



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**



**Contribuição para o conhecimento fitoquímico da espécie *Vismia guianensis*
(Hypericaceae).**

MARIA SALLET ROCHA SOUZA

JOÃO PESSOA

2014

MARIA SALLET ROCHA SOUZA

**Contribuição para o conhecimento fitoquímico da *Vismia guianensis*
(Hypericaceae).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Emidio Vasconcelos Leitão da Cunha

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

JOÃO PESSOA,

2014

S729c Souza, Maria Sallett Rocha.
Contribuição para o conhecimento fitoquímico da *Vismia guianensis* (Hypericaceae) / Maria Sallett Rocha Souza.-- João Pessoa, 2014.
94f. : il.
Orientador: Emidio Vasconcelos Leitão da Cunha
Coorientadora: Maria de Fátima Vanderlei de Souza
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. *Vismia guianensis*.
3. Vismiaquinona A. 4. Canferol. 5. Óleo essencial. 6. Atividade antimicrobiana.

UFPB/BC

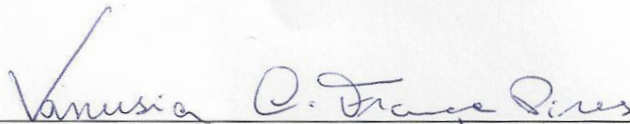
CDU: 547.9(043)

MARIA SALLET ROCHA SOUZA

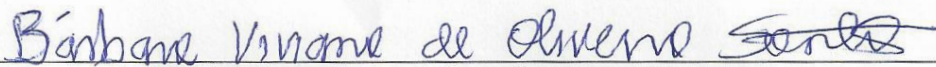
**Contribuição para o conhecimento fitoquímico da *Vismia guianensi*
(Hypericaceae).**

Aprovado em 26 / 02 / 2014

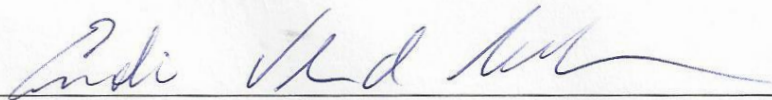
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Vanusia França Pires/UEPB
Examinadora Externa



Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos/UFPB
Examinadora Interna



Prof. Dr. Emidio Vasconcelos Leitão da Cunha/UFPB
Orientador

JOÃO PESSOA

2014

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo.

À minha família, em especial aos meus tios Naidson e Laudina, minha mãe, Rita, e meus primos Naidson Júnior, Nady, Celeste e Olavio por me ajudarem a chegar até aqui.

Aos professores que passaram pela minha vida durante toda a minha formação, por todos os ensinamentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Emidio Vasconcelos Leitão da Cunha pela confiança e orientação durante esse trabalho.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza pela orientação, atenção e paciência.

À Evelise Márcia Locatelli de Souza pela identificação botânica da planta.

À Micheline Lima e Alex Magno pela coleta da planta.

À Profa. Dra. Márcia Ortiz e Maria Ferreira pela realização das análises em CG/EM.

À Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pêsoa pela análise antimicrobiana.

À banca examinadora pela disponibilidade em contribuir com esse trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos pela ajuda e disponibilidade, em especial a Nonato, Glória, Carol e Vicente.

À Otemberg, Rafaela, Paula, Evandro, Ana Paula, Jacqueline, Camila, Denise, Milen, Jéssica, Flávio, Élide, Sany, Carol, Clarice, Severino, Raquel, Madalena e Tânia pela amizade, companhia e pela ajuda especializada no laboratório.

À Alessandra por ouvir todas as minhas reclamações e por todas as conversas.

À Jessica, Esdras, Anna Raphaela e Geovani pela amizade e apoio mesmo à distância.

À Susyanne e Janine pela amizade, companheirismo e ajuda sempre.

À Agna, Elisana e Horacina pela amizade e companheirismo.

Ao Nercionildo, pelo apoio e incentivo.

À Flaviana, Pedro Jaime, Márcia e D. Iracema, por serem muito mais que amigos e vizinhos.

A Fábio, Raimundo e Wilmam pela amizade e ensinamentos.

Aos meus amigos Salvio, Karlos, Nívea e Caio pelos momentos de descontração.

Ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos.

À Universidade Federal da Paraíba.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos...

*“A criação de mil florestas está
em uma semente”*

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

SOUZA, Maria Sallett Rocha. **Contribuição para o conhecimento fitoquímico da espécie *Vismia guianensis* (Hypericaceae)**. 94 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

Vismia guianensis (Hypericaceae) é conhecida popularmente no Brasil como lacre ou goma-lacre. No presente trabalho foi realizada a extração dos constituintes químicos das folhas de *V. guianensis* por maceração com etanol. A prospecção fitoquímica mostrou a presença de flavonoides, saponinas, taninos, esteroides e antraquinonas, por cromatografia em coluna (CC) foram isolados da fase hexânica β -sitosterol, Estigmasterol e Vismiaquinona A, e da fase acetato de etila o Canferol. As estruturas foram elucidadas utilizando Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais. Das inflorescências da *V. guianensis*, foi realizada extração do óleo essencial por arraste de vapor em aparelho de Clevenger, e em paralelo, extração em Soxhlet com os solventes Hexano, Acetato de etila e Metanol. A determinação dos constituintes do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) e sua atividade antimicrobiana foi avaliada frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* determinando-se sua concentração inibitória mínima (CIM), a atividade foi considerada significante frente a estas cepas.

Palavras-chave: *Vismia guianensis*, Vismiaquinona A, Canferol, óleo essencial, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

SOUZA, Maria Sallett Rocha. **Contribution to the phytochemical knowledge of the species *Vismia guianensis* (Hypericaceae).** 94 p. Master's Thesis - Graduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Center for Health Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2014.

Vismia guianensis (Hypericaceae) is popularly known in Brazil as lacre or goma-lacre. In the present work the extraction of chemicals from the leaves of *V. guianensis* by maceration with ethanol. The phytochemical screening showed the presence of flavonoids, saponins, steroids, tannins and anthraquinones. By column chromatography were isolated Stigmasterol, β -Sitosterol and Vismiaquinone A from the hexane phase, and Kaempferol from the ethyl acetate phase. The structures were elucidated using nuclear magnetic resonance ^1H and ^{13}C unidimensional and bidimensional. Of the inflorescences of *V. guianensis*, was performed extraction of essential oil by steam drag in Clevenger apparatus, and parallel soxhlet extraction with hexane, ethyl acetate and methanol solvents. The determination of the constituents of the essential oil was performed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS) and antimicrobial activity was evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and was determined by minimum inhibitory concentration (MIC), activity was considered significant in these bacterial cultures.

Keywords: *Vismia guianensis*, Vismiaquinone A, Kaempferol, essential oil, antimicrobial activity.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt	Acetato de Etila
APT	<i>Attached Proton Test</i>
ATCC	American Type Culture Collection
B16	linhagens de células de carcinoma de ovário
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CD₃OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CH₃OH	Metanol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
EEB	Extrato Etanólico Bruto
g	Gramma
H₂O	Água
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
kg	quilograma
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise
M	multiplete
M5076	linhagens de células de melocarcinoma
MeOH	Metanol
mg	Miligrama

MHz	Megahertz
mL	Mililitro
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Paraíba
PgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>tdd</i>	Tripleto de dubletos
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
δ	Deslocamento químico em ppm
μL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global da família Hypericaceae.	25
Figura 2: Mapa global da concentração de espécies da Hypericaceae.	25
Figura 3: Partes da <i>Vismia guianensis</i>	29
Figura 4: Esqueleto básico de flavonoides	31
Figura 5: Estrutura do Antraceno	32
Figura 6: CCDP das frações 23-26 provenientes da cromatografia do extrato hexânico das inflorescências e <i>V. guianensis</i>	46
Figura 7: Estrutura de <i>Vg1</i> , Vismiaquinona A	54
Figura 8: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Vg1</i>	55
Figura 9: Expansão do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Vg1</i> na região de 7.70-6.55 ppm com mini expansões.	56
Figura 10: Expansão do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Vg1</i> na região de 2.70-2.36 ppm.	57
Figura 11: Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) – APT de <i>Vg1</i>	58
Figura 12: Espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃)	59
Figura 13: Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Vg1</i> na região de (7.4 -6.0 ppm) x (0.5-4.0 ppm)	60
Figura 14: Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Vg1</i>	61
Figura 15: Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Vg1</i> na região de (13.3-11.5 ppm) x (100-180 ppm)	62
Figura 16: Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Vg1</i> na região de (2.8-0.8 ppm) x (105-155 ppm)	63
Figura 17: Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Vg1</i> na região de (1.65-0.95 ppm) x (15-45 ppm)	64
Figura 18: Espectro HMQC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Vg1</i>	65
Figura 19: Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Vg1</i> na região de (7.60-6.60 ppm) x (102-128 ppm)	66
Figura 20: Espectro COSY (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Vg1</i>	67
Figura 21: Expansão do espectro COSY (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Vg1</i> na região de (7.7-6.5 ppm) x (6.1-8.0 ppm)	68
Figura 22: Estrutura de <i>Vg2</i> , β-sitosterol	71

Figura 23: Estrutura de <i>Vg3</i> , Estigmasterol.....	71
Figura 24: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>Vg2</i> e <i>Vg3</i> com mini expansões.....	72
Figura 25: Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de <i>Vg2</i> e <i>Vg3</i> na região de (2.4-0.6 ppm)	73
Figura 26: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) – APT de <i>Vg2</i> e <i>Vg3</i>	74
Figura 27: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) – APT de <i>Vg2</i> e <i>Vg3</i> na região de (58-10 ppm)	75
Figura 28: Estrutura de <i>Vg4</i> , 3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-cromen-4-ona (Canferol).	76
Figura 29: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de <i>Vg4</i>	78
Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de <i>Vg4</i>	79
Figura 31: Cromatograma do óleo essencial de inflorescências de <i>Vismia guianensis</i>	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fracionamento cromatográfico da fase AcOEt (15 g) em XAD-2 para separação de compostos fenólicos.	45
Tabela 2: Dados de RMN uni e bidimensionais de <i>Vg1</i> (δ , CDCl ₃ 500 e 125 MHz), comparados com a literatura (ALVAREZ, 2008).	53
Tabela 3: Comparação dos deslocamentos para átomos de carbono e hidrogênio de <i>Vg2</i> e <i>Vg3</i> , verificados nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C (δ , CDCl ₃ , 200 e 50 MHz) com a literatura (MIRANDA et al., 2014).....	70
Tabela 4: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de <i>Vg4</i> (δ , CD ₃ OD 500 e 125 MHz), comparados com modelo da literatura (BARRETO et al., 2013).....	77
Tabela 5: Composição Química (% relativa) do óleo essencial das inflorescências de <i>V. guianensis</i>	81
Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial das inflorescências de <i>Vismia guianensis</i> sobre as linhagens bacterianas.....	83

LISTA DE ESQUEMAS E GRÁFICOS

Esquema 1: Partição do EEB das folhas de <i>Vismia guianensis</i>	40
Esquema 2: Frações obtidas pela filtração da fase Hexânica em sílica gel.	40
Esquema 3: Frações obtidas pela filtração da fase Butanólica em ODS.	41
Esquema 4: Fracionamento cromatográfico da fração Hex (500mg) da Fase Hex em coluna de sílica flash (1,5g) (FHC1).	42
Esquema 5: Fracionamento cromatográfico da fração Hex:AcOEt (9:1), (3,5g).	43
Esquema 6: Processamento cromatográfico da fase AcOEt.	44
Esquema 7: Esquema da extração e fracionamento do extrato hexânico das inflorescências da <i>Vismia guianensis</i>	47
Esquema 8: Resumo da obtenção das substâncias isoladas das folhas de <i>Vismia guianensis</i> .	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação taxonômica do gênero <i>Vismia</i>	26
Quadro 2: Alguns constituintes químicos isolados de espécies do gênero <i>Vismia</i>	27
Quadro 3: Estruturas de algumas substâncias já isoladas da <i>Vismia guianensis</i>	30
Quadro 4: Substâncias isoladas da <i>Vismia guianensis</i> nesse estudo	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo Geral.....	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
3.1. Considerações sobre a família Hypericaceae.....	24
3.2. Considerações sobre o gênero <i>Vismia</i>	26
3.3. Consideração sobre a <i>Vismia guianensis</i>	28
3.4. Metabólitos secundários	30
3.4.1. Flavonoides.....	31
3.4.2. Antraquinonas.....	31
3.4.3. Esteroides	32
3.5. Óleos Essenciais	32
3.6. Considerações sobre atividade antimicrobiana.....	33
3.7. Considerações sobre as bactérias	33
4. METODOLOGIA.....	36
4.1. Coleta do material botânico	36
4.2. Processamento das folhas, galhos e inflorescências de <i>Vismia guianensis</i>	36
4.3. Obtenção do extrato bruto das folhas de <i>Vismia guianensis</i>	36
4.4. Métodos cromatográficos	36
4.5. Métodos espectroscópicos	37
4.6. Obtenção e caracterização do óleo essencial das inflorescências de <i>Vismia guianensis</i>	37
4.7. Caracterização do óleo essencial das inflorescências de <i>Vismia guianensis</i>	37
4.8. Prospecção Fitoquímica do EEB das folhas de <i>Vismia guianensis</i>	38
4.8.1. Pesquisa de antraquinonas	38
4.8.2. Pesquisa de saponinas.....	38

4.8.3.	Pesquisa de alcaloides	38
4.8.4.	Pesquisa de flavonoides.....	38
4.8.5.	Pesquisa de taninos.....	39
4.8.6.	Pesquisa de esteroides	39
4.9.	Particionamento do EEB das folhas de <i>Vismia guianensis</i>	39
4.10.	Filtração da Fase Hexânica	40
4.11.	Filtração da Fase Butanólica	41
4.12.	Fracionamento cromatográfico das fases, frações e subfrações obtidas.	41
4.13.	Fitoquímica das Inflorescências de <i>Vismia guianensis</i>	45
4.14.	Avaliação da atividade antimicrobiana	47
4.14.1.	Linhagens bacterianas.....	47
4.14.2.	Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial das inflorescências da <i>Vismia guianensis</i> frente a bactérias de importância clínica	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1.	Prospecção Fitoquímica.....	50
5.2.	Substâncias isoladas de <i>Vismia guianensis</i>	50
5.2.1.	Elucidação estrutural de <i>Vg1</i>	51
5.2.2.	Elucidação estrutural de <i>Vg2</i> e <i>Vg3</i>	69
5.2.3.	Elucidação estrutural de <i>Vg4</i>	76
5.3.	Caracterização do óleo essencial das inflorescências de <i>Vismia guianensis</i>	80
	CONCLUSÃO.....	86
	REFERÊNCIAS	88



Introdução

1. INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais está em contínua expansão em nível mundial. A crescente busca por agentes terapêuticos derivados de espécies vegetais justifica-se pelo surgimento de doenças ainda sem tratamento apropriado, e pelo crescimento do conhecimento científico a respeito dos fitoterápicos, como alternativas terapêuticas (GUERRA e NODARI, 2003). A expansão da fitoterapia pode ser atribuída a diversos fatores tais como: os efeitos adversos de fármacos sintéticos, a preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, a validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, o desenvolvimento de novos métodos analíticos colocados à disposição do controle de qualidade, o desenvolvimento de novas formas de preparações e administrações de produtos fitoterápicos, um melhor conhecimento químico, farmacológico e clínico das drogas vegetais e seus derivados, além, também, do menor custo se comparado com os fármacos sintéticos (BRAZ FILHO, 2010).

Estima-se que cerca de 44% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de fontes naturais, como plantas, micro-organismos e animais. Além disso, estima-se que das 252 substâncias consideradas básicas e essenciais pela OMS (Organização Mundial da Saúde), 11% são originárias de plantas, e um número significativo está representado por fármacos obtidos de precursores naturais (HOSTETTMANN et al, 2003). Segundo Newman (2012), 48,6% dos antitumorais disponíveis no mercado tem uma origem direta ou indiretamente ligada a produtos naturais.

Muitos fármacos de origem natural são obtidos hoje através de síntese química ou são utilizados como modelo para a síntese de outros fármacos bioativos, como a cocaína, cujo esqueleto tropânico serviu de protótipo para anestésicos locais como a procaína. A papaverina, um alcaloide isoquinolínico com propriedades antiespasmódicas, direcionou o desenvolvimento de inúmeros derivados, entre eles o verapamil. Outros fármacos oriundos da transformação da saligenina são o ácido acetilsalicílico e os sais de amônio quaternário, usados como bloqueadores neuromusculares, originários da tubocurarina (BARREIRO, 1990).

A utilização popular geralmente é um fator decisivo na pesquisa de novas substâncias ativas, vários medicamentos desenvolvidos foram obtidos a partir de pesquisas com plantas já utilizadas em diversos sistemas de medicina tradicional como a Chinesa e Indiana, entre outras.

A *Vismia guianensis* é uma espécie utilizada na medicina popular no tratamento de afecções de pele e como purgativo, alguns estudos já mostraram a presença de vários constituintes químicos, alguns farmacologicamente ativos, motivando o desenvolvimento desta pesquisa.



Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Contribuir com o estudo farmacognóstico da família Hypericaceae através do estudo fitoquímico da *Vismia guianensis*.

2.2. Objetivos Específicos

✓ Extrair, isolar e purificar metabólitos secundários de *V. guianensis*, utilizando diferentes métodos cromatográficos, tais como: Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia em Coluna (CC).

✓ Identificar ou elucidar os compostos isolados de *V. guianensis* através dos métodos espectroscópicos como ressonância magnética nuclear.

✓ Extrair o óleo essencial das inflorescências de *V. guianensis* e avaliar atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas.

✓ Caracterizar o óleo essencial das inflorescências de *V. guianensis* por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM).



Fundamentação
Teórica

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os vegetais representam as maiores fontes de substâncias ativas que podem ser usadas na terapêutica, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos (BRANDÃO et al, 2010). A atividade biológica das plantas medicinais é atribuída aos seus metabólitos secundários, os quais têm sido sumariamente definidos como compostos pouco abundantes, com uma frequência inferior a 1% do carbono total, ou pelo fato de sua estocagem ocorrer em órgãos ou células específicos (FUMAGALI et al, 2008). Essas moléculas contribuem para que as plantas possam ter uma boa interação com os diferentes ecossistemas tendo um papel importante na adaptação das mesmas aos seus ambientes aumentando a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, atuando na proteção contra os patógenos, contra outras plantas, e na interação com agentes polinizadores.

Estima-se que apenas 17% de toda a flora mundial, tenha sido estudada quanto ao seu emprego medicinal (FOGLIO et al, 2006). O Brasil detém uma grande diversidade de plantas com potencialidades medicinais o que o coloca numa posição privilegiada em relação a outros países e, considerando sua riqueza vegetal ainda sem estudo, aumenta a possibilidade do desenvolvimento de novos medicamentos (YUNES et al, 2001).

Várias plantas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças e para comprovação da eficácia e segurança dessas drogas vegetais são realizados ensaios farmacológicos e toxicológicos e para se chegar aos compostos puros responsáveis pelos efeitos biológicos apresentados pelos extratos (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998). Nesse sentido, a importância de estudos fitoquímicos está na contribuição da composição química através do isolamento dos constituintes e sua elucidação estrutural.

3.1.Considerações sobre a família Hypericaceae

Hypericaceae Juss é uma família de plantas da ordem Malpighiales, já fez parte da família Clusiaceae/Guttiferae, da qual foi desmembrada devido a sua monofilia observada em estudos filogenéticos e a caracteres morfológicos (STEVENS, 2007; WURDACK e DAVIS, 2009). É constituída por nove gêneros *Cratoxylum* Blume, *Eliea* Cambess, *Harungana* Lamarck, *Hypericum* L., *Lianthus* N. Robson, *Santomasia* N. Robson, *Thornea* Breedlove & McClintock, *Triadenum* Rafinesque e *Vismia* Vand entre os quais se distribuem 560 espécies nas regiões de clima temperado e subtropical (STEVENS, 2007). O gênero *Hypericum* é o

mais numeroso incluindo 469 espécies na contagem mais recente segundo Crockett e Robson (2011).

Plantas pertencentes à família Hypericaceae são bem conhecidas na medicina popular apresentando ampla variedade de uso tais como antiinflamatório, anti-hemorrágico e antimicrobiano (LORENZI e SOUZA, 2001).

A Figura 1 apresenta a distribuição da família Hypericaceae e a Figura 2 o mapa da ocorrência das espécies dessa família.

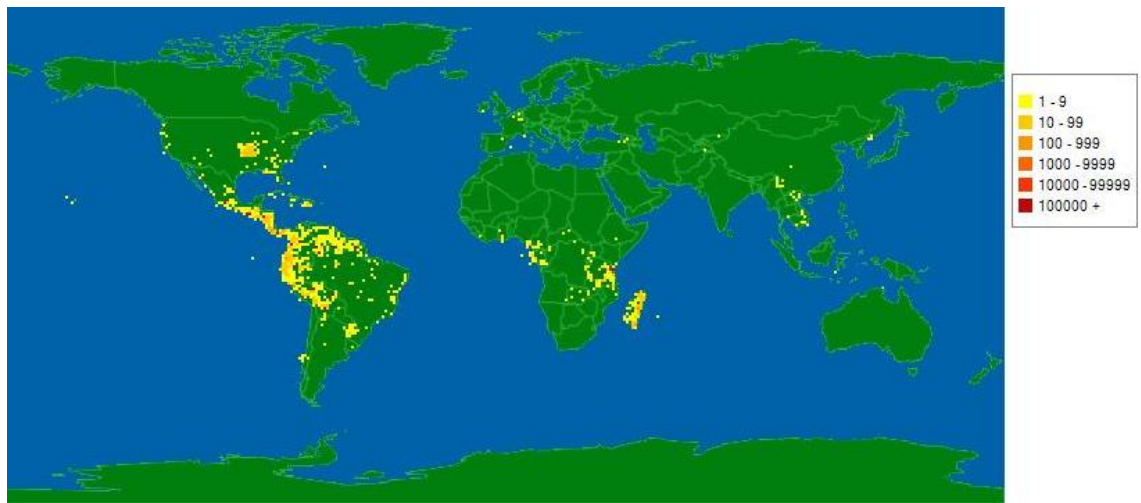
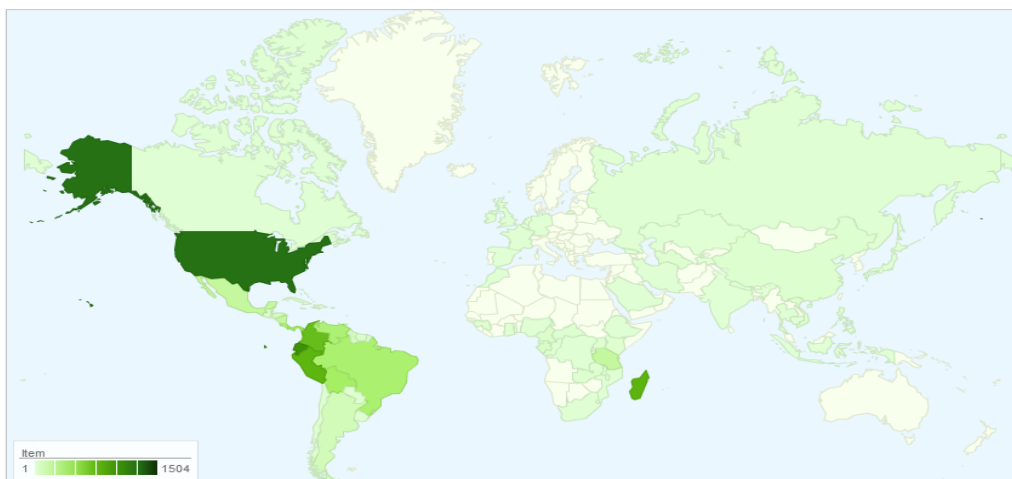


Figura 1: Distribuição global da família Hypericaceae.

Fonte: <http://www.tropicos.org/HeatMap.aspx?matypeid=2&lookupid=42000447&map=2>



* These counts only include specimens with locations in mappable countries

Figura 2: Mapa global da concentração de espécies da Hypericaceae.

Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/42000447?tab=maps>

3.2.Considerações sobre o gênero *Vismia*

O gênero *Vismia*, é constituído por pequenas árvores e arbustos, sendo que 80% das noventa e sete espécies conhecidas podem ser encontradas na América do Sul e Central e as demais se distribuem pela África e mais raramente pela Ásia, a maioria delas fornece resinas de colorações diferentes e varias tem valor medicinal (Di STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Espécies desse gênero têm sido empregadas na medicina tradicional para o tratamento de algumas enfermidades, particularmente o látex, produzido por diversas espécies tais como *V. augusta*, *V. confertiflora*, *V. dealbata*, *V. baccifera ssp. V. ferruginea* e *V. guianensis* dentre outras, tem sido utilizadas no tratamento de feridas, ulcerações, afecções de pele, herpes, como febrífugo e purgante (ALVAREZ et al, 2008).

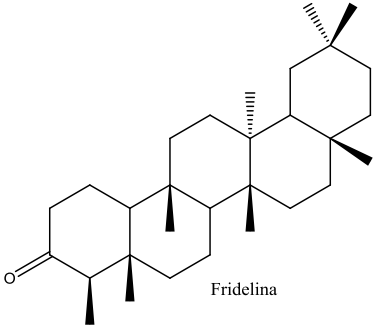
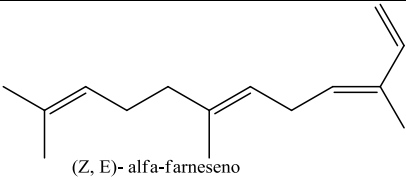
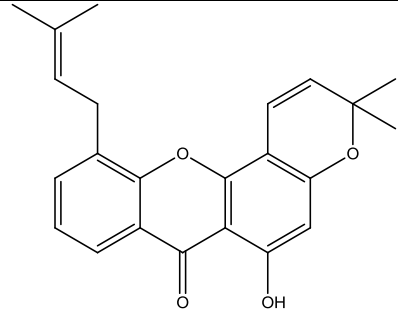
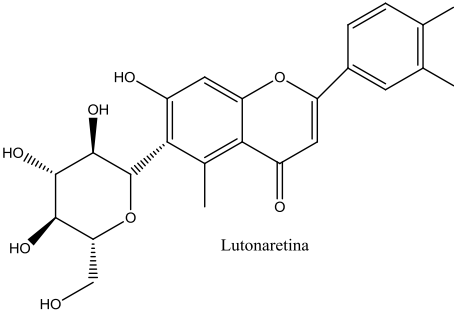
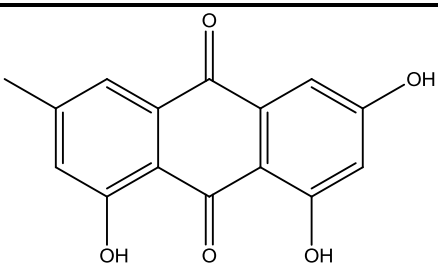
Taxonomicamente é classificado conforme o Quadro1:

Quadro 1: Classificação taxonômica do gênero *Vismia*.

TAXONOMIA DO GÊNERO <i>Vismia</i>	
Classe	Equisetopsida C. Agardh
Subclasse	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superordem	Rosanae Takht.
Ordem	Malpighiales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Família	Hypericaceae Juss.
Gênero	<i>Vismia</i> Vand

A literatura relata a presença de diversos metabólitos isolados desse gênero: flavonoides, flavonóis, xantonas, antranas, antraquinonas, benzofenonas, lignanas, esteroides, monoterpenos e triterpenos como constituintes majoritários (HUSSAIN, 2012). No quadro 2, estão dispostos alguns dos constituintes químicos já isolados nesse gênero e espécie a partir da qual foi isolado.

Quadro 2: Alguns constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Vismia*.

CONSTITUINTES QUÍMICOS DO GÊNERO <i>Vismia</i>		
Estrutura química	Espécie	Fonte
 <p>Fridelina</p>	<i>V. rubescens</i>	Tamokou et al, 2009
 <p>(Z, E)- alfa-farneseno</p>	<i>V. mexicana</i>	Pinheiro et al, 1984
 <p>Laurentixantona A</p>	<i>V. laurentii</i>	Ngumemving et al, 2006
 <p>Lutonaretina</p>	<i>V. guineensis</i>	Politi et al, 2004
 <p>Emodina</p>	<i>V. baccifera</i>	Hussein, 2003

3.3.Consideração sobre a *Vismia guianensis*

A espécie *Vismia guianensis*, conhecida popularmente como “lacre”, pau-de-lacre, árvore-da-febre, caapia e caopia, é encontrada nas regiões do Norte e Nordeste do Brasil, Colômbia, Venezuela, Guiana (MOURÃO e BELTRATI, 2001) Trata-se de arbusto, com folhas ovais e oblongas. As inflorescências apresentam-se em panículas terminais e seus frutos são globosos, carnosos e indeiscentes (Di STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). Esta espécie se destaca pela aplicação de seu látex (resina amarelo-avermelhada denominada goma-lacre ou goma-guta) e da infusão das folhas no combate das afecções dermatológicas contra o pano branco (Pitiríase versicolor), impinges (Tinea corporea) e ferimento por inseto. O decocto e infusão das suas folhas e cascas são utilizados contra reumatismo, como tônico e febrífugo (OLIVEIRA, 2009).

A Figura 3 mostra um exemplar da *Vismia guianensis* evidenciando folhas, frutos e inflorescências.

Em *Vismia guianensis* foi detectada a presença de diversos compostos, como a vismiona e a ferruginina; além de xantonas, antraquinonas, benzofenonas e benzocumarinas. Estudos tem revelado a atividade de *Vismia guianensis* no combate a células cancerígenas. Pasqua et al (1995) mostraram que a Vismiona, metabólito presente em *V. guianensis* e em outras espécies do gênero, mostrou atividade *in vitro* contra linhagem de tumores experimentais – carcinoma de ovário M5076 e melanocarcinoma B16, já Di Stasi e Hiruma-Lima (2002) destacam uma potencial atividade antimalárica. Suffredini et al (2007) mostraram uma acentuada atividade letal dos extratos orgânicos e aquosos de *V. guianensis* frente à linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.

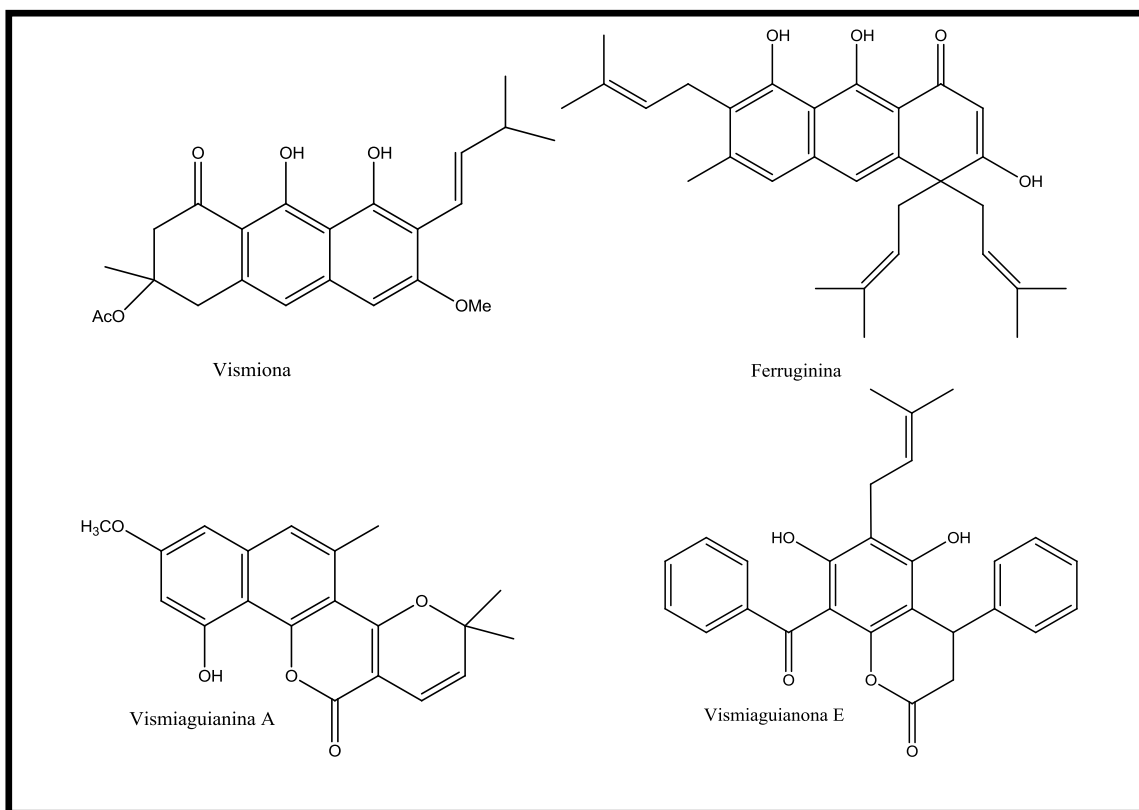


Figura 3: Partes da *Vismia guianensis*.

Seo e colaboradores (2000), a partir de extratos das raízes de *V. guianensis* isolaram cinco benzofenonas (vismiagianonas A, B, C, D e E) e duas benzocumarinas (vismiagianinas A e B). Monache e colaboradores (1980) identificaram na composição química dos frutos de *V. guianensis* dois antranoides prenilados (γ -hidroxi-ferruginina A e γ,γ -dihidroxi-ferruginina A). Mais recentemente, compostos fenólicos presentes nos extratos dos frutos de *V. guianensis* tem mostrado atividade antioxidante, como e o caso dos antranoides prenilados ferruginina A e γ -hidroxiferruginina e da antraquinona vismiona A (ALVAREZ et al., 2008).

O Quadro 3 apresenta estruturas de substâncias presentes em *Vismia guianensis*.

Quadro 3: Estruturas de algumas substâncias já isoladas da *Vismia guianensis*



3.4. Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa e baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG e LUBERT, 2008). Estes compostos são conhecidos por desempenharem um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes e também representam uma fonte importante de substâncias farmacologicamente ativas (FUMAGALI et al, 2008).

Metabólitos secundários nas plantas podem ser divididos em três grupos distintos quimicamente: terpenos, compostos fenólicos e componentes contendo nitrogênio (VIZOTTO et al, 2010).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (PEREIRA e CARDOSO, 2012). O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanoides, compostos que tem em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcalóides derivados deles; terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos (LEITE et al, 2008). Serão destacados Flavonoides, esteroides e antraquinonas, metabólitos comuns na família em estudo.

3.4.1. Flavonoides

Os flavonoides estão entre os compostos naturais mais disseminados em plantas, tanto na forma livre quanto em heterosídeos, com cerca de 9000 estruturas conhecidas (MARTENS e MITHOFER, 2005). São substâncias aromáticas contendo 15 átomos de carbono C₁₅ no seu esqueleto básico. Este grupo de compostos polifenólicos apresenta uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado, formando um sistema C₆-C₃-C₆. (PEREIRA e CARDOSO, 2012), onde o grupo C₆-C₃ forma o anel cromano (Anel A e C) ligado ao segundo anel aromático (C₆ – Anel B) na posição 2,3 ou 4 do anel cromano, como pode-se observar na Figura abaixo.

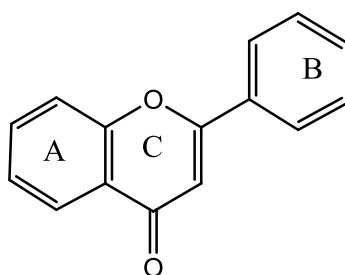


Figura 4: Esqueleto básico de flavonoides

3.4.2. Antraquinonas

As antraquinonas são substâncias aromáticas derivadas do antraceno e constituem o grupo mais numeroso das quinonas naturais apresentando significativas atividades biológicas (VIZCAYA et al, 2011).

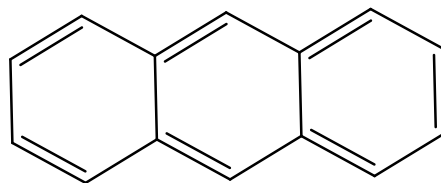


Figura 5: Estrutura do Antraceno

Apresentam-se geralmente como substâncias cristalinas de cor amarela, vermelha ou laranja e estão distribuídas largamente no reino vegetal, desde as plantas superiores até aos fungos e líquens. Algumas antraquinonas de procedência animal são registradas na literatura, dentre elas o ácido carmínico, extraído das fêmeas da colchinilha (*Dactylopius coccus* Costa) (SANTOS et al, 2008).

3.4.3. Esteroides

São compostos hexaprenoides derivados da ciclização do esqualeno dando lugar a um sistema de quatro ciclos denominado ciclopentanoperidrofenantreno. Os fitosteróis como o β -sitosterol são bastante comuns sendo o β -sitosterol o esteroide mais abundante, constituindo 36,1% do total de esteróis (RODRIGUES et al, 2004).

3.5. Óleos Essenciais

Óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos voláteis, obtidos a partir de material vegetal (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes) Podem ser extraídos por meio de inúmeras técnicas, como: extração por arraste a vapor, hidrodestilação, prensagem a frio, extração por solventes orgânicos, extração por alta pressão e extração por CO₂ supercrítico (OKOH et al, 2010), sendo o mais comum, hidrodestilação utilizando Clevenger. Óleos essenciais podem estar presentes em todas as partes de uma planta, no entanto, sua composição pode variar de acordo com sua localização em um mesmo vegetal. Um exemplo é o óleo essencial extraído da canela, quando obtido das folhas e raízes é rico em eugenol e cânfora, enquanto que o óleo obtido da casca é rico em cinamaldeído (KOKETSU et al, 1997).

A caracterização química dos componentes dos óleos essenciais é realizada normalmente através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), sendo as regiões de pico analisadas e seus constituintes definidos (GOMES et al, 2007).

3.6. Considerações sobre atividade antimicrobiana

Atualmente, a resistência bacteriana vem sendo considerada como um problema de saúde pública crescente no mundo inteiro e o maior obstáculo para o sucesso dos tratamentos de doenças infecciosas (BENGHEZAL et al., 2007; OLIVEIRA e SILVA, 2008). O que tem levado os pesquisadores a buscar novas substâncias tóxicas para as bactérias, que funcionem como antimicrobianas, a partir de várias fontes, tais como as plantas medicinais.

A triagem de extratos de plantas, assim como de compostos sintetizados no metabolismo secundário, para evidenciar a presença de novos compostos com atividade antimicrobiana é uma fonte potencial de medicamentos mais efetivos (KARAMAN et al., 2003).

A atividade antimicrobiana pode ser avaliada de diversas formas, os métodos comumente utilizados são o de difusão em disco, difusão utilizando cavidades feitas no ágar, diluição em ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima - CIM (NASCIMENTO et al, 2007; NOSTRO et al., 2004; CIMANGA et al., 2002; SHAFI et al., 2002; CANILLAC e MOUREY, 2001; TAKAISI-KIKUNI et al., 2000). A pesquisa da atividade antimicrobiana de extratos vegetais é realizada preferencialmente pela técnica de microdiluição em placa, empregada para determinar a CIM (menor concentração capaz de inibir o crescimento do microorganismo) (OLIVEIRA, 2009). A Resazurina, um indicador de óxido-redução, tem sido utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana, principalmente por se tratar de um reagente de baixo custo (PALOMINO et al, 2002).

3.7. Considerações sobre as bactérias

As bactérias são classificadas de acordo com Hans Christian Gram em GRam positivas e Gram negativas. A parede das bactérias Gram positivas apresenta várias camadas de um polissacarídeo denominado peptidoglicano que forma uma rede através de ligações cruzadas entre seus aminoácidos além de pequenas quantidades de ácido teicóico, enquanto as bactérias Gram negativas apresentam uma única camada de peptidoglicano e uma membrana externa complexa composta de lipopolissacarídios, proteínas e lipoproteínas. Essas diferenças estruturais levam a modificações na permeabilidade o que acarreta variação na sensibilidade a substâncias exógenas. Normalmente as bactérias Gram positivas são mais sensíveis aos antimicrobianos do que as Gram negativas embora alguns antimicrobianos atuem apenas em bactérias Gram negativas (MADIGAN e MARTINKO, 2004).

Foram utilizadas neste estudo espécies Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*).

Staphylococcus aureus pertence a família Staphylococcaceae, se apresentam como cocos Gram positivos que formam grupos com aspecto de cachos de uvas com cor amarelada, devido a produção de carotenóides . Normalmente, esta bactéria está associada com infecções da pele e do trato respiratório inferior. *S. aureus* tem uma grande importância clínica uma vez que é a principal causa de infecções hospitalares adquiridas nos berçários, em cirurgias e em procedimentos médicos invasivos. Algumas linhagens têm se mostrado muito resistentes a vários antibióticos (HOLT et al. 1994).

Pseudomonas aeruginosa pertence à família Pseudomonadaceae caracteriza-se como bastonete Gram negativo reto ou ligeiramente curvo, aeróbio estrito, podendo ser observado como células isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas, revelando mobilidade através de flagelo polar. *P. aeruginosa* se comporta como um patógeno oportunista iniciando infecções em indivíduos com baixa resistência e freqüentemente está associada com infecções do trato respiratório, urinário e lesões na pele resultantes de queimaduras graves ou outros traumatismos. Esta bactéria, naturalmente resistente a muitos dos antibióticos amplamente utilizados, é comumente encontrada no ambiente hospitalar e pode infectar facilmente os pacientes que estão recebendo tratamento para outras doenças (MADIGAN e MARTINKO, 2004).

Escherichia coli é um bacilo Gram negativo pertencente à família das Enterobacteriaceae, aeróbias ou aeróbias facultativas (HOLT et al., 1994). *E. coli* é o membro mais bem conhecido da microbiota normal do intestino humano, mas também é um patógeno gastrointestinal versátil que pode estar envolvido na diarreia infantil, ocasionalmente ocorrendo em proporções epidêmicas em berçários ou enfermarias obstétricas. *E. coli* também pode causar infecções no trato urinário de pessoas mais velhas ou naquelas cuja resistência está diminuída devido a cirurgias ou exposição à radiação ionizante. As linhagens enteropatogênicas de *E. coli* estão freqüentemente envolvidas nas infecções semelhantes à disenteria e febres generalizadas (TORTORA et al, 2005).



Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta do material botânico

As partes aéreas de *Vismia guianensis* foi coletada na localidade de Piabuçu – Paraíba, em 23 de maio de 2013. O material botânico foi identificado por Profa. Dra. Evelise Márcia Locatelli de Souza e uma exsicata com a seguinte identificação: JPB 55421 foi depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB).

4.2. Processamento das folhas, galhos e inflorescências de *Vismia guianensis*

O material botânico foi separado e seco em estufa com ar circulante à temperatura de 40-45 °C, e em seguida triturado e moído em moinho mecânico. Obtendo-se 2,215 Kg de pó das folhas, 1,305 Kg de pó dos galhos e 285g de pó das inflorescências

4.3. Obtenção do extrato bruto das folhas de *Vismia guianensis*

1.455g do pó das folhas foi submetido a maceração com etanol a 95%, na proporção pó: solvente (20:80) por 72 horas cada extração, foram realizadas quatro extrações até o esgotamento do material vegetal.

Após a extração, as soluções extrativas foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida a temperatura de 40-45°C obtendo-se 560,64g de extrato etanólico bruto (EEB).

4.4. Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos utilizados para o isolamento dos constituintes químicos foram Cromatografia em Coluna (CC), utilizando como fase fixa sílica gel ART 7734 da MERCK de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm e 0,04-0,063 mm, Sephadex LH20, XAD-2 e Octadecilsilano. O comprimento e as dimensões das colunas de vidro variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. O monitoramento das frações obtidas das CC foi realizado por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA). Para isso, foram utilizadas placas flexíveis Whatman AL SIL G/UV.

Os solventes orgânicos (hexano, acetato de etila e metanol) utilizados para eluição foram solventes destilados na Central de Destilação, localizada nas dependências do PgPNSB.

A visualização das substâncias aplicadas nas cromatoplasas foi feita por exposição da mesma à lâmpada de irradiação ultravioleta, em aparelho BOITTON (modelo BOIT-LUB01) em dois comprimentos de onda (254 e 366nm).

4.5. Métodos espectroscópicos

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram registrados em espectrômetros VARIAN, modelo MERCURY, operando a 200 MHz (RMN ^1H) e 50 MHz (RMN ^{13}C) e SYSTEM operando a 500 MHz (RMN ^1H) e 125 MHz (RMN ^{13}C). Os solventes utilizado na dissolução das amostras foram clorofórmio e metanol deuterados (CDCl_3 e MeOD, respectivamente), Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hz.

4.6. Obtenção e caracterização do óleo essencial das inflorescências de *Vismia guianensis*

O pó das inflorescências de *Vismia guianensis* (140,00g) foi submetido à hidrodestilação durante 9 horas, utilizando um aparelho do tipo Clevenger a temperatura de 100°C.

O líquido obtido foi separado da água em ampola de separação e, em seguida, filtrado com sulfato de sódio anidro. O óleo obtido apresentou coloração amarela e odor característico.

4.7. Caracterização do óleo essencial das inflorescências de *Vismia guianensis*

A separação, quantificação (normalização de área) e identificação das substâncias foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando por impacto de elétrons (70eV), com coluna capilar de sílica fundida OV-5 (Ohio Valley Specialty Chemical, Inc. 30,0m x 0,25mm x 0,25 μm); gás de arraste hélio (1 ml/min), injetor a 240°C, detector a 230°C, em split. 1/20. Foi injetado 1 μL da solução (1 μL do óleo essencial em 1 mL de acetato de etila - grau Cromatográfico) no seguinte programa de temperaturas: 60°C -240°C, 3°C/min.

As substâncias foram identificadas pela comparação dos espectros de massas obtidos com o do banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.), literatura (ADAMS, 2007) e índices de Retenção (IR). Para a obtenção dos IR das substâncias foi empregada uma mistura de hidrocarbonetos (C₉-C₂₄ - Sigma Aldrich 99%), analisada nas mesmas condições operacionais das amostras e aplicando-se a equação de Van den Dool & Kratz, 1963 (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963).

A análise foi realizada na UNICAMP em parceria com a Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques.

4.8. Prospecção Fitoquímica do EEB das folhas de *Vismia guianensis*

4.8.1. Pesquisa de antraquinonas

Para pesquisa de Antraquinonas livres, agitou-se 1g do material vegetal com 10 mL de éter etílico, filtrando posteriormente. A solução etérea, foi adicionado 1 mL de NaOH 0,1N, agitando em seguida. A camada aquosa deve tornar-se rósea indicando resultado positivo.

4.8.2. Pesquisa de saponinas

Dissolveu-se 2 mL do EEB em 10 mL de água purificada, em tubo de ensaio, agitou-se por um minuto e deixou-se em repouso por dez minutos. O teste é considerado positivo quando a espuma permanece após o repouso.

4.8.3. Pesquisa de alcaloides

Evaporou-se 25 mL do extrato alcoólico até secura alcalinizando-se com 0,8 mL de NaOH 1N, adicionou-se 12 mL de solução água destilada: CHCl₃ (1:1), filtrou-se em algodão e em seguida separou-se a camada clorofórmica em ampola de separação. Acidificou-se a solução clorofórmica com 6 mL de HCl 1N, agitando-se e deixando decantar até apresentar-se límpido, distribuiu-se em tubos de ensaio a solução ácida sobrenadante. Adicionou-se separadamente aos tubos os reagentes Bouchardat, Mayer, Dragendorff e ácido sílico tungstíco, a presença de alcaloides foi avaliada de acordo com a presença de precipitado.

4.8.4. Pesquisa de flavonoides

Em ampola de separação adicionou-se 15mL de extrato alcoólico, 15ml de água destilada agitando e deixando em repouso. Adicionou 15 mL de CHCl₃ e deixou-se em

reposou até a separação das camadas desprezou-se a camada clorofórmica, evaporou-se o restante até a secura e adicionou-se 13 mL de MeOH dissolvendo-se, distribuiu-se em dois tubos de ensaio e adicionou-se ao primeiro tubo 0,5ml de HCl a 10% e uma fita de magnésio, deixando-se reagir. O resultado positivo pode ser observado pela coloração rósea. O segundo tubo foi submetido a secagem em banho-maria e adicionou-se 5 gotas de acetona e 0,05 mg de ácido oxálico e a mesma quantidade da ácido bórico, secou-se novamente em banho-maria por 5 minutos, e adicionou-se 10ml de Éter etílico, observando em luz ultravioleta (UV) a presença de fluorescência.

4.8.5. Pesquisa de taninos

Evaporou-se 50 mL do extrato alcoólico até secura, adicionou-se 10 mL de água destilada, filtrou-se com algodão. Distribuiu-se em seis tubos de ensaio, adicionando nos três primeiros gelatina 0,5% e nos outros três FeCl_3 2% . Na Reação da gelatina a formação de precipitado indica a presença de taninos. Na Reação com sais de ferro o desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, enquanto a coloração verde indica a presença de taninos condensados.

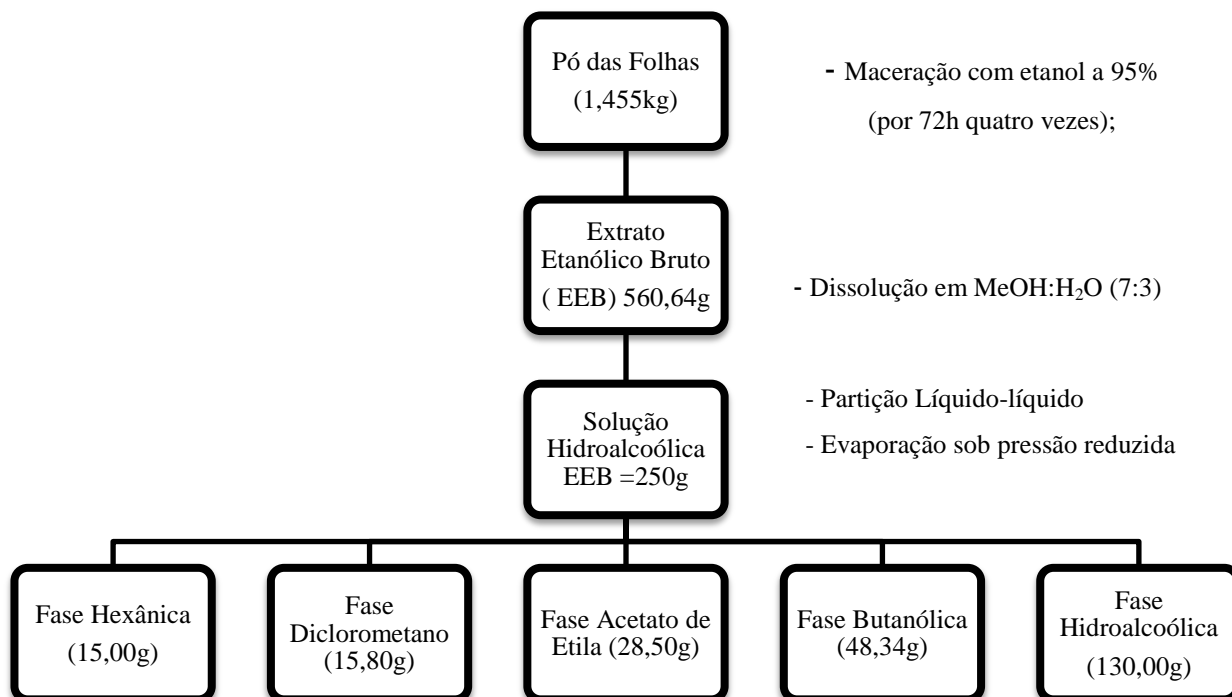
4.8.6. Pesquisa de esteroides

Evaporou-se 10 mL do extrato alcoólico até secura, adicionou-se 2,5 mL de CHCl_3 agitou-se e distribuiu-se em tubos de ensaio: 0,12; 0,25 e 0,5 mL. Em cada tubo adicionou-se 2 mL de CHCl_3 e 1mL de anidrido acético, agitou-se e adicionou-se 2 mL de H_2SO_4 em cada tubo agitando devagar, os resultados foram comparados com padrão de colesterol e um padrão negativo.

4.9. Particionamento do EEB das folhas de *Vismia guianensis*

250,0g do EEB foi dissolvida em uma solução de MeOH:H₂O (3:7) e homogeneizado sob agitação mecânica por 1 hora, obtendo-se uma solução hidroalcoólica que foi particionada separadamente e consecutivamente com hexano (Hex), diclorometano (CH_2Cl_2) , acetato de etila (AcOEt) e n-butanol em ampola de separação para obtenção de suas respectivas fases, conforme esquema 1.

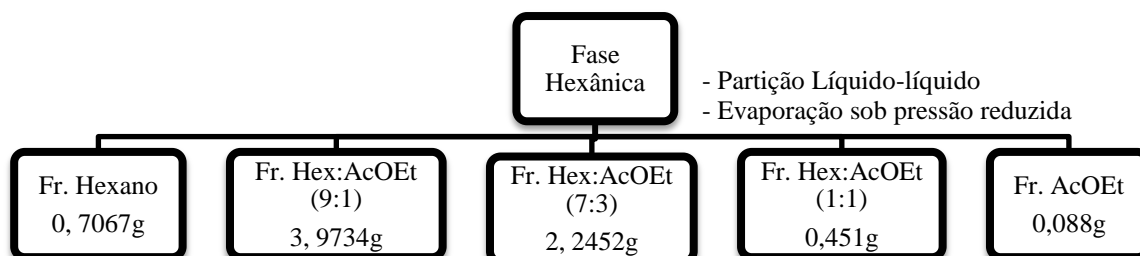
Esquema 1: Partição do EEB das folhas de *Vismia guianensis*.



4.10. Filtração da Fase Hexânica

Foi realizada em funil de Buchner sob vácuo utilizando 10g da fase hexânica, sílica gel e os solventes Hexano e Acetato de etila em diferentes proporções, conforme o esquema 2.

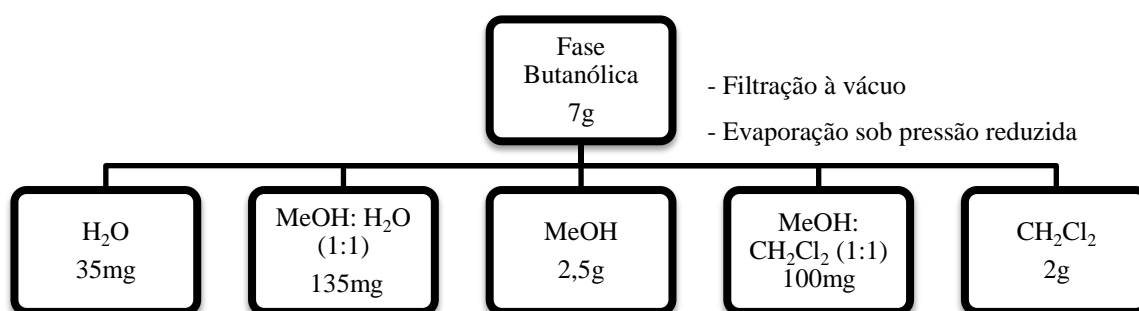
Esquema 2: Frações obtidas pela filtração da fase Hexânica em sílica gel.



4.11. Filtração da Fase Butanólica

Foi realizada em funil de buchner sob vácuo utilizando ODS (Octadecilsilano) com 7,00g da fase butanólica e os solventes H₂O, MeOH e CH₂Cl₂, em diferentes proporções, as quantidades obtidas podem ser observadas no esquema abaixo.

Esquema 3: Frações obtidas pela filtração da fase Butanólica em ODS.



4.12. Fracionamento cromatográfico das fases, frações e subfrações obtidas.

As fases, frações e subfrações foram cromatografadas em colunas, utilizando como fases estacionárias sílica gel, sílica flash, sephadex LH20 e XAD-2, e como fases estacionárias Hexano, AcOEt, CH₂Cl₂, MeOH e H₂O em diversas proporções.

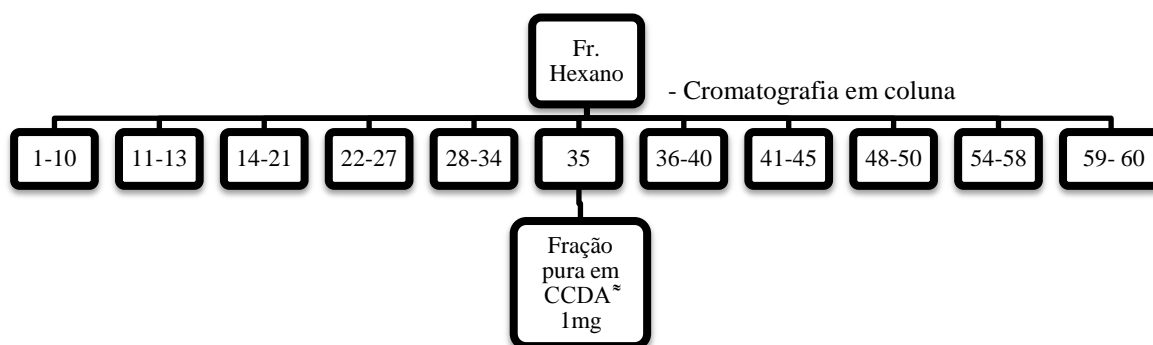
As frações foram analisadas comparativamente através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizando diferentes sistemas de eluição e reunidas, quando semelhantes, de acordo com os perfis cromatográficos, após análise à luz UV.

4.12.1. Fracionamento da fração Hexano

Realizado em coluna utilizando sílica flash como fase estacionária e como eluentes, Hexano, AcOEt e MeOH sozinhos e em misturas binárias por ordem crescente de polaridade. Obteve-se 60 subfrações reunidas por semelhança conforme aspecto da CCDA observada em luz UV, pode-se observar as subfrações reunidas no esquema 4.

A subfração 35 apresentou-se pura em CCDA, no espectro de RNM ¹H, apresentou picos característicos de antraquinona, no entanto devido à pequena quantidade não foi possível completar o processo de identificação.

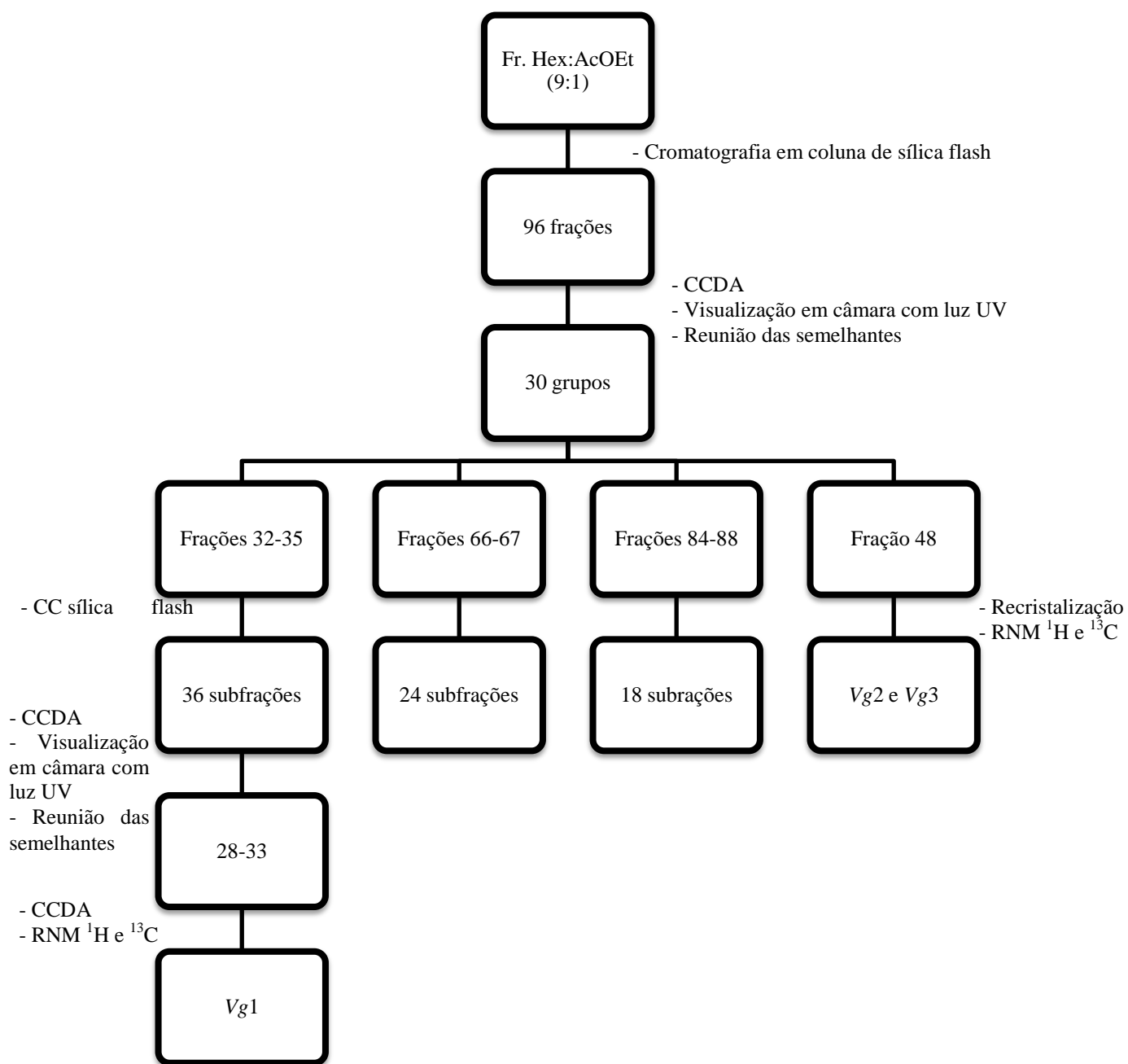
Esquema 4: Fracionamento cromatográfico da fração Hex (500mg) da Fase Hex em coluna de sílica flash (1,5g) (FHC1).



4.12.2. Fracionamento da fração Hex:AcOEt (9:1)

Realizado em coluna utilizando sílica flash como fase estacionária e como eluentes, Hexano, CH_2Cl_2 e MeOH sozinhos e em misturas binárias por ordem crescente de polaridade. Obteve-se 96 subfrações reunidas em 30 grupos, por semelhança conforme aspecto da CCDA observada em luz UV. As subfrações 32-35, 66-67 e 84-88 foram recromatografadas e a partir da cromatografia sucessiva das subfrações 32-35 obteve-se Vg1. A subfração 48 foi recristalizada e retirou-se a parte solúvel o precipitado cristalizado foi submetido a análise por espectro de RNM ^1H e ^{13}C , e identificadas como Vg2 e Vg3, como pode-se observar as no esquema 5.

Esquema 5: Fracionamento cromatográfico da fração Hex:AcOEt (9:1), (3,5g).



4.12.3. Fracionamento da fração Hex:AcOEt (1:1) e AcOEt .

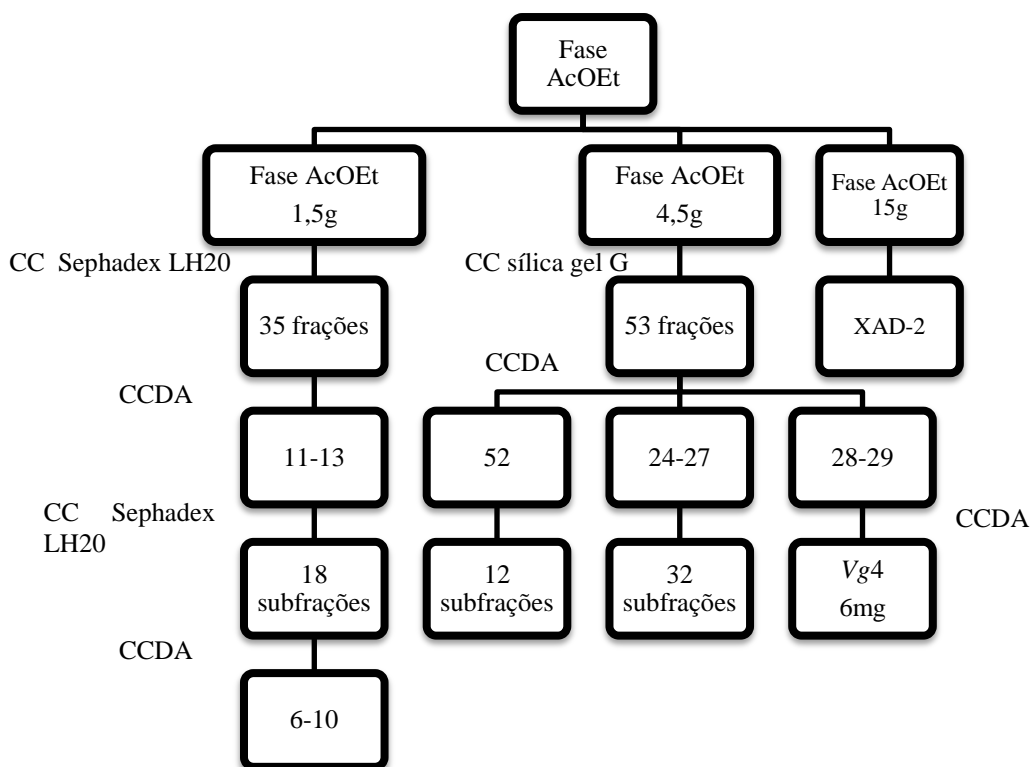
As frações Hex:AcOEt (1:1) e AcOEt foram avaliadas em CCDA e reunidas devido a sua semelhança, obteve-se 539 mg que foram cromatografadas utilizando sílica gel G como fase estacionária e como eluentes Hexano, CH₂Cl₂ e MeOH, sozinhos e em misturas binárias por ordem crescente de polaridade, foram obtidas 61 frações.

4.12.4. Processamento cromatográfico da fase AcOEt

Parte da Fase AcOEt (1,5g) foi submetida a cromatografia em coluna em sephadex LH 20, tendo como eluente MeOH, obteve-se 35 frações, as quais foram reunidas e as subfrações 11-13 foram cromatografadas novamente em em sephadex LH 20, obtendo-se 18 subfrações, das quais da 6-10 mostraram-se puras em CCDA.

Outra porção da fase AcOEt foi cromatografada em sílica gel G, obtendo-se 53 frações, sendo a 51-53 obtidas por filtração para recuperar parte do material pois as substâncias impregnaram no adsorvente. As frações 28-29 mostram-se semelhantes e puras em CCDA e foram codificadas como Vg4, as frações 24-27 foram reunidas e recromatografadas em sílica gel G obtendo-se 32 subfrações, no entanto nenhuma pura, a fração 52 foi submetida a cromatografia em coluna com Sephadex LH20 como fase estacionária, obtendo-se 12 frações. Para melhor compreensão segue o esquema do processamento dessa fase.

Esquema 6: Processamento cromatográfico da fase AcOEt.



CCDP

Foi observado a presença de compostos fenólicos na fração AcOEt e para separá-los optou-se por realizar cromatografia em coluna utilizando XAD-2 como fase

estacionária e como eluentes, H₂O, MeOH, Acetona, AcOEt e Hexano, as quantidades obtidas pode ser observadas na tabela abaixo.

Tabela 1: Fracionamento cromatográfico da fase AcOEt (15 g) em XAD-2 para separação de compostos fenólicos.

Sistema de eluição	Quantidade
H ₂ O	1 L***
MeOH:H ₂ O (3:7)	0,8 L***
MeOH:H ₂ O (1:1)	0,5 L***
MeOH	2 g
Acetona	72mg
AcOEt	8,3mg
Hex	132mg
MeOH	2 mg

*** Aguardando liofilização, no caso das fases contendo MeOH, o solvente orgânico foi evaporado.

A fase CH₂Cl₂ ,foi cromatografada em sílica gel G obtendo-se 79 frações as quais foram reunidas por semelhança, algumas frações foram submetidas a RNM ¹H, não apresentaram picos de interesse.

4.13. Fitoquímica das Inflorescências de *Vismia guianensis*

O pó das inflorescências (145,0 g) foi submetido a extração em sohxlet com Hexano, Acetato de etila e Metanol até exaustão.

O extrato hexânico das inflorescências foi submetido a cromatografia em coluna utilizando sílica flash como fase estacionária e Hexano, Acetato de etila, Diclorometano e Metanol puros e em misturas binárias em ordem crescente de polaridade como eluentes. Foram obtidas 61 frações, as quais foram cromatografadas em CCDA e reunidas de acordo com a semelhança observada sob UV. A fração 14 foi submetida a cromatografia em coluna também em sílica flash para purificação, obteve-se cristais amarelos visualmente puros em CCDA.

As frações 23-26 da foram reunidas e 69 mg foram aplicadas em placa cromatográfica para CCDP (Cromatografia em Camada Delgada Preparativa)

utilizando-se como eluente Hex:CH₂Cl₂ (75:25), obtendo-se faixas que podem ser visualizadas na figura abaixo:

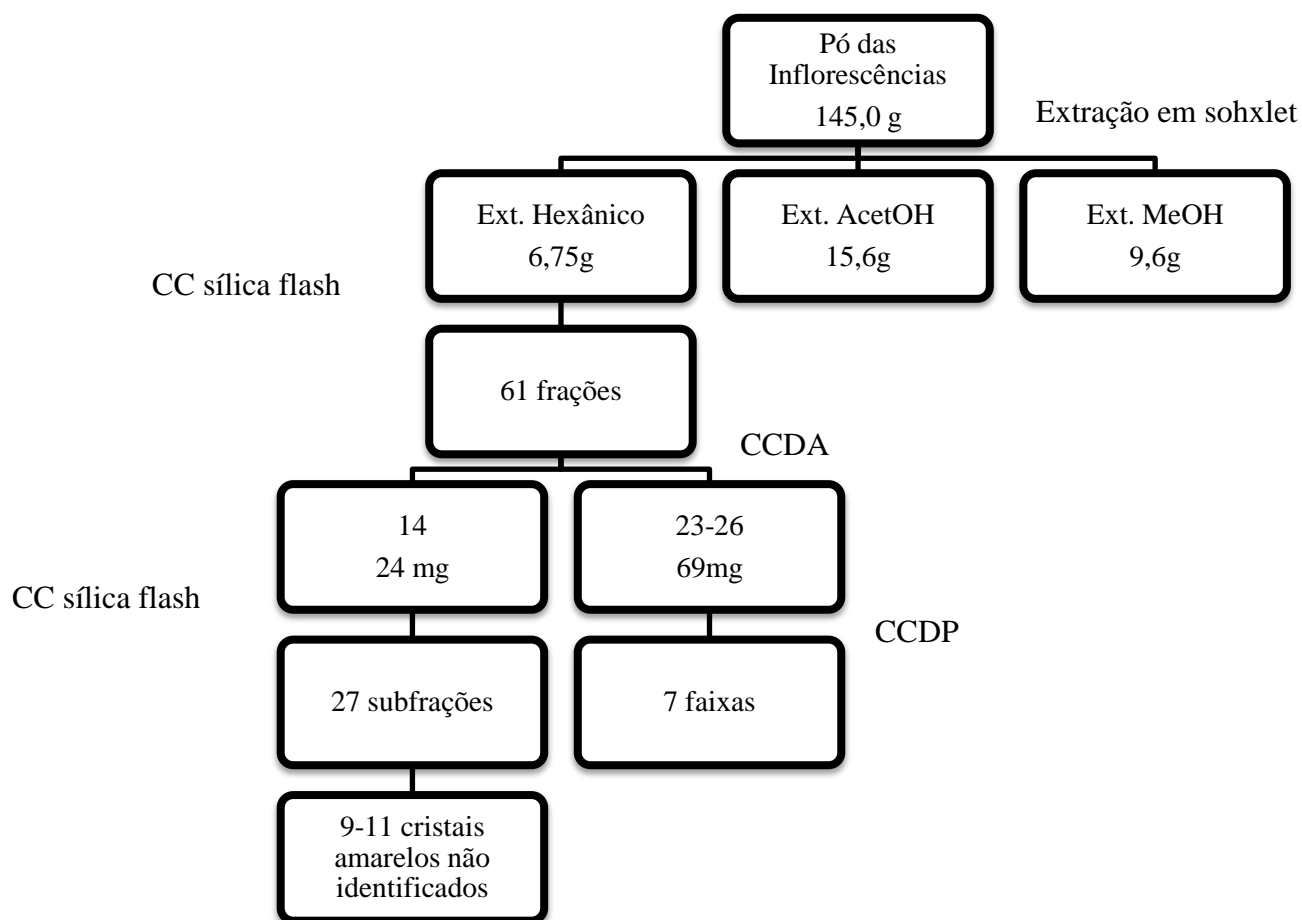


Figura 6: CCDP das frações 23-26 provenientes da cromatografia do extrato hexânico das inflorescências e *V. guianensis*.

As faixas obtidas foram raspadas e filtradas em funil de placa porosa, a solução resultante foi evaporada, as frações foram etiquetadas, pesadas, analisadas por CCDA (Cromatografia em Camada Delgada Analítica) e levadas para análise por RNM¹H, devido a pequena quantidade os sinais não foram detectados.

Para melhor entendimento observar o esquema abaixo:

Esquema 7: Esquema da extração e fracionamento do extrato hexânico das inflorescências da *Vismia guianensis*.



4.14. Avaliação da atividade antimicrobiana

4.14.1. Linhagens bacterianas

Para os testes de atividade antibacteriana foram utilizadas linhagens Gram positivas e Gram negativas oriundas de coleções de referência (ATCC - American Type Culture Collection):

- ✓ *Escherichia coli* ATCC 2536;
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 8539;
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027;

- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23242;
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25619;
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25925.

4.14.2. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial das inflorescências da *Vismia guianensis* frente a bactérias de importância clínica

A atividade antibacteriana foi avaliada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição descrita por Eloff (1998). A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição utilizando-se placas de 96 orifícios e fundo em “U” para cada uma das cepas avaliadas. Para tanto, diluições a metade de uma solução do produto teste (512 – 4 µg) foram adicionadas a uma suspensão (1×10^{-2} UFC/mL) das diferentes linhagens bacterianas em meio Luria Bertani - LB (extrato de levedura (DIFCO) 10 g, triptona (DIFCO) 5 g, NaCl (VETEC) 10 g para 1 L).

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. O crescimento bacteriano foi confirmado após a adição de resazurina 0,1 % (SIGMA) e incubação a 37 °C por 30 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata e foi considerada como CIM a menor concentração do óleo essencial das inflorescências da *Vismia guianensis* que inibiu completamente o crescimento bacteriano (DEVIENNE e RADDI, 2002).



*Resultados
e Discussão*

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Prospecção Fitoquímica

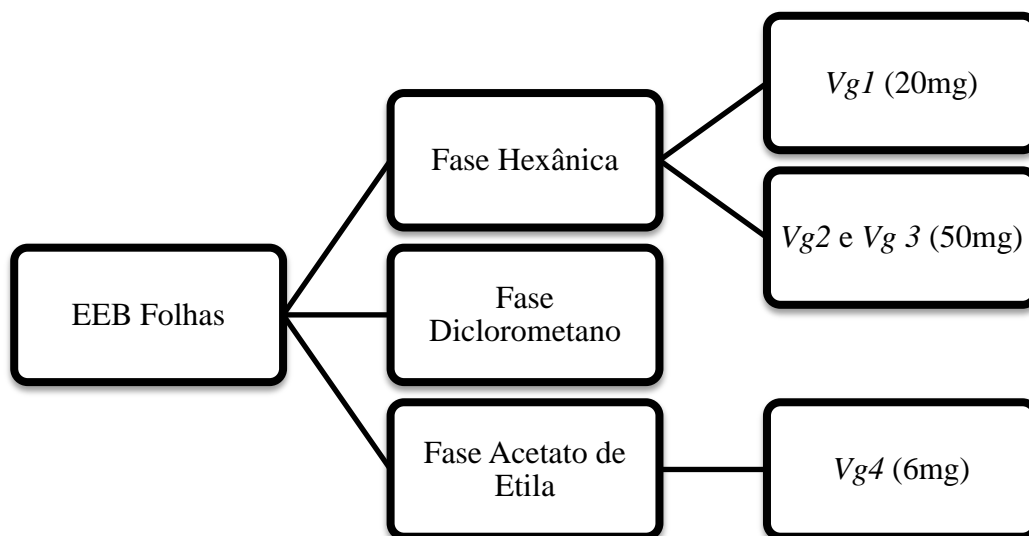
O EEB apresentou resultado positivo para as seguintes classes de metabólitos: taninos, flavonóides, saponinas, esteroides e antraquinonas (foi realizado apenas teste para antraquinonas livres) e negativo para alcaloides corroborando com os resultados obtidos por Oliveira (2009) em extratos das cascas e folhas da *Vismia guianensis*.

Camelo et al (2011) relatou a presença de saponinas, açúcares redutores, taninos, flavonoides, xantonas, alcaloides, esteroides e triterpenos em estudo utilizando o extrato liofilizado da planta.

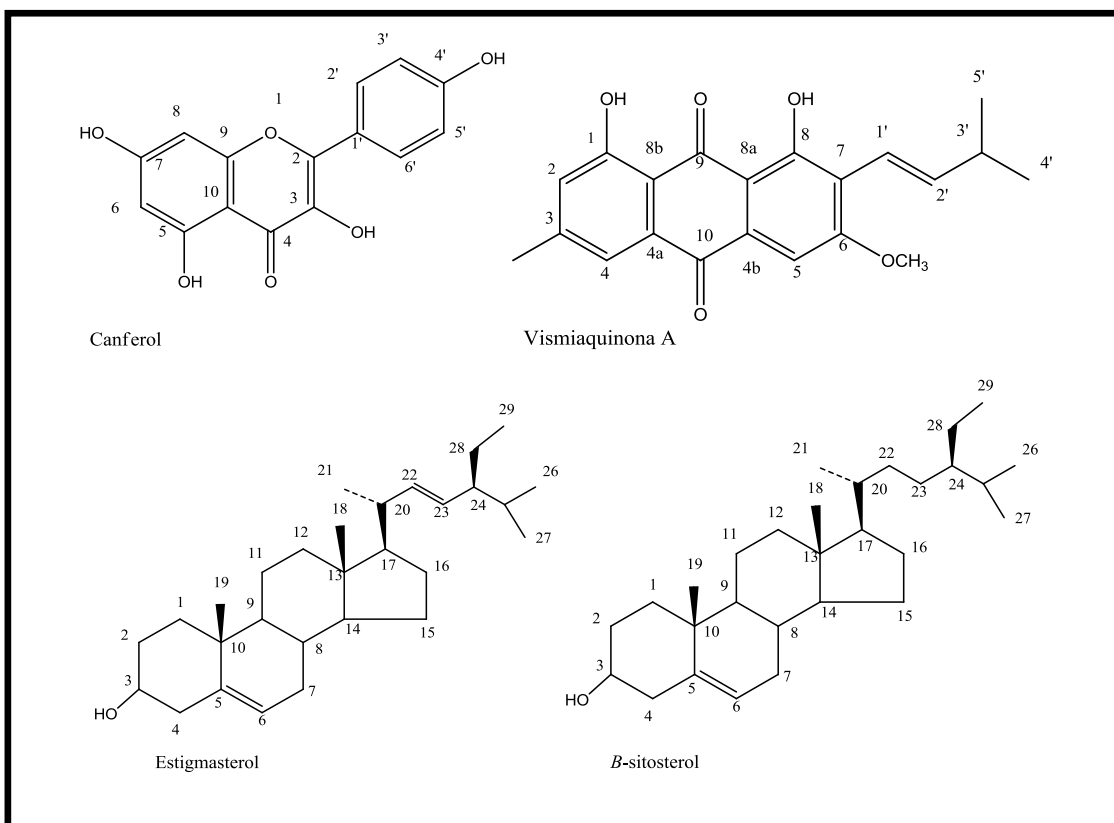
5.2. Substâncias isoladas de *Vismia guianensis*

Das folhas de *Vismia guianensis* foram isoladas e identificadas quatro substâncias, codificadas de *Vg1*, *Vg2*, *Vg3* e *Vg4*. O Esquema 8 permite a visualização resumida do processo de obtenção das mesmas, e o Quadro 4 mostra as estruturas das substâncias isoladas.

Esquema 8: Resumo da obtenção das substâncias isoladas das folhas de *Vismia guianensis*



Quadro 4: Substâncias isoladas da *Vismia guianensis* nesse estudo



5.2.1. Elucidação estrutural de *Vg1*

Foi isolada da fração Hex:AcOEt (9:1) da fase hexânica das folhas de *Vismia guianensis* cerca de 20mg de cristais em forma de agulhas vermelho-alaranjadas e com ponto de fusão em 194°C. A substância *Vg1* apresentou no espectro de RNM¹H (500 MHz, CDCl₃) e suas expansões (Figura 8 - 10 nas páginas 55 - 57) sinais em 12,86 (s, 1H) e 12,03 (s, 1H) característicos de hidroxila em ponte, comumente encontrados em antraquinonas. Na região de aromáticos observou-se sinais, dois duplo dubletos e um singlete todos com integral para um hidrogênio cada (7,54 (dd, $J = 1,7, 0,7$ Hz, H-4), 7,32 (s, H-5), 7,00 (dd, $J = 1,7, 0,7$ Hz, H-2), levando-se a sugerir que *Vg1*, quando comparado a dados da literatura (NAGEM e OLIVEIRA, 1997; ALVAREZ, 2008) possui núcleo antraquinônico substituído nas posições C-1, C-3, C-6, C-7 e C-8 (Tabela 2, pág. 53).

Na região de hidrogênios olefínicos foram definidos dois duplos dubletos em δ_H 6,88 (H-2') e δ_H 6,60 (H-1') ambos acoplando trans com $J = 16,00$ Hz. As constantes de acoplamento para H-1' igual a 1,3 Hz, como também para H-2' em $J=7,0$ Hz, propõem que estes hidrogênios acoplam também com os hidrogênios de grupo prenila em δ_H 2,50 (tdd, $J = 13,7$ e $7,0$ Hz, H-3') e as δ_H 1,12 (d, $J = 7,0$ 6H CH₃-4' e 5'),

acoplado com o H-3'. Estes dados e comparações com dados da literatura (NAGEM e OLIVEIRA, 1997; ALVAREZ, 2008) permitiram propor que *Vgl* possui um radical isoprenoidico.

No espectro de RMN de ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3) (Figura 11), pode-se observar deslocamentos em 191,27, 181,69 são característicos de carbonila de antraquinonas, δ_{C} 162,91, 162,39 e 162,00 indicam a presença de três carbonos oxigenados, δ_{C} 22,44, 22,12 sugere a presença de carbonos metílicos corroborando com a presença dos sinais em 2,40 e 1,12 presentes no RNM^1H e δ_{C} 56,26 relativo a carbono metoxílico, corrobora como sinal em 4,00 correspondente a uma metoxila.

No espectro de NOESY é possível verificar a interação entre os hidrogênios em δ_{H} 7,54 e 7,00 com os hidrogênios da metila em 2,40, confirmando a metila na posição 3, e dos δ_{H} 6,60 e o δ_{H} 6,88 com δ_{H} 1,12 e δ_{H} 1,10. Pode-se também observar a interação entre o δ_{H} 7,34 e o δ_{H} 4,00 correlacionando o esse *singleto* à metoxila. No espectro de COSY pode-se observar correlação entre os *duplo dubletos* δ_{H} 6,60 e o δ_{H} 6,88 sugerindo acoplamento.

No espectro de HMBC observa-se correlação entre o *dublete* de metilas em δ_{H} 1,12 e os carbonos δ_{C} 146,67, 22,43 e 33,37, da metoxila em δ_{H} 4,00 com o carbono δ_{C} 162,91 e dos hidrogênios das hidroxilas δ_{H} 12,86 com os carbonos δ_{C} 110,43, 119,93 e 162,91 e δ_{H} 12,03 com os carbonos δ_{C} 113,64, 124,32 e 162,38. No HMQC observou-se as correlações entre os hidrogênios aromáticos e seus respectivos carbonos δ_{H} 7,54 com δ_{C} 121,03 e δ_{H} 7,32 com δ_{C} 103,30.

Antranoides são utilizados como marcadores taxonômicos da tribo Vismieae (*Vismia*, *Harungana* e *Psorospermum*), o gênero *Vismia* geralmente possui antraquinonas com um grupamento metila na posição C-6 e dois grupamentos hidroxila nas posições C-1 e C-8 (TALA, 2013) corroborando com a proposta. Os dados de RNM^1H e RNM^{13}C uni e bidimensionais permitem sugerir que *Vgl* trata-se da 1,8-dihidroxi-3metil-6-metoxi-7-isopentenil-antraquinona, conhecida como Vismiaquinona A, considerada uma antraquinona típica desse gênero.

A Vismiaquinona A já foi isolada na espécie e em outras espécies desse gênero, entre elas *Vismia reirchartiana* (GONCALVES e MORS, 1981), *Vismia japurensis* (MIRAGLIA et al., 1981), *Vismia martiana* (NAGEM e FARIA, 1990), *Vismia parviflora* (NAGEM e De OLIVEIRA, 1997), *Vismia baccifera* (HUSSEIN et al., 2003; SALAS et al., 2008) e *Vismia laurentii* (NGUEMEVING et al., 2006; WABO et al., 2007) .

Tabela 2: Dados de RMN uni e bidimensionais de *Vgl* (δ , CDCl₃ 500 e 125 MHz), comparados com a literatura (ALVAREZ, 2008).

<i>Vgl</i>					Vismiaquinona A	
	δ_C	δ_H	HMBC	HMQC	δ_C	δ_H
1	162,38	-			163,1	-
2	124,32	7,00 (dd, $J = 1,7; 0,7$ Hz, 1H)	Me-3, C4, C8b	C2	124,8	7,00(s, 1H)
3	148,34	-			148,9	-
4	121,03	7,54 (dd, $J = 1,7; 0,7$ Hz, 1H)	C2, C8b, Me-3, C10	C4	121,5	7,46(s, 1H)
4a	131,97	-			131,9	-
4b	133,12	-			133,0	-
5	103,30	7,32 (s, 1H)	C4a, C8a, C7, C10	C5	110,4	7,55(s, 1H)
6	162,91	-			162,5	-
7	119,93	-			114,0	-
8	162,00	-			162,9	-
8a	110,43	-			110,3	-
8b	113,64	-			116,2	-
9	191,27	-			191,1	-
10	181,70	-			182,6	-
1'	115,77	6,60 (dd, $J = 16,00; 1,3$ Hz, 1H)	C8, C3'	C1'	132,3	6,59(d, $J = 16,2$)
2'	146,67	6,88 (dd, $J = 16,00; 7,0$)Hz, 1H)	C7, C4', C5', C3'	C2'	147,2	6.81(dd $J = 7,0; 16,2$)
3'	33.37	2,50 (tdd, $J = 13.65, 7,0, 1,3$ Hz, 2H)		C3'	33,8	2.40(m, 3H)
4'	22,43	1,12 (d, $J = 7,0$ Hz, 6H)	C5', C3', C2' C4', C5'	C4', C5'	22,8	1,07(d, $J = 6,7$ Hz,6H)
5'						
OH-8	-	12,86 (s, 1H)	C8a, C6, C7		-	12,06(s, 1H)
OH-1	-	12,03 (s, 1H)	C8b, C8, C2		-	12,89(s, 1H)
Me-3	22,12	2,40 (s, 3H),	C3, C4, C2	Me-3	22,6	2,40(s, 3H)
MEO	56,26	4,00 (s, 3H)	C6	MeO	56,7	3,98(s, 3H)

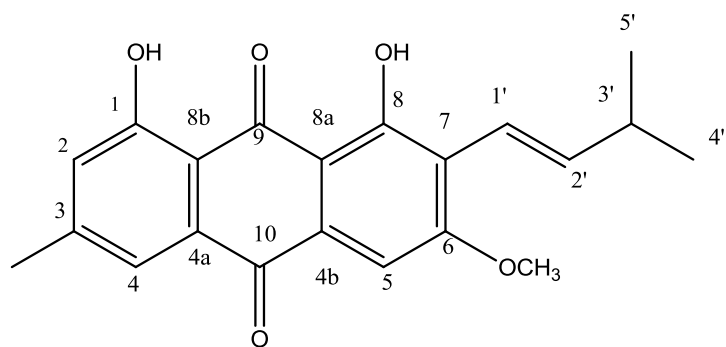


Figura 7: Estrutura de *Vg1*, Vismiaquinona A

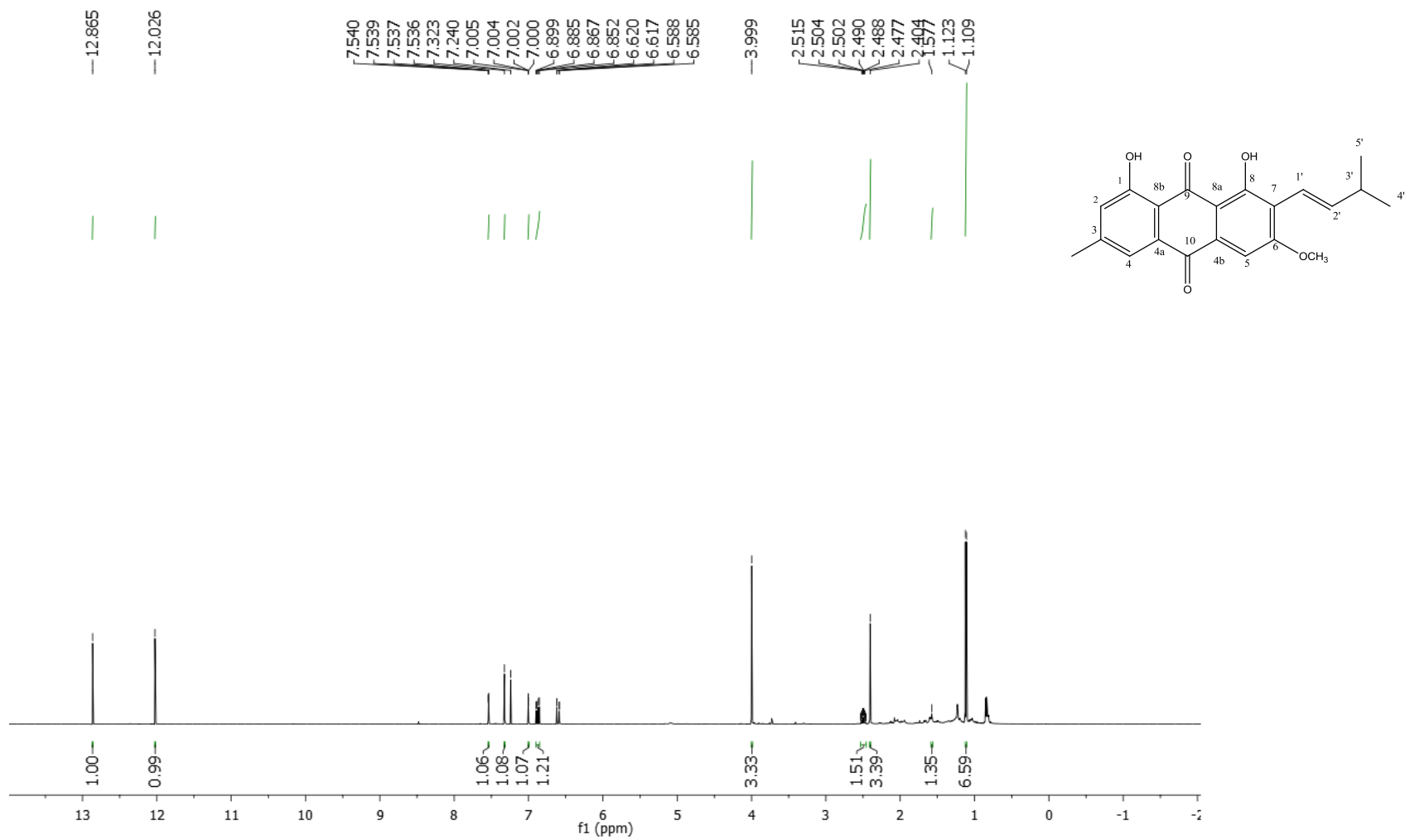


Figura 8: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de Vg1

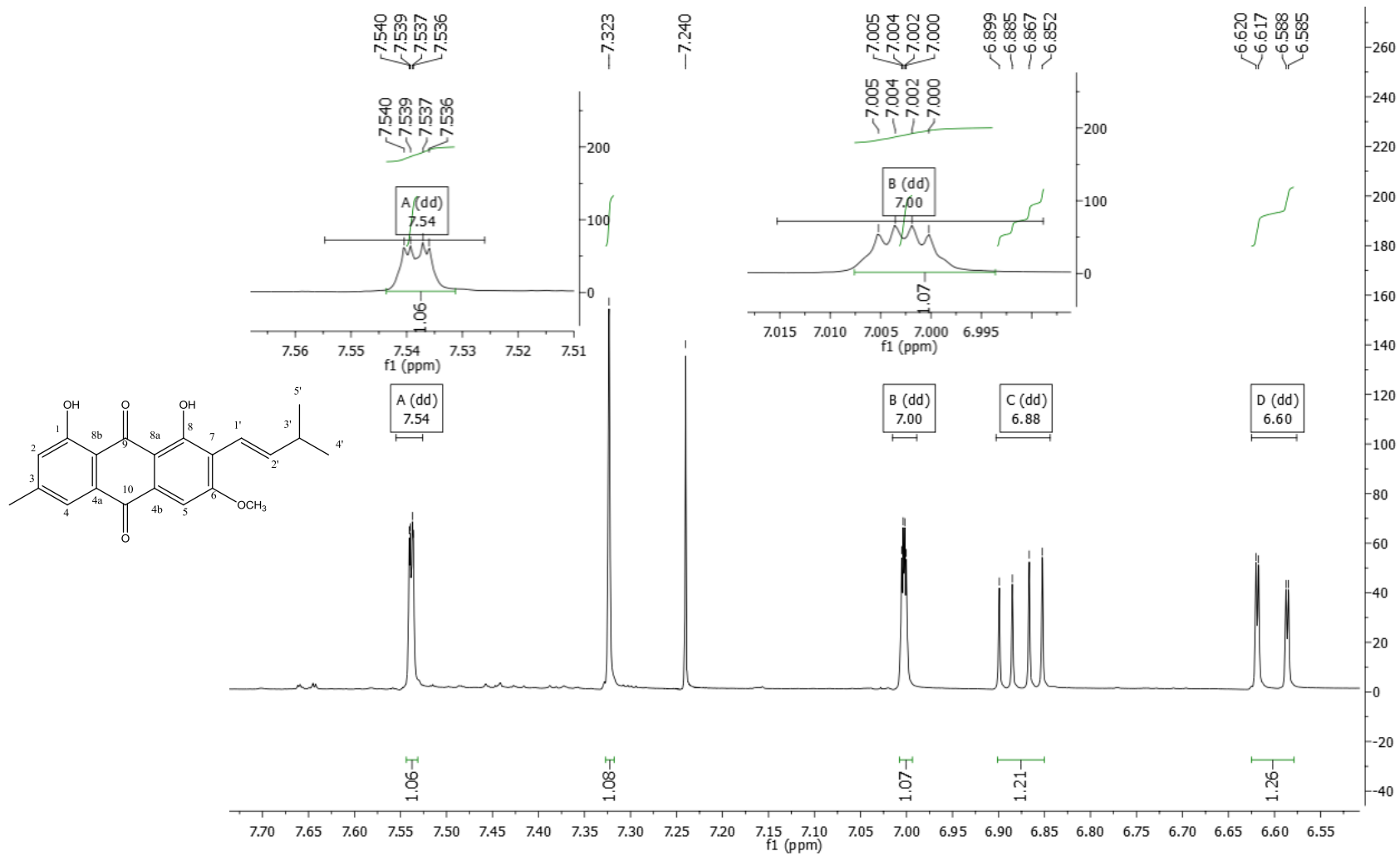


Figura 9: Expansão do espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de Vg1 na região de 7.70-6.55 ppm com mini expansões.

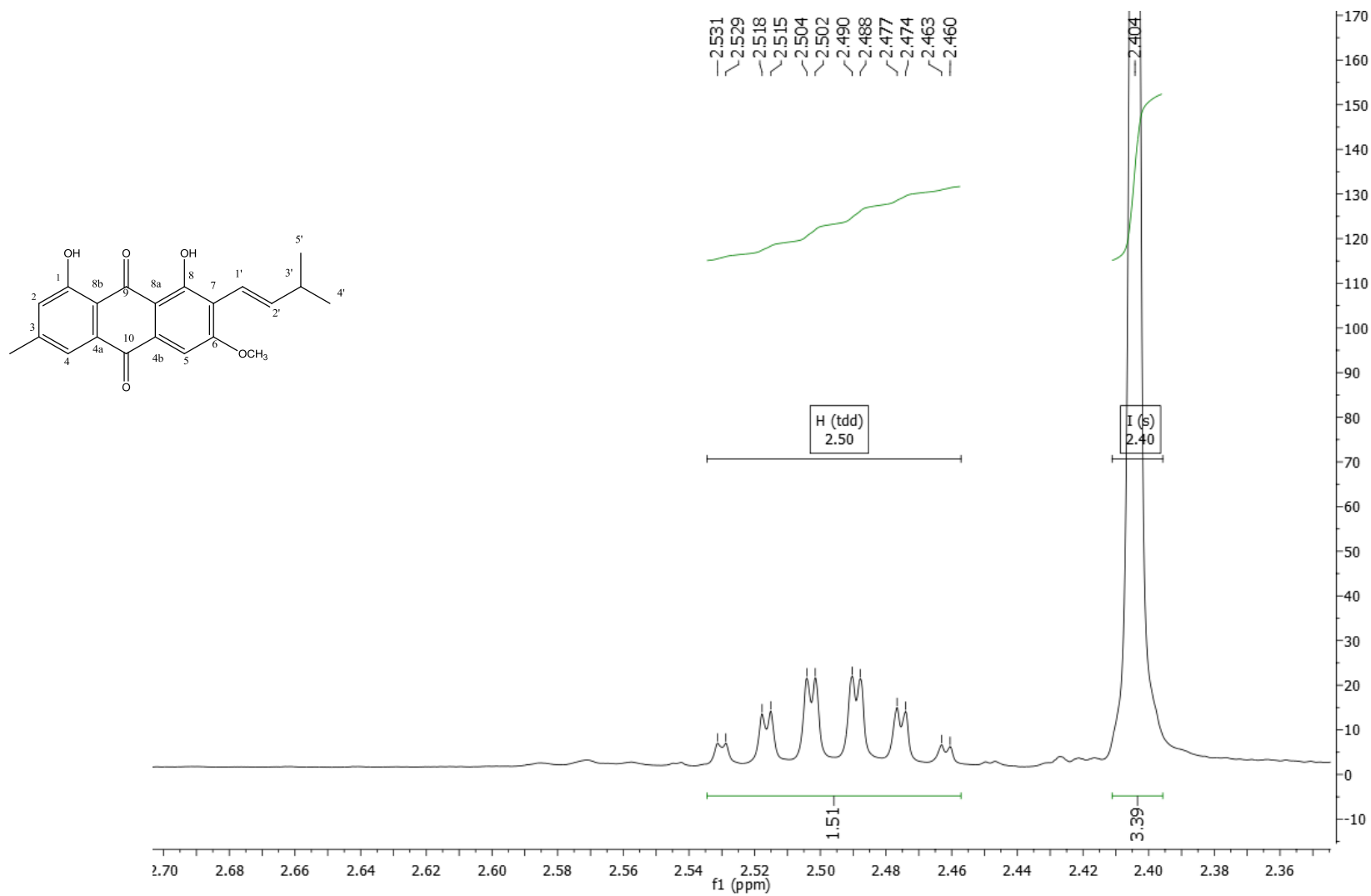


Figura 10: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *VgI* na região de 2.70-2.36 ppm.

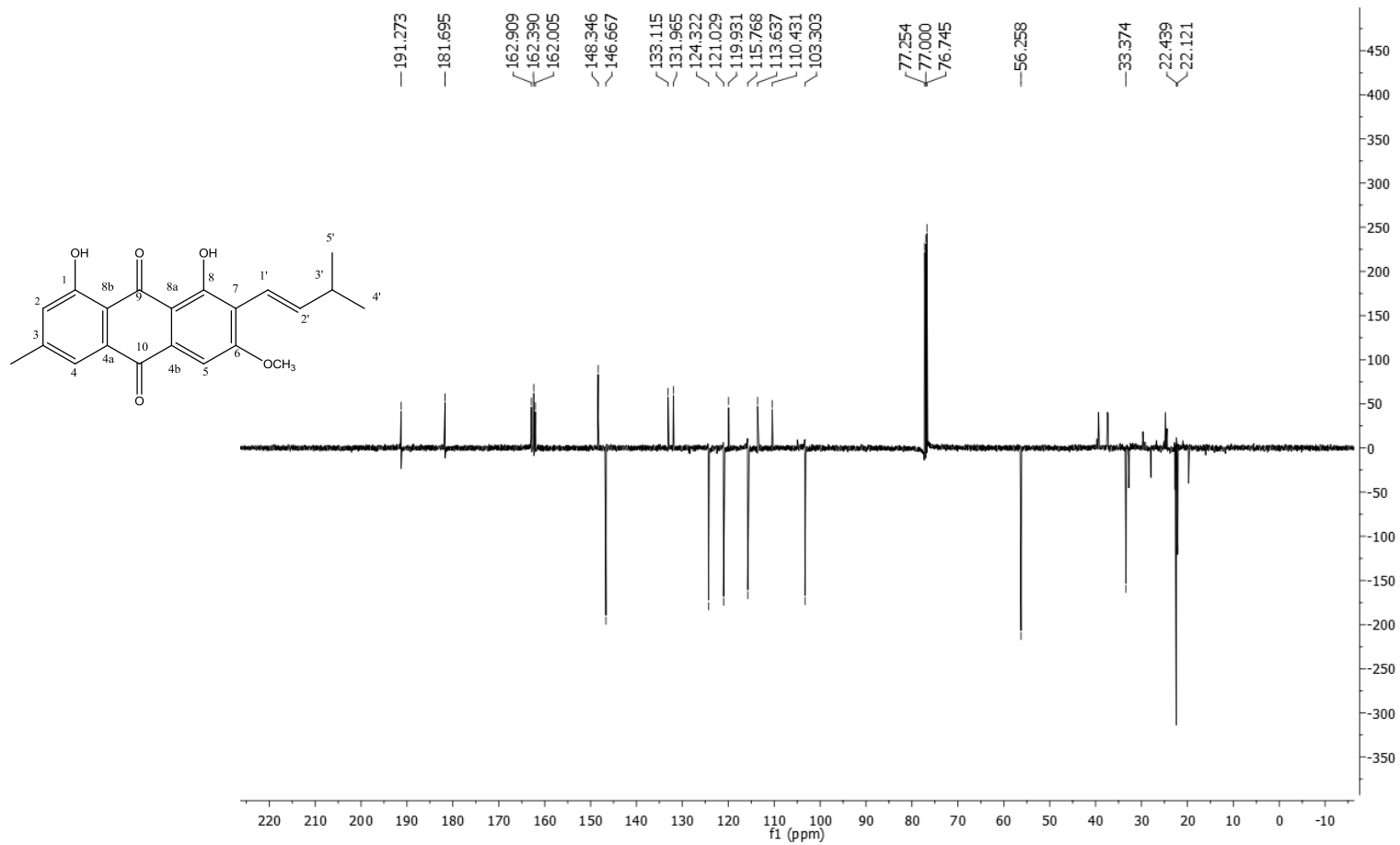


Figura 11: Espectro de RMN de 13C (125 MHz, CDCl₃) – APT de *Vgl*.

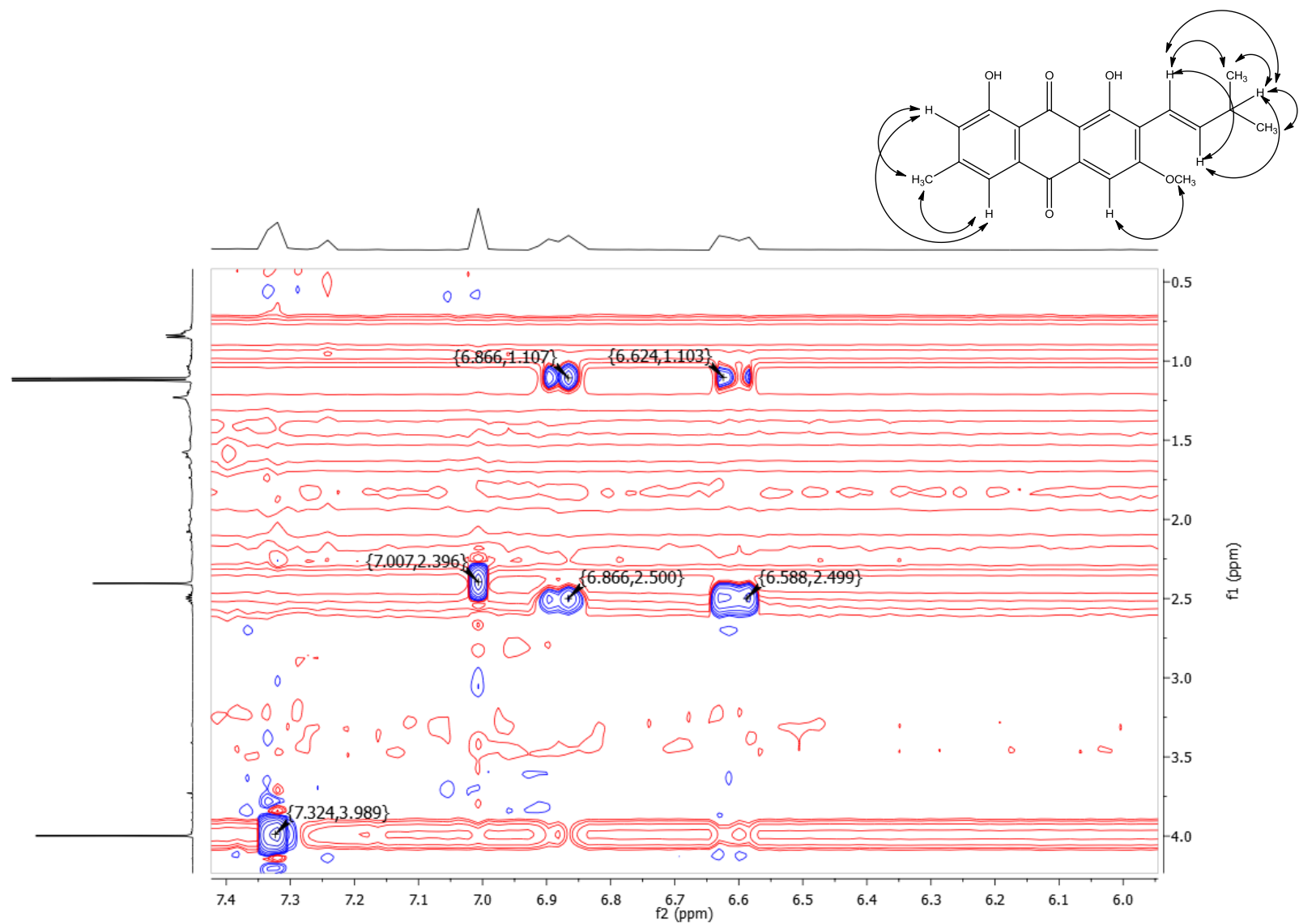


Figura 13: Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl₃) de *VgI* na região de (7.4 -6.0 ppm) x (0.5-4.0 ppm).

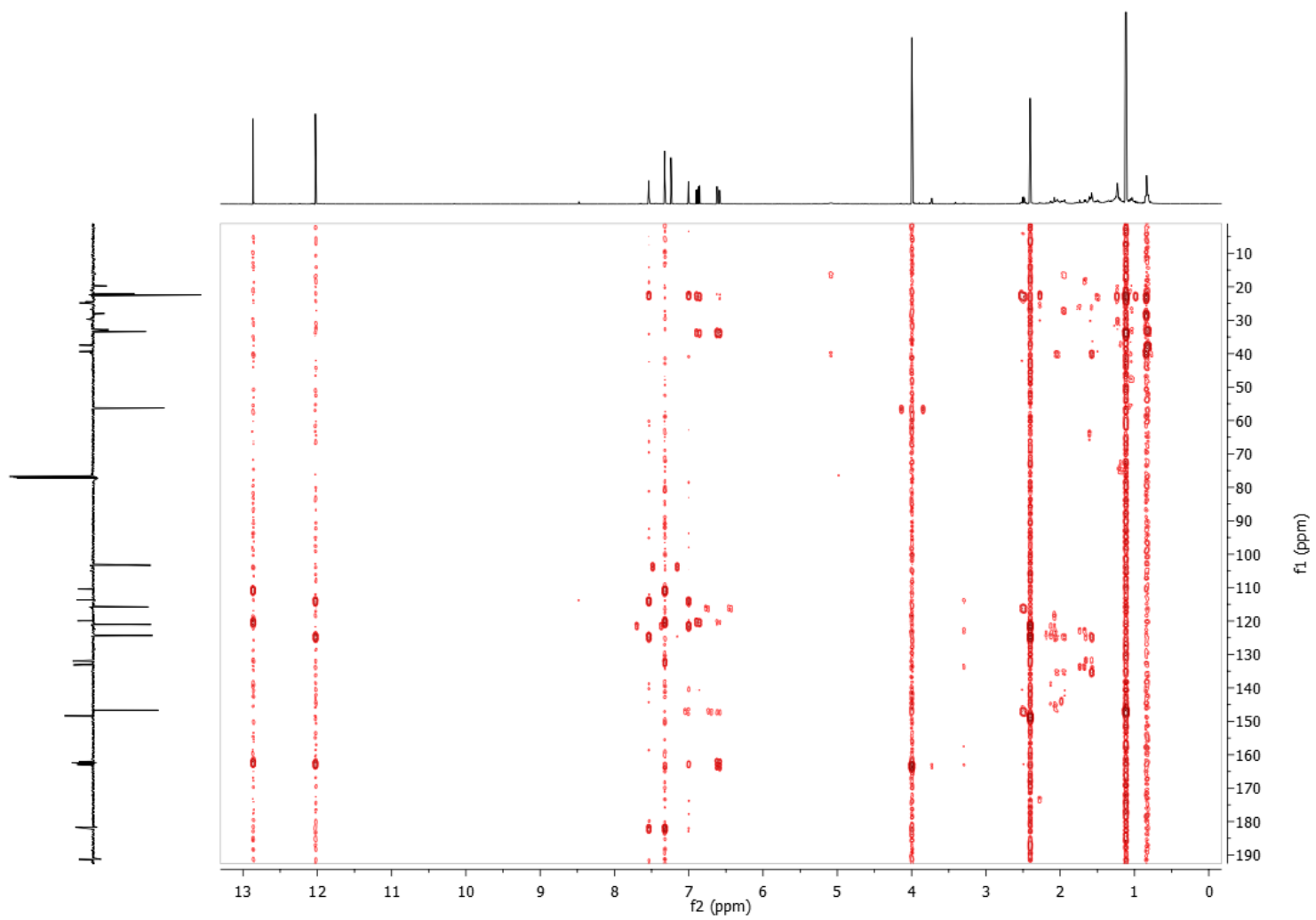


Figura 14: Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl₃) de *VgI*

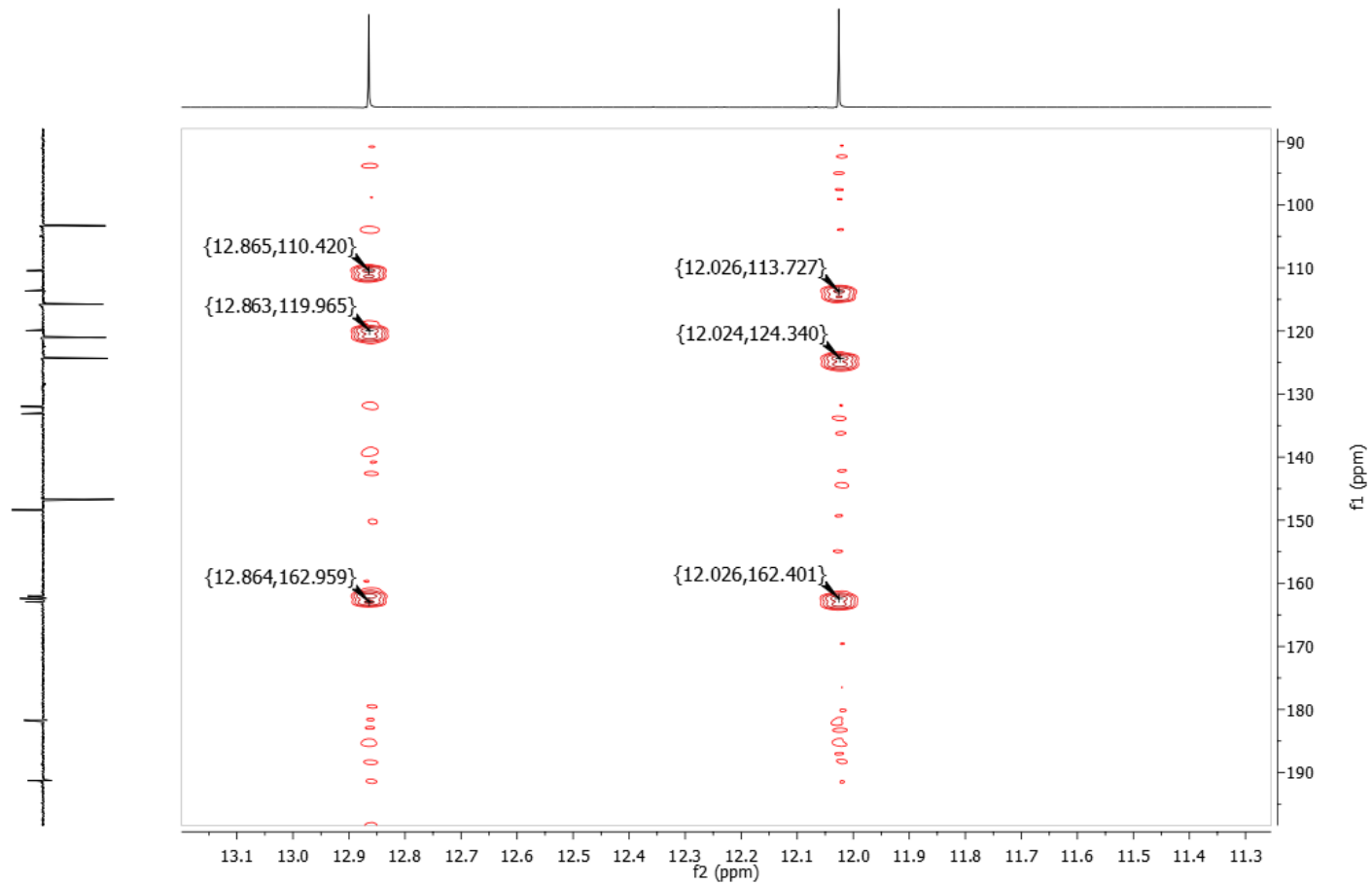


Figura 15: Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl₃) de *VgI* na região de (13.3- 11.5 ppm) x (100-180 ppm)

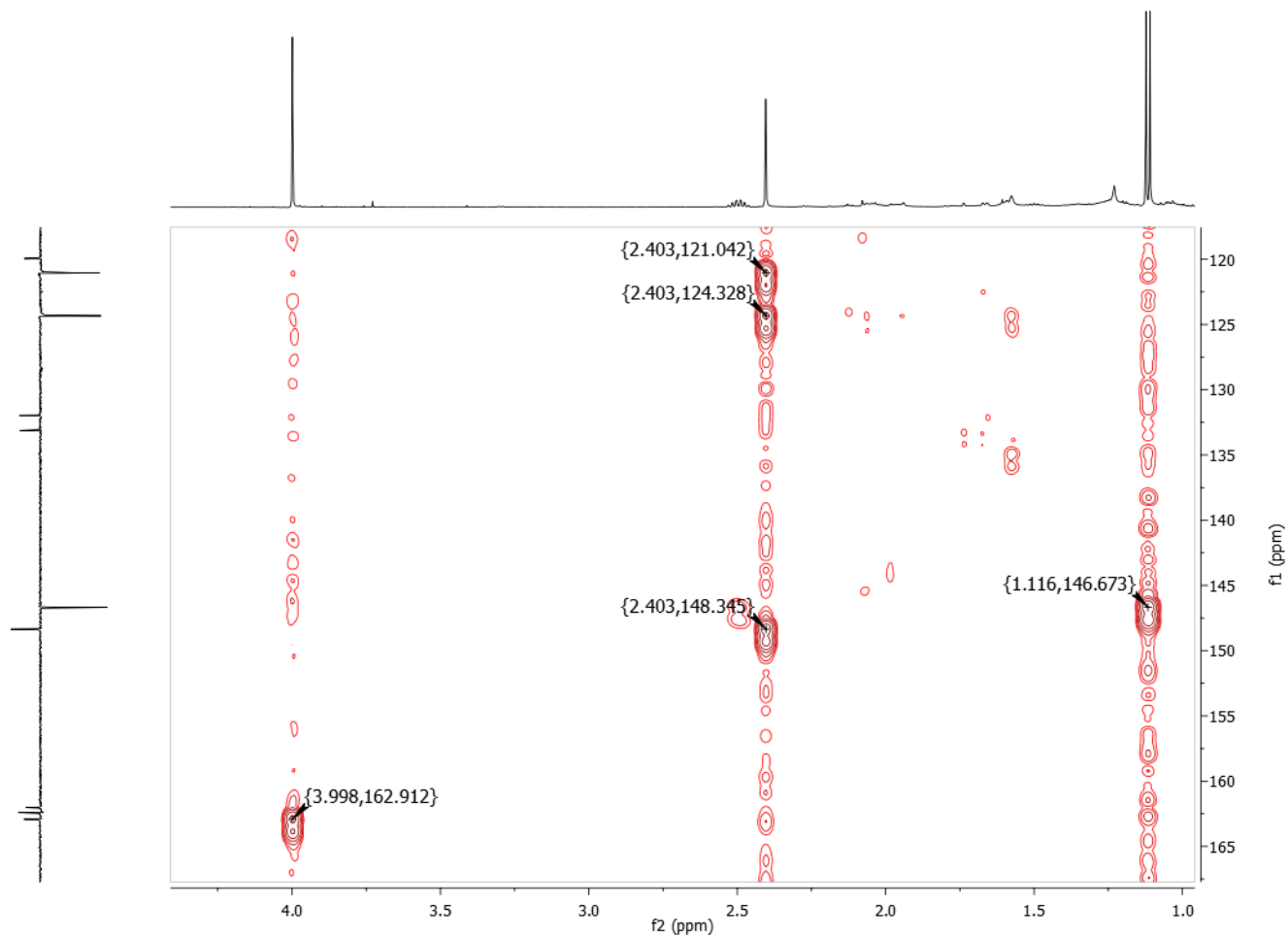


Figura 16: Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl₃) de *Vg1* na região de (2.8- 0.8 ppm) x (105-155 ppm)

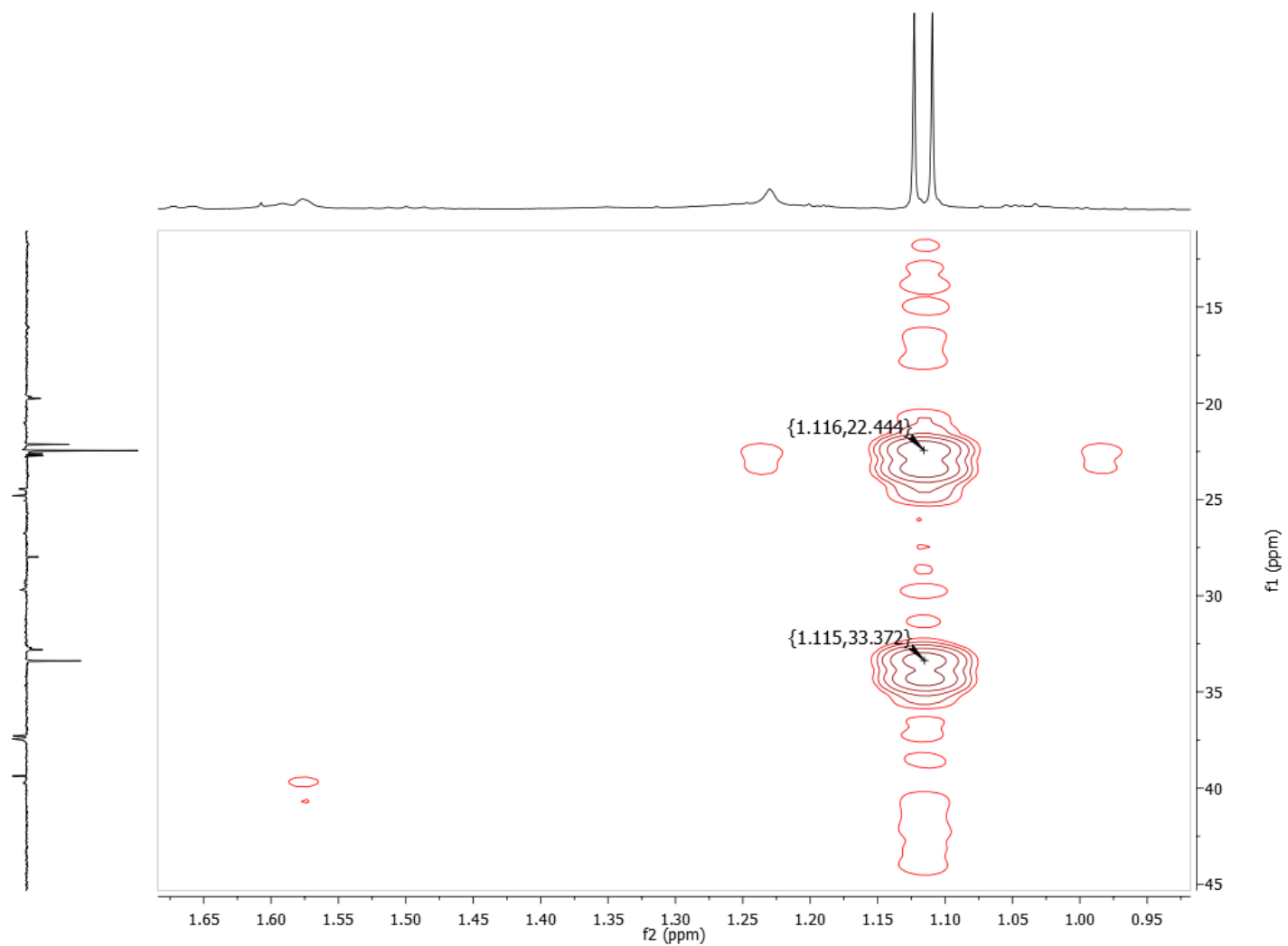


Figura 17: Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *VgI* na região de (1.65- 0.95 ppm) x (15-45 ppm)

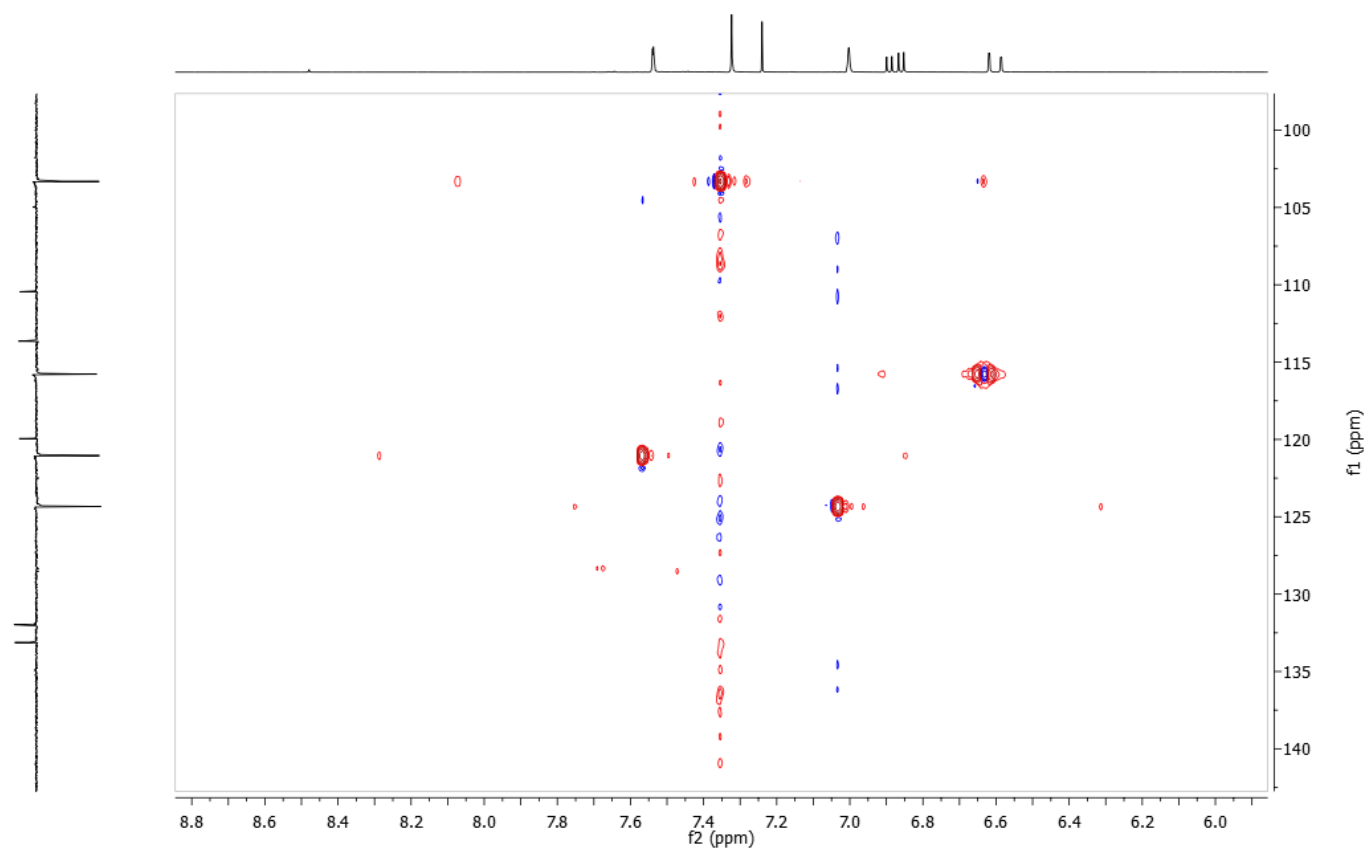


Figura 18: Espectro HMQC (500 e 125 MHz, CDCl₃) de *VgI*.

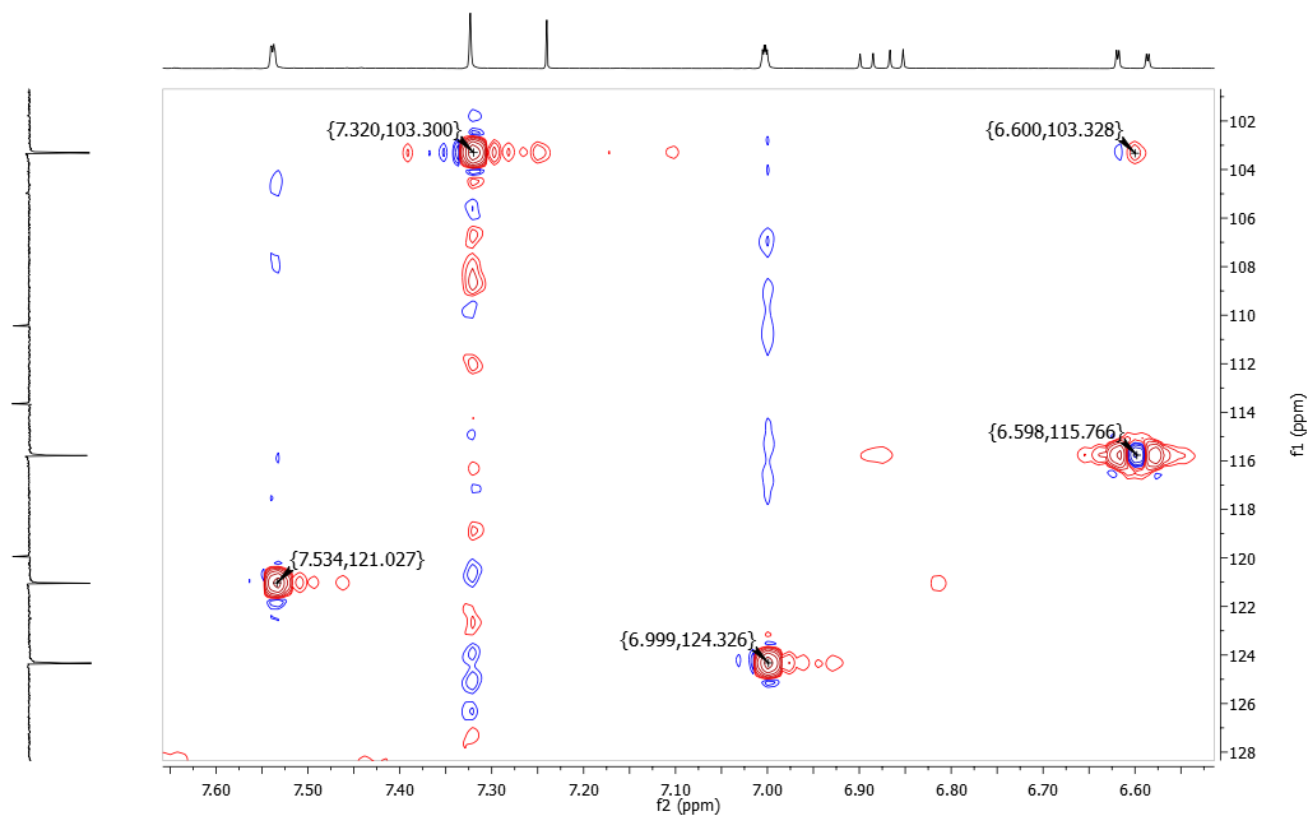


Figura 19: Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *VgI* na região de (7.60-6.60 ppm) x (102-128 ppm).

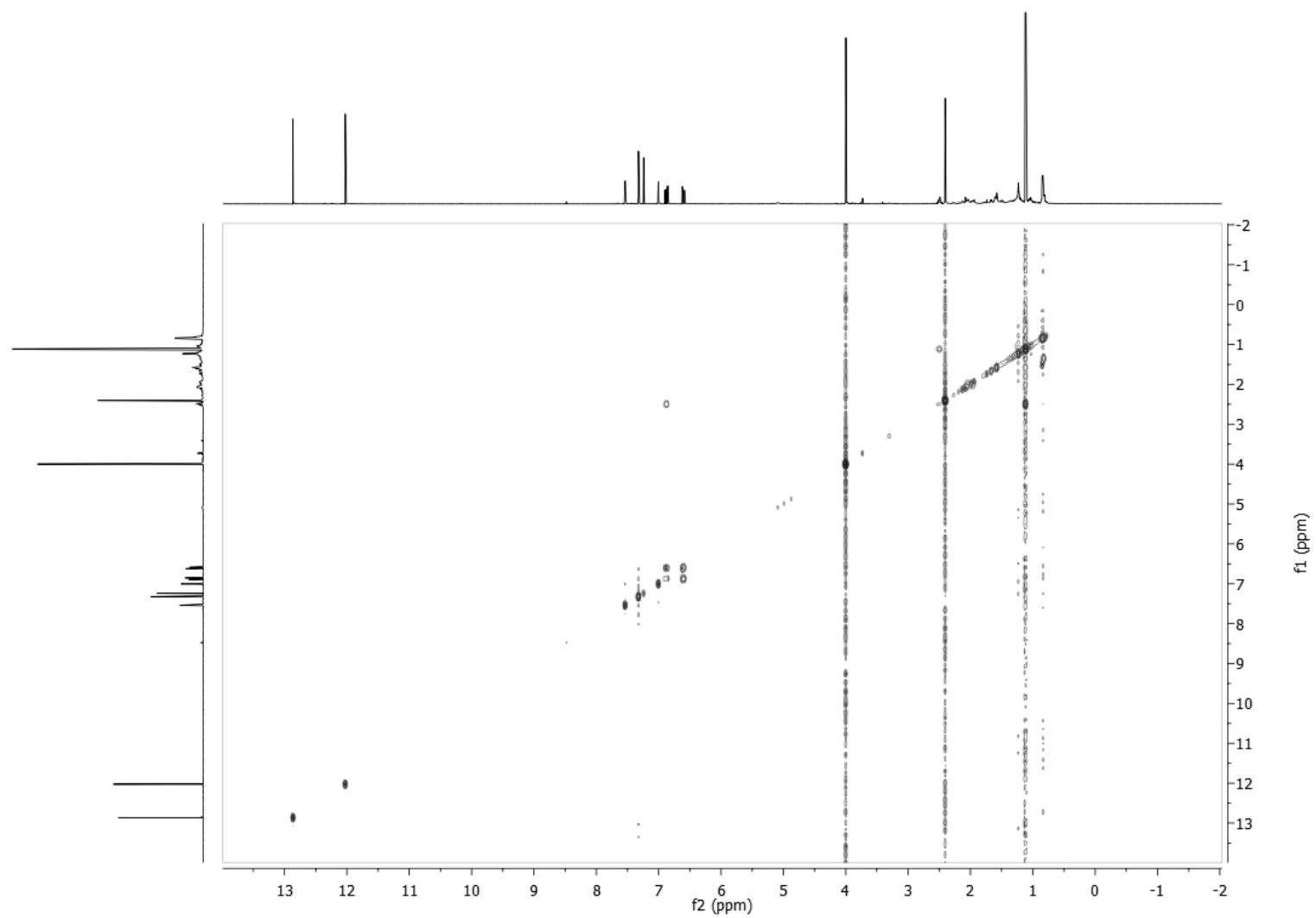


Figura 20: Espectro COSY (500 e 125 MHz, CDCl₃) de *VgI*

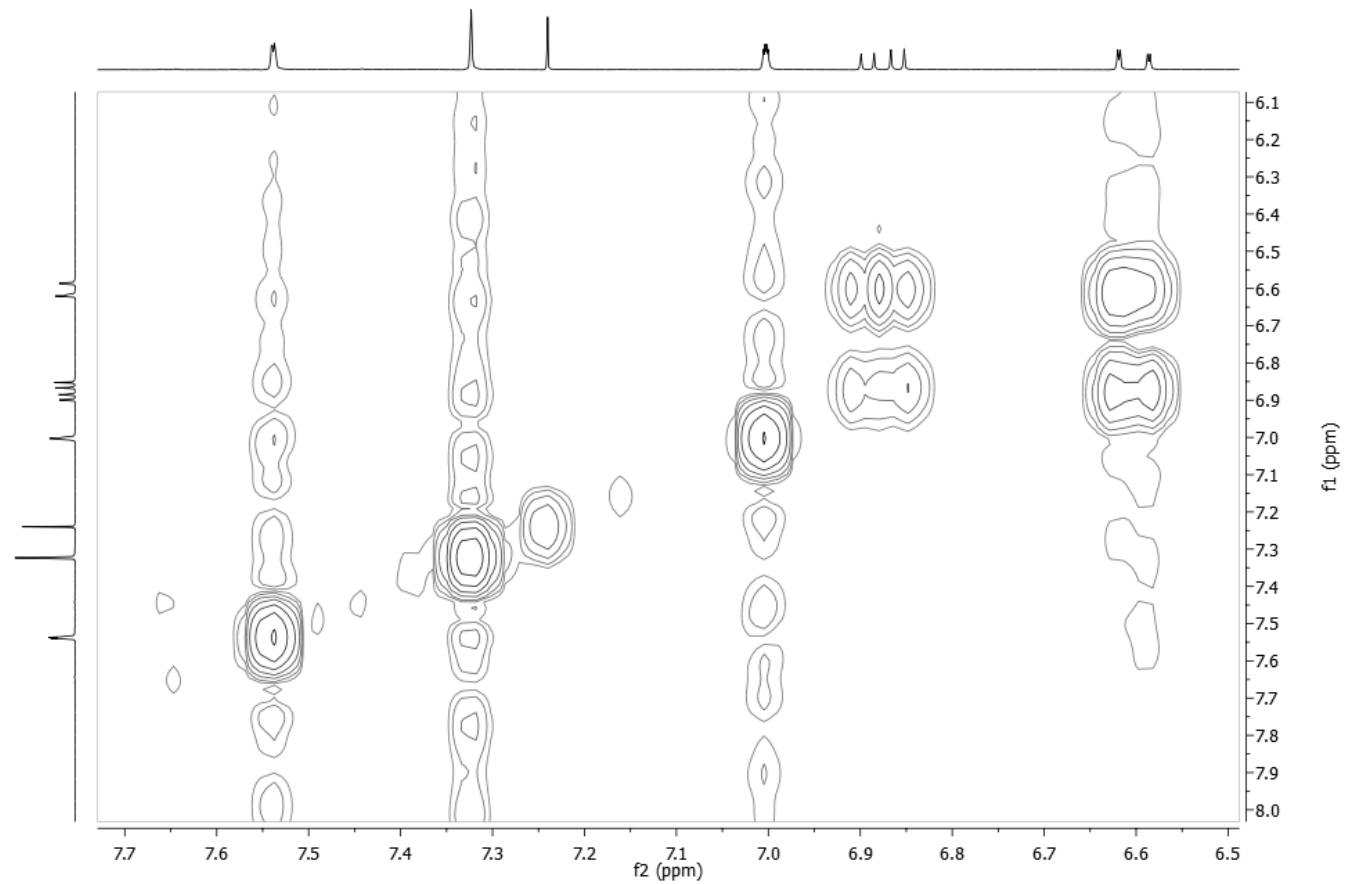


Figura 21: Expansão do espectro COSY (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Vg1* na região de (7.7-6.5 ppm) x (6.1-8.0 ppm).

5.2.2. Elucidação estrutural de Vg2 e Vg3

A análise do espectro de RMN ^1H de Vg2 e Vg3 mostrou um envelope de sinais na região compreendida entre δ_{H} 0.64 e δ_{H} 2.53 correspondentes a hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos de carbono sp^3 característicos de triterpenos e esteroides.

Multiplete em δ_{H} 3.49 sugere-se a presença de um hidrogênio oximetínico na posição 3 de núcleo esteroidal e/ou triterpênico (KONGDUANG, et al., 2008). Observou-se um *dublete* em δ_{H} 5.32 (*d*, $J = 5.1$ Hz, 1H) e dois *duplo dubletos* em δ_{H} 5.13 (*dd*, $J = 15.1, 8.1$ Hz, 1H), 4.98 (*dd*, $J = 15.2, 8.1$ Hz), na região de hidrogênios olefínicos. As referidas observações possibilitaram sugerir que Vg2 e Vg3 é uma mistura de esteroides.

A análise do espectro de RMN ^{13}C mostrou absorções entre δ_{C} 11.80 e δ_{C} 21.05, características destes grupos, reforçando, portanto, a proposta de núcleo esteroidal, pelo espectro de RMN ^1H . O número de absorções presentes no espectro de RMN ^{13}C e seus respectivos deslocamentos químicos acrescidos de comparações com o modelos da literatura possibilitaram identificar as substâncias como sendo uma mistura dos esteroides β -sitosterol e Estigmasterol, Vg2 e Vg3 respectivamente.

Tabela 3: Comparação dos deslocamentos para átomos de carbono e hidrogênio de Vg2 e Vg3, verificados nos espectros de RMN ¹H e ¹³C (δ, CDCl₃, 200 e 50 MHz) com a literatura (MIRANDA et al., 2014).

C	Vg2		β-sitosterol		Vg3		Estigmasterol	
	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C
5		140,71		140,7		140,71		140,7
10		36,48		36,1		36,48		36,5
13		42,21		42,3		42,21		42,3
CH								
3	3,49(<i>m</i>)	71,71	-	71,8		71,71	-	71,8
6	5,32(<i>d</i>)	121,67	-	121,7		121,67	-	121,7
8		31,86		31,9		31,86		31,9
9		50,11		50,1		51,21		50,1
14		56,73		56,7		56,82		56,7
17		56,02		56,0		55,91		56,0
20		36,12		36,1		40,48		40,4
22		-		-	5.13	138,28	-	138,3
23		-		-	4.98	129,22	-	129,2
24		45,79		45,8		51,21		51,2
25		28,22		29,1		-		-
CH₂								
1		37,22		37,4		37,22		37,2
2		31,86		31,6		31,86		31,6
4		42,21		42,3		42,21		42,3
7		31,57		31,6		31,57		31,78
11		23,03		21,0		23,03		20,94
12		39,74		39,7		39,65		39,53
15		24,27		24,3		24,27		24,16
16		28,90		28,2		28,90		29,57
22		33,68		33,9		-		-
23		26,03		26,0		-		-
28		24,07		23,0		25,38		25,4
CH₃								
18	0,64(<i>s</i>)	11,83	-	11,9	0.66 (<i>s</i>)	11,95	-	12,2
19	0,97(<i>s</i>)	19,37	-	19,0	0.97 (<i>s</i>)	19,37	-	19,0
21	0,92	18,95	-	18,7	1.02	19,80	-	21,2
26		21,05		19,8		21,05		21,2
27		19,00		19,3		19,00		18,9
29		12,02		12,0		12,23		12,2

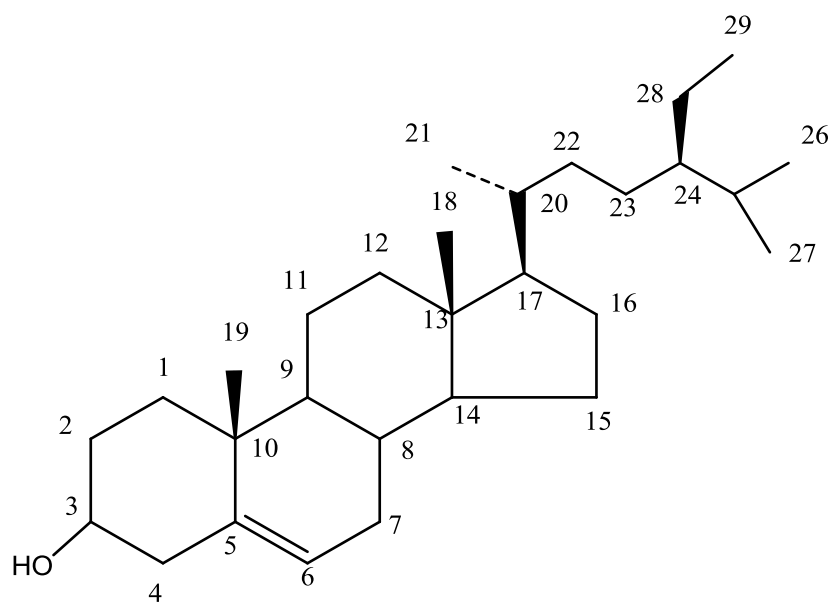


Figura 22: Estrutura de Vg2, β -sitosterol

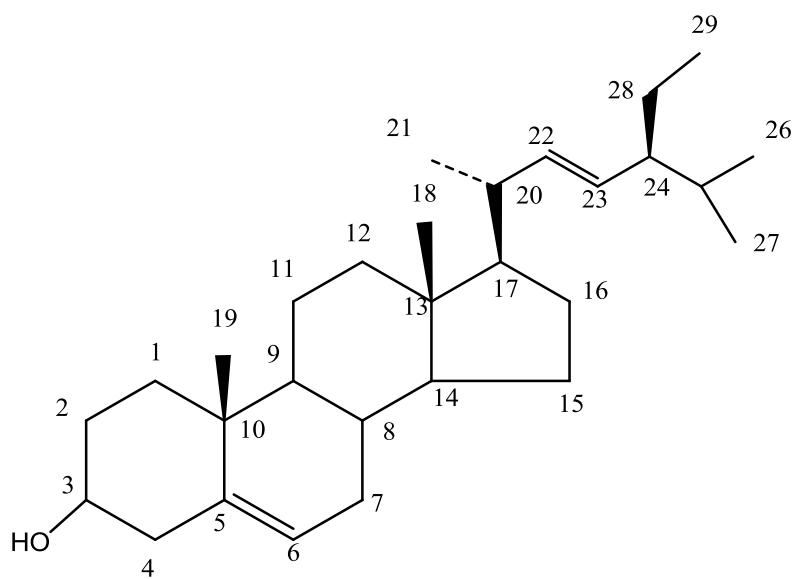


Figura 23: Estrutura de Vg3, Estigmasterol.

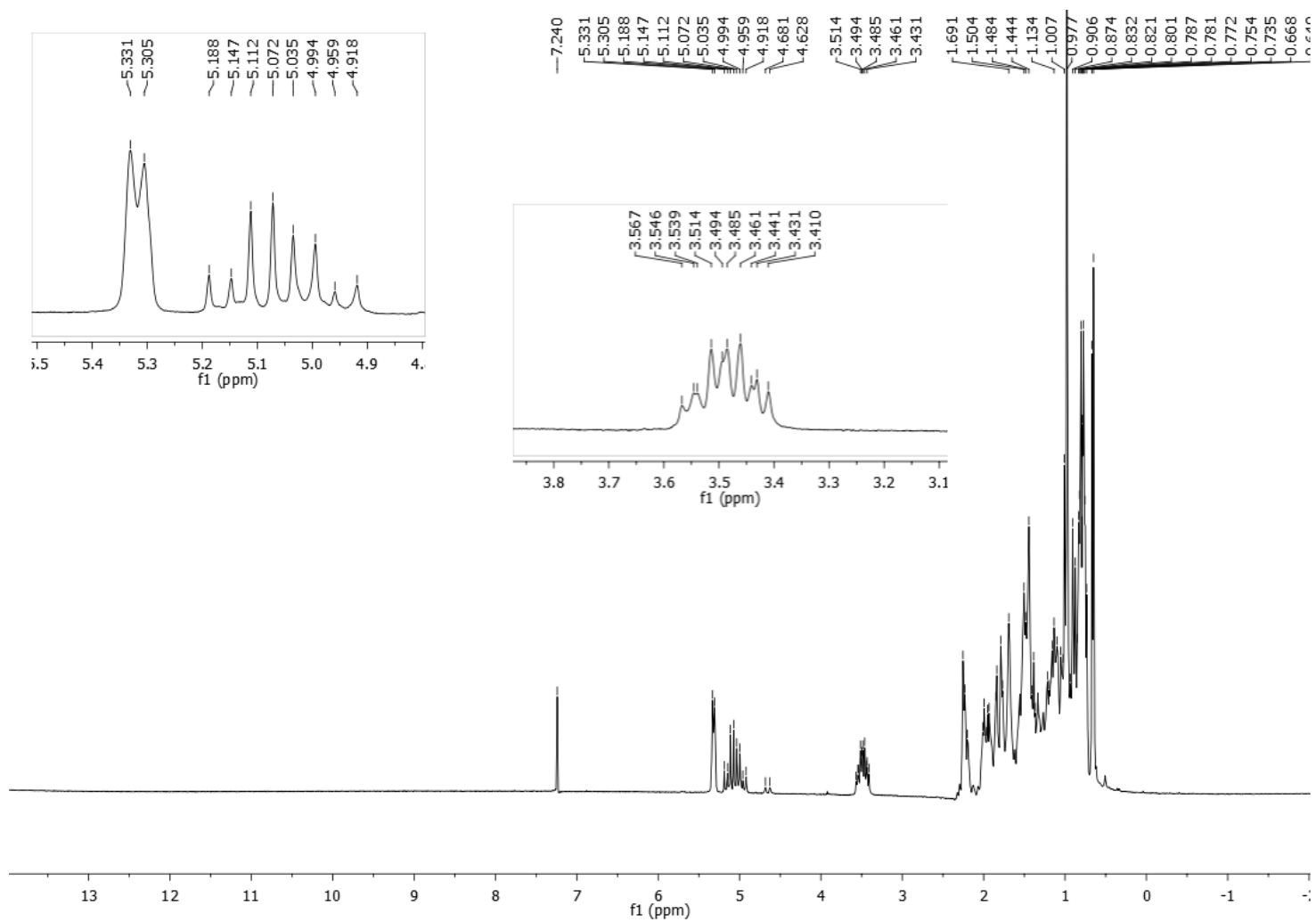


Figura 24: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de *Vg2* e *Vg3* com mini expansões

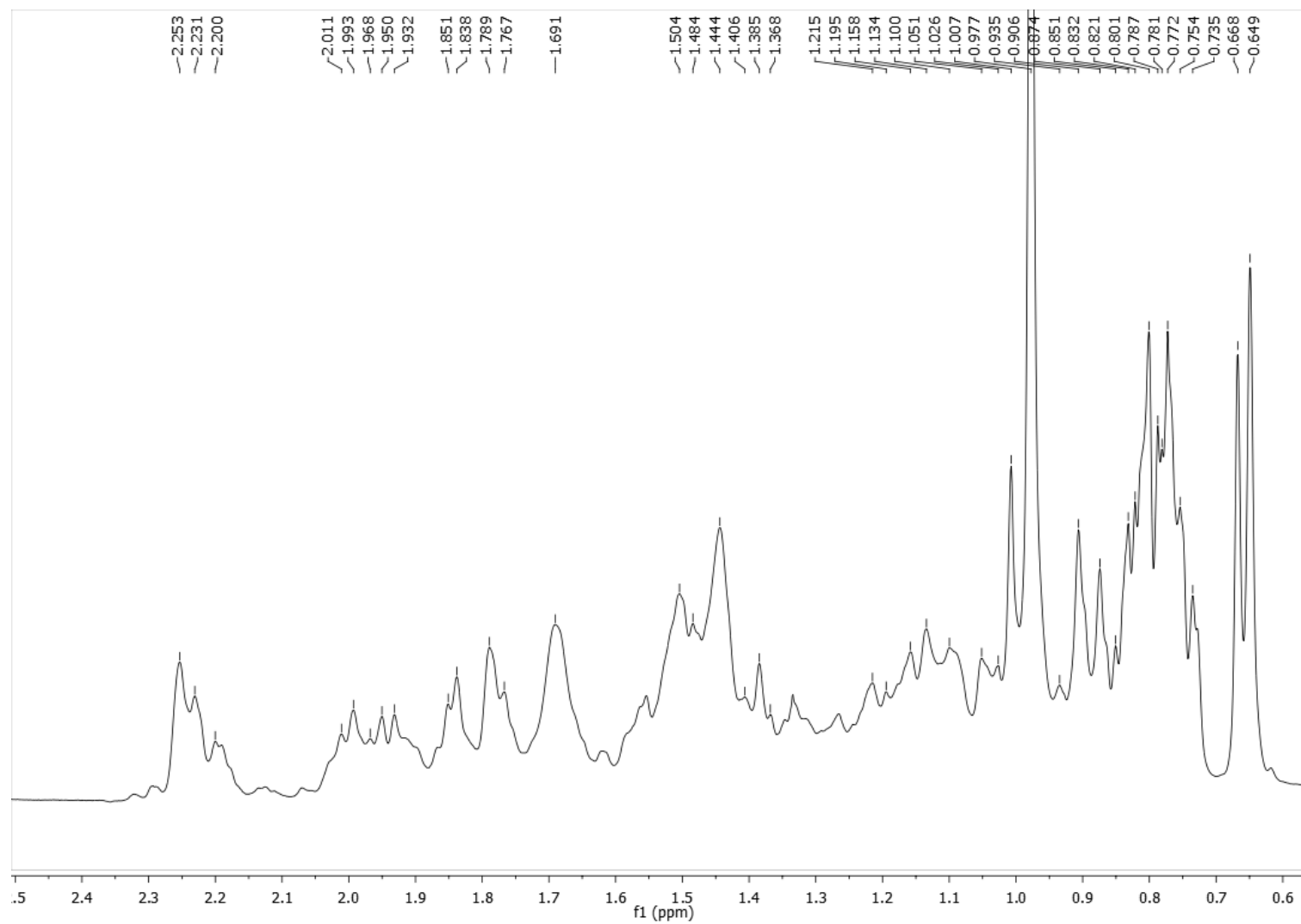


Figura 25: Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Vg2 e Vg3 na região de (2.4-0.6 ppm)

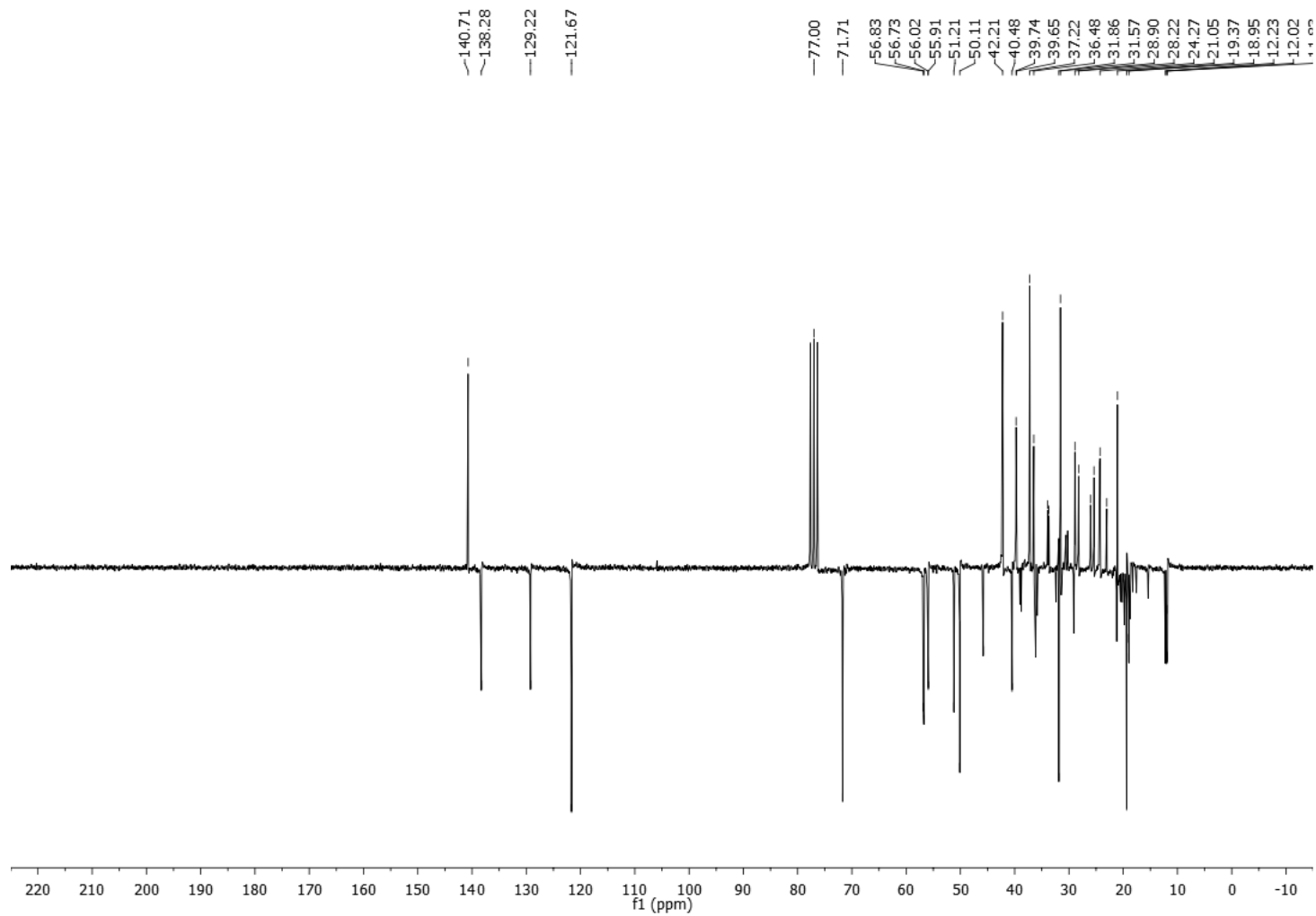


Figura 26: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) – APT de *Vg2* e *Vg3*

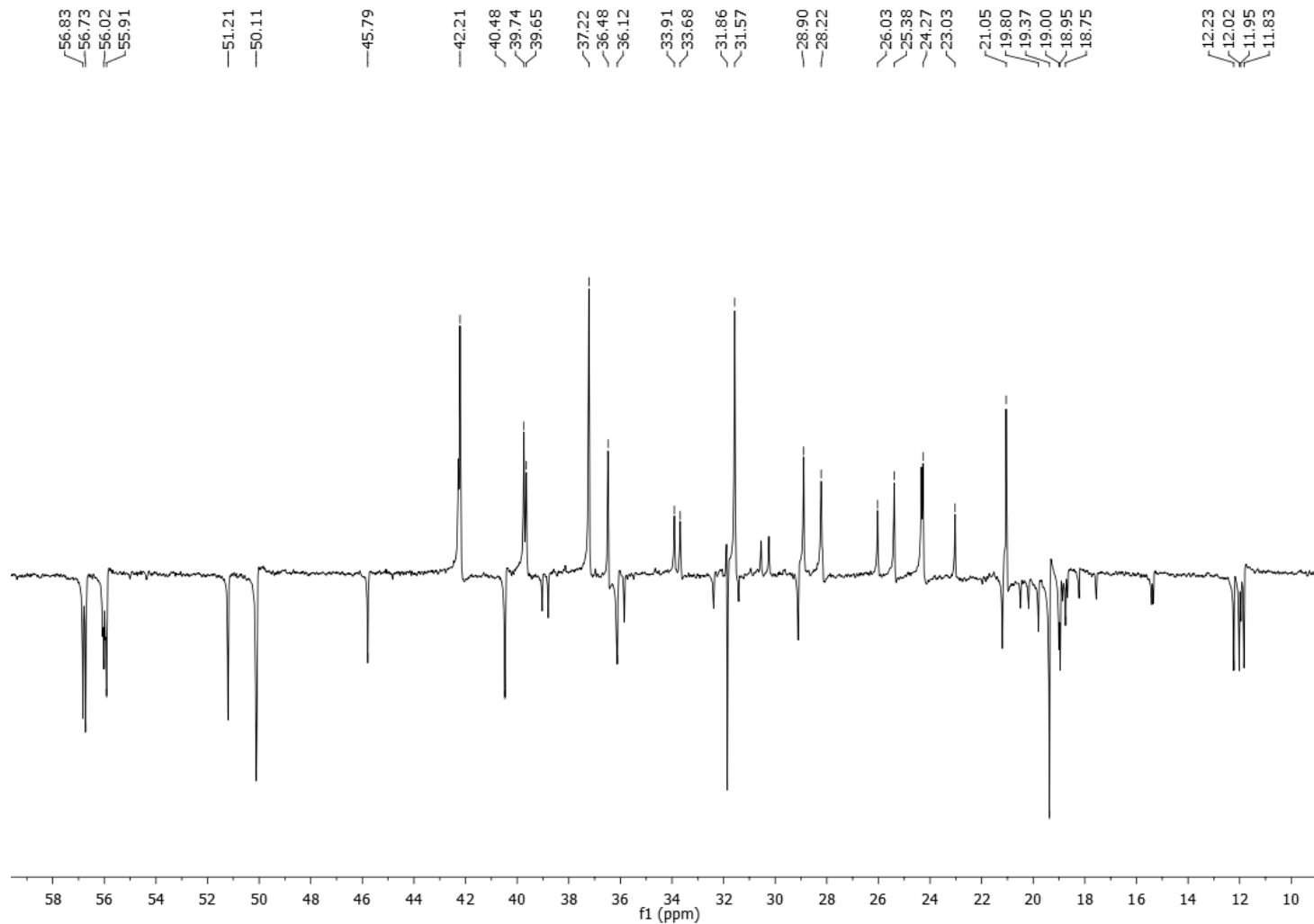


Figura 27: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) – APT de Vg2 e Vg3 na região de (58-10 ppm)

5.2.3. Elucidação estrutural de *Vg4*

O tratamento cromatográfico da fase AcOEt do EEB das folhas de *Vismia guianensis* resultou no isolamento de 6 mg de cristais amarelos, com ponto de fusão em 265° C, denominado *Vg4*.

O espectro de RMN¹H exibiu um conjunto de absorções na região de hidrogênios aromáticos que permitiu inferir sobre um esqueleto típico de flavonoide 5,7-dioxigenado (SILVA et al, 2005). Um dubleto em δ_H 6.18 e outro em δ_H 6.39, ambos com uma constante de acoplamento (J) igual a 2,0 Hz mostrando acoplamento meta, dois dubletos em δ_H 8.08 e δ_H 6.90, integrando para 2H cada e J=9,0 Hz, característico de acoplamento orto, demonstraram a presença de um sistema AA'BB', sugerindo assim um esqueleto flavonoídico com anel B para substituído. Assim, *Vg4* pode ser relacionado a um flavonoide do tipo flavonol com a estrutura básica contendo 15 átomos de carbono C6-C3-C6.

O espectro de RMN ¹³C mostrou também quatro sinais intensos referentes a dois sistemas AA'BB'. As duas absorções em δ_C 130.68 e δ_C 116.30 foram propostas para os carbonos 2',6' e 3',5', respectivamente, do anel B do flavonoide.

Sugere-se que a substância *Vg4* seja 3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-cromen-4-ona, Canferol, já isolado anteriormente na família em estudo da espécie *Hypericum perforatum* L (BERGHOFER e HOLZL, 1986).

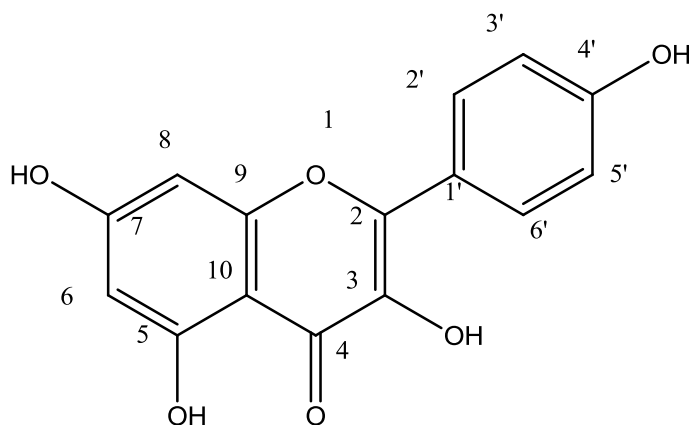


Figura 28: Estrutura de *Vg4*, 3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-cromen-4-ona (Canferol).

Tabela 4: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de *Vg4* (δ , CD_3OD 500 e 125 MHz), comparados com modelo da literatura (BARRETO et al., 2013).

<i>Vg4</i>		Canferol		
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		148.07		148.2
3		137.139		137.3
4		177.39		177.5
5		162.5		162.7
6	6.18 (<i>d</i> , $J = 2.1$ Hz, 1H).	99.27	6.17 (<i>d</i> , $J = 2.0$ Hz, 1H).	99.4
7		165.65		165.7
8	6.39 (<i>d</i> , $J = 2.1$ Hz, 1H)	94.46	6.39 (<i>d</i> , $J = 2.0$ Hz, 1H)	94.6
9		158.27		158.4
10		104.54		104.7
1'		123.73		123.9
2' e 6'	δ 8.08 (<i>d</i> , $J = 9.0$ Hz, 2H),	130.68	δ 8.09 (<i>d</i> , $J = 9.0$ Hz, 2H),	130.9
3' e 5'	6.90 (<i>d</i> , $J = 9.0$ Hz, 2H)	116.30	6.90 (<i>d</i> , $J = 9.0$ Hz, 2H)	115.7
4'		160.57		160.7



Figura 29: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de *Vg4*

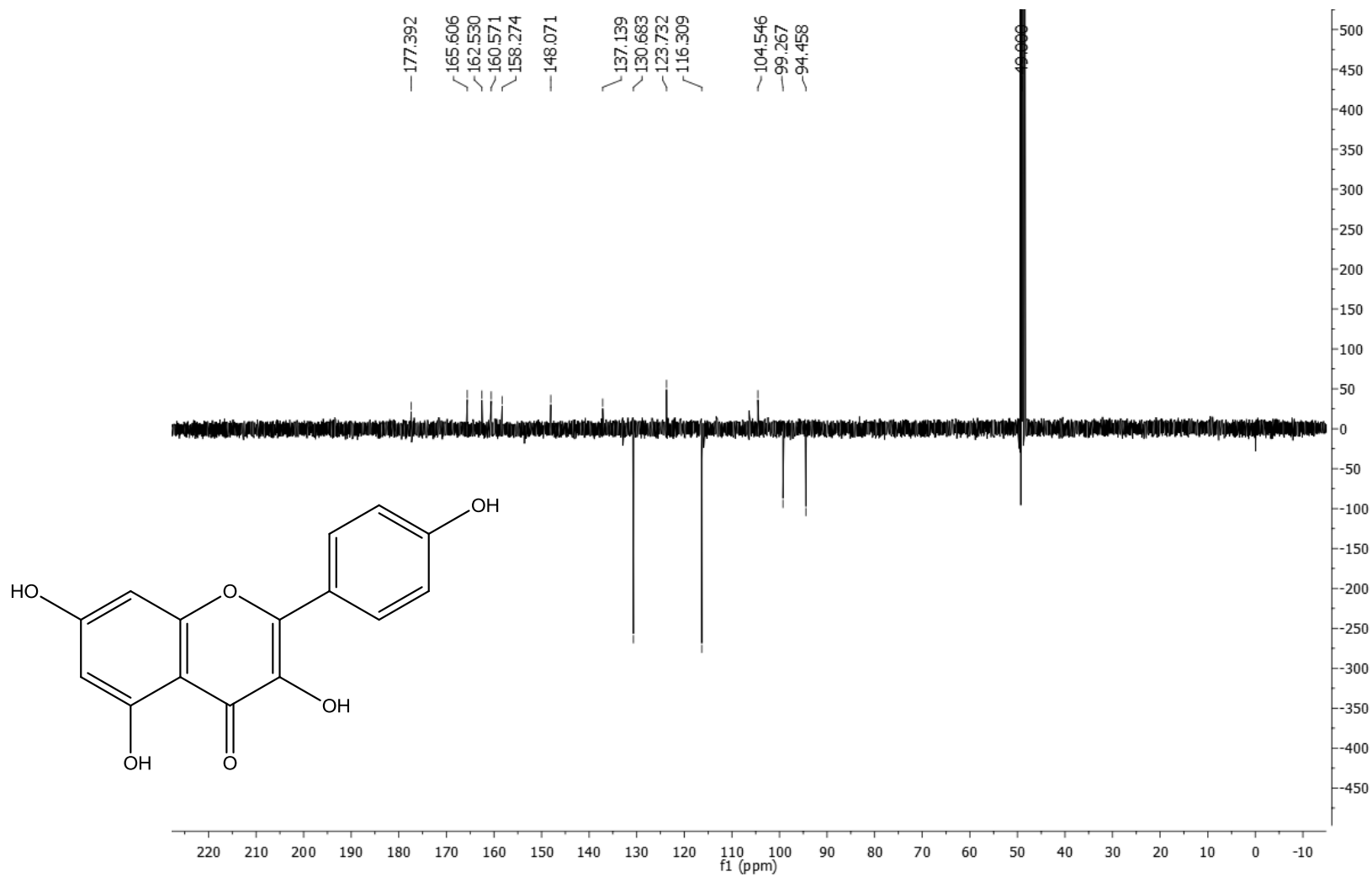


Figura 30: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CD₃OD) de Vg4

5.3. Caracterização do óleo essencial das inflorescências de *Vismia guianensis*

O óleo essencial obtido das inflorescências da *Vismia guianensis* teve um rendimento de 0,1% em relação ao peso do material utilizado. A porcentagem de identificação dos componentes do óleo foi de 88,07%, com um total de 43 constituintes identificados, conforme Tabela 5. Apresentou 2,64% de monoterpenos oxigenados, 54,39 de hidrocarbonetos sesquiterpênicos 28,37% de sesquiterpenos oxigenados, 0,06% de éster e 2,07% de ácido graxo. Os constituintes majoritários foram o trans-cariofileno (14,8%), e δ -cadineno (10,34%) e óxido de cariofileno (6,68%).

Os frutos da *Vismia guianensis* em estudo de Silvestre et al, (2012) apresentou como componentes majoritários β -cariofileno (25,8%), α -copaeno (13.1%), e δ -cadineno (11.6%), sendo similar apenas esse último componente.

Rouis et al. (2012) relata em estudo realizado com as partes aéreas de *Hypericum triquetrifolium* a presença de vários constituintes, entre eles, α -muuroleno, α -humuleno, germacreno D e δ –cadineno, corroborando com os resultados obtidos nesse estudo.

Tabela 5: Composição Química (% relativa) do óleo essencial das inflorescências de *V. guianensis*.

PICO	SUBSTÂNCIAS	(%) Relativa	IR*	IR**
	MONOTERPENO OXIGENADO			
1	linalol	0,89	1098	1096
2	α -terpineol	1,75	1190	1188
	HIDROCARBONETO SESQUITERPÊNICO			
3	α -copaeno	4,46	1378	1376
4	β -elemeno	1,47	1394	1390
5	<i>trans</i> -cariofileno	14,87	1421	1419
6	aromadendreno	0,52	1440	1441
7	α -humuleno	3,23	1455	1454
8	allo-aromadendreno	0,58	1459	1460
9	γ -gurjuneno	2,88	1475	1477
10	γ -muuroleno	0,58	1479	1479
11	germacreno D	3,47	1482	1485
12	δ -selineno	4,25	1493	1492
13	α -muuroleno	1,51	1498	1500
14	β -bisaboleno	2,46	1507	1505
15	γ -cadineno	1,92	1512	1513
16	δ -cadineno	10,34	1522	1523
17	<i>trans</i> -cadin-1,4 dieno	0,69	1531	1534
18	α -cadineno	0,51	1536	1538
19	α -calacoreno	0,65	1541	1545
	SESQUITERPENO OXIGENADO			
21	espatulenol	4,94	1575	1578
22	óxido de cariofileno	6,68	1581	1583
24	viridiflorol	1,81	1590	1592
30	1-epi-cubenol	2,77	1627	1628
31	γ -eudesmol	1,23	1630	1632
34	epi- α -cadinol	3,15	1640	1640
35	α -muurolol	1,02	1644	1646
36	β -eudesmol	0,59	1648	1650
37	selin-11-en-4- α -ol	4,80	1652	1659
39	14 hidrox-9-epi-(<i>E</i>)-cariofileno	1,38	1669	1669
	ESTER			
42	hexadecanoato de metila	0,60	1925	1921
	ÁCIDO GRAXO			
43	ácido hexadecanóico	2,07	1959	1960
	Monoterpeno oxigenado	2,64		
	Hidrocarboneto sesquiterpênico	54,39		
	Sesquiterpeno oxigenado	28,37		
	Ester	0,6		
	Ácido graxo	2,07		
	TOTAL IDENTIFICADO	88,07		

IR* = Índice de retenção calculado; IR** = Índice de retenção literatura (Adams, 2007).

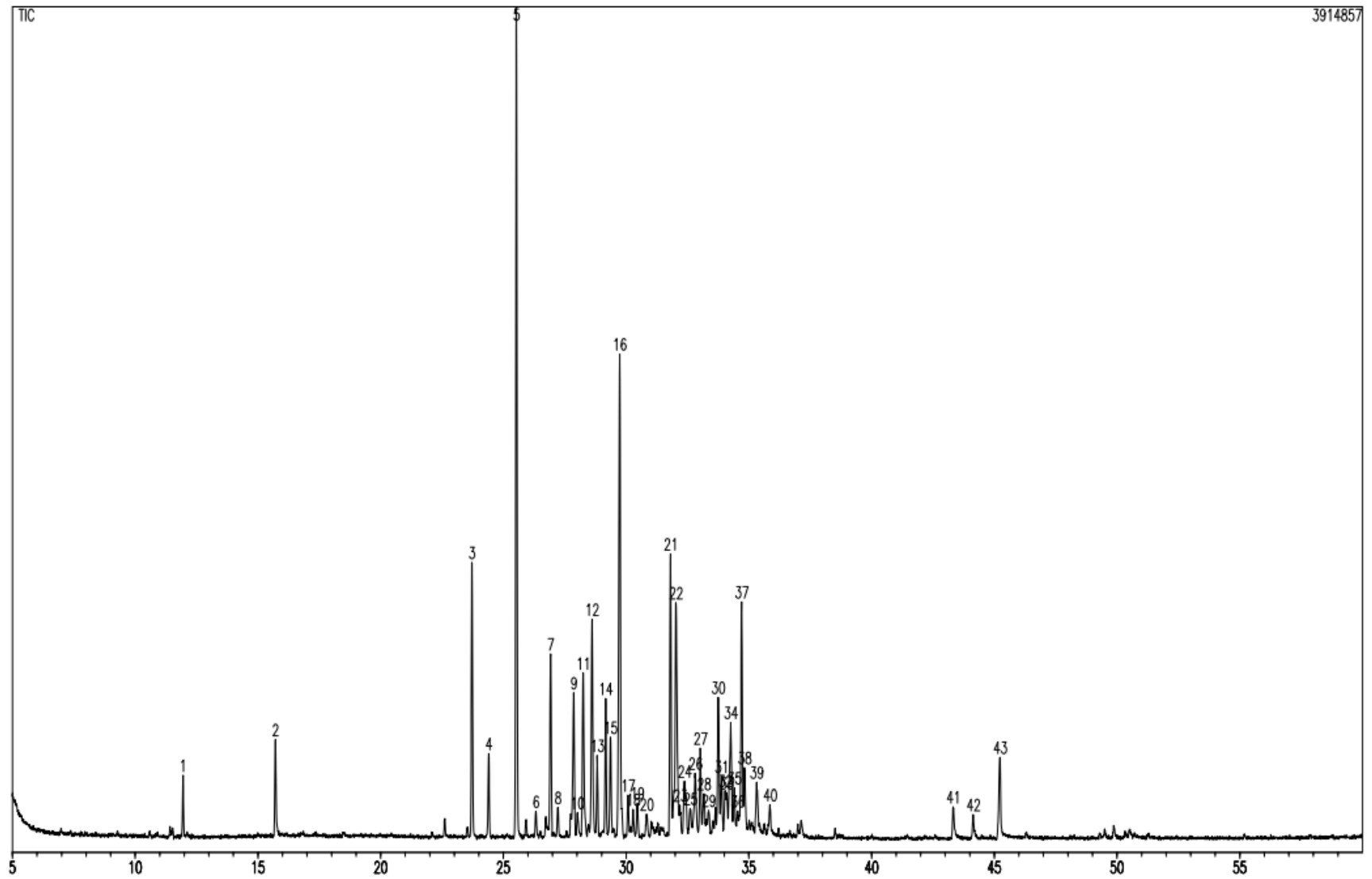


Figura 31: Cromatograma do óleo essencial de inflorescências de *Vismia guianensis*.

5.2.2 - Atividade Antimicrobiana do óleo essencial das inflorescências de *Vismia guianensis*

O óleo essencial inibiu o crescimento de todas as linhagens Gram positivas e Gram negativas testadas apresentando diferentes valores de CIM (Tabela 6).

Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial das inflorescências de *Vismia guianensis* sobre as linhagens bacterianas

Linhagem bacteriana	Concentração Inibitória Mínima (CIM) µg/mL
<i>E. coli</i> ATCC 2536	256
<i>E. coli</i> ATCC 8539	128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 8027	256
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 23242	256
<i>S. aureus</i> ATCC 25619	256
<i>S. aureus</i> ATCC 25925	256

ATCC = American Typing Culture Collection

Não existe consenso sobre o nível de inibição aceitável para os produtos naturais quando comparados com antibióticos que são utilizados na clínica médica, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos dos antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles que inibem o crescimento bacteriano em concentrações elevadas. Aligianis et al. (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM que considera como: inibição forte - CIM até 500 µg/mL, inibição moderada – CIM entre 600 e 1500 µg/mL e inibição fraca – CIM acima de 1600 µg/mL. Considerando essa classificação o óleo essencial das inflorescências da *V. guianensis* apresentou forte efeito antibacteriano frente a linhagens Gram positivas e Gram negativas testadas com concentração inibitória mínima que variou entre 128µg e 256µg. Este resultado é relevante uma vez que bactérias Gram positivas são normalmente mais sensíveis a antibióticos do que as bactérias Gram negativas (MADIGAN e MARTINKO, 2004). Isso se deve ao fato de que a membrana externa das bactérias Gram negativas é uma barreira que dificulta a entrada de várias moléculas de antibióticos e o espaço periplasmático contém enzimas que são capazes de degradar moléculas vindas de fora da célula (HOLETZ et al., 2002). Além disso, antibióticos que atuam sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, denominados de amplo espectro, têm uma maior aplicação médica do que aqueles que atuam apenas sobre um grupo de microrganismos.

Alguns dos componentes encontrados nesse óleo essencial, trans-cariofileno (14,87%), α -humuleno (3,23%) e germacreno-D (3,57%) são descritos como esqueletos carbônicos com ampla atividade antibacteriana, anti-fúngica e inibidores enzimáticos por Abraham (2001) e Almeida et al(2005).

Em estudo realizado por Silvestre et al. (2012) com óleo essencial dos frutos dessa planta o melhor potencial antimicrobiano foi para *Staphylococcus lentus* com uma CIM de 78 μ g, os componentes majoritários do óleo analisado β -cariofileno (25.8%), α -copaeno (13.1%), and δ -cadineno (11.6%). O extrato etanólico da *V. guianensis* foi avaliado por Camelo et al (2011) e apresentou atividade antimicrobiana para as cepas *Streptococcus mitis* (ATCC 903), *Streptococcus sanguis* (ATCC 10557), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 40175), *Candida krusei* (ATCC 40147) e *Candida parapsilosis* (ATCC 40038).



Conclusão

CONCLUSÃO

✓ O estudo das folhas e inflorescências de *Vismia guianensis* levou ao isolamento de quatro substâncias que foram identificadas por meio de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY e NOESY). As substâncias isoladas foram identificadas como sendo: Vismiaquinona A, β -sitosterol, Estigmasterol e Canferol. Sendo a última inédita na espécie.

✓ A composição química do óleo essencial das inflorescências de *Vismia guianensis* foi determinada após análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, sendo identificados 43 componentes, os constituintes majoritários foram o trans-cariofileno (14,8%), e δ -cadineno (10,34%) e óxido de cariofileno (6,68%).

✓ O óleo essencial das inflorescências de *Vismia guianensis* apresentou forte atividade antibacteriana frente a linhagens Gram positivas de *S. aureus* e Gram negativas de *E. coli* e *P. aeruginosa*.



Referências

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, W.R. Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for humans as well? **Current Medicinal Chemistry**, v.8, p.583-606, 2001.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, p. 804, 2007

ALMEIDA, L.F.R.1, DELACHIAVE, M.E.A.1, MARQUES, M.O.M. Composição do óleo essencial de rubim (*Leonurus sibiricus* L. – Lamiaceae). **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.8, n.1, p.35-38, 2005.

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species, **J. Agric. Food Chem.** v. 49, p.4168-4170, 2001.

ALVAREZ, R.E.; et al, . Antioxidant activity and phenolic content of extracts from berries of two species of *Vismia* genus (Guttiferae). **Vitae**, v. 15, n. 1, p.165-172, 2008.

BARREIRO, E. J. Produtos Naturais e Bioativos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Fármacos. **Quím. Nova**, v.13, n. 1, p. 29-39, 1990.

BARRETO, M. B; et al, Flavonoides e terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae) **Quím. Nova**, v. 36, n. 5, S1-S14, 2013

BENGHEZAL, M.; et al. Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. **Cellular Microbiology**. v. 9, p. 1336- 1342, 2007.

BERG, J. M. T. E LUBERT, J. 2008, **Bioquímica**. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p.

BERGHOFER, R.; HOLZL, J. Biflavonoids in *Hypericum perforatum*; Part 1. Isolation of I3,II8-biapigenin. **Planta Medica**, v.53, p.216-217, 1986.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quím. Nova**, v. 33, n. 6, 1359-1369, 2010.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, n. 1, p. 229-239, 2010

CAMELO, S. R.; et al, Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *vismia guianensis* (aubl.) choisy. **IJPSR**, v. 2, n.12, p.3224-3229, 2011.

CANILLAC, N. e MOUREY, A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiol** v.18, p.261-268. 2001.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998

CIMANGA, K., et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **J Ethnopharmacol** 79: 213-220. 2002.

CROCKETT, S. L., ROBSON, N. K. B. Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*. **Med Aromat Plant Sci Biotechnol**. v.5, (Special Issue 1), p.1-13, 2011.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 33, p. 166-168, 2002.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. Sao Paulo: Unesp, 2002.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, p. 711-713, 1998.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como fontes de Recursos Terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **Revista Multiciência**, v. 7, 2006.

FUMAGALI, E.; et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.18(4): 627-641, Out./Dez. 2008

GOMES, P. B.; MATA, V. G.; RODRIGUES, A. E. Production of rose geranium oil

using supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 41, p. 50-60, 2007.

GONÇALVES, M.L.S.; MORS, W.B. Vismiaquinone, a Δ^1 -isopentenyl substituted anthraquinone from *Vismia reichardtiana*, **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 1947-1950, 1981.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões C.M.O. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS; 2003, p. 14-28.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.97, p. 1027-1031, 2002.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. Sao Carlos: Edufscar, 2003.

HUSSAIN, H., et al. Chemistry and biology of genus *Vismia*. **Pharmaceutical Biology**, v.50, n.11, 2012.

HUSSEIN, A. A., et al. Bioactive Constituents from Three *Vismia* Species. **J. Nat. Prod.**, 66, 858-860, 2003.

KARAMAN, I., et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **J. Ethnopharmacology**, v.2837, p. 1-5, 2003.

KOKETSU, M., et al. The bark and leaf essential oils of cinnamom (Cinnamomum verum Presl) grown at Paraná, Brazil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.17, n.3, p.281-285, 1997.

LEITE, J. P. V. 2008. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1.Ed. São Paulo: Atheneu, 344p.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2001. 558 p.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. The Bacteria. In: **Brock – Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prantice Hall. 718-814, 2004.

MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Molecules of interest flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2399-2407, 2005.

MIRAGLIA M.C.M., et al., The chemistry of Brazilian Guttiferae. Part 38. Anthraquinones from *Vismia* species. **Phytochemistry**, 20, 2041–2042. 1981.

MONACHE, F.D.; *et al.* Chemistry of *Vismia* genus. Note V: g-hidroxi and g,g-dihidroxi-ferruginina A. **J. Nat. Prod.**, v.43, n.4, p.487-494, 1980.

MIRANDA, M. L. D., et al . Sesquiterpenos e outros constituintes das folhas de *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae). **Quím. Nova**, v. 37, n. 3, 2014 .

MOURÃO, K. S. M. e BELTRATI, C. M. Morphology and anatomy of developing fruits and seeds of *Vismia guianensis* (AUBL.) CHOISY (Clusiaceae). **Rev. Brasil. Biol.**, 61(1): 147-158, 2001.

NAGEM, T. J.; De OLIVEIRA, F.F. Xanthonas and other constituents of *Vismia parviflora*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 8, p. 505-508, 1997.

NAGEM T. J., FARIA T .J.. Quinonoid and other constituents of *Vismia martiana*. **Phytochemistry**, 29, 3362–3364, 1990.

NASCIMENTO, P. F. C., et al. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. **Rev Bras Farmacogn.** 17:108-113, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, **Journal of Natural Products**, v.75, n.3, p. 311–335, 2012.

NGUEMEVING, J. R. et al. Laurentixanthonas A and B, antimicrobial xanthonas from *Vismia laurentii*. **Phytochemistry**. 67, 1341–1346, 2006.

NOSTRO A., et al. Susceptibility of methicillin-resistant *staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiol Lett** 230: 191-195, 2004.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chem** 120: 308-312, 2010.

OLIVEIRA, A. H. de, **Atividade antimicrobiana e imunológica *in vitro* dos extratos de *Senna reticulata* (Willd). Irwin & Barneby (mata-pasto) e *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre)** 126 p., Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2009.

OLIVEIRA, A.C.; SILVA, R.S. Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Rev Elet Enferm**, v.10, p.189-197, 2008.

PALOMINO, J.C; et al, Resazurin microtiter assay apate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, n.8, p.2720-2722, 2002.

PASQUA, G. *et al.*: Accumulation of vismione A in regenerated plants of *Vismia guianensis* D.C. **Protoplasma** 1995; 189: 9-16.

PEREIRA, R. J. e CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits **J. Biotec. Biodivers.** v. 3, N.4: pp. 146-152, 2012.

PINHEIRO, R.M., et al. Chemistry of *Vismia* genus. Part 10. Prenylated anthranoids from *Vismia* species. **Phytochemistry**, 23, 1737–1740, 1984.

POLITI, M., et al, HPLC-UV/PAD and HPLC-MS(n) analyses of leaf and root extracts of *Vismia guineensis* and isolation and identification of two new bianthrone. **Phytochem Anal**, 15, 355–364, 2004.

RODRIGUES, J. N., et al . Caracterização físico-química de creme vegetal enriquecido com ésteres de fitosteróis. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo , v. 40, n. 4, 2004.

ROUIS, Z., et al., Chemical Composition and Intraspecific Variability of the Essential Oils of Five Populations of *Hypericum triquetrifolium* TURRA Growing in North Tunisia. **Chemistry & Biodiversity**, 9: 806–816, 2012.

SALAS, F., et al. In vitro Cytotoxic Activity of Sesamin Isolated from *Vismia baccifera* var. *dealbata* Triana & Planch (Guttiferae) Collected from Venezuela. 2008. **Nat Prod Comm** 3: 1705 – 1708, 2008.

SANTOS, R. N. dos, SILVA, M. G., BRAZ FILHO, R. Constituintes químicos do Caule de *Senna reticulata* Willd. (leguminoseae) **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 8, 1979-1981, 2008.

SEO, E.K; . *et al*, . New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, v.55, p.35-42, 2000.

SHAFI, P. M.; et al., Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oil. **Fitoterapia**, n.73: p.414-416, 2002.

SILVA, D. A; et al . Flavonóides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O-a-L-ramnopiranosídeo. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa ,v. 15,n. 1, 2005

SILVESTRE, R. G., et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits. **African Journal of Biotechnology** .v.11, n.41, p. 9888-9893, 2012.

STEVENS, P. F. Clusiaceae-Guttiferae, Hypericaceae. In K. Kubitzki [ed.], **The families and genera of vascular plants**, vol. IX, Flowering plants. Eudicots. Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales p.p, Geraniales, Gunnerales, Myrtales p.p., Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae alliance, Passifloraceae alliance, Dilleniaceae, Huaceae, Picramniaceae, Sabiaceae, 48 – 66, 194 – 201. Springer, Berlin, Germany, 2007.

SUFFREDINI I.B . *et al*, In vitro breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. **Pharmazie**, v.62, n.10, p.798-800, 2007.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D.J. A generalization of the relation index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, New york. v. 11, p. 463-467, 1963.

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; TSHILANDA, D.; BABADY, B. Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*. **Fitoterapia**, v.71, p. 69-71, 2000.

TALA, M. F., et al. Anthraquinones and triterpenoids from seeds of *Vismia Guineensis*, **Biochemical Systematics and Ecology**, v.50, p.310–312, 2013.

TAMOKOU, J. de D. et al, Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. **J Ethnopharmacol**, v.124, p.571–575, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, Porto Alegre, Artmed, 2005.

VIZCAYA, M. et al. ; Revisión bibliográfica sobre la composición química y actividades farmacológicas del género *Vismia* (Guttiferae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas** 11 (1): 12, 2011.

VIZZOTO, M. et al. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, 16 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316), 2010.

WABO, H.K. et al. Prenylated anthraquinones and other constituents from the seeds of *Vismia laurentii*. **Chem Pharm Bull** (Tokyo). v. 55, n.11, p.1640-2, 2007.

WURDACK, K. J e DAVIS, C. C. Malpighiales phylogenetics: gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. **American Journal of Botany** v. 96, n. 8, p. 1551–1570. 2009

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001