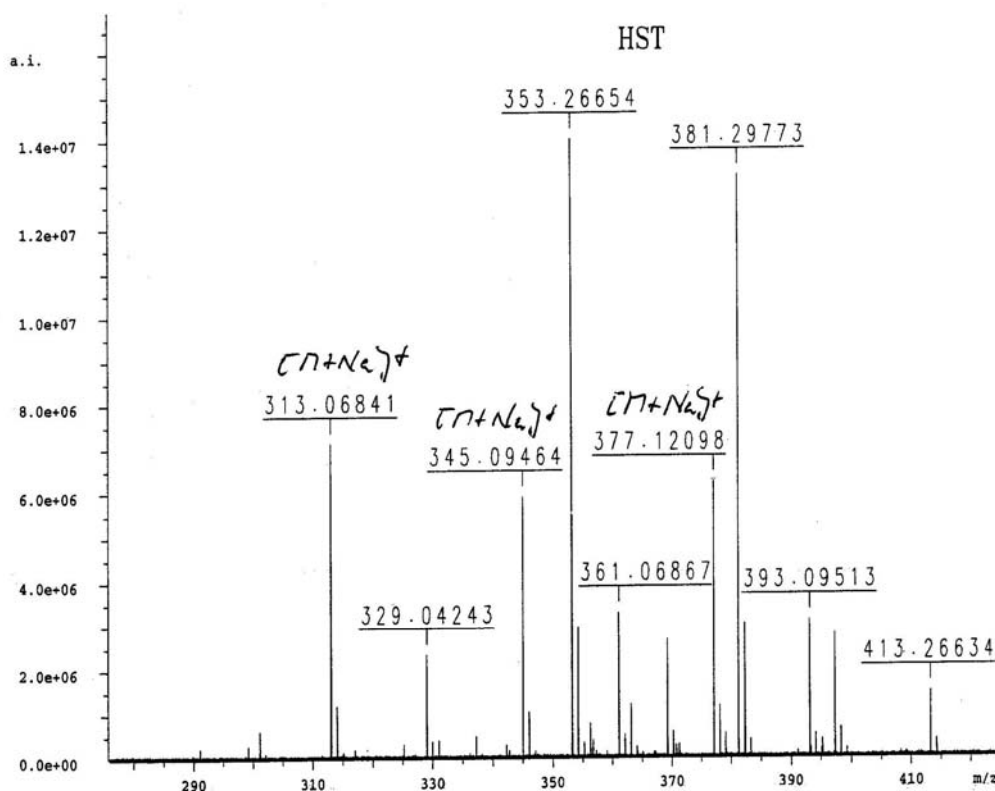


Figura 81- Espectro de massas ESI de Hs-7 (44)

3.2.2.2.2 Análise do espectro de RMN de 1H de Hs-7.

A estrutura de Hs-7 foi definida após a análise de todas as demais informações espectrais, como RMN de 1H , ^{13}C , COSY, HMQC e HMBC.

No espectro de RMN de 1H (figura 82), os sinais pertencentes às absorções dos hidrogênios desta substância, se encontram em uma região entre $\delta = 2,02$ e $7,19$ ppm. Como o produto da reação era o resultado de uma reação de acetilação, esperava-se observar no espectro de RMN 1H , o desaparecimento do hidrogênio 3-OH, que em Hs-5 aparece em $\delta 6,68$ ppm, além do surgimento do grupo acetila. Na realidade, observou-se o desaparecimento do grupo hidroxila da estrutura, mas não foi observado o

grupo metila do acetil. Comparando-se este espectro com o espectro da substância que deu origem ao produto (allamandina-A), observou-se o surgimento de um singlete em campo baixo (δ 7,19 ppm) e o desaparecimento do sinal de H-4. Os demais sinais em δ 5,97; 5,58; 5,50; 3,95; 3,70 e 3,35 ppm, correspondem aos hidrogênios observados na estrutura da alamandina-A. Portanto estes dados confirmam que houve eliminação em vez de acetilação de Hs-5. A comparação dos espectros e a comparação em CCD, comprovaram que o produto de eliminação e o metabólito Hs-7 tratam-se da mesma substância, e que já tinha sido anteriormente isolada e denominada de plumericina (**25**).

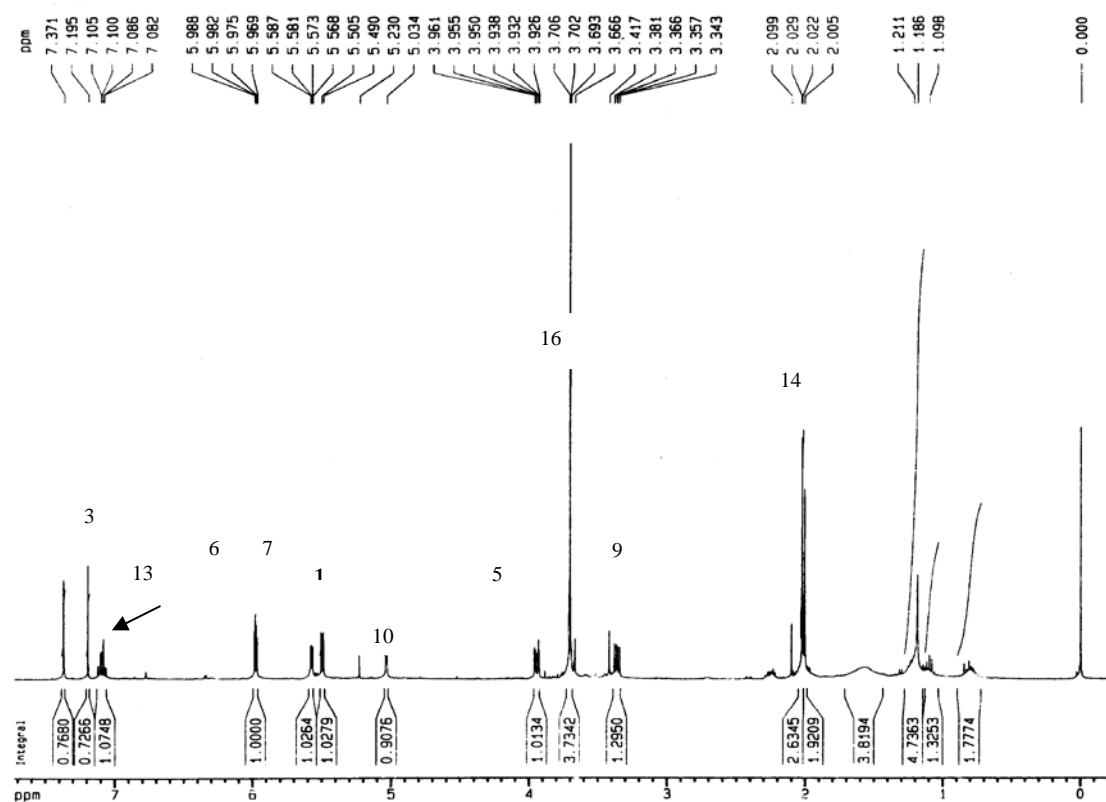


Figura 82- Espectro de RMN ^1H de Hs-7 (44) em CDCl_3 a 400MHz.

3.2.2.2.3 Análise do espectro de RMN de ^{13}C de Hs-7 (44).

O espectro de ^{13}C apresenta sinais de 15 carbonos, com deslocamentos químicos semelhantes aos encontrados para alamandina-A. A diferença entre os dois espectros está nos deslocamentos químicos dos carbonos que apareciam no espectro de alamandina-A em δ 90,6 ppm (C-3) e δ 45,82 ppm (C-4), e que em Hs-7, ressonam em δ 152,09 e 109,3 ppm, respectivamente, comprovando a presença de uma dupla ligação em Hs-7. Os demais sinais são compatíveis com a estrutura **25** proposta.

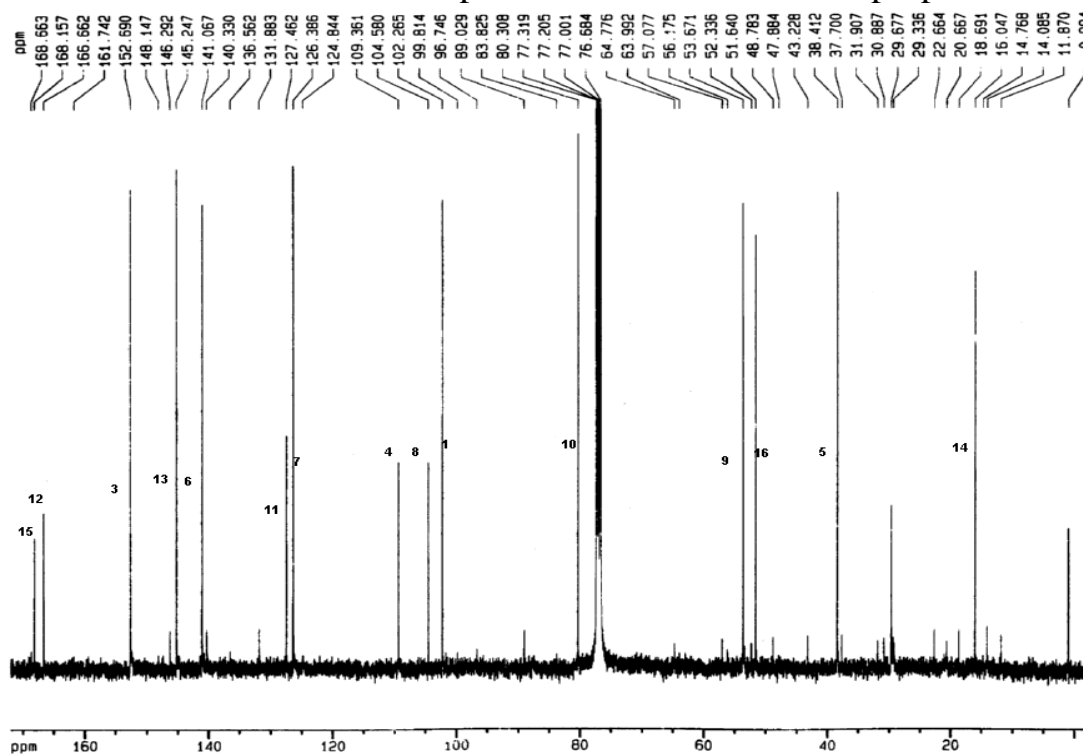


Figura 83- Espectro RMN ^{13}C de Hs-7 em CDCl_3 a 100 MHz.

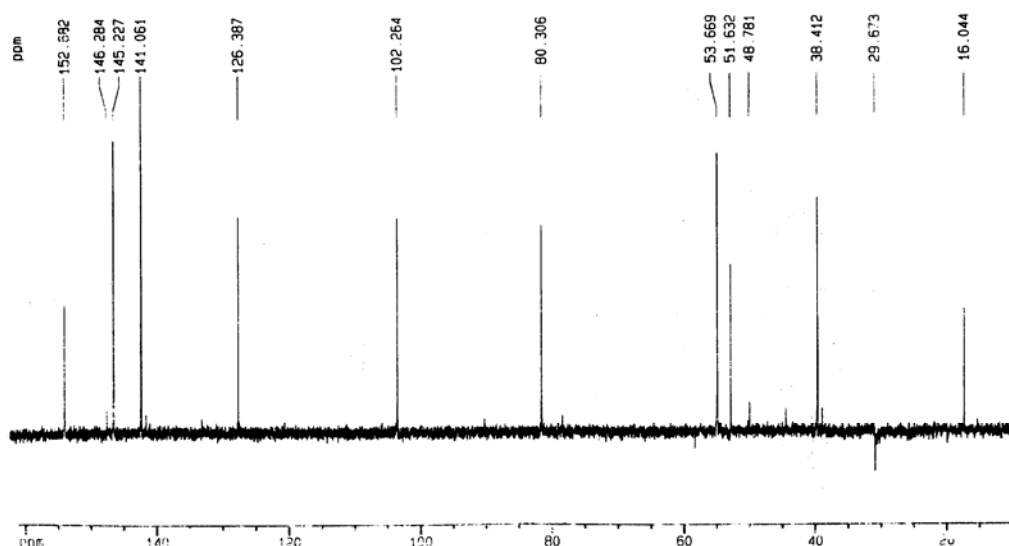


Figura 84- Espectro DEPT 135° de Hs-7 em CDCl_3 a 100 MHz.

3.2.2.2.4 Análise do espectro DEPT 135^o de HS-7.

O espectro DEPT 135^o (figura 84) apresenta nove sinais acima da linha base distribuídos em carbonos metínicos e metílicos, e nenhum carbono metilênico. Pela ausência de quatro sinais comparado-se com o espectro total, conclui-se que a estrutura de Hs-7 esta constituída por seis carbonos quaternários, uma metila e oito carbonos metínicos.

3.2.2.2.5 Análise do espectro COSY de Hs-7 (44).

O espectro COSY de Hs-7 (figura 85) mostra que a estrutura apresenta 3 sistemas de spins. Um sistema é formado pelos hidrogênios H-13 (δ 7,09 ppm) e com H-14 (δ 2,03 ppm), que se correlacionam entre si. Em um outro sistema, o hidrogênio H-6 (δ 5,97 ppm) se correlaciona com H-7 (δ 5,58ppm), não se correlacionando com H-5, como em allamandina-A (43). O terceiro sistema de spins ocorre entre H-1 (δ 5,50ppm) que se correlaciona com H-9 (δ 3,35 ppm) e este com H-5 (δ 3,95 ppm).

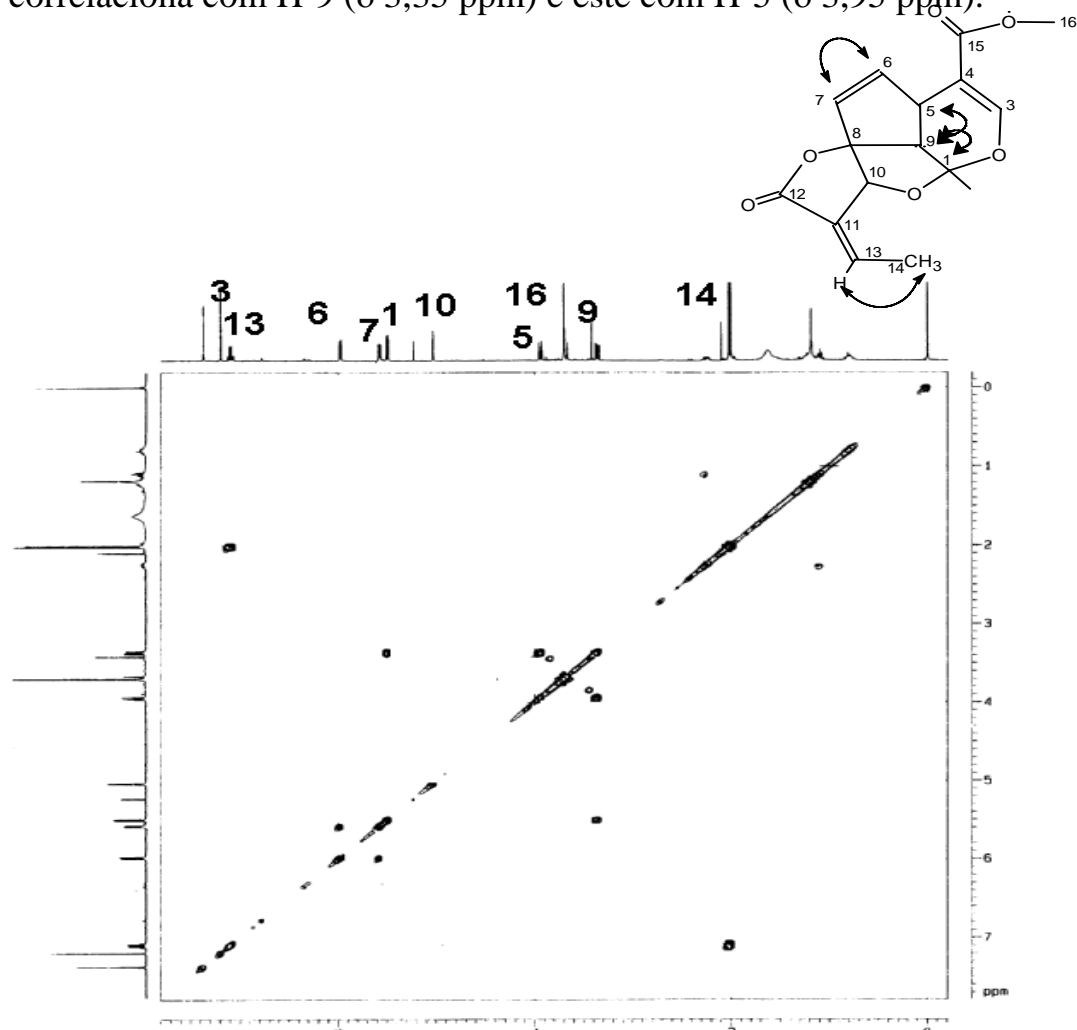


Figura 85- Espectro COSY de Hs-7 em CDCl₃ a 400 MHz.

3.2.2.2.6 Análise do espectro HMQC de Hs-7.

Através do espectro HMQC de Hs-7 (figura 86) ficaram definidas as correlações dos Hidrogênios com seus respectivos carbonos. Foi importante observar neste espectro a correlação do hidrogênio H-3 (δ 7,19 ppm) com o carbono que absorve em δ 152,1 ppm, e a não correlação do carbono que absorve em 109,3 ppm com nenhum hidrogênio, confirmando a presença da dupla ligação entre C3 e C4. Demais correlações observadas no espectro estão em concordância com a estrutura proposta.

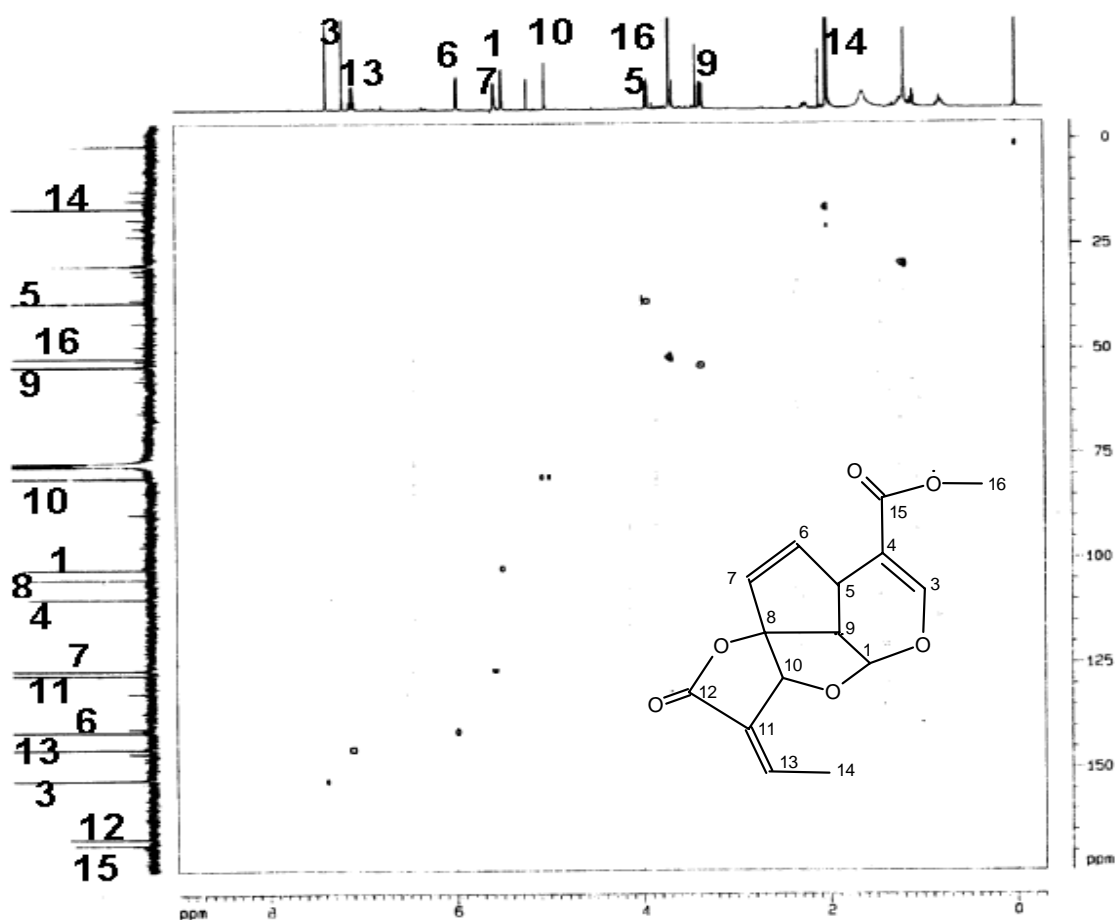


Figura 86- Espectro HMQC de Hs-7 em DMSO- d_6 a 400 MHz.

3.2.2.2.7 Análise do espectro de HMBC de Hs-7.

O espectro HMBC de Hs-7 (figura 87), através de correlações via ^2J e ^3J , auxiliou na atribuição inequívoca de todos carbonos e hidrogênios da estrutura. Algumas das correlações mais elucidativas são: H-3 (δ 7,19 ppm) com C-5 (δ 38,41 ppm) e com C-1 (δ 102,2 ppm), H-1 (δ 5,50 ppm) com C-10 (δ 80,3 ppm), com C-9 (δ 53,67 ppm) e com C-8 (δ 104,5 ppm), H-6

(δ 5,97 ppm) com C-5, H-7 (δ 5,58 ppm) com C-9. Estas duas ultimas correlações foram úteis para a confirmação da junção do anel ciclopenteno com o anel de 6 membros. H-14 (δ 2,03 ppm) se correlaciona com C-11 (δ 127,4 ppm) e com C-13 (δ 145,2 ppm), confirmando a cadeia lateral com a dupla ligação exocíclica ao sistema lactônico da estrutura. Demais correlações podem ser observadas na estrutura apresentada com o espectro de HMBC.

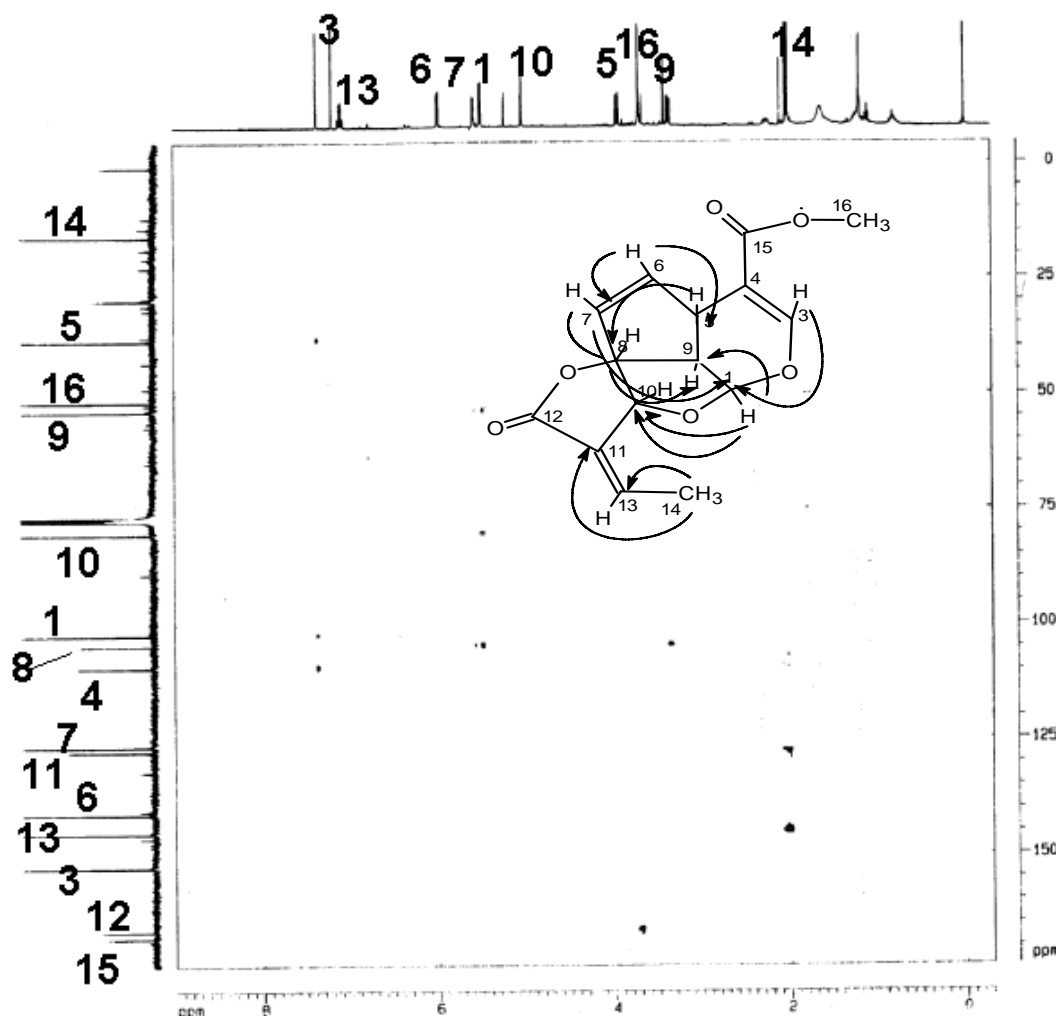


Figura 87- Espectro HMBC de Hs-7 em CDCl_3 a 400 MHz.

3.2.2.2.8 Análise do espectro NOESY de Hs-7 (44).

O espectro NOESY de Hs-7 mostra correlações espaciais entre os hidrogênios H-1, H-9 e H-5 de onde se conclui que estes hidrogênios se encontram em uma relação *cis*. A correlação entre H-10 com a metila em C-14 que é ligada ao carbono olefínico C-13, sugere tratar-se de uma olefina *trans*, o que corresponde ao metabólito plumericina.

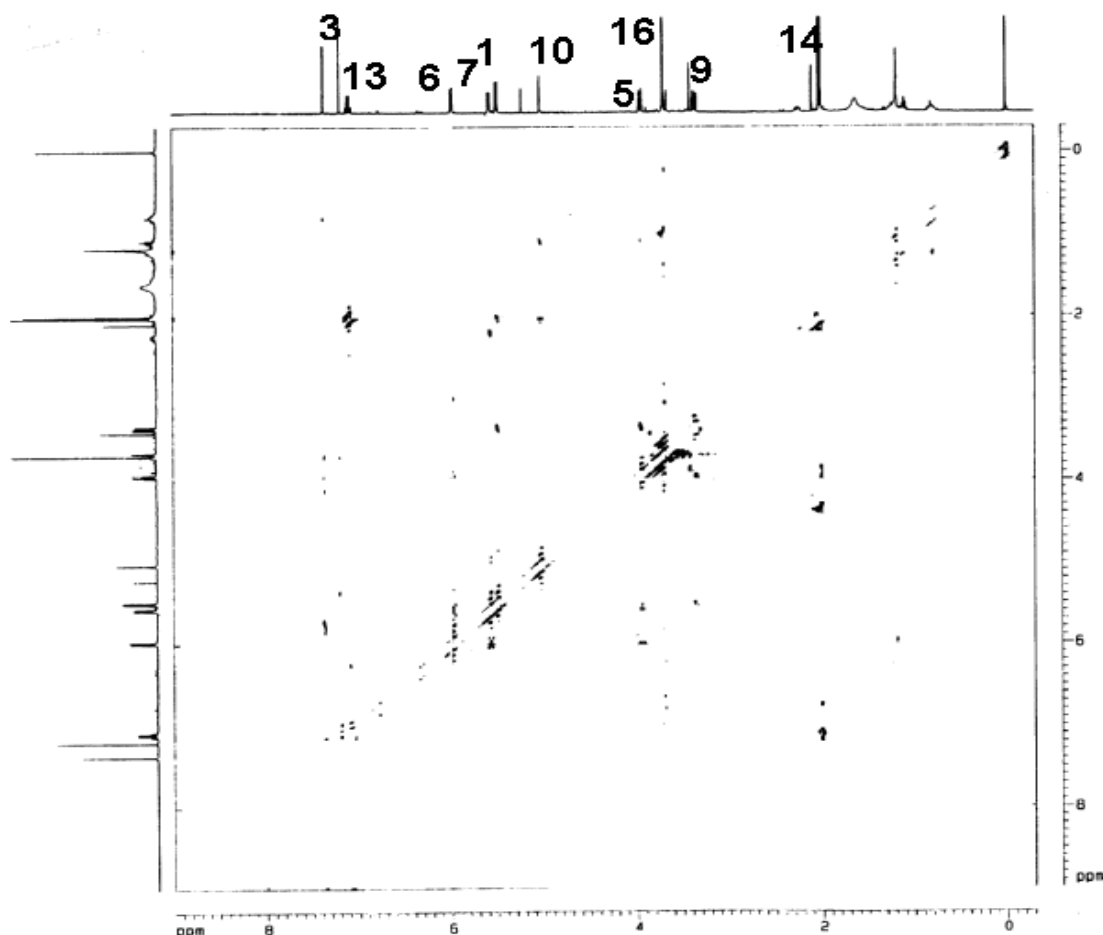


Figura 88- Espectro NOESY de Hs-7 em CDCl_3 a 400MHz.

Além disso, os deslocamento químico para H-14 de 2,03 ppm e para C-14 em 16,0 ppm, concordam que a metila está em posição *trans* em relação à carbonila C-12. Para a metila estar em posição *cis* à C-12, os deslocamentos químicos assumiriam valores em campo mais baixo, devido ao impedimento estérico entre CH_3 -14 e C-12.

Como esta substância foi obtida de uma transformação estrutural de alamandina-A com a manutenção da integridade configuracional dos centros estereogênicos, a estereoquímica dos centros quirais foi proposta como: *R* (1*u*, 5*l*, 9*u*, 10*u*).

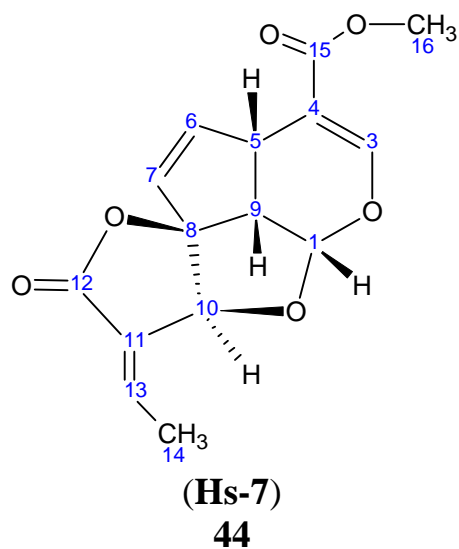


Tabela 6 Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de Hs-7 em CDCl_3 , a 400MHz.

N°	δH ppm	δC ppm
1	5,50	102,2
2		
3	7,19	152,69
4		109,3
5	3,95	38,41
6	5,97	141,06
7	5,58	126,38
8		104,5
9	3,35	53,67
10	5,03	80,3
11		127,4
12		166,6
13	7,09	145,24
14	2,03	16,04
15		168,15
16	3,72	51,6

3.3 Atividade antimicrobiana

Nos últimos anos, o grupo de pesquisa em produtos naturais de Santa Maria (NPPN), tem se preocupado, não só com o isolamento e a determinação estrutural de metabólitos secundários isolados de plantas medicinais, mas também com a atividade biológica destas plantas, através de estudos biológicos de extratos brutos, frações e dos metabólitos purificados. Quando as estruturas apresentam grupos funcionais possíveis de serem derivatizados, estes são modificadas e suas atividades biológicas determinadas. Atualmente o NPPN-SM possui um laboratório preparado para realizar análises antimicrobianas, principalmente análise antibacteriana, suprimindo parte da necessidade do grupo em complementar o trabalho fitoquímico.

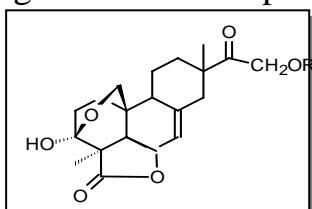
Neste trabalho, foram analisados extratos brutos, frações neutras, metabólitos puros e derivados, obtidos das espécies *Humirianthera ampla* e *Himatanthus sucuuba*. Para isso, foram utilizadas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Micrococcus luteus*), Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Salmonella setubal*), e leveduras (*Cândida albicans* e *Sacharomyces cerevisiae*). O método escolhido, por ser o mais desenvolvido no grupo, foi o da bioautografia, através do qual se pode realizar um "screening" primário nos extratos brutos e frações obtidas, e também se observar a quantidade mínima inibitória dos extratos e dos metabólitos puros ou modificados.

A tabela 7 mostra que o extrato metanólico bruto de *H. ampla* apresentou uma atividade fraca (240 µg) contra as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *S. epidermidis*, e contra a levedura *C. albicans*. Percebe-se, através dos resultados da tabela, que determinadas modificações estruturais mudam a atividade de uma substância, ou suprimindo ou potencializando-a. Por exemplo, o metabólitoannonalida mostrou fraca atividade (240 µg) contra as duas leveduras utilizadas, enquanto que seu derivado acetilado não mostrou nenhuma atividade. Por outro lado, humirianthol (18) e acrenol (19) apresentaram fraca atividade (240µg) em suas formas não derivatizadas contra *C. albicans*, e foram inativos para *S. cerevisiae* e para todas as bactérias testadas, enquanto que seus derivados acetilados (35) e (36), apresentaram uma atividade boa contra as duas cepas de fungos (30-10 µg), mas foram igualmente inativos para bactérias. Por outro lado, o derivado cetil do acrenol foi inativo para as duas leveduras, mas mostrou uma fraca atividade para um tipo de bactéria, a *Escherichia coli*, na quantidade de 240 µg. Como as substâncias isoladas não foram ativas contra bactérias, ao contrário do extrato bruto que foi ativo para três, possivelmente a (s) substância (as) responsável (eis) por esta atividade não tenha (m) sido isolada (s), ou que a atividade do extrato seja consequência de um sinergismo entre várias substâncias.

Os resultados apresentados na tabela 8 mostram que o extrato bruto de *H. Sucuba* é ativo apenas para *S. epidermidis* e *S. setubal*, enquanto que o extrato hexânico mostrou atividade apenas para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O extrato clorofórmico foi o mais ativo, sendo ativo para todas as bactérias e fungos utilizados, enquanto que o extrato acetato de etila, foi ativo apenas para *Escherichia coli*.

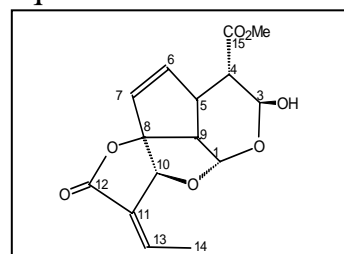
As substâncias puras Hs 5 e Hs 7, isoladas da fração clorofórmica, foram ativas para a maioria das cepas testadas. Hs 5 foi ativa para todas as bactérias e inativa para as duas cepas de fungos, enquanto que Hs 7 não foi ativa apenas para *S. epidermidis*. A substância Ha-2 foi inativa para todas as cepas. Como Hs-5 e Hs-7 foram isoladas do extrato clorofórmico, podem ser as responsáveis pela boa atividade desta fração.

O teste de letalidade por *Artemia salina* realizadas com amostras puras e frações tanto da *H. ampla* e *H. sucuba* demonstrou a eficiência de algumas amostras perante os ovos eclodidos do pequeno crustáceo.

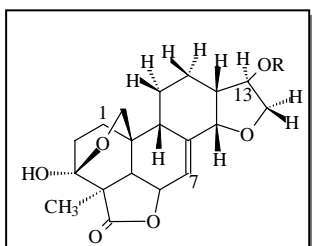


20 R=H Annonalida AI-1

41 R=Ac Annonalida acetilada.

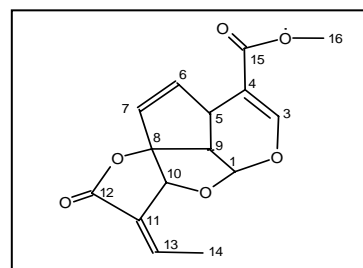


Hs-5 Allamandina-A

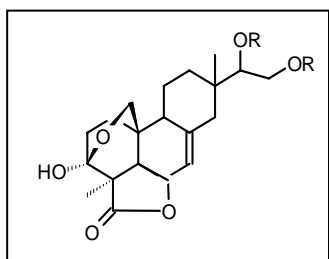


18 R=H Humirianthol AI-3

35 R=Ac Humirianthol acetilado.



Hs-7 Plumericina^a

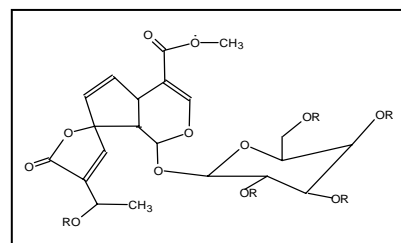


Ha-2

19 R=H Acrenol AI-4.

36 R=Ac Acrenol acetilado

42 R= $\begin{array}{c} \text{C H}_3 \\ | \\ \text{---} \end{array}$ Acrenol cetal.



32 R=H Plumerideo glicosilado

39 R=Ac Plum. glic. acetilado

TABELA 7-Atividade antimicrobiana das frações, metabólitos puros e derivados dos metabólitos isolados da espécie *Humirianthera ampla*.

	<i>Staphylococcus Aureus</i>	S. epidermidis	<i>Micrococcus luteus.</i>	<i>Escherichia coli.</i>	<i>Salmonella Setúbal</i>	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	<i>Bacillus Subtillis</i>	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	<i>Candida albicans.</i>	<i>Sacharomyces Cerevisae.</i>
Extrato bruto 240µg	inibiu	inibiu	-	Inibiu⁺					inibiu	
Fração clorofórmica 240µg										
Annonalida 240µg									inibiu	inibiu
Annonalida acetilada 240µg										
Humirianthol 240µg									inibiu	
Humirianthol acetilado 240µg									30µg	10µg
Acrenol 240µg									inibiu	
Acrenol acetilado 240µg									10µg	10µg
Acrenol cetil 240µg				inibiu						
Plumerídeo glicosilado 240µg										
Plumerídeo glicosilado Acetilado 240µg										

10µg = [] mínima com a qual ocorreu a inibição.

TABELA 8-Atividade antimicrobiana das frações, metabólitos e derivados dos metabólitos isolados da espécie *Himatanthus sucuuba*.

	<i>Staphylococcus Aureus</i>	S. epidermidis	<i>Micrococcus luteus</i> .	<i>Escherichia coli</i> .	<i>Salmonella Setúbal</i>	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	<i>Bacillus Subtilis</i>	<i>Pseudomonas Aeroginosa</i>	<i>Candida albicans</i> .	<i>Sacharomyces Cerevisae</i> .
Extrato bruto 240µg	inibiu	inibiu	-		inibiu					
Fração hexânica 240µg	inibiu			inibiu				inibiu		
Fração clorofórmica 240µg	Inibiu⁺	Inibiu+	inibiu	Inibiu+	inibiu	inibiu	inibiu	inibiu	inibiu	inibiu
Fração acetato de etila 240µg				inibiu						
Allamandina A Hs-5	10µg	20µg	20µg	10µg	10µg	Inibiu+ 20µg	10µg	Inibiu+ 20µg		
Plumericina Hs-7	10µg		30µg	40µg	30µg	Inibiu+ 20µg	Inibiu+ 20µg	Inibiu+ 10µg	10µg	10µg

10µg = [] mínima com a qual ocorreu a inibição.

TESTE DE LETALIDADE POR ARTEMIA SALINA (TLAS)

Amostra	LC₅₀^a	T. relativa^b
Extrato bruto Humirianthera ampla	112,6	0,2
Fração clorofórmica H.ampla	277,5	0,1
AI-1 (Anonnalida)	9,1	2,2
AI-1 acetilado	57,6	0,4
AI-3 (Humirianthol)	11,6	1,7
AI-3 acetilado	11,5	1,7
AI-4 (Acrenol)	16,0	1,2
AI-4 (acetilado)	8,5	2,3
AI-4K (Acrenol cetal)	14,1	1,4
Ha-2(Plumerídeo glicosilado)	917,6	0,02
Ha-2 acetilado	349,6	0,04
Ha-1 (Ácido glicoplumérico)	494,0	0,03
Extrato bruto Himatanthus sucuuba	189,1	0,08
Fração Acetato de etila H. sucuuba	537,1	0,03
Fração clorofórmico H. sucuuba	551,5	0,03
Hs-5 (Allamandina A)	42,5	0,46
Hs-7 (Plumericina)	3,9	4,40
Latex da H. sucuuba	210,7	0,10

^a μg/mL

^b Relativa a solução de K₂Cr₂O₇ LC₅₀= 19,45 μg/mL.

4 EXPERIMENTAL

4.1 INSTRUMENTOS UTILIZADOS

4.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

As medidas de ressonância magnética nuclear foram realizadas em um espectrômetro Bruker DPX 400, do departamento de química da Universidade Federal de Santa Maria/RS, que opera a 400 MHz para ^1H e 100MHz para ^{13}C , em tubos de 5 mm.

Os solventes utilizados para análise das amostras foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6). Os deslocamentos químicos foram registrados em “ppm” (partes por milhão) em relação ao TMS (tetrametilsilano $\delta=0,00$ ppm).

4.1.2 Aparelho de Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho MQRPF-301 digital da Microquímica, com termômetro não aferido.

4.1.3 Polarímetro

As rotações óticas (α) foram obtidas em um polarímetro digital Jasco DIP-1000 (589 nm, linha D de sódio). As medições foram feitas em uma cubeta de 1 dm de comprimento.

4.1.4 Raio X.

A coleção de dados foi obtido em um difratômetro Nonius Kappa CCD, do Departamento de Química da Universidade de Toronto, Canada.

4.1.5 Infravermelho.

Os espectros de IV foram obtidos em um espectrofotômetro BrukerIFS-28 (DQ-UFSM), com uma janela espectral desde 4000 até 400cm^{-1} . As amostras foram preparadas como pastilhas de KBr (2-3 mg da amostra para 100mg de KBr).

4.1.6 espectrometria de massas.

Os espectros de massas foram realizados em um aparelho Bruker Bio Apex 70 eV FT-ICR (Bruker Daltonics, USA), do " Institut of Plant Biochemistry", Halle na der Salle, Alemanha.

4.1.7 Cromatógrafo gasoso.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás Varian 388, equipado com detector FID, e hidrogênio como gás de arraste,operando de modo split e colunas capilares de sílica fundida empacotadas com fases

quirais e aquirais, como heptaquis-(2,6-O-metil-3-pentil)- β -CD e Se-54, respectivamente.

4.2 Material e métodos cromatográficos

Cromatografias em coluna e em placas preparativas foram realizadas, utilizando-se sílica gel G (35-70 mesh e 230-400 mesh) como suporte sólido. Cromatografias em camada delgada foram realizadas em placa de vidro com camada de sílica gel 60GF 254, e alumina da Merck.

Para revelar os compostos observados em CCD, foram utilizados os seguintes métodos: lâmpada UV 254 e 366 nm (Hereaus), reativo de Dragendorff modificado segundo Munier e Macheboef⁶¹, solução de permanganato de potássio e solução de ácido sulfúrico e álcool etílico (10-90), seguido de aquecimento.

Os reagentes e solventes utilizados foram produtos analiticamente puros Merck e Reagan. Em certos casos, utilizou-se de técnicas específicas de purificação de solventes, obtendo-se, dessa maneira, produtos com maior grau de pureza.

4.2.1 SOLVENTES USADOS

- Etanol comercial
- Éter etílico P.A.(Merk)
- Diclorometano P.A.
- Metanol P.A.
- Clorofórmio P.A.(Merk)
- n-Hexano

4.2.2 Reagentes usados

- HCl
- NH₃OH
- Anidrido acético
- Piridina

A relação a seguir, mostra os principais sistemas de solventes utilizados em CCD e CC:

- 1.Hexano
- 2.Hexano, Clorofórmio (2:1)
- 3.Hexano, Clorofórmio (1:1)
4. Hexano, Clorofórmio (1:2)
- 5.Clorofórmio
- 6.Clorofórmio, Metanol (98:2)
- 7.Clorofórmio, Metanol (95:5)
- 8.Clorofórmio, Metanol (90:10)
- 9.Clorofórmio, Metanol (80:20)
- 10.Acetato de etila
- 11.Acetato de etila/Metanol (99:1)
- 12.Acetato de etila/Metanol (80:20)
- 13.Acetato de etila/Metanol (70:30)
- 14.Metanol

4.3 Material vegetal

Os procedimentos de coleta, secagem, obtenção dos extratos, fracionamentos, isolamento e purificação de metabólitos das duas espécies são semelhantes. São desconsiderados todos os procedimentos de extrações de frações ácidas e frações básicas por não apresentarem os resultados esperados. Portanto, a descrição dos procedimentos de extrações por fracionamento de fases neutras foi desenvolvida para cada uma das duas espécies conforme fluxogramas (1 e 2).

4.3.1 Coleta do material da espécie *Humirianthera ampla*

Tubérculos da espécie (20Kg) foram coletados na Fazenda Nova Olinda no Município de Sena Madureira, a 110 Km de Rio Branco (Estado do Acre), no mês de julho de 1997, após a estação chuvosa e início da seca. Os tubérculos, identificados pelo botânico Marcos Silveira, professor da UFAC, foram macerados e secados à sombra em uma temperatura sempre inferior a 50°C, e posteriormente foram triturados a finos grãos em moinho Willey. Após secagem e moagem, a amostra seca pesou 5Kg.

4.3.1.1 Extração

Após a amostra seca e pesada, iniciou-se a extração com álcool etílico 95%. O extrato etanólico bruto obtido foi devidamente seco e pesado, obtendo-se 332,45 gramas.

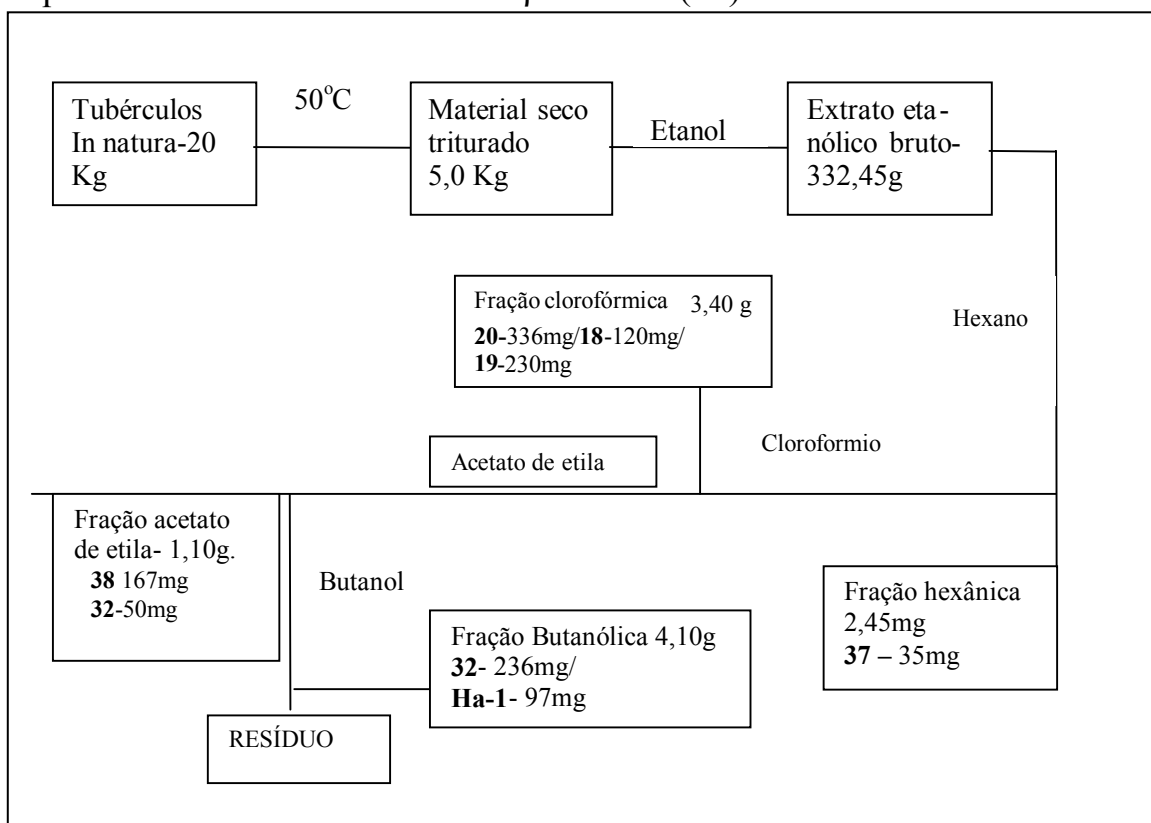
4.3.1.2 Fracionamento neutro do extrato bruto

Sobre extrato etanólico bruto total procedeu-se o fracionamento neutro com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e butanol), conforme mostra o

fluxograma 1. Com cada solvente, foram realizadas várias extrações até o esgotamento do material solúvel (CCD), que foram secos e pesados. Em seguida, cada extrato foi analisado através de CCD. Os metabólitos secundários foram isolados através de técnicas cromatográficas, como a cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa.

4.3.1.2.1 Análise da fração hexânica neutra da *Humirianthera ampla*.

Esta fração (2,45g), após ser solubilizada em metanol, formou um precipitado branco, que após ser submetido a uma separação por CC, originou um metabólito puro em CCD (35mg), que foi codificado como AI-7e que foi identificado como sendo β -amirina (**37**).



Fluxograma 1 – rota de análise fitoquímica dos tubérculos da *H. ampla*.

4.3.1.2.2 Análise da fração clorofórmica neutra da *Humirianthera ampla*.

Da fração clorofórmica (3,40g) foram isolados e identificados os três metabólitos que já tinham sido estudadas exhaustivamente em uma etapa anterior. Os três metabólitos AI-1annonalida (**20**)(336mg), AI-3humirianthol (**18**)(120mg) e AI-4acrenol (**19**)(230mg) foram isolados por CC usando sílica gel como suporte e um sistema de eluentes de $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH}$ com polaridades crescentes (ver sistemas 6,7,8,e9 da página 101). Estes metabólitos foram, no trabalho atual, novamente estudados,

principalmente na determinação de suas estereoquímicas e de suas atividades antimicrobianas. Alguns derivados foram obtidos e estudados.

4.3.1.2.3 Análise da fração acetato de etila e butanólica de *Humirianthera ampla*.

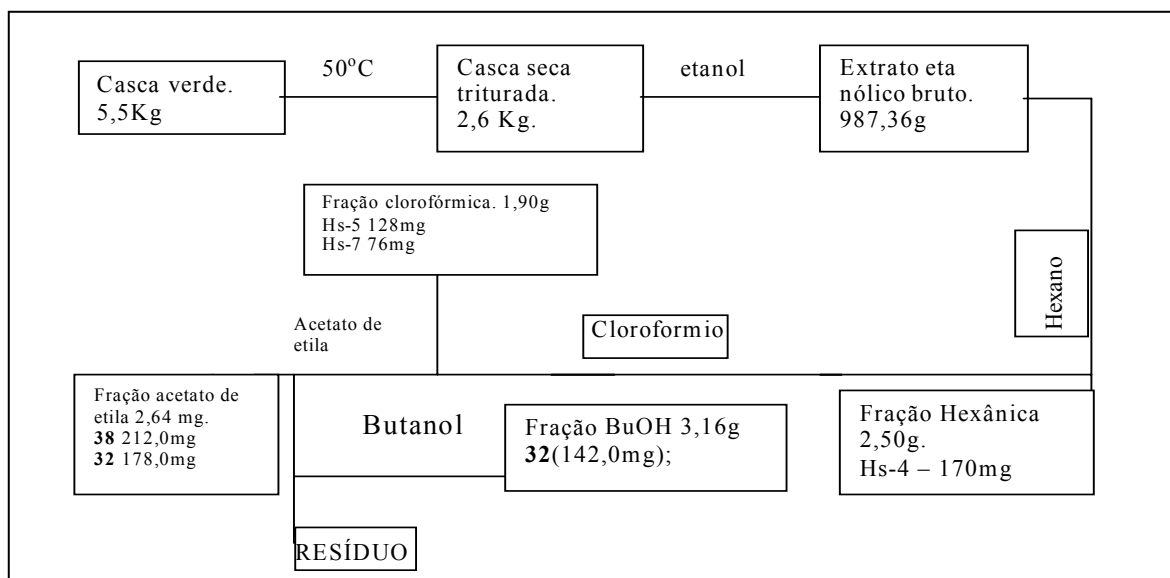
A fração acetato de etila (1,10g) foi submetida a uma separação através de CC utilizando-se sílica gel como suporte sólido e eluente acetato de etila :MeOH com crescente polaridade. Desta maneira, isolou-se 167 mg de um metabólito puro e cristalino, que foi codificado como AI-2, que mais tarde foi identificado como sendo o sitosterol glicosilado (**38**), além de 50 mg de um metabólito codificado como Ha-2, que foi identificado como sendo o plumerídeo glicosilado (**32**).

Da fração butanólica, além do plumerídeo glicosilado (**32**) (236mg), foi isolado o metabólito codificado como Ha-1 (97,00mg). O Ha-1 foi isolado após o procedimento inicial com CC usando sílica gel como suporte e sistema de eluentes de Acetato de etila :Metanol e subsequentemente por CCD eluindo a placa com um sistema Acetato de etila :Metanol 90:5. Ha-1 é solúvel a partir de Acetato de etila :Metanol 90:10.

Da fração butanólica, além do plumerídeo glicosilado (**32**) (236mg), foi isolado o metabólito codificado como Ha-1 (97,00mg).

4.3.2 Coleta do material da espécie *Himatanthus sucuuba*.

As cascas da *Himatanthus sucuuba* (Woodson) foram coletadas em 1998, a quarenta quilômetros distante de Rio Branco, Acre.



Fluxograma 2 - rota de análise fitoquímica dos tubérculos da *H. sucuuba*.

No herbário da UFAC (Universidade Federal do Acre) há a exsicata com número 8311; coletado por Irio Ribeiro.

O extrato etanólico bruto obtido foi devidamente seco e pesado obtendo-se 987,36g, e que foi processado conforme o Fluxograma 2.

4.3.2.1 Análise da fração hexânica neutra de *Himatanthus sucuuba*.

Desta fração(2,5g), após purificações através de recristalização com etanol e por cromatografia em placas preparativas, foram isolados os metabólitos cinamato de α -amirina (**27**), cinamato de lupeol (**28**), e acetato de lupeol (**29**), já encontrados na planta em estudos anteriores.^{46,48}

4.3.2.2 Análise da fração clorofórmica neutra da *Himatanthus sucuuba*.

Com a fração clorofórmica (1,90g) foi submetida a CC usando sílica gel como suporte e sistema de eluentes com ordem crescente de polaridade CHCl_3 a $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}(8:2)$. Desta fração foram isolados os metabólitos plumericina (**25**) (Hs-7) (76mg) e allamandina-A (**30**) (Hs-5)(128mg).

4.3.2.3 Análise da fração acetato de etila e butanólica neutra da *Himatanthus sucuuba*.

Na fração acetato de etila foi isolado e identificado o sitosterol glicosilado (**38**)(212,0mg) e em ambas frações formaram um precipitado cristalino após adição de etanol, que por CCD e posterior purificação por recristalização com metanol, foi identificado o plumerídeo glicosilado (**32**)(178mg) e (142mg) isolado anteriormente da espécie *H. ampla*.

4.3.3 Método Horeau.

Em um recipiente de vidro apropriado, colocou-se 20 μmol do respectivo álcool secundário e acrescentou-se 20 μmol de anidrido-2-fenilbutírico racêmico e 20 μL de piridina seca. Deixou-se agitando por uma hora a temperatura ambiente. Após, adicionou-se 20 μL de água e continuou-se agitando a t.a por trinta minutos (hidrólise). Na seqüência, adicionou-se 500 μL de clorofórmio e algumas gotas de etanol/fenolftaleína, seguido de adição de uma solução de hidróxido de sódio até obtenção da cor violeta. Após agitação vigorosa, extraiu-se a fase clorofórmica. Na fase aquosa foram adicionados 500 μL de clorofórmio e o meio foi acidificado com 20 μL de HCl 1 M. No repouso, depois de vigorosa agitação, houve separação das fases e a fase aquosa foi descartada.

O ácido racêmico contido na fase clorofórmica foi metilado com diazometano, e posteriormente analisado por CG enantioseletiva.

4.3.4 Acetilação de álcoois secundários e primários.

Para 0,5 mmol de álcool, foram utilizados 3 mL de piridina e 3 mL de anidrido acético conforme metodologia já descrita na literatura⁶¹. A reação foi deixada em agitação por três horas, e após, o resíduo foi solubilizado em clorofórmio e lavado com HCl 2 N. O produto obtido foi analisado em CCD, em diversos sistemas de solventes.

4.3.5 Metilação do ácido carboxílico.

Para um mmol de ácido, foram adicionados 5mmoles de diazometano, acompanhando-se o final da reação através de CCD.

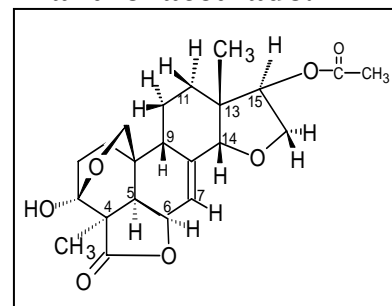
4.3.6 Preparação do diazometano.

Em um balão de fundo redondo, colocou-se 12g de KOH, 15mL de água, 50 mL de metanol e 50 mL de etanol, e em um funil de adição, 21g de Diazald[®] solubilizado em éter dimetílico do etileno glicol e éter etílico. Aqueceu-se o balão a 60-70⁰C e gotejou-se o conteúdo do funil de adição. O diazometano foi recebido em um balão contendo éter etílico resfriado com gelo seco e acetona. Os resíduos foram destruídos com ácido acético.

4.4 Informações sobre as substancias estudadas

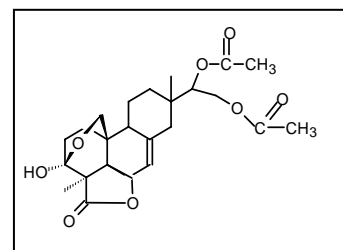
4.4.1 Dados cristalográficos do raio X do humirianthol acetilado.

$C_{22}H_{28}O_7$, $P2_12_12_1$, $T=150K$, $a=6.6478(5)\text{Å}$,
 $b=12.8381(8)\text{Å}$, $c=23.3409(9)\text{Å}$, $V=1992.0(2)\text{Å}^3$, $Z=4$,
 $\varphi_{\max}=25.03^\circ$, 10310 reflexões, 2061 unique
 $(R_{int}=0.153)$, $R_1[I>2\sigma(I)]=5.86\%$, $wR_2=14.58\%$,
 configuração relativa.



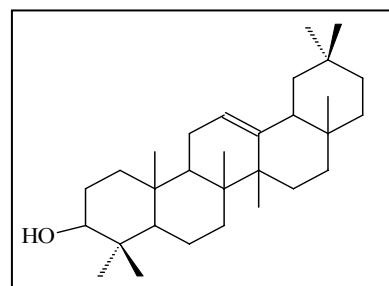
4.4.2 Dados cristalográficos do Raio X do acrenol acetilado.

$C_{25}H_{33}Cl_3O_8$, $P2_12_12_1$, $T=100K$, $a=8.0961(8)\text{Å}$,
 $b=11.2954(18)\text{Å}$, $c=28.684(4)\text{Å}$, $V=2623.1(6)\text{Å}^3$,
 $Z=4$, $\varphi_{\max}=20.06^\circ$, 8481 reflexões,
 2410 unique ($R_{int}=0.132$), $R_1[I>2\sigma(I)]=6.30\%$,
 $wR_2=16.13\%$, Flack $x=0.17(17)$, configuração absoluta.



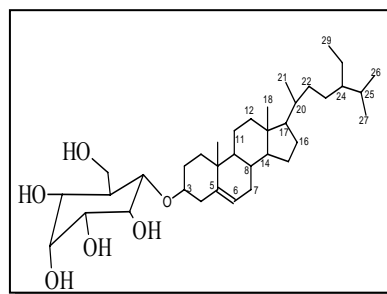
4.4.3 β -Amirina.

$[\alpha]_{D}^{25} = -51(c\ 1\ CHCl_3)$; P.F.: 212⁰C; recristaliza em etanol; estrutura definida através dos dados obtidos e comparados com a literatura⁵⁹(exp.); Dados RMN ¹H e ¹³C vide tabela 1 página 28.



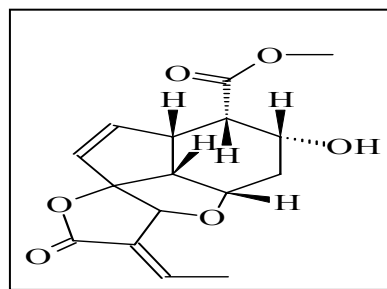
4.4.4 β -O-Sitosterol Glicosilado

IV_(KBr) OH=3421,7 cm^{-1} P.F.:220 $^{\circ}$ C; recristaliza em etanol; estrutura definida através dos dados obtidos e comparados com a literatura⁶⁰(exp.); Dados RMN ^1H e ^{13}C vide tabela 2 página 35.



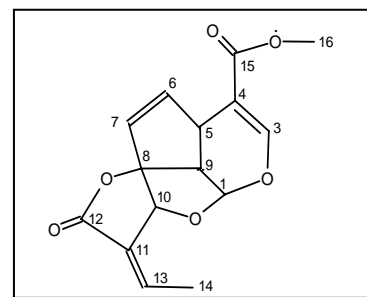
4.4.5 Allamandina-A

$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_7$; P.M.:322.310; $\text{C}_{(59.62\%)}\text{H}_{(5.63\%)}\text{O}_{(34.75\%)}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +20$ (c-0,06 Py); $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +15$ (c-0,006 MeOH); P.F.:233-235 $^{\circ}$ C; recristaliza com CHCl_3 (12mg 0,00048%w/w).(lit.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +11,53$ (c-0,5157 MeOH); P.F.:235 $^{\circ}$ C (exp.); Dados RMN ^1H e ^{13}C vide tabela 5 página 83.



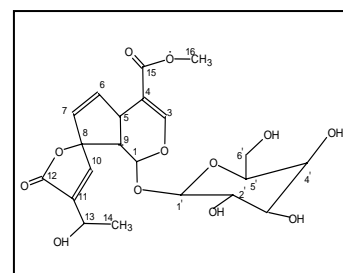
4.4.6 Hs-7

Plumericina $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$; P.M.:290,68; $\text{C}_{(62.07\%)}\text{H}_{(4.86\%)}\text{O}_{(33.7\%)}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +204$ (c-1. CHCl_3); P.F.:212,5-213,5 $^{\circ}$ C recristaliza com C_6H_6 ; Isoplumericina $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +216$ (c-1,01 CHCl_3); P.F.:200,5-201,5 $^{\circ}$ C (lit.); Hs-7 $\text{C}_{(61\%)}\text{H}_{(5\%)}\text{O}_{(34\%)}$ $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +197$ (c-0,286. CHCl_3); P.F.:199-204 $^{\circ}$ C(Experimental). Dados RMN ^1H e ^{13}C vide tabela 6 página 94.



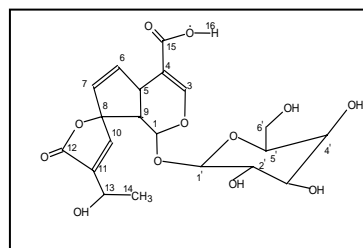
4.4.7 Plumerídeo glicosilado

$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -111$ (c-1. H_2O); $[\alpha]_{\text{D}}^{16} = -114$ (c-0,54. H_2O); $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -75 \pm 3^0$ (c-0,71 MeOH); P.F.:156-158 $^{\circ}$ C(anidro)(lit.); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -118,73^0$ (c-0,759 MeOH); P.F.:153 $\pm 1^{\circ}$ C(Experimental). Dados RMN ^1H e ^{13}C vide tabela 3 página 52



4.4.8 (Ha-1) Ácido 1 β -O-D-glicopiranosilplumérico.

R_f = 0,52 (acetato de etila:metanol, 9:1) $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -85 \pm 3^0$ (c-0,71 MeOH); P.F.:196,0 $\pm 1^{\circ}$ C(observado).



4.5 Atividade antimicrobiana

4.5.1 Microorganismos

Utilizaram-se cepas referência da American Type Culture Collection (ATCC), constituídas de microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos e fungos.

GRAM-POSITIVOS

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- *Bacillus subtilis* ATCC

GRAM-NEGATIVOS

- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
- *Escherichia coli* ATCC 11103
- *Salmonella setubal* ATCC 1919
- *Pseudomonas aeruginosas* ATCC

FUNGOS

- *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601
- *Candida albicans* ATCC 10231.

4.5.2 Padrões utilizados nos ensaios microbiológicos

As substâncias padrões utilizadas foram os seguintes antibióticos: Amoxicilina (978,9µg/mg) e Nistatina (2464,38UI/mg), padrões primários da USP, que foram preparados conforme FDA (1991).

4.5.3 Meios de Cultura

Para a manutenção das cepas dos microorganismos padrões foram feitos repiques a cada 15 dias, em tubos de ensaio com Ágar simples e Ágar Sabouraud-dextrose inclinados, para bactérias e fungos respectivamente. A incubação deu-se a 37°C por 24 horas. Posteriormente, retirados da estufa e mantidos à temperatura ambiente até o momento da elaboração do experimento.

- Ágar sabouraud

Peptona	10,0g
Dextrose	40,0g
Ágar-ágar	15,0g
Água destilada	1000,0mL

Reidratou-se em 1000,0 mL de água destilada 65,0g do meio, com aquecimento até a fusão do ágar. Posteriormente cerca de 5,0 mL foram distribuídos em tubos de ensaio 16X150mm e esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos. Após a esterilização, os tubos foram mantidos inclinados até a sua solidificação.

■ Ágar simples

Caldo nutriente	8,0g
Ágar-ágar	15,0g
Água destilada	1000,0mL

O meio foi dissolvido em água destilada, e colocado volumes de 5,0mL em tubos de ensaio 16X150 mm, tamponados com algodão e esterilizados em autoclave a 120°C, durante 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos inclinados até a solidificação do meio.

4.5.4 Preparação dos inóculos bacterianos .

As culturas bacterianas foram semeadas em Caldo de Caseína- Soja.

■ Caldo de Caseína-Soja

Caseína tratada por suco pancreático	17,0g
Farinha de soja por digestão papaínica	3,0g
Dextrose	2,5g
Fosfato de potássio dibásico	2,5g
Cloreto de sódio	5,0g
Água destilada	1000,0mL

4.5.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Para a determinação da atividade das amostras em estudo foi utilizado o seguinte meio de cultura:

■ Ágar Mueller-Hinton



Infuso de carne	300g
Caseína hidrolisada	17,5g
Amido	1,5g
Ágar-ágar	17,0g
Água destilada	1000,0mL

Preparado conforme as instruções do fabricante, reidratar 38,0g em água destilada, em seguida esterilizar em autoclave por 15 minutos a 120°C.

4.5.6 Preparação das suspensões dos microrganismos (inóculos)

Utilizando-se uma alça de platina esterilizada, transferiu-se as culturas de 24 horas dos microrganismos padrões em ágar simples inclinado para tubos de ensaio contendo 5,0mL de uma solução salina estéril padronizada pela escala de Mac Farland (0,5mL de cloreto de bário 0,048M + 99,5mL de ácido sulfúrico a 1,0%). Obteve-se, assim um inóculo contendo aproximadamente 10^8 UFC/mL, equivalente à metade da escala 1 de Mac Farland, e denominada de “suspensão concentrada”.

4.5.7 Determinação da atividade antimicrobiana pelo Método de Bioautografia

A atividade antimicrobiana pelo método de Bioautografia foi realizada de acordo com Hostettmann e colaboradores (1991) e Hamburger & Hostettmann (1991). Para a concretização deste, utilizou-se placas de Petri de 10X100 mm de diâmetro, onde foram depositadas as cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ com as amostras a serem analisadas. As cromatofolhas foram eluídas em clorofórmio: metanol (90:10). Em seguida, foram adicionados 10mL do meio de cultura liquefeito e inoculado com o microrganismo padrão sobre as cromatofolhas. Após a solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas a 35°C por 18 horas. Decorrido o período de incubação, as cromatofolhas foram reveladas com uma solução aquosa de cloreto 2,3,5 trifenil tetrazóleo (20mg/mL), e incubadas a 35°C durante 2-4 horas.

4.6. Teste de letalidade por *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina*^{64,65,66} tem como base a habilidade de uma substância em matar as larvas de *Artemia salina* criadas em laboratório. Este método é considerado como uma ferramenta bastante eficiente, rápida, simples e barata de avaliação preliminar de atividade farmacológica⁶⁷. Uma boa correlação tem sido feita com TLAS na detecção de compostos antitumorais⁶⁶, anti-trypanossomas cruzi⁶⁸ e antimaláricos⁶⁹.

5.1 Metodología

Ovos de artemia salina são eclodidos em solução de água do mar artificial sob oxigenação e iluminação. Após 48 horas formam-se as larvas do tipo “náupleos”.

Transferem-se 10 a 15 náupleos para tubos contendo solução da amostra em concentrações de 10 a 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$). Após 24 horas observa-se o número total de sobreviventes e o número total de náupleos. Determina-se a LC_{50} , concentração letal que mata 50 % da população total de animais, pelo método de Probits descrito por Finney⁶⁷

As amostras são consideradas ativas quando $TLAS < 1000 \mu\text{g/mL}$.

$LC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ Alta toxicidade

$LC_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$ Média toxicidade

$LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ Baixa toxicidade

5. CONCLUSÕES

Dos tubérculos da espécie *Humirianthera ampla* Miers (Icacynaceae) foram isolados os seguintes metabólitos secundários: β -amirina, sitosterol glicosilado, plumerídeo glicosilado, annonalida, humirianthol, acrenol e o ácido 1β -O- β -D-glicopiranosilplumérico.

O metabólito codificado por Ha-1 teve sua estrutura elucidada e identificado como ácido 1β -O- β -D-glicopiranosilplumérico. Na literatura consta este metabólito como constituinte da *Pluméria rubra* porém é um constituinte novo na *Humirianthera ampla*.

Da casca da espécie *Himatanthus sucuuba* Woodson (Apocynaceae) foram isolados e identificados os seguintes metabólitos secundários: cinamato de α -amirina, cinamato de lupeol, sitosterol glicosilado, allamandina-A, plumericina, e o plumerídeo glicosilado.

Apesar da substância plumerídeo glicosilado ter sido isolado de outras espécies do gênero *Pluméria*, a literatura não cita o isolamento deste metabólito das espécies *Humirianthera ampla* e *Himatanthus sucuuba*.

Os metabólitos humirianthol, acrenol, isolados de *Humirianthera ampla*, e allamandina-A e plumericina, isolada de *Himatanthus sucuba*, tiveram suas estereoquímicas absolutas ou relativas determinadas através da associação de métodos como: método de Horeau, difração de Raios-X e a RMN de ^1H , especialmente através da técnica NOESY.

Os hidrogênios e carbonos de todos os metabólitos isolados foram inequivocamente identificados, sendo que estes dados, formulados na forma de tabelas neste trabalho, podem servir de modelos para a atribuição de carbonos e hidrogênios de outras estruturas análogas.

As duas espécies estudadas apresentaram testes positivos quando analisadas quanto suas possíveis atividades antimicrobianas. Foram testados extratos brutos, frações e substâncias isoladas puras. Allamandina-A e plumericina foram as substâncias puras que se mostraram mais promissoras como substâncias antimicrobianas. Além disso, observou-se que derivatizações em algumas estruturas pode, em alguns casos, acentuar a atividade da substância ou mesmo inibir esta atividade. Por exemplo, acetilação dos metabólitos acrenol e humirianthol aumentaram suas atividades frente aos fungos *Cândida albicans* e *Sacharomyces cerevisiae*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1) Kamchonwongpaisan, S. and Meshnick, S. R. ; *Gen. Pharmac.* 27, 587, (1996).
- 2) Kingston, D. G. I. ; *Pharmac. Ther.* 1, 52, (1991).
- 3) Horwitz, S. B.; *Nature* 593, 367 (1994).
- 4) Neumeyer, J.L. et al ; *J. Med. Chem.* 34, 3144 (1991).
- 5) Verpoorte, R. et al ; *The Alkaloids*, 40:1-187 (1997).
- 6) Chadwick, D. J.; Marsh, J. (Editors); *“Bioactive Compounds from Plants”*, John Wiley, New York (1990).
- 7) Schultes, E.R. and Hoffmann, A. (1979) **Plant of the Gods. Origins of Halucinogenenic**. McGraw-Hill Book Company, New York, NY, 192p.
- 8) Machado, E. C.; et al. *“Four Cyclopeptidic Alkaloids From Discaria longispina” Journal Of Natural Products*, 548,58, (1995)
- 9) da Silva, U. F.; et al. "The stereochemistry of the N,N-dimethyl amino acid and of the α -amino acid unit of peptid alkaloids" *Phytochemical Analysis*, 20, 7, (1996).
- 10) de Moura, N. F ; et al. **Benzophenanthridine Alkaloids from Zanthoxylum rhoifolium**” *Phytochemistry*, 1443, 46 (1997).
- 11) Morel, A. F.; et al; **“Cyclopeptide alkaloids of Scutia buxifolia”** *Phytochemistry*, 125, 47 (1998).
- 12) Morel, A. F.; et al. **“ A new amide from Nicotiana glauca”** *Planta Medica* 64 (1998).
- 13) Cronquist, A.; *An Integrated System of Classification of Higher Plants*, Columbia University Press, New York (1981).
- 14) Engler, A. *In die Natürlichen Pflanzenfamilien*; Eds Engelmann, Leipzig III,5,233(1896).

- 15) Benson, L. D. *Plant Classification* 2nd Edn. Lexington, Mass. (1979).
- 16) Goldberg, A. *Classification, Evolution and Phylogeny of the Families of dicotyledons* Smithsonian Institution Press, Washington (1986).
- 17) Howard, R. A. ; **Contribution from the Gray Herbarium Harvard University. CXLII. Studies of the Icacinaceae IV: Consideration of the New World Genera**, 3, 60 (1942).
- 18) Oliveira, A. B. de; Terpenoids from Amazonian Icacinaceae (*Chemistry of the Amazon*) *Am. Chem. Soc.* 10, 99-115 (1994).
- 19) Carvalho, M. J. C.; O Pólen em plantas da Amazônia. Gêneros Poraqueiba Aubl. E Emmotum Desv. (Icacinaceae), *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, série botânica, 42, Belém, (1971).
- 20) Barroso, G. M. *Sistemática das Angiospermas do Brasil* v.2 Viçosa UFV- Imprensa Universitária (1984).
- 21) Brako, L. & Zarucchi J. L.; Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 1993.
- 22) Agarwal, J. S. & Rastogi, R. P.; *Indian J. Chem.* 13, 758 (1975).
- 23) Govindachari, T. R. et al ; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, I, 1215 (1974).
- 24) Govindachari, T. R. & Viswanathan, N. ; *Phytochemistry* 11, 3529 (1972).
- 25) Arisawa, M., et al; *Planta Médica* 43, 404 (1981).
- 26) Oliveira, A. B. et al ; *Phytochemistry* 13, 1199-1204 (1974).
- 27) On'okoko, P. & Vanhaelen, M. ; *Phytochemistry* 19, 303 (1980).
- 28) On'okoko, P. et al ; *Bull. Soc. Chim. Belg.* 86, 655 (1977).
- 29) On'okoko, P. et al ; *Tetrahedron* 41, 745 (1985).
- 30) Zogbi, M. G. B. ; et al.; *Phytochemistry* 20, 7, 1669-1673 (1981).
- 31) Zogbi, M. G. B. ; et al. ; *Acta Amazônica* 13, 1, 215-216, (1983).

- 32) Graebner, I.B ; Estudo de RMN ^1H e ^{13}C de diterpenos da Humirianthera ampla.MIERSA(Icacinaceae) *Dissertação de mestrado* UFSM,(1998).
- 33) Orsini, F. & Pelizzoni, F.; *Tetrahedron Letters* 12, 1085-1088,1977.
- 34) Mussini, P. ; et all. ; *J.C.S. Perkin I* 2551-2557(1973).
- 35) Graebner, I.B. et all ;*Phytochemistry* 53,955-959(2000).
- 36) Silva, M.,F. at all; *Nomes vulgares de plantas da Amazônia*. Manaus.Am.(1977).
- 37) Engler, A. & Prantl, K.; *Die natürlichen planzenfamilien*, IV,2,(1895).
- 38) Cruz, G. L. ; *Dicionário de plantas úteis do Brasil*. Ed. Civilização Brasileira S.A. 3^a ed., p 597, Rio de Janeiro, (1985).
- 39) Perdue,G.P.& Blomster,R.N.; *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67,9(1978).
- 40) Sanduja, R. et all; *Journal of Natural Products* 48,2,335(1985).
- 41) Tan, G. T. et all ; *Journal of Natural Products* 54, 1, 143 (1991).
- 42) Endo, Y. et all. ; *Chem. Pharm. Bull.* 42, 6, 1198-1201 (1994).
- 43) Villegas, L. F. et all ; *Journal of the Ethnopharmacology* 55, 193 (1997).
- 44) Guerra, M. de O. & Peters, V. M. ; *Journal of the Ethnopharmacology* 34, 195 (1991).
- 45) Miranda, A. L. P. de , et all. ; *Planta Médica* 66, 284 (2000).
- 46) Hasegawa, M. & Ferrigni, V, N. R.; *Rev. Latinoamer. Quim.*, 7, 146 (1976).
- 47) Vanderlei, M. F. et all ; *J. Braz. Chem. Soc.* 2, 2, 51-55 (1991).
- 48) Barreto A. de Sá et all ; *J. Braz. Chem. Soc.* 9, 5, 430, (1998).
- 49) Little, J. E. & Jhonstone, D. B.; *Arch. Biochemistry* 30, 445 (1951).
- 50) Schmid, H. at all. ; *Helvética Chimica Acta* 35, 415 (1952).

- 51) Halpern, O. & Schmid H. *Helvética Chimica Acta* 41, 1109 (1958).
- 52) Schönberg, A. G. & Schmid H. *Helvética Chimica Acta* 44, 1447 (1961).
- 53) Abe, F. et all. ; *Chem. Pharm. Bull.* 36, 8, 2784-2789 (1988).
- 54) Kardono, L. B. S. et all ; *J. of Natural Products* 53, 6, 1447-1455 (1990).
- 55) Kupcham, S. M. et all; *The J. of Organic Chem.* 39,17,2477(1974).
- 56) Coppen, J. J.W.; *Phytochemistry*, 22,1(1983).
- 57) Anderson, J. E. et all; *Journal of Natural Products* 51,2,307-308(1988).
- 58) König W.A.; et all; *Chirality* 6,141-147 (1994).
- 59) Ugaz, O. L.; *Investigación Fitoquímica* Segunda edicion, Pontificia Universidad Católica del Peru. Fondo Editorial 1994.
- 60) Machado, E. C.; *Tese de doutoramento* Universidade Federal de Santa Catarinade, Florianópolis (1995) Br.
- 61) Hennig, P. *Tese de doutoramento* Universidade de Tübingen (1985) (RFA).
- 62) Govindachari, T. R.; et all *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* 1215 (1974).
- 63) Perez M.T.L.P. ; *Tese de doutoramento* UFSC Florianópolis.1997.
- 64) Michael, A. S., Thompsom C. G., et al. *Science*, 1956, 123:464
- 65) Vanhaecke, P., Persoone G., et al *Ecotoxicol. Env. Safety*, 1981,5:352-387.
- 66) Meyer, B. N, Ferrigni, N.R, et al. *Planta Medica*, 1982, 45:31-34.
- 64) Colegate, S. M. *Bioactive Natural Products: detection, isolation and structural determination.* CRC Press, EUA, 1993, 441-450.
- 65) Alves, T. M. A. et al *Men. Inst. Oswaldo Cruz*, 2000, 95(3): 367-373.
- 66) Ciccia, G. Coussio, J., Mongelli, E. *Ethnopharmacol.*, 2000, 72:185-189.