

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS RAMOS DE ESPÉCIES
DO GÊNERO *Vismia* Vand. (Hypericaceae)**

MARIA IZABEL CORREIA OSORIO

MANAUS

2019

MARIA IZABEL CORREIA OSORIO

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS RAMOS DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Vismia* Vand. (Hypericaceae)**

ORIENTADORA: DRA. CECILIA VERONICA NUNEZ

Dissertação apresentada à
Coordenação do Programa Integrado de
Pós-Graduação em Botânica do INPA,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciências
Biológicas, área de concentração em
Botânica.

MANAUS

2019



**ATA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO
DE MESTRADO DISCENTE DO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA DO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA
AMAZÔNIA.**


Aos vinte e oito dias do mês de junho de 2019 às 09:00 horas, na sala de aula da Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais INPA-Campus I, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Dra. Daiane Martins Ramos, da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Dra. Nádia Cristina Falcão Bucker, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e Dra. Waldireny Caldas Rocha, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), tendo como suplentes: Dra. Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e Dr. Manoel Feitosa Jeffreys, da Universidade Paulista (UNIP/SEDUC), sob a presidência do primeiro, a fim de proceder à arguição pública da **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, intitulada: “ **Estudo químico e biológico dos galhos de *Vismia japurensis* Reichardt (Hypericaceae)** ” discente: **Maria Izabel Correia Osorio**, sob orientação: Dra. Cecilia Veronica Nunez. Após a exposição, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
DAIANE MARTINS RAMOS	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
NÁDIA CRISTINA FALCÃO BUCKER	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
WALDIRENY CALDAS ROCHA	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
CLAUDIA DANTAS C. WYREPKOWSKI	<input type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
MANOEL FEITOSA JEFFREYS	<input type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO

Manaus (AM), 28 de junho de 2019.

OBS: _____

Nada mais havendo, foi lavrado a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.



Dr. Michael John Gilbert Hopkins
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Botânica
PO. 116/2017 - DIBOT/INPA

FICHA CATALOGRÁFICA

083e Osorio, Maria Izabel Correia
ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS RAMOS DE ESPÉCIES
DO GÊNERO *Vismia* Vand. (Hypericaceae) / Maria
Izabel Correia Osorio; orientadora Cecilia
Veronica Nunez. -- Manaus:[s.l], 2019.
80 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação
em Botânica) -- Coordenação do Programa de Pós-
Graduação, INPA, 2019.

1. *Vismia*. 2. Fitoquímica. 3. Ensaio biológico.
I. Nunez, Cecilia Veronica, orient. II. Título.

CDD: 580

Dedicatória

Em memória a meus pais Adrião Ozorio e Iracema Correia. Amarei vocês eternamente.

“Epígrafe”

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por todas as conquistas, e por não me deixar esmorecer nos momentos de maiores dificuldades. Por toda força e coragem a mim concedida para seguir em frente na minha caminhada em busca de novos conhecimentos.

Durante minha vida acadêmica em busca de conhecimento tive a honra de conhecer pessoas tão bondosas, competentes e especiais que me deram suporte e encorajamento nessa jornada de estudos e trabalho. Minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Cecilia Veronica Nunez, pelas orientações, paciência, ensinamentos, amizade, compreensão, incentivo, ajuda e principalmente pela acolhida, confiança depositada a minha pessoa, ao meu trabalho desde a graduação; momento esse que foi o início de um novo ciclo de experiências e conhecimento. Minha eterna gratidão e carinho, obrigada, minha doutora maravilhosamente linda e bondosa.

A minha Família, em especial meus pais Adrião e Iracema que já não se encontram entre nós, mas que foram essenciais para minha formação e mesmo sem entender o que eu estudava, com o que trabalhava, eram compreensivos para comigo quando não podia estar ao lado deles, pelas conversas regadas de palavras de esperança, conforto, incentivo e sabedoria. Aos meus filhos Adriane e Adenil Junior pela força e apoio durante os períodos difíceis. Os meus irmãos, pelas palavras de incentivo, orações, amizade, compreensão, carinho, conforto, apoio e encorajamento todas as vezes que precisei todos estavam apostos para me ouvir e acolher. Aos meus primos e primas, quase irmãos que direta ou indiretamente sempre estavam me dando incentivo e torcendo por mim, meu muito obrigada.

A minha amiga e irmã de coração Laila Pedroza, ou Lyla que foi a primeira pessoa a me incentivar a entrar na área da fitoquímica que mesmo sem entender nada topei e passei a gostar. Foi através das suas palavras de incentivo, apoio, paciência, compreensão, amizade, companheirismo, pelas conversas de bancada, pelas caronas, obrigada por fazer parte do meu círculo de amizade, da minha vida. Tenho adquirido um enorme aprendizado com você ainda mais porque trabalhamos juntas com a mesma planta, agradeço também por ser minha companheira de viagens aos congressos, os passeios que fizemos juntas mesmo sem conhecer os locais, aprendemos rápido, sem medo de nós perdermos nas cidades até então desconhecidas, o meu muito obrigada por tudo.

A minha amiga e princesinha, Laura Correa meu muito obrigada, pelas suas palavras de bondade, paciência, compreensão, ensinamento, aprendizagem, pelas informações, de esclarecimento e, apoio e, pelas palavras de incentivos, carinho a mim transmitida, com uma imensa tranquilidade, compreensão, sempre com suas palavras meigas, nos momentos mais

diffíceis sempre transmitindo paz, amor e muita sabedoria, você menina Laura o meu muito obrigada.

A minha amiga, companheira, irmã de coração Maria Teresa (Maitê) por toda ajuda, incentivo, por cada palavra, gesto de carinho, por esclarecer minhas dúvidas, por realizar meus testes antibacterianos, pelas conversas, risadas e amizade durante todo tempo em que temos convivido. Foi muito bom ter conhecido você minha peruana favorita. A minha amiga Tais Xavier, por me ajudar nas horas que precisei, por tirar minhas dúvidas, pelo apoio, incentivo, amizade, pelas conversas jogadas fora nos nossos intervalos e os cafezinhos. Foi maravilhoso conhecer uma sinhazinha de Parintins.

Aos meus amigos da Turma de Mestrado em Botânica, Anchieta, Oscarina, Itamara, Havle, Renato, Jéssica, Marcelo, Guilherme, Malika, Marisabel, Francisco, e outros que conheci ao longo dessa jornada botânica como Lorena, Ariel, Kamila, Ronaldo, Aline, e Gabriela, agradeço a Deus por ter tido a oportunidade de conhecer a todos, que compartilhamos de momentos de muito aprendizado, companheirismo e diversão juntos.

Ao Prof. Dr. Mike Hopkins, o meu muito obrigada pela aprendizagem, apoio, ensinamentos, cuidado em nossas caminhadas pelas várias disciplinas nas áreas de floresta, pela força e, dedicação de passar os ensinamentos a cada um de seus alunos. Resistindo ao cansaço, o sol, a chuva, fome fazendo tudo isso por gostar do que sabe fazer. Transmitir seus conhecimentos a cada um de nós, sem mais, só tenho a lhe agradecer por tudo de maravilhoso.

Aos meus amigos de laboratório (Lab. 1 e 2): Em especial a Lorena Mayara, pela sua amizade, carinho, compreensão, pelo incentivo, encorajamento, apoio, pelas conversas, de bancadas, as caronas e que mesmo de longe torce por mim, a você Mayara o meu muito obrigada. E ao meu amigo Manoel Jeffreys, obrigada por me trazer até este laboratório que foi o início de tudo, obrigada por depositar sua confiança em mim pelas suas palavras de apoio e incentivo pelas caronas, pelas ajudas, infinita, a você Manu o meu muito obrigada. A Fabiele pela ajuda, amizade, compreensão, pelas conversas jogadas fora, pelas risadas e por tudo que juntas aprendemos. A Prof^a. Dr^a. Daiane Martins pela força, apoio incentivos encorajamentos e aprendizagem pelas conversas e risadas. A Prof^a. Dr^a. Nádia Falcão Buckes pela realização dos ensaios de angiogênese, pelo apoio, incentivo, amizade e aprendizagem, o meu muito obrigada. Ao David Ribeiro, obrigada meu menino, pela sua grandiosa ajuda, por tirar minhas dúvidas infinitas, pela sua amizade, bondade, pela sua paciência, mansidão, e por todas as vezes que precisei e você nunca me disse não, sou muito grata e tenho uma grande admiração e consideração por você. Aos demais colegas do laboratório Jaciara, Fabio Vidal, Claudia Dantas, Pierre Alexandre, Juliana Souza, Sabrina, André, Juliana de Oliveira, Fabiane Moraes, Vanessa

Neves, Júlio Cezar, Maria Carolina, Amanda, Gabriel, Priscila, Aline, Maria Cristina, Daniel, Weilson, Perla, Wendell, William, Laisley, Stefhania, Ana Luiza, Vanessinha e, Jennifer, Leomara, Andrei, Francislany, Nerilson, Orleyson e Maria Negreiro, meus sinceros agradecimentos (perdoem-me se estiver esquecendo o nome de alguém, não diminui em nada a importância que tiveram em todo esse processo). Agradeço a todos pois sempre estiveram presentes ao meu lado, pela amizade, apoio, por todas as conversas (as tristes e as alegres), pela paciência e pelas brincadeiras ao longo do meu Mestrado.

Quero agradecer a equipe da central analítica pela realização das análises de ressonância magnética nuclear em especial a Sabrina e Magno, o meu muito obrigada.

Ao Programa de Pós-Graduação PPG-BOT.

Aos professores e colegas do curso de Mestrado em Botânica do INPA.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse projeto.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE QUADROS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	xxi
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Família Clusiaceae Lindl. e Hypericaceae Juss.	3
2.2 Família Hypericaceae.....	3
2.3 Gênero <i>Vismia</i> Vand.	6
2.3.1 <i>Vismia cauliflora</i> A. C. Sm.	8
2.3.2 <i>Vismia japurensis</i> Reicht.	11
2.3.3 <i>Vismia sandwithii</i> Ewan.....	15
2.4 Produtos naturais bioativos	16
2.4.1 Metabólitos Primários e Secundários	17
2.5 Atividade Química e Biológica.....	17
2.5.1 Atividade de toxicidade frente <i>Artemia</i>	18
2.5.2 Atividade antioxidante	18
2.5.3 Atividade antibacteriana.....	19
2.5.4 Atividade antiangiogênica.....	20
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. MATERIAS E MÉTODOS	22
4.1 Especificações dos equipamentos e materiais utilizados	22

4.2 Coleta do material vegetal	23
4.3 Preparo dos extratos vegetais	26
4.4 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	27
4.5 Análise dos extratos hexânicos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Rimn de ¹ H)	28
4.6 Isolamento dos constituintes químicos dos ramos de <i>V. japurensis</i>	28
4.6.1 Fracionamento da fração 3-10.....	29
4.7 Isolamento dos constituintes químicos dos ramos de <i>Vismia sandwithii</i>	37
4.8 Métodos de análise estrutural.....	41
4.9 Avaliação das atividades química e biológicas.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Rendimentos dos extratos brutos	45
5.2 Identificação estrutural das substâncias isoladas	50
5.2.1 Identificação da substância I	50
5.2.2 Identificação da substância II.....	53
5.2.3 Identificação da substância III e IV	56
5.2.4 Identificação da substância V	60
5.3 Avaliação da atividade química e biológica	63
5.3.1 Atividade de toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	63
5.3.2 Atividade antioxidante	63
5.3.3 Atividade antibacteriana.....	64
6. CONCLUSÃO.....	68
7. REFERÊNCIAS	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados do fracionamento do extrato hexânico de <i>V. japurensis</i>	28
Tabela 2. Dados do fracionamento da fração 3-10.....	29
Tabela 3. Dados do fracionamento da fração 6-7.....	30
Tabela 4. Dados da preparativa da fração 34-35.....	30
Tabela 5. Dados da preparativa da fração 36-52.....	30
Tabela 6. Dados do fracionamento da fração 8-9.....	32
Tabela 7. Dados do fracionamento da fração 22.....	32
Tabela 8. Dados do fracionamento da fração 10-13.....	35
Tabela 9. Dados do fracionamento da fração 8-13.....	35
Tabela 10. Dados do fracionamento da fração 3-7.....	35
Tabela 11. Dados do fracionamento da fração 5-23.....	35
Tabela 12. Dados do fracionamento da fração 1.....	35
Tabela 13. Dados do fracionamento da fração 14-19.....	36
Tabela 14. Dados do fracionamento da fração 4-5.....	36
Tabela 15. Fração: 1-RVS-H (coluna aberta).....	38
Tabela 16. Dados do fracionamento da fração 67-81.....	39
Tabela 17. Dados do fracionamento da fração 129-132.....	39
Tabela 18. Massas dos extratos brutos obtidas dos ramos de <i>V. japurensis</i> , <i>V. cauliflora</i> e <i>V. sandwithii</i>	45
Tabela 20. Teste de toxicidade de extratos dos ramos de <i>V. japurensis</i> frente a indivíduos de <i>Artemia salina</i>	63
Tabela 19. Resultado da avaliação antioxidante dos extratos brutos das folhas de <i>V. japurensis</i>	64
Tabela 21. Concentração Inibitória Mínima – CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos hexânicos dos ramos de <i>V. japurensis</i> e <i>V. sandwithii</i>	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial da família Hypericaceae. Fonte: http://: www.tropicos.org	4
Figura 2. Distribuição de Hypericaceae no Brasil. Fonte: http://www.splink.org.br/index?lang=pt	6
Figura 3. Distribuição do gênero <i>Vismia</i> no Brasil. Fonte: http://www.splink.org.br/index?lang=pt	7
Figura 4. Ilustração botânica da espécie <i>V. cauliflora</i>	9
Figura 5. <i>V. cauliflora</i> . A. Ramos com folhas. B. Ramo com inflorescências caulifloras. C. Detalhe da face abaxial das folhas. D. Detalhe do pecíolo em corte transversal. Fotos: Shimizu 2017. Fonte: Vogel-Ely <i>et al.</i> 2019	10
Figura 6. Substâncias identificadas em <i>V. cauliflora</i> (Ribeiro <i>et al.</i> 2014).....	11
Figura 7. Ilustração de <i>V. japurensis</i>	12
Figura 8. <i>V. japurensis</i> . A. Ramos com folhas e inflorescências. B. Ramos mostrando ambas as faces abaxial e adaxial das folhas C. Ramos com frutos D. Ramos com inflorescência. Fonte: Osorio, M. I. C. e Pedroza, L. S. 2018; Cabral 2016; Shimizu 2018	13
Figura 9. Substâncias isoladas da espécie <i>V. japurensis</i>	15
Figura 10. <i>V. sandwithii</i> A. Ramos com inflorescência. B. Frutescência. C. Detalhe da coloração da seiva. Fotos: Martins 2017. Fonte: Vogel-Ely <i>et al.</i> 2019.....	16
Figura 11: Fluxograma de coletas para cada espécie de <i>Vismia</i>	24
Figura 12. <i>V. japurensis</i> : A) ramos com folhas e inflorescência; B) arbusto; C) exsicata.....	25
Figura 13. <i>V. cauliflora</i> : A) Ramos com inflorescências caulifloras; B) árvore inteira com folhas	25
Figura 14. <i>V. sandwithii</i> : A) Folha; B) árvore; C) ramos. Fonte: Osorio, M.I.C. e Pedroza, L.S 2019.	26
Figura 15. Fluxograma do preparo dos extratos vegetais	27
Figura 17. Fluxograma do fracionamento da fração 3-10.8-9.....	33
Figura 18. Fluxograma do fracionamento fração 3-10.10-13.....	34
Figura 19. Fluxograma do fracionamento fração 3-10.14-19.....	37
Figura 20. Fluxograma dos fracionamentos das frações 67-81 e 129-132.....	40
Figura 21. CCDC dos extratos hexânicos brutos dos ramos. <i>V. japurensis</i> (1 ^a , 2 ^a e 3 ^a coleta) (1, 2, 3), <i>V. cauliflora</i> (4) e <i>V. sandwithii</i> (5)	47
Figura 22. Espectros de RMN de ¹ H de todos os extratos hexânicos das três espécies de <i>Vismia</i> . RVS: Ramos de <i>V. sandwithii</i> ; RVC: Ramos de <i>V. cauliflora</i> ; RVJ: Ramos de <i>V. japurensis</i>	47

Figura 23. Expansão dos Espectros de RMN de ^1H , de todos os extratos hexânicos das três espécies de <i>Vismia</i> , da região 0,6 a 1,8 ppm. RVS: Ramos de <i>V. sandwithii</i> ; RVC: Ramos de <i>V. cauliflora</i> ; RVJ: Ramos de <i>V. japurensis</i>	48
Figura 24. Expansão dos Espectros de RMN de ^1H , de todos os extratos hexânicos das três espécies de <i>Vismia</i> , da região 6,0 a 8,0 ppm. RVS: Ramos de <i>V. sandwithii</i> ; RVC: Ramos de <i>V. cauliflora</i> ; RVJ: Ramos de <i>V. japurensis</i>	49
Figura 25. Expansão dos Espectros de RMN de ^1H , de todos os extratos hexânicos das três espécies de <i>Vismia</i> , da região 10,0 a 16,0 ppm. RVS: Ramos de <i>V. sandwithii</i> ; RVC: Ramos de <i>V. cauliflora</i> ; RVJ: Ramos de <i>V. japurensis</i>	49
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H da substância I, friedelina (CDCl_3 , 300MHz)	51
Figura 27. Expansão na região de 0,0 a 2,5 ppm do espectro de RMN de ^1H da substância I, friedelina (CDCl_3 , 300MHz)	51
Figura 28. Comparação da fração 4-5 com um padrão da substância I, friedelina (CDCl_3 , 300MHz).....	52
Figura 29. Comparação da fração 4-5 com um padrão, ampliação da região das metilas, da substância I, friedelina (CDCl_3 , 300MHz)	52
Figura 30. Estrutura da substância I, friedelina	52
Figura 31. Estrutura da substância II, madagascina	53
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H da mistura das substâncias I e II, friedelina e madagascina (CDCl_3 , 300MHz).....	54
Figura 33. Expansão da região de (6,5 a 13 ppm) do espectro de RMN de ^1H da substância II, madagascina (CDCl_3 , 300MHz).....	54
Figura 34. Expansão da região dos aromáticos (6,5 a 7,7 ppm) do espectro de RMN de ^1H da substância II, madagascina (CDCl_3 , 300MHz).....	55
Figura 35. Expansão da região dos aromáticos (6,5 a 7,7 ppm) do espectro de RMN de ^1H da substância II, madagascina (CDCl_3 , 300MHz).....	55
Figura 36. Comparação da fração 1 com um padrão da substância II, madagascina (CDCl_3 , 300MHz).....	56
Figura 37. Estrutura das substâncias fisciona e vismiaquinona A (substância III e IV)	57
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H da substância II e IV, fisciona e vismiaquinona A (CDCl_3 , 300MHz).....	58
Figura 39. Expansões da região de 6,8 a 7,7 ppm) do espectro de RMN de ^1H das substâncias III e IV, fisciona e vismiaquinona A (CDCl_3 , 300MHz).....	58

Figura 40. Expansão da região de 1,0 a 4,5 ppm do espectro de RMN de ^1H das substâncias III e IV, fisciona e vismiaquinona A (CDCl_3 , 300MHz).....	59
Figura 41. Comparação da fração 1 com um padrão da substância III, fisciona (CDCl_3 , 300MHz).....	59
Figura 42. Comparação da fração 1 com um padrão da substância IV, vismiaquinona A (CDCl_3 , 300MHz).....	60
Figura 43. Espectro de RMN de ^1H da substância V, friedelanol (CDCl_3 , 300MHz).....	61
Figura 44. Expansão na região de 0,0 a 2,5 ppm do espectro de RMN de ^1H da substância V, friedelanol (CDCl_3 , 300MHz)	61
Figura 45. Comparação da fração 11-13 com um padrão da substância V, friedelanol (CDCl_3 , 300MHz).....	62
Figura 46. Comparação da fração 11-13 com um padrão, ampliação da região das metilas, da substância V, friedelanol (CDCl_3 , 300MHz).....	62
Figura 47. Estrutura da substância V, friedelanol	62
Figura 48. Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato dos ramos da 1ª coleta de <i>V. japurensis</i>	66
Figura 49. Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato dos ramos da 3ª coleta de <i>V. japurensis</i>	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Substâncias identificadas na espécie <i>V. cauliflora</i>	10
Quadro 2: Substâncias isoladas da espécie <i>V. japurensis</i>	14

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt- Acetato de etila
C¹³- Hidrogênio de carbono
CCDC- Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
COSY- *Correlation Spectroscopy*
CL₅₀ - Concentração Letal para 50% dos indivíduos.
CLSI- Clinical and Laboratory Standards
DCM- Diclometano
DMSO-Dimetilsulfoxido.
DPPH•- 1-1-difenil-2-picril-hidrazila
Fe³⁺ - Ferro-Fenantrolina
¹H- Hidrogênio
HMBC- *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HSQC- *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*
Hex- Hexano
INPA- Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
MEOH- Metanol
MIC- Concentração Inibitória Mínima
RMN- Ressonância Magnética Nuclear
RMPI- Roswell Park Memorial Institute
SiO₄ - Sílica
TMS-Tetrametilsilano
UV - Ultra-Violeta
NP/PEG - Difenilboriloxietilamina/Palietilenoglicol
MHz - Mega Hertz
IFAM - Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Amazonas
CCDP - Cromatografia em camada delgada preparativa

RESUMO

Espécies do gênero *Vismia* (Hypericaceae) são frequentemente pioneiras nos processos sucessionais de florestas secundárias, dominando extensas áreas, conhecidas como “vismiais”. Em estudos realizados com espécies desse gênero foram relatadas atividades antioxidante, bacteriana, citotóxica, leishmanicida, antimalárica, entre outras. Desta forma, o objetivo deste estudo foi ampliar o conhecimento químico e biológico dos ramos de *V. japurensis* Reichardt, *V. cauliflora* A. C. Sm. e *V. sandwithii* Ewan. Foram realizadas três coletas de *V. japurensis*, uma de *V. sandwithii* e uma de *V. cauliflora*. Os materiais foram secos, moídos e extraídos com hexano, metanol e água. Os extratos hexânicos das cinco coletas foram analisados usando as técnicas de cromatografia em camada delgada comparativa e ressonância magnética nuclear de ¹H. Os ramos da primeira coleta de *V. japurensis* e de *V. sandwithii* foram submetidos a diversos fracionamentos cromatográficos. A determinação estrutural das substâncias isoladas foi realizada pela utilização de métodos espectroscópicos (RMN de ¹H e de ¹³C, incluindo as técnicas bidimensionais: HSQC, HMBC, COSY e NOESY), espectrometria de massas, além de comparação com dados da literatura. Do extrato hexânico da primeira coleta da espécie de *V. japurensis* foi isolado um triterpeno (friedelina) e três antraquinonas (madagascina, fisciona e vismiaquinona). Já do extrato hexânico de *V. sandwithii* foi isolado um triterpeno (friedelanol). Os extratos hexânicos e metanólicos da primeira coleta dos ramos de *V. japurensis* foram testados para a atividade antioxidante, contudo não se mostraram ativos. Quanto à atividade de toxicidade frente a *Artemia salina*, os extratos de *V. japurensis* apresentaram uma toxicidade na concentração de 1000 µg/mL, com mortalidade de 96% das larvas, para o extrato hexânico da primeira coleta e da terceira coleta apresentou mortalidade de 63% (hexânico) e 83% (metanólico). Para a atividade antiangiogênica, foram testados os extratos hexânicos da primeira coleta, que apresentaram uma atividade nas concentrações de 100, 500 e 1000 µg/mL com percentual de inibição de novos vasos sanguíneos de aproximadamente 60, 80 e 90% respectivamente. Da terceira coleta de *V. japurensis*, testados nas mesmas concentrações, apresentaram os respectivos valores de inibição 60, 80 e 97%. Os extratos hexânicos das coletas *V. japurensis* e *V. sandwithii* foram testados pelo método de microdiluição e foram considerados ativos com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 500 µg/mL frente às bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Edwardsiella tarda* e *Pseudomonas aeruginosa*. Este é o primeiro relato de estudo químico com os ramos de *V. sandwithii* sendo este o primeiro relato do

triterpeno friedelanol. Foi a primeira vez que está sendo descrita atividade biológica para esta espécie. E para a espécie *V. japurensis*, este é o primeiro relato de estudos químico e biológico realizados com os ramos da espécie.

Palavras chaves: metabólitos secundários, triterpeno, antraquinona, *Vismia*

ABSTRACT

Vismia species (Hypericaceae) are often pioneers in the successional processes of secondary forests, dominating extensive areas, called “vismiais”. In studies with species of this genus are related the activities: antioxidant, antibacterian, cytotoxic, leishmanicid, antimalaric, and others. Our study proposes amplified the chemical and biological knowledge of branches of *V. japurensis* Reichardt, *V. cauliflora* A. C. Sm. and *V. sandwithii* Ewan. Three sampling of *V. japurensis*, one of *V. cauliflora*, and one of *V. sandwithii* has performed. The materials has dried, milled and extracted with hexane, methanol and water. The hexanic extracts of three species has analysed using chromatographic technics (thin layer chromatography and nuclear magnetic resonance of ^1H). The branches of the first sampling of *V. japurensis* and *V. sandwithii* has submitted to many chromatographic fractions. The structural determination of substances has performed using spectroscopic methods (^1H NMR and ^{13}C , including bidimensionals technics: HSQC, HMBC, COSY and NOESY) and mass spectrometry, besides of comparison with literature. In the hexanic extracts of *V. japurensis* has isolated one triterpene (friedelin) and three anthraquinones (madagascin, physcion and vismiaquinone). In the hexanic extracts of *V. sandwithii* has isolated one triterpene (friedelanol). The hexanic and methanolic extracts of the first sample of branches of *V. japurensis* has tested for activity antioxidant, but no have activity. The toxicity activity against *Artemia salina* has performed and the *V. japurensis* extracts presented toxicity in concentration 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with mortality of 96% of larvae to hexanic extract of the first sampling and the three sampling presented mortality of 63% (hexanic) and 83% (methanolic). The antiangiogenic activity has tested with hexanic extracts of the first sampling and presented activity in 100, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations, with inhibition percentuale of new blood vessels of approximately 60, 80 and 90%, respectively. For third sampling of *V. japurensis*, has tested in same concentrations, presented the respectively inhibition values 60, 80 and 97%. The hexanic extracts from *V. japurensis* and *V. sandwithii* has tested for microdilution method and has considered active with minimal inhibitory concentration (MIC) of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Edwardsiella tarda* e *Pseudomonas aeruginosa*. This is the first study using *V. sandwithii* branches, being this the first report of triterpene (friedelanol), and the first time the biological activity is being described for this species. For *V. japurensis* species, this is the first report of chemical and biological study with your branches.

Keywords: secondary metabolites, triterpenes, anthraquinones, *Vismia*.

1. INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas desde o início da humanidade, ao longo do tempo este conhecimento empírico é repassado de geração em geração, sendo uma das mais importantes fontes de substâncias, e destacam-se, pois, possuem uma grande variedade de classes e estruturas químicas. Essas substâncias são provenientes do metabolismo primário e secundários que nos vegetais origina diversas moléculas. Essas substâncias resultam em alterações em indivíduos ancestrais da espécie, selecionados por adaptações ao ambiente onde vivem ao longo do tempo (Verma e Shukla 2015).

Sendo assim, os estudos químicos das plantas são de grande importância, pois o conhecimento das substâncias presentes nos extratos vegetais permite avaliar o seu potencial farmacológico. Além de contribuir de forma positiva para a obtenção de diversos tipos de fármacos (Giordani 2008; Maciel *et al.* 2002; Weber e Kim 2016).

No Brasil, pesquisas geralmente são voltadas para a descoberta de fármacos, e/ou fitoterápicos, gerando o avanço da pesquisa básica multidisciplinar, e estas contribuem para um maior desenvolvimento tecnológico nacional. Deve-se levar em conta que a diversidade de metabólitos produzidos nos biomas brasileiros é ainda muito pouco explorada no ponto de vista farmacológico (Barreiro e Bolzani 2009).

Diversas famílias vegetais que se demonstraram fontes importantes para estudos fitoquímicos e farmacológicos encontram-se na promissora ordem Malpighiales Bercht. e J. Presl. Dentre elas, a família Salicaceae Mirb, por exemplo, que contém o gênero *Salix* L, do qual foram obtidos salicilatos, como a salicina, precursor da mais importante substância para a história da humanidade e da indústria farmacêutica: o ácido acetilsalicílico ou aspirina (Patrono 2013). A família Salicaceae possui ainda outras espécies que apresentam atividades biológicas como anticancerígena (Felipe *et al.* 2014; Ferreira *et al.* 2016; Prieto *et al.* 2013); tripanossomicida (Bou *et al.* 2014; Calixto Júnior *et al.* 2015), efeitos no sistema nervoso central (Estork *et al.* 2016) e podem ser utilizadas na formulação de cosméticos clareadores da pele (Maack e Pegard 2016).

Outras famílias da mesma ordem e próximas filogeneticamente, são Euphorbiaceae Juss. Erythroxylaceae Kunth. Clusiaceae Lindl. e Hypericaceae Juss. Para a família Erythroxylaceae Kunth., destaca-se o gênero *Erythroxylum*, famoso pela obtenção de alcaloides como a cocaína e outras substâncias das quais derivam propriedades etnomédicas como potencial estimulante, euforizante e alívio de fadiga (Bieri *et al.* 2006).

A família Hypericaceae antes pertencente a Clusiaceae (Stevens 2001), destaca-se pelo seu potencial químico e biológico, como em estudos realizados com espécies do gênero *Hypericum*, que apresenta um potencial antidepressivo. Também com espécies do gênero *Vismia*, do qual são conhecidas atividades biológicas como: antibacteriana, antimalárica, antifúngica, antioxidante, entre outras. Apresentando como principais constituintes químicos da classe das quinonas, flavonoides e terpenos (Hussain *et al.* 2012; Vizcaya *et al.* 2012). Com base neste potencial químico e biológico no presente trabalho foi realizado o estudo químico e biológico. Os extratos dos ramos de duas espécies do gênero *Vismia*, sendo elas *V. japurensis* Reichardt e *V. sandwithii* Ewan foram analisados no laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Família Clusiaceae Lindl. e Hypericaceae Juss.

As famílias Clusiaceae Lindl. e Hypericaceae Juss. Compartilham além de aspectos taxonômicos, aspectos de potencial biológico e químicos similares. É compreensível, pois recentemente, toda a subfamília Hypericoideae Engl., dentro de Clusiaceae, foi elevada em categoria taxonômica e agora constitui grande parte da família Hypericaceae (Gustafsson *et al.* 2002; Ruhfel *et al.* 2016; Ruhfel *et al.* 2011).

Essa elevação da categoria taxonômica de Hypericaceae está baseada em estudos moleculares recentes que demonstram Hypericaceae (anteriormente pertencente à Clusiaceae subfamília Hypericoideae) não apresentar relações que sustentem essa ligação encontrando-se mais próxima a Podostemaceae, grupo irmão de Hypericaceae. Com base nesses estudos foi circunscrita como uma família independente (Gustafsson *et al.* 2002; APG III 2009).

Tratando-se de caracteres morfológicos Clusiaceae é reconhecida por apresentar látex colorido, folhas opostas, simples, inteiras, com glândulas pelúcidas, flores dioicas ou monoicas, prefloração imbricada ou convoluta, sépalas e pétalas livres, numerosos estames, livres ou conados, com presença de glândulas (raro), frutos do tipo cápsula e deiscente. Já Hypericaceae é reconhecida por geralmente apresentar hábito arbustivo ou ervas, ausência de látex colorido, presença de seiva resinosa translúcida ou amarelada, ovário súpero, estilete alongado e estigma diminuto (Judd *et al.* 2009). Plantas de ambas as famílias apresentam atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante e anti-inflamatória (Conforti *et al.* 2002; Dzoyem *et al.* 2015; Meirelles *et al.* 2017; Muriithi *et al.* 2016; Moulari *et al.* 2006; Rabanal *et al.* 2005; Radic e Strukelj 2012; Kuete *et al.* 2007).

Em Clusiaceae, destacam-se os biflavonoides com atividades analgésica, antinociceptiva, antiparasitária e imunomoduladora. A Hypericaceae, especificamente, destaca-se a atividade antidepressiva de espécies do gênero *Hypericum* L. e outras menos recorrentes entre as suas espécies como anticolinérgica e até como potencial fonte de tratamento da hipomelanose macular progressiva (Béjaoui *et al.* 2017; Staden *et al.* 2017; Ferreira *et al.* 2012; Rabanal *et al.* 2005; Stein *et al.* 2016).

2.2 Família Hypericaceae

Hypericaceae está incluída na ordem Malpighiales e possui 11 gêneros e 584 espécies no mundo (The Plant List 2013). A família possui distribuição cosmopolita, ou seja, com ocorrência em todos os continentes do mundo (Figura 1) (Martins *et al.* 2017).

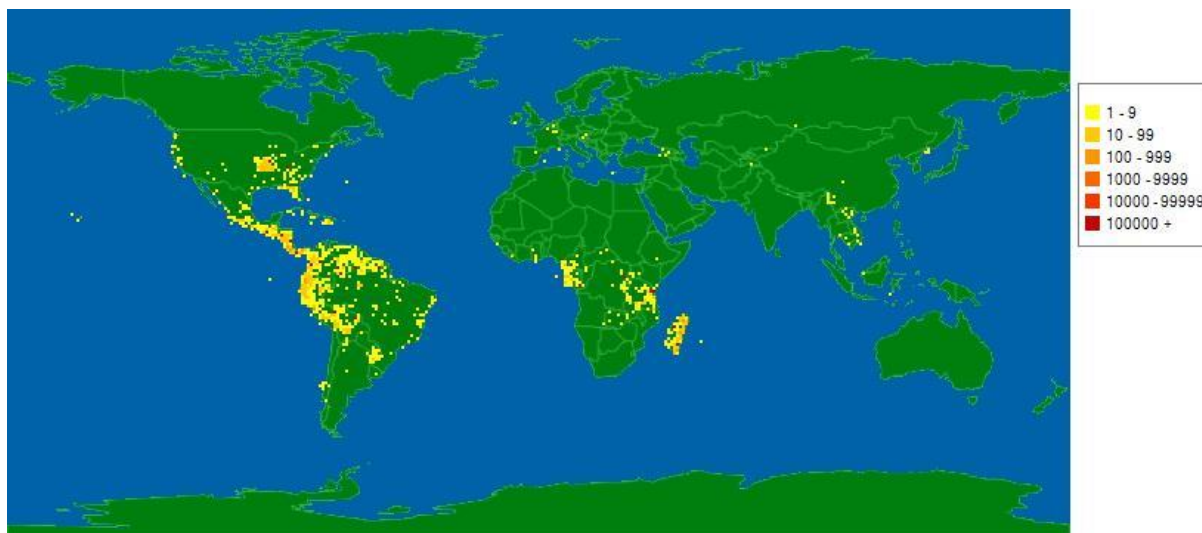


Figura 1. Distribuição mundial da família Hypericaceae. Fonte: [http://: www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)

Os 11 gêneros antes pertencentes à Clusiaceae (*Vismia* Vand., *Harungana* Lam., *Hypericum* L., *Lianthus* N. Robson, *Triadenum* Raf., *Thornea* Breedlove e E. M. McClint., *Santomasia* N. Robson, *Cratoxylum* Blume e *Eliea* Cambess) mais os gêneros *Ascyrum* L. e *Psorospermum* Spach que constituem a atual família Hypericaceae (Gustafsson *et al.* 2002). Esta apresenta três tribos majoritárias e monofiléticas: Hypericeae Choisy, Vismiae Choisy e Cratoxyleae Benth.

As principais características diagnósticas para as três tribos de Hypericaceae são as seguintes, os representantes da tribo Vismiae que apresentam indumento estrelado, broto terminal sem escamas, flores geralmente heterostílicas, pétalas com pelos na superfície adaxial, contorcidas para cóclea, sem escamas, fascículos, estaminódios cinco, estigma expandido e suave com frutas bagas (Stevens 2007).

Para a Tribo Hypericeae são plantas geralmente glabras, às vezes com pelos unicelulares ou uni seriados, broto terminal sem escamas, flores geralmente homostílicas, pétalas glabras, amarelas, as vezes brancas a vermelhas, contorcidas, sem escamas, fascículos 3, livres ou unidos, estaminódios quando presentes 3-5, estigma geralmente não ou pouco expandido, com papilas arredondadas, fruta do tipo cápsula septícida, raramente uma baga e sementes geralmente não desenroladas.

A tribo Cratoxyleae apresenta plantas lenhosas, glabras, broto terminal perola, flores homostílicas ou heterostílicas, pétalas glabras, raramente amarelas, geralmente com escamas, fascículos 3, estaminódios 3, carpelos 3, estigma ligeiramente expandido, não papilado, fruta do tipo cápsula loculicida mais ou menos e sementes aladas (Stevens 2007).

Com relação as atividades biológicas de Hypericaceae, destaca-se a atividade antidepressiva (Stein *et al.* 2016; Viana *et al.* 2005), além das já citadas anteriormente temos atividades antifúngica (Meirelles *et al.* 2017; Sytar *et al.* 2016) anti-inflamatório, (Dzoyem *et al.* 2015; Rabanal *et al.* 2005), antioxidante (Conforti *et al.* 2002), antibacteriana (Moulari *et al.* 2006; Tankeo *et al.* 2016), antiprotozoária (Lenta *et al.* 2007), anticolinérgico (inibe a acetilcolinesterase) (Béjaoui *et al.* 2017) e até como potencial fonte de tratamento da hipomelanose macular progressiva (Staden *et al.* 2017).

A família Hypericaceae caracteriza-se pela produção de metabólitos com grande potencial farmacológico. Abaixo são citados alguns exemplos de gêneros e espécies com atividades biológicas das respectivas tribos a que pertencem.

Para o gênero *Harungana* pertencente à tribo Vismiae, são relatadas as atividades: antibacteriana, toxicidade, antiprotozoária e antioxidante. Tanto para os extratos quanto para frações e substâncias (Kengni *et al.* 2016; Tankeo *et al.* 2016; Iwalewa *et al.* 2008; Kouam *et al.* 2005).

Para a espécie *Hypericum caprifoliatum*, pertencente à tribo Hypericeae, há relatos de que seus extratos apresentam atividade antidepressiva e antinociceptiva em roedores (Daudt *et al.* 2000; Viana *et al.* 2005).

Já para o gênero *Cratoxylum*, pertencente à tribo Cratoxyleae foram relatadas atividades antioxidante, antibacteriana e de citotoxicidade (Udomchotphruet *et al.* 2012; Mahabusarakam *et al.* 2008).

No Brasil, a família apresenta dois gêneros: *Hypericum* L. e *Vismia* Vand. O gênero *Vismia* com 30 espécies possui uma maior diversidade na região Amazônica, enquanto o gênero *Hypericum* possui 23 espécies com maior diversidade concentrada no Sul do país. Destas 53 espécies, 18 são endêmicas ocorrendo apenas na Amazônia, na Caatinga, Pampas, Cerrado, e na Mata Atlântica (Figura 2) (Bittrich *et al.* 2015; Martins *et al.* 2018).

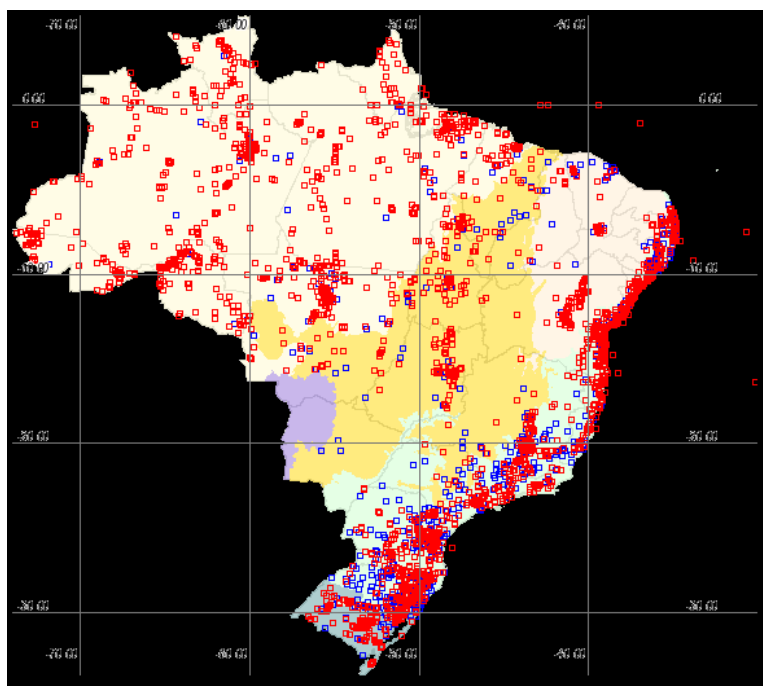


Figura 2. Distribuição de Hypericaceae no Brasil. Fonte: <http://www.splink.org.br/index?lang=pt>

2.3 Gênero *Vismia* Vand.

O gênero *Vismia* possui uma ampla distribuição geográfica, sendo que, das 61 espécies conhecidas, 80% podem ser encontradas na América do Sul e América Central e as demais se distribuem pela África e, mais raramente, pela Ásia. No Brasil, este gênero pode ser encontrado em toda a região Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo). Exceto na região Sul (Figura 3) (Ewan 1962; Mesquita *et al.* 2001; Tropicos.org 2017; Vogel-Ely *et al.* 2018; Martins *et al.* 2018).

Sua distribuição ocorre em diferentes tipos de vegetação como: áreas antrópicas, caatinga, campinarana, campo rupestre, carrasco, cerrado, floresta ciliar, floresta de igapó, floresta de terra firme, floresta de várzea, floresta estacional perenifólia, floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila, floresta ombrófila mista, palmeiral e vegetação sobre afloramentos rochosos, pois suas espécies são frequentemente pioneiras nos processos sucessionais de florestas secundárias, dominando extensas áreas, e conhecidas como “vismiais”

(Ewan 1962; Mesquita *et al.* 2001; Tropicos.org 2017; Vogel-Ely *et al.* 2018; Martins *et al.* 2018).

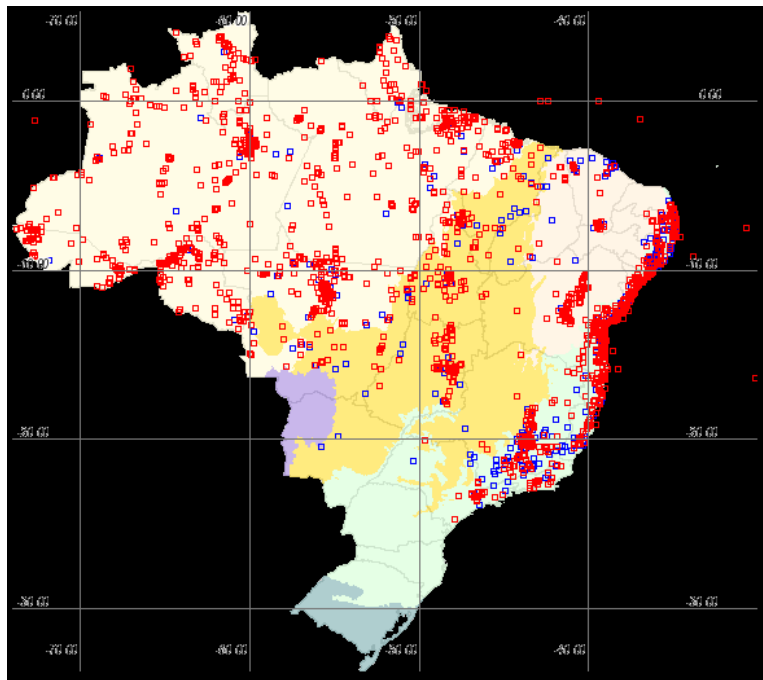


Figura 3. Distribuição do gênero *Vismia* no Brasil. Fonte: <http://www.splink.org.br/index?lang=pt>

As espécies de *Vismia* costumam ser árvores ou arbustos, com base do tronco reta e ramos glabros ou indumentados com exsudato presente. Suas folhas podem ser pecioladas ou subsésseis, alternas, espiraladas, opostas e/ou verticiladas, membranáceas, cartáceas ou coriáceas, normalmente indumentadas na face abaxial, pontuações nigrescentes evidentes ou não. Inflorescências paniculadas, terminais, axilares ou raramente caulifloras, brácteas e bractéolas presentes, normalmente caducas. As flores costumam ser homostilas ou heterostilas, pediceladas, raramente subsésseis; sépalas 5, prefloração quincuncial, livres ou unidas na base, cartáceas, subcoriáceas ou coriáceas, margens hialinas ou membranáceas, glabras ou indumentadas, estrias e/ou pontuações nigrescentes presentes ou ausentes. Os frutos são bagas, coriáceas, às vezes com estrias ou pontuações nigrescentes, sépalas adpressas, patentes, ascendentes ou reflexas no fruto maduro. Sementes reniformes, geralmente numerosas e marrons (Vogel-Ely *et al.* 2018).

Hussain e colaboradores (2012) numa revisão sobre a química e o potencial biológico do gênero *Vismia*, descreve como principais fitoconstituintes: os flavonoides, quinonas, lignanas e terpenoides.

Muitas destas substâncias já isoladas do gênero foram avaliadas biologicamente como a vismiona A, com potencial antineoplásico (Cassinelli *et al.* 1986); benzofenonas e benzocumarinas, contra carcinoma epidermóide oral (Seo *et al.* 2000); substâncias fenólicas com potencial antioxidante (Álvarez *et al.* 2008); as xantonas laurentixantonas A e B com atividade antimicrobiana contra *Streptococcus faecalis* e *Candida glabrata*; antraquinonas vismiaquinona e vismiaquinona C, a xantona 6-deoxiisojacareubina, o triterpeno friedelina e o flavonoide kaempferol com atividades contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Nguemeving *et al.* 2006); e a vismiona H contra o *Plasmodium falciparum* (François *et al.* 1999).

2.3.1 *Vismia cauliflora* A. C. Sm.

Descrição detalhada da espécie *V. cauliflora* encontrada na Reserva Florestal Adolpho Ducke segundo Martins e colaboradores (2018):

“Árvores, 4-13 m alt.; ramos cilíndricos, velutinos, tricomas marrom-escuros, estrelados; exsudato alaranjados. Laminas de 35-75 x 11-17 cm, subcoriáceas, discolors, oblanceoladas, longo-elípticas a fusiformes, ápice acuminado, base atenuada, arredondada a subcordada, face adaxial glabrescente, tricomas estrelados e ferrugíneos nas nervuras, opaca, face abaxial pilosa, com tricomas estrelados e ferrugíneos pontuações nigrescentes evidentes, nervuras secundárias de 12-24 pares, fortemente proeminentes na face abaxial; pecíolos 6-8 mm de comprimento Inflorescências caulifloras, subsésseis, congesta; brácteas 2-6 mm de comprimento, lineares. Flores provavelmente homostilas; pedicelos 1,5-2 mm de comprimento; sépalas 5-6 x 2-2,5 mm, cartáceas, castanhas, oblongo-obovais a obolongo-oblanceoladas, ápice agudo, margens membranáceas em 3 sépalas, com pontuações nigrescentes, face adaxial com estrias nigrescentes *in sicco* (cor não observada *in vivo*), face abaxial com tricomas estrelados, ferrugíneos, persistentes; pétalas 7-9x 2-3,2mm, amareladas a verde-claras, oblongas, ápice arredondado, base atenuada, face adaxial inteiramente lanosa, face abaxial com estrias e pontuações nigrescentes *in sicco*, na metade, fascículos de 7-8 estames, 3-3,5 mm comprimento, lanoso na porção mediana, persistentes, ápice da antera com glândulas nigrescentes; nectários 1-3 mm comprimento, retangulares, persistente; ovários 2-3 mm de comprimento, globoso, com pontuações nigrescentes, estiletos 2-7 mm comprimento, com pontuações nigrescentes, glabros, geralmente persistente. Bagas 0,7-1,2 cm de comprimento, acinzentadas, globosas; sépalas ± patentes a ascendentes no fruto maduro”.

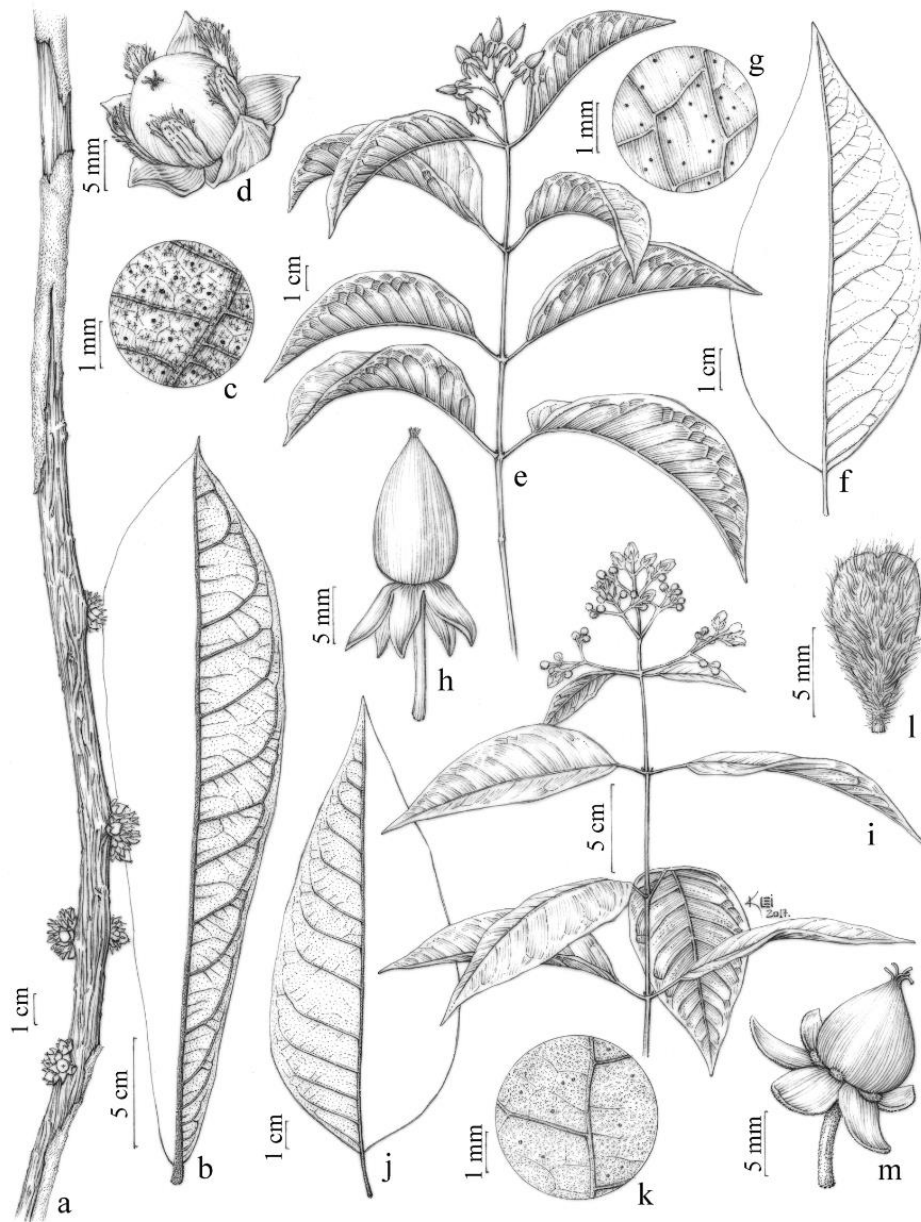


Figura 4. Ilustração botânica da espécie *V. cauliflora*

A. Ramo com inflorescências caulifloras. B. Face abaxial da folha. C. Detalhe das pontoações nigrescentes evidentes na face abaxial foliar. D. Fruto. E-H. *V. cayennensis*. e. Ramo com frutos. F. Face abaxial da folha. G. Detalhe das pontoações nigrescente evidentes na face abaxial foliar. H. Fruto. I-m. *V. guianensis*. I. Ramos com botões florais. J. Face abaxial da folha. K. Detalhe das pontoações nigrescentes evidentes na face abaxial foliar. L. Pétala com face adaxial inteiramente lanosa. M. Fruto (Martins *et al*, 2018).

Vismia cauliflora foi encontrada até o momento apenas no Estado do Amazonas, mais especificamente na Reserva Florestal Adolpho Ducke. Nas bordas de estrada geralmente em floresta secundária ou em sub-bosque de floresta de vertente, sendo facilmente identificada pelas suas características como as folhas compridas, medindo 75 cm de comprimento, seu ápice

acuminado, pelas suas inflorescências caulifloras, subsésseis que florescem no mês de junho a setembro e frutificam de novembro a dezembro (Figura 4) (Martins *et al.* 2018).

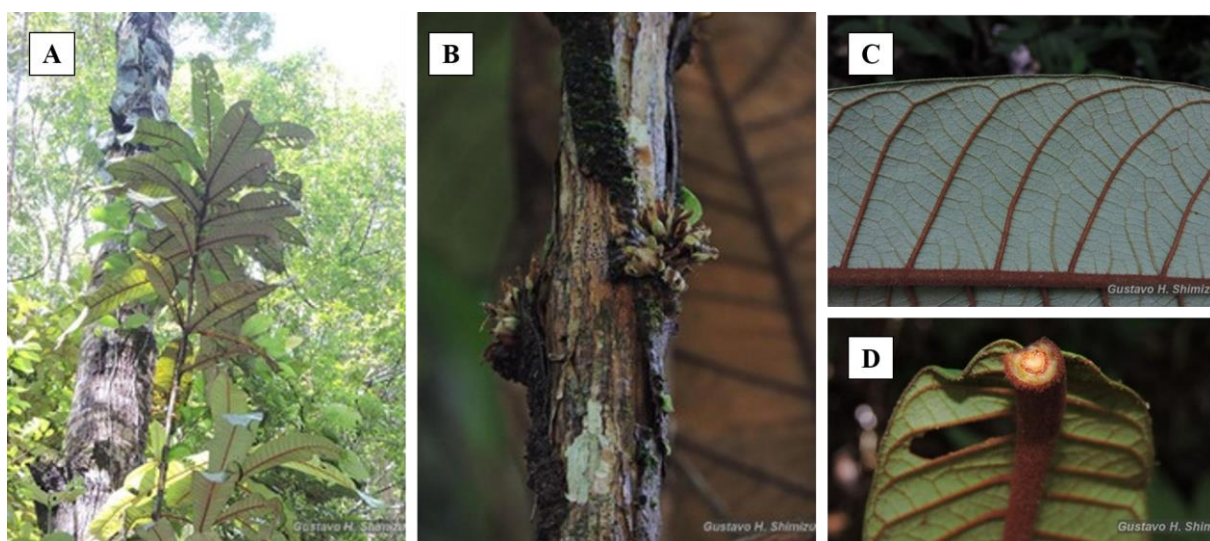


Figura 5. *V. cauliflora*. A. Ramos com folhas. B. Ramo com inflorescências caulifloras. C. Detalhe da face abaxial das folhas. D. Detalhe do pecíolo em corte transversal. Fotos: Shimizu 2017. Fonte: Vogel-Ely *et al.* 2019

Estudos realizados com *V. cauliflora* demonstraram o seu potencial antioxidante (Chisté *et al.* 2014). Também foram relatados para os extratos da casca do caule e das flores apresentou um potencial terapêutico contra doenças da pele (Ribeiro *et al.* 2014) (Quadro1) e a quantificação de substâncias fenólicas e carotenoide (Campos *et al.* 2014).

Substâncias	Número	Referências
Ácido gálico	(1)	Ribeiro <i>et al.</i> 2014
<i>di-cis</i> -luteína	(2)	Ribeiro <i>et al.</i> 2014
(-) -epicatequina	(3)	Ribeiro <i>et al.</i> 2014
Ácido dihidroxibenzoico	(4)	Ribeiro <i>et al.</i> 2014

Quadro 1: Substâncias identificadas na espécie *V. cauliflora*

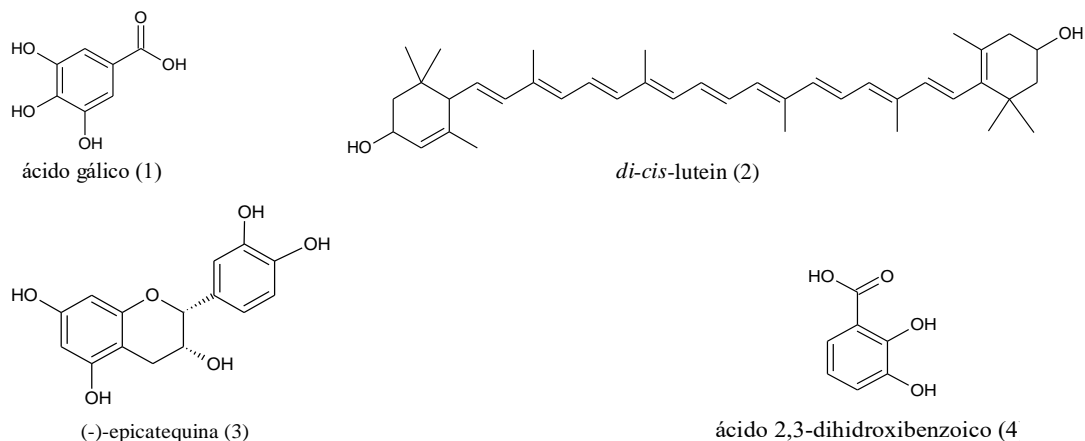


Figura 6. Substâncias identificadas em *V. cauliflora* (Ribeiro *et al.* 2014)

2.3.2 *Vismia japurensis* Reicht.

Vismia japurensis Reicht. é conhecida popularmente como “lacre”, “picharina”, “pau-de-lacre” e “purga de vento”. Geralmente são árvores ou arbustos medindo 3 até 10 metros de altura; ramos jovens tomentosos; folha obovada lanceolada, de 20 cm de comprimento, coriácea, face abaxial puberulenta; inflorescência em panícula, terminal, flores branco-amarelas, sépalas agudas, visivelmente coriáceas, de modo que o cálice de frutificação é quase lenhoso; pétalas longas e obovadas; fruto baga e subgloboso verde imaturo (Figura 7) (Amaral *et al.* 2014; Distasi e Hiruma-Lima 2002).

Descrição detalhada da espécie *V. japurensis* encontrada na Reserva Florestal Adolpho Ducke segundo Martins e colaboradores (2018):

“Árvores ou arbustos, 4-10 m de altura. Ramos cilíndricos, pubescentes, tricomas ferrugíneos, estrelados; exsudato alaranjado. Lâminas 17-20 × 4,5-10 cm, subcoriáceas, discoloras, oval-lanceoladas ou elíptico-lanceoladas, ápice agudo ou acuminado, base arredondada, face adaxial glabra, às vezes nítida, face abaxial pubescente, com tricomas estrelados ferrugíneos, pontoações nigrescentes não evidentes, encobertas pelo indumento; nervuras secundárias 8-15 pares, proeminentes na face abaxial; pecíolos 15-20 mm comprimento Inflorescências terminais, pedunculadas, laxas; brácteas não observadas. Flores homótipas; pedicelos 4-5 mm comprimento; sépalas 6-8 × 4-5 mm, coriáceas, marrom-esverdeadas, oval-deltoides, ápice agudo, margens membranáceas, com estrias nigrescentes, face adaxial com estrias avermelhadas *in vivo* e nigrescentes *in sicco*, evidentes, face abaxial com tricomas estrelados, ferrugíneos, persistentes; pétalas 7-8 × 4-6 mm, verde-amareladas, obovais, ápice truncado, base atenuada, face adaxial lanosa apenas em uma das metades longitudinais, com estrias nigrescentes evidentes, face abaxial com estrias e pontoações avermelhadas *in vivo* e nigrescentes *in sicco*, na metade superior; fascículos de 20-30 estames, 6-8 mm comprimento, lanosos, persistentes, ápice da antera com glândula nigrescente; nectários ca. 1,5 mm comprimento, oblongos, persistentes; ovário ca. 2 mm comprimento, oval-oblongo, com pontoações nigrescentes, estiletos ca. 4 mm comprimento, com pontoações nigrescente nigrescentes, glabrescentes, persistentes. Bagas 1-1,3 cm comprimento, verdes, globosas; sépalas ascendentes no fruto maduro.”

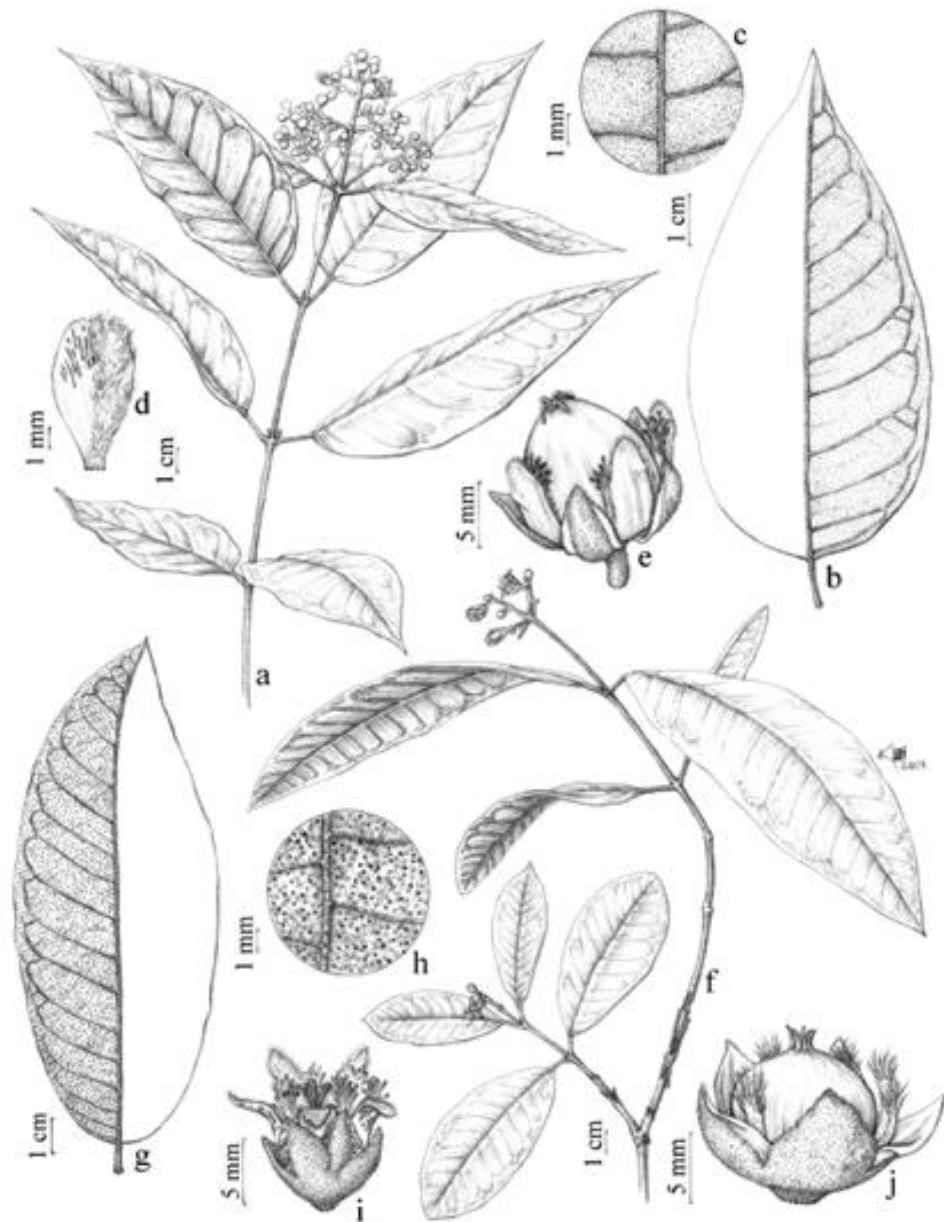


Figura 7. Ilustração de *V. japurensis*

A-E. *V. Japurensis*. A. Ramos, com inflorescência. B. Face abaxial da folha. C. Detalhe da face abaxial foliar. D. Pétala com face adaxial lanosa apenas em uma das metades longitudinais. E. Fruto. F-J. *V. sandwithii*. F. Ramo com inflorescência. G. Face abaxial da folha. H. Detalhe das pontuações nigrescentes fortemente evidentes na face abaxial foliar. I. Flor. J. Fruto (Martins *et al.* 2018).

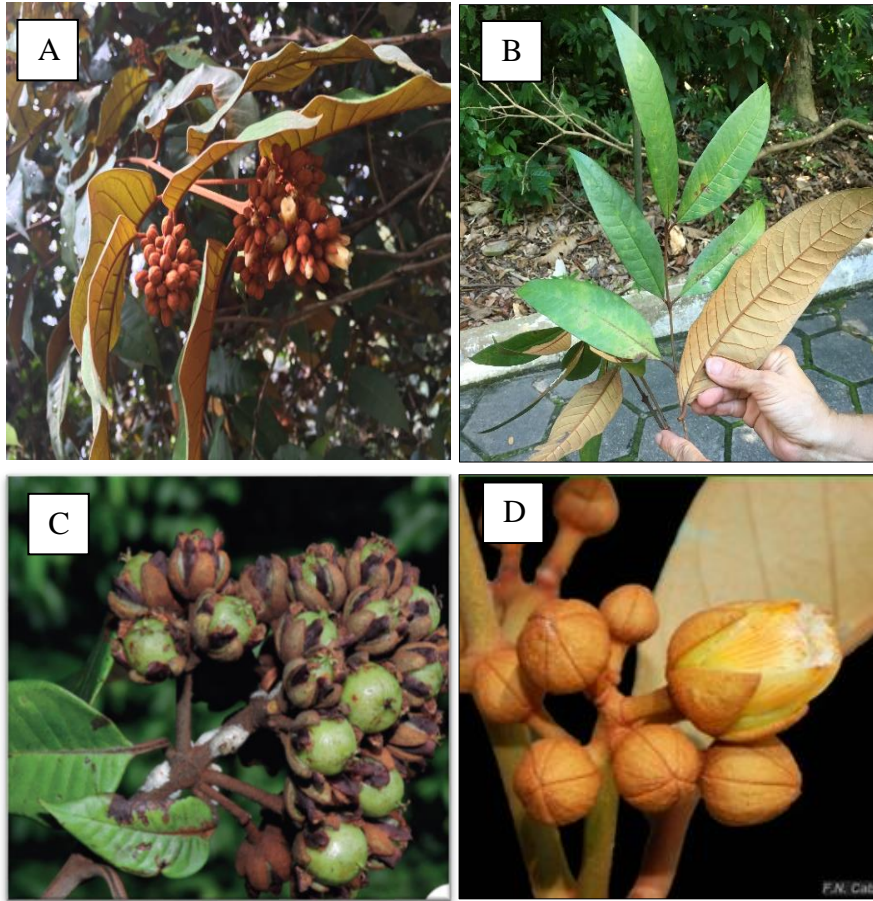


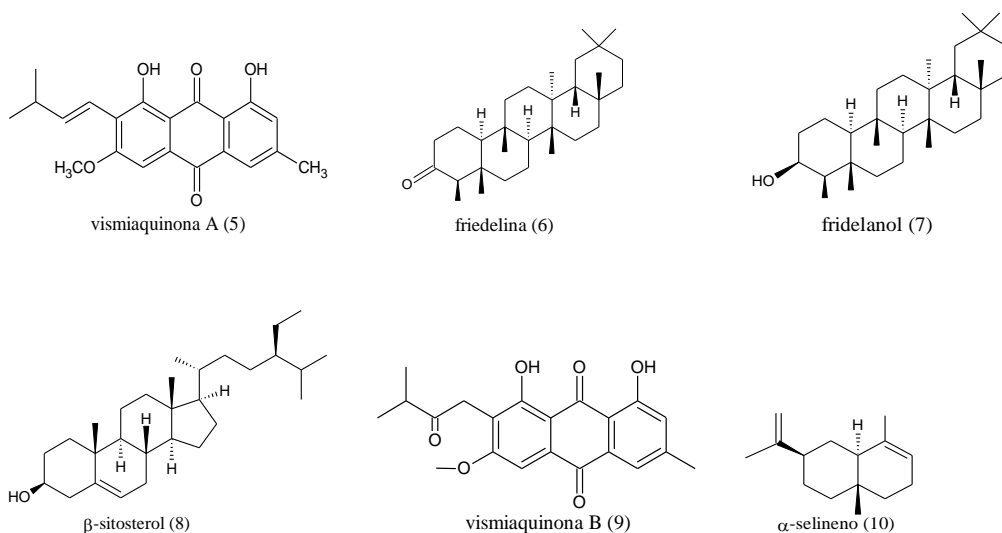
Figura 8. *V. japurensis*. A. Ramos com folhas e inflorescências. B. Ramos mostrando ambas as faces abaxial e adaxial das folhas C. Ramos com frutos D. Ramos com inflorescência. Fonte: Osorio, M. I. C. e Pedroza, L. S. 2018; Cabral 2016; Shimizu 2018

Os indivíduos de *V. japurensis* são árvores ou arbustos de 4 a 10 m de altura; têm folhas opostas, subcoriácea, discolores, base arredondada e ápice agudo, com látex alaranjado, inflorescência terminal e flores marrom-esverdeadas, possui fruto do tipo baga de 1 a 1,3 cm de comprimento, verdes, globosos e coriáceo. Suas espécies também são pioneiras, nativa da América Sul dominante em áreas onde houve corte de floresta, ou seguido pela queima e também podendo ser encontrada nas bordas de vegetação secundária. Propaga-se por sementes, em toda a Amazônia brasileira, e também na Colômbia, Equador, Guiana, Suriname, Venezuela, e nos pampas (Amaral *et al.* 2014; Tropicos.org 2017). No Brasil está presente nas regiões Centro-Oeste, e Norte (Vogel-Ely *et al.* 2018). Sendo encontrada próximo de curso d'água e em borda de vegetação secundária. Pode ser caracterizada pelas sépalas grandes (6-8 × 4-5 mm), fortemente coriáceas até mesmo no fruto, pela face adaxial das pétalas lanosa apenas em uma das metades longitudinais. Registrada com botões, flores em (setembro e dezembro) e frutos em dezembro (Martins *et al.* 2018).

Estudos químicos prévios descrevem o isolamento de 11 substâncias isoladas dos frutos e da madeira (Miraglia *et al.* 1981; Pinheiro *et al.* 1984). Existem relatos sobre o potencial antioxidantes dos seus extratos metanólicos, estudo este realizado pelo nosso grupo de pesquisa. Dados estes não publicados, e sem relatos de estudos biológicos realizados com esta espécie.

Parte Vegetal	Substâncias isoladas	Número	Referências
Madeira	Vismiaquinona A	(5)	Miraglia <i>et al.</i> 1981
Baga			Pinheiro <i>et al.</i> 1984
Madeira	Friedelina	(6)	Miraglia <i>et al.</i> 1981
	Friedelanol	(7)	
	β -sitosterol	(8)	
	Vismiaquinona B	(9)	
Baga	α -selineno	(10)	Pinheiro <i>et al.</i> 1984
	β -selineno	(11)	
	Vismiona A	(12)	
	Acetilvismiona B	(13)	
	γ -hidroxiantrona B	(14)	
	<i>cis</i> - γ -hidroxiferruginina A	(15)	

Quadro 2: Substâncias isoladas da espécie *V. japurensis*



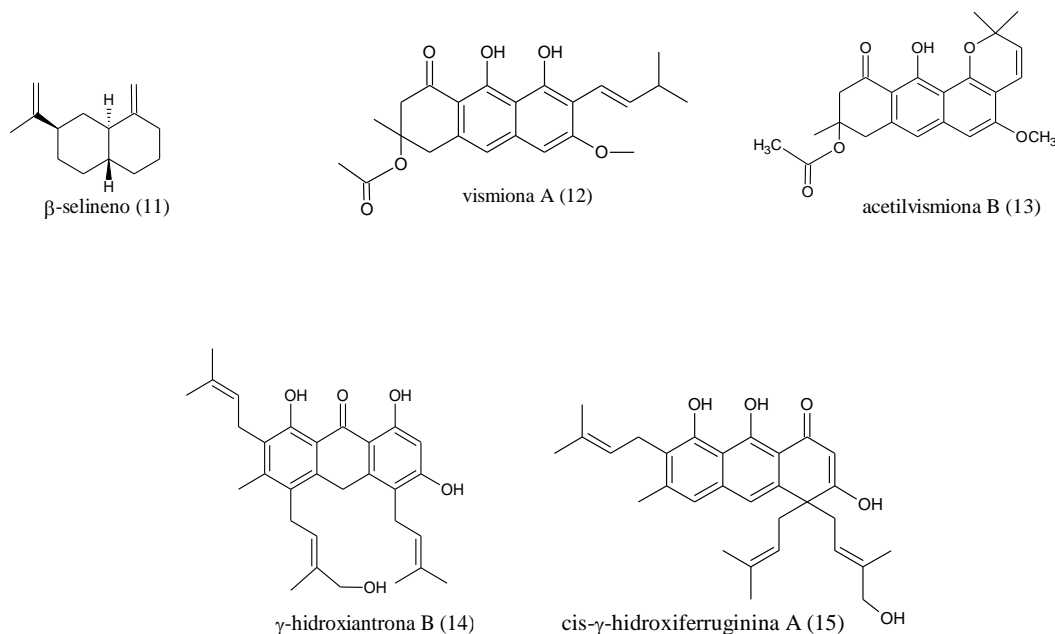


Figura 9. Substâncias isoladas da espécie *V. japurensis*

2.3.3 *Vismia sandwithii* Ewan.

Descrição detalhada da espécie *V. sandwithii* encontrada na Reserva Florestal Adolpho Ducke segundo Martins e colaboradores (2018):

“Árvores, 5-16 m de altura; ramos cilíndricos, tomentosos, tricomas ferrugíneos, estrelados e exsudato alaranjado a vermelho-alaranjado. Lâminas 13-30 (-40) \times 7,5-12 cm, cartáceas, discolores, elípticas a oblongas, ápice acuminado, base arredondada a subcordada, face adaxial glabrescente, com tricomas estrelados, ferrugíneos, opaca, face abaxial tomentosa, com tricomas estrelados pedunculados, ferrugíneos, pontoações nigrescentes fortemente evidentes; nervuras secundárias 9-14 pares, proeminentes na face abaxial e pecíolos 12-15 mm de comprimento. Inflorescências terminais, pedunculadas, laxas e brácteas 1-2 mm comprimento, trigonais a oblongas. Flores heterostilas; pedicelos 3-5 mm comprimento; sépalas 6-9 \times 3-7 mm, subcoriáceas, esverdeadas, ovais a oval-oblongas, ápice subagudo, margens membranáceas em 3 sépalas, com estrias e pontoações nigrescentes, face adaxial com estrias e pontoações nigrescentes *in vivo* e *in sicco*, evidentes, face abaxial com tricomas estrelados ferrugíneos, persistentes; pétalas 8 \times 1,5-2,5 mm, verde-claras a brancas, oblongas, ápice cuneado, base atenuada, face adaxial inteiramente lanosa, com estrias e pontoações nigrescentes evidentes; face abaxial com estrias e pontoações nigrescentes *in vivo* e *in sicco*, menos na base; fascículos de ca. 20 estames, 7-9 mm comprimento, hirsutos na porção mediana, persistentes, ápice da antera com glândula nigrescente; nectários ca. 1,5 mm comprimento, linear-oblongos, persistentes; ovário ca. 2 mm comprimento, oval-oblongo, com estrias nigrescentes, estiletos 2-3 mm comprimento, com estrias nigrescentes, glabrescentes, persistentes. Bagas ca. 0,8 cm comprimento, verde-acinzentadas a verde-arroxeadas, globosas; sépalas ascendentes no fruto maduro”.

Esta espécie ocorre na região amazônica e nos países Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela e, no Brasil, é encontrada na região Norte.

Especialmente em capoeiras e florestas de terra firme (Vogel-Ely *et al.* 2018). Pode ser confundida com *V. macrophylla*. Sua mais evidente característica, entretanto, são as pontuações nigrescentes na face abaxial das folhas, diferindo da *V. macrophylla* Kunth, principalmente pelo número de nervuras secundárias que são 10 a 22 ou da *V. sandwithii* que são de 9 a 14 pares e pela ausência de papilas diminutas brancas na face abaxial das folhas (presentes em *V. macrophylla*), pelas estrias no ovário e nos estiletos; podendo ser encontrada com botões, flores no final e início do ano. Com frutos nos primeiros meses (Martins *et al.* 2018).



Figura 10. *V. sandwithii* A. Ramos com inflorescência. B. Frutescência. C. Detalhe da coloração da seiva. Fotos: Martins 2017. Fonte: Vogel-Ely *et al.* 2019.

Não foram encontrados relatos na literatura consultada trabalhos acerca das suas atividades biológicas, e de constituintes químicos, razão pela qual foi inserida neste trabalho.

2.4 Produtos naturais bioativos

Os produtos naturais derivados de plantas, podem apresentar grande potencial bioativo. Possuindo substâncias com propriedades terapêuticas, que agem em alvos moleculares de inúmeros organismos, proporcionando assim, variadas atividades biológicas, como atividade cardiovascular, antibacteriana, antifúngica e entre outras (Niero *et al.*; 2003; Krief *et al.* 2005; Leake e Read 2017). Isto se deve à função própria dos metabólitos nos vegetais: que oferecem uma natural proteção contra herbívora, bem como contra fitopatologias causadas por vírus, bactérias, fungos e nematódeos (Engel 2007; Hause e Schaarschmidt 2009; Krief *et al.* 2005; Leake e Read 2017).

Uma procura crescente entre os produtos naturais, por exemplo, tem sido o combate à resistência de muitos desses micro-organismos aos antibióticos. Além disso, podem ser

utilizados na indústria farmacêutica, alimentar, agrônômica e cosmética, bem como potenciais fitoterápicos no tratamento de variadas doenças (McClements e Xiao 2017; Penié e Alfonso 2011).

2.4.1 Metabólitos Primários e Secundários

No metabolismo vegetal, são produzidos metabólitos primários e secundários. Estes são responsáveis pela a vida dos organismos que são asseguradas e controladas pelas transformações químicas realizadas. A partir deste e suas rotas biossintéticas elaboradas, originam os metabólitos primários e secundários secundários (Braz Filho 2010).

Os metabólitos primários são substâncias encontradas em todos os seres vivos, desempenhando funções essenciais como: crescimento, desenvolvimento e reprodução (Pereira e Cardoso 2012; Vaishnav e Demain 2010). Respondem pela sobrevivência do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração, assimilação de nutrientes, possuindo ainda função estrutural e de armazenamento de energia (Silva *et al.* 2010).

Já os metabólitos secundários estão relacionados entre o meio ambiente e os seres vivos como: atrativos (cheiro, cor e sabor), proteção contra a herbivoria, patógenos e entre outros (Pereira e Cardoso 2012; Vaishnav e Demain 2010). Muitos metabólitos secundários exibem funções anti-patogênicas, compreendendo uma riqueza de compostos interessantes para o ser humano, pois tem grande aplicabilidade por seus efeitos terapêuticos. E são específicos de uma planta e/ou do tecido, por isso a necessidade de estudar diferentes espécie e suas diferentes partes (Vizzotto *et al.* 2010). Estes apresentam uma vasta quantidade de atividades biológicas como: fungicida, inseticida, citotóxica, antiviral, tranquilizante e analgésica (Rozwalka *et al.* 2008).

Como exemplo de metabólitos secundários com propriedades farmacológicas podemos citar o alcaloide morfina, isolada em 1804 pelo farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam. Este alcaloide de importância milenar apresenta ação analgésica e foi originalmente isolado de *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae Juss.) (Barreiro 2008).

2.5 Atividades Química e Biológicas

Um extrato vegetal apresenta uma grande quantidade de substâncias e é possível identificar a propriedade de um extrato vegetal ou de uma substância pura a partir de teste de

verificação das atividades química e biológicas. Até a produção de um medicamento, por exemplo, foram realizadas várias etapas: *in vitro*, pré-clínica e clínica, em animais e após, em seres humanos. Assim, identificando-se as bioatividades, pode-se originar antibióticos, analgésicos, antidepressivos, antitumorais e antiparasitários (Almeida 2001; Gonçalves *et al.* 2016; López-Rubalcava e Estrada-Camarena 2016; Nascimento *et al.* 2000; Prates 2002; Sandjo *et al.* 2016). Muitos são os ensaios realizados para uma gama de atividades, sendo assim neste trabalho será dado destaque as atividades antioxidante, antibacteriana, angiogênica e de toxicidade frente à *Artemia salina*.

2.5.1 Atividade de toxicidade frente *Artemia*

A *Artemia salina* é uma espécie de crustáceo pertencente à ordem Anostraca da família Artemidae. Esses crustáceos são amplamente utilizados em testes e estudos de taxonomia e morfologia, e experimentos nas Vinatea áreas de ecologia, toxicologia, genética, biologia molecular e bioquímica (Michael *et al.* 1956; Vinatea 1982).

As substâncias consideradas bioativas quase sempre são tóxicas, em elevadas doses. Para isso, sua concentração pode ser monitorada através de bioensaios com este microcrustáceo muito utilizado em laboratórios de pesquisa em Produtos Naturais com o objetivo de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas. Geralmente a *A. salina* é utilizada em testes de toxicidade por ser um ensaio biológico simples rápido e barato, de fácil manuseio e cultivo, por isso, são utilizados como bioindicador em avaliações toxicológicas pré-clínicas (Carvalho *et al.* 2009; Teixeira 2008).

2.5.2 Atividade antioxidante

Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação ou a inibem, através de um ou mais mecanismos, com capacidade de neutralizar a ação dos radicais livres. Eles podem ser sintéticos ou não naturais, podendo ser ingeridos através de alimentos ricos em substâncias antioxidantes e sendo está a forma mais segura (Broinizi *et al.* 2007; Degáspari *et al.* 2004; Soares 2002). Dentre a variedade de substâncias que possuem esse potencial, podemos destacar algumas de origem natural, como o ácido ascórbico, a vitamina E e os carotenoides (Shami e Moreira 2004).

A vitamina C, também denominada de ácido ascórbico, é um dos mais potentes antioxidantes, capaz de estabilizar, e em alguns casos, erradicar os radicais livres, e impedindo a deterioração das células (Bianchi e Antunes 1999). Os antioxidantes estão presentes em diversos alimentos, como verduras, frutas e legumes, ou isolados a partir da planta na forma de clorofila, flavonoides, carotenoides; eles atuam protegendo a planta contra injúrias e em seres humanos atua na inibição dos danos causados pelos radicais livres (Bianchi e Antunes 1999).

Estes radicais livres, que possuem o número de elétrons ímpares, geram a oxidação nas células saudáveis, pois buscam um elétron ligante para se estabilizarem, porém, durante esse processo podem danificar as células e muitas vezes geram outros radicais livres. O aumento dos radicais livres está relacionado com o processo de envelhecimento das células do corpo humano, assim podendo causar o aparecimento de doenças degenerativas, tumores, entre outras doenças. Também pode causar danos teciduais, afetando as proteínas, lipídios e carboidratos (Melo *et al.* 2008; Vasconcelos *et al.* 2014).

Muitos testes são utilizados para avaliar o potencial antioxidante presente em plantas, visando a prevenção de doenças crônicas e degenerativas. Dentre estes, destaca-se o método de sequestro de radicais livres utilizando-se o 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH•), pelo qual há a descoloração de uma solução composta por radicais estáveis de cor violeta, pois, quando na adição, podem doar um átomo de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge 2007; Huang *et al.* 2005; Brand-William *et al.* 1995).

2.5.3 Atividade antibacteriana

Algumas bactérias causam graves problemas de saúde pública, principalmente devido ao crescente número de micro-organismos resistentes. Existindo uma dificuldade de se encontrar no mercado tratamentos eficientes, fazendo-se necessária a busca por novos agentes antimicrobianos ou inibidores de resistência (Strobel *et al.* 2004).

Os agentes antimicrobianos podem agir através de vários mecanismos: por inibição da síntese de ácidos nucleicos, por lesão da parede celular e alterações da permeabilidade celular, por alterações das moléculas de proteínas, entre outras (Kyaw 2005; Hancock 2005; Walsh 2000). Podem ser classificadas como bactericidas, quando matam o microrganismo; ou bacteriostáticas, quando impedem seu crescimento (Lima 2001; Tortora *et al.* 2005).

Muitas plantas são uma fonte de novas moléculas com propriedades antimicrobianas (Duarte 2006; Packer e Luz 2007), inclusive diversas substâncias extraídas de espécies

brasileiras, como os alcaloides isoboldina e anonaina de *Annona salzmannii* A. DC; o ácido hidroxibenzoico de *Piper aduncum* L., e flavonoides de várias espécies (Lima 2001; Paulo *et al.* 1992; Orjala *et al.* 1993; Park *et al.* 2006).

2.5.4 Atividade antiangiogênica

Câncer é conhecido como um conjunto de vários tipos de doenças, que tem em comum o crescimento desordenado das células que podem invadir os tecidos e órgãos adjacentes, dando início a um processo identificado como metástase (Instituto Nacional do Câncer 2017). Alterações ocorridas na rota da cascata metabólica podendo causar o alastramento nos processos de proliferação e diferenciação celular. As lesões expansivas, conhecidas como tumores, quando ocorrem em órgãos saudáveis, e na medida que se desenvolvem, podendo lesionar ou invadir os tecidos adjacentes normais (Silva 2007).

A angiogênese é um processo normal de surgimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes causando a proliferação das células musculares lisas e células endoteliais (Oliveira *et al.* 2010). É um processo de extrema importância durante o período de desenvolvimento, também podendo ocorrer na idade adulta, durante a regeneração de feridas e na restauração da passagem do fluxo sanguíneo para os tecidos danificados (Kanjoormana e Kuttan 2010).

A angiogênese é um processo muito vulnerável e regulado por fatores de desenvolvimento, interação de crescimento e inibidores, podendo causar vários tipos de doenças, como o câncer. A atividade proangiogênica favorece a oxigenação e fornecimento de nutrientes promovendo o crescimento do tecido tumoral, podendo lesionar os tecidos e órgãos adjacentes, promovendo o processo metastático. Oposto das células tumorais, as células endoteliais são geneticamente saudáveis e são, portanto, objetos de interesses terapêuticos, pois não se tornam resistentes à uma terapia antiangiogênica (Kanjoormana e Kuttan 2010). A inibição da angiogênese vem sendo percebida como alvo de valor na área da pesquisa como uma das estratégias de avanços no tratamento do câncer (Pratheeshkumar *et al.* 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Ampliar o conhecimento sobre os constituintes químicos dos ramos de *Vismia japurensis* Reichardt, *V. cauliflora* A.C.Sm. e *V. sandwithii* Ewan (Hypericaceae), bem como sobre as atividades biológicas de *V. japurensis* (Hypericaceae).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os extratos hexânicos das espécies *V. japurensis*, *V. cauliflora* e *V. sandwithii* por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H);
- Realizar o fracionamento dos extratos hexânicos dos ramos de *V. japurensis* e *V. sandwithii*;
- Identificar e/ou elucidar as estruturas das substâncias isoladas de *V. japurensis* e *V. sandwithii*;
- Avaliar as atividades de toxicidade frente a *Artemia salina*, antioxidante, antimicrobiana e angiogênica dos extratos dos ramos de *V. japurensis*.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Especificações dos equipamentos e materiais utilizados

- Solventes: foram utilizados os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol, metanol e acetona grau comercial, de diferentes marcas, sendo todos estes solventes destilados no laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).
- Preparação dos extratos: utilizou-se banho de ultra-sônica (UNIQUE frequência 40KHz E®) com na preparação dos extratos, e para a evaporação do solvente, utilizou evaporador rotativo à vácuo (FISATOM®).
- Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC): utilizaram-se cromatoplasmas de sílica gel 60, com indicador de fluorescência no comprimento de onda de 254 nm e 365 nm com 0,20 mm de espessura, em folha de alumínio (MACHEREY-NAGEL-MN®).
- Cromatografia de Adsorção em Coluna Aberta (CCA): Sílica Gel 60, 230-400 Mesh (MERK®). As colunas cromatográficas variaram de acordo com a quantidade de amostra, mas as proporções amostra manteve-se em torno de 1:100.
- Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)
- Reveladores: foram utilizados os seguintes reveladores, reveladores físicos luz UV (254 e 365 nm), os reveladores químicos: foram iodo resublinado, sulfato cérico, cloreto férrico, cloreto de alumínio, NP/PEG, anisaldeído sulfúrico, e Reagente de Dragendorff, onde as soluções destes foram borrifadas sobre as cromatoplasmas.
- Método Espectroscópico: Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram obtidos no equipamento Bruker DRX 300 MHz, sendo os espectros obtidos utilizando solvente deuterado com TMS, e as análises foram realizadas na Central Analítica do INPA.
- Preparação dos reveladores utilizados na análise de cromatografia em camada delgada:
 - Solução de sulfato cérico: utilizou-se 4,2 g de sulfato cérico IV que foram solubilizados em 50 mL de água destilada. Após a solubilização foi acrescentado 2,8 mL de H_2SO_4 concentrado e submetido aquecimento. Após resfriamento, foi completado com 100 mL de água destilada. Este é um revelador universal, nas cores entre lilás, laranja, vermelho e rosa indicam presença de terpenos.

- Solução de anisaldeído sulfúrico: foram misturados 0,5 mL de anisaldeído com 10 mL de ácido acético glacial e adicionaram-se 85 mL MeOH e mais 5 mL de H₂SO₄ concentrado. Este é um revelador universal, nas cores lilás e rosa e indicam presença de terpenos.
- Solução de cloreto de alumínio: foi solubilizado 1 g de cloreto de alumínio em 100 mL de álcool etílico. Para observação após a placa ser borrifada, observa-se no UV 365 nm a intensificação da fluorescência, o que indica a possível presença de flavonoides.
- Iodo: para a revelação com iodo foi utilizado iodo ressublimado. O aparecimento de manchas amarelas indica a presença de ligações duplas, após a evaporação do iodo as placas podem ser reveladas com outro revelador.
- Solução de Reagente de Dragendorff: preparam-se duas soluções (I e II). A solução I consistiu em dissolver, sob aquecimento, 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10 mL de ácido acético glacial, após foram adicionados 40 mL de água destilada. A solução II foi preparada dissolvendo-se 8 g de iodeto de potássio em 30 mL de água destilada. Estas duas soluções (I e II) foram reunidas e denominadas de solução estoque. A solução para borrifar direto nas placas foi preparada misturando-se 5 mL da solução I e 5 mL da solução II e acrescentando-se 20 mL de ácido acético e avolumando com água destilada até 100 mL. A solução de Dragendorff quando borrifada na placa revela ou indica a presença de alcaloides pela coloração laranja.
- KOH: foram solubilizados 10 g de hidróxido de potássio em 100 mL de etanol PA. Este é um revelador específico para antraquinonas, nas cores rosa e vermelho.
- NP/PEG: para a preparação da solução de NP dissolvem-se 0,5 g de NP em 50 mL de metanol. Para a solução do PEG dissolvem-se 2,5 g de PEG em 50 mL de metanol. Para a detecção de flavonoides, primeiramente aplica-se a solução de NP e em seguida a solução do PEG e verifica-se se houve intensificação na fluorescência sob luz UV em 365 nm.

4.2 Coleta do material vegetal

Foram coletados ramos de três espécies do gênero *Vismia*: *V. japurensis*, *V. sandwithii* e *V. cauliflora* (Figura 11). Para a espécie *V. japurensis* o material analisado (Figura 12) foi proveniente de três coletas diferentes. Sendo a primeira e a terceira coleta dos ramos de um indivíduo localizado na trilha principal entre o prédio da incubadora e prédio do CPPN, tendo em torno terra firme com solo de terra preta e camada de serrapilheira sobre o solo envolvendo

árvores primárias e secundárias no Campus I do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, nos dias 09 de julho de 2013 as 14:00 horas e 04 de agosto de 2014 as 4:30 horas, respectivamente. A exsicata da primeira coleta foi depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, sob o número de registro 25.9225, como a terceira coleta foi realizada com o mesmo indivíduo da primeira coleta não houve depósito de registro.

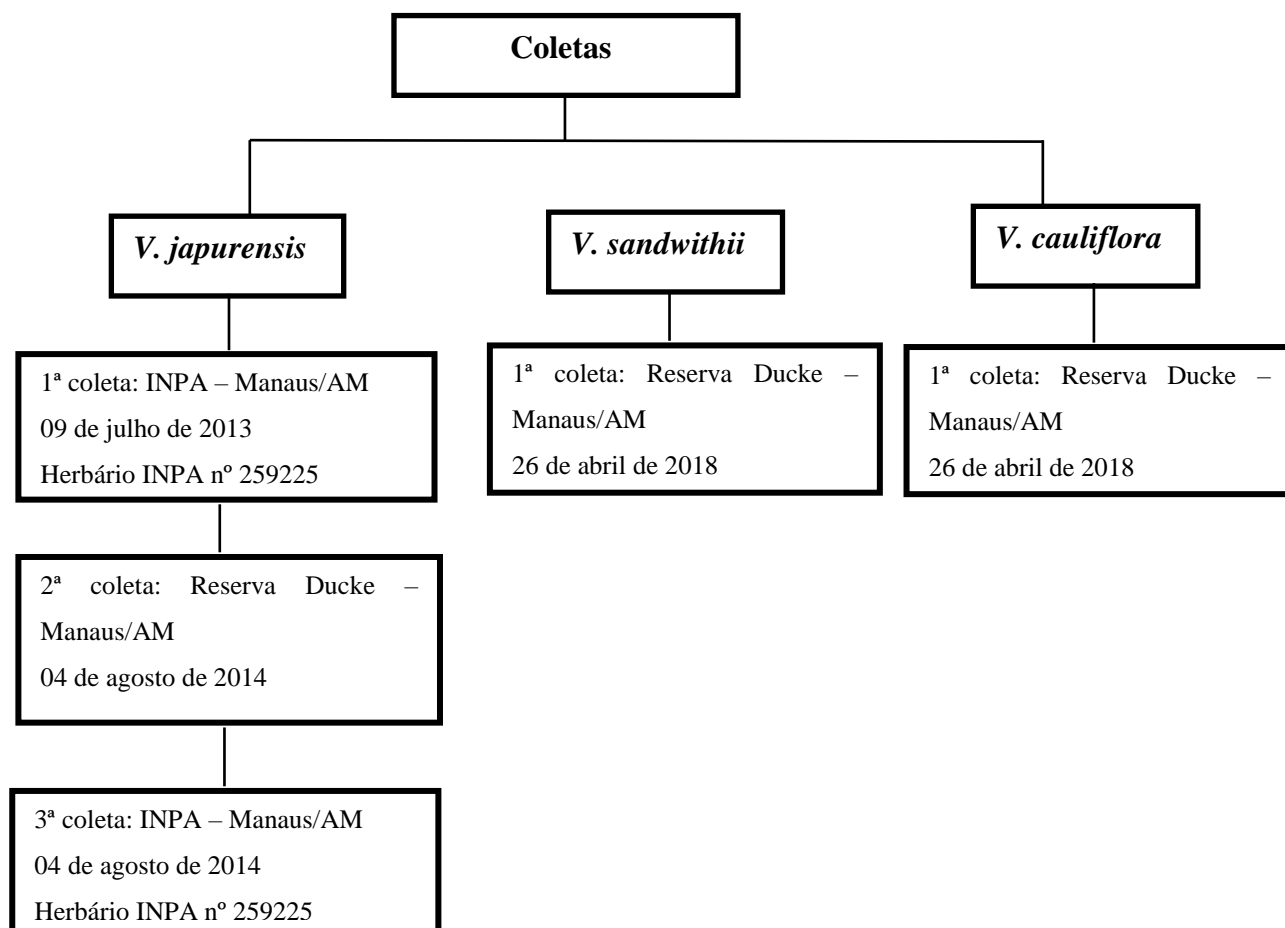


Figura 11: Fluxograma de coletas para cada espécie de *Vismia*

A segunda coleta foi realizada de um indivíduo localizado na trilha principal próximo ao alojamento da reserva A. Ducke, em seu entorno floresta de terra firme com solo de terra preta com uma camada de serrapilheira servindo como nutrientes para outras espécies, foi coletada dia 04 de agosto de 2014 as 10:30, na Reserva Florestal Adolpho Ducke, e foi identificada, pela Mestra em Botânica, Laura Correa Cavalcante e também foram comparadas com as exsicatas já existente no Herbários do INPA, e sua exsicata por ser exterior foi depositada no herbário do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM) sob o número de registro 10479. Como a terceira coleta foi realizada do mesmo indivíduo da primeira da primeira coleta não houve necessidade de depositar uma nova exsicata.

Para as espécies *V. cauliflora* (Figura 13) e *V. sandwithii* (Figura 14) foi realizada uma coleta do material vegetal (ramos) na Reserva Florestal Adolpho Ducke-Manaus-AM, em 26 de abril de 2018, e ambas as exsicatas foram depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, INPA, sobre o número de registro 23643 para *V. cauliflora* e 283644 para *V. sandwithii*.



Figura 12. *V. japurensis*: A) ramos com folhas e inflorescência; B) arbusto; C) exsicata
Fonte: Osorio, M.I.C. e Pedroza, L.S 2018.



Figura 13. *V. cauliflora*: A) Ramos com inflorescências caulifloras; B) árvore inteira com folhas
Fotos: Shimizu 2017. Fonte: Vogel-Ely *et al.* 2019.

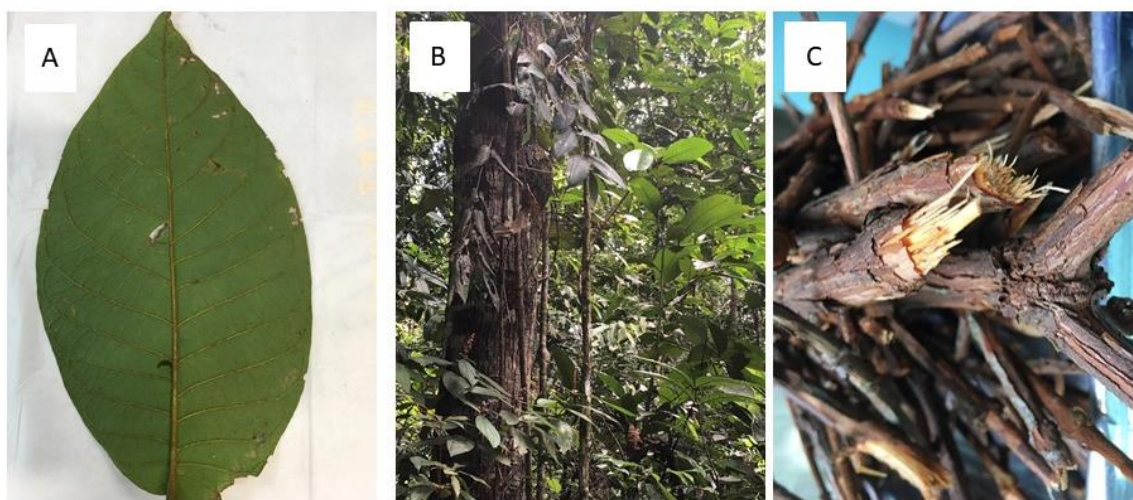


Figura 14. *V. sandwithii*: A) Folha; B) árvore; C) ramos. Fonte: Osorio, M.I.C. e Pedroza, L.S 2019.

4.3 Preparo dos extratos vegetais

Esse processo de extração é dividido em quatro etapas: separação, secagem do material vegetal, trituração ou moagem, extração e concentração.

O material vegetal coletado foi levado ao Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, onde foi separado em folhas e ramos, os quais foram secos em estufa de ventilação da marca DE LEO com temperatura de 40-45 °C, por aproximadamente quatro dias ou até que estivessem bem secos.

Após seco foi então triturado em moinho de facas para o preparo dos extratos e extraído com solventes orgânicos de polaridade crescente (hexano, metanol e água). Estes foram previamente destilados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA. O material vegetal foi primeiramente extraído com hexano usando ultrassom (UNIQUE®) por 20 min, seguido de filtração. Este procedimento foi repetido três vezes. O material residual foi seco em estufa e extraído com metanol, usando-se a mesma metodologia e finalmente com água destilada por três vezes. Os extratos hexânicos e metanólicos foram concentrados e secos utilizando evaporador rotativo (FISATOM®) sob pressão reduzida, em temperatura < 45 °C e no caso do extrato aquoso utilizou-se liofilizador (CHRIST®, modelo beta1-8 LD plus) (Figura 15). Os extratos brutos das três coletas foram pesados para determinação de rendimentos por meio da fórmula abaixo.

$$\% = \frac{(\text{massa do extrato obtido} \times 100)}{\text{massa do material vegetal seco}}$$

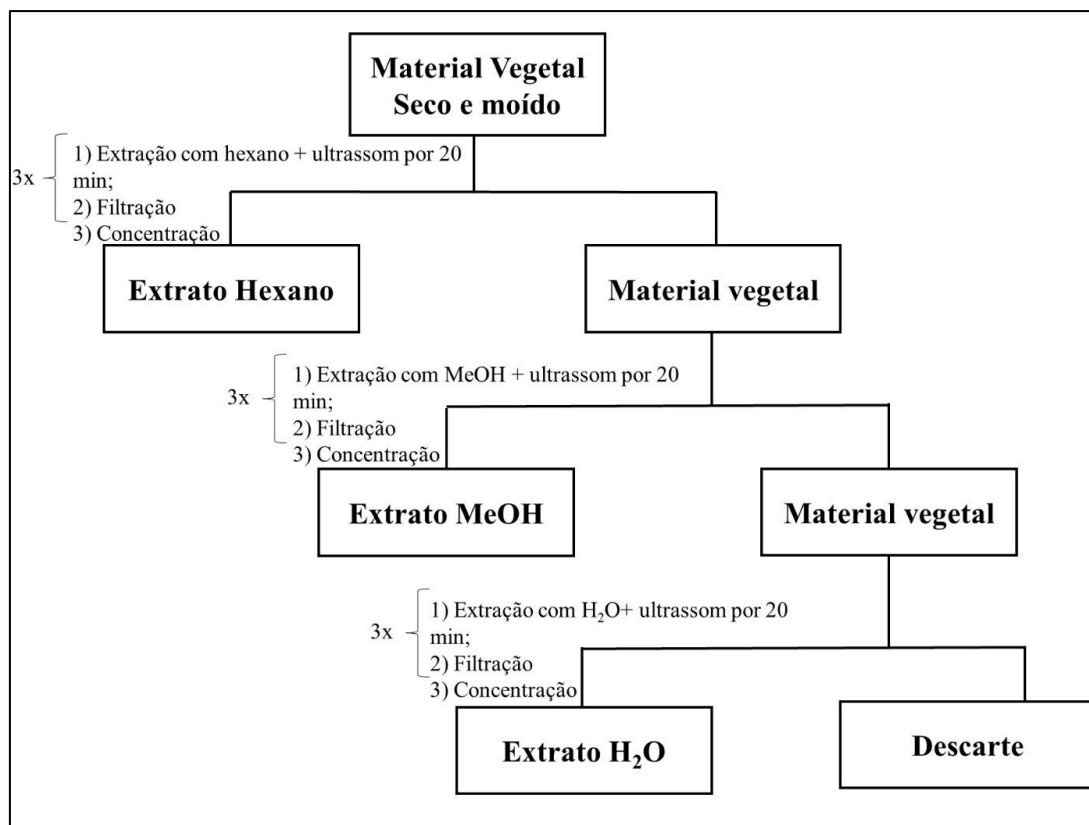


Figura 15. Fluxograma do preparo dos extratos vegetais

4.4 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Os extratos hexânicos obtidos dos ramos das três espécies foram analisados em cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) que teve como finalidade a determinação do sistema de eluição adequado para um fracionamento cromatográfico em coluna aberta e realizar um comparativo entre as três espécies do gênero *Vismia*.

Foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel 60, com indicador de fluorescência (UV₂₅₄ e UV₃₆₅ nm) com 0,20 mm de espessura (Macherey–NageL-MN®), e dentro de uma cuba de vidro, foram eluídas com sistemas de polaridade adequada. Os reveladores físicos foram luz UV (comprimentos de ondas $\lambda = 254$ e 365 nm) e diversos reagentes químicos, tais como: sulfato cérico (Ce(SO₄)₂), para detecção de terpenos; anisaldeído sulfúrico, para detecção de terpenos entre outras classes; hidróxido de potássio (KOH), para detecção de antraquinonas; cloreto

férrico (FeCl_3) para detecção de substâncias fenólicas; AlCl_3 para confirmar presença de flavonoides e NP/PEG para detecção de flavonoides. Esses reveladores podem dar indicações de classes as quais pertencem as substâncias presentes nos extratos. Assim, conseqüentemente, foi possível estabelecer uma estratégia para a separação e purificação de suas moléculas (Collins *et al.* 2006).

4.5 Análise dos extratos hexânicos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos hexânicos brutos foram obtidos em espectrômetro Bruker BioSpin AG, modelo Fourier 300 Ultrashield, 300 MHz. Utilizando 20 mg de cada extrato bruto e 3 mL de clorofórmio deuterado (CDCl_3) para dissolução das amostras e adicionando TMS como referência interna para o deslocamento químico dos sinais de ressonância nos espectros, sendo a ele atribuído o valor de 0,00 ppm. Os espectros de hidrogênios foram obtidos na frequência de 300 MHz, após a aquisição dos espectros fez-se o processamento dos mesmos utilizando o software TopSpin 4.0.6.

4.6 Isolamento dos constituintes químicos dos ramos de *V. japurensis*

O extrato fracionado foi o hexânico da 1ª coleta, pois mostrou-se rico quimicamente (presença de antraquinonas e de terpenos) e pela massa apresentada uma quantidade mínima. Uma alíquota de (1,30 g) do extrato hexânico dos ramos da primeira coleta (1RVJ-H) foi fracionada em coluna aberta utilizando sílica gel 60 (30g) como fase estacionária e eluída com os solventes hexano, acetona e metanol (Tabela 1). Dessa coluna foram obtidas 71 frações. Após as análises em CCDC as frações que apresentaram semelhança foram agrupadas, resultando em oito frações. A partir destas três frações (2, 3-10 e 17-33) foram selecionadas para continuar o fracionamento, por apresentarem características da presença de antraquinonas quando analisadas por CCDC e RMN de ^1H .

Tabela 1. Dados do fracionamento do extrato hexânico de *V. japurensis*

Fração: 1-RVJ-H (coluna aberta)	
Massa da amostra: 1,30 g	h x ϕ da coluna: 41 x 2,0 cm
Massa da sílica: 30 g	volume de eluente utilizado: 200 mL

Sistemas de eluição	Frações
Hexano/acetona/metanol 9:1	
Hexano/acetona 9:1	1-10
Hexano/acetona 8:2	11-20
Hexano/acetona 7:3	21-30
Hexano/acetona 6:4	31-40
Hexano/acetona 1 :1	41-50
Hexano/acetona 100%	51-60
Acetona/metanol 1:1	61-70
Metanol:100%	71

4.6.1 Fracionamento da fração 3-10

A fração 3-10 (48,1 g) foi fracionada em coluna aberta (h x Ø =50 x 2,0 cm) utilizando sílica gel 60 (48,1 g) como fase estacionária e eluída com mistura dos solventes, hexano (HEX) e acetato de etila (AcOEt) e utilizando um volume de 200 mL para cada mistura de gradiente (Tabela 2). Foram obtidas 83 frações em um volume de 100 mL a cada fração coletada. Após análises em CCDC as frações que apresentaram semelhanças foram reunidas, resultando em 14 frações. Destas as frações 6-7, 8-9, 10-13, 14-19 e 22-28 foram escolhidas para continuar o fracionamento.

Tabela 2. Dados do fracionamento da fração 3-10

Fração: 3-10 (coluna aberta)	
Massa da amostra: 0,481 g	h x φ da coluna: 50 x 2,0 cm
Massa da sílica: 48,1 g	volume de eluente utilizado: 200 mL
Sistemas de eluição	Frações
Hexano/acetato de etila 95:5	
Hexano/100	1-2
Hexano/acetato de etila 95:5	3-10
Hexano/acetato de etila 90:10	11-24
Hexano/acetato de etila 85:15	25-31
Hexano /acetato de etila 8:2	32-43
Hexano/acetato de etila 75:25	44-50
Hexano/acetato de etila 70:30	51-61
Hexano/acetato de etila 60:40	62-67
Hexano/acetato de etila 1:1	68-72
Acetato de etila 100%	73-83

4.6.1.1 Fracionamento da fração 3-10.6-7

A partir de fracionamentos sucessivos da fração 3-10.6-7 (Tabela 3), conforme mostrado no fluxograma (Figura 16), em destaque na cor vermelha, todas as numerações que foram fracionadas. Da fração 3-10.6-7 obteve-se a fração 34-35 (11,3 mg), a qual após uma cromatografia em camada delgada preparativa de sílica (20 x 20 cm, placa de vidro, 0,75 mm de camada) (Tabela 4), obteve-se a fração 4-5 (4,9 mg) denominada de substância I e a subfração 36-52 (10,1 mg), que também foi submetida a uma preparativa (Tabela 5), originando a fração 4 (23,2 mg) também denominada de substância I.

Tabela 3. Dados do fracionamento da fração 6-7

Fração: 3-10. 6-7 (coluna aberta)	
Massa da amostra: 0,84 g	h x ϕ da coluna: 37 x 3,1 cm
Massa da sílica: 16 g	volume de eluente utilizado: 100 mL
Sistemas de eluição	Frações
Hexano/diclorometano e metano/ e Hexano 100%	1-18
Hexano/diclorometano 9:1	19-27
Hexano/diclorometano 8:2	28-45
Hexano/diclorometano 7:3	46-57
Hexano/diclorometano 6:4	58-64
Hexano/diclorometano 1:1	65-70
Hexano/diclorometano 4:6	71-77
Diclorometano 100%:	78-83
Diclorometano/acetona 7:3	84-87
Acetona 100%	88-91
Acetona /metanol 7:3	92-94
Metanol 100%	95

Tabela 4. Dados da preparativa da fração 34-35

Fração: 3-10. 6-7.34-35 (placa preparativa)	
Massa da amostra: 11,3 g ou mg	volume de eluente utilizado: 150 mL
Placa preparativa: 20 x 20 cm	
Sistemas de eluição	Frações
Eluída 5 vezes com o sistema Hexano/diclorometano 9:1	1-9

Tabela 5. Dados da preparativa da fração 36-52

Fração: 3-10. 6-7.36-52 (placa preparativa)	
Massa da amostra: 10,1mg	volume de eluente utilizado: 150 mL
Placa preparativa: 20 x 20 cm	
Sistemas de eluição	Frações
Eluída 5 vezes com o sistema Hexano/diclorometano 9:1	1-9

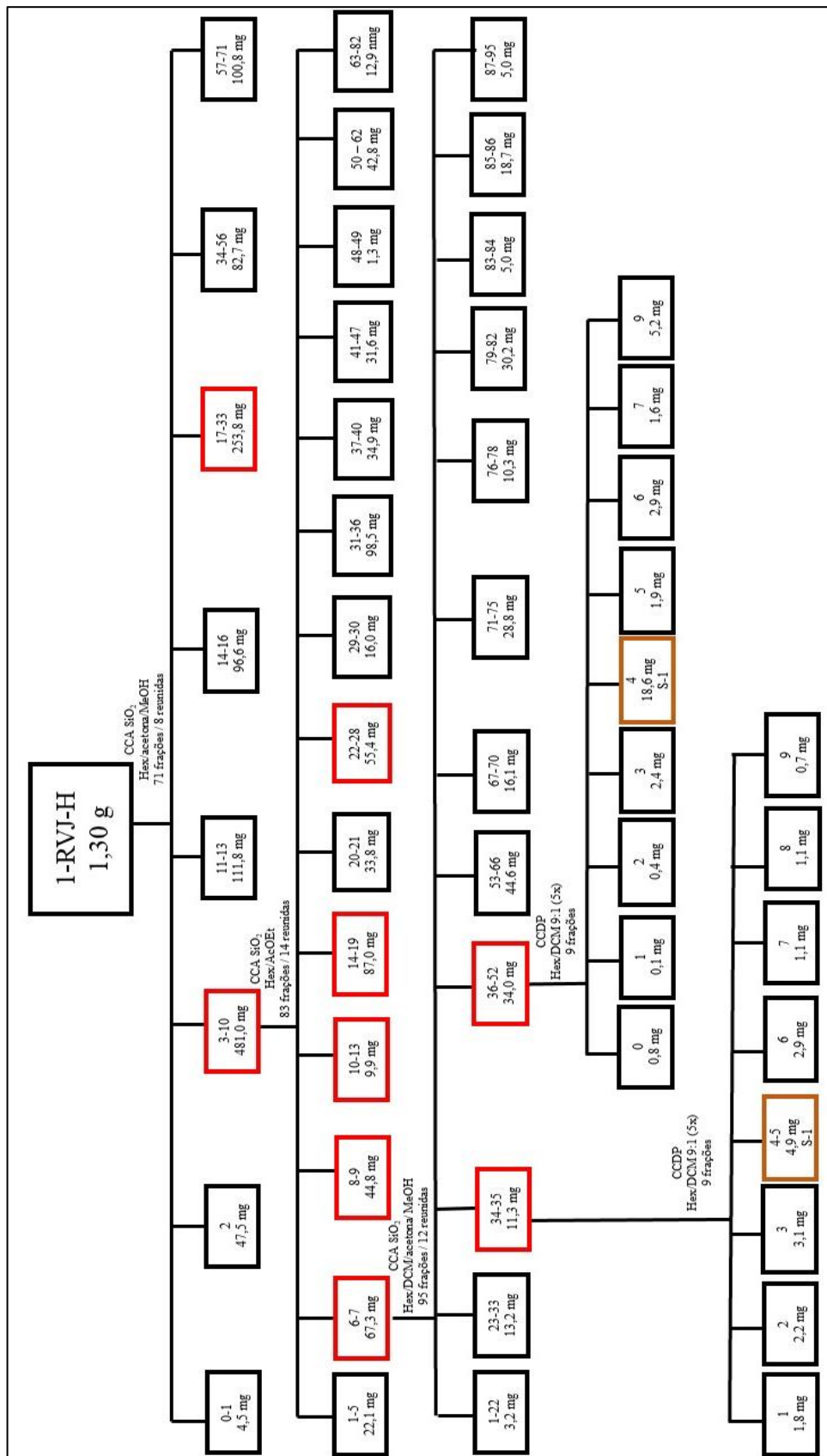


Figura 16. Fluxograma do fracionamento da fração 3-10.6-7

4.6.1.2 Fracionamento da fração 3-10.8-9

A partir de fracionamentos sucessivos da fração 3-1.8-9, conforme mostrado no fluxograma (Figura 17) e (Tabelas 6), obteve-se a fração 22 (28,0 mg), e após uma preparativa (Tabela 7) obteve-se a fração 1 (5,5 mg), a qual observou-se que se tratava de uma mistura das substâncias denominadas substância I e II.

Tabela 6. Dados do fracionamento da fração 8-9

Fração: 3-10. 8-9 (coluna aberta)	
Massa da amostra: 44,8 mg	h x ϕ da coluna: 11,5 x 1,5 cm
Massa da sílica: 6,0 g	volumes de eluente utilizado: 200 mL
Sistemas de eluição	Frações
Hexano/diclorometano/e metanol 9:1	
Hexano/diclorometano 9: 1	1-25
Hexano/diclorometano 8:2	26-30
Hexano/diclorometano 7:3	31-35
Hexano/diclorometano 6:4	36-41
Hexano/diclorometano 1:1	42-47
Diclorometano 100%	48-50
Diclorometano/metanol 9:1	51-54
Metanol 100%	55-56

Tabela 7. Dados do fracionamento da fração 22

Fração: 3-10. 8-9. 22 (placa preparativa)	
Massa da amostra: 78,0 mg	
Placa preparativa: 20 x 20 cm	volume de eluente utilizado: 150 mL
Sistemas de eluição	Frações
Eluída 10 vezes com o sistema Hexano/Acetato de etila 95:5	1-6

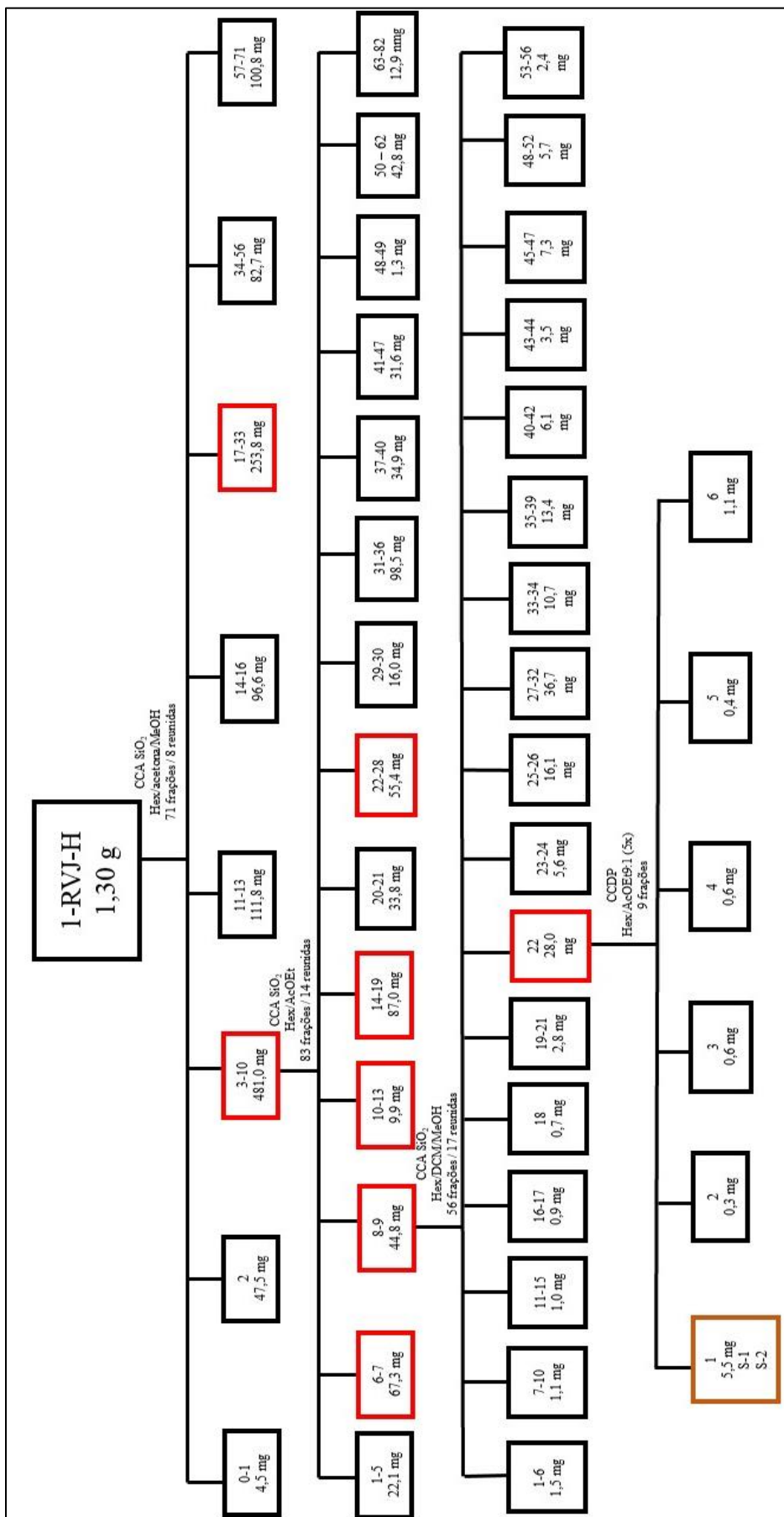


Figura 16. Fluxograma do fracionamento da fração 3-10.8-9

4.6.1.3 Fracionamento da fração 3-10.10-13

A partir de fracionamentos sucessivos da fração 10-13, conforme mostrado no fluxograma e tabelas (Figura 18) (Tabelas 9, 10, 11 e 12), obteve-se a fração 1 (3,7 mg) denomina de mistura das substâncias III e IV.

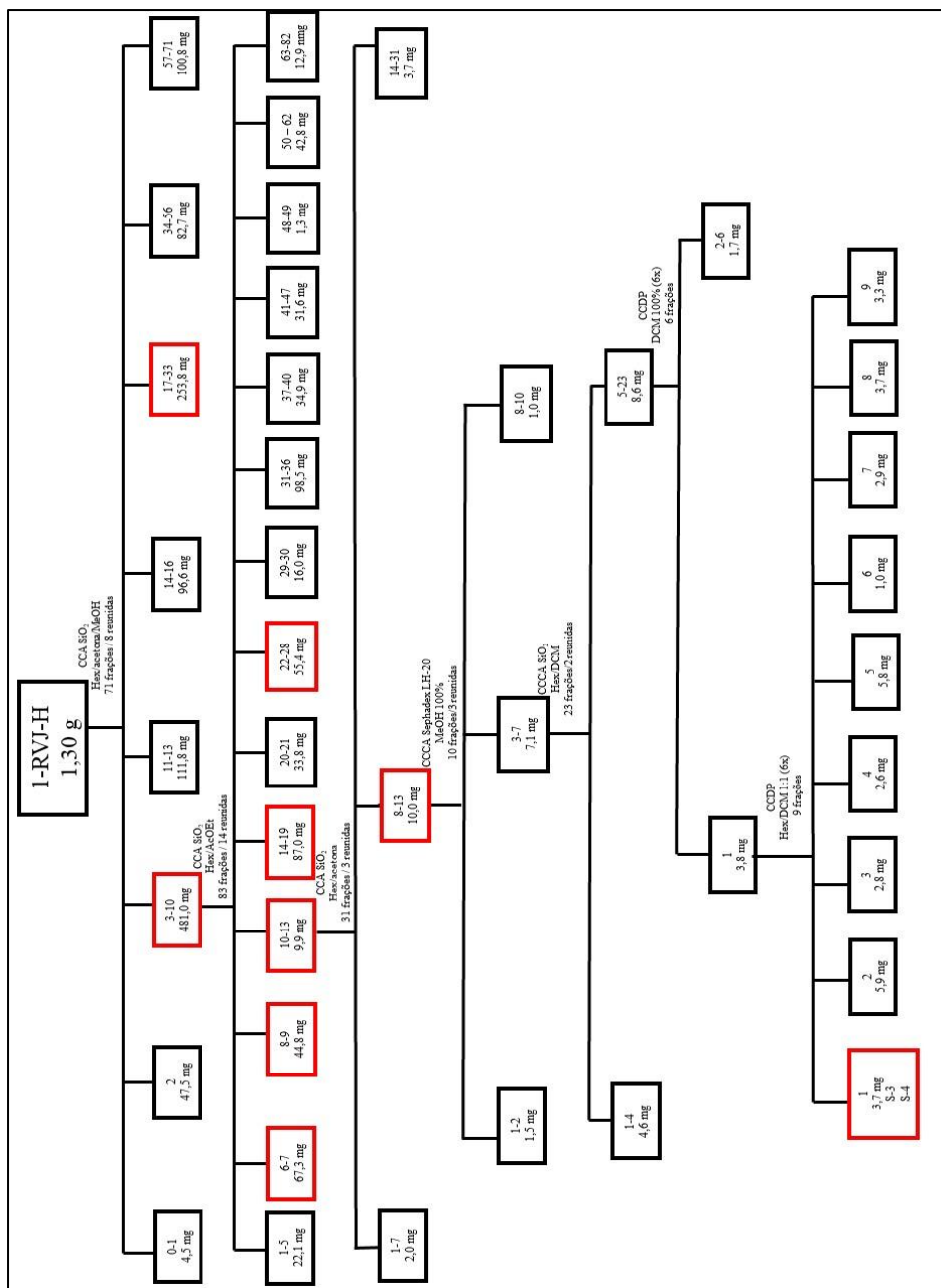


Figura 17. Fluxograma do fracionamento fração 3-10.10-13

Tabela 8. Dados do fracionamento da fração 10-13

Fração: 3-10. 10-13 (coluna aberta)	
Massa da amostra: 14,7 g	h x ϕ da coluna: 6,6 x 1,0 cm
Massa da sílica: 2 g	volume de eluente utilizado: 10 mL
Sistemas de eluição	Frações
Hexano/acetona 95:5	1-13
Hexano/acetona 90:10	14-20
Hexano/acetona 85:15	21-23
Hexano/acetona 80:20	24-27
Hexano /acetona 70:30	28
Hexano/acetona 60:40	29
Hexano/acetona 1:1	30

Tabela 9. Dados do fracionamento da fração 8-13

Fração: 3-10. 10-13. 8-13 (Sephadex LH-20)	
Massa da amostra: 63 mg	h x ϕ da coluna: 21,5 x 0,5 cm
Massa da sephadex: 0,63 g	volume de eluente utilizado: 25 mL
Sistemas de eluição	Frações
Metanol 100%	1-10

Tabela 10. Dados do fracionamento da fração 3-7

Fração: 3-10. 10-13. 8-13. 3-7 (coluna aberta)	
Massa da amostra: 5,6mg	h x ϕ da coluna: 18, x 0,5 cm
Massa da sílica: 0,56g	volume de eluente utilizado: 25 mL
Sistemas de eluição	Frações
Hexano/diclorometano 9:1	1-5
Hexano/diclorometano 85:15	6-12
Hexano/diclorometano 8:2	13-14
Hexano/diclorometano 7:3	15-17
Hexano/diclorometano 6:4	18-21
Hexano/diclorometano 1:1	22-
Diclorometano 100%	23

Tabela 11. Dados do fracionamento da fração 5-23

Fração: 3-10. 10-13. 8-13. 3-7. 5-23 (placa preparativa)	
Massa da amostra: 8,8mg	
Placa preparativa 20 x 20 cm	volume de eluente utilizado: 50 mL
Sistemas de eluição	Frações
Diclorometano 100% x 6	1-6

Tabela 12. Dados do fracionamento da fração 1

Fração: 3-10. 10-13. 8-13. 3-7. 5-23.1 (placa preparativa)	
Massa da amostra: 3,8mg	
Placa preparativa 20x20 cm	volume de eluente utilizado: 40mL

Sistemas de eluição	Frações
Hexano/diclorometano 1:1 x 6	1-9

4.6.1.4 Fracionamento da fração 3-10.14-19

A partir de fracionamentos sucessivos da fração 14-19, conforme mostrado no fluxograma e tabelas (Figura 19) (Tabelas 13 e 14), obteve-se a fração 1 (29,2 mg) denominada de substância V, e a fração 6-9 (4,3 mg) denominada de mistura das substâncias III e V, e a fração 4-5.1 (14,7 mg) que foi denominada de substância III.

Tabela 13. Dados do fracionamento da fração 14-19

Fração: 3-10. 14-19 (coluna aberta)	
Massa da amostra: 0,95mg	h x ϕ da coluna: 26,6 x 1 cm
Massa da sílica: 9,5 g	volume de eluente utilizado: 50 mL
Sistemas de eluição	Frações
Hexano/acetato de etila e metanol 9:1	
Hexano 100%	1
Hexano/acetato de etila 9:1	2-3
Hexano/acetato de etila 8:2	4-6
Hexano/acetato de etila 7:3	7-9
Hexano/acetato de etila 6:4	10-12
Hexano/acetato de etila 1:1	13-16
Acetato de etila 100%	17-19
Metanol 100%	20-21

Tabela 14. Dados do fracionamento da fração 4-5

Fração: 3-10.14-19.4-5 (Preparativa)	
Massa da amostra: 45mg	
Placa preparativa 20 x 20cm	volume de eluente utilizado: 100 mL
Sistemas de eluição	Frações
Hexano/diclorometano 95:5	Eluída por 7x
	06 frações

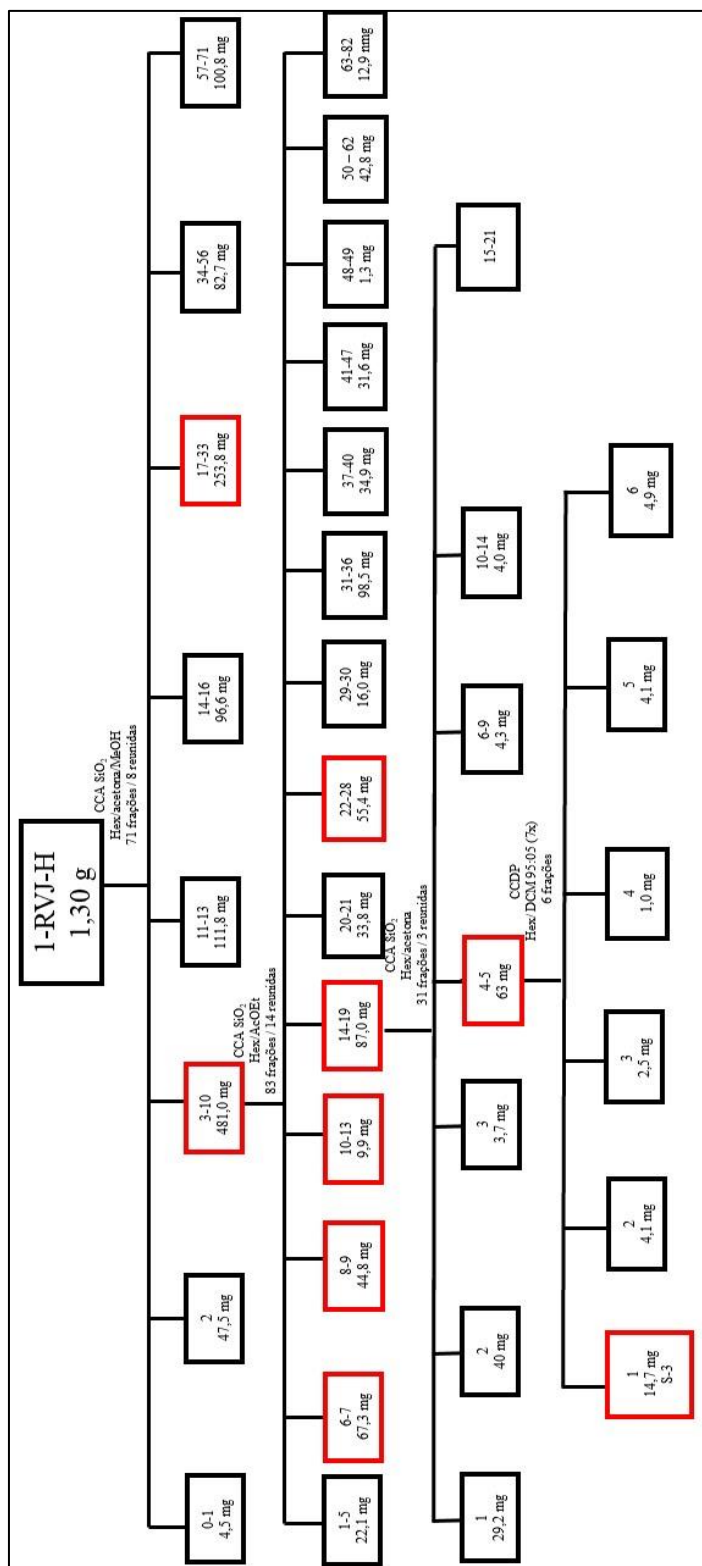


Figura 18. Fluxograma do fracionamento fração 3-10.14-19

4.7 Isolamento dos constituintes químicos dos ramos de *Vismia sandwithii*

O extrato de *V. sandwithii* escolhido para realizar o fracionamento foi o extrato hexânico pois apresentou características de terpenos, quinonas e flavonoides quando analisados por CCDC. O fracionamento foi monitorado por CCDC e as placas foram reveladas com reveladores físicos e químicos.

Uma alíquota de (5 g) do extrato hexânico dos ramos foi fracionada em coluna aberta utilizando sílica gel 60 (250 g) como fase estacionária e eluída com os solventes hexano, acetona e metanol como fase móvel (Tabela 15). Dessa coluna foram obtidas 178 frações. Após as análises em CCDC as frações que apresentaram semelhanças quimicamente foram agrupadas, resultando em 13 frações.

A partir destas, quatro frações foram selecionadas para continuar o fracionamento (22-23, 50-60, 67-81, e 129-132), por apresentarem características da presença de antraquinonas quando analisadas por CCDC e RMN de ¹H.

Tabela 15. Fração: 1-RVS-H (coluna aberta)

Massa da amostra: 5g Massa da sílica: 250g	h x φ da coluna: 46 x 5,0 cm volume de eluente utilizado: 100 mL
Sistema de aluição	
Hexano/acetona e metanol 98:2	Frações
Hexano/acetona 98:2	1-12
Hexano/acetona 96:4	13-24
Hexano/acetona 94:6	25-35
Hexano/acetona 92:8	36-45
Hexano/acetona 9:1	46-55
Hexano/acetona 8:2	56-65
Hexano/acetona 7:3	66-76
Hexano/acetona 6: 4	77-86
Hexano/acetona 1:1	87-100
Acetona 100%	101-107
Acetona/metanol 9:1	108-118
Acetona/metanol 8:2	119-128
Acetona/metanol 7:3	129-142
Acetona/metanol 6:4	143-149
Metanol 100%	150-178

4.7.1 Fracionamento da fração 67-81

A partir do fracionamento da fração 67-81 (672,9 mg), conforme mostrado no fluxograma (Figura 19) e tabelas abaixo (Tabela 16), obteve-se a fração 9-10 (7,4 mg) que foi denominada de substância III, e a fração 14-16 (8,0 mg), que foi denominada de substância V.

Tabela 16. Dados do fracionamento da fração 67-81

Fração: 67-81 (coluna aberta)	
Massa da amostra: 0,672g	h x ϕ da coluna: 16 x 3,0 cm
Massa da sílica: 34g	volume de eluente utilizado: 200 mL
Sistemas de eluição	Frações
Hexano/diclorometano e metanol 7:3	
Hexano/diclorometano 7:3	1-16
Hexano/diclorometano 6:4	17-26
Hexano/diclorometano 1:1	27-40
Hexano/diclorometano 3:7	41-49
Diclorometano 100%	50-58
Diclorometano/metanol 9:1	59-67
Diclorometano/ metanol 8:2	68-76
Diclorometano/ metanol 7:3	77-80
Diclorometano/metanol 6:4	81-83
Metanol 100%	84-85

4.7.2 Fracionamento da fração 129-132

A fração 129-132 (111,5 mg) foi fracionada (Figura 20) e (Tabela 17) por cromatografia em camada delgada preparativa e obteve-se a fração 1-3 (44,6 mg) e 9-10 (7,4 mg), que foi denominada de substância III, e a fração 11-13 (11,4 mg) denominada de substância v.

Tabela 17. Dados do fracionamento da fração 129-132

Fração: 129-132 (preparativa)	
Massa da amostra: 0,0115g	Volume de eluente utilizado: 150 mL
Placa preparativa 20 x 20cm	
Sistema De Eluição	Frações
Hexano/diclorometano 100% x 3	1-6

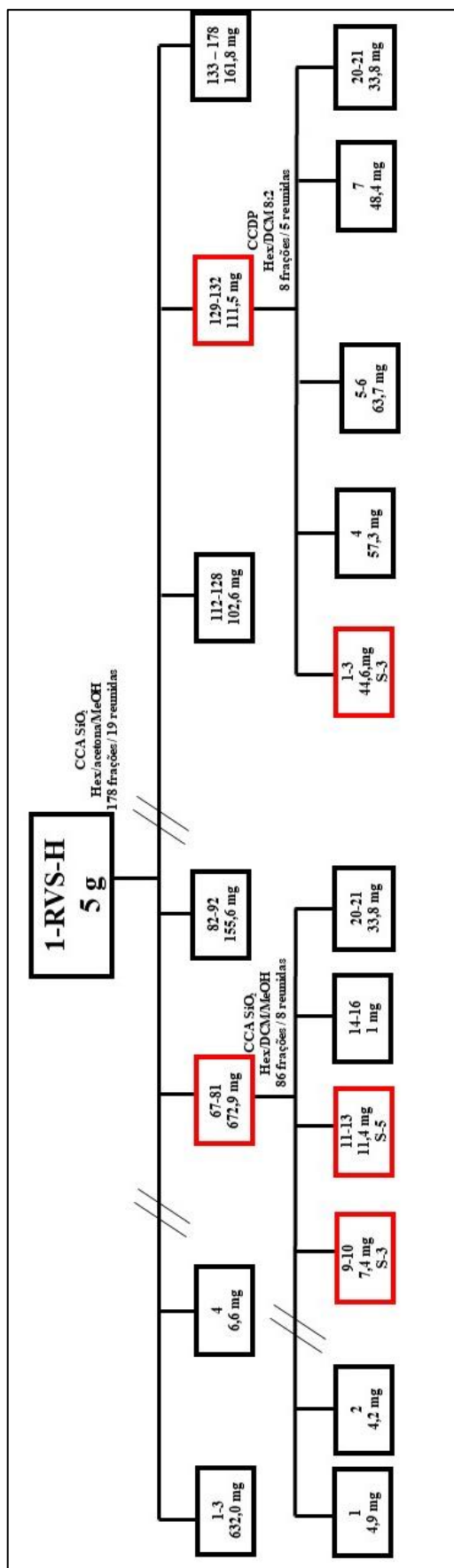


Figura 19. Fluxograma dos fracionamentos das frações 67-81 e 129-132

4.8 Métodos de análise estrutural

As frações que demonstraram elevado grau de pureza em um determinado constituinte, quando observadas sob os reveladores físicos e químicos da CCDC, foram analisadas por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C e comparadas com um padrão, visando identificação/elucidação estrutural.

4.9 Avaliação das atividades química e biológicas

4.9.1 Atividade de toxicidade frente à *Artemia salina*

Os extratos foram avaliados quanto à toxicidade sobre o microcrustáceo *A. salina*, conforme método descrito por Meyer e colaboradores (1982).

Os cistos de *A. salina* (10 mg) foram eclodidos em solução salina (3,8%) com o pH entre 8 e 9, temperatura ambiente entre 24 e 26 °C sob iluminação com lâmpada fluorescente, durante 48 horas. Após a eclosão das larvas, em uma placa de 24 poços, foram distribuídas 10 larvas em cada poço, adicionando os extratos a fim de se obter suas concentrações finais decrescentes, iniciando com 1000 µg/mL, todas em triplicata e permanecendo sob as mesmas condições para contagem de sobrevivência das larvas após 24 (Figura 12). Para o controle positivo foi usado dicromato de potássio 0,1% e para o controle negativo adicionou-se DMSO 5%. As amostras foram diluídas até encontrar-se a menor concentração letal média (CL₅₀), por meio de regressão linear para correção estatística.

4.9.2 Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos dos ramos (0,5 mg/mL) foi realizada utilizando os ensaios quantitativos com o DPPH• e com o Fe^{3+} /1,10-fenantrolina 0,25%, os resultados obtidos foram comparados em termos de equivalência com o padrão ácido ascórbico. A concentração equivalente do ácido ascórbico foi obtida pela interpolação dos dados entre a variação da absorbância e a concentração do ácido ascórbico representados em uma curva analítica. Para construção dessa curva analítica foram preparados seis micros tubos do tipo

ependorff, com alíquotas diluídas do padrão ácido ascórbico e sua quantificação foi feita através do espectrofotômetro (Marca Femto) em comprimento de onda de 517 nm, por 30 minutos.

Para a curva do Fe^{3+} foi preparada 10 μL dessas alíquotas diluídas em seis novos microtubos também e então adicionado a eles 10 μL de Fe^{3+} e 980 μL de 1,10 de fenantrolina. Uma hora depois, essas alíquotas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 508 nm.

Para a curva de DPPH•, as soluções foram preparadas no dia do experimento dissolvendo aproximadamente 3 mg do reagente em 100 mL de metanol (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O ácido ascórbico foi preparado dissolvendo 44 mg do reagente em 50 mL de água deionizada (44 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para o procedimento utilizando o DPPH• foram adicionados 10 μL da solução do extrato e 990 μL de DPPH• e 30 minutos depois, a leitura é realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 517 nm. O preparo do branco consistiu em adicionar 10 μL de água deionizada com 990 μL de DPPH•. Para o procedimento usando Fe^{3+} como agentes oxidantes foram utilizados 10 μL da solução do extrato para 10 μL de uma solução padrão de Fe^{3+} e 980 μL de 1,10-fenantrolina. A leitura foi feita 1 hora depois em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 508 nm. O preparo do branco consistiu em adicionar 10 μL de água deionizada com 10 μL de Fe^{3+} e 980 μL de 1,10-fenantrolina. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

4.9.3 Atividade antibacteriana

Para os ensaios antibacterianos foram utilizadas as bactérias: *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA 110-36, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Edwardsiella tarda* ATCC 15947, *Salmonella enterica* ATCC 13076.

As avaliações dos extratos e substâncias foram realizadas pelo método de microdiluição em caldo, segundo orientações propostas por CLSI (2012). Para a realização do ensaio, inicialmente os micro-organismos testes foram repicados em caldo Mueller–Hinton, sendo incubados durante um período de 16 a 24 horas, para a reativação.

Para a realização do ensaio, o inóculo foi previamente ajustado em espectrofotômetro, obtendo-se uma absorbância de 0,08 em 625 nm (o que equivale à escala 0,5 de McFarland),

este então foi diluído 20 vezes. Assim, o volume final de bactéria aplicado em cada poço foi de aproximadamente 5×10^4 UFC.

Os extratos foram primeiramente solubilizados em DMSO a 5%, e em seguida realizadas diluições sucessivas. Em seguida foram adicionados em cada um dos poços (microplaca de 96 poços) 10 μ L desta solução de inóculo de 90 μ L de cada concentração dos extratos ou substâncias isoladas.

Para controle negativo foram utilizados 95 μ L de caldo Mueller–Hinton contendo 5% de DMSO e 5 μ L de inóculo. Para o controle positivo foram utilizados 90 μ L do antibiótico oxitetraciclina na concentração de 125 μ g/mL e 10 μ L de inóculo. Para a avaliação dos extratos foram utilizadas as concentrações de 1000 e 500 μ g/mL, para as substâncias isoladas foram utilizadas as concentrações de 125 μ g/mL, 62,5 μ g/mL e 31,2 μ g/mL.

Todos os testes foram realizados em triplicata. Em seguida a placa foi incubada à temperatura e tempo adequados para cada micro-organismo (30 ou 37 °C). Cada microplaca foi avaliada através da leitura espectrofotométrica em 625 nm. Os dados obtidos foram processados utilizando-se o programa estatístico Origin. 8.

4.9.4 Atividade antiangiogênica

A avaliação da atividade antiangiogênica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Nguyen e colaboradores (1994), sendo realizado com triplicata. Os ovos fertilizados da espécie *Gallus domesticus* foram incubados em uma incubadora automática e digital Chocmaster®, na posição horizontal, à temperatura de 37 °C e sob umidade relativa do ar de 33%. Após 48 h de incubação, uma pequena janela de 5 mm de diâmetro foi aberta na casca, na região onde se localiza a câmara de ar do ovo e assim, uma quantidade de cerca de 1 mL de clara foi retirada afim de se evitar a aderência dos embriões nas membranas ovulares.

Logo em seguida, outra janela, agora com cerca de 15 mm de diâmetro, foi aberta na região do ovo posicionada acima da região da membrana corioalantoica dos embriões. Estas janelas foram fechadas com auxílio de uma fita isolante de cor preta para minimizar a perda de umidade. Os embriões permaneceram assim, sob incubação, por mais 72 h até a idade embrionária de 6 dias, quando um disco de metil celulose (1,0%) embebido com os extratos bruto (1 mg) e álcool etílico foram implantados sobre os vasos sanguíneos no terço externo da membrana corioalantoica. O orifício foi novamente fechado com a fita gomada preta. Assim, a incubação prosseguiu por mais 48 h, até a idade embrionária de oito dias, quando se realizou a

análise da atividade antiangiogênica e vascular. Na região de implantação do disco foram registrados com uma câmera fotográfica. Essas imagens foram enviadas para um computador, onde cada imagem em triplicata foi utilizada para se realizar uma contagem de vasos sanguíneos que interceptam o disco e vasos presentes na vizinhança em uma área de 0,9 cm². Os resultados foram expressos como percentual de vasos \pm desvio-padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimentos dos extratos brutos

Dos extratos obtidos, os metanólicos apresentaram maiores valores de rendimento podendo ser atribuídos (Tabela 18) para todas as coletas, destacando-se principalmente a 1ª, 2ª e 3ª coleta de *V. japurensis*, com rendimentos acima de 8%. Vale ressaltar que para a espécie *V. cauliflora*, levando em consideração a quantidade do material submetido as extrações, foi o que apresentou um maior rendimento, tanto no extrato hexânico como no metanólico. Os extratos hexânicos das demais espécies obtiveram rendimentos inferiores a 1%. Os extratos metanólicos e hexânicos da primeira coleta de *V. cauliflora* e *V. sandwithii* também apresentaram um percentual de rendimento inferior a 1%.

O extrato metanólico capta mais substâncias polares que a planta produz, como clorofila, açúcares e moléculas polares ligadas a açúcares por exemplo. Podendo desengordurar a matéria prima vegetal, extrair substâncias apolares como terpenos (esteroides) e ácidos graxos. Também pode extrair algumas moléculas polares características moleculares do n-hexano.

Tabela 18. Massas dos extratos brutos obtidas dos ramos de *V. japurensis*, *V. cauliflora* e *V. sandwithii*

	Extratos	Material vegetal (g)	Massa extrato (g)	Rendimento (%)
1ª coleta	RVJ-Hexano	295,63	1,75	0,59
	RVJ-Metanol	295,30	25,52	8,63
	RVJ-Água	295,20	3,46	3,46
2ª coleta	RVJ-Hexano	410,60	4,1	0,99
	RVJ-Metanol	410,58	35,17	8,56
	RVJ-Água	410,55	3,80	0,92
3ª coleta	RVJ-Hexano	360,65	4,10	1,13
	RVJ-Metanol	360,63	31,02	8,60
	RVJ-Agua	360,60	2,54	0,70
1ª coleta	RVC-Hexano	50,00	0,51	1,02
	RVC-Metanol	50,00	2,71	5,42
1ª coleta	RVS-Hexano	903,20	4,96	0,70
	RVS-Metanol	903,15	7,28	0,8

RVJ: Ramos de *V. japurensis*; RVC: Ramos de *V. cauliflora*; RVS: Ramos de *V. sandwithii*.

Porém o rendimento pode mudar de espécie para espécie, pois algumas podem apresentar composição química de moléculas apolares que só são carregadas com hexano, aumentando muito o rendimento dos extratos. Também em algumas plantas, podem produzir menos metabólitos secundários em relação a outras plantas, causando uma grande diferença nos rendimentos entre os extratos hexânicos e metanólicos.

4.2 Análise dos extratos por cromatografia em camada delgada comparativa e ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Os extratos hexânicos dos ramos de *V. japurensis*, *V. cauliflora* e *V. sandwithii* foram analisados e comparados por CCDC (Figura 21) e RMN (Figura 22) com o objetivo de investigar a complexidade química dos extratos e semelhança das classes químicas presentes nos extratos trabalhados.

- Os extratos hexânicos das três espécies de *Vismia* mostraram-se ricos quimicamente pois apresentaram características da presença de algumas classes químicas como terpenos e esteroides, pois quando revelados com os reveladores com anisalaldeído sulfúrico apresentaram manchas com coloração lilás e rosa e com sulfato cérico ($Ce(SO_4)_2$) apresentaram manchas com coloração marrom avermelhada (Figura 21). Quando analisado com NP/PEG foi possível observar intensificação nas fluorescências sob luz UV em 365 nm nas bandas com coloração indicando presença de flavonoides. E quando revelado com KOH, foi observado bandas com coloração rosa, indicando presença de quinonas. Quando revelado com DPPH foi possível observar bandas com coloração amareladas com indicativo de aromáticos. Também quando revelado com cloreto férrico foi possível observar indícios da presença de aromáticos. Foi possível observar que a terceira coleta de *V. japurensis* revelou bandas com coloração parecidas com *V. cauliflora* e *V. sandwithii* e também foi observada que *V. cauliflora* e *V. sandwithii* apresentaram coloração com bandas semelhantes sendo que a primeira e segunda coleta de *V. japurensis* apresentaram características com bandas diferenciadas das demais espécies analisadas.
- Estes dados corroboram também com os dados observados na análise de RMN de 1H , com as ampliações na região de 0,60 a 1,8 ppm (Figura 23) onde foi observada a presença dos hidrogênios das metilas presentes nos terpenoides e esteroides bem característico para o gênero, pois na literatura são descritos os isolamentos de uma grande quantidade de terpenos. Apresentam também um sinal intenso em 1,25 ppm que correspondentes aos

hidrogênios de CH₂ de cadeias alifáticas lineares (comumente denominados de “graxas”, que podem ser de alcanos ou ácidos graxos, entre outros).

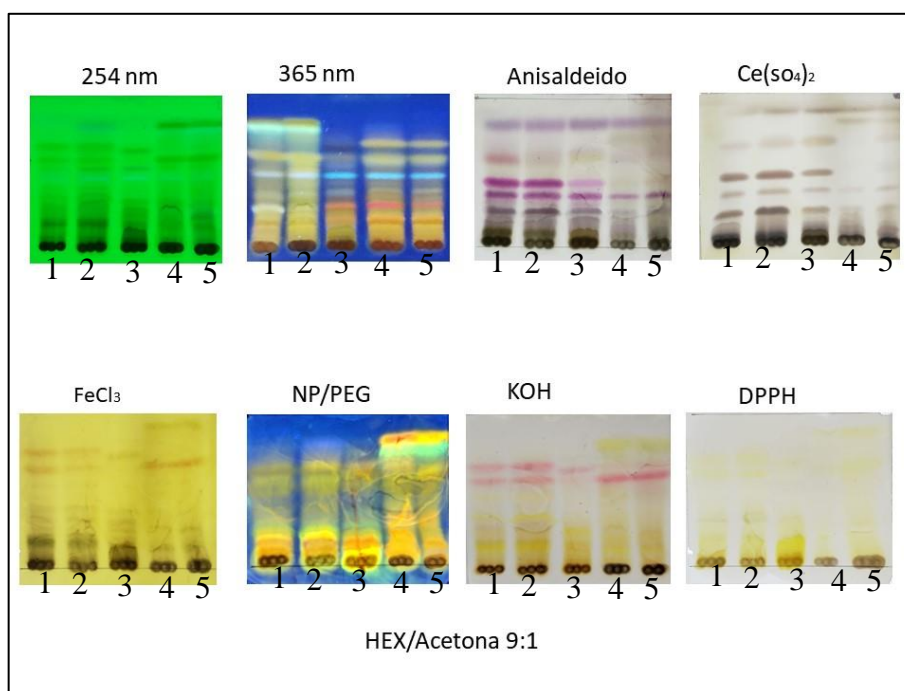


Figura 20. CCDC dos extratos hexânicos brutos dos ramos. *V. japurensis* (1^a, 2^a e 3^a coleta) (1, 2, 3), *V. cauliflora* (4) e *V. sandwithii* (5)

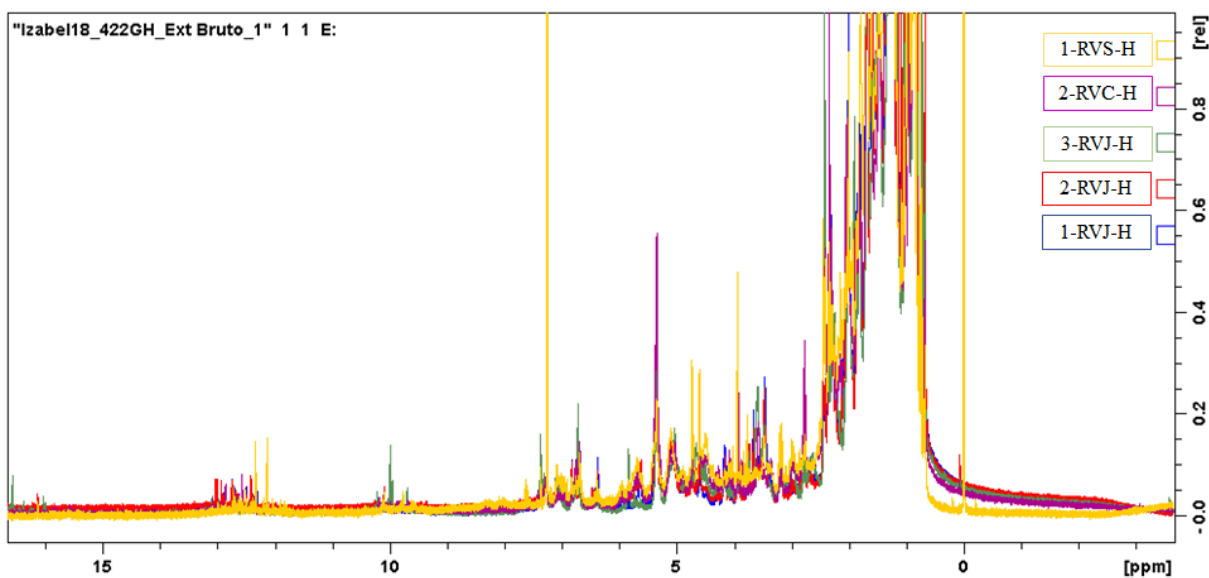


Figura 21. Espectros de RMN de ¹H de todos os extratos hexânicos das três espécies de *Vismia*. RVS: Ramos de *V. sandwithii*; RVC: Ramos de *V. cauliflora*; RVJ: Ramos de *V. japurensis*

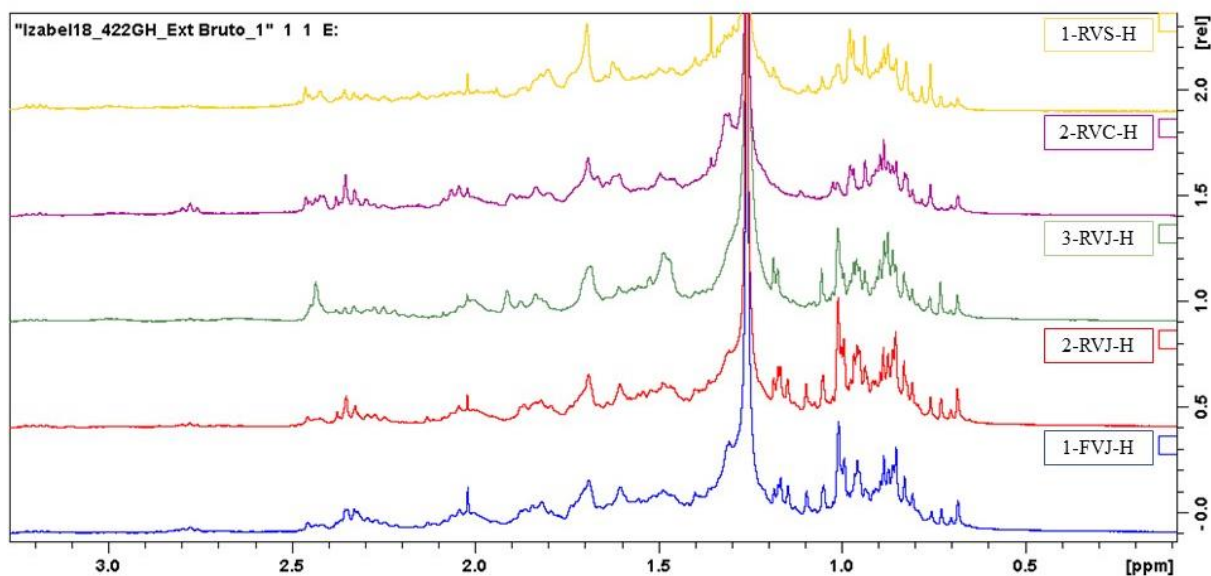


Figura 22. Expansão dos Espectros de RMN de ^1H , de todos os extratos hexânicos das três espécies de *Vismia*, da região 0,6 a 1,8 ppm. RVS: Ramos de *V. sandwithii*; RVC: Ramos de *V. cauliflora*; RVJ: Ramos de *V. japurensis*

Quando revelados com KOH (Figura 21), observaram-se algumas bandas com a coloração rosa, sendo este um indicativo da presença de quinonas bem característico para o gênero *Vismia*. Resultados estes que corroboram com a literatura onde são relatadas quinonas isoladas de diferentes espécies do gênero *Vismia* (Hussain *et al.* 2012; Vizcaya *et al.* 2012). Quando revelados com DPPH mostraram a presença de possíveis antioxidantes pela coloração amarela. Verificou-se também a presença de flavonoides nas três espécies de *Vismia*, quando analisados com NP-PEG (Figura 21), pois houve uma intensificação das fluorescências. Dados estes que corroboram com os dados observados nos espectros de RMN de hidrogênio nas ampliações da região de 5,0 e 5,5 ppm foi observado sinais indicando a presença de hidrogênios olefínicos. Os espectros apresentaram uma grande quantidade de sinais na região dos hidrogênios aromáticos na região entre 6,0 a 8,0 ppm (Figura 24). E na região de 10,0 a 16,0 ppm apresentou sinais que podem ser atribuídos a hidroxilas queladas (Figura 25). Sinais estes que podem ser um indicativo da presença das quinonas e flavonoides, sendo as quinonas consideradas marcadores químicos do gênero, e dados estes que corroboram com os obtidos nas análises em cromatografia em camada delgada comparativa, quando reveladas com KOH e NP-PEG

Todos os extratos analisados por CCDC e RMN mostraram-se ricos quimicamente revelando uma grande quantidade de possíveis substâncias a serem isoladas.

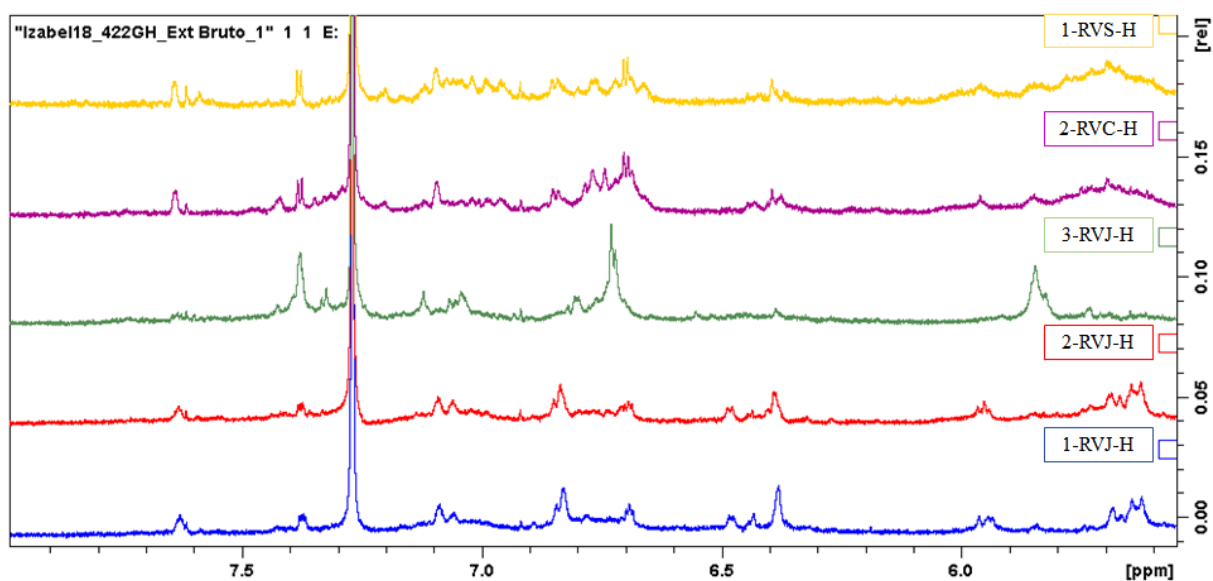


Figura 23. Expansão dos Espectros de RMN de ¹H, de todos os extratos hexânicos das três espécies de *Vismia*, da região 6,0 a 8,0 ppm. RVS: Ramos de *V. sandwithii*; RVC: Ramos de *V. cauliflora*; RVJ: Ramos de *V. japurensis*

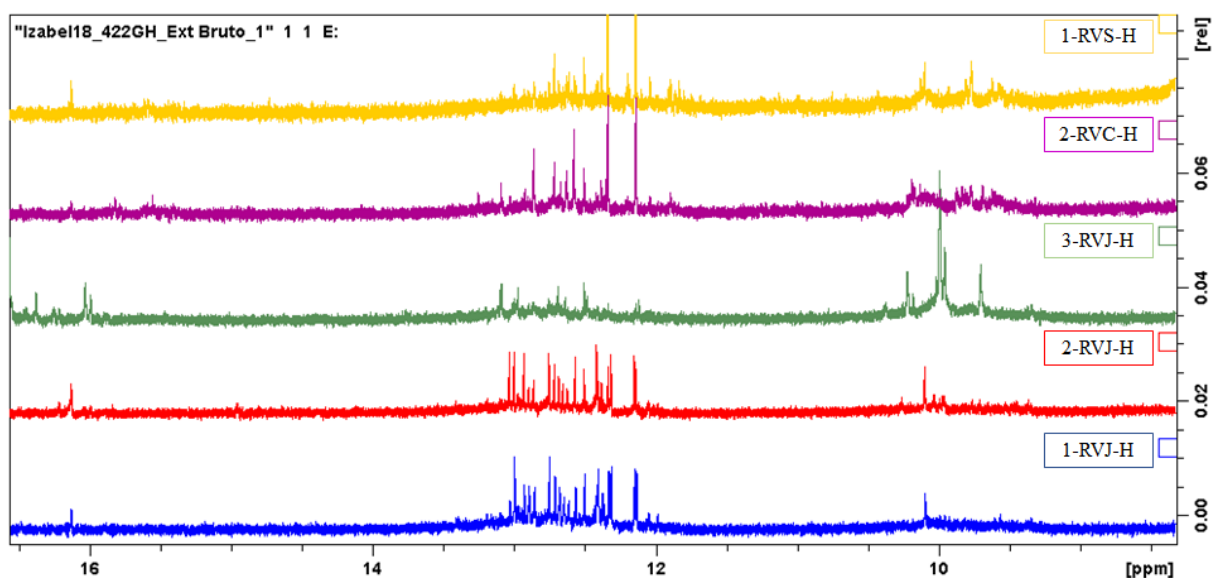


Figura 24. Expansão dos Espectros de RMN de ¹H, de todos os extratos hexânicos das três espécies de *Vismia*, da região 10,0 a 16,0 ppm. RVS: Ramos de *V. sandwithii*; RVC: Ramos de *V. cauliflora*; RVJ: Ramos de *V. japurensis*

5.2 Identificação estrutural das substâncias isoladas

Dos fracionamentos realizados foi possível isolar 5 substâncias:

- Substância 1: isolada do extrato hexânico da espécie *V. japurensis*;
- Substância 2: isolada do extrato hexânico da espécie *V. japurensis*;
- Substância 3: isolada do extrato hexânico da espécie *V. japurensis* e extrato hexânico da espécie *Vi. sandwithii*;
- Substância 4: isolada do extrato hexânico da espécie *V. japurensis*;
- Substância 5: isolada do extrato hexânico da espécie *V. sandwithii*.

5.2.1 Identificação da substância I

A fração 4-5 (4,9 mg) obtida do extrato hexânico dos ramos de *V. japurensis* da 1ª coleta, apresentou-se na forma de cristais brancos, e quando revelada com anisaldeído verificou-se a coloração amarela, com $R_f = 0,65$, quando eluída com Hex/DCM 1:1.

O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 26) apresentou sinais de sete simpletos em δ_{H} 0,73; 0,89; 0,96; 1,0; 1,01; 1,05; 1,18, todos com integral para 3 hidrogênios, e um duplete em δ_{H} 0,88 ($d, J = 6,58 \text{ Hz}, 3\text{H}$) totalizando as 8 metilas de um triterpeno (Figuras 27). Foram observados também sinais na região de δ_{H} 1,26 a 1,58 referentes a hidrogênios metilênicos e δ_{H} 2,17 a 2,45 referentes aos hidrogênios metínicos da molécula. A ausência de ligações duplas na região entre δ_{H} 5,0 e 6,0, o que levou a sugerir que a substância I tratava-se de um triterpeno do esqueleto friedelano.

O espectro de hidrogênio da substância I foi comparado com um padrão (Figuras 28 e 29) já obtido em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa com as folhas de *V. japurensis*, assim como os dados obtidos foram comparados com a literatura e foi possível confirmar os deslocamentos químicos de ^{13}C identificando a substância I como o triterpeno friedelina (Figura 29) (Mahato e Kundu 1994). Este triterpeno já foi isolado das folhas, frutos e madeira de *V. japurensis* (Pedroza 2019; Pinheiro *et al.* 1984; Miraglia *et al.* 1981).

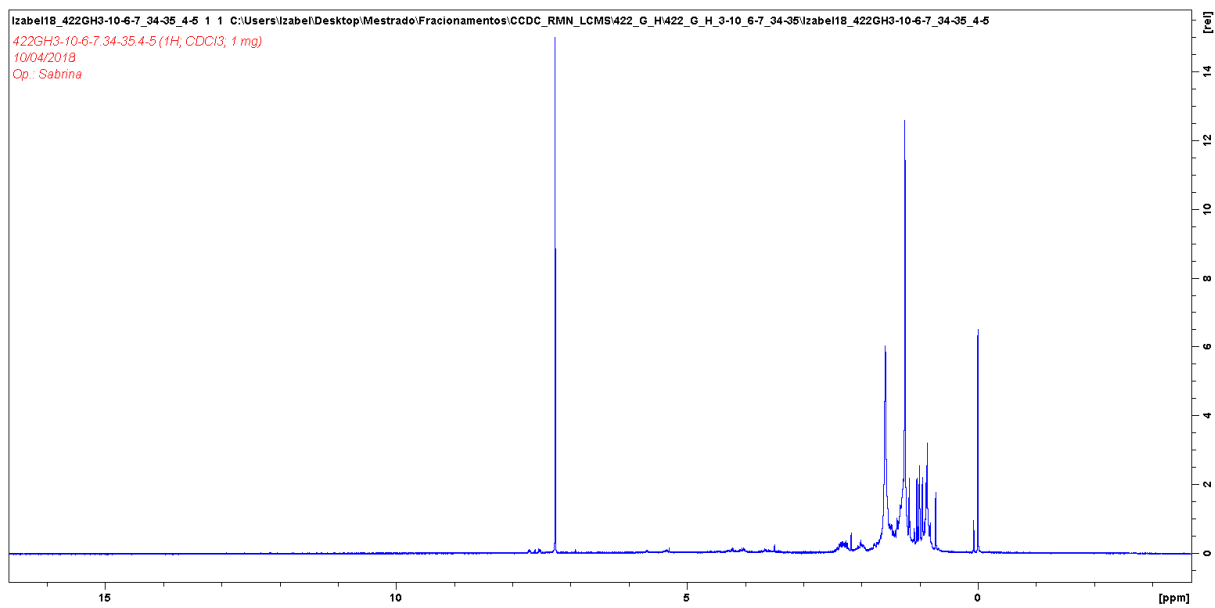


Figura 25. Espectro de RMN de ¹H da substância I, friedelina (CDCl₃, 300MHz)

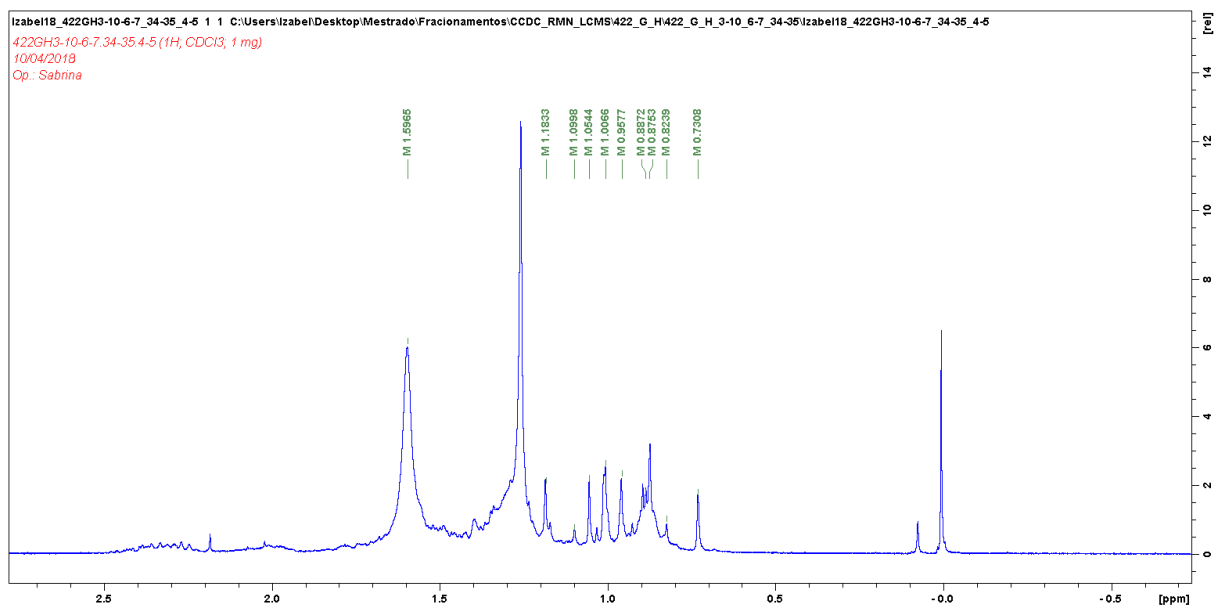


Figura 26. Expansão na região de 0,0 a 2,5 ppm do espectro de RMN de ¹H da substância I, friedelina (CDCl₃, 300MHz)

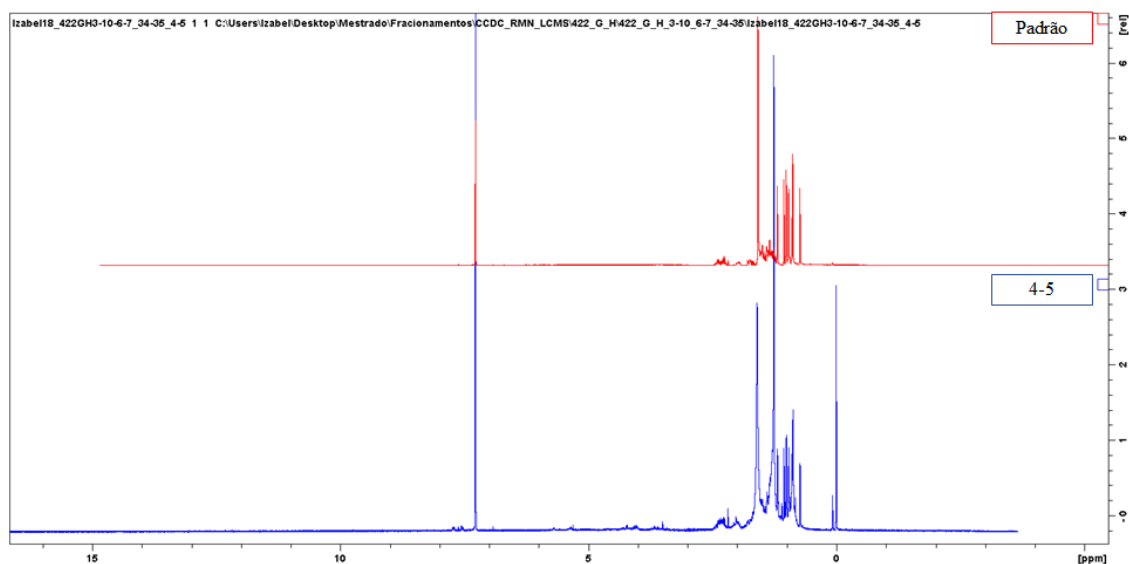


Figura 27. Comparação da fração 4-5 com um padrão da substância I, friedelina (CDCl₃, 300MHz)

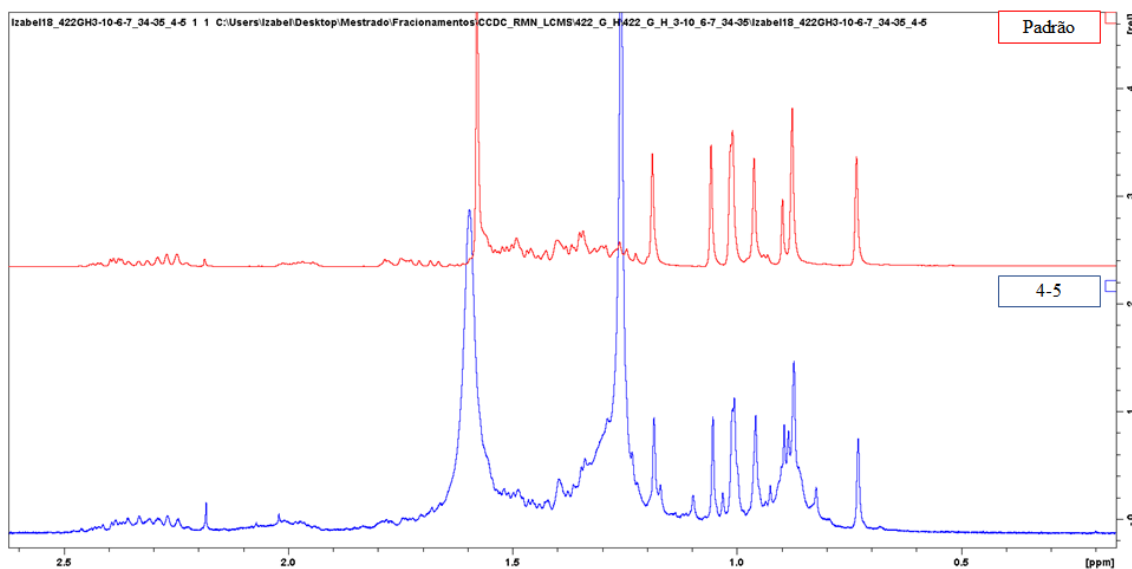


Figura 28. Comparação da fração 4-5 com um padrão, ampliação da região das metilas, da substância I, friedelina (CDCl₃, 300MHz)

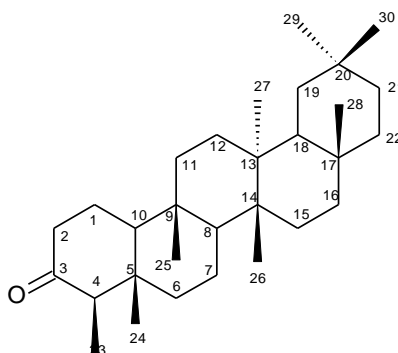


Figura 29. Estrutura da substância I, friedelina

5.2.2 Identificação da substância II

A fração 1 (5,5 mg) foi obtida do extrato hexânico dos ramos da 1ª coleta, apresentou características de que se tratava de uma mistura das substâncias I e II. Quando reveladas com KOH, revelou uma banda na coloração rosa, característico para a presença de uma quinona.

O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 32) confirmou a presença das duas substâncias, e para a substância dois mostrou dois sinais em δ_{H} 12,16 (*s*, 1H) e 12,32 (*s*, 1H) (Figura 33), referentes a duas hidroxilas queladas por ligações de hidrogênio, comumente encontradas em esqueletos de antraquinonas, e em δ_{H} 2,45 um sinal integrado para três hidrogênios referentes a uma metila, característica para metila ligada a anel aromático.

Apresentou também os sinais em δ_{H} 4,65 (*d*, $J = 6,5$ Hz, 2H) e em δ_{H} 5,48 (*m*, 1H), e dois sinais em δ_{H} 1,82 (*s*, 3H) e δ_{H} 1,78 (*s*, 3H) (Figura 35), atribuídos aos hidrogênios metilênicos, olefínicos e a duas metilas respectivamente, pertencentes ao grupo *O*-dimetilalila.

Na região dos aromáticos (Figura 34), observaram-se os sinais: dois duplos dupletos e dois dupletos, todos com integrais para um hidrogênio cada em δ_{H} 7,63 (*dd*, $J = 1,6; 0,8$ Hz, H-4), δ_{H} 7,38 (*d*, $J = 2,6$ Hz, H-5), δ_{H} 7,08 (*dd*, $J = 1,6; 0,8$ Hz, H-2), δ_{H} 6,68 (*d*, $J = 2,6$ Hz, H-7).

O espectro de hidrogênio da substância II foi comparado com um padrão (Figura 36), já obtida em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa com as folhas de *V. japuraensis*.

Os dados de RMN de ^1H permitem sugerir que a substância II se trata da antraquinona conhecida como madagascina (Figura 31). Este é primeiro relato do isolamento de madagascina na madeira de *V. japuraensis*. Na literatura há relatos da presença desta antraquinona em outras espécies do gênero *Vismia* como em estudos realizados por Nagem e Oliveira (1997) que isolou de *V. parviflora*.

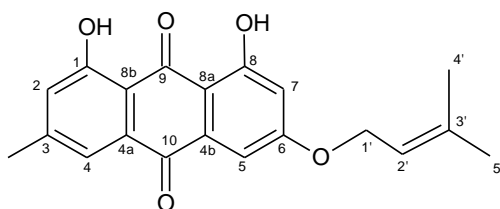


Figura 30. Estrutura da substância II, madagascina

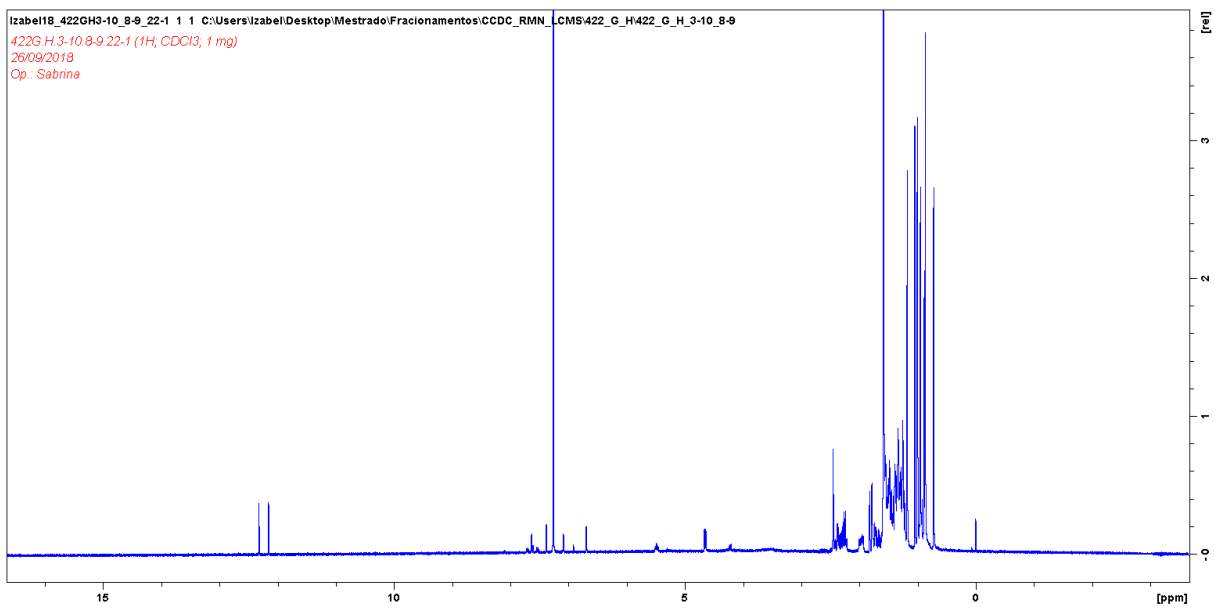


Figura 31. Espectro de RMN de ¹H da mistura das substâncias I e II, friedelina e madagascina (CDCl₃, 300MHz)

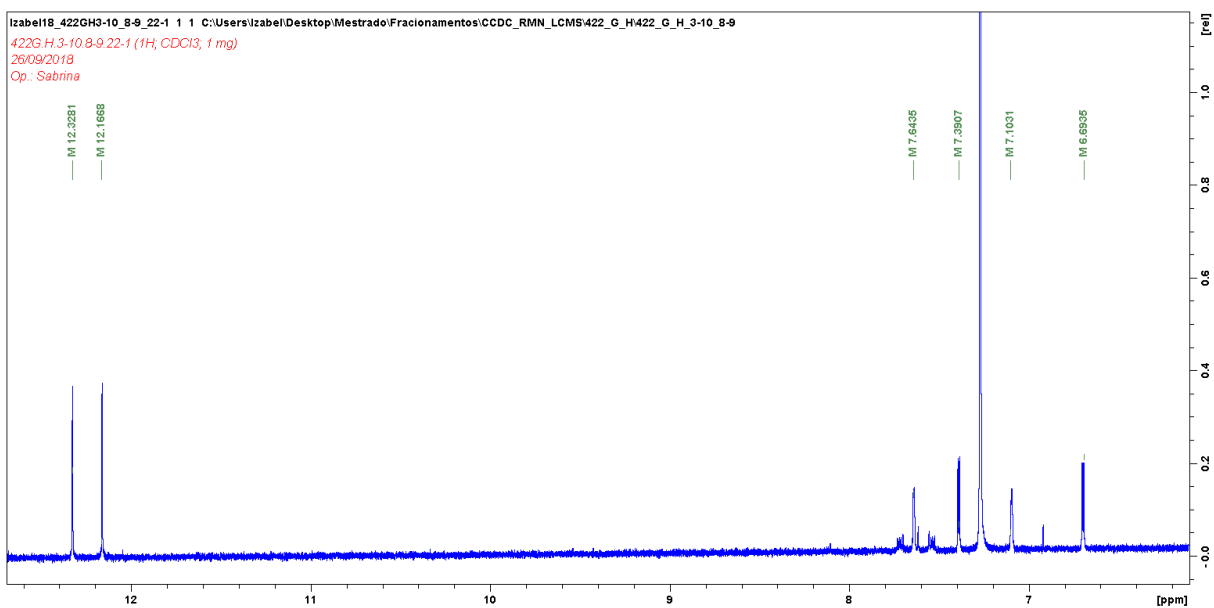


Figura 32. Expansão da região de (6,5 a 13 ppm) do espectro de RMN de ¹H da substância II, madagascina (CDCl₃, 300MHz)

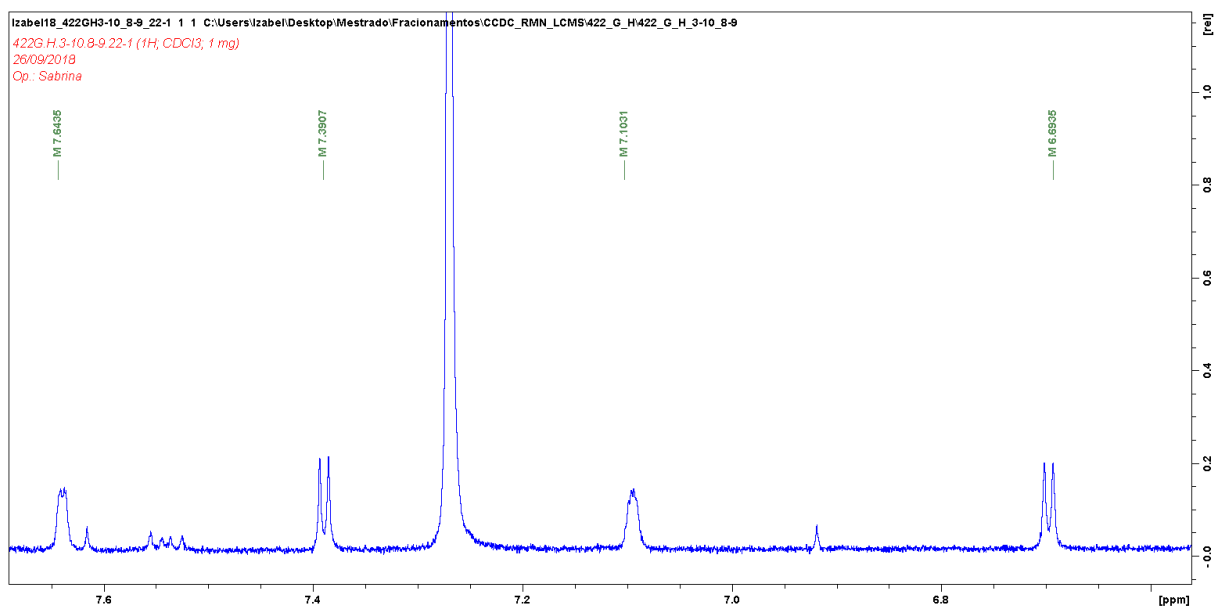


Figura 33. Expansão da região dos aromáticos (6,5 a 7,7 ppm) do espectro de RMN de ¹H da substância II, madagascina (CDCl₃, 300MHz)

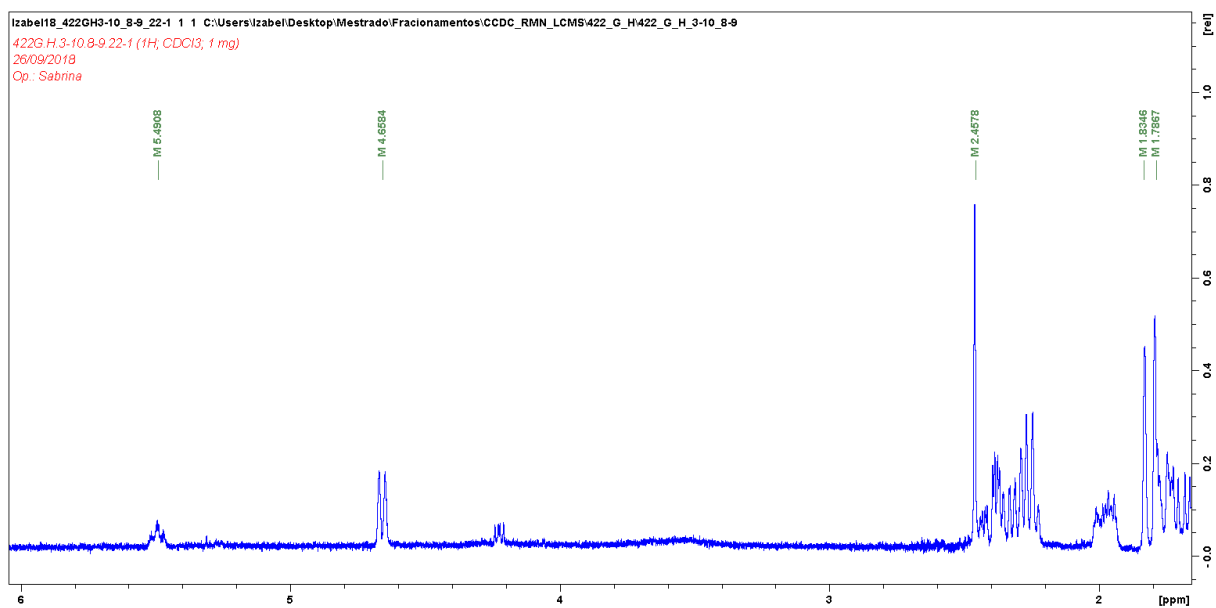


Figura 34. Expansão da região dos aromáticos (6,5 a 7,7 ppm) do espectro de RMN de ¹H da substância II, madagascina (CDCl₃, 300MHz)

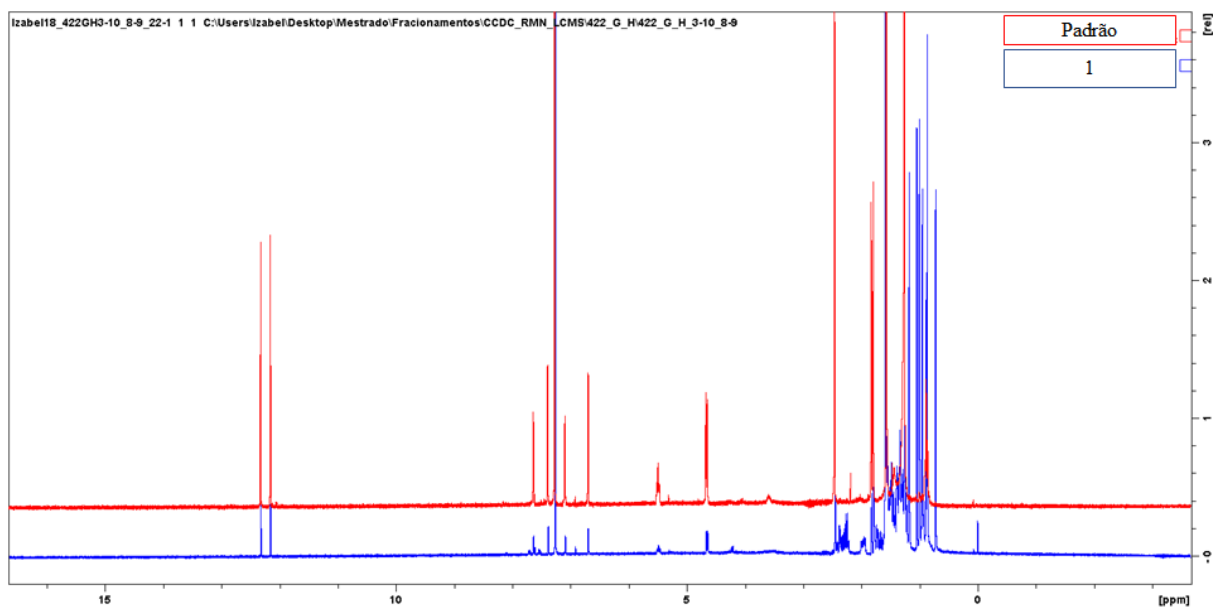


Figura 35. Comparação da fração 1 com um padrão da substância II, madagascina (CDCl₃, 300MHz)

5.2.3 Identificação da substância III e IV

A fração 1 (3,7 mg) foi obtida do extrato hexânico dos ramos da 1^a coleta, apresentou características de que se tratava de uma mistura das substâncias III e IV. Quando reveladas com KOH, revelou duas bandas na coloração rosa, característico para a presença de uma quinona.

O seu espectro de RMN de ¹H (Figura 38) mostrou quatro sinais em δ_H 12,33 (s, 1H, OH) e 12,16 (s, 1H, OH), atribuído a substância III e os sinais em δ_H 12,99 (s, 1H, OH) e 12,13 (s, 1H, OH), atribuído a substância IV, referentes a quatro hidroxilas queladas a grupos carbonilas (C=O), levando a sugerir que as substâncias III e IV se tratavam de duas antraquinonas.

Na região dos aromáticos (Figura 39), observou-se 4 sinais atribuídos a substância III sendo eles, dois dupletos e dois duplos dupletos, todos com integrais para um hidrogênio cada δ_H 7,64 (dd, $J = 1,58; 0,93$ Hz, H-4), δ_H 7,39 (d, $J = 2,51$ Hz, H-5), δ_H 7,09 (dd, $J = 1,4; 0,93$ Hz, H-2); δ_H 6,70 (d, $J = 2,51$ Hz, H-7), observou-se também 3 sinais atribuídos a substância IV, sendo eles: dois duplos dupletos e 1 simpleto largo, todos com integrais para um hidrogênio cada δ_H 7,61 (dd, $J = 1,58; 0,37$ Hz, H-4), δ_H 7,43 (sl, 1H, H-5), δ_H 7,12 (dd, $J = 1,58; 0,84$ Hz, H-2), referentes a acoplamentos na posição *meta*, para ambas as moléculas.

Em δ_H 2,46 (s, 3H), um sinal integrado para três hidrogênios referentes a uma metila, característica para metila ligada a anel aromático. E em δ_H 3,65 (s, 3H) um sinal também com integral para três hidrogênios referentes a um grupo metoxila (Figura 40), para a substância III.

Em δ_H 2,49 (s, 3H), um sinal integrado para três hidrogênios referentes a uma metila, característica para metila ligada a anel aromático. E em δ_H 4,06 (s, 3H) um sinal também com integral para três hidrogênios referentes a um grupo metoxila atribuídos a substância IV.

Apresentou também dois duplos duplete na região de δ_H 6,96 (dd, $J = 16,30; 7,17$ Hz, 1H), e δ_H 6,65 (dd, $J = 16,21; 1,21$ Hz, 1H) atribuídos a hidrogênios olefínicos na posição *trans* do grupo dimetilalila, e um sinal δ_H 2,52 (m, 1H) atribuído a um hidrogênio metínico e dois sinais em δ_H 1,15 (s, 3H) e δ_H 1,13 (s, 3H), referentes aos deslocamentos químicos dos hidrogênios das metilas do grupo dimetilalila, pertencentes a substância IV.

O espectro de hidrogênio das substâncias III e IV foi comparado com os padrões (Figuras 41 e 42) já obtidos em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa com as folhas de *V. japurensis*

Os dados de RMN de 1H , foram comparados com a literatura (Ottobelli *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012; Simetanina *et al.* 2007) permitindo assim sugerir que a substância III e IV se tratavam das antraquinonas conhecidas como fisciona e vismiaquinona A (Figura 37). Este é o primeiro relato do isolamento de fisciona nos ramos de *V. japurensis* e *V. sandwithii*. E o primeiro relato de vismiaquinona A nos ramos de *V. japurensis*. Na literatura há relatos do isolamento de fisciona em outras espécies de *Vismia* como em: *V. cayennensis* (Miraglia *et al.* 1981; Pinheiro *et al.* 1984). Miraglia e colaboradores (1981), isolaram vismiaquinona A da madeira e Pinheiro e colaboradores (1984), isolaram dos frutos de *V. japurensis*. Na literatura há relatos do isolamento de vismiaquinona A em outras espécies do gênero *Vismia*, como nos estudos realizados por Lins e colaboradores (2016), com *V. guianensis* e Gonçalves e Mors (1981), também relataram a presença desta antraquinona em estudos realizados com a espécie *V. reichardtiana*.

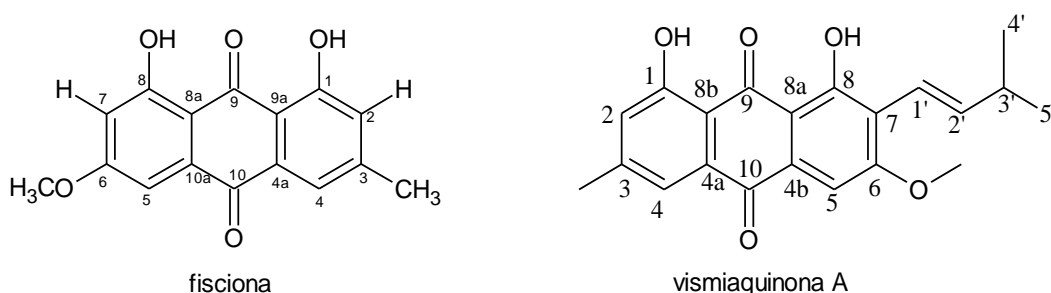


Figura 36. Estrutura das substâncias fisciona e vismiaquinona A (substância III e IV)

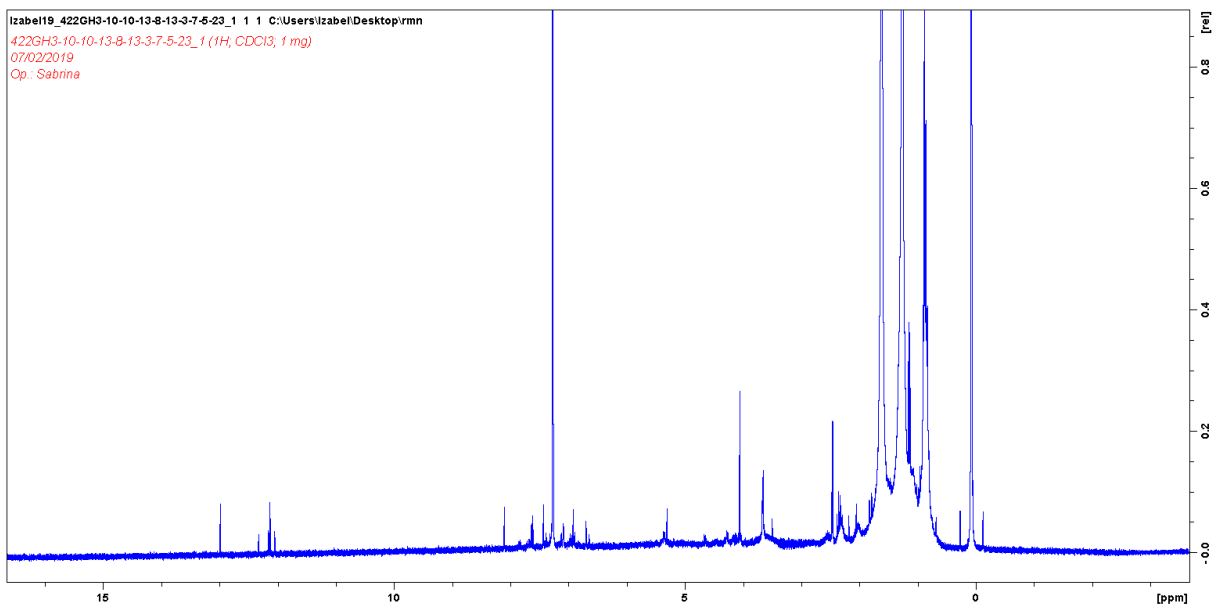


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H da substância II e IV, fissiona e vismiaquinona A (CDCl_3 , 300MHz)

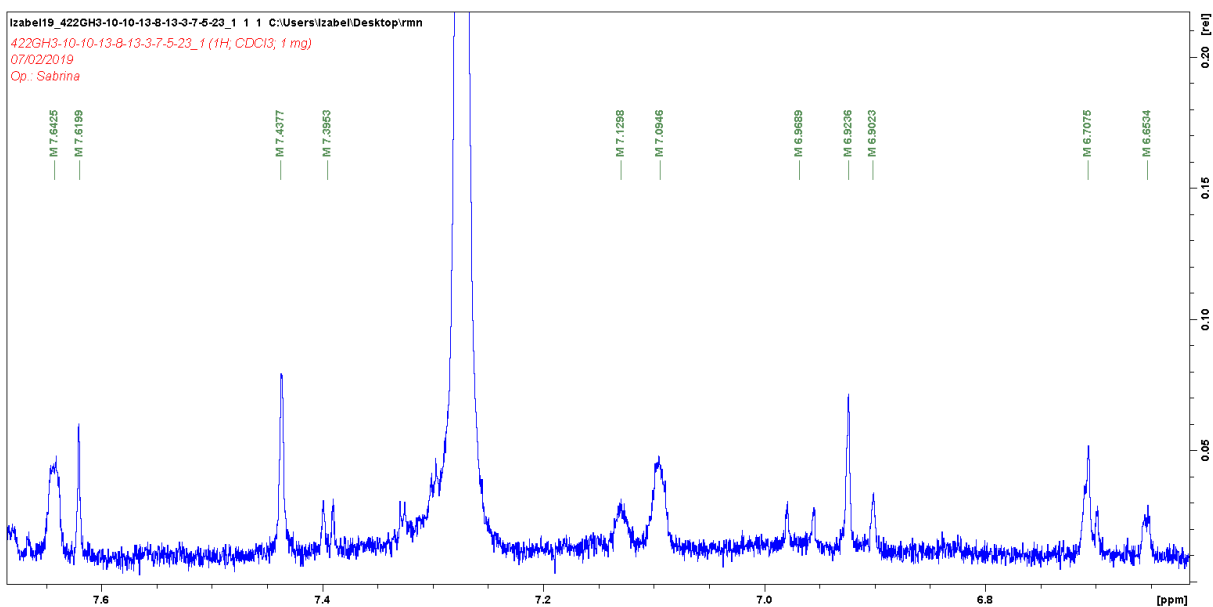


Figura 38. Expansões da região de 6,8 a 7,7 ppm) do espectro de RMN de ^1H das substâncias III e IV, fissiona e vismiaquinona A (CDCl_3 , 300MHz)

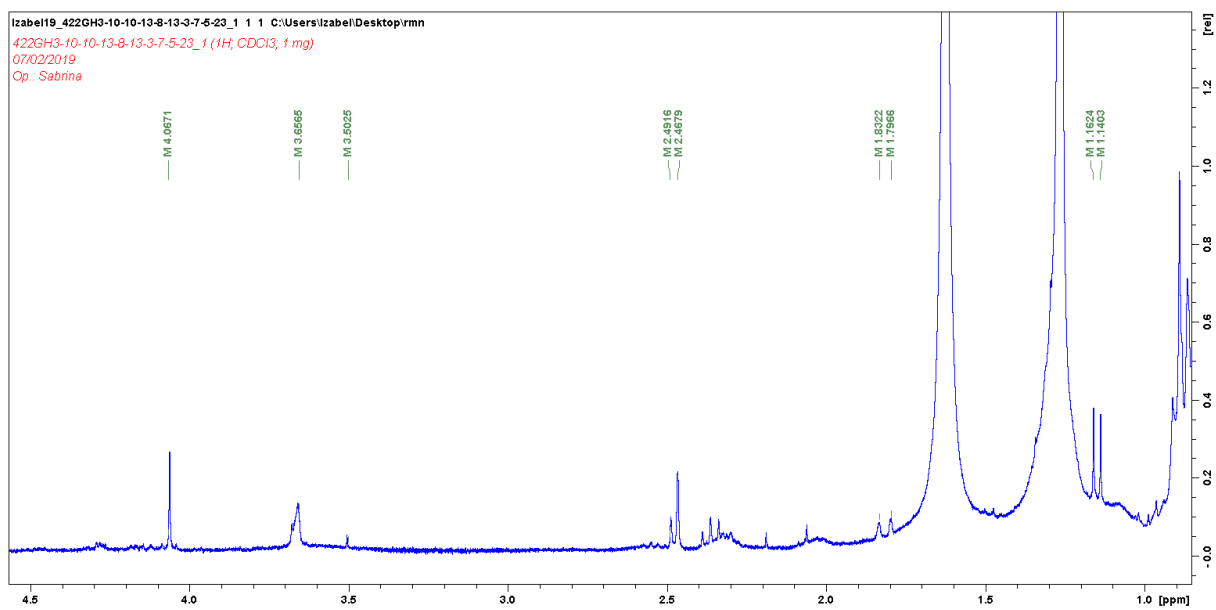


Figura 39. Expansão da região de 1,0 a 4,5 ppm do espectro de RMN de ^1H das substâncias III e IV, fisciona e vismiaquinona A (CDCl_3 , 300MHz)

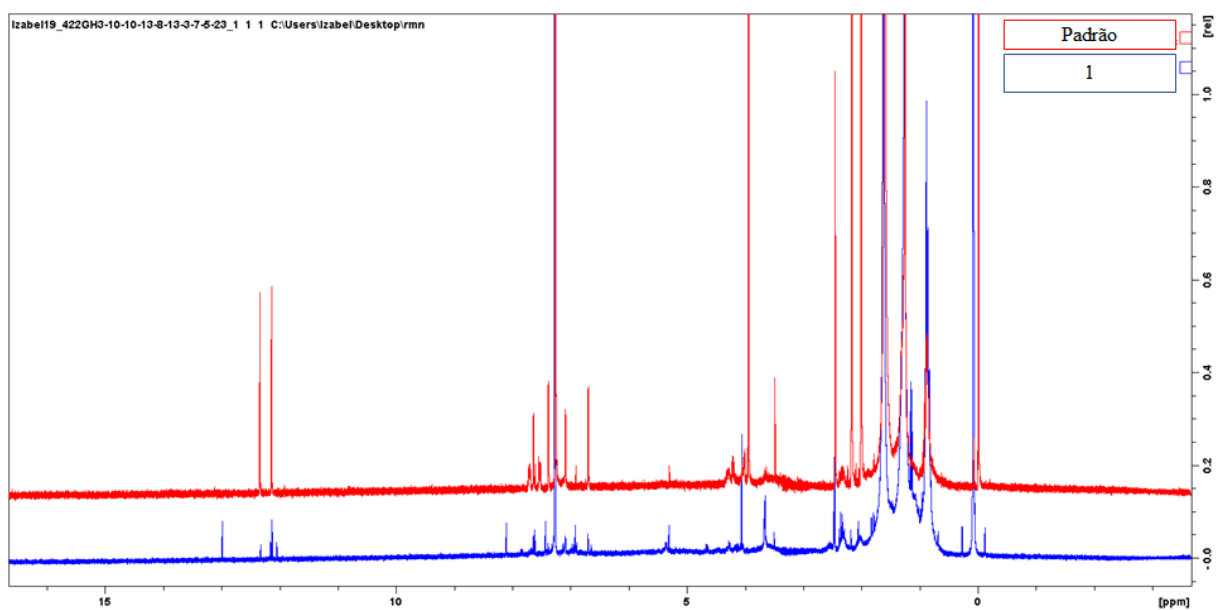


Figura 40. Comparação da fração 1 com um padrão da substância III, fisciona (CDCl_3 , 300MHz)

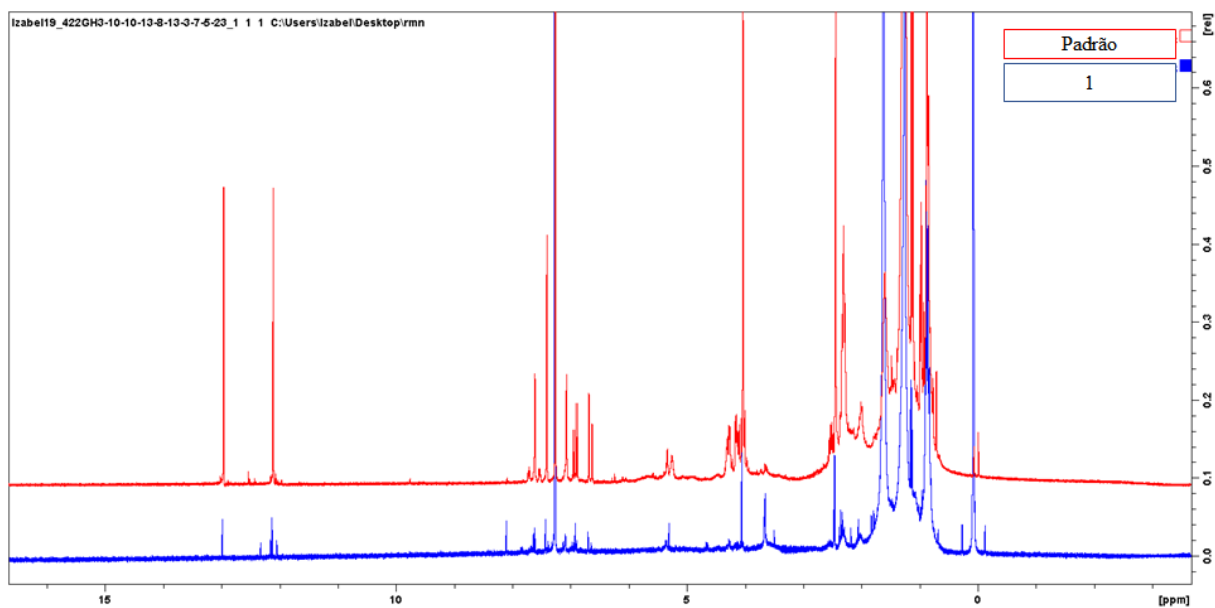


Figura 41. Comparação da fração 1 com um padrão da substância IV, vismiaquinona A (CDCl₃, 300MHz)

5.2.4 Identificação da substância V

A fração 11-13 (11,4 mg) obtida do extrato hexânico dos ramos de *V. sandwithii*, apresentou-se na forma de cristais brancos, e quando revelada com anisaldeído verificou-se a coloração amarela, com $R_f = 0,44$, quando eluída com Hex/DCM 1:1.

O seu espectro de RMN de ¹H (Figura 43) mostrou a presença de 8 sinais na região de δ_H 0,86 a 1,17, sendo 7 simpletos em δ_H 0,86; 0,94; 0,95; 0,96; 0,99; 1,0; 1,7, todos com integral para 3 hidrogênios, e um duplete em δ_H 0,97 (d , $J = 7,73$ Hz, 3H) totalizando 8 metilas de um triterpeno (Figura 44). Também foi observado sinais na região de δ_H 1,21 a 2,10 referentes a hidrogênios metilênicos e metínicos da molécula. Mostrou um sinal em δ_H 3,73 (q , $J = 2,42$ e Hz, 1H), correspondendo a um hidrogênio carbinólico. A ausência de ligações duplas na região entre δ_H 5,0 e 6,0, foi um indicativo da presença de um triterpeno de esqueleto friedelano.

O espectro de hidrogênio da substância foi comparado com um padrão (Figuras 45 e 46). Comparando os dados com a literatura foi possível confirmar os deslocamentos químicos identificando a substância V como o triterpeno friedelanol (Figura 47) (Salazar *et al.* 2000). Este é o primeiro relato deste triterpeno nos ramos de *V. japurensis* e *V. sandwithii*, sendo que Miraglia e colaboradores (1981), isolaram este triterpeno da madeira de *V. japurensis*.

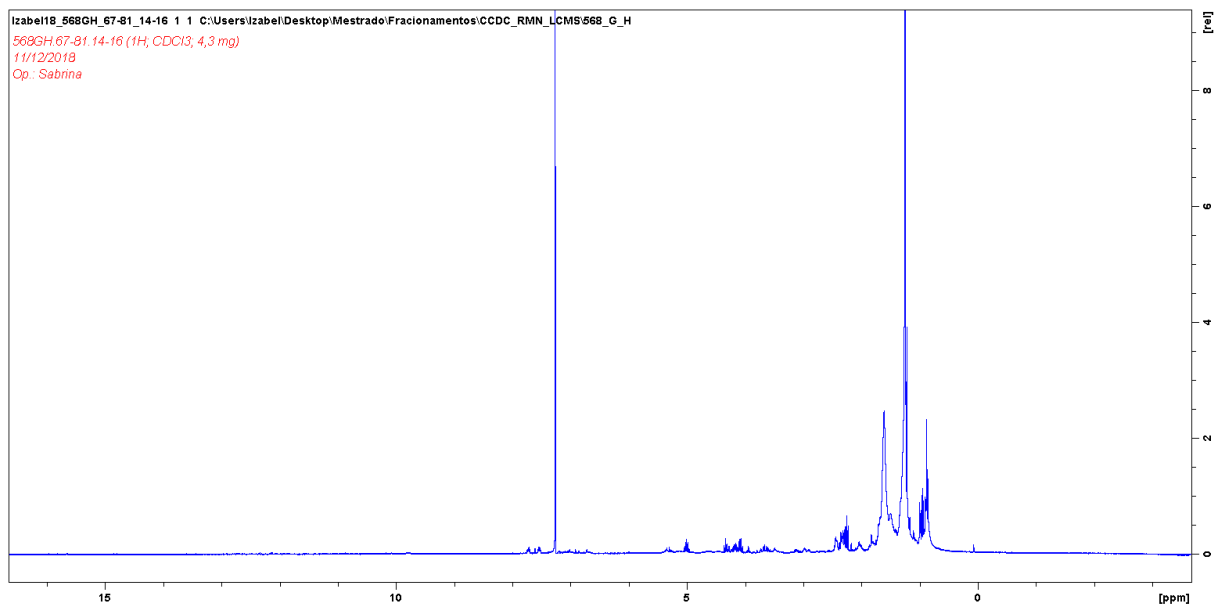


Figura 42. Espectro de RMN de ¹H da substância V, friedelanol (CDCl₃, 300MHz)

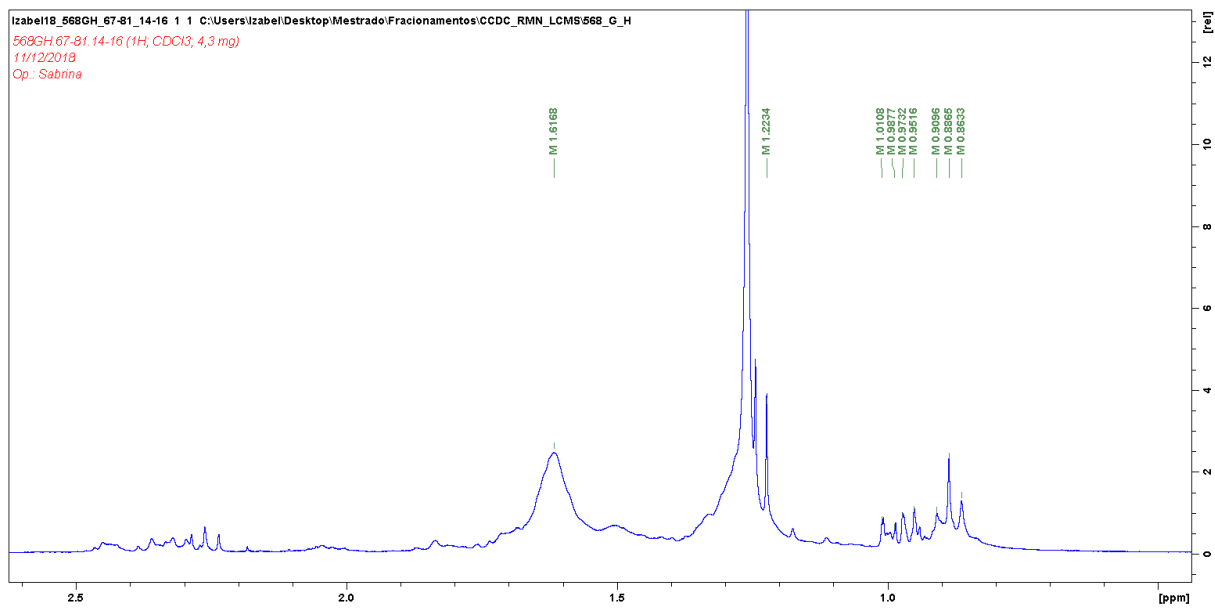


Figura 43. Expansão na região de 0,0 a 2,5 ppm do espectro de RMN de ¹H da substância V, friedelanol (CDCl₃, 300MHz)

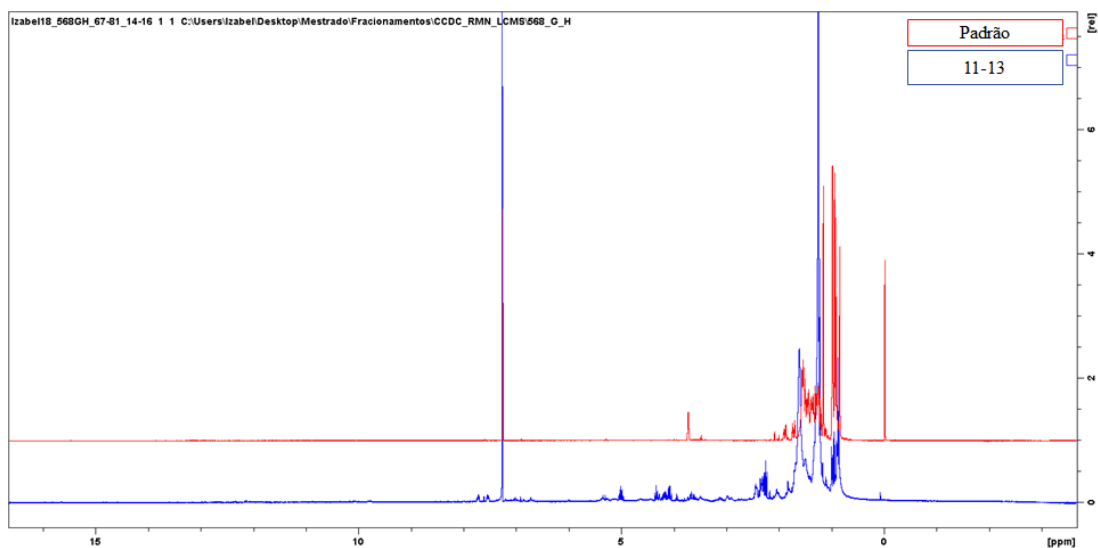


Figura 44. Comparação da fração 11-13 com um padrão da substância V, friedelanol (CDCl₃, 300MHz)

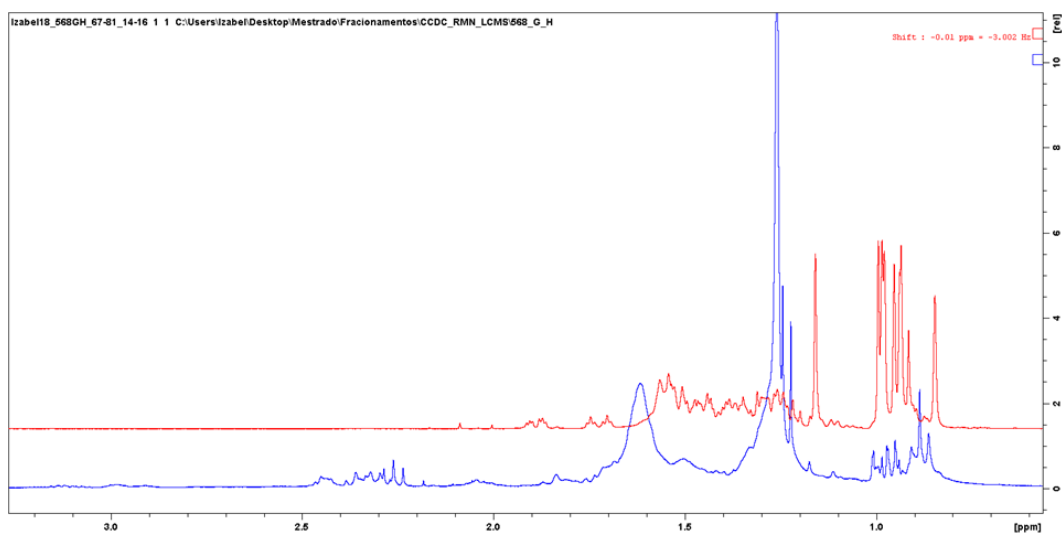


Figura 45. Comparação da fração 11-13 com um padrão, ampliação da região das metilas, da substância V, friedelanol (CDCl₃, 300MHz)

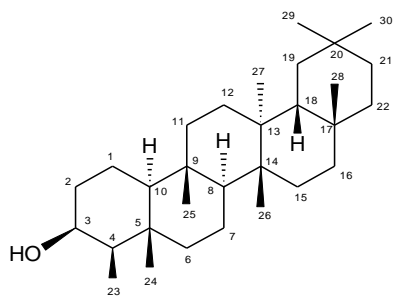


Figura 46. Estrutura da substância V, friedelanol

5.3 Avaliação da atividade química e biológica

5.3.1 Atividade de toxicidade frente *Artemia salina*

O extrato hexânico dos ramos da primeira coleta, apresentaram-se tóxicos com uma taxa de mortalidade de 96% na concentração de 1000 µg/mL. Na terceira coleta o extrato hexânico apresentou uma taxa de mortalidade de 63% e o extrato metanólico mostrou uma alta toxicidade matando 83% dos indivíduos (Tabela 22). Porém, durante os procedimentos não foi possível inferir as CL₅₀ para os mesmos. Meyer e colaboradores (1982) estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL₅₀, apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, desde então, considera-se que quando são verificados valores acima de 70% de toxicidade na concentração de 1000 µg/mL, estes são considerados tóxicos. Assim, os extratos hexânico da 1ª coleta e metanólico da 3ª coleta devem ser submetidos a análise em diferentes concentrações para determinação da CL₅₀.

Tabela 19. Teste de toxicidade de extratos dos ramos de *V. japorensis* frente a indivíduos de *Artemia salina*

Coleta	Amostras	Concentração: 1000 µg/mL
1 ^a	HEX	96%
	MeOH	6%
	H ₂ O	3%
3 ^a	HEX	63%
	MeOH	83%
	H ₂ O	3%

Legenda: hexano (HEX), metanol (MeOH) e água (H₂O)

5.3.2 Atividade antioxidante

Os extratos avaliados não foram considerados antioxidante, pois foram observadas equivalências com o ácido ascórbico acima de 8 (Tabela 21) tanto para o método que usava DPPH como para ferro/fenantrolina como agentes oxidantes.

Conforme Martins e colaboradores (2014), os resultados da atividade antioxidante são expressos pela equivalência com o ácido ascórbico, que permite correlacionar a resposta obtida do extrato vegetal com antioxidante padrão e quanto mais próximo de 1,0 mais semelhante seria

a capacidade da amostra frente ao ácido ascórbico, sendo assim, os extratos analisados não apresentaram potencial antioxidante.

Tabela 20. Resultado da avaliação antioxidante dos extratos brutos das folhas de *V. japuraensis*

Extrato	Método usando DPPH•			Método usando Fe ³⁺		
	Valores médios			Valores médios		
	[DABS ₅₁₇]	[AA] _{eq}	Equiv.	[Fe ²⁺]	[AA] _{eq}	Equiv.
1-RVJ- H	0,047	0,401	12,539	0,174	63,670	
1-RVJ-MeOH		0,575	8,730	0,562	8,958	

Legenda: [DABS₅₁₇]: Absorbância; [AA]_{eq}: Ácido- ascórbico; [Fe²⁺]: Ferro/Fenantrolina

5.3.3 Atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana (tabela 21) dos extratos hexânicos, demonstrou que, das 9 bactérias testadas 6 gram-negativas foram sensíveis, destacando as cepas que foram inibidas na concentração de 500µg/mL sendo elas; *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Edwardsiella tarda* (ATCC 15945). A bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* foi sensível somente ao extrato hexânico da primeira coleta na concentração de 1000 µg/mL. Também foi possível observar que as bactérias *Aeromonas hydrophila* (IOC/FDA11036) e *Salmonella enterica* (ATCC 13076) não apresentaram sensibilidade nos extratos testados.

Esta atividade observada nos extratos hexânicos para as duas espécies, pode ser atribuída a presença de antraquinonas e triterpenos, pois substâncias pertencentes a estas classes químicas apresentam na literatura uma vasta quantidade de estudos que atribuem atividade antibacteriana para elas como em estudos realizados com outras espécies do gênero *Vismia* (Kuetze *et al.* 2007; Tamokou *et al.* 2009; Sufredini *et al.* 2006).

Tabela 21. Concentração Inibitória Mínima – CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos hexânicos dos ramos de *V. japurensis* e *V. sandwithii*

Bactérias	Extratos hexânicos dos ramos					
	1ª coleta <i>Vismia japurensis</i>		2ª coleta <i>Vismia japurensis</i>		1ª coleta <i>Vismia sandwithii</i>	
	1000 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+

4.4.3 Atividade antiangiogênica

Quanto à avaliação da atividade antiangiogênica do extrato hexânico dos ramos da primeira coleta apresentou um efeito promissor, pois na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ o percentual foi de aproximadamente 60% de inibição de novos vasos sanguíneos. Na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ apresentou uma porcentagem de aproximadamente 80% de inibição, enquanto na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ que apresentou um efeito considerado promissor de aproximadamente 90% de inibição quando comparado ao controle negativo. (Figura 48). Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

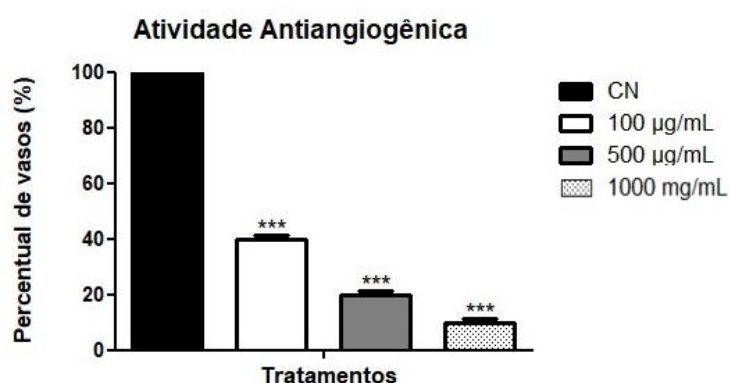
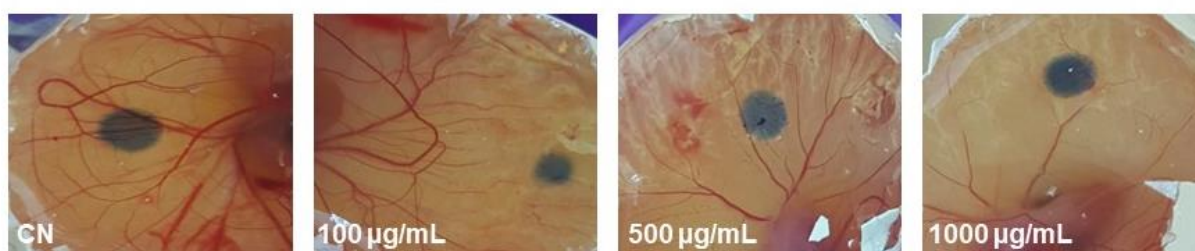


Figura 47. Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato dos ramos da 1ª coleta de *V. japurensis*

A atividade antiangiogênica do extrato hexânico dos ramos da terceira coleta de *V. japurensis*, apresentou um percentual de aproximadamente 60% de inibição de novos vasos sanguíneos na concentração de 100 µg/mL, em comparação ao controle. Na concentração de 500 µg/mL apresentou um percentual de aproximadamente 80% da inibição e na concentração de 1000 µg/mL aproximadamente 97% na inibição quando comparado ao controle negativo. (Figura 49). Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN). Com base nos resultados observados, concluímos que os dois extratos hexânicos das duas coletas de *V. japurensis* são potenciais agentes inibidores da angiogênese.

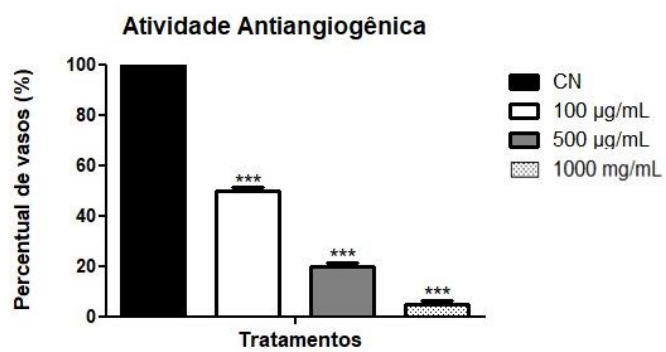
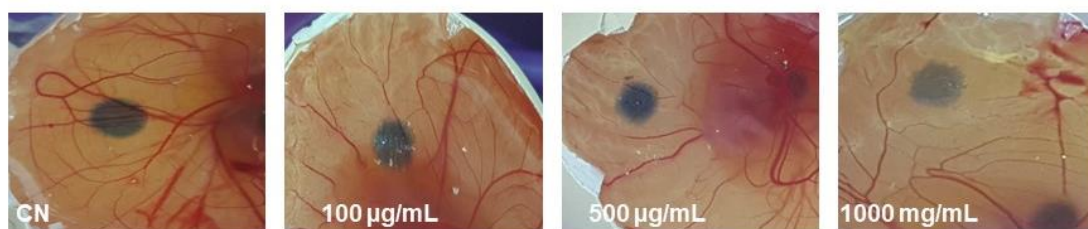


Figura 48. Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato dos ramos da 3^a coleta de *V. japurensis*

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento químico e biológico para o gênero *Vismia*. Foi possível verificar que os extratos hexânicos das três espécies são ricos em antraquinonas e terpenos, e observar que a presença destes não é alterada mesmo com as diferenças de localidade das espécies, dados que corroboram com a literatura. Destacando-se principalmente que este é um estudo químico inédito com a espécie *V. sandwithii*, da qual foi isolado o triterpeno friedelanol e a antraquinona fisciona e este é o primeiro relato de atividade antibacteriana para o extrato hexânico desta espécie. E para a espécie *V. japurensis* este é o primeiro estudo químico e biológico realizado com os ramos, da qual foi isolado o triterpeno friedelina e as antraquinonas madagascina, fisciona e vismiaquinona A, assim como as atividades biológicas antiangiogênica, antibacteriana e de toxicidade frente *A. salina* estão sendo descritas pela primeira vez na literatura para a espécie *V. japurensis*.

7. REFERÊNCIAS

- Almeida, R. 2001. Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*, v. 8, n. 4, p. 310–322.
- Álvarez, R.; Jimenz, J.G.; Posada, C.M.A.; Rosano, B.A.; Jesus, H.; Gil, H.; Garcia, C.M.P.; Durango, D.L.R. 2008. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (Guttiferae). *Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*. v. 15, n. 1, p. 165-172.
- Amaral, I.L.; Soares, M.L.C.; Nogueira, C.L.B.; Matos, F.D.A. 2014. *Plantas colonizadoras de áreas desflorestadas para atividades petrolíferas*. Manaus: Editora INPA, 136p.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of the flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 16, p. 105-121.
- Barreiro, E.J.; Manssour, C.A.M. 2008. *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, Art Med Editora Ltda: Porto Alegre, p. 71-135.
- Barreiro, E.J.; Bolzani, V.S.; 2009. Biodiversidade: Fonte Potencial para descoberta de Fármacos. *Química Nova*, v.32, n.3, p. 679-688.
- Béjaoui, A.; Ben-Salem, I.; Rokbeni, N.; M'rabet, Y.; Boussaid, M.; Boulila, A. 2017. Bioactive compounds from *Hypericum humifusum* and *Hypericum perforatum*: inhibition potential of polyphenols with acetylcholinesterase and key enzymes linked to type-2 diabetes. *Pharmaceutical Biology*, v. 55, n. 1, p. 906–911.
- Bianchi, M.L.P.; Antunes, L.M.G. 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição, Campinas*, v. 12, n.2, p. 123-130.
- Bieri, S; Brachet, A.; Veuthey, J.; Christen, P. 2006. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 103, n.3, p. 439–447.
- Bittrich, V.; Trad, R.J.; Cabral, F.N.; Nascimento-Jr, J. E.; Souza, V.C. 2015. Hypericaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB133>). Acesso em: 10/07/2017.
- Bou, D.D.; Tempone, A. G.; Pinto, E.G.; Lago, J. H.G.; Sartorelli, P. 2014. Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmanial* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. *Phytomedicine*, v. 21, n.5, p. 676-681.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E., Berset, C, 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, v.28, p. 25-30.

- Braz Filho, R. 2010. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 229-239.
- Broinizi *et al.* 2007. Avaliação da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos Naturalmente Presentes em Subprodutos do Pseudofruto de Caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, 27(4): 902-908.
- Calixto Júnior, J. T.; Morais, S.M.; Vieira, L.G.; Alexandre, J.B.; Costa, M.S.; Morais-Braga, M.F.B.; Júnior, J.E.G.L.; Silva, M.M.O.; Barros, L.M.; Coutinho, H.D.M. 2015. Phenolic composition and anticholinesterase, antioxidant, antifungal and antibiotic modulatory activities of *Prockia crucis* (Salicaceae) extracts collected in the Caatinga biome of Ceará State, Brazil. *European Journal of Integrative Medicine*, v.7, n. 5, p. 547–555.
- Carvalho, C. A.; Matta, S.L.P.; Melo, F.C.S.A.; Andrade, D.C.F.; Carvalho, L.M.; Nascimento, P.C.; Silva, M.B.; Rosa, M.B. 2009. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers-Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 6(1) 51-58.
- Cassinelli, G.; Geroni, C.; Botta, B. Monache, G.D.; Monache, F. D. 1986. Cytotoxic and antitumor activity of vismiones isolated from *Vismieae*. *Journal of Natural Products*, n.49, p. 929-931.
- Chen, J.Y.; Xie, Y.F.; Zhou, T.X.; Qin, G.W. 2012. Chemical constituents of *Menispermum dauricum*. *Chinese Journal of Natural medicines*, v. 10, n. 4, p. 292-294.
- Chisté, R.C.; Ribeiro, A.B.; Berto, A.; Freitas, M.; Visentainer, J.V.; Fernandes, E. 2014. *Vismia cauliflora* extracts: bioactive compounds and the in vitro scavenging capacity against reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 75, p.16.
- Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. 2012. Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão. NCCLS/CLSI. USA. *Approved Standard*. M2-A8, v. 23, n. 1.
- Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. 2006. Fundamentos de Cromatografia. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, p. 962.
- Conforti, F. 2002. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetriifolium* turra aerial part. *Fitoterapia*, v. 73, n. 6, p. 479-8.
- Daudt, R.; Von Poser, G.L.; Neves, G.; Rates, S.M.K. 2000. Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from South Brasil. *Phytotherapy Research*, v.14, n. 5, p. 344-346.

- Degáspari *et. al.* 2004. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. Visão Acadêmica, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33- 40.
- Distasi L.C.; Hiruma-Lima, C. A. 2002. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª ed. *Revista e Ampliada*. São Paulo: Editora Unesp, p. 604.
- Duarte, M.C.T. 2006 Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. *Multiciência: construindo a história dos produtos naturais*, n. 7, 2.
- Dzoyem, J.P.; Lannang, A.M.; Fouotsa, H.; Mbazoa, C.D.; Nkengfack, A.E.; Sewald, N.; Eloff, J.N. 2015. Anti-inflammatory activity of benzophenone and xanthone derivatives isolated from *Garcinia* (Clusiaceae) species. *Phytochemistry Letters*, v. 14, p. 153-158.
- Engel, A.S. 2007. Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. *Journal of Cave and Karst Studies*, v.69, p.187–206.
- Estork, D.M.; Gusmão, D.F.; Paciencia, M.L.B.; Frana, S.A.; Díaz, I.E.C.; Varella, A.D.; Younes, R.N.; Reis, L.F.L.; Montero, E.F.S.; Bernardi, M.M.; Suffredini, I.B. 2016. Erratum to “Casinga-cheirosa organic extract impairment over Balb-c male mice behavioral phenotype”. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 26, n. 6, p. 797–7.
- Ewan, J. 1962. Synopsis of the South American species of *Vismia* (Guttiferae). *Contributions from the United States National Herbarium*, v. 35, p. 293–377.
- Felipe, K.B.; Kwiecinski, M.R.; Da Silva, F.O.; Bücker, N.F.; Farias, M.S.; Castro, L.S.E.P.W.; De Souza, G.V.M.A.; Motta, N.S.; Correia, J.F.G.; Rossi, M.H.; Pedrosa, R.C. 2014. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 155, n.3, p. 1492–1499.
- Ferreira, P.M.P.; Bezerra, D. P.; Silva, J.N.; Costa, M.P.; Ferreira, J.R.O.; Alencar, N.M.N.; Figueiredo, I.S.T.; Cavalheiro, A.J.; Machado, C.M.L.; Chammas, R.; Alves, A.P.N.N.; Moraes, M.O.; Pessoa, C. 2016. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 186, p. 270–279.
- Ferreira, R. O.; Carvalho, M. G.; Silva, T. M. S. 2012. Ocorrência de biflavonoides em Clusiaceae: aspectos químicos e farmacológicos. *Química Nova*, v. 35, n. 11, p. 2271–2277.
- François, G.; Steenackers, T.; Assis, L.A.; Seteglich, W 1999. Vismione H and structurally related anthranoid compounds of natural and synthetic origin as promising drugs against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: structure-activity relationships. *Parasitology Research*, v.85, n.7, p.582-588.

- Giordani, R. B.; Pagliosa, L. B.; Henriques, A. T.; Zuanazzi, J.A. 2008. Invertigaçao do potencial antioxidante e anticolinesterasico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 2042-2046.
- Gonçalves, J.C.R.; Couliadiati, T.H.; Monteiro, A.L.; Carvalho-Gonçalves, L.C.T.; Oliveira-Valença, W.; De Oliveira, R.N.; Amorim, C. C.; Araújo, D.A.M. 2016. Antitumoral activity of novel 1,4-naphthoquinone derivative involves L-type calcium channel activation in human colorectal cancer cell line. *Journal of Applied Biomedicine*, v. 14, n.3, p. 229–234.
- Gonçalves, M.L. S.; Mors, W.B. 1981. Vismiaquinone, a Δ^1 -isopentenyl substituted anthraquinone from *Vismia reichardtiana*. *Phytochemistry*, v. 20, n.8, 1947-1950.
- Gustafsson, M.H.G.; Bittrich, V.; Stevens, P.F. 2002. Phylogeny of Clusiaceae based on rbc L Sequences. *International Journal of Plant Science*, v. 163, n.6, p. 1045–1054.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J.M, 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. 4a ed. *Oxford University Press*, p. 268-340.
- Hancock, R.E.W. 2005. Mechanisms of Action of Newer Antibiotics for Gram-positive Pathogens. *The Lancet Infectious Diseases*, v.5, p. 209-218.
- Hause, B.; Schaarschmidt, S. 2009. The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms. *Phytochemistry*, v. 70, n. 13-14, p. 1589-1599.
- Huang, D. Ou, B.; Prior, R. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, n. 6, p. 1.841-1.856.
- Hussain, H.; Hussain, J.; Al-Harrasi, A.; Saleem, M.; Green, I.R.; Van Ree, T.; Ghulam, A. 2012. Chemistry and biology of genus *Vismia*. *Pharmaceutical Biology*, v. 50, n. 11, p. 1448–1462.
- Instituto Nacional do Câncer - INCA. 2017. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 3ª ed. rev. e atual. Rio de Janeiro.
- Iwalewa, E. O.; Omisore, N. O.; Adewunmi, C. O.; Gbolade, A. A.; Ademowo, O. G.; Nneji, C.; Agboola, O. I.; Daniuan. O. M. 2008. Anti-protozoan activities of *Harungana madagascariensis* stem bark extract on trichomonads and malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 117, p. 507-511.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J. 2009. Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 612p.
- Kanjoomana, M.; Kuttan, G. 2010. Antiangiogenic Activity of Ursolic Acid. *Integrative Cancer Therapies*, v.9, p. 224-235.

- Kengni, F.; Fodouop, S. P. C.; Tala, D. S.; Djimeli, M. N.; Fokunang, C.; Gatsing, D. 2016. Antityphoid properties and toxicity evaluation of *Harungana madagascariensis* Lam (Hypericaceae) aqueous leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 179, p.137-145.
- Kouam, S. F.; Ngadjui, B. T.; Krohn, K.; Wafo, P.; Ajaz, A.; Choudhary, M. I. 2005. Prenylated anthronoid antioxidants from the stem bark of *Harungana madagascariensis*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 1174-1179.
- Krief, S.; Hladik, C. M.; Haxaire, C. 2005. Ethnomedicinal and bioactive properties of plants ingested by wild chimpanzees in Uganda. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 101, n. 1–3, p. 1–15.
- Kuete, V.; Komguem, J.; Beng, V. P.; Meli, A.L.; Tangmouo, J.G.; Etoa, F.X.; Lontsi, D. 2007. Antimicrobial components of the methanolic extract from the stem bark of *Garcinia smeathmannii* Oliver (Clusiaceae). *South African Journal of Botany*, v. 73, n. 3, p. 347–354
- Kyaw, C.M. 2005. Antibióticos e Quimioterápicos. (www.unb.br/ib/cel/microbiologia/antibioticos/antibioticos.html). Acesso em 12/03/2019.
- Leake, J.R.; Read, D.J. 2017. Chapter 2 – Mycorrhizal symbioses and pedogenesis throughout Earth’s history. In: *Mycorrhizal mediation of soil*, p. 9–33.
- Lenta, B.N.; Vonthron-Sénécheau, C.; Sohd, R.F.; Tantongmo, F.; Ngouela, S.; Kaiser, M.; Tsamo, E.; Anton, R.; Weniger, B. 2007. In vitro antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 8-12.
- Lima, E.O. 2001 Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: Yunes, R. A. e Calixto, J. B. (Eds.) *Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Editora Argós. 523 p.
- Lins, A.C.S.; Agra, M. F.; Conceição, D.C.O.; Pinto, F.C.T.; Camara, C.A.; Silva, T.M.S. 2016. Constituintes químicos e atividade antioxidante das partes aéreas de *Clusia paralicola* (Clusiaceae) e *Vismia guianensis* (Hypericaceae). *Revista Virtual de Química*, v. 8, n.1, 157-168.
- López-Rubalcava, C.; Estrada-Camarena, E. 2016. Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 186, p. 377–391.

- Maack, A.; Pegard, A. 2016. *Populus nigra* (Salicaceae) absolute rich in phenolic acids, phenylpropanoids and flavonoids as a new potent tyrosinase inhibitor. *Fitoterapia*, v. 111, p. 95–101.
- Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga, V. F. Jr.; Grynberg, N. F.; Echevarria, A. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n.3, p.429–438.
- Mahabusarakam, W.; Rattanaburi, S.; Phongpaichit, S.; Kanjana-Opas, A. 2008. Antibacterial and cytotoxic xanthenes from *Cratoxylum cochinchinense*. *Phytochemistry Letters* v. 1, n. 4, p.211-214. DOI: 10.1016/j.phytol. 09.012
- Mahato, S.B.; Kundu, A.P. 1994. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v. 37, p. 1517- 1575.
- Martins, M.V; Shimizu, G.H.; Bittrich, V. 2018. Flora da Reserva Ducke, Estado do Amazonas, Brasil: Hypericaceae. *Hoehnea* 45(3): 361-371.
- Martins, M.V; Shimizu, G.H.; Marinho, L.C. Vogel-Ely, C.2017. Flora do Espírito Santo: Hypericaceae. *Rodriguésia* 68(5): 1595-1605.
- Martins, M.V. 2017. In: Vogel-Ely, C.; Shimizu, G.H.; Martins, M.V.; Marinho, L.C. Hypericaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB84140>). Acesso em: 17/05/2019.
- Martins, D.; Fachin-Espinar, M.T.; Oliveira, T.A.; Lima, C.S.K.; Cavalcanti, M. R.; Teles, R.B.; Nunez, C.V. 2014. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). Asociación Académica de Ciencias Farmacéuticas de Antofagasta (ASOCIFA). *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, v. 6, n. 2, p. 158-171.
- Mcclements, D.J.; Xiao, H. 2017. Designing food structure and composition to enhance nutraceutical bioactivity to support cancer inhibition. *Seminars in Cancer Biology*.
- Meirelles, G. C.; Pippi, B.; Hatwig, C.; De Barros, F.M.C.; De Oliveira, L.F.S.; Von Poser, G.L.; Fuentefria, A. M. 2017. Synergistic antifungal activity of the lipophilic fraction of *Hypericum carinatum* and fluconazole. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 27, n. 1, p. 118–123.
- Melo, E.A.; Maciel, M.I.S.; Lima, V.L.A.G.; Nascimento, R. J.2008. Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44, 193–201. Disponível em (<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v44n2/a05>). Acesso em 23/05/2019.
- Mesquita, R.C.G.; Kalanickes; G. G.; Williamson, G.B. 2001. Alternative successional pathways in the Amazon Basin, *Journal of Ecology*, 89, p. 528–537.

- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putman, J.B.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; Mclaughlin, J.L.; 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v. 45, p. 31-34.
- Michael, A.S.; Thompson, C.G.; Abramovitz, M. 1956. *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. *Science*, v. 123.
- Miraglia, A.D.C.M.; Mesquita, A.A.L.; Varejão, M.J.C.; Gottlieb, O.R.; Gottlieb, H.E. 1981. Anthraquinones from *Vismia* species. *Phytochemistry*, v. 20, n. 8, p. 2041-2042.
- Moulari, B.; Pellequer, Y.; Boutounne, H.; Girard, C.; Chaumont, J.P.; Millet, J.; Muyard, F. 2006. Isolation and in vitro antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanone from the leaves of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 106, n. 2, p. 272-278.
- Muriithi, E.; Bojase-Moleta, G.; Majinda, R.R.T. 2016. Benzophenone derivatives from *Garcinia livingstonei* and their antioxidant activities. *Phytochemistry Letters*, v. 18, p. 29-34.
- Nagem, T.J.; Oliveira, F.F. 1997. Xanthones and other constituents of *Vismia parviflora*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 8, n. 5, p. 505-508.
- Nascimento, G.G.F; Locatelli, J.; Freitas, P.C.D. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, n. 4, p. 247-256.
- Niero, R.; Maheiro, A; Bittencourt, C.M.S.; Biavatti, M.W.; Leite, S.N.; Cechinel-Fiho, V. In: Bresolin, T.M.B.; Cechinel-Fiho, V. 2003. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos. Itajaí: UNIVALI, p. 11-56.
- Nguemeving, J. R.; Azebaze, A.G.B.; Kuete, V.; Eric-Carly, N.N.; Beng, V.P.; Meyer, M.; Blond, A.; Bodo, B.; Nkengfack, A.E. 2006. Laurentixanthones A and B, antimicrobial xanthones from *Vismia laurentii*. *Phytochemistry*, v. 67, n. 13, p. 1341–1346.
- Nguyen, M., Shing, Y. Folkman, J. 1994. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick-embryo chorioallantoic membrane. *Microvascular Research*, v.47, n.1, p.31-40.
- Oliveira, L.B.O.; Gomes, C. F.; Bampi, V.; Rheingantz, M.G.; Souza, M. A. L. 2010 Angiogênese e tumorigênese: onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapias. *Vitalle-Revista de Ciências da Saúde*, v. 22, n. 2, p. 11-22.
- Orjala, J.; Erdelmeier, C.A.J; Wright, A.D.; Rali, T.; Sticher, O. 1993. Chromenes and prenylated benzoic-acid derivative from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, v.34, p. 813-818.

- Ottobelli, I.; Facundo, V. A.; Zulini, J.; Luz, C. C.; Brasil, H. O. B. B.; Militao, J. S. L. T.; Braz-Filho, R. 2011. Estudo químico de duas plantas medicinais da amazônia: *Philodendron scabrum* k. Krause (Araceae) e *Vatairea guianensis* aubl. (Fabaceae). v.41, n. 3, p. 393-400.
- Park, B.S. 2006 Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, p. 255-262.
- Patrono, C. 2013. Chapter 53 – Aspirin. In: *Platelets*, p. 1099–1115.
- Paulo, M.Q. Barbosa-Filho, J.M.; Lima, E.O.; Maia, R.F.; Barbosa, R.C.; Kaplan, M.A. 1992. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 36, p. 39-41.
- Pedroza, L.S. 2019. *Estudo químico e biológico de três espécies do gênero Vismia Vand (Hypericaceae)*. Tese de doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 228p.
- Penié, J.B.; Alfonso, A.R.E. 2011. Papel de la nutrición en la prevención de la enfermedad aterosclerótica. Importancia de los suplementos dietéticos: nutracéuticos. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, v. 11, p. 13–17.
- Pereira, R.J.; Cardoso, G. 2012. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 3, n.4, p. 146–152.
- Pinheiro, R.M.; Mac-Quhae, M.M.; Bettolo, G.B.M.; Monache, F.D. 1984. Prenylated anthranoids from *Vismia* species, *Phytochemistry*, vol. 23, n. 8, p. 1737-1740.
- Prates, M.V. 2002. Pesticídeos antimicrobianos: uma alternativa no combate a micro-organismos resistentes. Ver. *Biotecnologia. Ciência e Desenvolvimento*; 17:30-36.
- Pratheeshkumar, P.; Budhraj, A.; Son, Y.O.; Wang, X.; Zhang, Z.; Ding, S.; Wang, L.; Hitron, A.; Lee, J.C.; Xu, M. Chen, G.; Luo, J.; Shi, X. 2012. Quercetin Inhibits Angiogenesis Mediated Human Prostate Tumor Growth by Targeting VEGFR- 2 Regulated AKT/mTOR/P70S6K Signaling Pathways. *Plos one*, v.7, n.10.
- Prieto, A.M.; Santos, A.G.; Oliveira, A.P.S.; Cavalheiro, A.J.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.S.; Varanda, E.A.P.; Soares, C.P. 2013. Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). *Food and Chemical Toxicology*, v. 53, p. 153–159.
- Rabanal, R.M.; Bonkanka, C.X.; Hernández-Pérez, M.; Sánchez-Mateo, C.C. 2005. Analgesic and topical anti-inflammatory activity of *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, n. 3, p. 591–596.

- Radic, N.; Strukelj, B. 2012. Endophytic fungi -The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*, v.19, p. 1270-1284.
- Ribeiro, A.B.; Berto, A.; Ribeiro, D.; Freitas, M.; Chisté, R.C.; Visentainer, J.V.; Fernandes, E. 2014. Stem bark and flower extracts of *Vismia cauliflora* are highly effective antioxidants to human blood cells by preventing oxidative burst in neutrophils and oxidative damage in erythrocytes. *Pharmaceutical Biology*, 53:11, p.1691-1698.
- Rozwalka, L.C.; Lima, M.L.R.Z.C.; Mio, L.L.M.; Nakashima, T. 2008. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. *Ciência Rural*, v.38, n.2, p.301-307.
- Ruhfel, B.R.; Bove, C.P.; Philbrick, C.T.; Davis, C.C. 2016. Dispersal largely explains the Gondwanan distribution of the ancient tropical clusioid plant clade. *American Journal of Botany*, 103: 1117-1128.
- Ruhfel, B.R.; Bittrich, V.; Bove, C.P.; Gustafsson, M.H.G.; Philbrick, C.T.; Rutishauser, R.; Xi Z e Davis C.C. 2011. Phylogeny of the Clusioid clade (Malpighiales): evidence from the plastid and mitochondrial genomes. *American Journal of Botany*, 98: 306-325.
- Salazar, G.C.M.; Silva, G.D.F.; Duarte, L. P.; Vieira Filho, S. A.; Lula, I. S. 2000. Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncana* Reiss: ^1H and ^{13}C chemical shift assignments. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v.38, p. 977-980.
- Sandjo, L.P.; Moraes, M.H.; Kuete, V.; Kamdoun, B.C.; Ngadjui, B.T.; Steindel, M. 2016. Individual and combined antiparasitic effect of six plant metabolites against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters*, v. 26, n. 7, p. 1772–1775.
- Seo, E.K.; Wani, M. C.; Wall, M.E.; Navarro, H.; Mukherjee, R.; Farnsworth, N.R.; Kinghorn, A.D. 2000. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. *Phytochemistry* v. 55, n. 1, p. 35-42.
- Silva, C.D.S.; Santos, P.A.A.; Lira, J.M.S.; Santana, M.C.; Silva Junior, C.D. 2010. Curso diário das trocas gasosas em plantas de feijão-caupi submetidas à deficiência hídrica. *Revista Caatinga*, v.23, p.7-13.
- Silva, D.B.; Matos, M.F.C.; Nakashita, S.T.; Misu, C.K. Yoshida, N.C.; Carollo, C.A. Fabri, J.R.; Miglio, H.S.; Siqueira, J.M. 2007. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfínicos obtidos de Annonaeae. *Química Nova*, v. 30, n.8, p. 1809-1812.

- Simetanina, O.F.; Kalinovskii, A.I.; Khuudyakova, Y.V.; Slinkina, N.N.; Pivkin, M.V.; Kuznetsovam, T.A. 2007. Metabolites From The Marine Fungus *Eurotium Repens*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 43, n.4, p. 395-396.
- Shimizu, G.H. 2017. In: Vogel-Ely Ely, C.; Shimizu, G.H.; Martins, M.V.; Marinho, L.C. *Hypericaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB84116>). Acesso em: 17/05/2019.
- Soares, S.E. 2002. Ácidos Fenólicos como Antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15, n.1, p.71-81.
- Staden, A.B van. Canha, M.; Nqephe, M.; Rademan, S.; Cuñar, V.; Lall, N. 2017. Potential medicinal plants for progressive macular hypomelanosis. *South African Journal of Botany*, v. 111, p. 346–357.
- Stein, A.C.; Müller, L. G.; Ferreira, A. G. K.; Braga, A.; Betti, A. H.; Centurião, F.B.; Scherer, E. B.; Kolling, J.; Von Poser, G. L.; Wyse, A. T. S.; Rates, S. M. K. 2016. Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative with antidepressant-like activity, increases Na+K+ATPase activity in mice cerebral cortex. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 26, n. 5, p. 611–618.
- Stevens, P.F. 2001 (Onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017. (<http://www.mobot.org/Mobot/research/APweb/>). Acesso em: 21/05/2019.
- Stevens, P.F. 2007. Hypericaceae. In: Kubitzki, K. (ed.). *The families and genera of vascular plants*. Flowering plants. Eudicots: Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales p.p., Geraniales, Gunnerales, Myrtales, Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae alliance, Passifloraceae alliance, Dilleniaceae, Huaceae, Picramniaceae, Sabiaceae. Springer, Berlin, v.8, 635p.
- Strobel, G.A.; Daisy, B.; Castillo, U.; Horper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, v.67, p. 257-268.
- Sufredini, I. B.; Paciencia, M. L. B.; Nepomuceno, D. C.; Younes, R. N.; Varella, A. D. 2006. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts – Clusiaceae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n.3, 287-290.
- Shami, N.J.I.E.; Moreira, E.A.M. 2004. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, Campinas, n.17, v. 2, p. 227-236.
- Sytar, O.; Hemmerich, I.; Zivcak, M.; Rauh, C.; Brestic, M. 2016. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi journal of Biological Sciences*, v. 25, n. 4, p. 631-641.

- Tamokou, J.D; Kuate, J.R.M.; Tene, P. 2009. Antimicrobial clerodane diterpenoids from *Microglossa angolensis*. *India Journal of Pharmacology* v.41.
- Tankeo, S.B; Damen, F.; Sandjo, L.P.; Celik, I.; Tane, P.; Kuete, V. 2016. Antibacterial activities of the methanol extracts, fractions and compounds from *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, n. 190, p.100-105.
- Teixeira, J. 2008. Avaliação dos efeitos tóxicos e genotóxicos do inseticida imidacloprido em *Artemia salina* e *Allium cepa* L. Monografia, Criciúma, UNESC, 51p.
- The Plant List 2013. (<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Hypericaceae/>). Acesso em 14/05/2019.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden, 2017. (<http://www.tropicos.org/Name/40024614>). Acesso em: 26/07/2017.
- Udomchotphruet, S.; Phuwapraisirisan, P.; Sichaem, J.; Tip-Pyang, S. 2012. Xanthones from the stems of *Cratoxylum cochinchinense*. *Phytochemistry*, v. 73, p.148-151.
- Vaishnav, P.; Demain, A.L. 2010. Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v. 29, n.2 p. 223–229.
- Vasconcelos, T.B.; Cardoso, A.R.N.R.; Josino, J.B; Macenad, R.H.M.; Bastos, V.P.D. 2014. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo. *UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde*, v.16, n.3, p.213-9.
- Verma, N.; Shukla, S. 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v. 2, n. 4, p. 10.
- Viana A.F.; Rego, J-C.; von Poser, G.; Ferraz, A.; Heckler, A.P.; Costentin, J.; Rates, S.M.K. 2005. The antidepressant like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham e Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. *Neuropharmacology* 49: p. 1042-1052.
- Vinatea, J.E. 1982. Acuicultura continental. Peces, Artemias y Dafnias. Camarones y Langostinos. *Librería Studium*, Lima Perú. 229 pp.
- Vizcaya, M.; Morales, A.; Rojas, J., Nunez, R. 2012. Revision bibliografica sobre la composition quimica y actividades Farmacologicas del género *Vismia* (Guttiferas). *Revista de revision Boletim Latinoamericano y del Cariby de plantas Medicinales y Aromatica*, v.11, n.1, p. 12-34.
- Vizzotto, M.; Krolow, A.C.; Weber, G.E.B. 2010. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. *Embrapa Clima Temperado*. Pelotas, RS.16p.

- Vogel-Ely, E.C.; Shimizu, G.H.; Martins, M.V.; Marinho, L.C. 2018. Hypericaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8011>). Acesso em: 19/04/2019.
- Walsh, C. 2000. Molecular Mechanisms that Confer Antibacterial Drug Resistance. *Nature*, 406, p. 775-781.
- Weber, T.; Kim, H.U. 2016. The secondary metabolite bioinformatics portal: Computational tools to facilitate *synthetic biology of secondary metabolite production*. *Synthetic and Systems Biotechnology*, v. 1, n. 2, p. 69–79.
- Wurdack, K.J.; Davis, C.C. 2009. Malpighiales phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. *American Journal of Botany* v. 96, n.6, p. 1551-1570.