

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

GUILHERME CARVALHO RIBEIRO RODRIGUES

**“ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *Guettarda platypoda* D.C.
(RUBIACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA”**

RECIFE – PERNAMBUCO

2013

GUILHERME CARVALHO RIBEIRO RODRIGUES

**“ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *Guettarda platypoda* D.C.
(RUBIACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos do título de Magister Scientiae.

Área de concentração: Química de Produtos Naturais

Orientador: Profº Dr. Sebastião José de Melo
Co-Orientador Profª Telma Leda Gomes de Lemos

Recife, 2013

Rodrigues, Guilherme Carvalho Ribeiro

Estudo fitoquímico das folhas de *Guettarda paltypoda* D.C. (Rubiaceae) e avaliação da atividade biológica/ Guilherme Carvalho Ribeiro Rodrigues– Recife: O Autor, 2013.

61 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Sebastião José de Melo

Coorientador: Telma Leda Gomes de Lemos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia Industrial, 2013.

Inclui bibliografia

- 1. Fitoquímicos 2. Rubiaceae 3. Biotecnologia vegetal I. Melo, Sebastião José de (orientador) II. Lemos, Telma Leda Gomes de (coorientadora) III. Título**

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 072

GUILHERME CARVALHO RIBEIRO RODRIGUES

**“ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *GUETTARDA PLATYPODA* D.C.
(RUBIACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA”**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião José de Melo
UFPE

Prof^a Dr^a Janete Magali de Araújo
UFPE

Prof. Dr. Antônio Fernando Moraes de Oliveira

Recife, 26 de fevereiro de 2013

A todos aqueles que me apoiaram durante esses anos.

“Somos o que pensamos. Tudo o que somos surge com nossos pensamentos. Com nossos pensamentos, fazemos o nosso mundo”.

(Buda)

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço à minha Mãe, Rozany de Carvalho por me trazer à vida e fazer dessa algo verdadeiramente bom e digno.

Aos meus pais, Francisco de Assis e Rozany pelo carinho, dedicação e por ,mesmo com as grandes dificuldades que passaram, nunca desistirem de investir na educação dos filhos.

À toda minha família pelo apoio e o carinho, em especial para minha tia Aurelia de Carvalho que foi como uma mãe durante esses anos na capital.

Aos Professores, Orientadores e Amigos José Sebastião de Melo e Haroudo Sátiro pela fundamental ajuda na construção deste trabalho.

Aos Mestres, futuros Doutores e Grandes Amigos de Laboratório José Antonio e Gibson pela amizade, carinho e por toda a ajuda durante esses dois anos.

À Isla Vanessa pela orientação e ajuda desde a iniciação científica mas além de tudo pela amizade e carinho

À Prof^a Dr^a Telma Leda Gomes Lemos pela orientação e apoio durante o trabalho realizado na Universidade Federal do Ceará.

Aos Membros do Laboratório de Biocatálise e Produtos Naturais da Universidade Federal do Ceará pela ajuda e orientação.

Ao Prof. Dr^o Raimundo Braz-Filho pela valiosa contribuição na elucidação das estruturas.

Ao Prof. Dr. Alexandre Goes por suas valiosas aulas e conselhos.

À Professora Dr Elba Lúcia e a Msc. Valerium Castro pela contribuição no trabalho.

À Prof^a Dr^a Terezinha Gonçalves pela orientação e contribuição valorosa na elaboração do trabalho.

À Felipe e a Antonio Marcos pela valiosa contribuição com a ajuda análise antimicrobina.

E principalmente Maria Gislaine dos Santos pelo amor, companheirismo, compreensão e dedicação durante os últimos quatro anos.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco pelo apoio financeiro.

RESUMO

A dificuldade de acesso aos serviços de saúde pública e o surgimento de novas doenças têm incentivado o uso dos conhecimentos da medicina tradicional assim como aumentado o interesse pelas terapias alternativas e pelo uso terapêutico de produtos naturais, especialmente naqueles derivados de vegetais. A Angélica do mato (*Guettarda platypoda*) é arbusto presente flora do estado de Pernambuco utilizado na medicina popular como antifebrifuga, porém a validação de suas propriedades terapêuticas e o estudo químico da espécie ainda se encontram em aberto. O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo de fracionamento biomonitorado das folhas de *G. platypoda*, assim avaliando a atividade biológica (Citotóxica, antioxidante e antimicrobiana) de seus metabólitos secundários majoritários e/ou frações de polaridades diferentes. A purificação guiada por bioatividade iniciou-se particionando o extrato bruto metanólico das folhas de *G. platypoda* (EBMFG) em coluna cromatográfica líquida tradicional (CLT) em gel de sílica com solventes de polaridade crescente (n-hexano, n-hexano/AcOEt 1:1, AcOEt e MeOH), e após evaporação total do solvente das frações foram avaliadas suas atividades citotóxica, antioxidante e antimicrobiana. As frações ativas foram selecionadas e passaram novamente por fracionamento em CLT até o isolamento de uma provável molécula ativa. A prospecção fitoquímica foi feita através de cromatografia em camada delgada, utilizando as fases móveis e reveladores específicos descritos em literatura para cada grupo de metabólitos, detectando a presença de flavonóides, taninos, monoterpénóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, esteróides, saponinas e açúcares redutores. Para a determinação do potencial citotóxico, foi empregada a metodologia de acordo com o método do MTT {Brometo de [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazolium]}, método colorimétrico *in vitro*, baseado na formação de sais de formazan, testando o extrato bruto e suas frações na dose de 50 mg/mL frente a duas diferentes linhagens tumorais (HEP-2 e HT29), evidenciando inibição da proliferação celular superior a 75% nas frações F2.2 e F3. A atividade antioxidante foi determinada com base na capacidade de sequestro de radicais livres do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Os resultados demonstraram que tanto o extrato bruto das folhas de *Guettarda platypoda* quanto F3 e F4 possuem alta atividade antioxidante, superando a atividade do padrão Vitamina C. A análise antimicrobiana foi feita inicialmente com EBMFG através da técnica poços difusão em agar, substancia essa que se demonstrou ativa frente a três das cepas gram positivas testadas, *Staphylococcus aureus* AM 103, *Staphylococcus aureus* AM 1210 e *Staphylococcus epidermidis* AM 235. Os ensaios antimicrobianos tiveram continuidade com as frações do EBMFG através método de CMI (concentração mínima inibitória) diluição em Agar, entretanto todas as frações demonstraram-se inativas, com CMI>1 mg/mL. A partir do fracionamento biomonitorado uma substância, ISO-5, foi isolada da fração F3 e seus espectros de Ressonância Magnética Nuclear e Infravermelho revelaram se tratar da **feofitina a**, uma porfirina, pela primeira vez relatada no gênero *Guettarda*.

Palavras-chave: *Guettarda platypoda*; Fitoquímica; Fracionamento Biomonitorado; Atividade Citotóxica; Atividade Antioxidante; Feofitina a.

ABSTRACT

The difficulty of access to public health services and appearance of new diseases have been encouraged the use of the traditional medicine knowledge as well increased the interest in alternative therapies and the use of natural therapeutic products, especially those derived from plants. Angelica do mato (*Guettarda platypoda*) is a bush present on Pernambuco's flora and it is used in popular medicine as antipyretic, but their therapeutic properties validation and the chemical study of the species are still unfinished. The aim of this study was to conduct a bioassay-guided fractionation study of the leaves of *G. platypoda*, thus evaluating the biological activity (Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial) of their secondary metabolites and / or fractions of different polarities. The bioactivity-guided purification began partitioning the crude methanol extract of the leaves of *G. platypoda* (EBMFG) in a traditional liquid chromatography column (TLC) on silica gel, using solvents of increasing polarity (n-hexane n-hexane/AcOEt 1:1, EtOAc and MeOH), and after the solvent evaporation completed, the fractions were evaluated by their cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities. The active fractions were selected and passed again by fractionation on TLC to the isolation of a probable active molecule. The phytochemical screening was performed using thin layer chromatography, using specific mobile phase and revealing described in the literature for each group of metabolites, detecting the presence of flavonoids, tannins, monoterpenoids, sesquiterpenoids, diterpenes, triterpenoids, steroids, saponins and reducing sugars. To determine the cytotoxic potential the methodology according to the MTT {Bromide [3 - (4,5-dimethyl-2-thiazole) -2,5-difeniltetrazolium]} method was applied, in vitro colorimetric method based on the formation of formazan salts, testing the crude extract and its fractions at a dose of 50 mg / mL against two different strains tumor (HEp-2 and HT29), showing inhibition of cell proliferation in greater than 75% in F2.2 and F3 fractions. The antioxidant activity was determined based on the ability of takeover free radicals of DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazila). The results showed that EBMFG, F4 and F5 have high antioxidant activity, overcoming the activity of the standard vitamin C. The antimicrobial analysis was carried out initially with EBMFG by agar wells diffusion technique, and it has been demonstrated active against three Gram positive strains, *Staphylococcus aureus* AM 103, *Staphylococcus aureus* AM 1210 and *Staphylococcus epidermidis* AM 235. Antimicrobial assays were continued with the fractions from EBMFG using MIC (minimal inhibitory concentration) agar dilution technique, however all the fractions proved to be inactive, with MIC > 1 mg / mL. On fractionation bioassay-guided do isolated a substance(ISO-5) from F3 fraction and their spectra Nuclear Magnetic Resonance (1D and 2D) and Infrared showed to be the pheophytin a, a porphyrin, unprecedented in the *Guettarda* genre.

Keywords: *Guettarda platypoda*; Phytochemistry; bioassay-guided fractionation; Cytotoxic Activity, Antioxidant Activity, pheophytin a.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: A: <i>Guettarda platypoda</i> ; B: Flor de <i>Guettarda platypoda</i> ; C: Folha de <i>Guettarda platypoda</i> ; D: Fruto de <i>Guettarda platypoda</i> .	Pag. 8
Figura 02: Reação de desmetalção da clorofila a à feofitina a. (FILHO, 2011)	Pag. 10
Figura 03: Fluxograma da Purificação guiada por bioatividade.	Pag.13
Figura 04: Disposição das amostras na placa de petri durante o ensaio de poços.	Pag. 16
Figura 05: Descrição da distribuição das drogas na microplaca de 96 poços durante análise antimicrobiana por determinação da CMI.	Pag. 18
Figura 06: Cromatograma NEU/UV (360nm) EBMFG evidenciando a presença de flavonóides através da coloração alaranjada e amarelada.	Pag. 20
Figura 07: Cromatograma vanilina clorídrica/VIS 1- EBMFG (proantocianidinas); 2 – Padrão de Iridóides; 3 – Padrão de Leucoantocianidinas.	Pag. 20
Figura 08: Cromatograma -NEU/UV/Eluente n-BuOH-Me ₂ CO-TPPO ₄ (40:50:10) (360nm) 1- EBMFG; 2- Padrão Ácido Clorogênico.	Pag. 20
Figura 09: Cromatogramas (A) NEU/UV (360nm) Evidenciada a presença de flavonóides através da coloração alaranjada e amarelada nas frações F3 e F4.; (B) vanilina clorídrica/VIS Evidenciada a presença de taninos condensados pela coloração avermelhada e alta polaridade em F4.; (C) timol/VIS Evidenciada a presença de açúcares pela coloração avermelhada e baixa polaridade em F2, F3 e F4. Além de confirmar a presença de sacarose (SA) em F4; (D) Lieberman/UV (360nm), Evidenciada a presença de terpenos em todas as frações.	Pag. 21
Figura 10: Fluxograma do fracionamento biomonitorado do EBMFG.	Pag. 22

Figura 11: Cromatograma - Vanilina perclórica/VIS, ISO 4, ISO 5 e ISO 6 respectivamente, obtido na fração de acetato de etila.	Pag. 23
Figura 12: Halos de inibição do ensaio antimicrobiano por técnica de poços em milímetros.	Pag. 26
Figura 13: Ensaio antimicrobiano por técnica de poços frente a <i>S. aureus</i> AM 1210.	Pag. 27
Figura 14: Ensaio antimicrobiano por técnica de poços frente a <i>S. epidermidis</i> AM 235.	Pag. 27
Figura 15: Ensaio antimicrobiano por técnica de poços frente a <i>S. aureus</i> AM 103.	Pag. 28
Figura 16: Estrutura Molecular da Feofitina a (ISO 5)	Pag. 32
Figura 17: Diferença estrutural entre as feofitinas. (FILHO, 2011)	Pag. 32
Figura 18: Espectro de Infravermelho de ISO 5.	Pag. 35
Figura 19: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.	Pag. 36
Figura 20: Expansão 1 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.	Pag. 37
Figura 21: Expansão 2 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.	Pag. 38
Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C DEPT135 (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de ISO 5.	Pag. 39
Figura 23: Expansão 1 do espectro de RMN ^{13}C DEPT135 (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de ISO 5.	Pag. 40

Figura 24: Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de ISO 5.	Pag. 41
Figura 25: Expansão 1 do espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de ISO 5.	Pag. 42
Figura 26: Expansão 2 do espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de ISO 5.	Pag. 43
Figura 27: Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.	Pag. 44
Figura 28: Expansão 1 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.	Pag. 45
Figura 29: Expansão 2 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.	Pag. 46
Figura 30: Expansão 3 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.	Pag. 47
Figura 31: Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.	Pag. 48
Figura 32: Expansão 1 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.	Pag. 49
Figura 33: Expansão 2 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.	Pag. 50
Figura 34: Expansão 3 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.	Pag. 51
Figura 35: Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.	Pag. 52
Figura 36: Expansão 1 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.	Pag. 53

MHz) de ISO 5.

Figura 37: Expansão 2 do espectro de RMN $1\text{H} \times 1\text{H}$ COSY (δ , CDCl_3 , 500
MHz) de ISO 5.

Pag. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Fases móveis e reagentes diversos consoantes ao grupo de metabólitos a ser investigado	Pág. 12
Tabela 02: Microorganismos utilizados no teste de atividade antimicrobiana por técnica de poços.	Pág. 15
Tabela 03: Resultado da Avaliação Fitoquímica do extrato bruto metanólico, e de suas frações, das folhas de <i>Guettarda platypoda</i> .	Pág. 20
Tabela 04: Resultado do rendimento do fracionamento de 8,027 g do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Guettarda platypoda</i> do fracionamento em gel de sílica a vácuo.	Pág. 22
Tabela 05: Resultados da Atividade citotóxica do Extrato bruto metanólico das folhas de <i>G. platypoda</i> e suas frações	Pág. 23
Tabela 06: Resultados da Atividade antioxidante do Extrato bruto metanólico das folhas de <i>G. platypoda</i> e suas frações.	Pág. 25
Tabela 07: Resultado do ensaio de Concentração Mínima Inibitória (CMI) em µg/mL	Pág. 28
Tabela 08: Deslocamento químico dos carbonos do núcleo porfirínico, e suas interações.	Pág. 44
Tabela 09: Deslocamento químico dos carbonos do radical Fitol, e suas interações.	Pág. 34

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
AF	Ácido fórmico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CHCl ₃	Clorofórmio
COSY	Ressonância Magnética Nuclear de Espectroscopia Correlacionada
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
δ	Deslocamento Químico
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazolium]
<i>n</i> -BuOH	n-Butanol
NEU	solução de 1% difenilboriloxietilamina
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EBMFG	Extrato bruto metanólico das folhas de <i>Guettarda platypoda</i>
F1	Fração N-Hexânica do Extrato bruto metanólico das folhas de <i>Guettarda platypoda</i>
F2	Fração N-Hexano/Acetato de Etila (1:1) do Extrato bruto metanólico das folhas de <i>Guettarda platypoda</i>
F3	Fração Acetato de Etila do Extrato bruto metanólico das folhas de <i>Guettarda platypoda</i>
F4	Fração Metanólica do Extrato bruto metanólico das folhas de <i>Guettarda platypoda</i>
F2.1	Resíduo inicial extraído do fracionamento em gel de sílica da Fração N-Hexano/Acetato de Etila (1:1) do Extrato bruto metanólico das folhas de <i>Guettarda platypoda</i>
F2.2	Resíduo secundário extraído do fracionamento em gel de sílica da Fração N-Hexano/Acetato de Etila (1:1) do Extrato bruto metanólico das folhas de <i>Guettarda platypoda</i>
P 4	Primeira substância pura extraída em coluna de gel de sílica da Fração Acetato de Etila do Extrato bruto metanólico das folhas de

	<i>Guettarda platypoda</i>
P 5	Segunda substância pura extraída em coluna de gel de sílica da Fração Acetato de Etila do Extrato bruto metanólico das folhas de <i>Guettarda platypoda</i> – Feofitina a
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
TPPO4	Tampão fosfato
TTZ	cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio
UV	Ultravioleta
VIS	Luz Visível
IV	Infravermelho
CMI	Concentração Mínima Inibitória

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
3. Revisão Bibliográfica.....	4
3.1. Produtos Naturais.....	4
3.2. Família Rubiaceae.....	6
3.3. Gênero Guettarda.....	7
3.4. <i>Guettarda platypoda</i> DC.	7
3.5. Porfirinas e Feofitina a	9
4. Material e métodos.....	11
4.1. Coleta e Identificação.	11
4.2. Secagem e Trituração.....	11
4.3. Extração.	11
4.4. Perfil fitoquímico.....	11
4.5. Fracionamento biomonitorado.	13
4.6. Identificação das substâncias.	14
4.7. Testes de atividade citotóxica	14
4.8. Teste de Atividade Antioxidante.....	14
4.9. Avaliação da Atividade Antimicrobiana	15
4.9.1. Determinação do halo de inibição por técnica de poços	15
4.9.1.1. Preparação dos inóculos	16
4.9.1.2. Técnica de Poços ...	16
4.9.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	17
5. Resultados e Discussão.....	19
5.1. Estudo Fitoquímico.....	19
5.2. Fracionamento Biomonitorado.....	21
5.3. Testes de atividade citotóxica	23
5.4. Atividade antioxidante	24
5.5. Avaliação da Atividade Antimicrobiana	26
5.5.1. Determinação do halo de inibição por técnica de poços	26
5.5.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	28
5.6. Determinação da estrutura molecular de ISO 5.	29
6. Conclusões.....	55
7. Referências.....	56

1. Introdução

A química é uma ciência central, assumindo em muitos aspectos as características de uma ciência interdisciplinar, que fornece os meios essenciais para a correta compreensão de outras disciplinas científicas (BRESLOW, 1997).

E a vida está de fato envolvida com a química. Nascimento, crescimento, reprodução, doenças e morte dependem de transformações químicas executadas pelos metabolismos primários e secundários de organismos vivos. A bioquímica investiga a química de produtos naturais do metabolismo primário, que produz: aminoácidos, proteínas, lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos. Enquanto que a química de produtos naturais do metabolismo secundário é estudada pelos químicos orgânicos. Os caminhos biossintéticos do metabolismo secundário envolvem um número relativamente pequeno de bioreações conhecidas pelos químicos orgânicos (chiquimato, policetídeo e mevalonato) e os produtos desses são frequentemente características de grupos biológicos, como família ou gênero. (TORSELL, 1997; DEWICK, 1998).

Durante a década de 90 houve um crescente interesse pelas terapias alternativas e pelo uso terapêutico de produtos naturais, especialmente naqueles derivados de vegetais (MENTZ e SCHENKEL, 1989). Este fato encontra-se associado ao crescimento do interesse da indústria farmacêutica pelo uso da biodiversidade como fonte de novos medicamentos (CORDELL, 1995).

A grande extensão territorial do Brasil e o difícil acesso decorrente dela têm promovido o isolamento geográfico de muitas comunidades, dificultando a implantação serviços de saúde pública, levando ao surgimento de novas doenças nessas comunidades. Esses transtornos têm incentivado o uso dos conhecimentos da medicina tradicional como também tem sido adicionado novos conhecimentos e usos medicinais da flora (RODRIGUES e CARLINI, 2002).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (DIAS, 1996). Com esse grande número de espécies, torna-se um forte candidato ao descobrimento de novos fármacos com ação terapêutica. Entretanto, no Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Muitas vezes, são empregadas para fins

medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. E as pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro ainda são incipientes (VEIGA-JÚNIOR *et al.*, 2005).

No início da década de 1990, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993). Atualmente, de acordo com a OMS, a estimativa é de que cerca de 40% dos fármacos empregados na terapêutica, são provenientes de fontes naturais, sendo 25% de plantas. Este percentual aumenta ainda mais se nos restringirmos apenas aos fármacos anticancerígenos e antibióticos (YUE-ZHONG SHU, 1998). Das 252 drogas, consideradas básicas pela OMS, 11% são exclusivamente de origem natural e um número significativo destes são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001).

A família Rubiaceae está distribuída nos principais ecossistemas brasileiros (amazônia, cerrado, mata atlântica). Essa família é bem conhecida devido à importância econômica e terapêutica das suas espécies, especialmente *Coffea arábica* e *Cinchona ledgeriana* (BOLZANI *et al.*, 2001). São inúmeros os relatos da utilização de plantas da família Rubiaceae com fins medicinais, entre as atividades encontradas estão: atividade antitumoral (MOURA *et al.*, 2006), atividade alelopática (FUGII *et al.*, 2003), citotoxicidade (FALCÃO *et al.*, 2005; HEITZMAN, *et al.* 2005), atividade antiinflamatória (FALCÃO *et al.*, 2005; LUCENA *et al.*, 2005), atividade antiviral, atividade imunoestimulante, atividade antioxidante, atividade hipotensiva, atividade antimutagênica e atividade antimicrobiana (HEITZMAN, *et al.*, 2005).

De acordo com Gazda (2004), esta família engloba 637 gêneros e aproximadamente 10.700 espécies. A maioria de seus representantes ocorre em regiões tropical e subtropical

Como parte de um programa de trabalho na Universidade Federal de Pernambuco na área de fitoquímica e relevando os aspectos acima apontados junto a importância dos produtos naturais para a sociedade como um todo, estudamos a espécie *Guettarda platypoda* D.C. (Rubiaceae). A escolha desta planta, cujo estudo químico ainda está em aberto, se deve ao fato de ser a mesma utilizada na medicina popular, como febrífuga e também utilizada durante o período puerperal (AGRA, 1980).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Realizar um estudo biomonitorado para a investigação fitoquímica das folhas da espécie *Guettarda platypoda* e avaliar a atividade biológica (microbiológica e farmacológica) de seus metabólitos secundários majoritários e/ou frações de polaridades diferentes.

2.2. Objetivos específicos

- Fracionar o extrato bruto metanólico das folhas de *G. platypoda* (EBMFG) com solventes de diferentes polaridades (n-hexânico, de acetato de etila e metanólico).
- Submeter o extrato e suas frações aos ensaios de citotoxicidade, antimicrobiano e antioxidante.
- Realizar a triagem fitoquímica do EBMFG e de suas frações visando detectar os principais metabólitos secundários presentes no objeto de estudo.
- Realizar fracionamento cromatográfico em sílica gel, sephadex LH-20, das frações ativas.
- Caracterizar as substâncias bioativas puras via métodos físicos de análise espectrométrica.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Produtos naturais

As plantas tem sido uma rica fonte de obtenção de moléculas com aplicação na terapêutica. O homem sempre buscou na natureza os suprimentos para suas necessidades básicas retirando dela tudo que lhe era necessário a sobrevivência, inclusive soluções para combater suas enfermidades (NEWMAN *et al.*, 2000).

Durante a antiguidade Egípcia, Grega e Romana conhecimentos empíricos sobre plantas e seus poderes de cura foram acumulados e transmitidos principalmente pelos árabes aos descendentes destas civilizações. Demonstrando assim que desde as mais remotas civilizações as plantas eram utilizadas com finalidades terapêuticas. E assim com o passar do tempo os laços entre as plantas medicinais e o avanço da ciência se estreitaram, principalmente com o advento da síntese química, iniciando-se uma fase de crescimento vertiginoso. Além disso, o incentivo ao resgate da sabedoria popular do uso das plantas medicinais ofereceu um suporte científico para o desenvolvimento de novos medicamentos (SILVA *et al.*, 2004; HOSTETTMANN *et al.*, 2003; GROVER, 2004;).

A utilização de produtos naturais como matéria-prima para a produção de substâncias com atividade biológica, especialmente os fármacos, tem sido extensamente relatada ao longo dos anos (SIMOES *et al.*, 1999). Desta forma, as plantas medicinais constituem uma fonte renovável de onde podem ser obtidos novos e eficazes medicamentos (DI STASI, 1995).

A fitoterapia brasileira, assim como a de todo mundo, encontra-se em processo de ampla expansão. A utilização de plantas, no Brasil, com propósitos curativos teve sua origem inicialmente na cultura indígena, posteriormente através dos conhecimentos trazidos da África pelos negros e, finalmente, por meio dos imigrantes. Em todas as regiões, o uso de plantas medicinais nas suas mais diversas formas, tornou-se uma prática comum, desenvolvida por todas as camadas da sociedade, especialmente pelas populações submetidas a privações sociais e econômicas (MELO, 1991).

Com isso, a Organização Mundial de Saúde (OMS), ao fim da década de 1970, criou o Programa de Medicina Tradicional, com objetivos de proteger e promover a saúde, incentivando a preservação da cultura popular sobre os conhecimentos da utilização de plantas medicinais (BRASIL, 2006; WHO, 2002). Neste programa, a OMS recomenda aos estados-membros o desenvolvimento de políticas públicas para facilitar

a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde, assim como promover o uso racional dessa integração (BRASIL, 2006).

No Brasil, em 2006, foi criada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos tendo como objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006), aprovada pelo Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Neste mesmo ano, a Portaria GM/MS nº 971, de 3 de maio de 2006, aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). Estes corroboraram, juntamente com a Portaria Interministerial nº 2.960, de 09 de dezembro de 2008 (a qual aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos), para criar a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10, de 09 de março de 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A RDC nº 10 se propõe a contribuir para a construção do marco regulatório para produção, distribuição e uso de plantas medicinais, particularmente sob a forma de drogas vegetais, a partir da experiência da sociedade civil nas suas diferentes formas de organização, de modo a garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a esses produtos (ANVISA, 2010).

Antioxidantes naturais tem ganhado crescente interesse da população por estarem intimamente relacionados a baixas incidências de doenças degenerativas incluindo câncer, doenças cardiovasculares entre outras (Oliveira *et al.*, 2011)

Diversas substâncias presentes naturalmente nos alimentos de origem vegetal apresentam potencial para atuar como antioxidante em meio biológico. Nas frutas, por exemplo, os principais compostos antioxidantes são a vitamina C, os carotenoides e os compostos fenólicos, tais como os flavonoides. (Oliveira *et al.*, 2011)

A terapia contra o câncer provavelmente é a área de maior enfoque para os estudos com produtos naturais. Novas aplicações clínicas de metabólitos secundários oriundos de plantas e seus derivados têm sido direcionados para o combate ao câncer (NEWMAN *et al.*, 2003; BUTLER, 2004).

Desde 1955, o Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos, realiza triagens pré-clínicas de compostos e materiais, que incluem extratos de origem natural. Mais de 400.000 compostos foram testados para avaliar atividade anticâncer, incluindo 180.000 derivados de microrganismos e 114.000 extratos vegetais. Entre os anos de 1990 e 1996, aproximadamente, vinte agentes anticâncer, os quais incluem produtos

naturais puros ou semi-sintéticas, foram aprovados para o mercado (MUKHERJEE *et al.*, 2001).

De acordo com Cragg e Newman (2000), 50% das drogas em testes clínicos para atividade anticâncer foram isoladas de fonte natural ou estão relacionadas a elas.

3.2.Família Rubiaceae

A família Rubiaceae compreende cerca de 9.000 espécies distribuídas pelo mundo, sendo mais representada em regiões tropicais, onde já foram registradas aproximadamente 5.000 espécies. No Brasil ocorrem cerca de 2.000 espécies de Rubiaceae distribuídas em 120 gêneros, sendo considerada uma das principais famílias da flora brasileira (SOUZA e LORENZI, 2005).

A família Rubiaceae foi descrita primeiramente pelo botânico francês Antoine Laurent de Jussieu, em 1789, tem seu nome derivado do gênero *Rubia* L., do latim rubium, relativo à tinta vermelha produzida pelas raízes de algumas plantas deste gênero, utilizadas para tingir tecidos (PEREIRA, 2007).

Robbrecht (1988, 1993) publicou a descrição morfológica desta família, reconhecendo quatro subfamílias, Cinchonoideae, Ixoroideae, Rubioideae e Antirheoideae, somando 44 tribos, concluindo também que as tribos Condamineae, Rondeletiae e Sipaneeae, com base na morfologia, são consideradas muito próximas das tribos da subfamília Cinchonoideae. A implementação das técnicas moleculares contribuiu ainda mais para a compreensão da sistemática da família Rubiaceae. Estudos filogenéticos baseados em dados moleculares, como os de Bremer *et al.* (1995, 1999), reconheceram apenas três subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae. Em 2006 Robbrecht e Manen reconhecem apenas duas subfamílias, Cinchonoideae e Rubioideae, com quatro supertribos (MARGALHO *et al.*, 2009).

A maior parte das espécies da família Rubiaceae é própria das regiões mais quentes, principalmente dos trópicos. Mais de 95% de todas as espécies crescem nessas regiões diminuindo em direção ao sul (DELPRETE, 1998 apud OLIVEIRA, 2009). Para a região Nordeste, Barbosa *et al.* (1996) compilaram 66 gêneros e 277 espécies presentes na flora.

A família é conhecida devido à importância econômica (*Coffea arábica*, café) e terapêutica de suas espécies, sendo amplamente utilizadas na medicina popular e na

fabricação de fitofármacos e fitoterápicos (*Uncaria tomentosa*, unha de gato) (OLIVEIRA, 2009).

3.3. Gênero *Guettarda*

O gênero *Guettarda* (Rubiaceae) compreende plantas extensamente distribuídas em áreas tropicais. Elas são popularmente utilizadas na América do Sul para tratamento de ferimentos e inflamações. (ACHILLE *et al.*, 2006)

O gênero pertencente à tribo Guettardeae, composta por cerca de 150 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e neotropicais (ACHILLE *et al.*, 2006), dentre elas, as espécies brasileiras *G. platypoda* e *G. angelica*, encontradas nas regiões nordeste e centro-oeste e utilizadas popularmente como antifebril. (CAPASSO *et al.*, 1998; AGRA *et al.*, 1985)

Algumas dessas espécies apresentam comprovadas atividades biológicas. Dentre as quais estão *G. angelica* Mart., cujas raízes são utilizadas no tratamento de tifo, febres e diarreia e os estudos *in vitro* demonstraram atividades antibacteriana frente a salmonelas e hipoglicemiante em ratos (SOUSA *et al.*, 1984), *G. spruceana* Muell. Arg. usada como enemagoga e abortiva (QUINTANS-JUNIOR *et al.*, 2001), *G. acreana* (Krause) que apresenta atividade antiinflamatória e antiespasmódica (CAPASSO *et al.*, 1998) e *G. platypoda* DC. usada como antifebrífuga e demonstrou atividade antiinflamatória (BHATTACHARYYA e ALMEIDA, 1985) e antiviral contra os vírus da estomatite vesicular e rinovírus (AQUINO *et al.*, 1989).

3.4. *Guettarda platypoda* DC.

Guettarda platypoda DC. (Figura 1 – A), angélica do mato, é uma espécie arbustiva com ampla distribuição no litoral brasileiro, principalmente na região Nordeste incluindo restingas, que são ecossistemas bastante ameaçados pela ocupação humana (PEREIRA e BARBOSA, 2004; ZICKEL *et al.*, 2007).

Suas folhas (Figura 1 – C) são verdes, simples, opostas, de textura membranácea e possuem tricomas em ambas as faces sempre mais abundantes na face abaxial. Os tricomas presentes caracterizam-se pela presença de cristais tipo drusas incrustados em

suas paredes. Esse tipo de cristal está geralmente associada a defesa da planta contra herbivoria e ou a manutenção de nutrientes como reserva de cálcio ou oxalato. (METCALFE e CHALK,1950; CORRÊA, 2007).

As flores (Figura 1 – B) são hermafroditas, actinomorfas, pentâmeras, com sépalas fundidas, esverdeadas e persistentes no fruto, fase em que adquirem coloração levemente avermelhada; as pétalas são fundidas, de cor creme, formando um tubo ereto e hipocrateriforme. (NOVO, 2010)

Essa espécie apresenta frutos drupóides (Figura 1 – D), epicarpo verde-claro quando imaturo e branco-amarelado, quando maduro. A superfície externa do fruto varia de lisa ou com algumas depressões. Mesocarpo carnoso, formando uma polpa suculenta, esbranquiçado, macio, sabor adocicado e com odor devido à presença de flavonóides (CORRÊA, 2007).

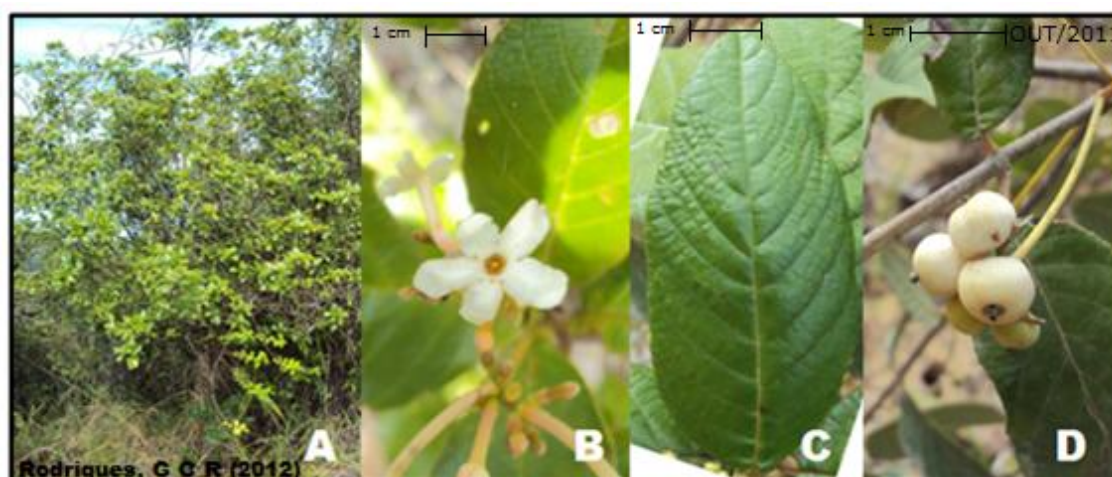


Figura 01: A: *Guettarda platypoda*; B: Flor; C: Folha; D: Fruto.

As sementes de *G. platypoda* são envolvidas totalmente pelo endocarpo lenhoso, juntos são denominados de pirênio, com apenas um pirênio por fruto. O tegumento é rígido, lenhoso, dificultando sua abertura para observação do embrião. Internamente, foi possível observar dois lóculos curvos. Externamente aos lóculos observa-se uma massa gelatinosa e macia. Os lóculos são muito próximos, curvos e muitas vezes distribuídos de forma aleatória, (BARROSO *et al.* 1999; LIMA *et al.*, 2010)

3.5. Porfirinas e Feofitina a

As porfirinas constituem uma classe muito importante de moléculas que estão presentes em muitos sistemas biológicos, como por exemplo, nos citocromos e hemoglobinas, os quais são responsáveis pela transferência de elétrons na cadeia respiratória e pelo transporte de oxigênio na corrente sanguínea, respectivamente (LEHNINGER *et al.*, 2005).

As porfirinas e seus derivados compreendem um grande grupo de diversas entidades químicas que são constituídas essencialmente de quatro anéis pirrólicos ligados entre si por uma ponte metínica, formando um grande macrociclo. As diferenças estruturais na série de porfirinas decorrem do grau de insaturação dos anéis, na composição das cadeias laterais anexadas aos anéis pirrólicos e nas posições axiais do macrociclo (STERNBERG *et al.*, 1998).

Moléculas de porfirinas podem formar complexos com íons metálicos por coordenação através dos quatro átomos de nitrogênio pirrólicos, no entanto, muitas existem naturalmente sob a forma desmetalada. Estes compostos possuem uma alta hidrofobicidade, sobretudo na forma desmetalada (STERNBERG *et al.*, 1998).

Dentro da classificação dos derivados porfirínicos, a clorofila pertence à classe das clorinas. A clorofila a é uma clorina metalada com um íon (Mg^{2+}) e que contém uma cadeia fitílica (por alusão ao álcool fitol) anexa ao anel porfirínico (IV). A presença desta cadeia longa e apolar confere uma alta hidrofobicidade à molécula. A clorofila a, bem como os seus derivados que contêm a cadeia fitílica são insolúveis em meio aquoso. A desmetalção da clorofila a origina a feofitina a (Figura 2) onde o íon metálico (Mg^{2+}) é substituído por dois átomos de hidrogênio. A obtenção deste derivado se dá através da reação de hidrólise ácida (SOARES, 2006).

Da clorofila a também se originam biossinteticamente as demais, sendo este fenômeno conhecido como feofitinização (STREIT *et al.*, 2005).

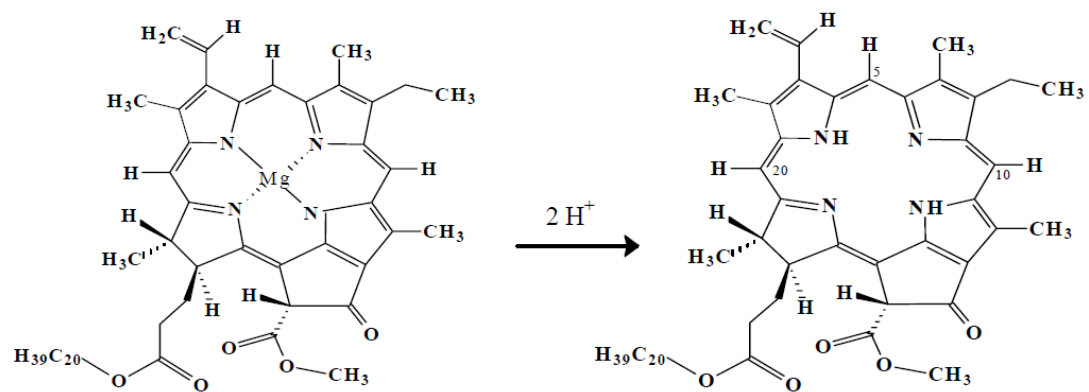


Figura 02: Reação de desmetalção da clorofila *a* à feofitina *a*. (FILHO, 2011)

4. Material e Métodos

4.1. Coleta e Identificação.

O material botânico (folhas de *Guettarda platypoda*) foi coletado no município de Itamaracá, Pernambuco a cerca de 50 km do Recife. Após coleta, exemplares dessecados da planta foram depositados no Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e identificados sob o número 86565.

4.2. Secagem e Trituração.

O material vegetal (folhas) foi seco em estufa a 48 °C por 48 horas, triturado em moinho de facas e pesado.

4.3. Extração.

A extração de componentes foi feita através de maceração por sete dias, usando metanol (10%). A solução obtida então foi concentrada à pressão reduzida em evaporador rotativo até retirada total do solvente.

4.4. Perfil fitoquímico

A prospecção fitoquímica do EBMFG e de suas frações foi feita através de cromatografia em camada delgada, utilizando as fases móveis e reveladores específicos descritos na literatura para cada grupo de metabólitos (Tabela 01) e como fase estacionária placas de Gel Sílica (ALUGRAM® SIL G/UV254, Ref: 818133).

Para a identificação de Saponosídeos foi utilizado o teste de afrogenicidade. O teste consistiu na diluição em tubos de ensaio com água destilada do extrato bruto, agitação manual por aproximadamente trinta segundos e em seguida observada a consistência e a persistência da espuma produzida. O critério usado para avaliar a presença de saponosídeos foi a formação de uma espuma abundante e persistente por mais de 2h.

Tabela 01. Fases móveis e reagentes diversos consoantes ao grupo de metabólitos a ser investigado

METABÓLITOS	FASE MÓVEL	REVELADOR	REFERÊNCIA
Alcaloides	AcOEt-AF-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26)	Dragendorff	WAGNER, 1996
Monoterpenóides e Sesquiterpenóides	Benzeno-AcOEt (97:03)	Vanilina sulfúrica	WAGNER, 1996
Diterpenóides	Benzeno-AcOEt (93:07)	Vanilina sulfúrica	WAGNER, 1996
Triterpenóides e Esteróides	AcOEt-AF-AcOH-H ₂ O (100:0,5:0,5:0,5)	Lieberman/ Burchard	HARBONE, 1998
Iridóides	AcOEt-AF-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26)	Vanilina sulfúrica	SÁ BARRETO, 2005
Açúcares	n-BuOH-Me ₂ CO-TPPO ₄ (40:50:10)	Cloreto de trifeniltetrazólio	METZ, 1961
Glicosídeos cardíacos	AcOEt-MeOH-H ₂ O (100:13,5:10)	Kedde	WAGNER, 1996
Cumarinas	Et ₂ O-Tolueno-AcOH 10% (50:50:50)	U.V.	WAGNER, 1996
Derivados cinâmicos	AcOEt-AF-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26)	NEU	XAVIER, 1988
Flavonóides	AcOEt-AF-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26)	NEU	XAVIER, 1988
Proantocianidinas condensadas e Leucoantocianidinas	AcOEt-AF-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26)	Vanilina clorídrica	ROBERTSON, 1957
Taninos hidrolizáveis	n-BuOH-Me ₂ CO-TPPO ₄ (40:50:10)	Difenilboriloxietilamina Alumem de ferro	XAVIER, 2002 STIASNY, 1912

Legenda: AcOEt-AF-AcOH-H₂O = Acetato de etila/Ácido fórmico/ Ácido acético/Água; Benzeno-AcOEt = Benzeno/ Acetato de etila; *n*-BuOH-Me₂CO-TPPO₄ = *n*-Butanol/Acetona/Tampão fosfato, pH 5,0; AcOEt-MeOH-H₂O = Acetato de etila/Metanol/Água; Et₂O-Tolueno-AcOH = Etóxi etano/Tolueno/Ácido acético; NEU = solução de 1% difenilboriloxietilamina

4.5. Fracionamento biomonitorado

O Fracionamento Biomonitorado consiste na obtenção de frações, as quais são monitoradas através de ensaio de atividade farmacológica com o objetivo detectar quais delas apresentam compostos bioativos (HOUGHTON, 2000).

O extrato bruto metanólico das folhas de *G. platypoda* foi submetida à fracionamento em coluna cromatográfica líquida tradicional com solventes de polaridade crescente (n-hexano, n-hexano/AcOEt 1:1, AcOEt e MeOH), em seguida as frações foram concentradas a pressão reduzida em evaporador rotativo e submetidas a avaliação das atividades citotóxica e antioxidante. As frações com atividade foram selecionadas e foram submetidas novamente ao fracionamento em sílica gel.

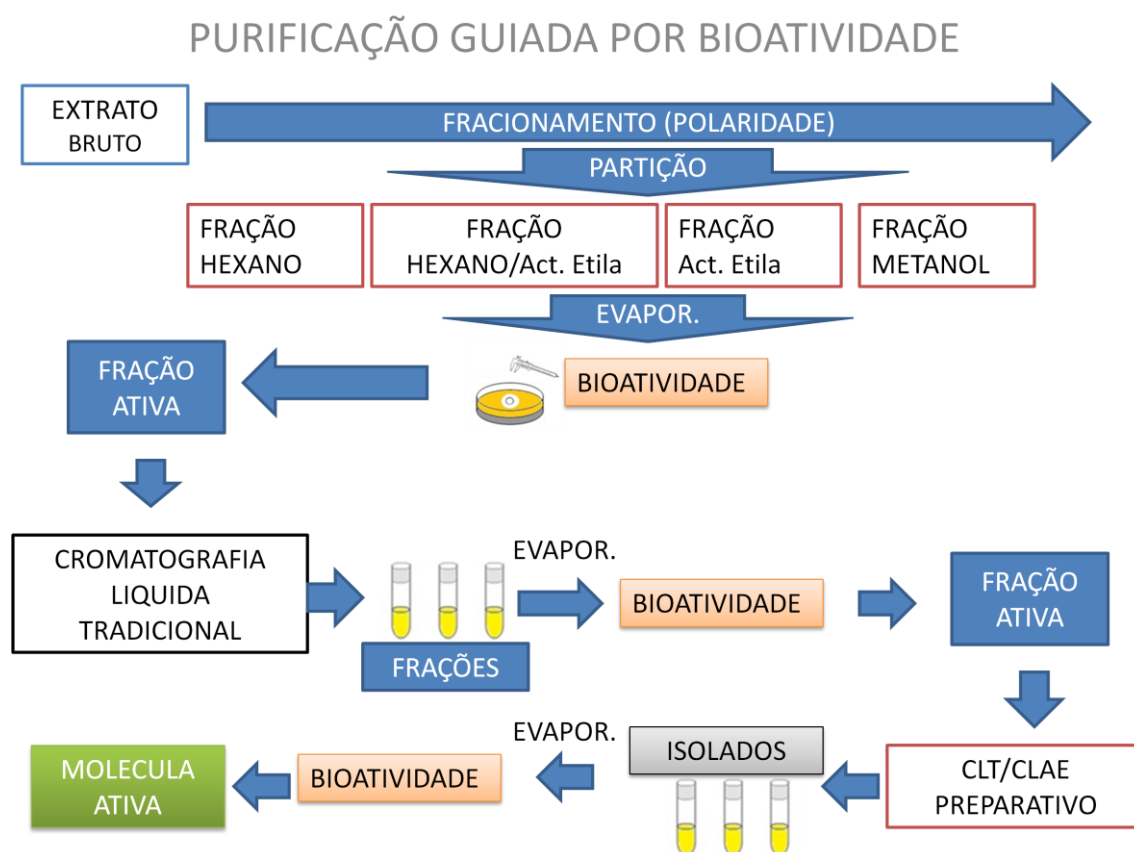


Figura 03: Fluxograma da Purificação guiada por bioatividade.

4.6. Identificação das substâncias.

As substâncias isoladas foram analisadas através de métodos espectrométricos [Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) em uma e duas dimensões; Espectro de Infravermelho (IV)].

4.7. Testes de atividade citotóxica

Os testes de atividade citotóxica foram realizados *in vitro* através do método do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium), este método é uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Ou seja, a solução amarela de MTT é reduzida pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo, sendo um método rápido, sensível e barato.

As linhagens de células utilizadas foram, HEP-2 (Human Epidermoide Cancer Cells) e HT29 (Carcinoma de Colon), avaliando o EBMFG e suas frações e as linhagens MCF-7 e HL-60 (leucemias) para o composto isolado, todos na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. E, por intermédio da leitura óptica em leitor automático de placas a 595 nm, foi determinada a inibição da proliferação celular através da comparação da densidade óptica (DO) média dos poços testes e dos poços controles.

4.8. Determinação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada com base na capacidade de seqüestro de radicais livres, semelhante ao descrito por Hegazi *et al.*, (2002), utilizando o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) na concentração de 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Soluções em concentrações de 1; 5; 10; 50; 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ foram preparadas pela dissolução das amostras em metanol, e 1,0 mL de cada solução foi misturada a outra solução metanólica de DPPH (1,0 mL), na concentração de 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Após 30 minutos foram realizadas medidas da absorbância em espectrofotômetro UV-VIS a 520 nm. A percentagem de inibição foi obtida por comparação da absorção da solução contendo amostra, em relação a uma solução controle de DPPH sem amostra. O cálculo da

atividade antioxidante foi feito utilizando o programa GraphPad Prism 4 for Windows e no cálculo da CI50 a equação dose-resposta sigmoidal.

- Percentagem de Inibição = $(1 - \text{Abs. Da amostra} / \text{Abs. Do DPPH}) \times 100$

O teste foi realizado em triplicata, utilizando como padrões positivos o Trolox e a vitamina C.

4.9. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

4.9.1. Determinação do halo de inibição por técnica de poços

Esta técnica foi utilizada preliminarmente para avaliar se o extrato bruto metanólico de folhas de *G. platypoda* possuía alguma atividade antimicrobiana e para selecionar quais microorganismos (Tabela 2) seriam testadas frente às frações do EBMFG por técnica de Concentração mínima inibitória (CMI).

Tabela 02: Microorganismos utilizados no teste de atividade antimicrobiana por técnica de poços.

<i>Microorganismo</i>	<i>Gram</i>	<i>Código</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	G +	AM103
<i>Staphylococcus aureus</i>	G +	AM 1272
<i>Staphylococcus aureus</i>	G +	AM 1210
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G +	AM235
<i>Bacillus subtilis</i>	G +	AM 04
<i>Enterococcus faecalis</i>	G +	AM 1056
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	G +	AM 245
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G -	AM 206
<i>Escherichia coli</i>	G -	AM 1050
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G -	AM 410
<i>Salmonella</i>	G -	AM 1046
<i>Shigella flexneri</i>	G -	AM 992
<i>Candida albicans</i>		AM1140
<i>Candida Krusei</i>		AM 1168
<i>Candida tropicalis</i>		AM 1181

Legenda: AM – Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE.

4.9.1.1. Preparação dos inóculos

As culturas bacterianas inoculadas em ágar Muller-Hinton após 24 horas de incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram suspensas em 5 ml solução fisiológica estéril e comparadas as turvações do tubo 0,5 da escala McFarland (10^8 UFC.mL^{-1}) (NCCLS, 2003).

4.9.1.2. Técnica de Poços

O semeio dos inóculos foi realizado com swab de algodão estéril na superfície de placas de Petri contendo 20 ml de ágar Muller-Hinton, procedendo subsequentemente à perfuração asséptica dos poços (perfurador de 6 mm de diâmetro) e aplicando as amostras (testes, controle e padrão) com pipeta automática na razão de 100 μL por poço. As amostras teste do *screening* de atividade antimicrobiana foram extrato metanólico das folhas da *Guettarda platypoda*, nas concentrações de 50 mg.mL^{-1} e 100 mg.mL^{-1} , diluídos em solução de DMSO 20%. No ensaio, o antibiótico Padrão foi a tetraciclina ($300\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) e a amostra controle do diluente foi DMSO 50%, como demonstrado na Figura 4.

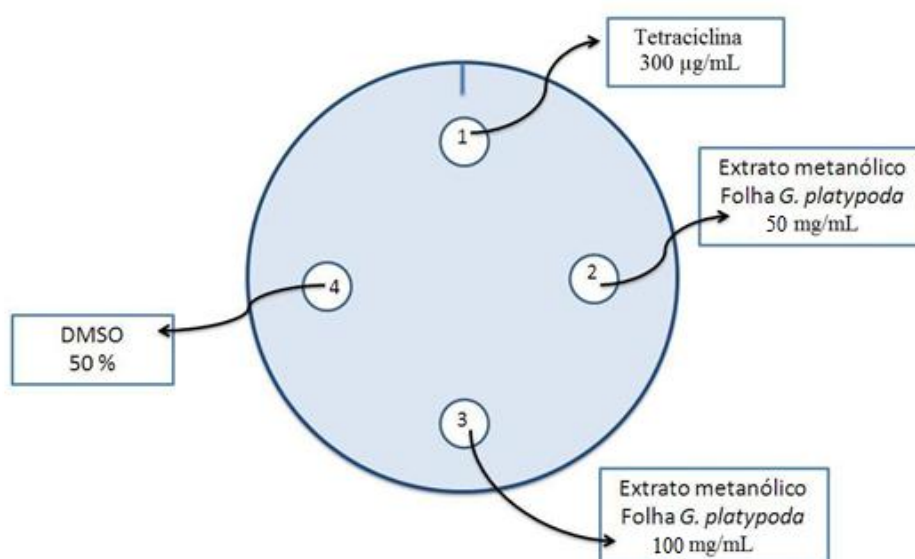


Figura 04: Disposição das amostras na placa de petri durante o ensaio de poços.

4.9.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações estabelecidas pela Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010), com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em microplacas estéreis de 96 orifícios com fundo em forma de “U”, com adição da resazurina para revelar o crescimento bacteriano. A diluição das drogas foi realizada primariamente em tubos a fim de obter a concentração adequada para iniciar a diluição na microplaca, de acordo com as especificações da Figura 05.

Inicialmente as soluções estoque dos extratos foram esterilizadas por filtração através de membranas de porosidade de 0,22 µm milipore®, em seguida um volume de 180 µL foi inoculado nos orifícios de A e B, para o padrão e de C a H para as amostras, todos da coluna 1. Os demais orifícios foram preenchidos inicialmente apenas com 100 µL de caldo Mueller-Hinton.

Logo após, foi realizada transferência de 90µL do conteúdo dos orifícios da coluna 1 para a 2 e assim sucessivamente até a 12(padão) e 8(amostras), sendo desprezados os últimos 90 µL, obtendo-se assim concentrações decrescentes dos extratos (1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,625 µg/mL, 7,81 µg/mL e 3,9 µg/mL) e do padrão (64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,0625 µg/mL e 0,03125 µg/mL) (Figura 5).

Após a diluição dos extratos, foi acrescido em todos os orifícios, exceto nos controles das amostras, diluentes e do meio, um volume de 10 µL dos inóculos microbianos padronizados, obtendo-se por orifício, uma concentração final de 10^4 UFC/mL. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

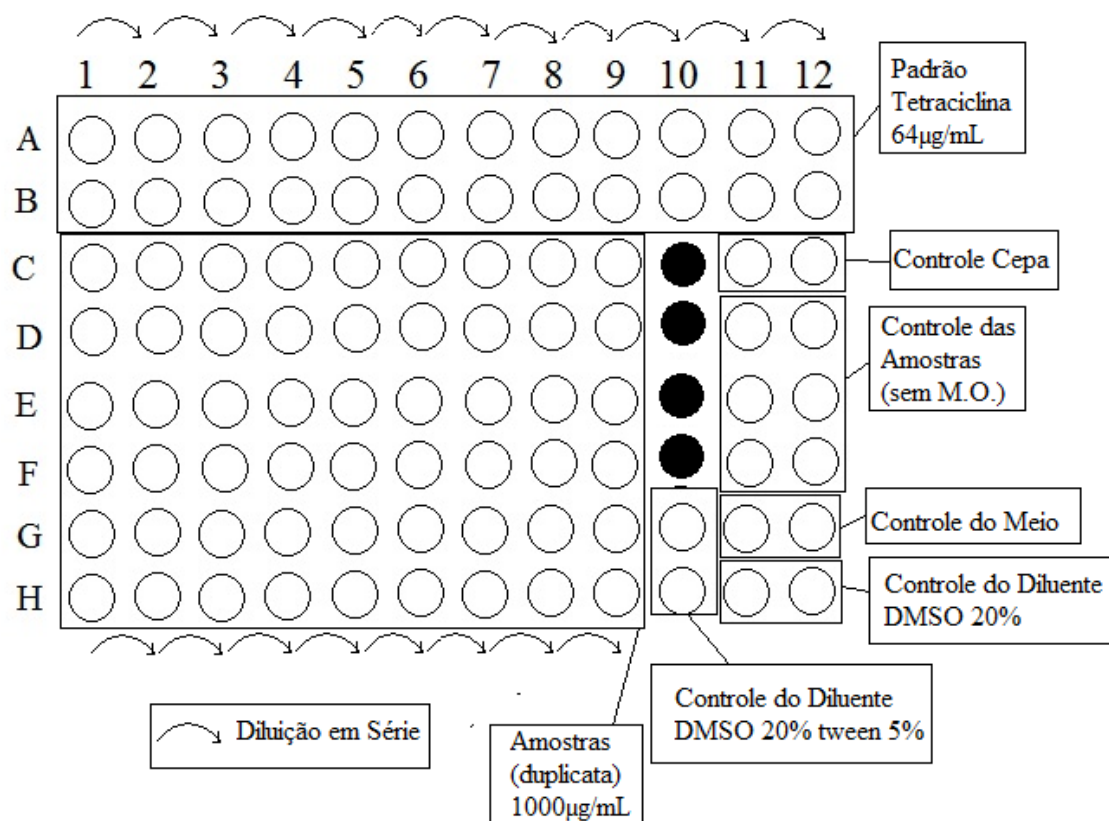


Figura 05: Descrição da distribuição das drogas na microplaca de 96 poços durante análise antimicrobiana por determinação da CMI.

5. Resultados e discussão

5.1. Estudo Fitoquímico

A prospecção fitoquímica foi feita baseada na metodologia anteriormente descrita, realizada tanto no extrato bruto das folhas de *Guettarda platypoda*, quanto em suas principais frações (Tabela 03).

Flavonóides (Figura 06), Taninos (Figura 07), monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpenóides, triterpenóides (Figura 09 - D), esteróides, saponinas e açúcares redutores (Figura 09 - C) foram observados no EBMFG. Os demais metabólitos, como leucoantocianidinas (Figura 07), alcalóides e derivados antracênicos não foram detectados nos ensaios realizados.

Foi constatada via teste de afrogenicidade a presença de abundante de espuma, no EBMFG e em F4, que perdurou por mais de 24h, também constatado por Corrêa (2007). Vários autores relatam, na raiz, a presença de diversas saponinas triterpênicas derivados do ácido quinóico (AQUINO *et al.*, 1988a, 1989a; ALMEIDA, 1982; BHATTACHARYYA; ALMEIDA, 1985; FERRARI *et al.*, 1986; MELO *et al.*, 2008). Triterpenos, esteroides, evidenciados nas folhas por Corrêa (2007), também estão presentes nas raízes (PINA, 2011).

Em contrapartida nos nossos testes foi constatada a presença de ácido clorogênico no extrato metanólico das folhas de *Guettarda platypoda*, diferente do evidenciado por Corrêa (2007) (Figura 09).

Assim como nas raízes (PINA, 2011) também foi constatada a presença de açúcares nas folhas de *G. platypoda*, detectando sacarose em grande concentração na fração F4 (Figura 10). Proantocianidinas foram identificados no extrato etanólico das raízes (ALMEIDA, 1982) e metanólico das folhas (CORRÊA, 2007), assim como por nós, Confirmado pela presença da coloração avermelhada e alta polaridade, como observado na Figura 10. Assim como em Corrêa (2007) também não notamos a presença de alcalóides, mas Ferrari *et al.* (1986) localizou no extrato metanólico da raiz a presença do alcalóide 5 α -carboxistrictosidina (precursor dos alcalóides indólicos monoterpenóides), sendo também relatado por Melo *et al.* (2008).

Tabela 03: Avaliação Fitoquímica do EBMFG e de suas frações.

Grupo de Metabólitos Secundários	EBM FG	Fração N- Hexânica (F1)	Fração n- hexano/AcOEt (1:1) (F2)	Fração AcOEt (F3)	Fração Metanólica (F4)
Taninos	+	-	-	-	+
Alcalóides	-	-	-	-	-
Açúcares Redutores	+	-	+	+	+
Derivados	-	-	-	-	-
Antracênicos					
Flavonóides	+	-	-	+	+
Triterpenos	+	+	+	+	+
Saponinas	+	-	-	-	+
Mono/Sesc/Diterpeno	+	+	+	-	-

Legenda: (+) confirmada à presença; (-) confirmada à ausência;



Figura 06: Cromatograma NEU/UV (360nm) EBMFG evidenciando a presença de flavonóides através da coloração alaranjada e amarelada.



Figura 07: Cromatograma vanilina clorídrica/VIS 1- EBMFG (proantocianidinas); 2 – Padrão de Iridóides; 3 – Padrão de Leucoantocianidinas.



Figura 08: Cromatograma - NEU/UV/Eluente n-BuOH-Me₂CO-TPPO₄ (40:50:10) (360nm) 1- EBMFG; 2- Padrão Ácido Clorogênico.

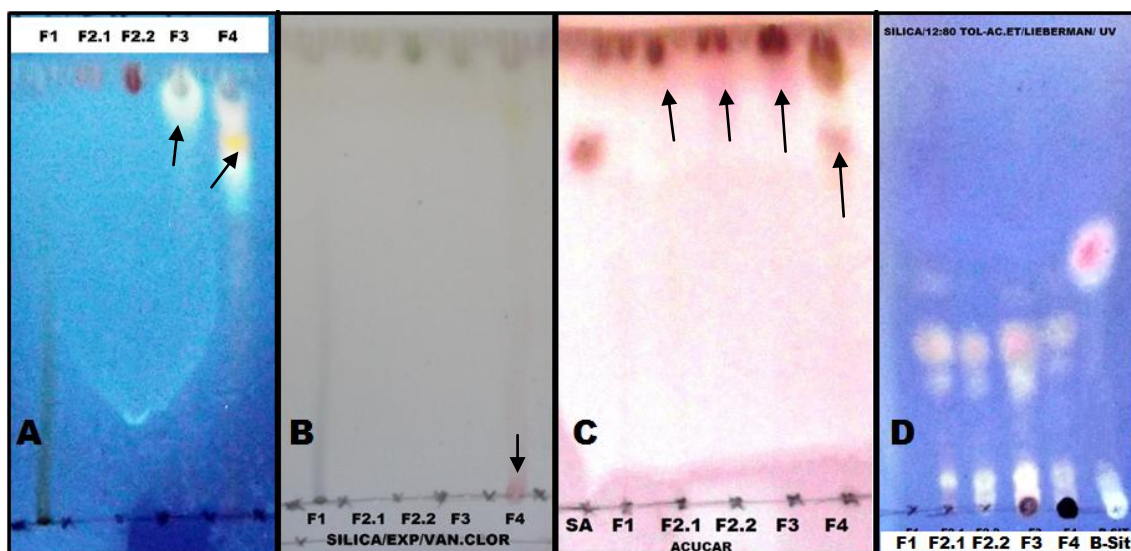


Figura 09: Cromatogramas (A) NEU/UV (360nm) Evidenciada a presença de flavonóides através da coloração alaranjada e amarelada nas frações F3 e F4.; (B) vanilina clorídrica/VIS Evidenciada a presença de taninos condensados pela coloração avermelhada e alta polaridade em F4.; (C) timol/VIS Evidenciada a presença de açúcares pela coloração avermelhada e baixa polaridade em F2, F3 e F4. Além de confirmar a presença de sacarose (SA) em F4; (D) Lieberman/UV (360nm), Evidenciada a presença de terpenos em todas as frações.

5.2.Fracionamento Biomonitorado

A partir do fracionamento cromatográfico do EBMFG foram obtidas quatro frações: n-hexano (F1); n-hexano/AcOEt [1:1] (F2); AcOEt (F3); MeOH (F4).

Após a retirada dos solventes das frações as mesmas se apresentavam como: (F1) coloide amarelo claro; (F2) solido amorfo verde escuro; (F3) solido amorfo verde escuro; (F4) coloide vermelho ferrugem.

As frações supracitadas foram avaliadas quanto a sua atividade biológica e a fração F3, que obteve os melhores resultados, foi novamente submetida a fracionamento, como o disposto na Figura 10.

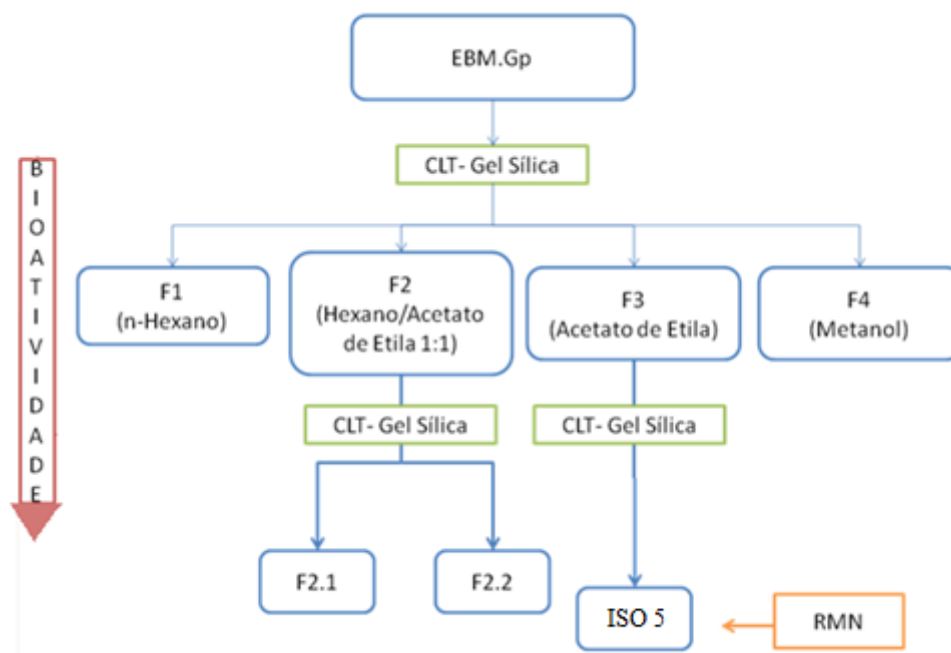


Figura 10: Fluxograma do fracionamento biomonitorado do EBMFG.

Além disso, o primeiro fracionamento demonstrou que o EBMFG é predominantemente polar, pois a massa da fração metanólica (F4) representou 56,3% da massa total do extrato (Tabela 04).

Tabela 04: Rendimento do fracionamento de 8,027 g do EBMFG em gel de sílica a vácuo.

	<i>Peso seco (g)</i>	<i>Rendimento (%)</i>
Fração metanólica (F4)	4,498	56,3
Fração acetato de etila (F3)	0,153	1,9
Fração n-hexano/acetato de etila (1:1) (F2)	0,55	6,8
Fração n-hexano (F1)	0,125	1,5
Total	5,326	66,35

O fracionamento da fração de acetato de etila (F3) levou ao isolamento uma substâncias, ISO-5 (Figura 11), em quantidade e pureza suficiente para análises em C¹³ e H¹ RMN.

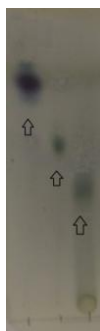


Figura 11: Cromatograma - Vanilina perclórica/VIS, ISO 4, ISO 5 e ISO 6 respectivamente, obtido na fração de acetato de etila.

5.3. Testes de atividade citotóxica

Análise da citotoxicidade pelo método de MTT, que foi descrita pela primeira vez por Mosman (1983), analisa a viabilidade e do estado metabólico da célula. É um ensaio rápido, sensível e de baixo custo e por isso é utilizada no programa de rastreio do National Cancer Institute dos EUA (NCI), que testa mais do que 10.000 amostras por ano (SKEHAN, 1990).

De acordo com Fouche *et al*, (2008) pode-se afirmar que há atividade citotóxica em extratos testados em dose única de no máximo 100 µg/ml que inibem a proliferação de duas ou mais linhagens celulares em pelo menos 75%. A partir desses resultados podemos afirmar que as frações F2.2 e F3 apresentam atividade citotóxica (Tabela 05).

A presença de terpenoides nas duas frações ativas pode ser a provável causa da ação citotóxica. Esses metabólitos são conhecidos por sua atividade antitumoral, tendo como principal representante da categoria o paclitaxel, considerado o antitumoral mais promissor entre 1980 e 2000 (SIMÕES, 1999).

Tabela 05: Atividade citotóxica do EBMFG e suas frações

Amostras	HEP-2		HT29	
	% de inibição	erro	% de inibição	Erro
Fração metanólica (F4)	25,2	1,1	31,3	4,8
Fração acetato de etila (F3)	92,8	0,3	77,8	3,5
F2.1	80,5	1,1	38,4	5,4
F2.2	99,7	0,1	86,7	3,2
Fração n-hexano (F1)	40,3	3,2	35,5	8,1
EBMGP	40,7	3,3	53,8	0,6
Amostra	MCF-7		HL-60	
	% de inibição		% de inibição	
ISO – 5	25,49		26,79	

Legenda: F2.1 e F2.2 subfrações da Fração n-hexano/acetato de etila (1:1) (F2)

5.4. Atividade antioxidante

Nesse teste foram analisados o Extrato bruto metanólico das folhas de *Guettarda platypoda*, suas frações primárias e as substâncias isoladas da fração mais ativa (F3). Os resultados demonstraram que tanto o EBMFG quanto F3 e F4 possuem alta atividade antioxidante, possuindo mais de 99% de inibição dos radicais livres na concentração de 0,1 mg/ mL, com IC₅₀ (Concentração que inibe 50% dos radicais livres) inferiores ao padrão Vitamina C que possui alta atividade antioxidante (MENSOR *et al.*, 2001). Esse fato se deve provavelmente pela presença de flavonoides (ALMEIDA, 2011) em F3 e flavonoides, taninos e açúcares redutores em F4 e no EBMFG, compostos já conhecidos por terem atividade antioxidante (SIMÕES, 1999).

Em seus estudos Endo (1984, 1985) relatou que as clorofilas e as feofitinas possuem atividade pro-oxidantes, quando expostas à luz, entretanto quando estão sob o abrigo da luz tornam-se antioxidante. Sendo nosso experimente realizado sob o abrigo da luz, como esperado, ISO- 5 (Feofitina a) apresentou atividade antioxidante.

Tabela 06: Atividade antioxidante do EBMFG e suas frações.

Amostra/conc.	0,001mg/mL	0,005mg/mL	0,01mg/mL	0,05mg/mL	0,1mg/mL	1mg/mL	IC ₅₀ (mg/mL)
EBMFG	9,2%	36,5%	70,1%	89,9%	99,3%	99,4%	$7,02.10^{-3} \pm 2,8.10^{-5}$
F1	-	-	-	-	-	-	-
F2	-	-	-	-	-	-	-
F3	7,5%	50%	86,2%	93,3%	99,5%	99,6%	$5,58.10^{-3} \pm 7,0.10^{-4}$
F4	1,2%	29%	64%	82,5%	99,0%	99,1%	$8.10^{-3} \pm 1,1.10^{-5}$
ISO - 5	0%	5,48%	8,86%	37,4%	44,8%	48,2%	$77,9.10^{-3} \pm 2,2.10^{-3}$

Padrão/Conc.	0,001mg/mL	0,002mg/mL	0,004mg/mL	0,005mg/mL	0,1mg/mL	1mg/mL	IC ₅₀ (mg/mL)
Trolox	24,5%	41%	51,8%	86,5%	99,8%	99,9%	$2,6.10^{-3} \pm 2,3.10^{-4}$

Padrão/Conc.	0,0025mg/mL	0,005mg/mL	0,0125mg/mL	0,025mg/mL	0,0375mg/mL	0,050mg/mL	IC ₅₀ (mg/mL)
Vitamina C	36%	42,6%	53,9%	91,2%	95,9%	97%	$8,14.10^{-3} \pm 5,9.10^{-4}$

Legenda: (EBMFG) Extrato bruto metanólico das folhas de *G. platypoda*; (F4) Fração metanólica; (F3) Fração acetato de etila; (F2) N-hexano/AcOEt (1:1); (F1) Fração n-hexano; (ISO-4) composto isolado de F3.

5.5. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

5.5.1. Determinação do halo de inibição por técnica de poços

Como anteriormente citado, o ensaio por técnica de poços foi feito como seleção de cepas para posterior análise via CMI tanto do EBMFG quanto de suas frações. Os resultados foram avaliados conforme os parâmetros de Alves (2000) que classifica o potencial antimicrobiano, sendo halos de inibição: < 9 mm, inativo; 9 a 12 mm, parcialmente ativo; de 13 a 18 mm, ativo; > 18 mm, muito ativo).

Como é possível verificar no gráfico da Figura 12, o extrato bruto metanólico de *G. platypoda* foi ativo para três cepas: *Staphylococcus aureus* AM 103, *Staphylococcus aureus* AM 1210 e *Staphylococcus epidermidis* AM 235, todos com halos de inibição igual ou superior a 13 mm em pelo menos uma das doses. (Figuras 13, 14 e 15)

Em relação a essa metodologia o EBMFG demonstrou-se superior ao extrato bruto metanólico das raízes de *G. platypoda* (PINA, 2011), o qual não demonstrou-se ativo frente a nenhuma das cepas.

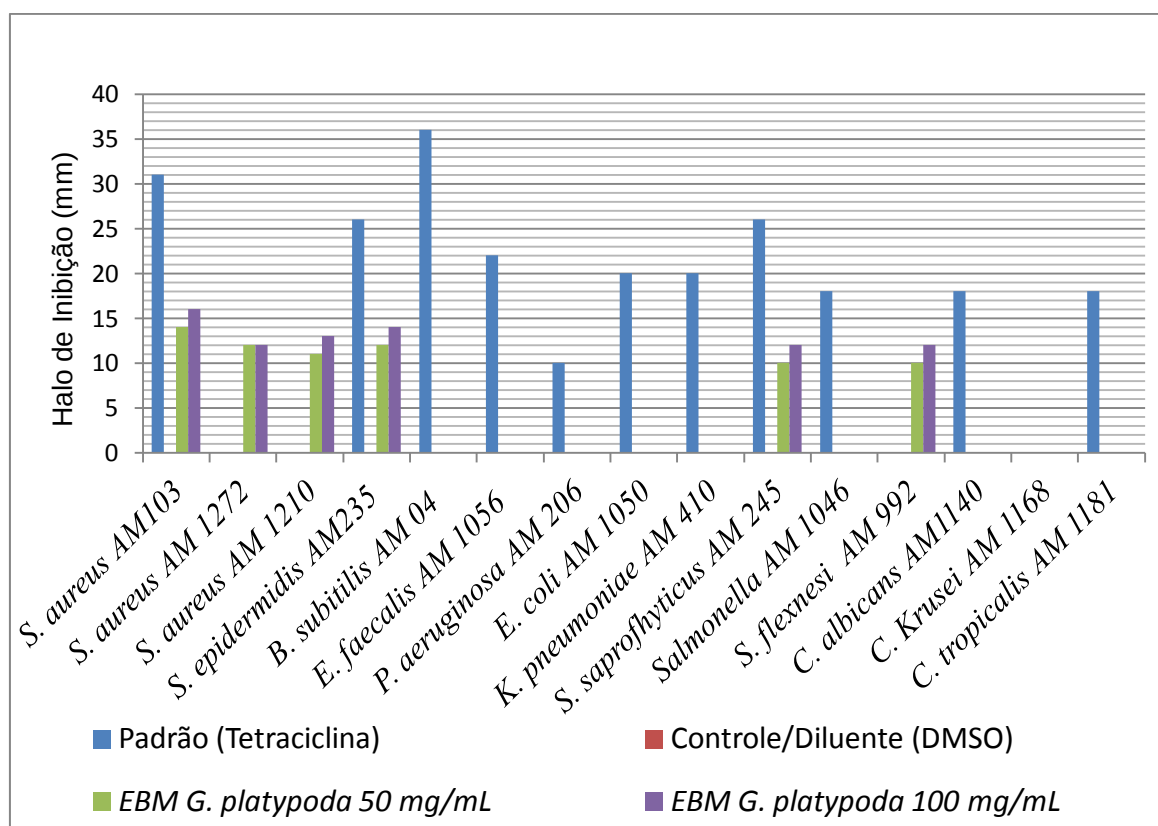


Figura 12: Halos de inibição do ensaio antimicrobiano por técnica de poços em milímetros.

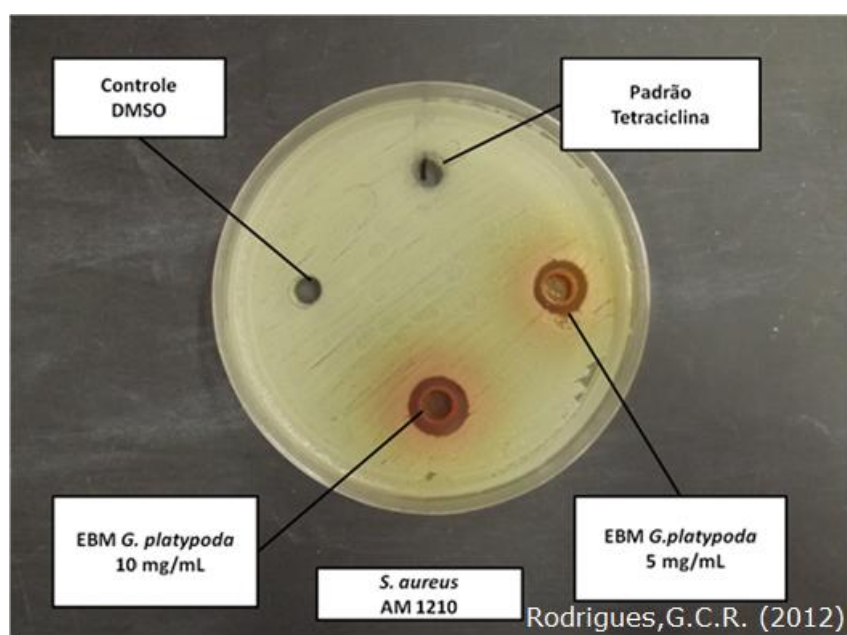


Figura 13: Ensaio antimicrobiano por técnica de poços frente a *S. aureus* AM 1210.

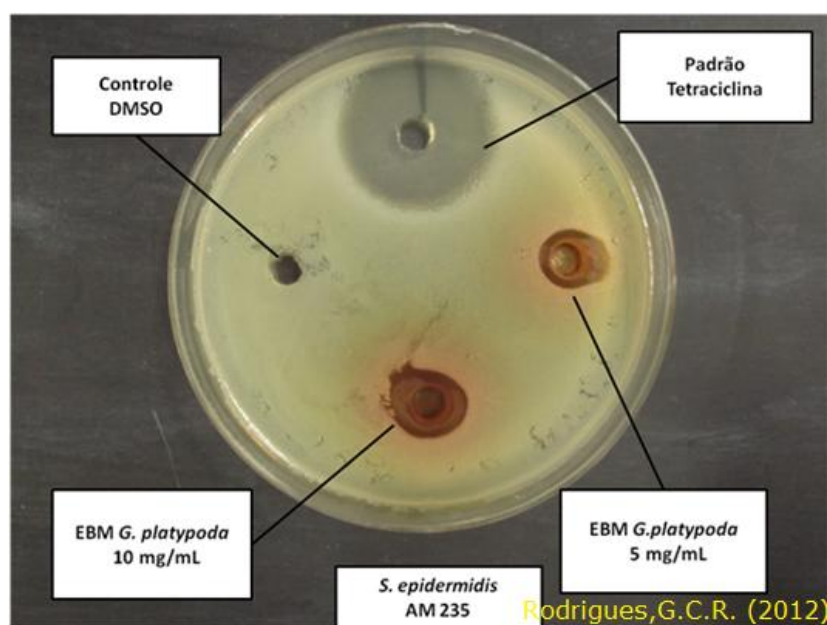


Figura 14: Ensaio antimicrobiano por técnica de poços frente a *S. epidermidis* AM 235.

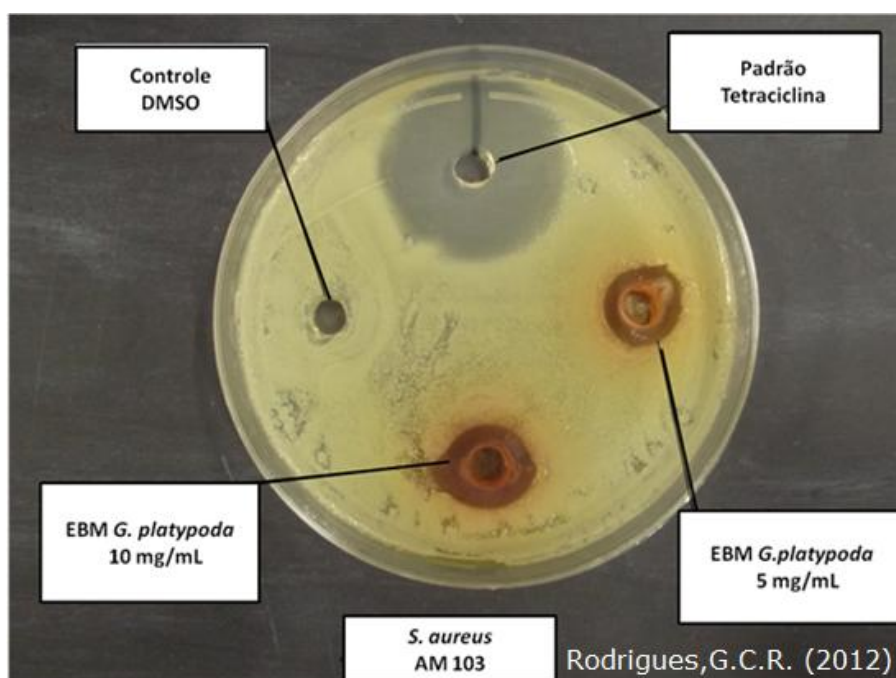


Figura 15: Ensaio antimicrobiano por técnica de poços frente a *S. aureus* AM 103.

5.5.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Como referido nas metodologias os microorganismos utilizados foram aqueles no qual o EBM de *Guettarda platypoda* gerou halos de inibição igual ou maior a 13 mm, excetuando-se o *Bacillus subtilis*.

Como disposto na Tabela 07, nenhuma das amostras utilizadas apresentou CMI menor que 1000 µg/mL, sendo então consideradas pouco, ou não, ativas.

Tabela 07: Resultado do Ensaio de Concentração mínima Inibitória (CMI) em µg/mL

Amostras	AM-103 <i>S.aureus</i>	AM-1210 <i>S.aureus</i>	AM-04 B. <i>subtilis</i>	AM-235 S. <i>epidermides</i>
Fração metanólica (F4)	>1000	>1000	>1000	>1000
Fração acetato de etila (F3)	>1000	>1000	>1000	>1000
Subfração F2.1	>1000	>1000	>1000	>1000
Subfração F2.2	>1000	>1000	>1000	>1000
Fração n-hexano (F1)	>1000	>1000	>1000	>1000
Extrato bruto metanólico	>1000	>1000	>1000	>1000
Padrão (tetraciclina)	0,5	>64	0,25	0,5

5.6.Determinação da estrutura molecular de ISO 5.

Com o objetivo de deduzir a estrutura químicas da substância isoladas ISO 5, realizamos estudos de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C) e de infravermelho.

ISO 5 apresentou-se como um sólido amorfo verde escuro. O espectro de IV (Figura 18) da substância mostrou uma banda característica de estiramento de C-H alifático em 2926 cm^{-1} e uma banda sugestiva de estiramento C-H de grupo metoxílico em 2847 cm^{-1} . Em 3434 cm^{-1} observou-se a presença de uma banda, a qual propôs se tratar de deformação axial de N-H de aminas ou de O-H. Em 1613 cm^{-1} uma banda condizente com a absorção de ligação dupla em sistemas conjugados, levaram a sugerir que a molécula em análise pode conter um núcleo porfirínico. Absorções em 1738 e 1698 cm^{-1} condizentes com a deformação axial de grupo carbonílico não conjugado e conjugado, respectivamente sugerem a presença desses grupos em ISO 5 (SILVERSTEIN *et al.*, 2005; FILHO, 2011).

Relativo à RMN ^1H e ^{13}C , além dos métodos unidimensionais, utilizou-se também experiências 2D: homonuclear ^1H - ^1H -COSY e heteronucleares ^1H - ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ [$n= 1$, HSQC; $n= 2$ e 3 , HMBC).

O espectro de RMN ^1H (Figura 19) de ISO 5 e suas expansões (Figuras 20 e 21.) exibiram absorções que corroboram para que ISO 5 seja uma substância com núcleo porfirínico.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz) (Figura 19) apresentou sinais, singletos, característicos para prótons de carbonos metínicos que unem anéis pirrólicos de um derivado porfirínico (δ 9,56; δ 9,35 e δ 8,56), correspondendo aos prótons H-10; H-5 e H-20, respectivamente. Observam-se também quatro metilas que aparecem como substituintes nos anéis pirrólicos da porfirina com $\delta = 3,69$ (Me-12¹); $\delta = 3,40$ (Me-2¹); $\delta = 3,21$ (Me-7¹) e $\delta = 1,82$ (Me-18¹) referentes às metilas dos anéis do núcleo porfirínico (Tabela 08) (MATSUO *et al.*, 1996).

De acordo com Schwikkard *et al.*, (1998) a feofitina b possui em C-7¹ um grupo aldeído (Figura 17), diferindo do nosso composto por conta do sinal em δ 3,21, fortalecendo a proposta de que ISO 5 se trata da Feofitina a.

Outros dados que corroboram para existência do núcleo porfirínico são: Um tripleto em δ 1,69 com $J=7,5\text{ Hz}$ supostos hidrogênios do grupo CH₃, da posição C- 8²; Um singlete largo em δ 3,90 (H-13⁴) com integração para três hidrogênios, característico de grupo metoxila, fortalecendo a sugestão dada pelo IV; E outro singlete

em $\delta = 6,27$ (H- ^{13}C) condizente com hidrogênio ligado a anel porfirínico. (Figura 19-21) (MATSUO *et al.*, 1996)

Os sinais para hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos entre 0,8 e 1,9 δH (Figura 19) sugerem que a substância em análise possui em sua estrutura o grupo fitil éster (MATSUO *et al.*, 1996).

A análise comparativa de espectros de RMN ^{13}C (Figura 24 - 26) totalmente desacoplado de interação com átomos de hidrogênio (RMN ^{13}C – $[\text{}^1\text{H}]$) e os obtidos utilizando experiência DEPT – 135 (Figura 22 e 23) (CH e CH_3 em fase oposta de CH_2 , carbonos não hidrogenados não são modelados e, por isto, não aparecem) permitiu identificar 19 sinais correspondentes aos carbonos não hidrogenados (C), 22 ligados carbonos metínicos (CH) e ou carbonos metílicos (CH_3 ,) e 14 ligados a carbonos metilênicos (CH_2).

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) de ISO-5 (Figura 24), obtido em CDCl_3 apresentou 55 linhas espectrais conforme deslocamentos químicos mostrados nas Figuras 24, 25 e 26 que correspondem aos carbonos sinalizados na Figura 16 e nas Tabelas 8 e 9 demonstram similaridade com o espectro da **Feofitina a** em Matsuo, 1996. Assim entre δ 130 e 173, como destacado na Tabela 8, podem ser atribuídos a carbonos quaternários, destacando-se que aqueles que apresentam sinais em campo mais baixo, como por exemplo os C-16, C-19, C-13¹, C-13³ e C-17³, são ligados ao heteroátomo N ou são carbonos da carbonila.

Observaram-se igualmente os sinais em δ 97,15, 104,63, 51,83, 50,33, 93,33, 129,28 e 64,91 que correspondem, de acordo com a literatura (MATSUO, 1996; SILVERTEIN, 2005), à carbonos metínicos próximos a sistemas pirrólicos, retiradores de elétrons, e os sinais em δ 32,96, 32,81 e 28,11 que são igualmente carbonos metínicos, porém no radical fitil, afastados do anel porfirínico. Em adição, verificaram-se também os sinais na região de δ 39,95 a 19, 07, que correspondem aos carbonos metilênicos sp^3 , e afastados de grupos retiradores de elétrons, enquanto que os carbonos metilênicos sp^2 e sp^3 próximo ao oxigênio, retirador de elétrons, apresentaram sinais a 122,96 e 61,67, respectivamente. Observaram-se ainda os sinais δ na região de δ 23,29 – 12,28 que correspondem aos carbonos sp^3 , com exceção do carbono em δ 53,04 (C13⁴), ligado a metoxila.

Alguns dos sinais de RMN ^{13}C (125 MHz) apresentados nas Tabelas 8 e 9 e na Figura 24 diferiram ligeiramente de Matsuo, 1996, entretanto as análises das interações

apresentadas nos espectros $^1\text{H} - ^1\text{H-COSY}$, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HSQC e $^2\text{J}_{\text{CH}} / ^3\text{J}_{\text{CH}}$, HMBC (Figuras 27 a 37 e nas Tabelas 8 e 9) confirmam nossa tese acerca da estrutura sugerida.

Além disso, experimento bidimensional, HSQC, (Figuras 27 a 30), de ISO-05 permitiu correlacionar os sinais em δ 104,63, 97,75 e 93,33 dos carbonos metínicos que unem os anéis pirrólicos com os seus hidrogênios em δ 9,56; δ 9,35 e δ 8,56, respectivamente. Enquanto que, ainda neste experimento, foi possível correlacionar o sinal do carbono metínico C-13² em δ 64,91 ao seu átomo de hidrogênio em δ 6,28 (s), confirmando se tratar da feofitina a. Este experimento ainda permitiu correlacionar os demais carbonos metínicos, e os carbonos metilênicos e metílicos com os seus átomos de hidrogênio, conforme se podem observar na Tabela 8.

O experimento bidimensional de correlação heteronuclear HMBC (Figuras 31 a 34) possibilitou identificar correlações a longa distância (^2J e ^3J) dos hidrogênios da **feofitina a** com os correspondentes átomos de carbonos. Assim, podem-se destacar as correlações dos hidrogênios dos grupos metilas substituintes dos anéis pirrólicos, 3H-2¹, 3H-7¹ 3H-18¹ a duas ligações com os carbonos em δ 132,06, 136,38 e 50, 33, respectivamente. Enquanto que o grupo metila 3H-8² do grupo etila substituinte em C-8 de um dos anéis pirrólicos, apresentou correlação a duas ligações com o carbono em δ 19,07(C-8). Os grupos metilas da unidade fitil 3H-20', 3H-19', 3H-18', 3H-16'/3H-17' mostraram correlações a duas ligações com carbonos em δ 143,02 (C-3'), 32,96 (C-7'), 32,81(C-11'), 28,11 (C-15'), respectivamente.

Dentre as principais correlações a três ligações ($^3\text{J-HMBC}$) que complementam as informações obtidas com as correlações a duas ligações ($^2\text{J-HMBC}$) e as informações obtidas com HSQC, podem-se citar: 3H-2¹, H-3¹, 3H-7¹, 2H-8¹, H-10, H-13²/3H-12¹, H-13², 2H-1'/ 2H-17' com os carbonos em δ 142,27 (C-1), 136,74(C-4) 155,85 (C-6), 151,19(C-9), 129,30 (C-12), 149,85 (C-14) e 173,17 (C- 17³), respectivamente.

As atribuições relatadas somando-se as comparações com os dados da literatura (MATSUO, 1996; SCHWIKKARD *et al.*, 1998; FILHO, 2011), nos permitiu identificar a substância ISO 5 como sendo a **Feofitina a** (Figura 16) descrita pela primeira vez na gênero *Guetarda*.

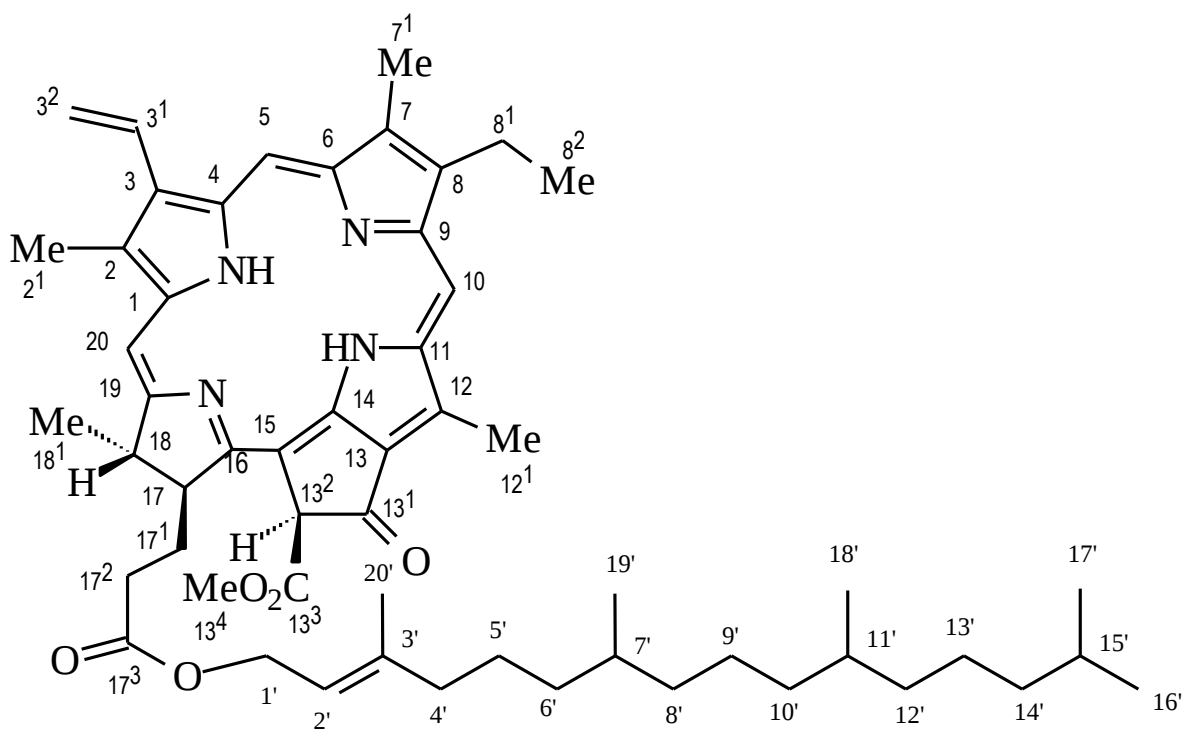
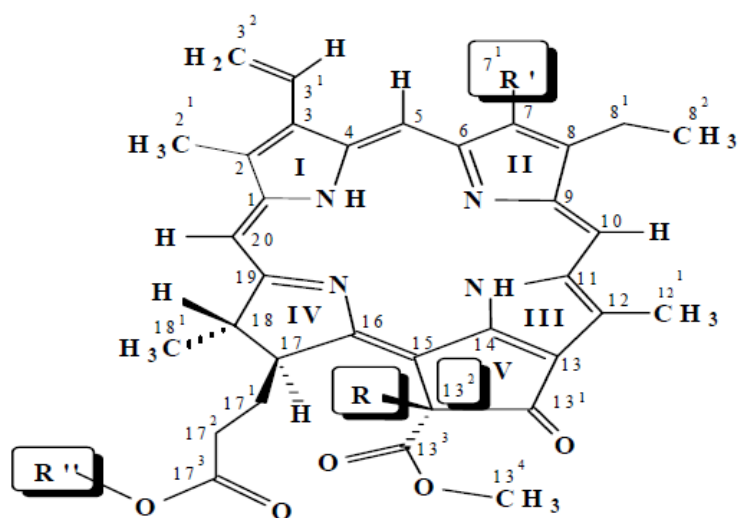


Figura 16: Estrutura Molecular da Feofitina a (ISO 5)



R=H	R'=CH ₃	R''=C ₂₀ H ₃₉	Feofitina a
R=OH	R'=CH ₃	R''=C ₂₀ H ₃₉	13²-hidroxifeofitina a
R=H	R'=CH ₃	R''=CH ₃	Feoforbídeo a
R=H	R'=CHO	R''=C ₂₀ H ₃₉	Feofitina b

Figura 17: Diferença estrutural entre as feofitinas (FILHO, 2011).

Tabela 08: Deslocamento Químico dos Carbonos do núcleo porfirínico, e suas interações.

	HSQC		HMBC		MATSUO, 1996	
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
C						
1	142.27	-		3H-2 ¹	142.9	-
2	132.-06	-	3H-2 ¹	H-2; H-3 ¹	131.8	-
3	136.45	-	H-3 ¹	2H-3 ²	136.5	-
4	136.74	-		H-3 ¹	136.7	-
6	155.85	-		3H-7 ¹	155.5	-
7	136.38	-	3H-7 ¹	H-5; 2H-8 ¹	136.1	-
8	145.49	-	2H-8 ¹	H-10; 3H-7 ¹ ; 3H-8 ²	145.2	-
9	151.19	-		2H-8 ¹	151.0	-
11	138.14	-	H-10	3H-12 ¹	137.9	-
12	129.30	-		H-10	129.1	-
13	129.19	-		H-13 ² ; 3H-12 ¹	129.3	-
14	149.85	-		H-13 ²	150.0	-
15	105.46	-	H-13 ²		105.2	-
16	161.48	-			161.3	-
19	172.45	-	H-18	3H-18 ¹	172.2	-
13 ¹	189.87	-	H-13 ²		189.6	-
13 ³	169.83	-	H-13 ²	MeO-13 ⁴	173.0	-
17 ³	173.17		2H - 17 ²	2H-1 ³ ; 2H-17 ¹	173.0	
CH						
5	97.75	9.35 (s)			97.5	9.36 (s)
10	104.63	9.56 (s)			104.4	9.50 (s)
17	51.83	4.25 (m)		3H-18 ¹	51.7	4.21 (ddd)
18	50.33	4.45	3H-18 ¹		50.1	4.46 (dq)
20	93.33	8.56 (s)			93.1	8.55 (s)
3 ¹	129.28	7.97 (dd, 17.8, 11.5)			129.0	6.28 (dd)
13 ²	64.91	6.28 (s)			64.7	6.26 (s)
CH₂						
3 ²	122.96	6.29 (d, J = 17.8 Hz) 6.14 (d, J = 11.5 Hz)			122.8	6.17
8 ¹	19.63	3.66 (q)	3H-8 ²		19.7	3.66 (q)

17 ¹	30.03	2.64 (m), 2.37 (m)			29.8	4.21 (ddd)
17 ²	31.45	2.50 (m), 2.23 (m)			31.2	
CH₃						
2 ¹	12.28	3.40 (s)			12.1	3.39 (s)
7 ¹	11.40	3.21 (s)			11.2	3.21 (s)
8 ²	17.59	1.69 (t, J = 7.5 Hz)	2H-8 ¹		19.7	1.68 (t)
12 ¹	12.28	3.69 (s)			12.2	3.88 (s)
13 ⁴	53.04	3.90 (s)			53.0	3.68 (s)
18 ¹	23.29	1.82 (d, J = 7.3 Hz)	H-18		22.7	1.80 (d)

Legenda: (s) singlete; (d) duplete; (t) tripleto; (q) quarteto; (dd) duploduplete; (m) multiplete.

Tabela 09: Deslocamento Químico dos Carbonos do radical Fitol, e suas interações.

	HSQC		HMBC		MATSUO, 1996	
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
C						
3'	143.02	-	3H-20'/ 2H-4'	2H-1'/ 2H-5'	139.9	-
CH						
2'	117.94	5.15 (t, J = 6.9 Hz)	2H-1'	3H-20'	123.4	
7'	32.96	1.31 (m)	3H-19'		32.8	
11'	32.81	1.31 (m)	3H-18'		32.8	
15'	28.11	1.51 (h, J = 6.6 Hz)	3H- 16'/3H- 17'		28.0	
CH₂						
1'	61.67	4.52 (m), 4.44 (m)			59.4	
4'	39.99	1.89 (t, J = 7.7 Hz)		3H-20'	39.9	
5'	25.19	1.61 (m)			25.3	
6'	36.83	1.02 (m)		3H-19'	36.8	
8'	37.59	1.21 (m)		3H-19'	37.5	
9'	24.61	1.12 (m)			24.5	
10'	37.53	1.23 (m)		3H-18'	37.5	
12'	37.46	1.23 (m)		3H-18'	37.4	
13'	24.98	1.27 (m)			24.8	
14'	39.55	1.12 (m)			39.5	
CH₃						
16'	22.91	0.86 (d, J = 6.5 Hz)	H-15'		22.6	

17'	22.81	0.86 (d, J = 6.5 Hz)	H-15'		22.7	
18'	19.91	0.81 (d, J = 6.6 Hz)			19.6	
19'	19.63	0.80 (d, J = 6.6 Hz)			19.8	
20'	17.59	1.59 (s)		H-2'	16.2	

Legenda: (s) singlete; (d) duplete; (t) triplete; (q) quarteto; (h) hepteto; (m) multiplete.

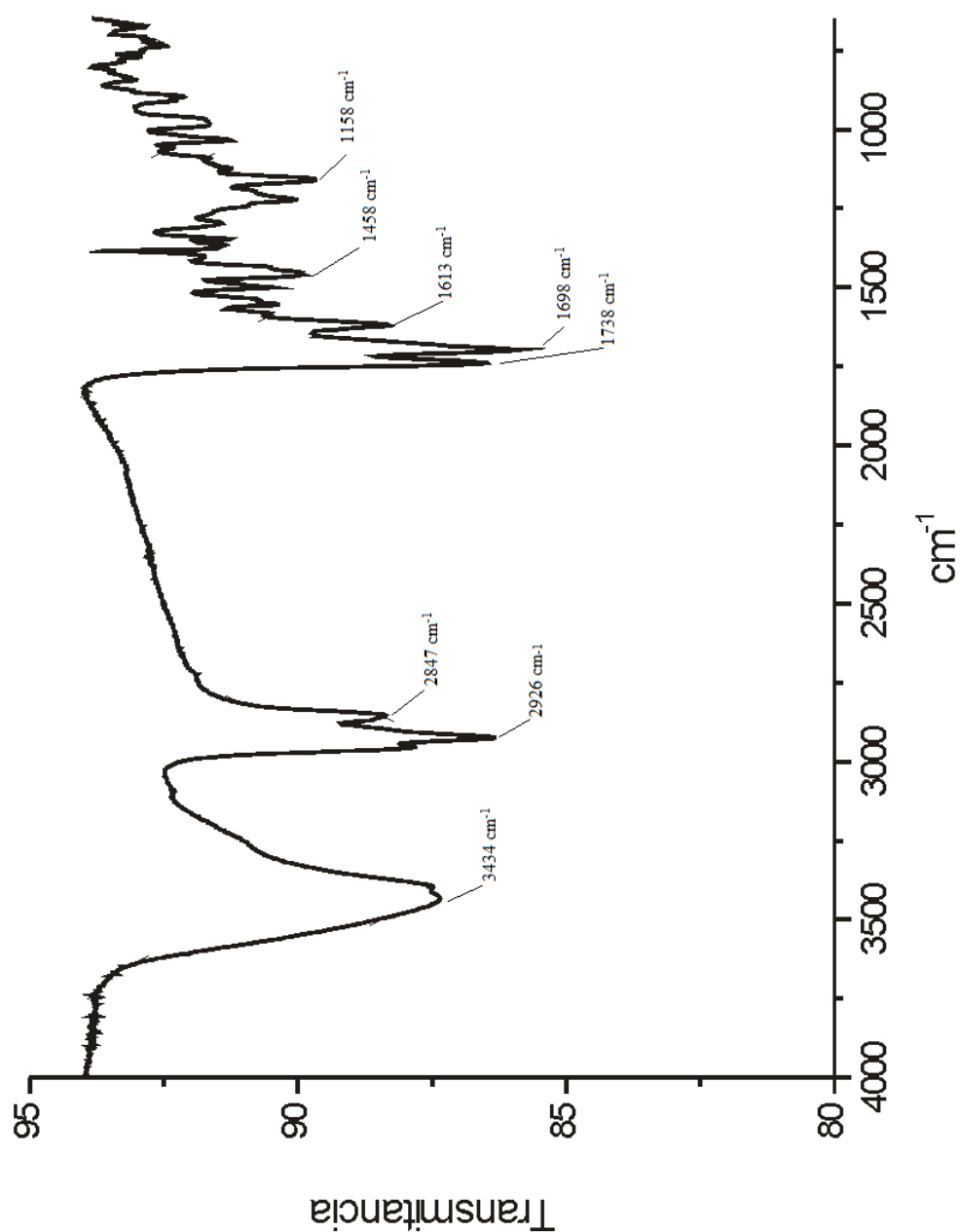


Figura 18: Espectro de Infravermelho de ISO 5.

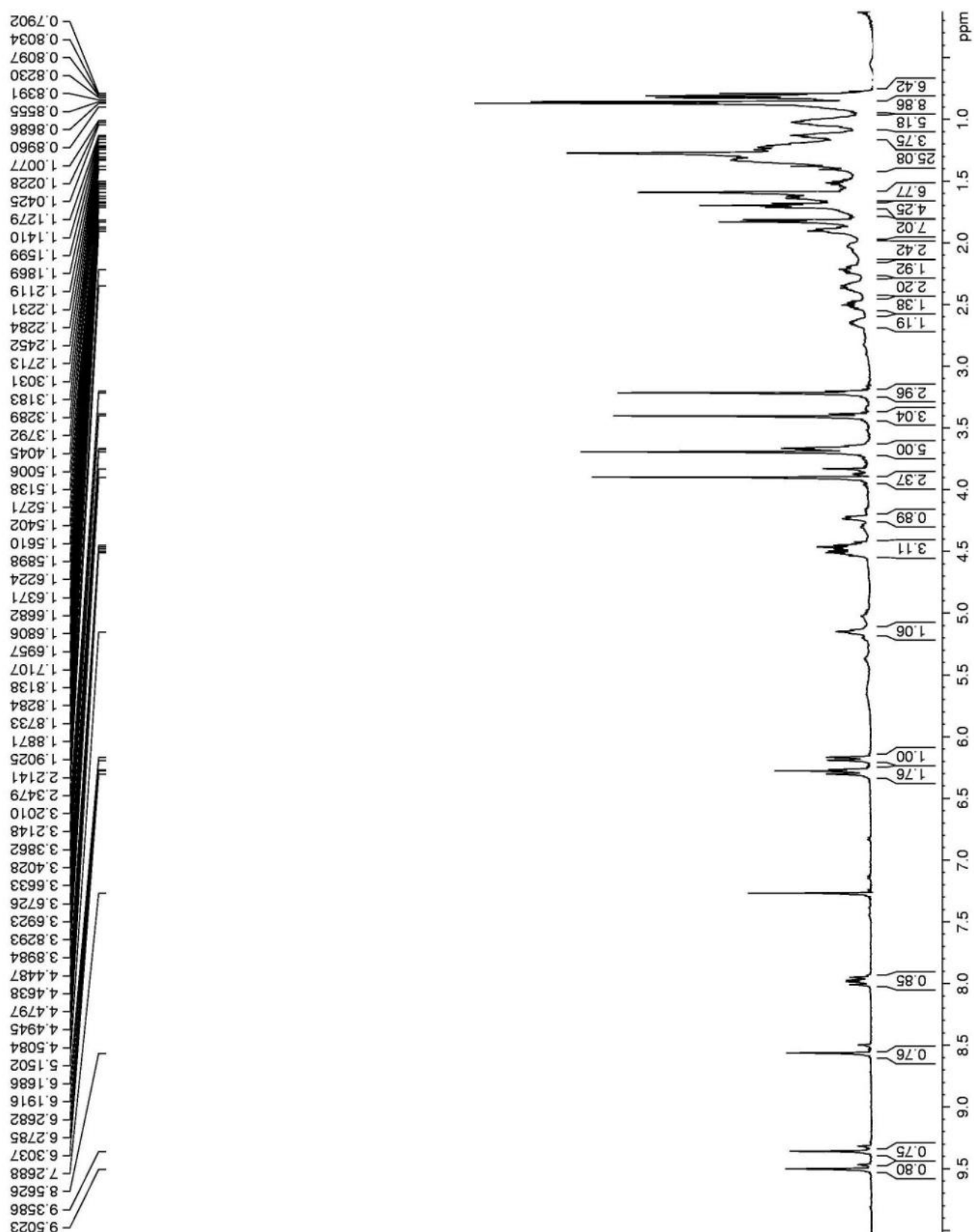


Figura 19: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

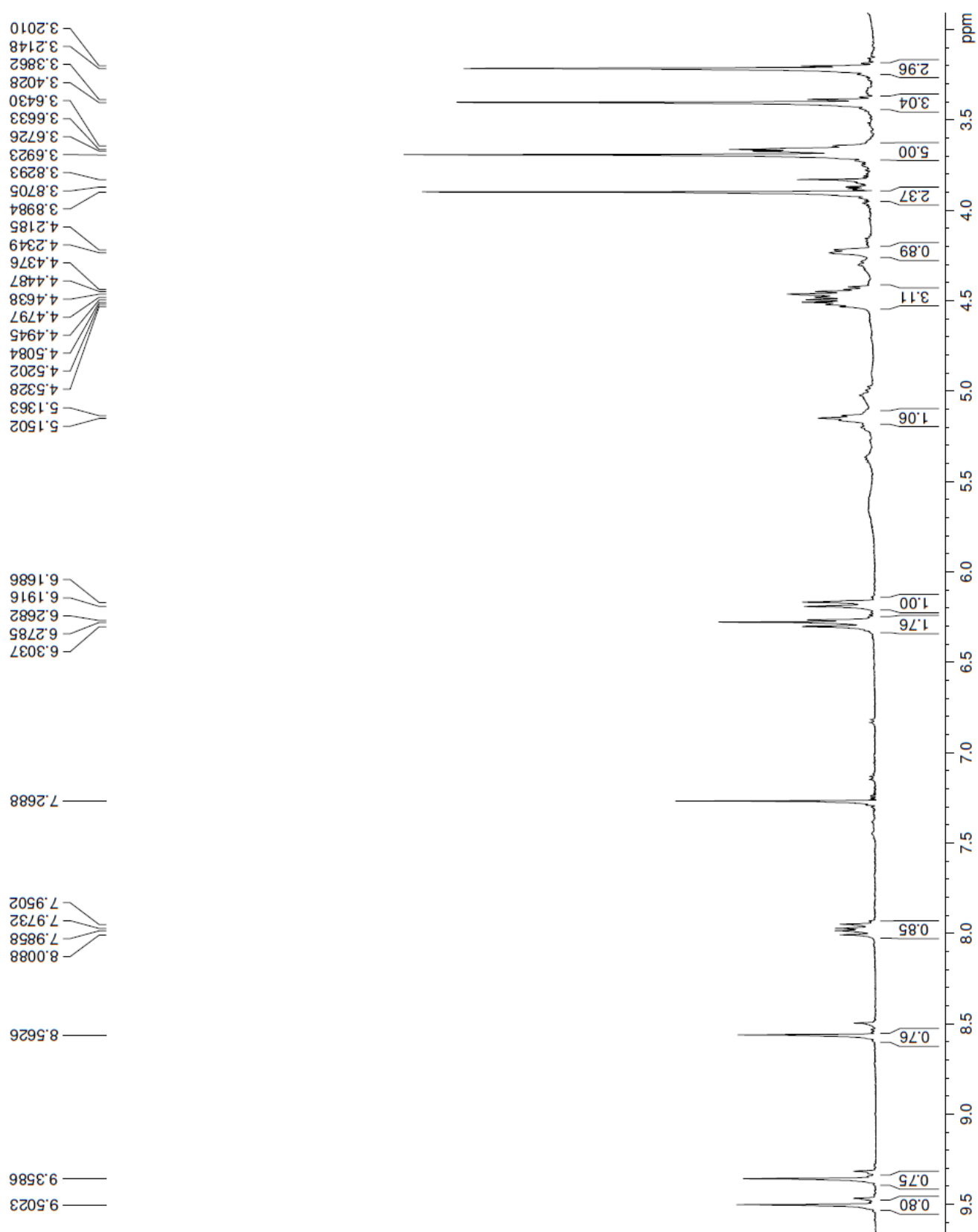


Figura 20: Expansão 1 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

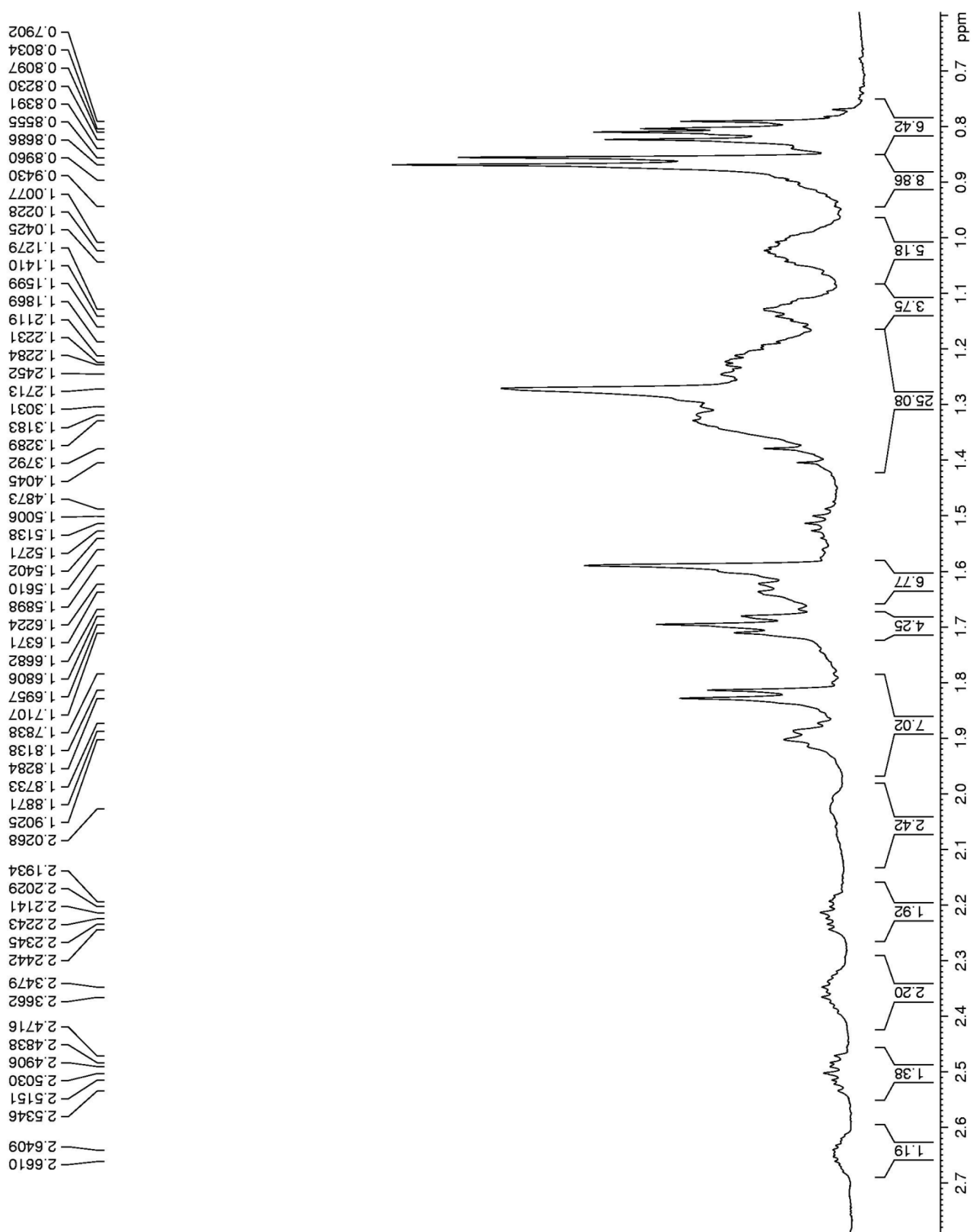


Figura 21: Expansão 2 do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

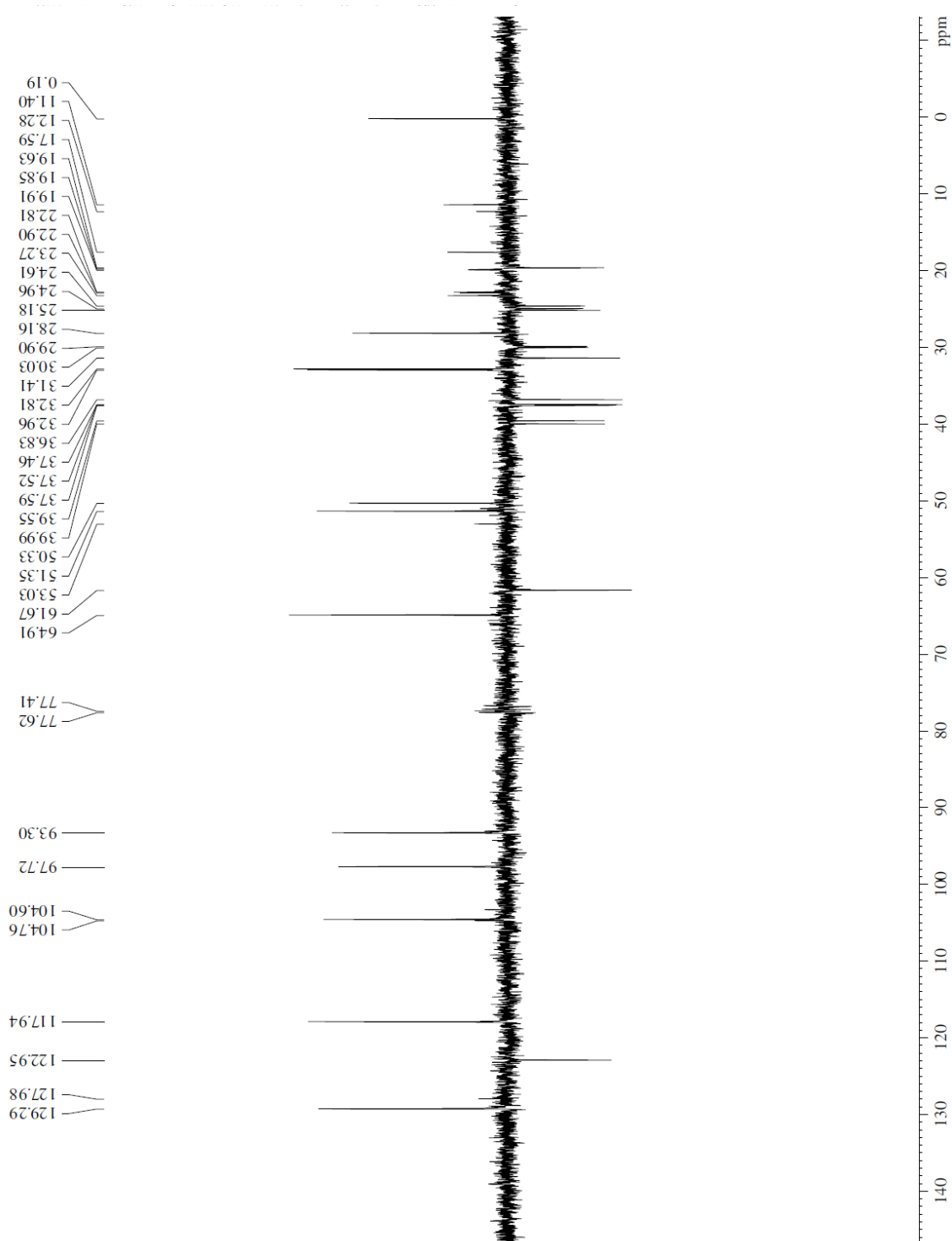


Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C DEPT135 (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de ISO 5.

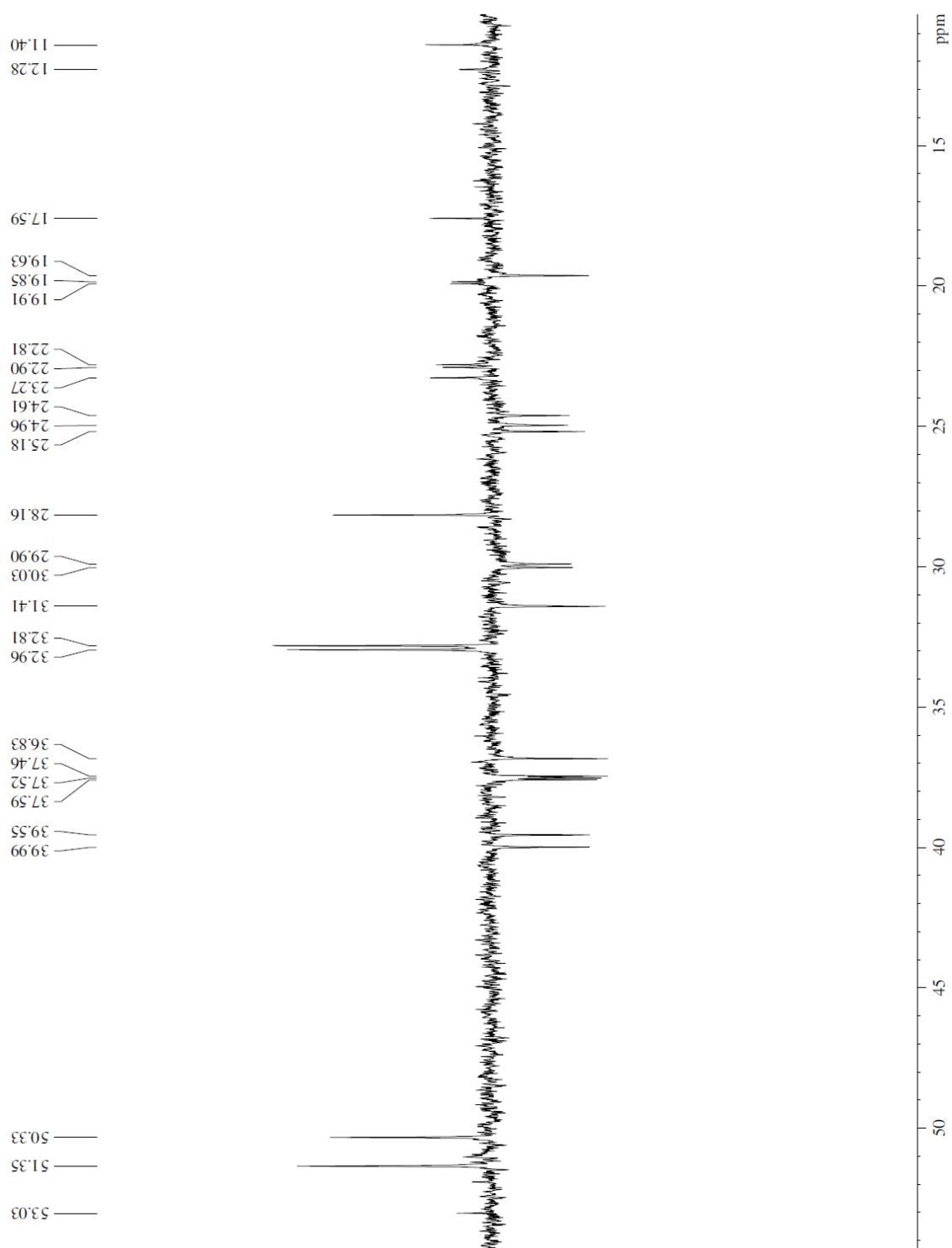


Figura 23: Expansão 1 do espectro de RMN ^{13}C DEPT135 (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de ISO 5.

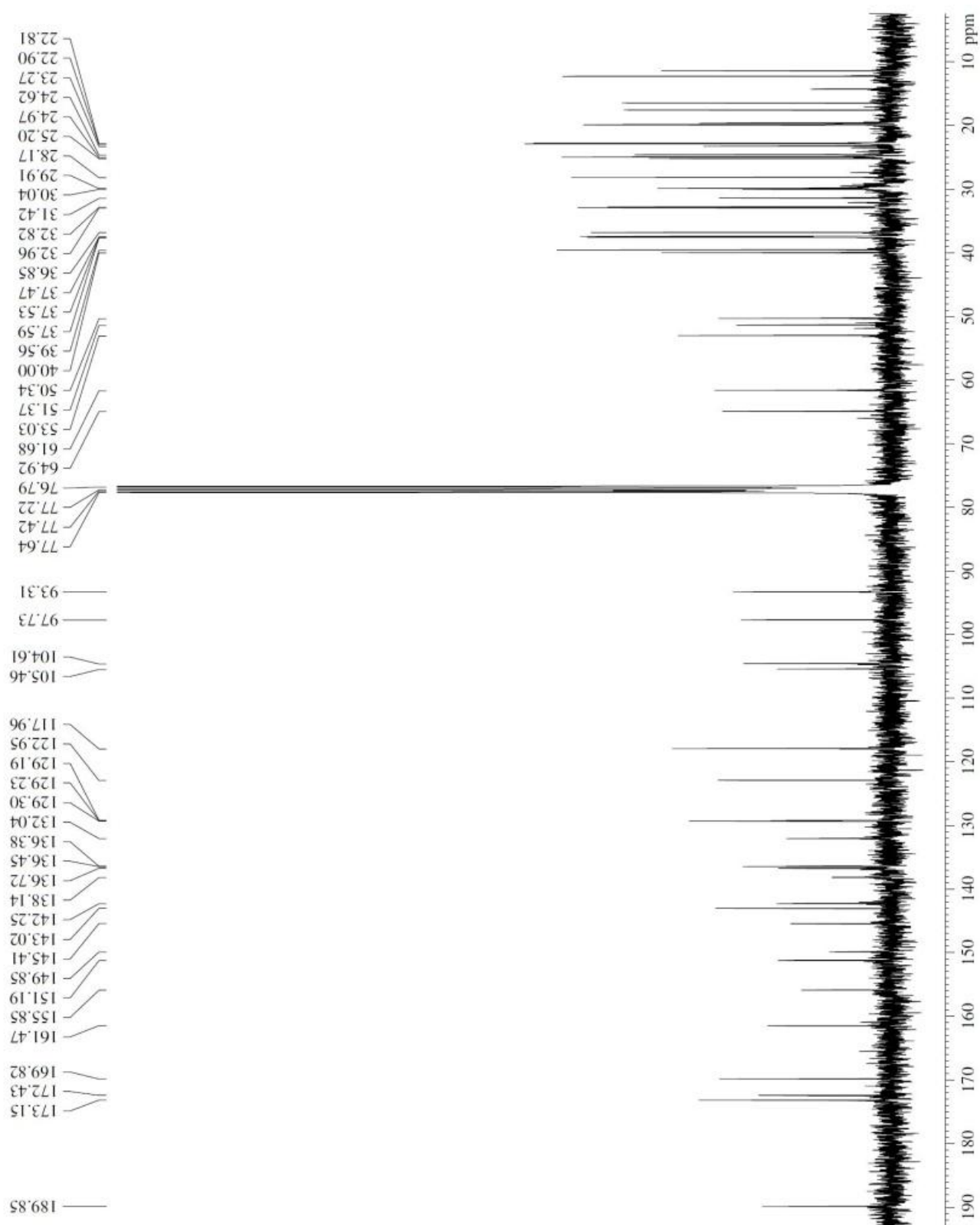


Figura 24: Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de ISO 5.

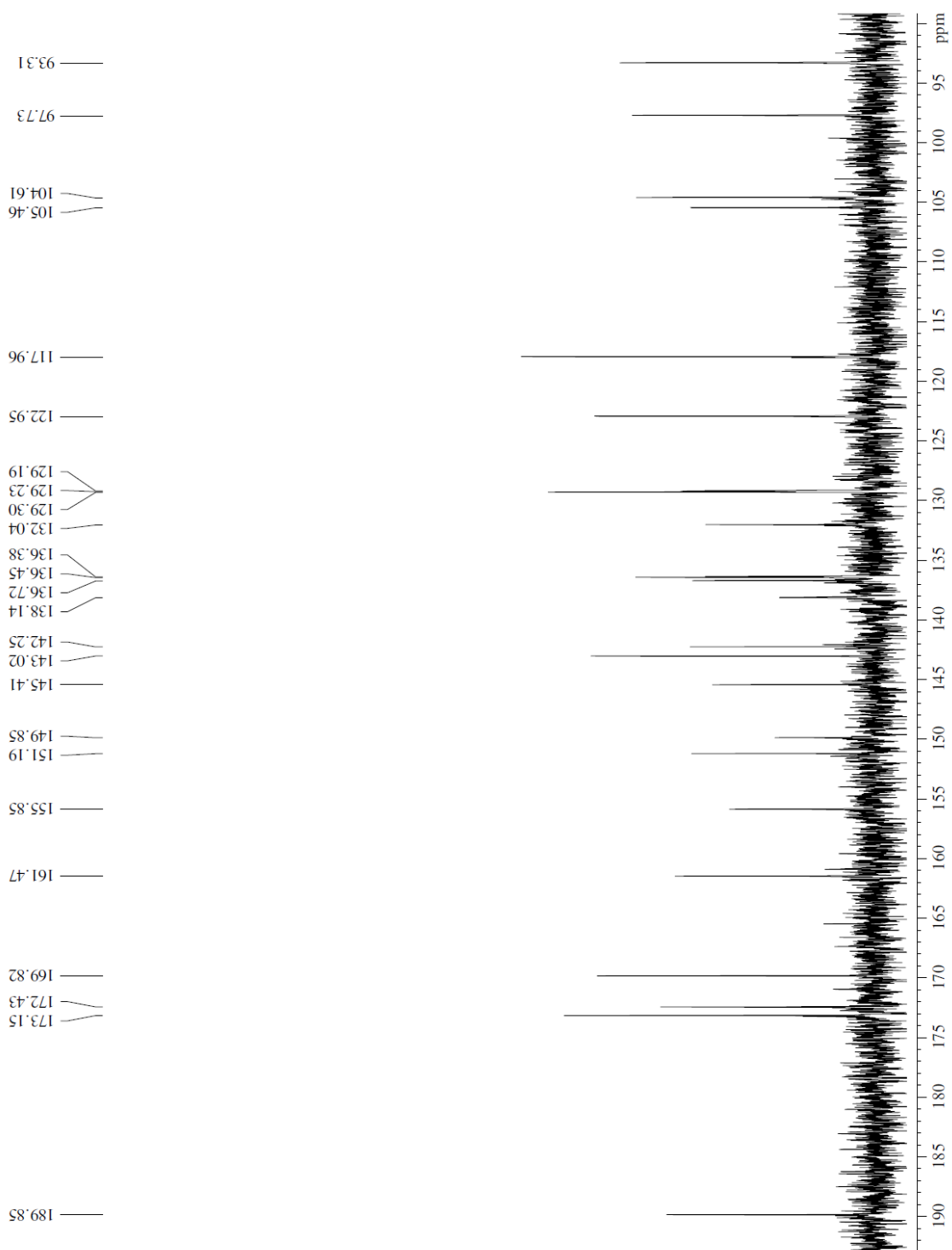


Figura 25: Expansão 1 do espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de ISO 5.

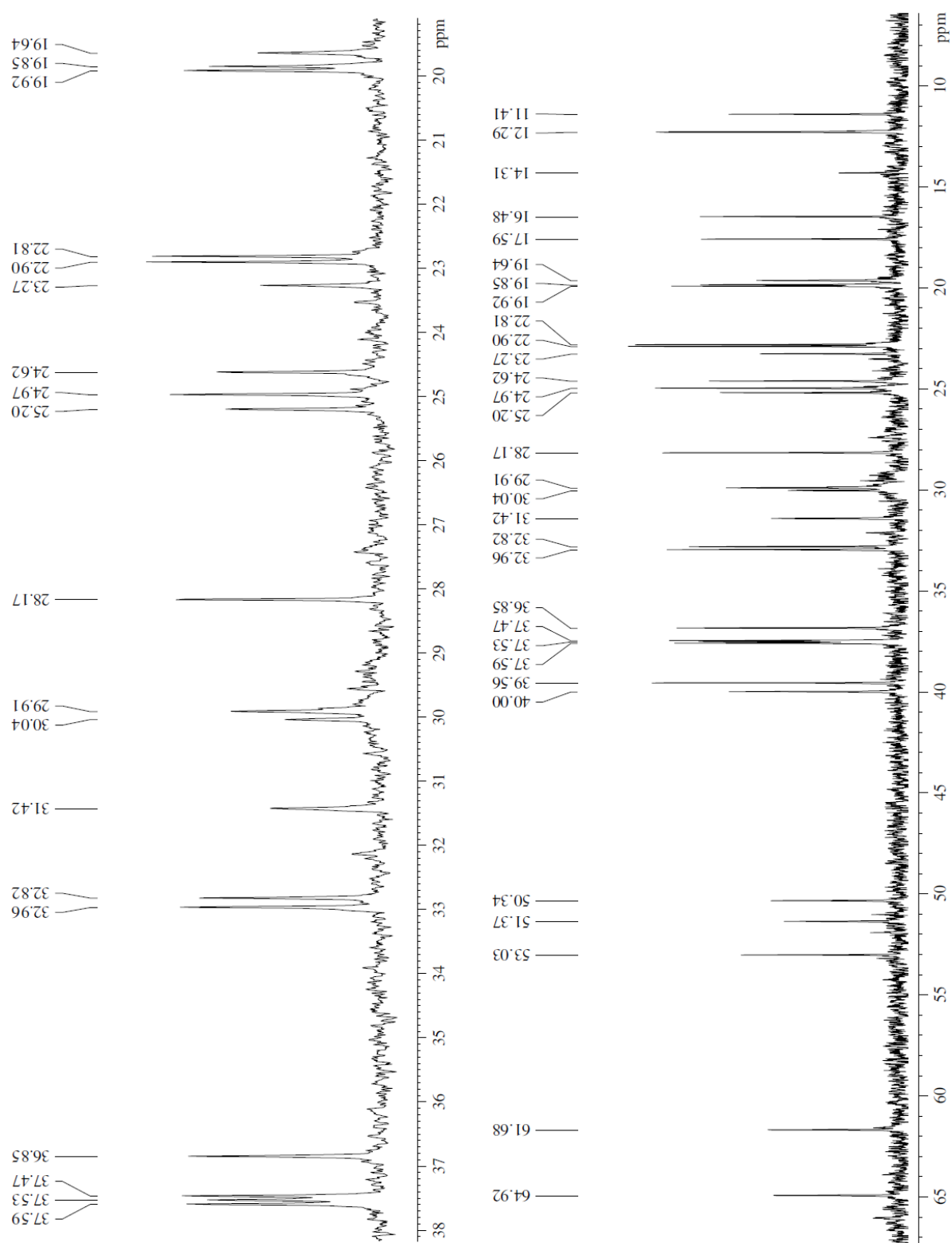


Figura 26: Expansão 2 do espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de ISO 5.

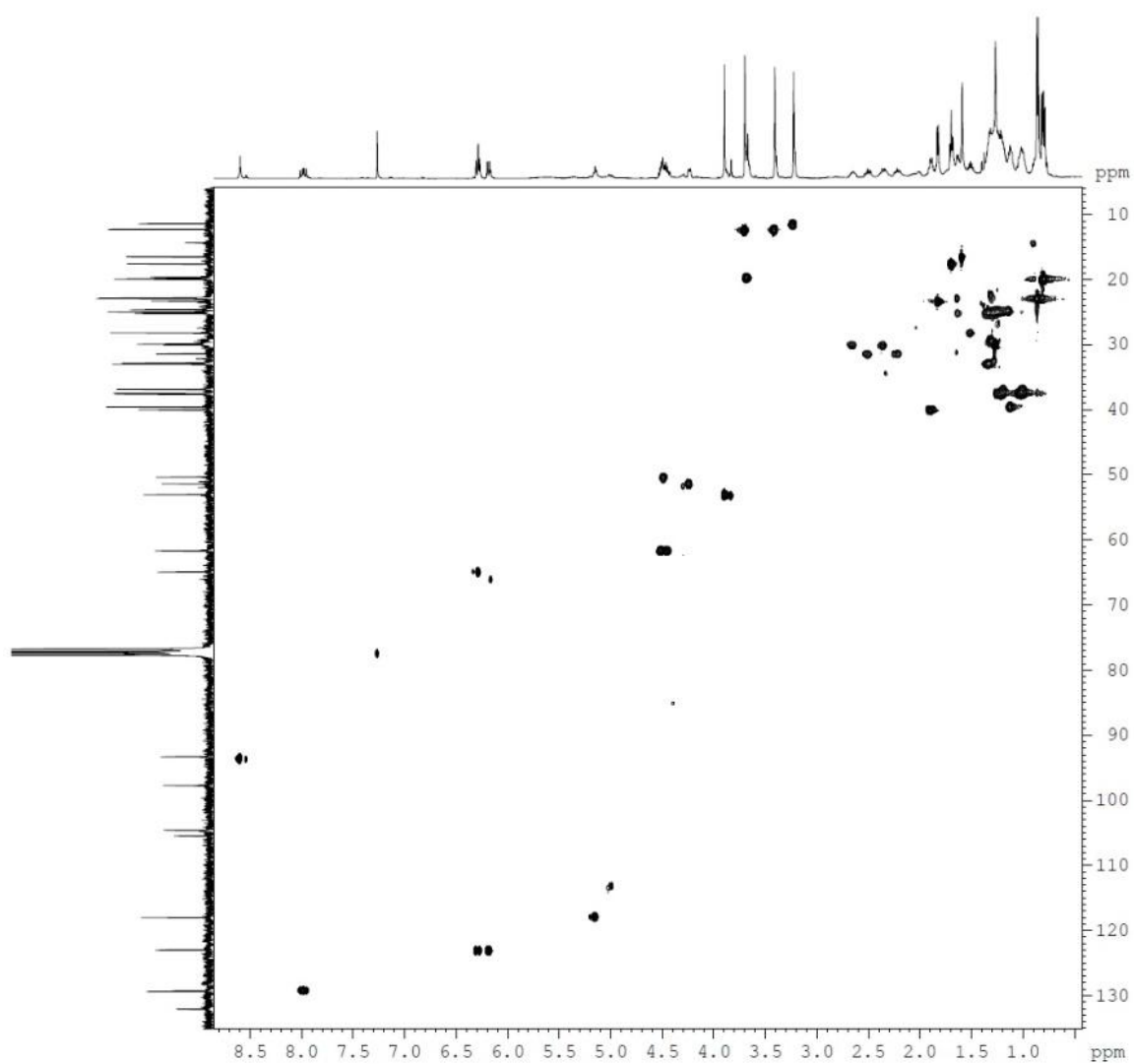


Figura 27: Espectro de RMN ^1H x ^{13}C HSQC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

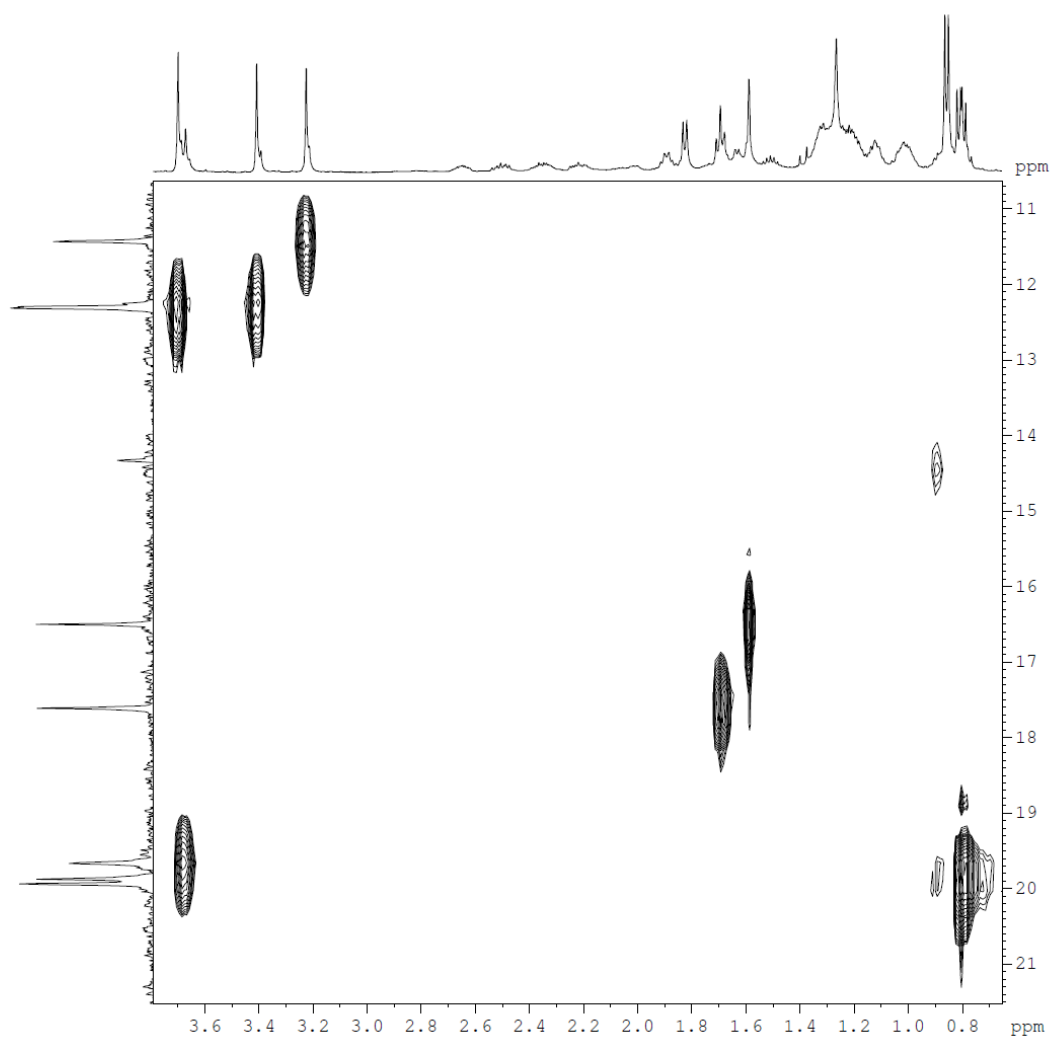


Figura 28: Expansão 1 do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HSQC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

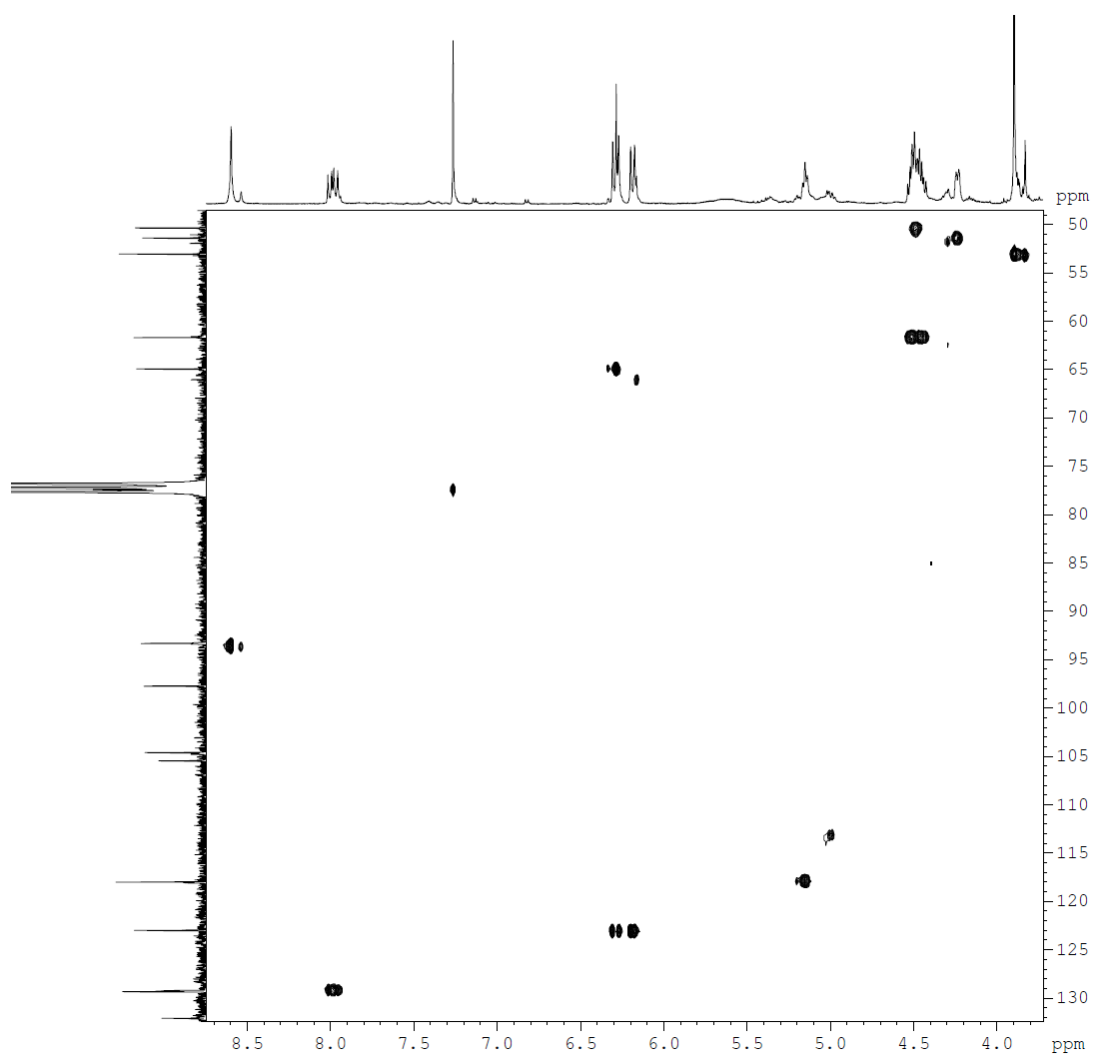


Figura 29: Expansão 2 do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HSQC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

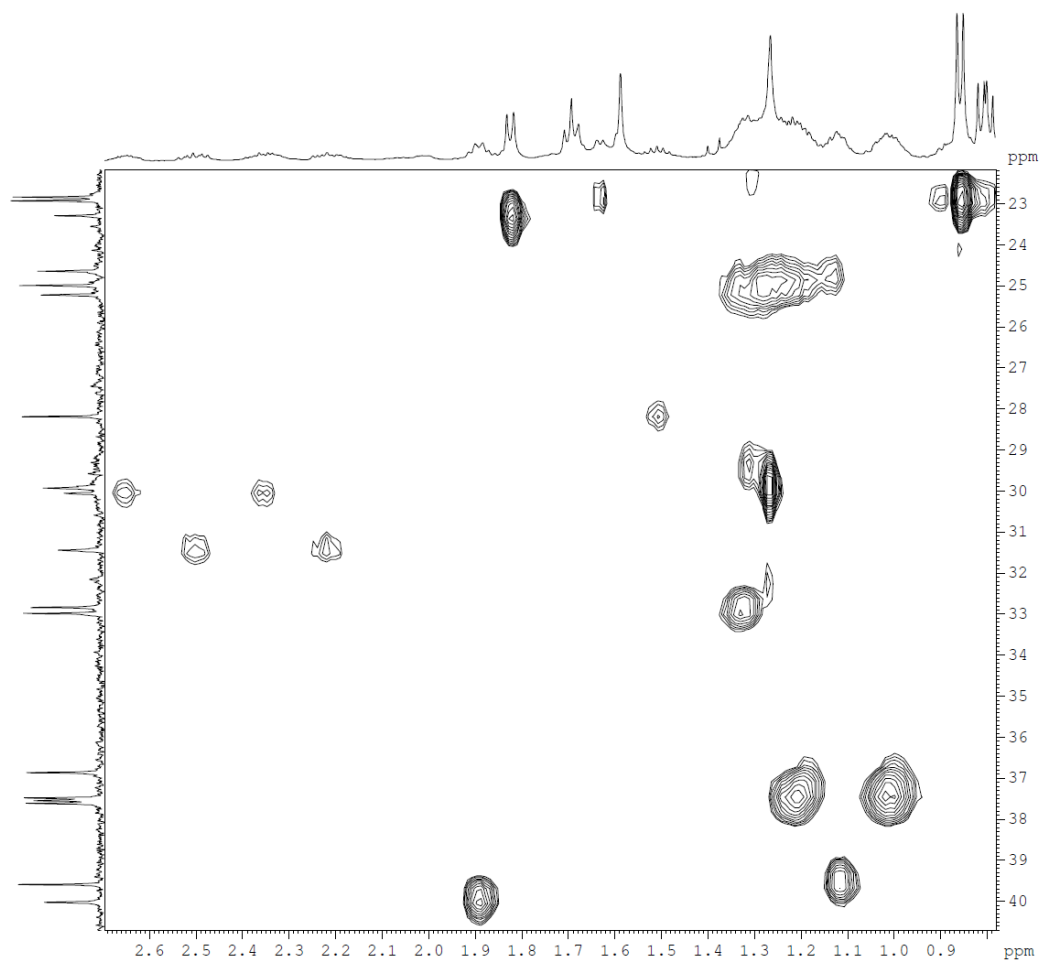


Figura 30: Expansão 3 do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HSQC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

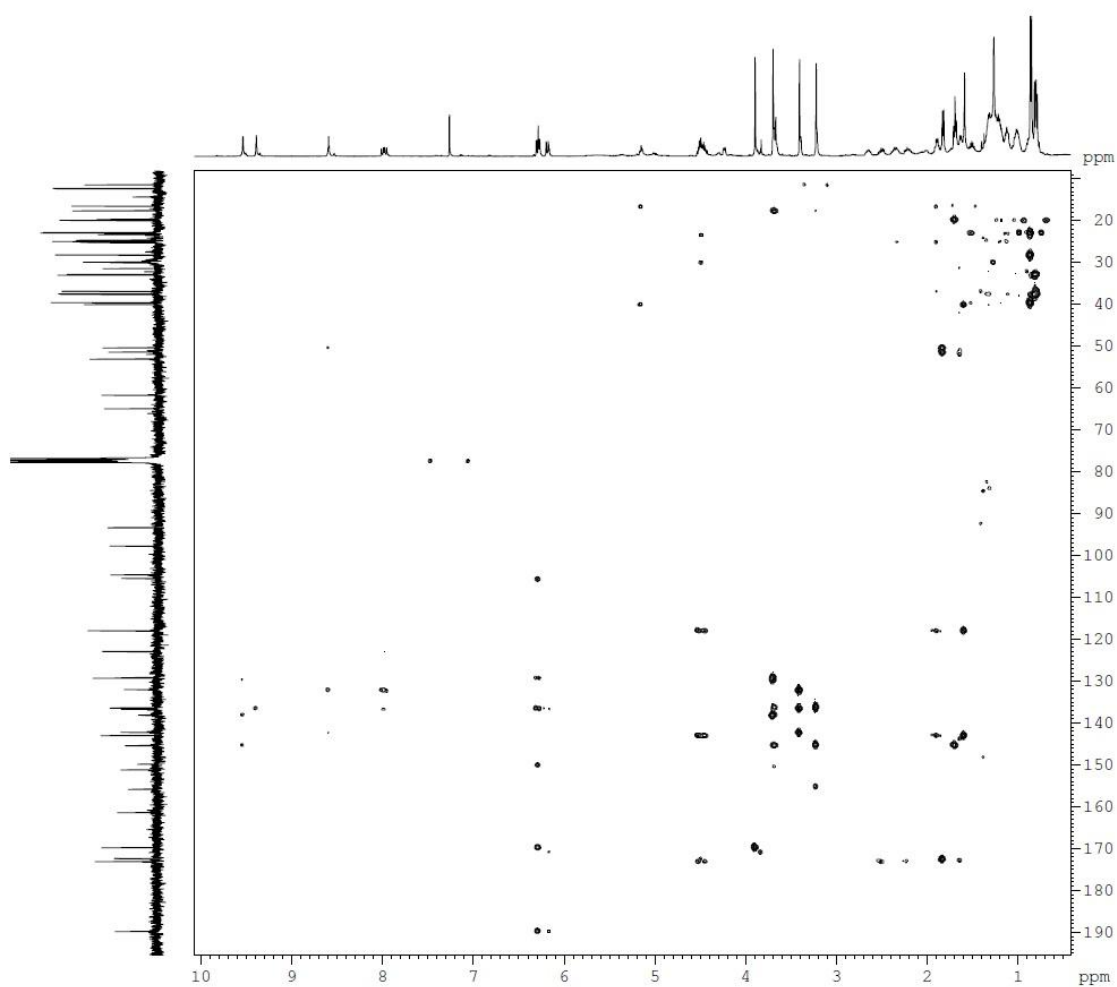


Figura 31: Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

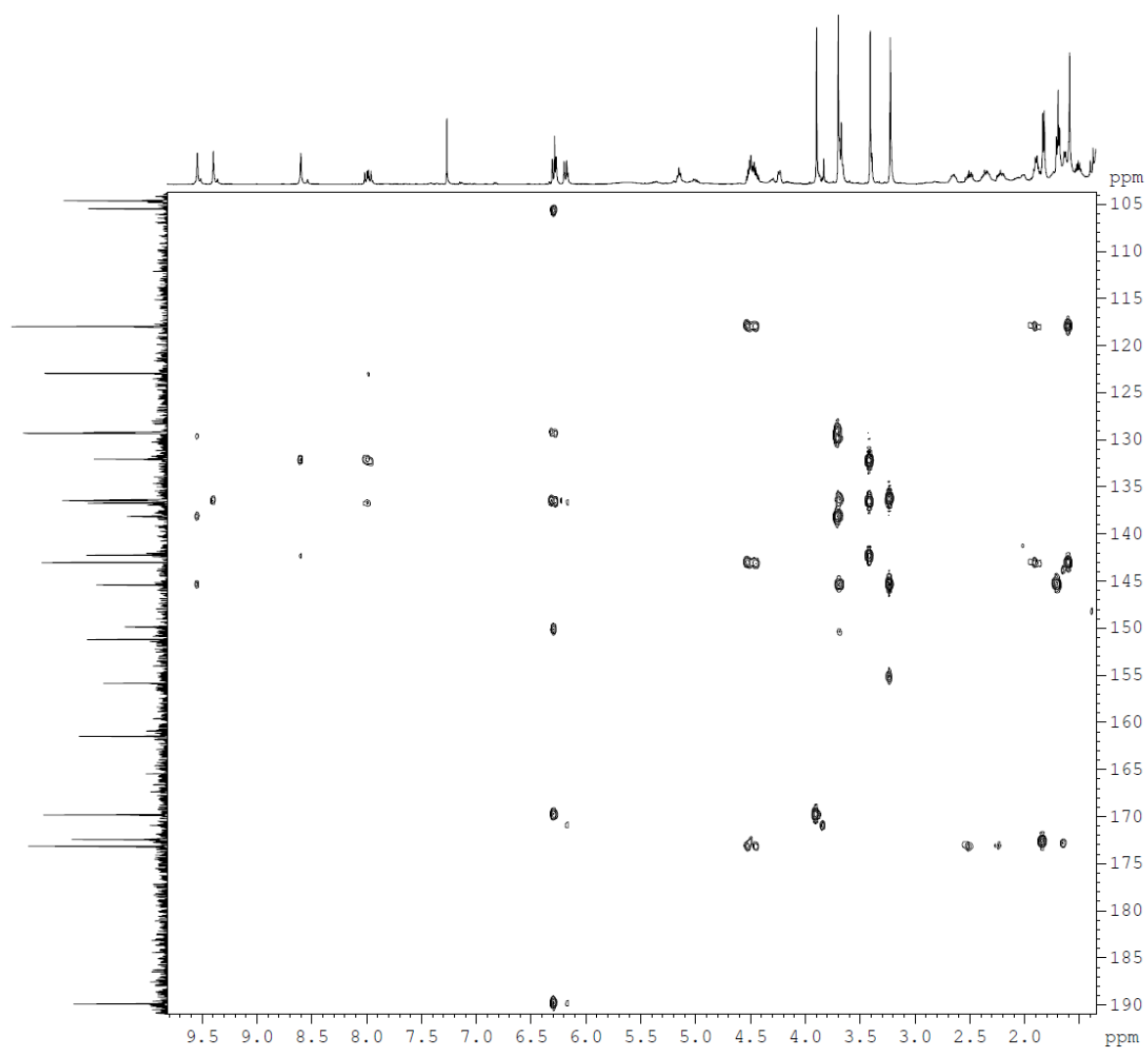


Figura 32: Expansão 1 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

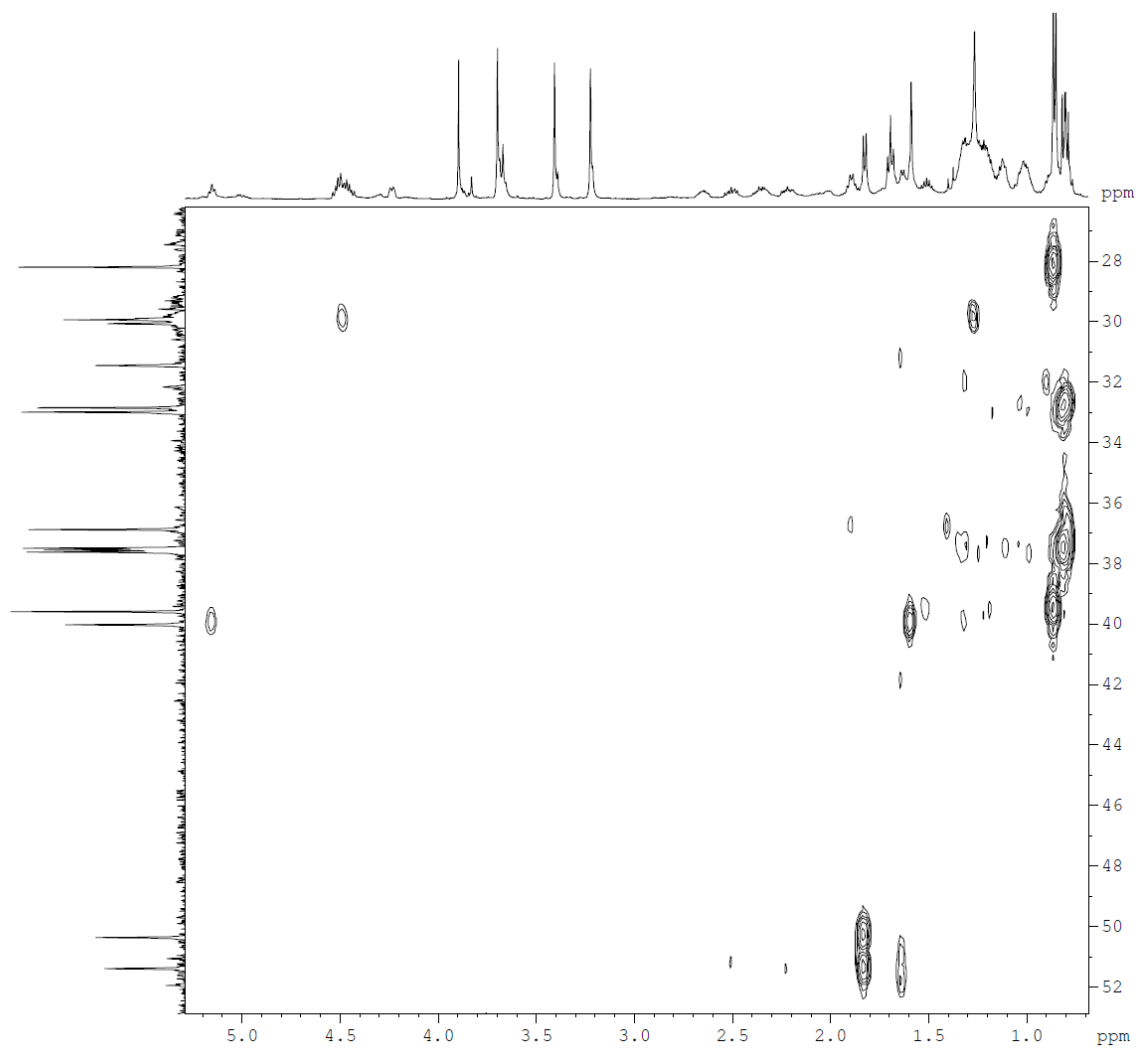


Figura 33: Expansão 2 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

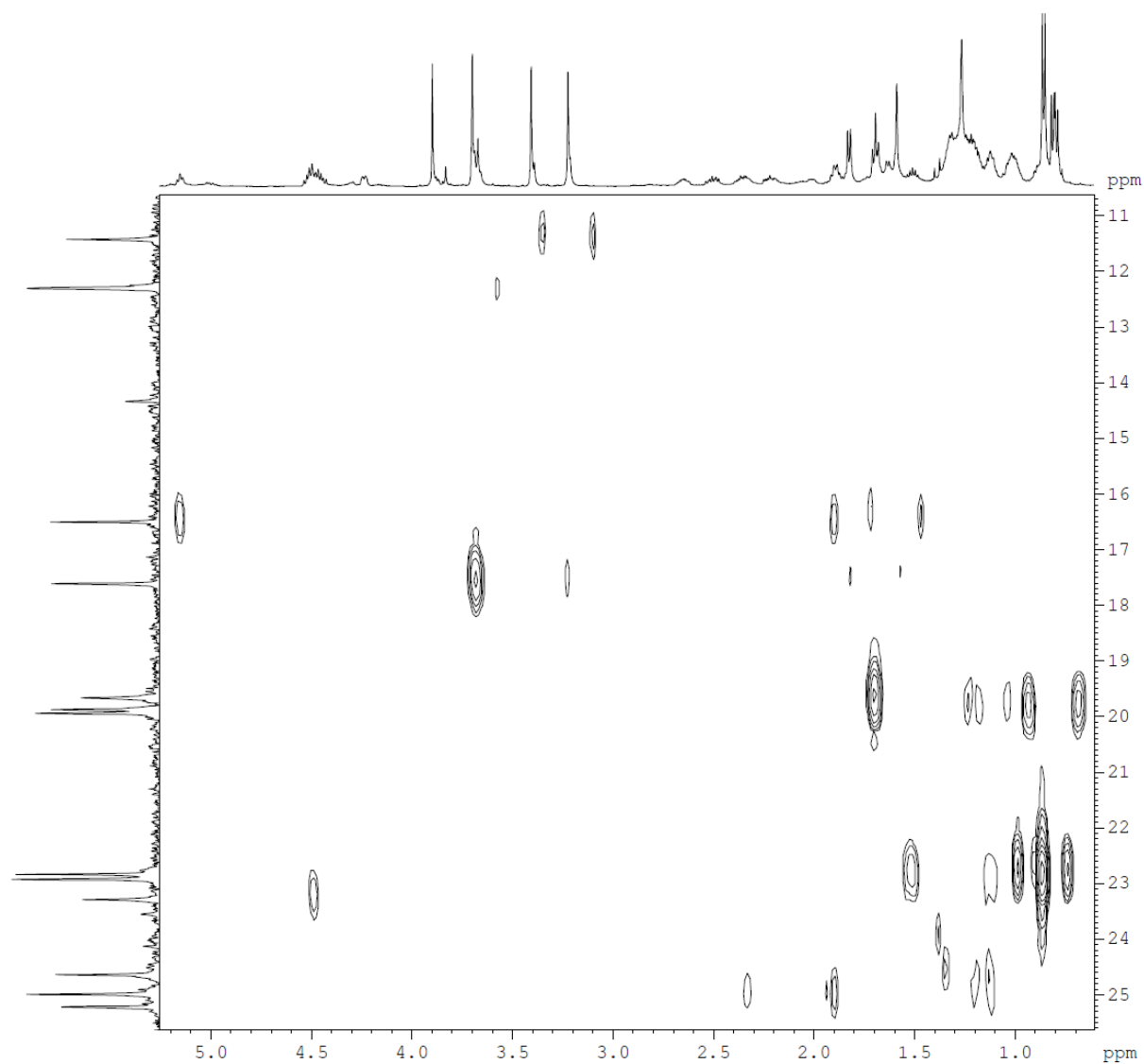


Figura 34: Expansão 3 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

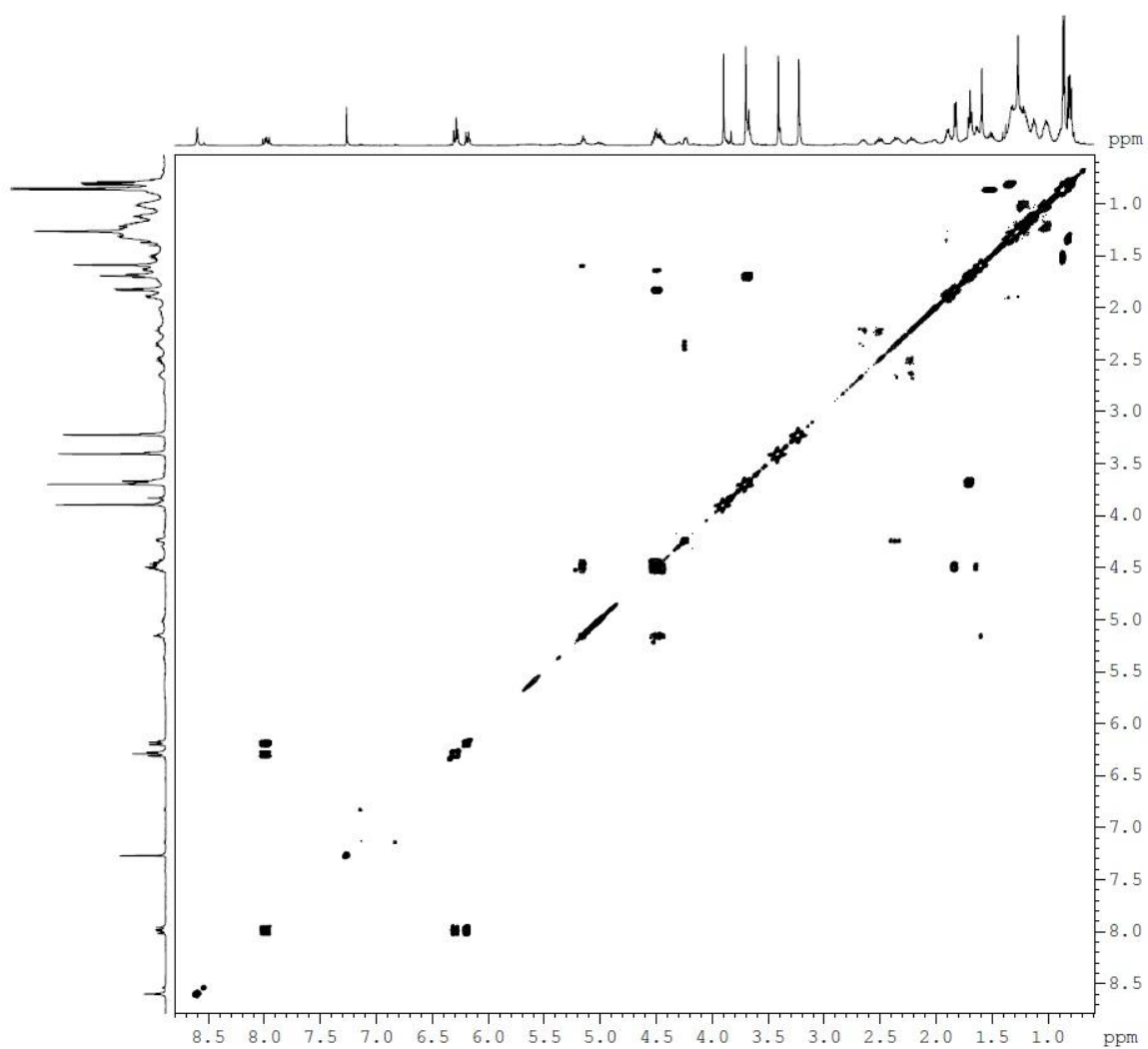


Figura 35: Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

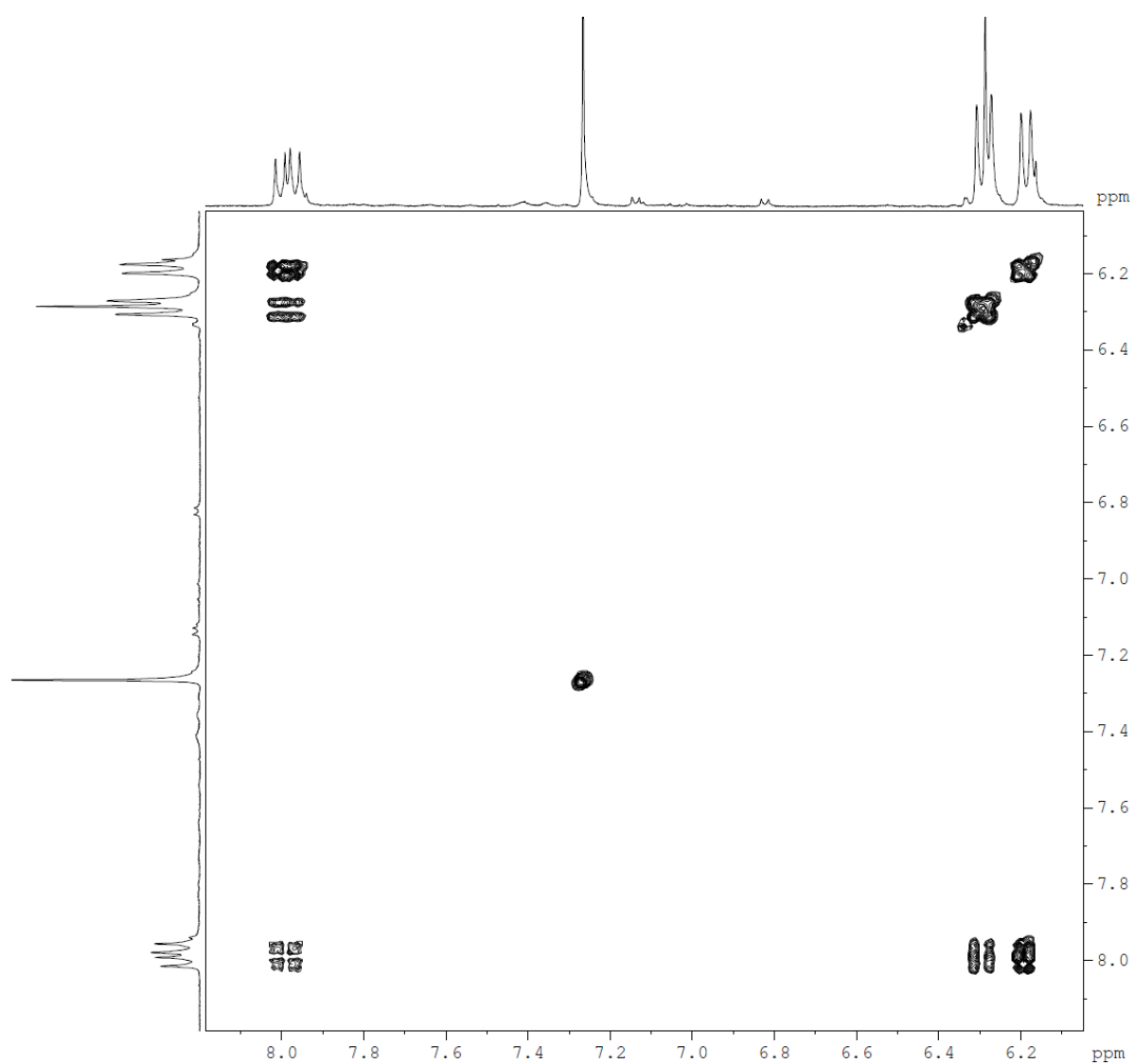


Figura 36: Expansão 1 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

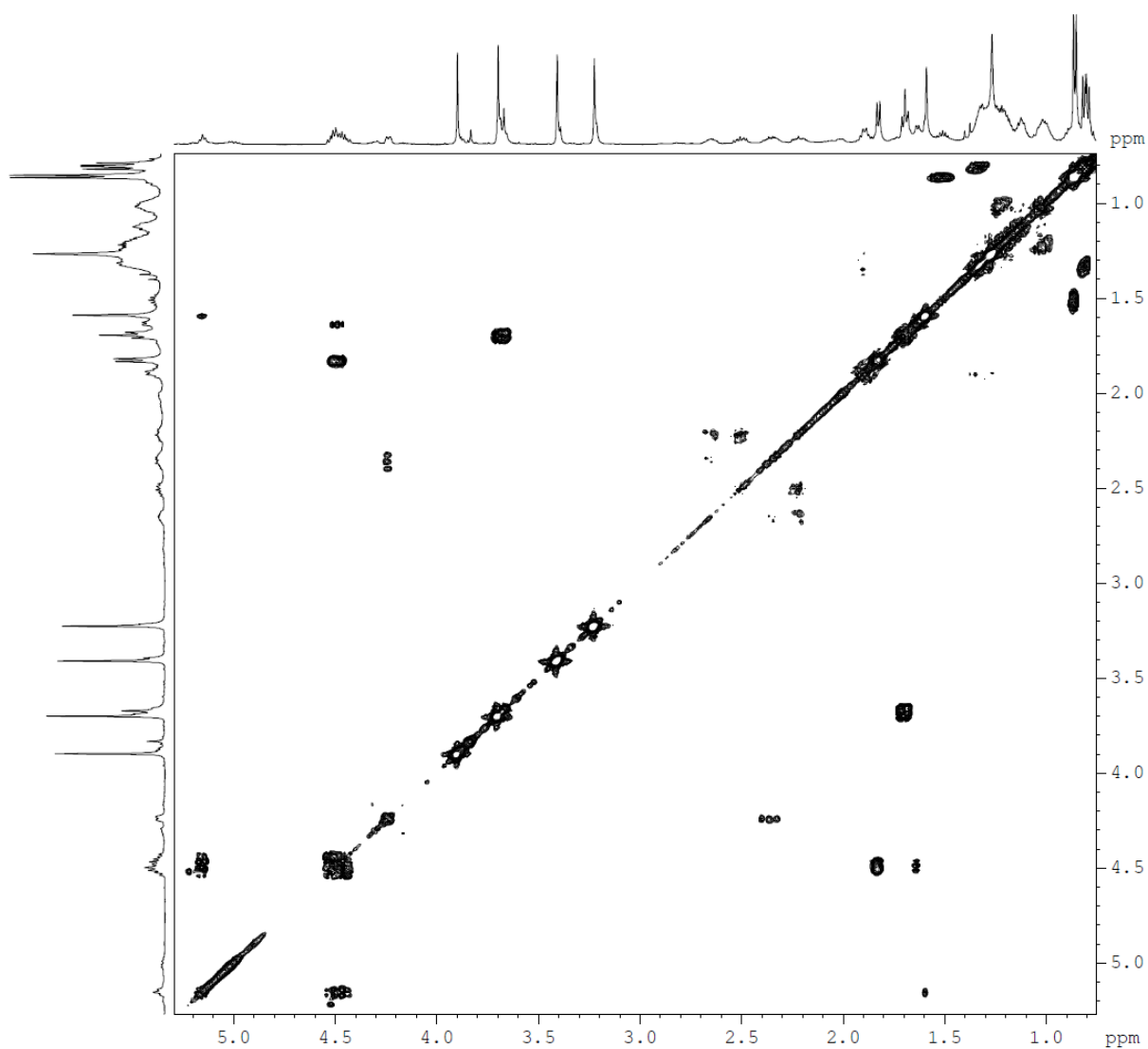


Figura 37: Expansão 2 do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de ISO 5.

6. Conclusões

- O estudo fitoquímico extrato metanólico das folhas de *Guettarda platypoda* demonstrou-se de acordo com a literatura e atingiu seu objetivo ao contribuir com o conhecimento químico da espécie *Guettarda platypoda*, além de contribuir para compreensão de suas propriedades biológicas. No EBMFG estão presentes derivados cinâmicos, flavonoides, proantocianidinas, terpenoides, saponinas e açúcares redutores.
- O extrato metanólico das folhas de *Guettarda platypoda*, F3 e F4 apresentaram atividade antioxidante superior ao padrão de vitamina C.
- As frações de Acetato de Etila (F3) e o subderivado da fração n-hexano-Acetato de etila 1:1 F2.2 apresentam atividade citotóxica.
- Através de métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas de IV, RMN ¹H e ¹³C uni e bidimensionais e comparações com os dados da literatura foi possível isolar e identificar uma substância não antes relatada no gênero *Guettarda*: Feofitina a (ISO - 5).

7. Referências

- ACHILLE, F.; MOTLEY, T. J.; LOWRY, P. P.; JEREMIE, J., Polyphyly in *Guettarda* l. (Rubiaceae, Guettardeae) based on nrDNA its sequence data, **Ann. Missouri Bot. Gard.**, v. 93, p 103, 2006
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil , **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 17, p. 114, 2007.
- AKERELE, O. As plantas medicinais: Um tesouro que não devemos desperdiçar. **Foro Mundial de Saúde**, v.14, p. 390-395, 1993.
- ALMEIDA, M. C. S. **Estudo fitoquímico e avaliação antioxidante de *Lippia sidoides***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2011.
- ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRAND, T.S.M.; SMÔNIA, F.A.; SMÂNIA, JR. A.; ZANI, C.L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). **RESOLUÇÃO - RDC Nº 10, DE 9 DE MARÇO DE 2010**. Brasília, 10 mar, p. 8, 2010.
- AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; MELLO, J.; Quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*, **Phytochemistry**, v.29, p. 199, 1989.
- BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L. & ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.
- BHATTACHARYYA, J.; DE ALMEIDA, M. Z., Isolation of the constituents of the root-bark of *Guettarda platypoda* . **J. Nat. Prod.**, v. 48, p. 148, 1985.
- BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H.S.; LOPES, M.N. Secondary metabolites from Brazilian Rubiaceae plant species: chemotaxonomical and biological significance. **Phytochemistry**, v. 5, p.19, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006.
- BRESLOW, R. Chemistry today and tomorrow: The central, useful and creative sciene. **American Chemical Society**, Washington-DC, 1997.

- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Prod.**, v. 67 n. 12, p.2141-2153, 2004.
- CAPASSO, A.; BALDERRAMA, L.; SILVILA, S.C.; TOMMASI, N.; SORRETINO, L. Phytochemical and pharmacological studies of *Guettarda acreana*. **Planta Med.**, v.64, p.348-352, 1998.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement: M100- S20 & M100-S-20- U. 2010
- CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v.40, n.6, p.1585-1612, 1995.
- CORRÊA, P.G. Defesas foliares em resposta à herbivoria em espécies lenhosas de restinga, Ipojuca - PE. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.
- DELPRETE, P.G. Rubiaceae (Coffea or Quinine family). In: SMITH, N. et al. (ed.). **Flowering plants of the neotropics**. Princeton: Princeton University Press, p.328-333, 2004
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach**, John Wiley, New York, 1998.
- DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. Sao Paulo: ed. UNESP, 1995.
- DIAS, B. F. S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica do Brasil: desafios e oportunidades**. Campinas: André Tosello, 10, 1996.
- ENDO, Y.; USUKI, R.; KANEDA, T. Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.62, n.9, p.1387-1390, 1985.
- ENDO, Y.; USUKI, R.; KANEDA, T. Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation of methyl linoleate. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.61, n.4, p.781-784, 1984.
- FALCÃO, H.S.; LIMA, I.O.; SANTOS, V.L.; DANTAS, H.F.; DINIZ, M.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BATISTA, L.M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Brazilina Journal of Pharmacognosy**, v 15, p. 3981-39, 2005.

- FILHO, S. G. B., **Feofitinas e Esteróides Glicosilados de *Turnera subulata* Sm.(TURNERACEAE)**. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2011.
- FOUCHE G.; CRAGG G.M.; PILLAY P.; KOLESNIKOVA N.; MAHARAJ V.J.; SENABE J. In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, i. 3, p. 455-461, 2008.
- FUJII, Y.; PARVERZ, S.S.; PARVEZ, M.M.; OHMAE, Y.; IDA, O. Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. **Weed Biology and Management**, v 3, p. 233-241, 2003
- GAZDA, V. E., **Abordagem Química e Estudo da atividade biológica das Raízes de *Chiococca Alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae)** – dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
- GROVER, J. K.; YADAV, S. P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v 93, p. 123-132, 2004.
- HEGAZI, A. G; EL HADY, F. K. A. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. **Z. Naturforsch.**, v. 57c, p. 395-402, 2002.
- HEITZMAN, M.E.; NETO, C.C.; WINIARZ, E.; VAISBERG, A.J., HAMMOND, G.B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, p. 5-29, 2005.
- HOSTETTMAN, K.; QUIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. **Série de textos da escola de Verão em Química-IV**, São Carlos, SP, EdFSCar, 152 p. 2003.
- HOUGHTON, P.J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 419 - 423, 2000.
- LEHNINGER, D.; NELSON, D. L.; COX, M. M. C. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W.H. Freeman, 4. ed., 2005.
- LIMA, L. F.; LIMA, P. B.; ALMEIDA JR., E. B.; ZICKEL, C. S. Morfologia de frutos, sementes, plântulas de *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae). **Biota Neotrop.**, v. 10, n. 1, 2010.
- LUCENA, J.E.X.; BISPO, M.D.; NUNES, R.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; TEIXEIRA-SILVA, F.; MARÇAL, R.M.; ANTONIOLLI, A.R. Efeito

- antinociceptivo e antiinflamatório do extrato aquoso da entrecasca de *Coutarea hexandra* Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.67, p.72, 2006.
- MARGALHO, L.F.; ROCHA, A.E.S. da; SECCO, R. de S. Rubiaceae Juss. da restinga da APA de Algodual/Maiandeuá. Maracanã, Pará, Brasil. **Cienc. Nat.**, v. 4, n. 3, p. 303-339, 2009.
 - MATSUO, A.; ONO, K.; HAMASAKI, K.; NOZAKI, H. Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 2, p.427-430, 1996.
 - MELO, C. L. **Estudo Farmacológico da Ternatina, um flavonóide isolado de Egletes viscosa, LESS – Ceara**. Dissertacao (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 1991.
 - MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G., Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res**, v. 15, p. 127- 130, 2001.
 - MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. A coerência e a confiabilidade das indicações terapêuticas. **Caderno de Farmácia**, v. 5 (1/2), p. 93 –119. 1989.
 - MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R., **Produtos Naturais. Estudos Químicos e Biológicos**. Editora da Universidade Estadual do Ceará, 2007.
 - MOURA, V.M.; SANTOS, D.P.; SANTIN, S.M.O.; CARVALHO J.E.; FOGLIO, M.A. Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (RUBIACEAE). **Química Nova**, v. 29, n 3, p.452-455, 2006
 - MUKHERJEE, A. K., BASU, S., SAKAR, N., GHOSH, A. C. Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 1467-1486, 2001.
 - NEWMAN D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. of Nat. Prod.** v. 66, p. 1022-1037, 2003.
 - NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v.17, p. 215 – 234, 2000.
 - NOVO, R. R. **Biologia reprodutiva de Guettarda platypoda DC. (Rubiaceae) em uma área de restinga no Estado de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado).

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, 2010.

- OLIVEIRA, D. DA S.; AQUINO, P. P.; RIBEIRO, S. M. R.; PROENÇA, R. P. DA C.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M., Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Sciences**. Maringá, v. 33, n. 1, p. 89-98, 2011.
- OLIVEIRA, P. L. **Contribuição ao estudo de espécies da família Rubiaceae: fitoquímica da espécie *Amaioua guianensis* Aulb.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química. Goiânia, 2009.
- PEREIRA, M.S.; BARBOSA, M.R.V. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil: subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. **Acta Bot. Bras.**, v. 18, n. 2, p. 305-318, 2004.
- PINA, E. M. L. **Estudo farmacológico das cascas da raiz de *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae).** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmaceuticas. Recife, 2011.
- QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ALMEIDA, R.N. de; FALCÃO, A.C.G.M.; AGRA, M. de F.; SOUSA, M. de F.V. de; BARBOSA-FILHO, J.M. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.21, n.3, p.179-184, 2002.
- ROBBRECHT, E. Introduction to advances in Rubiaceae macrosystematics. **Opera Botanica Belgica**, v. 6, p. 7-18, 1993
- ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. **Opera Botanica Belgica**, v. 1, p. 1-271, 1988.
- RODRIGUES, E.; CARLINI, E. L. A. A importancia dos levantamentos etnofarmacologicos no desenvolvimento de fitomedicamentos. **Revista Racine**, São Paulo, n.70, p.30-35, 2002.
- SCHWIKKARD, S. L.; MULHOLLAND, D. A.; HUTCHINGS, A. Phaeophytins from *Tapura fisheri*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2391-2394, 1998.
- SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. **Plantas Medicinais:** In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos, antiinflamatórios, aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, 480 p. 2004.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds.** 7 ed. John Wiley & Sons, 2005.

- SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. O.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Editora da Universidade e Editora da UFSC. 6ª Ed. P. 383-629. 1999.
- SOARES, R. R. S. **Estudo de propriedades da Clorofila A e da Feofitina A visando a Terapia Fotodinâmica**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Maringá – PR, 2006.
- SOUSA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MACHADO, M. I. L.; VENCATO, I.; MASCARENHAS, Y. P.; BRAZ FILHO, R., Triterpenoids from *Guettarda angélica*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 2589, 1984.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005.
- STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 17, p. 4151, 1998.
- STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.
- TORSSELL, K.B.G.. **Natural Product Chemistry: A mechanistic, biosynthetic and ecological approach** (2nd edition). Apotekarsocieteten-Swedish Pharmaceutical Society, Stockholm, 1997.
- VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- WHO. **Traditional medicine strategy 2002-2005**. Geneva p. 65. 2002.
- YUE-ZHONG S. H. U. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.
- ZICKEL, C. S.; ALMEIDA JR, E. B.; MEDEIROS, D. P. W.; LIMA, P. B.; SOUZA, T. M. S.; LIMA, A. B., Magnoliophyta species of restinga, state of Pernambuco, Brazil. **Check List**, v. 3, p. 224-241, 2007.