

ALESSANDRA CRISTINA DAMETTO

**Estudo químico e avaliação da atividade
biológica de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia
involucrata* (Myrtaceae)**

**Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor
em Química**

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

D157e Dametto, Alessandra Cristina
Estudo químico e avaliação da atividade biológica de
Eugenia brasiliensis e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae) /
Alessandra Cristina Dametto. – Araraquara : [s.n], 2014
169 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Flavonoides. 2. Antocianina. 3. Antioxidantes.
4. Anti-inflamatórios. I. Título.

DAMETTO, A. C. **Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae)**. 2014. 169 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.


Página	Linha	Onde se lê	Leia
146	Figura 80	Clivagem Heterocíclica	Quinona Métimeo

ALESSANDRA CRISTINA DAMETTO

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Araraquara, 24 de abril de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



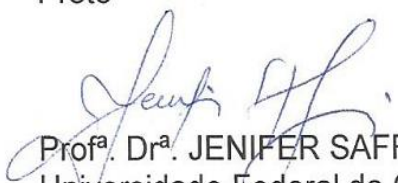
Dr. NIVALDO BORALLE
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Drª. LUCIANA POLESE
Centro de Estudos Ambientais / UNESP / Rio Claro



Prof. Dr. LUIZ ALBERTO BERALDO DE MORAES
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP / Ribeirão Preto



Profª. Drª. JENIFER SAFFI
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre / UFCSPA / Porto Alegre

DADOS CURRICULARES

ALESSANDRA CRISTINA DAMETTO

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 22/07/1983

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Araraquara/SP

Filiação: Roberto Aparecido Dametto

Regina Mara Marques Dametto

Profissão: Química

Endereço: Avenida Wilson Pinto de Souza, 1672, Jd. Vitória, Araraquara-SP

E-mail: alessandradametto@gmail.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação em Licenciatura em Química.

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Período: 2003-2007

Mestrado em Química.

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Área de concentração: Química Orgânica

Período: 2008-2010

Doutorado em Química.

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Área de concentração: Química Orgânica

Aperfeiçoamento em Doutorado Sanduíche na Michigan State University, MSU, East Lansing, Estados Unidos (novembro/2011-junho/2012)

ESTÁGIOS REALIZADOS

Iniciação à pesquisa científica

- Bolsista BAE:

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Departamento: Química Inorgânica

Orientador: Antônio Carlos Massabni

Período: 2003-2004

Bolsa: BAE - Bolsa de Auxílio ao Estudante

- Monitoria de Cálculo Diferencial e Integral I e II

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Departamento: Físico-Química

Orientador: Jorge Capela

Período: 2004-2005

Bolsa: BITA - Bolsa de Incentivo Técnico Acadêmico

- Participação no projeto: "Produção de Plásticos Biodegradáveis a partir da cana de açúcar por via Biotecnológica”

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Departamento: Química Analítica

Orientador: Clóvis Augusto Ribeiro

Período: 2005-2007

Bolsa: FACTE - Fundação de Apoio à Ciência Tecnologia e Educação

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS E APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

Gromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) como ferramenta na identificação de compostos de baixa polaridade nos extratos de *Alchornea sidifolia* (Euphorbiaceae). XIII CIC Congresso de Iniciação científica,

2011.

Avaliação da atividade antioxidante e do potencial antidiabético das folhas de *Eugenia jambolana* e *Eugenia brasiliensis* (Myrtaceae). 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.

Atividade antioxidante e antifúngica das folhas e dos ramos de *Alchornea sidifolia*. XIII CIC Congresso de Iniciação científica, 2011.

Chemopreventive potential of anthocyanins from *Eugenia jambolana* fruits. Joint Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy & the Phytochemical Society of North America, 2010.

Estudo químico e identificação de oito antocianinas de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae). IV Simpósio de Cromatografia e Técnicas Afins (SIMCRO 2010), 2010, Campos do Jordão.

Antioxidant anthocyanins from the fruits and antimalarial extracts from the leaves of *Eugenia jambolana* (Myrtaceae). 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) and XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM), 2009, São Pedro.

Phytochemical study and evaluation of the antioxidant and antimalarial activity of *Myrciaria cauliflora* Berg. (Myrtaceae). 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) and XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM), 2009, São Pedro.

Estudo fitoquímico e das atividades antioxidante e antimalárica de *Myrciaria cauliflora* Berg. (Myrtaceae). 56^a Jornada Farmacêutica da UNESP, 2009, Araraquara.

Estudo fitoquímico e das atividades antioxidante e antimalárica de *Myrciaria cauliflora* Berg. (Myrtaceae). 17^o Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009, Araraquara.

Identificação de Triterpenos e Esteróides de folhas e frutos de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae) usando CG-DIC. 17° Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009, Araraquara.

Separation of anthocyanins from *Eugenia jambolana* by High-Speed Countercurrent Chromatography and screening for antioxidant activity. 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2009, Ribeirão Preto.

Perfil cromatográfico po HPLC-DAD e atividade biológica dos extratos dos frutos de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae). 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza.

Determinação de Praziquantel e Febantel em formulações de uso veterinário. Congresso Latino Americano de Cromatografia (COLACRO XII), 2008, Florianópolis.

Determination of Oxytocin in medications of veterinary Use. 6° International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2007

Validation of a spectrophotometric method for determination of oxytetracycline in pharmaceutical preparations. 6° International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2007, Ribeirão Preto.

Síntese e estudos preliminares de um complexo de Pt(II) com tiamina. XIV Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, 2006

Síntese e caracterização de complexos de Pt(II) com tiamina In: XVIII CIC Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2006, Bauru.

Validação de métodos para determinação do teor de 3-Hidroxi butirato (3HB) e 3-Hidroxi valerato (3HV) em polímero biodegradável, II Simpósio de Cromatografia (SIMCRO)2006 São Pedro.

Preparation and Crystal Structure of a New Decavanadate. XII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry (XII BMIC) II Joint Brazilian/Italian Inorganic

Chemistry Meeting, 2004

PARTICIPAÇÃO EM COMISSÕES

17º Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009.

III Workshop do NuBBE - Conservação e Uso Sustentável da Diversidade de Plantas do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Bioprodutos, 2008.

VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biot/Fapesp, 2008.

ORIENTAÇÕES E SUPERVISÕES

Danieli Camilo Marcato. “Estudo fitoquímico de *Alchornea sidifolia* visando substâncias bioativas”. 2011. Iniciação científica. Licenciatura em Química - Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Carolina von Atzingen Manocchio. “Estudo fitoquímico de *Alchornea sidifolia* visando substâncias bioativas”. 2010. Iniciação científica. Bacharelado em Química - Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Larissa Araújo Costa (UNIFAL). “Estudo químico dos frutos e folhas de *Eugenia brasiliensis* (Myrtaceae)”. 2014. Bacharelado em Biotecnologia - Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Tamara Biocanin (Universidade de Belgrado - IAESTE). “Antocianinas de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae)”. 2010. Bacharelado em Química - Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

GUILHERME, L. R.; MASSABNI, A. C.; DAMETTO, A. C., SOUZA CORRÊA, R.; ARAUJO, A. S. Synthesis, infrared spectroscopy and crystal structure determination of a new decavanadate. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 40, p. 897-901, 2010.

SANTOS, A. F., POLESE, L., RIBEIRO, C. A., ERNANDES, J. R., DAMETTO, A. C., Mangili, Lilian Silveira, KESSERINGH, S. M., NONATO, R. V. Validação de métodos para determinação do teor de 3-Hibroxibutirato e 3-Hidroxivalerato em polímero biodegradável. **Química Nova** (Online), v. 30, p. 1951-1955, 2007.

Dedico este trabalho a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para sua realização!

Agradecimentos

A minha grande jornada começou no dia 01 de março de 2003 quando ingressei no 1º ano do curso de Química Licenciatura da UNESP de Araraquara. A primeira etapa foi concluída no dia 12 de janeiro de 2008 quando me formei em Química. A conclusão desta etapa possibilitou o início da segunda parte desta jornada, o Mestrado. Após dois anos, no dia 05 de março de 2010, esta etapa também chegou ao seu final, e abriu caminho para a terceira e última etapa da minha jornada, o Doutorado. E, neste ano de 2014, esta grande e única jornada chega ao final. Desde o início até o final se passaram onze anos...

Nestes onze anos, muitas coisas aconteceram em minha vida e para cada uma delas tiveram pessoas especiais que estiveram ao meu lado. Por isso, quero aproveitar esta oportunidade para agradecer a cada uma dessas pessoas que me ajudaram a ser quem sou hoje.

Quero agradecer aos meus pais, Roberto e Regina, que sempre fizeram o possível e, muitas vezes o impossível, para que eu pudesse chegar a este momento. Agradeço-lhes também pelos bons exemplos de caráter e dignidade que eles sempre me deram.

Agradeço aos meus irmãos, Patrícia e Gabriel. À Patrícia, minha irmã mais velha, agradeço por ser um exemplo e estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Ao Gabriel, meu “irmãozinho” (hoje ele tem 18 anos), agradeço pelo bom coração que ele tem e com isso ele me ensinou a ser uma pessoa mais tolerante.

Ao meu cunhado, Lucas, agradeço pela simplicidade e humildade, pois estas duas características me inspiram a ser uma pessoa melhor.

Ao Marco, meu amado noivo, agradeço por compartilhar a sua vida comigo. Você é a minha força nos momentos de fraqueza, a minha alegria nos momentos de tristeza e o meu aconchego nos momentos de cansaço. Ao seu lado aprendi o que é o amor. Você é muito importante para mim. Amo você!

Agradeço a toda minha família que participou deste trabalho. Em especial, quero agradecer à minha tia Cristina pela doação dos vidrinhos que usei para colocar os extratos, ao Cesar, à Elaine, à Camila e Amanda por

coletarem os frutos e aos meus tios Nenê e Maria Helena pelo incentivo e apoio.

Não posso deixar de agradecer aos meus amigos do IQ que fizeram parte desta jornada: Adriana, William, Marco, Patricia, Rose, Jorge, Sheila, João, Flávia, Aroldo, Thayz, Lidiane, Marília, Ademir, Cláudio Rodrigo, Vanessa, Carol, Vinícius, Andressa, Alexander, Alan, Luciana Guilherme e muitos outros. Agradeço em especial a Daniara, pois nos momentos mais difíceis que passei quando morava fora do país, ela estava ao meu lado.

Agradeço aos meus amigos que conheci nos Estados Unidos, Angélica, Juliana, Paulo, Rita e Daniella, vocês se tornaram meus irmãos e estarão sempre em meu coração.

Agradeço minha amiga de infância, Kelly, por toda a diversão, companheirismo de aventuras e “planos” e amizade sincera.

Agradeço à Lena pelos grandes e valiosos ensinamentos e ao grupo (Inara, Adriana, Lili, Zê, Inês, Xande, Bia, Ísis, Isa, Reinaldo, Hélio, Suely, Milena e Marcia) do qual eu faço parte pela amizade, risadas e ensinamentos que compartilhamos.

Agradeço aos amigos Rebeca, Teresinha e Nerilson, orientados da Profa. Dulce e companheiros de laboratório pela amizade e por compartilharem suas experiências profissionais e seus conhecimentos.

Ao Dr. Nair, meus sinceros agradecimentos por compartilhar sua grande experiência profissional e de vida. Com ele aprendi a superar obstáculos e a crescer profissionalmente. O Dr. Nair é um exemplo de pessoa ética e íntegra. Enfim, seus ensinamentos me inspiraram a realizar todo este trabalho.

Não posso deixar de agradecer os meus companheiros de laboratório no exterior: Roger (Burkina Faso), Vjday (Índia), Zhang (China), Renato (Filipinas) e Sami (Egito), por compartilharem comigo suas culturas e conhecimentos.

Com muito carinho agradeço minhas alunas de iniciação científica, Caroline, Carolina, Danieli, Tamara e Larissa, pois com elas aprendi muito mais do que ensinei.

Agradeço a Profa. Dulce pelos seis anos de trabalho e pela confiança que ela teve sempre em mim. Nos momentos em que tudo parecia dar errado e que eu já estava prestes a desistir a profa. Dulce sempre chegava com a solução e

isso me incentiva a continuar e a ter esperança. Portanto, gostaria de agradecê-la por toda a paciência que teve durante todo este período.

Agradeço à Tais e ao “Gallo” por permitirem que eu entrasse em suas casas para realizar a coleta das folhas e dos frutos das espécies de *Eugenia*. A coleta também foi realizada em duas instituições, o SENAI e o IQ-UNESP/Araraquara, por isso gostaria de agradecer aos diretores destas instituições.

A todos os funcionários que trabalham no IQ meus agradecimentos pela ajuda, pelo atendimento atencioso e amigável.

Agradeço aos funcionários do departamento de Química Orgânica, Marquinho, João e Juliana, pois cada um deles teve uma participação especial em meu trabalho e na minha formação.

Ao Nivaldo, agradeço pela amizade, pela disponibilidade em sempre me ajudar, pela sinceridade e pelas longas discussões sobre as análises de RMN e os resultados obtidos.

À Luciana Polese eu agradeço por toda ajuda, amizade e conselhos.

Agradeço a Cris que é bibliotecária do IQ pela amizade, pelas conversas divertidas e pela correção cuidadosa das referências.

Agradeço ao Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro e à Profa. Marisa Veiga Capela ambos do Instituto de Química da UNESP/Araraquara. Ao prof. Clóvis, agradeço por permitir que eu usasse o cromatógrafo do seu laboratório e à profa. Marisa, agradeço pela ajuda no tratamento dos dados estatísticos. Agradeço ao Prof. Dr. Marcos Eberlin da UNICAMP por abrir as portas do seu laboratório para eu poder realizar algumas análises de Massas. Agradeço ao Prof. Dr. Norberto Peporini Lopes da Faculdade de Ciências e Letras da USP pelos ensinamentos e pela disponibilidade em ajudar. Também agradeço à Profa. Dra. Inês Cordeiro do IBt-SP pela identificação das espécies de plantas estudadas neste trabalho.

Agradeço a todos os professores do IQ, em especial às professoras Angela Araújo e Lourdes Campaner pela amizade e por esclarecerem muitas dúvidas.

Agradeço ao Instituto de Química e à Michigan State University.

À Capes, agradeço pela bolsa concedida.

Por último, agradeço a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível.

“Faça primeiro o necessário; depois faça o possível; e, de repente você vai perceber que pode fazer o impossível.”

(São Francisco de Assis)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia (NuBBE) do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” em Araraquara, São Paulo, Brasil e no *Bioactive Natural Products and Phytochemicals (BNPP) Laboratory* da Michigan State University em East Lansing, Michigan, Estados Unidos.

Resumo

Este trabalho abordou o estudo químico e a avaliação das atividades biológicas dos extratos de folhas e frutos de *Eugenia brasiliensis* LAM. e *Eugenia involucrata* DC, espécies nativas brasileiras usadas na medicina popular para tratamento de inflamações. Nos frutos de *E. brasiliensis* e *E. involucrata* foram identificadas por CLAE-DAD-EM/EM 19 antocianinas: cianidina-3-O-soforosídeo (**A**₁), delphinidina-3-O-laminaribiosídeo (**A**₂), delphinidina-3-O-galactosídeo (**A**₃), delphinidina-3-O-glicosídeo (**A**₄), cianidina-3-O-galactosídeo (**A**₅), cianidina-3-O-laminaribiosídeo (**A**₆), cianidina-3-O-sambibiosídeo (**A**₇), cianidina-3-O-cafeoil-diglicosídeo (**A**₈), cianidina-3-O-glicosídeo (**A**₉), cianidina-3-O-cafeoil-glicosídeo (**A**₁₀), delphinidina-3-O-cumaroil-glicosídeo (**A**₁₁), pelargonidina-3-O-glicosídeo (**A**₁₂), cianidina-3-O-maloil-glicosídeo (**A**₁₃), cianidina-3-O-acetoil-glicosídeo (**A**₁₄), cianidina-3-O-pentosídeo (**A**₁₅), quatro antocianinas não identificadas (**A**₁₆, **A**₁₇, **A**₁₈ e **A**₁₉) e delphinidina (**A**₂₀). Com exceção de **A**₃, **A**₄, **A**₅ e **A**₉, identificadas anteriormente em *E. brasiliensis*, as antocianinas são relatadas pela primeira vez em ambas espécies. O teor obtido para as antocianinas majoritárias, **A**₄ e **A**₉, em *E. brasiliensis* foi 1,15 e 3,01 mg.g⁻¹ (fruto fresco), respectivamente e em *E. involucrata* foi 0,58 e 2,02 mg.g⁻¹ (fruto fresco), respectivamente. As substâncias isoladas das folhas de *E. brasiliensis* incluem um dissacarídeo (**1**), duas flavanonas: 2-(S)-7,5-di-hidroxi-6-metilflavanona (**2**) e 2-(S)-7,5-di-hidroxi-6,8-dimetilflavanona (**3**), uma di-hidrochalcona: 2'-6'-di-hidroxi-3'-metil-4'-metoxi-di-hidrochalcona (**4**) e uma neolignana: 7,8,7',8'-tetra-hidro-8,8'-dimetil-3,3'-dimetoxi-4,4'-di-hidroxi-dibenzociclo-octadieno (**5**). As substâncias **2**, **3** e **4** foram relatadas pela primeira vez na espécie em estudo e a substância **5** é inédita. Nas infusões de *E. brasiliensis* e *E. involucrata* foram identificadas 10 substâncias por EM: ácido gálico (**C**₁), ácido cafeico (**C**₂), ácido quínico (**C**₃), [epi]catequina (**C**₄), [epi]galocatequina (**C**₅), ácido cafeoil-O-glicosídeo (**C**₆), quercetina-3-O-ramnosídeo (**C**₇), [epi]afzelequina-[epi]catequina (**C**₈), [epi]galocatequina-[epi]catequina (**C**₉) e [epi]galocatequina-[epi]galocatequina (**C**₁₀). Apenas a catequina e a galocatequina foram identificadas anteriormente em *E. brasiliensis*. Os extratos das folhas de *Eugenia brasiliensis* apresentam atividade antioxidante, detectada pelos ensaios de redução do MTT e de inibição de lipoperoxidação usando LUVs, e ainda atividade anti-inflamatória, evidenciada pela inibição de enzimas cicloxigenases COX-1 e COX-2.

Palavras-chave: *Eugenia brasiliensis*. *Eugenia involucrata*. Flavonoides. Antocianinas. Antioxidante. Anti-inflamatório.

Abstract

This work deals with the chemical study and evaluation of biological activities of extracts from leaves and fruits of *Eugenia brasiliensis* LAM. and *Eugenia involucrata* DC, two Brazilian species used as folk medicines for treating inflammatory diseases. Nineteen anthocyanins were identified from fruits of *E. brasiliensis* and *E. involucrata* by HPLC-PDA-MS/MS: cyanidin-3-O-sophoroside (**A**₁), delphinidin-3-O-laminaribioside (**A**₂), delphinidin-3-O-galactoside (**A**₃), delphinidin-3-O-glucoside (**A**₄), cyanidin-3-O-galactoside (**A**₅), cyanidin-3-O-laminaribioside (**A**₆), cyanidin-3-O-sambibioside (**A**₇), cyanidin-3-O-caffeoyl-diglucoside (**A**₈), cyanidin-3-O-glucoside (**A**₉), cyanidin-3-O-caffeoyl-glucoside (**A**₁₀), delphinidin-3-O-coumaroyl-glucoside (**A**₁₁), pelargonidin-3-O-glucoside (**A**₁₂), cyanidin-3-O-maloyl-glucoside (**A**₁₃), cyanidin-3-O-acetoyl-glucoside (**A**₁₄), cyanidin-3-O-pentoside (**A**₁₅), and four non-identified anthocyanins (**A**₁₆, **A**₁₇, **A**₁₈ e **A**₁₉) and delphinidin (**A**₂₀). Except for **A**₃, **A**₄, **A**₅ and **A**₉, which had been previously identified in *E. brasiliensis*, the other anthocyanins are reported here for the first time in both species. The major anthocyanins, **A**₄ e **A**₉, were quantified and presented yields of 1.15 and 3.01 mg.g⁻¹ to *E. brasiliensis* (fresh fruit), respectively and 0.58 and 2.02 mg.g⁻¹ to *E. involucrata* (fresh fruit), respectively. The isolated compounds from *E. brasiliensis* leaves include one disaccharide (**1**), two flavanones: 2(S)-7,5-dihydroxy-6-methylflavanone (**2**) and 2(S)-7,5-dihydroxy-6,8-dimethylflavanone (**3**), one dihydrochalcone: 2',6'-dihydroxy-3'-methyl-4'-methoxy-dihydrochalcone (**4**) and the lignan: 7,8,7',8'-tetrahydro-8,8'-dimethyl-3,3'-dimethoxy-4,4'-dihydrodibenzocyclooctadiene (**5**). Compounds **2**, **3** and **4** are reported herein for first time in this species and compound **5** is a new neolignan. Eleven compounds were identified by FIA-MS from the tea of *E. brasiliensis* and *E. involucrata*: gallic acid (**C**₁), caffeic acid (**C**₂), quinnic acid (**C**₃), [epi]catechin (**C**₄), [epi]gallocatechin (**C**₅), caffeoyl-O-glucoside acid (**C**₆), quercetin-3-O-ramnoside (**C**₇), [epi]afzelechin-[epi]catechin (**C**₈), [epi]gallocatechin-[epi]catechin (**C**₉) e [epi]gallocatechin-[epi]gallocatechin (**C**₁₀), with only catechin and gallocatechin previously identified in *E. brasiliensis*. Crude extracts from leaves of *Eugenia brasiliensis* showed antioxidant activity, which was detected by lipoperoxidation inhibition using LUV's and MTT reduction assays, in addition to anti-inflammatory activity, evidenced by cyclooxygenase enzymes COX-1 and COX-2 inhibition assays.

Keywords: *Eugenia brasiliensis*. *Eugenia involucrata*. Flavonoids. Anthocyanins. Antioxidant. Antiinflammatory.

Lista de Figuras

Figura 1 - Dados estatísticos das substâncias químicas obtidas entre os anos de 1981 e 2006.	33
Figura 2 - Exemplos de algumas substâncias naturais e seus análogos sintéticos: (A)-vimblastina; (B)-vincristina; (C)-flavopiridol; (D)-rohitukina.	33
Figura 3 - Estruturas de algumas substâncias frequentes em espécies de <i>Eugenia</i>	39
Figura 4 – Árvores, folhas e frutos de <i>Eugenia brasiliensis</i>	40
Figura 5 - Árvores, folhas, flores e fruto (não maduro) de <i>Eugenia involucrata</i>	41
Figura 6 - Estrutura fundamental dos flavonoides.....	42
Figura 7 - Esquema simplificado da biossíntese dos flavonoides.	43
Figura 8 - Exemplos de flavonoides na forma livre e na forma glicosilada: (A) quercetina e (B) rutina.	44
Figura 9 - Estruturas das subclasses dos flavonoides.....	45
Figura 10 - Estrutura de uma di-hidrochalcona (A) e de uma chalcona (B).	46
Figura 11 - Estrutura dos flavonóis, das flavonas, di-hidroflavonol e flavanona.	47
Figura 12 - Estruturas de flavanois comuns encontrados em alimentos. (A) catequina e seus derivados e (B) galato de catequina e seus derivados.	48
Figura 13 - Exemplo de proantocianidinas. (A) Ligação tipo-B e (B) ligação tipo-A.....	49
Figura 14 - Estruturas das antocianinas.....	50
Figura 15 - Alterações estruturais em antocianinas dependendo do pH do meio.....	51
Figura 16 - Mecanismos de estabilização do radical formado durante processos oxidativos: (A) estrutura altamente conjugada; (B) quelação de metais (C) estabilização do radical formado.	54
Figura 17 - Esquema do fracionamento de FrHxAc.	72
Figura 18 - Separação cromatográfica por CLAE-DAD dos Extratos Brutos e das Frações metanólicas das espécies <i>E. brasiliensis</i> (A), <i>E. involucrata</i> (B), $\lambda =$	

520 nm. Coluna cromatográfica Phenomenex® C18-Hydro (250 x 4,6mm x d.i.; 4 µm), temperatura ambiente, fluxo de 0,75 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20µL. (condições cromatográficas veja tabela 3, pag. 65).78

Figura 19 - Expansão do perfil cromatográfico (11 minutos a 26 minutos) obtido por CLAE-DAD das frações metanólicas de (A) - *E. brasiliensis* e (B) - *E. involucrata* e espectros do UV-Vis das antocianinas. Coluna cromatográfica Phenomenex® C18-Hydro (250 x 4,6mm x d.i.; 4 µm), temperatura ambiente, fluxo de 0,75 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20µL. (condições cromatográficas veja tabela 3, pag. 65).79

Figura 20 - Espectros no UV-vis obtido para as antocianinas.....80

Figura 21 - Espectro de massas do íon precursor de *m/z* 611 (tempo de retenção: 13,0 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-soforosídeo, compatível com os dados apresentados.86

Figura 22 - Espectro de massas do íon precursor de *m/z* 611 (tempo de retenção: 15,8 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-laminaribiosídeo, compatível com os dados apresentados.86

Figura 23 - Espectro de massas do íon precursor de *m/z* 611 (tempo de retenção: 18,0 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-(cafeoil)-glicosídeo, compatível com os dados apresentados.87

Figura 24 - Espectro de massas do íon precursor de *m/z* 627 (tempo de retenção: 13,4 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da delphinidina-3-O-laminaribiosídeo, compatível com os dados apresentados.88

Figura 25 - Espectro de massas do íon precursor de *m/z* 465 (tempo de retenção: 14,7 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da delphinidina-3-O-galactosídeo, compatível com os dados apresentados.....88

Figura 26 - Espectro de massas do íon precursor de *m/z* 465 (tempo de retenção: 15,1 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da delphinidina-3-O-glicosídeo, compatível com os dados apresentados.89

Figura 27 - Espectro de massas do íon precursor de *m/z* 449 (tempo de retenção: 15,8) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-galactosídeo, compatível com os dados apresentados.....90

Figura 28 - Espectro de massas do íon precursor de *m/z* 449 (tempo de retenção: 17,1 min) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições

de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-glicosídeo, compatível com os dados apresentados.90

Figura 29 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 581 (tempo de retenção: 16,2) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da cianidina-3-O-sambubiosídeo, compatível com os dados apresentados.....91

Figura 30 - Espectro de massas do íon precursor m/z 581 (tempo de retenção: 18,6) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da delfinidina-3-O-(cumaroil)-pentosídeo, compatível com os dados apresentados.....91

Figura 31 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 773 (tempo de retenção: 16,6 min) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-(cafeoil)-diglicosídeo, compatível com os dados apresentados.93

Figura 32 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 433 (tempo de retenção: 19,1 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da pelargonidina-3-O-glicosídeo, compatível com os dados apresentados.93

Figura 33 - Espectro de massas do íon precursor m/z 565 (tempo de retenção: 19,8 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-(maloil)-O-glicosídeo, compatível com os dados apresentados.94

Figura 34 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 623 (tempo de retenção: 20,4 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-(acetoil)-sambubiosídeo, compatível com os dados apresentados.94

Figura 35 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 719 (tempo de retenção: 21,4 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e antocianina não-identificada.....95

Figura 36 - Espectro de massas o íon precursor de m/z 573 (tempo de retenção: 21,4 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e antocianina não-identificada.....95

Figura 37 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 573 (tempo de retenção: 23,0 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e antocianina não-identificada.....96

Figura 38 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 557 (tempo de retenção: 24,9 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e antocianina não-identificada.....97

Figura 39 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 419 (tempo de retenção: 20,6 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-arabinosídeo, compatível com os dados apresentados.....	97
Figura 40 - Proposta de fragmentação para as antocianinas.....	98
Figura 41 - Cálculo de pureza gerado pelo software LC Solutinos do pico de Cy-3g para o padrão (A) e para a amostra de <i>E. brasiliensis</i> (B). Coluna cromatográfica Phenomenex® C18-Hydro (250 x 4,6mm x d.i.; 4 μ m), temperatura ambiente, fluxo de 0,75 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 μ L. (condições cromatográficas veja tabela 4, pag. 67).....	100
Figura 42 - Resposta analítica (absorbância) em função das diferentes concentrações das soluções de Cy-3g.	101
Figura 43 – Antocianinas majoritárias nas amostras de <i>E. brasiliensis</i> e <i>E. involucrata</i> . Coluna cromatográfica Phenomenex® C18-Hydro (250 x 4,6mm x d.i.; 4 μ m), temperatura ambiente, fluxo de 0,75 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 20 μ L. (condições cromatográficas veja tabela 4, pag. 70).	107
Figura 44 - Propostas estruturais da substância 1: (A) - galactopiranosil-(1→6)-galactopiranosídeo e (B) - glicopiranosil-(1→6)-glucopiranosídeo.....	111
Figura 45 - Espectro de Dicroísmo Circular para a substância 2.....	112
Figura 46 - Proposta estrutural da substância 2.....	113
Figura 47 - Proposta estrutural da substância 3.....	114
Figura 48 - Proposta estrutural da substância 4.....	115
Figura 49 - Espectro de dicroísmo circular (DC) para a substância 5.	118
Figura 50 - Proposta estrutural da substância 5.....	118
Figura 51 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H da substância 1 (região entre 0 e 6,0 ppm) (500 MHz, CD ₃ OD).	120
Figura 52 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C da substância 1 (75 MHz, CD ₃ OD).....	121
Figura 53 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 2 (300 MHz, CD ₃ OD).	122
Figura 54 -Expansão do espectro de RMN de ¹³ C da substância 2 (75 MHz, CD ₃ OD).....	123
Figura 55 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 3 (500 MHz, CD ₃ OD).	124
Figura 56 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C da substância 3 (125 MHz, CDCl ₃).	125

Figura 57 - Espectro de RMN de ^1H da substância 4 (300 MHz, CD_3OD).	126
Figura 58 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4 (75 MHz, CD_3OD).	127
Figura 59 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância 5 (500 MHz, CD_3OD).....	128
Figura 60 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância 5 (500 MHz, CD_3OD).....	129
Figura 61 - Espectro de NOESY – 1D para a substância 5 : irradiação em δ_{H} 1,020 (300 MHz, CD_3OD).	130
Figura 62 - Espectro de NOESY – 1D para a substância 5 : irradiação em δ_{H} 0,795 (300 MHz, CD_3OD).	131
Figura 63 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 5 (125 MHz, CD_3OD). ...	132
Figura 64 - Espectro de RMN bidimensional (HSQC) da substância 5 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD).	133
Figura 65 - Cromatografia em camada delgada comparativa das infusões de <i>E. brasiliensis</i> (1) e <i>E. involucrata</i> (2).	134
Figura 66 - Espectros de massas de primeira ordem, em <i>full-scan</i> , da infusão da espécie <i>E. brasiliensis</i> no modo negativo. Faixa de íons 150 a 1500 Da (condições de análise pag. 62).	135
Figura 67 - Espectros de massas de primeira ordem, em <i>full-scan</i> , da infusão da espécie <i>E. involucrata</i> no modo negativo. Faixa de íons 150 a 1500 Da (condições de análise pag. 60).	136
Figura 68 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de <i>m/z</i> 169 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura do ácido gálico.	137
Figura 69 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de <i>m/z</i> 179 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura do ácido cafeico.	138
Figura 70 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor <i>m/z</i> 191 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura do ácido quínico.	138
Figura 71 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de <i>m/z</i> 341 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura do ácido cafeoil-O-glicosídeo, compatível com os dados apresentados.	139

Figura 72 - Proposta de fragmentação para o ácido gálico, ácido cafeico e ácido cafeoil-O-glicosídeo.	140
Figura 73 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 289 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura da [epi]catequina.	141
Figura 74 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 305 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura da [epi]galocatequina.	141
Figura 75 - Proposta de fragmentação para a [epi]catequina e [epi]galocatequina. (A) Mecanismo de Fragmentação retro-Diels-Alder e (B) Mecanismo de fragmentação Clivagem Heterocíclica.	142
Figura 76 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor m/z 447 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura da quercetina-3-O-ramnosídeo, compatível com os dados apresentados.	143
Figura 77 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor m/z 561 no modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura da [epi]afzelequina-[epi]catequina, compatível com os dados apresentados.	144
Figura 78 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor m/z 593 no modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura da [epi]galocatequina - [epi]catequina.	145
Figura 79 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor m/z 609 no modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura da [epi]galocatequina - [epi]galocatequina.	145
Figura 80 - Proposta de fragmentação para os dímeros presentes em <i>E. brasiliensis</i> e <i>E. involucreta</i> . (A) - Mecanismo de fragmentação retro-Diels-Alder e (B) - Mecanismo de fragmentação Quinona Metídeo.	146
Figura 81 - Esquema de conversão do MTT (amarelo) a formazan (violeta).	147
Figura 82 - Absorbância a 570nm obtida após a reação entre os extratos das folhas de <i>E. brasiliensis</i> e MTT (250 ppm).	148
Figura 83 - Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica.	149
Figura 84 - Capacidade de inibição de oxidação das vesículas unilamelares dos extratos das folhas de <i>E. Brasiliensis</i>	150
Figura 85 - Atividade de inibição das enzimas COX-1 and COX-2 pelos extratos das folhas de <i>E. brasiliensis</i>	151

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classe das substâncias isoladas e/ou identificadas em de espécies de <i>Eugenia</i>	36
Tabela 2: Massa obtida para os extratos e frações	64
Tabela 3: Condições cromatográficas para identificar as antocianinas por CLAE-DAD-EM/EM.....	65
Tabela 4: Condições cromatográficas para quantificar as antocianinas por CLAE-DAD.....	67
Tabela 5 - Rendimentos obtidos para as infusões liofilizadas das folhas de <i>E. brasiliensis</i> e <i>E. involucrata</i>	73
Tabela 6: Antocianinas identificadas em <i>Eugenia brasiliensis</i> e <i>E. involucrata</i>	85
Tabela 7: Precisão do método cromatográfico*.....	102
Tabela 8: Exatidão do método cromatográfico*.....	104
Tabela 9: Robustez com colunas diferentes.....	105
Tabela 10: Valores da robustez com marcas de solventes diferentes. Coluna cromatográfica Phenomenex® C18-Hydro (250 x 4,6mm x d.i.; 4 µm).	105
Tabela 11: Quantificação das antocianinas majoritárias presentes nas amostras de <i>E. brasiliensis</i> e <i>E. involucrata</i>	107
Tabela 12 - Substâncias identificadas nas infusões de <i>E. brasiliensis</i> e <i>E.involucrata</i>	136

Lista de equações

Equação 1 - Cálculo de absorbância após a reação com MTT em ensaio antioxidante.....	74
Equação 2 - Inibição da lipoperoxidação em ensaio fluorimétrico.....	75
Equação 3 - Inibição das enzimas COX-1 e COX-2 em ensaio anti-inflamatório.	76
Equação 4: Cálculo do limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).	101
Equação 5: Cálculo do coeficiente de variação.....	102
Equação 6: Cálculo da exatidão do método.....	103

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Ab	Absorbância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A ₅₇₀ -amostra	Absorbância medida em 570 nm para a amostra
A ₅₇₀ -controle negativo	Absorbância medida em 570 nm para o controle negativo (DMSO)
BHA	butil-hidroxianisol
BHT	butil-hidroxitolueno
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CD ₃ OD	Metanol deuterado
Cf	Concentração da amostra fortificada
CHI	Chalcona isomerase
CHS	Chalcona sintase
CHCl ₃	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos
CLAE-DAD-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos e à espectrometria de massas sequencial
cm	Centímetro
CMD	Concentração média determinada
Cnf	Concentração da amostra não fortificada
COX	Enzima ciclo-oxigenase
COX-1	Enzima ciclo-oxigenase 1
COX-2	Enzima ciclo-oxigenase 2
COX-3	Enzima ciclo-oxigenase 3
Cp	Concentração do padrão adicionado
CV	Coefficiente de variação
Cy-3g	Cianidina-3-O-glicosídeo

C18	Octadecilsilano
C4H	Cinamato-4-hidroxilase
4CL	4-cumaroil CoA ligase
DP _c e DP	Desvio padrão
Da	Dalton
DC	Dicroísmo circular
d.i.	Diâmetro interno
EA-Fo	Extrato aquoso das folhas de <i>E. brasiliensis</i>
EA1-Fo	Extrato aquoso 1 das folhas de <i>E. brasiliensis</i>
EA2-Fo	Extrato aquoso 2 das folhas de <i>E. brasiliensis</i>
EB1	Extrato bruto dos frutos de <i>E. brasiliensis</i>
EB2	Extrato bruto dos frutos de <i>E. involucrata</i>
EM1-Fo	Extrato metanólico 1 das folhas de <i>E. brasiliensis</i>
EM2-Fo	Extrato metanólico 2 das folhas de <i>E. brasiliensis</i>
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FrAc	Fração acetato das folhas de <i>E. brasiliensis</i>
FrHx	Fração hexânica das folhas de <i>E. brasiliensis</i>
FrHxAc	Frações hexânica e acetato combinadas
FrMe	Fração metanólica das folhas de <i>E. brasiliensis</i>
FrSMe-6	Fração solúvel em metanol após 6 horas de hidrólise
FeCl ₂ .4H ₂ O	Cloreto de ferro (II) tetra-hidratado
F _t	Fluorescência num dado ponto
F ₀	Fluorescência no instante inicial (t = 0)
g	grama
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HCl	Ácido clorídrico

Hz	Hertz
H ₂ O	Água
IC	Inclinação da reta para as três curvas de calibração
IEb-Fo	Infusão das folhas de <i>E. brasiliensis</i>
IEi-Fo	Infusão das folhas de <i>E. involucrata</i>
J	Constante de acoplamento
L	Litro
LD	Limite de detecção
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LQ	Limite de quantificação
LUV's	Large unilamellar vesicles
m/z	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
Me1-Fr	Fração metanólica dos frutos de <i>E. brasiliensis</i>
Me2-Fr	Fração metanólica dos frutos de <i>E. involucrata</i>
mg	Miligrama
mg.g ⁻¹	Miligrama por grama
mg.mL ⁻¹	Miligrama por mililitro
MHz	Mega-hertz
min	Minutos
mL	Mililitro
mL.min ⁻¹	Mililitro por minuto
mm	Milímetro
MTT	Sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
MPLC	<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i>
MΩ.cm	Megaohm centímetro
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
QTRAP	Quadrupolo- <i>ion trap linear</i>
pag.	Página
PAL	Fenilalanina amônia liase
PGE ₂	Prostaglandina E ₂

PGHS	Prostaglandina endoperóxido H sintase
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
rpm	Rotações por minuto
%R	Recuperação
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TBHQ	<i>terc</i> -butil-hidroquinona
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta e visível
v/v	volume/volume
°C	Grau Celsius
δ	Deslocamento químico
δ _H	Deslocamento químico de hidrogênio
δ _C	Deslocamento químico de carbono
λ máx.	Comprimento de onda de absorção máxima
μL	Microlitro
μL.min ⁻¹	Microlitro por minuto
μm	Micrômetro
[M – 162 – 162] ⁺	Íon precursor menos duas unidades glicosídicas
[M – 162] ⁺	Íon precursor menos uma unidade glicosídica
[M] ⁺	Íon precursor para antocianinas
[M-H] ⁻	Íon precursor no modo negativo

Sumário

1	Introdução	32
1.1	A importância dos Produtos Naturais	32
1.2	A Família Myrtaceae e o gênero <i>Eugenia</i>	35
1.3	A espécie <i>Eugenia brasiliensis</i> Lam.	40
1.4	A espécie <i>Eugenia involucrata</i> DC.....	41
1.5	Flavonoides	41
1.5.1	Di-hidrochalconas	46
1.5.2	Flavona, flavonol e flavanona	47
1.5.3	Flavanol e proantocianidina	48
1.5.4	Antocianinas	50
1.6	Estresse oxidativo	52
1.7	Inflamação	54
2	Objetivos	56
3	Justificativa	57
4	Materiais e métodos	58
4.1	Solventes e reagentes	58
4.2	Equipamentos	59
4.2.1	Cromatógrafo usado para a validação do método analítico	59
4.2.2	Cromatógrafos usados para a identificação das antocianinas nos extratos dos frutos	59
4.2.3	Espectrômetro de Massas	60
4.2.4	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	60
4.2.5	Dicroísmo Circular	60
4.2.6	Outros equipamentos	61
4.3	Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).....	61
4.4	Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	61

4.5	Cromatografia líquida de média pressão (MPLC – Medium Pressure Liquid Chromatography)	62
4.6	Coleta do material botânico	62
4.7	Estudo químico dos frutos de <i>E. brasiliensis</i> e <i>E. involucrata</i>	63
4.7.1	Identificação das antocianinas presentes no extrato metanólico dos frutos por Cromatografia Líquida de alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de diodos e Espectrômetro de Massas (CLAE-DAD-EM/EM).....	63
4.7.1.1	Preparação dos extratos.....	63
4.7.1.2	Preparação das amostras para análise por CLAE-DAD-EM/EM	64
4.7.1.3	Condições cromatográficas por CLAE-DAD-EM/EM.....	64
4.7.2	Validação do método para quantificar as antocianinas presentes no extrato metanólico dos frutos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	65
4.7.2.1	Preparação do padrão e das soluções de trabalho	65
4.7.2.2	Preparação das amostras para o teste de exatidão	66
4.7.2.3	Preparação das amostras para quantificar as antocianinas....	66
4.7.2.4	Condições cromatográficas para validação do método	67
4.8	Estudo fitoquímico das folhas de <i>Eugenia brasiliensis</i>	67
4.8.1	Preparação dos extratos	67
4.8.1.1	Estudo do Extrato Aquoso 1 (EA1-Fo).....	68
4.8.1.2	Estudo da fração solúvel em MeOH – 6 horas (FrSMo-6).....	69
4.8.1.3	Estudo do Extrato Aquoso 2 (EA2-Fo).....	69
4.8.1.4	Estudo do Extrato Metanólico 2 (EM2 - Fo)	70
4.8.1.5	Estudo da fração FrHxAc	70
4.9	Estudo químico das infusões de <i>Eugenia brasiliensis</i> e <i>Eugenia involucrata</i>	73
4.9.1	Preparação das infusões de <i>E. brasiliensis</i> e <i>E. involucrata</i>	73

4.9.2	Identificação dos constituintes químicos presentes nas infusões das folhas (IEb-Fo e IEi-Fo) por Espectrometria de Massas	73
4.10	Metodologia dos ensaios biológicos	74
4.10.1	Ensaio antioxidante usando MTT	74
4.10.2	Ensaio de inibição da lipoperoxidação	75
4.10.3	Ensaio de inibição das enzimas COX-1 e COX-2.....	76
5	Resultados e Discussão	77
5.1.1	Análise por CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM/EM.....	82
5.2	Validação do método analítico e quantificação das antocianinas	98
5.2.1	Seletividade.....	99
5.2.2	Linearidade, intervalo de trabalho, limite de quantificação e	99
5.2.3	Precisão.....	102
5.2.4	Exatidão	103
5.2.5	Robustez.....	104
5.2.6	Quantificação das antocianinas	106
5.3	Estudo químico das folhas de <i>Eugenia brasiliensis</i>	108
5.3.1	Dados espectrométricos das substâncias isoladas.....	108
5.3.2	Substância 1: dissacarídeo	109
5.3.3	Substâncias 2 e 3: (S)-7,5-di-hidroxi-6-metilflavanona e (S)-7,5-di-hidroxi-6,8-di-metilflavanona	111
5.3.4	Substância 4: 2',6'-di-hidroxi-3'-metil-4'-metoxi-di-hidrochalcona.....	115
5.3.5	Substância 5: (R)-7,8,7',8'-tetra-hidro-8,8'-dimetil-3,3'-dimetoxi-4,4'-di-hidroxi-dibenzociclo-octadieno	116
5.4	Material Complementar: Espectros de RMN para as substâncias isoladas.....	119
5.5	Identificação dos constituintes químicos presentes nas infusões de <i>E. brasiliensis</i> (IEb-Fo) e <i>E. involucrata</i> (IEi-Fo).....	134
5.6	Ensaio Biológicos.....	147

5.6.1	Ensaio antioxidante usando MTT	147
5.6.2	Ensaio de inibição da lipoperoxidação	149
5.6.3	Ensaio de inibição das enzimas COX-1 e COX-2	150
6	Conclusões	152
	Referências.....	155

1 Introdução

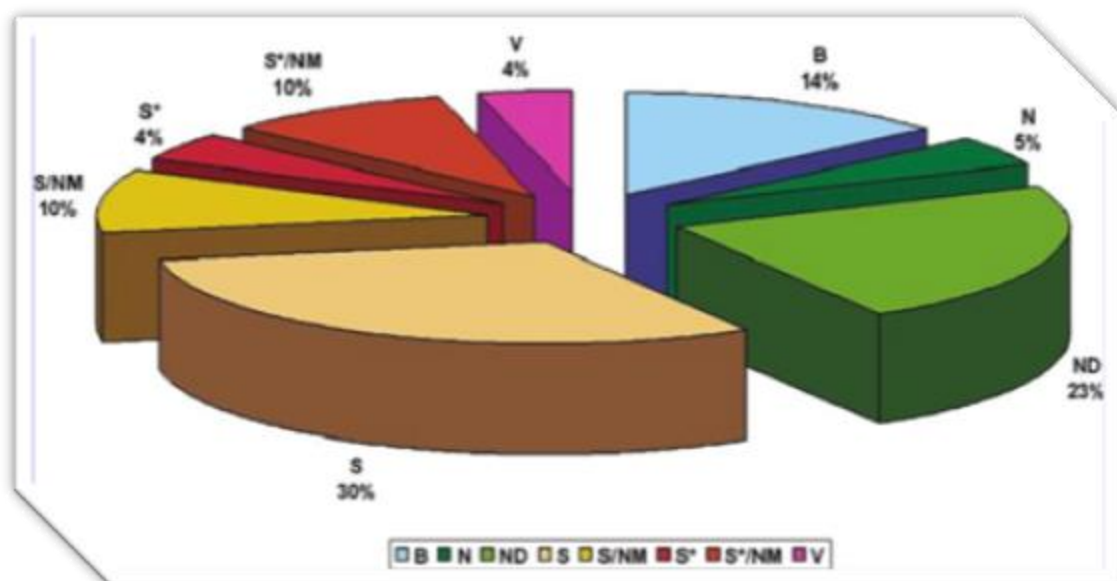
1.1 A importância dos Produtos Naturais

Ao longo da História da Humanidade, a Natureza tem sido uma fonte promissora de recursos naturais com fins medicinais para o tratamento, prevenção e cura de diversas doenças. Os egípcios possuem documentos de 1500 a. C. com mais de 700 drogas relatadas, a maioria de origem vegetal. Os documentos mais antigos são da Mesopotâmia, datam de 2600 a. C. e relatam aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas (CRAGG, GROTHAUS & NEWMAN, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 65% da população mundial faz uso das plantas medicinais como tratamentos iniciais para diversas patologias. Por esta razão, a OMS tem incentivado o estudo de plantas tradicionalmente conhecidas como medicinais, com o objetivo de avaliar cientificamente os benefícios da utilização de medicamentos fitoterápicos e de conhecer, ao mesmo tempo, os riscos de seu uso indevido. (LOGUERCIO et al., 2005; CRAGG, GROTHAUS & NEWMAN, 2009)

Pesquisas realizadas entre os anos de 1981 e 2006 mostram a importância dos produtos naturais na produção dos medicamentos utilizados pela população (Figura 1): 14% são de origem biológica (como proteínas ou peptídeos isolados de organismos ou células), 5% são provenientes apenas de produtos naturais, 23% são produtos semissintéticos derivados de produtos naturais, 10% são de origem totalmente sintética, porém o grupo farmacofórico mimetiza um produto natural, 4% são de origem totalmente sintética, mas o grupo farmacofórico é igual a de um produto natural; 10% são de origem totalmente sintética e sua estrutura mimetiza um produto natural, 30% são totalmente sintéticos e 4% são vacinas (NEWMAN & CRAGG, 2007). De acordo com os dados mostrados acima, é inegável a importância das plantas como fontes para fitomedicamentos e como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos.

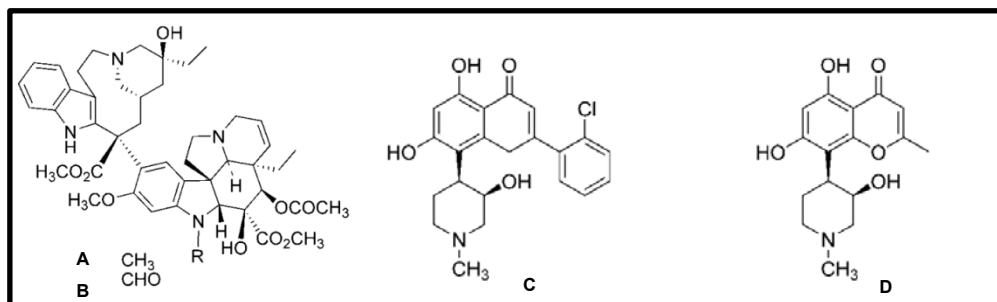
Figura 1 - Dados estatísticos das substâncias químicas obtidas entre os anos de 1981 e 2006.



Fonte: NEWMAN & CRAGG, 2007.

Exemplos marcantes incluem a vimblastina (Figura 2) e a vincristina (Figura 2), substâncias naturais isoladas de *Catharanthus roseus*, que inicialmente mostraram potencial para o tratamento de diabetes. Estudos posteriores, no entanto, evidenciaram que ambas as substâncias se mostraram promissoras para o tratamento do câncer. Outro exemplo é o flavopiridol (Figura 2), um análogo sintético da rohitukina (Figura 2), isolada de *Dysoxylum binectariferum*. A rohitukina possui atividade anti-inflamatória e imunomoduladora e o flavopiridol inibe o crescimento de linhagens de câncer de mama e pulmão (CRAGG, GROTHAUS & NEWMAN, 2009).

Figura 2 - Exemplos de algumas substâncias naturais e seus análogos sintéticos: (A)- vimblastina; (B)-vincristina; (C)-flavopiridol; (D)-rohitukina.



Fonte: CRAGG, GROTHAUS & NEWMAN, 2009.

Além de serem usadas como medicamentos muitas plantas podem ser consumidas como alimentos funcionais e/ou nutracêuticos. Alimentos funcionais são alimentos que além das funções nutricionais básicas, quando consumidos devem apresentar propriedades benéficas à saúde como, por exemplo, reduzir o risco de doenças neurodegenerativas. Estes alimentos devem ser seguros para consumo sem supervisão médica. Os nutracêuticos podem ser definidos como alimentos ou parte dos alimentos que apresentam benefícios à saúde, incluindo prevenção e/ou tratamento de doenças. Normalmente, os nutracêuticos são consumidos como nutrientes isolados, suplementos dietéticos, produtos projetados, produtos herbais e alimentos processados. As diferenças básicas entre alimentos funcionais e nutracêuticos são: os nutracêuticos são usados na prevenção e no tratamento de doenças, sendo necessário acompanhamento médico, os nutracêuticos incluem suplementos dietéticos enquanto que os alimentos funcionais devem estar na forma de um alimento comum (MORAES & COLLA, 2006). A pesquisa de bioprospecção, ou seja, a busca de substâncias que apresentam propriedades biológicas e/ou farmacológicas atrativas para o tratamento das diversas doenças, é favorecida pela disponibilidade de fontes naturais detentoras de alta quimiodiversidade. Esta condição é verificada em regiões de alta biodiversidade, já que a composição química das plantas e microrganismos, principais fontes de substâncias bioativas naturais para o desenvolvimento de agentes terapêuticos, geralmente apresenta características específicas, associadas a determinados grupos taxonômicos.

O Brasil é detentor da maior e da mais rica biodiversidade do planeta. Esta vasta diversidade biológica deve-se ao fato de que o Brasil possui várias zonas climáticas que incluem o trópico úmido no norte, o semiárido no nordeste e áreas temperadas no sul. As diferenças climáticas contribuem para as diferenças ecológicas formando zonas biogeográficas distintas chamadas biomas. No Brasil há cinco biomas principais: Floresta Amazônica (maior floresta tropical úmida); Pantanal (maior planície inundável); Cerrado (savanas e bosques); Caatinga (florestas semiáridas) e Mata Atlântica (floresta tropical pluvial) (www.mma.gov.br).

Geralmente, o estudo de uma planta começa a partir de dados obtidos pela pesquisa etnofarmacológica. Esta pesquisa fornece informações de

grande importância sobre a escolha do material vegetal, bem como contribui para a seleção das bioatividades e patologias a serem investigadas. Baseando-se nisso, as espécies escolhidas para este trabalho são provenientes de dois biomas brasileiros: a Mata Atlântica e o Cerrado e pertencem à família Myrtaceae e ao gênero *Eugenia*. As espécies de *Eugenia* possuem frutos comestíveis e são usadas na medicina tradicional como antiinflamatório, analgésico, antipirético, anti-hiperglicêmico e antidiarreico, sendo que algumas destas bioatividades estão relacionadas ao seu potencial antioxidante (MAGINA et al., 2009; FISCHER, HENRIQUES & MORENO, 2005).

1.2 A Família Myrtaceae e o gênero *Eugenia*

A família Myrtaceae é nativa de regiões tropicais, principalmente América do Sul, Sudeste da Ásia e Austrália, compreende 132 gêneros e 4620 espécies, sendo que no Brasil há 48 gêneros e mais de 900 espécies. Esta família é dividida em duas subfamílias, a Leptospermoideae, que apresenta espécies com frutos secos encontrados em sua maioria na Austrália, e a Myrtoideae que possui espécies com frutos carnosos, encontrados principalmente na América Central e América do Sul. No Brasil, as espécies nativas pertencem à subfamília Myrtoideae. Algumas espécies representativas da subfamília Myrtoideae são *Psidium guajava* (goiaba), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba), *Eugenia uvalha* (uvaia) e *Eugenia jambolana* (jambolão). As plantas desta família possuem grande importância econômica, pois podem ser usadas como alimentos, como plantas ornamentais e na medicina tradicional (REYNERTSON et al., 2008; DOMINGUES et al., 2008; CRUZ et al., 2011). O Sistema único de Saúde (SUS) divulgou uma lista com 71 espécies de plantas que podem ser usadas como fitoterápicos, entre estas espécies estão pelo menos três espécies da família Myrtaceae: *Eucalyptus globulus*, *Eugenia uniflora* e *Psidium guajava* (www.ibflorestas.org.br).

Dentre os inúmeros gêneros pertencentes a esta família, destaca-se o gênero *Eugenia* que possui cerca de 500 espécies distribuídas, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais da América, em regiões tropicais da Ásia e

algumas espécies ocorrendo na Austrália e na África. As espécies pertencentes a este gênero possuem frutos comestíveis e apresentam atividade anti-inflamatória, analgésica, antipirética, antifúngica e são usadas no tratamento de úlceras pépticas (MAGINA et al., 2009; COLE, HABER & SETZER, 2007). Trabalhos publicados na base de dados *Scinfinder* no período de 1960 a 2013 relatam alcanos, monoterpenos, sesquiterpenos, meroterpenos, triterpenos, esteroides, ácidos orgânicos, carboidratos, carotenoides, taninos, cromanos, flavonoides, flavonoides glicosilados e outros compostos fenólicos como componentes químicos isolados e/ou identificados em espécies de *Eugenia* (Tabela 1).

Tabela 1: Classe das substâncias isoladas e/ou identificadas em de espécies de *Eugenia*.

Espécies	Referências
Monoterpenos	
<i>E. pluriflora; E. umbeliflora</i>	Apel (2002b)
<i>E. uruguayensis</i>	Apel (2002b); Dellacasa (1997)
<i>E. dimorpha</i>	Apel (2002a)
<i>E. plicato costata</i>	Apel (2004d)
<i>E. brasiliensis</i>	Apel (2002c); Fischer (2005); Lima (2008)
<i>E. speciosa; E. multicosata;</i>	Apel (2002c)
<i>E. sulcata</i>	Apel (2002c); Ramos, (2010)
<i>E. austin-smithii; E. haberj; E. monteverdensis;</i>	Cole, Haber & Setzer (2007)
<i>E. cartagensis; E. zuchowskiae</i>	
<i>E. desynerica</i>	Costa (2000); Duarte, (2008); Duarte (2009)
<i>E. jambolana</i>	Craveiro (1983)
<i>E. rotundifolia</i>	Defaveri (2011); Ramos, (2010)
<i>E. singampattiana</i>	Kala (2011)
<i>E. stipitata</i>	Medeiros (2003).
<i>E. uniflora</i>	Oliveira (2006)
<i>E. rhombea</i>	Pino (2005)
<i>E. rottlerina</i>	Ral (2007)
<i>E. racemulosa</i>	Senna (2011)
<i>E. acapulensis</i>	Vila (2004)
<i>E. caryophyllata</i>	Zhang (2013)
Sesquiterpenos	
<i>E. ovalifolia</i>	Godoy (1999)
<i>E. pluriflora; E. umbeliflora; E. platysema; E. ramboj;</i>	Apel (2002b)
<i>E. uruguayensis</i>	Apel (2002b); Dellacasa (1997)
<i>E. dimorpha</i>	Apel (2002a)
<i>E. plicato costata; E. hyemalis;</i>	Apel (2004d)
<i>E. brasiliensis</i>	Apel (2004c); Fischer (2005); Lima (2008)

<i>E. speciosa</i> ; <i>E. multicosata</i>	Apel (2004c)
<i>E. sulcata</i>	Apel (2004c); Ramos (2010)
<i>E. cartagensis</i>	Cole, Haber & Setzer (2007)
<i>E. desynerica</i>	Costa (2000); Duarte (2008); Duarte (2009)
<i>E. neonitida</i> ; <i>E. rotundifolia</i>	Defaveri (2011)
<i>E. singampattiana</i>	Kala (2011)
<i>E. uniflora</i>	Amorin (2009); Costa (2009); Lago (2011), Malaman (2011); Melo (2007); Ogunwande (2005); Oliveira (2006)
<i>E. rhombea</i>	Pino (2005)
<i>E. rottlerina</i>	Raj (2007)
<i>E. racemulosa</i>	Senna (2011)
<i>E. acapulcensis</i>	Vila (2004)
<i>E. caryophyllata</i>	Iwamuro (1983); Stefanello (2008); Zheng (1992); Zhang (2013)
<i>E. bacopari</i> ; <i>E. burkatiana</i> ; <i>E. catharinensis</i> ; <i>E. joensonii</i>	Apel (2002a)
<i>E. florida</i> ; <i>E. mansoi</i>	Apel (2004b)
<i>E. beaurepareana</i> ; <i>E. pyriformis</i>	Apel (2004a)
<i>E. cuprea</i> ; <i>E. xiriricana</i> ; <i>E. pitanga</i> ; <i>E. arenosa</i> ;	Apel (2004c)
<i>E. mattossii</i>	Apel (2005)
<i>E. puniceifolia</i>	Maia (1997); Ramos (2010)
<i>E. stipitata</i>	Medeiros (2003)
<i>E. langsdorffii</i>	Moraes (2012)
<i>E. acutata</i> ; <i>E. candolleana</i> ; <i>E. copacabanensis</i>	Nakamura (2010)
<i>E. argentia</i>	Raj (2011)
<i>E. riedeliana</i>	Souza (2008)
<i>E. protenta</i>	Zoghbi (2011)
Meroterpenos	
<i>E. multiflora</i>	Faqueti (2013)
Triterpenos e esteroides	
<i>E. crebrinervis</i>	Bannon, Eade & Simes (1976)
<i>E. gustavioides</i>	Bannon, Eade & Simes (1976); Yazaki (1977)
<i>E. brasiliensis</i>	Frighetto (2005a), Magina (2012)
<i>E. florida</i>	Frighetto (2005b); Junges (1999)
<i>E. sandwicensis</i>	Gu (2001)
<i>E. jambolana</i>	Dametto (2010); Rajasekaran (1988), Gupta (1974)
<i>E. singampattiana</i>	Kala (2011)
<i>E. jambos</i>	Kuiate (2007)
<i>E. moraviana</i>	Lunardi (2001)
<i>E. uniflora</i>	Maranan (2011)
<i>E. grandis</i>	Manoharan (2003)
Flavonoides	
<i>E. uniflora</i>	Celli, Pereira-Netto & Beta (2011); Chang & Yang (2012)

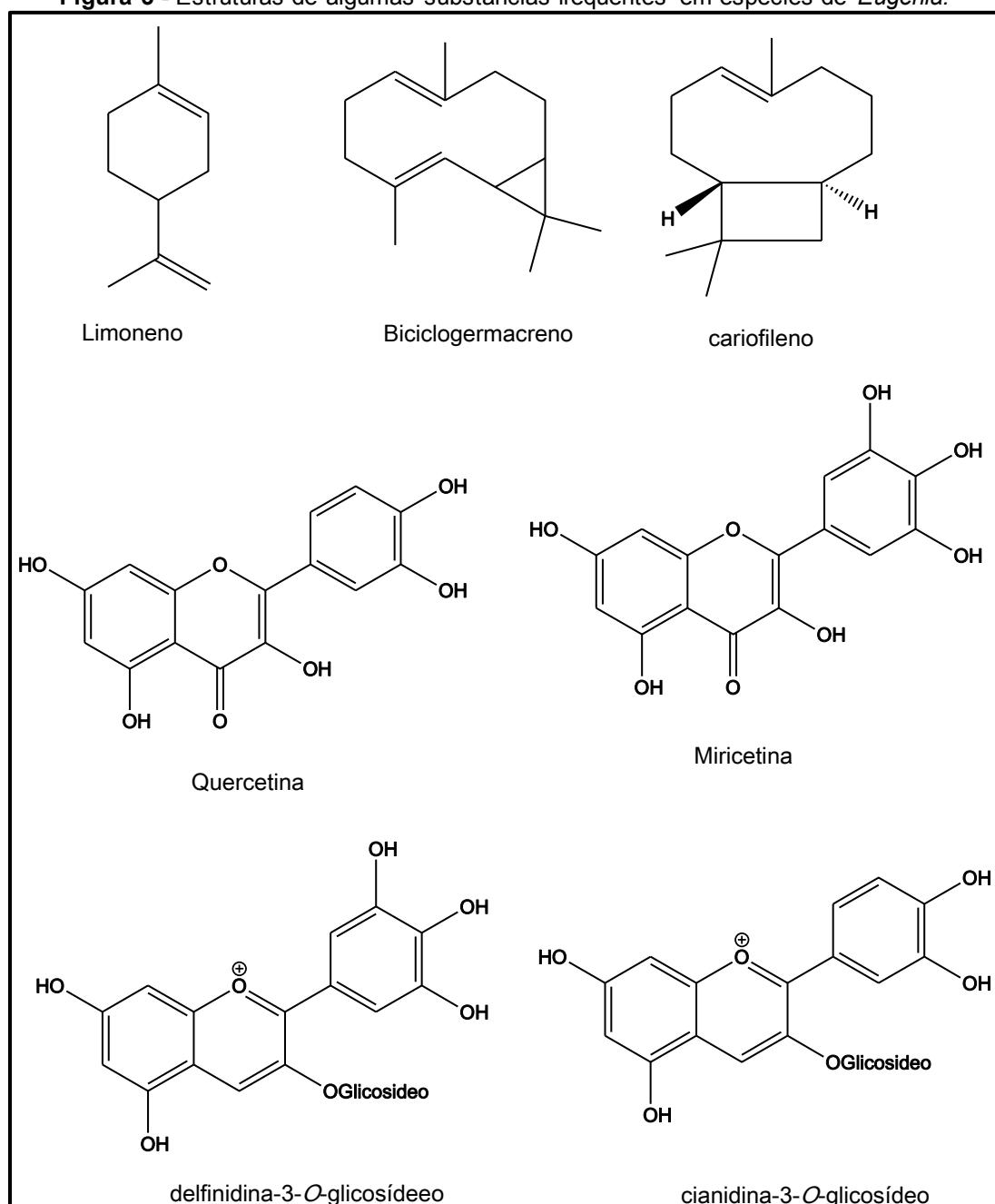
<i>E. jambolana</i>	Celli, Pereira-Netto & Beta (2011); Brito (2007); Faria (2011); Jadeja (2012); Li (2009); Veigas (2007); Mahmoud (2001); Nuengchammong (2009); Reynertson (2008)
<i>E. edulis</i>	Hussein (2003)
<i>E. brasiliensis</i>	Magina (2012); Pietrovick (2008); Reynertson (2008), Flores (2012)
<i>E. stipitata</i>	Neri-Numa (2013)
<i>E. aggregata; E. luschanathiana; E. reinwartidiana; E. jambos</i>	Reynertson (2008)
Carboidratos	
<i>E. jambolana</i>	Bandyopadhyay (2012); Gupta & Sharma (1974)
Ácidos orgânicos e compostos fenólicos	
<i>E. jambolana</i>	Bandyopadhyay (2012); Faria (2011); Gupta (1974); Mahmoud (2001); Nuengchammong (2009); Timbola (2002); Reynertson (2008)
<i>E. dysenterica</i>	Duarte (2009)
<i>E. crebunervis</i>	Bannon (1976)
<i>E. edulis</i>	Hussein (2003)
<i>E. singampattiana</i>	Kala (2011)
<i>E. brasiliensis; E. luschanathiana; E. jambos</i>	Reynertson (2008)
<i>E. gustavioides</i>	lazaki (1997)
Carotenoides	
<i>E. dysenterica</i>	Cardoso (2011)
<i>E. jambolana</i>	Faria (2011)
Hidrocarbonetos	
<i>E. jambolana</i>	Gupta & Sharma (1974)
Taninos	
<i>E. caryophyllata</i>	Kim (2001)
<i>E. uniflora</i>	Lee (1997); Lee (2000)
<i>E. grandis</i>	Nonaka (1987)
<i>E. jambolana</i>	Zhang & Lin (2009); Omar (2012)
<i>E. jambos</i>	Yang (2000)
Cromanos	
<i>E. caryophyllata</i>	Kim (2001)

Fonte: Elaborada pela autora.

Os artigos encontrados na literatura relatam que a maioria dos estudos realizados é sobre os óleos essenciais das espécies *Eugenia* e que, geralmente, os componentes majoritários destes óleos são sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados como germacreno, biciclogermacreno, β -cariofileno, β -elemeno, β -selineno, espatulenol, globulol, *epi*-globulol, α -cadinol

e δ -cadinol. Os monoterpênos mais comuns identificados foram α -pineno, β -pineno, limoneno e 1,8-cineol. Os triterpênos isolados e/ou identificados foram friedelina, β -sitosterol, ácido betulínico, β -amirina e α -amirina. Quanto aos compostos fenólicos, os mais comuns foram o ácido elágico e ácido gálico. Os flavonoides encontrados na maioria das espécies foram antocianinas mono e diglicosiladas (cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, malvidina), além de quercetina, rutina, miricetina e seus derivados glicosilados (Figura 3).

Figura 3 - Estruturas de algumas substâncias frequentes em espécies de *Eugenia*.



Fonte: CRUZ et al., 2011; REYNERTSON et al., 2008.

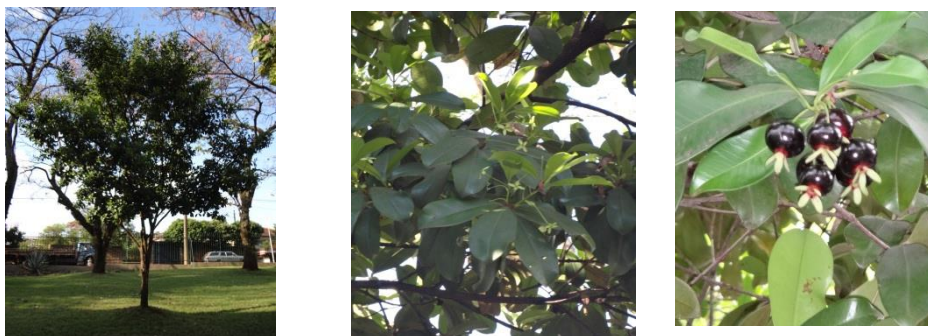
1.3 A espécie *Eugenia brasiliensis* Lam.

Eugenia brasiliensis (Lamb.) é uma árvore brasileira de até 15m de altura (Figura 4), encontrada mais especificamente em florestas pluviais da Mata Atlântica desde a Bahia até Santa Catarina, e é conhecida popularmente como grumixama ou cereja brasileira. Tradicionalmente, os frutos, as folhas e a casca das árvores são usados no tratamento para reumatismo, distúrbios gastrointestinais e como diuréticos (FISCHER, KATO & KONISHI, 2003).

As folhas de *E. brasiliensis* (Figura 4) contém ácido ursólico, α -amirina, β -amirina, betulina, ácido 29-hidroxi-oleanólico, quercetina, catequina e galocatequina e possuem atividade anti-inflamatória. O óleo essencial das folhas é rico em sesquiterpenos como o α - e β -selineno, o β -cariofileno, o óxido de cariofileno e o α -cadinol e possui atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* (MAGINA et al., 2009; MAGINA, et al., 2012; FISCHER, KATO & KONISHI, 2003; FRIGUETTO et al., 2005; PIETROVSKI et al., 2008).

Os frutos de *E. brasiliensis* (Figura 4) são comestíveis e apresentam coloração variável, sendo reconhecida três variedades: a vermelha, a roxa e a amarela ou branca (MORENO et al., 2007). As variedades com frutos roxos e vermelhos são ricas em antocianinas, principalmente, cianidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-galactosídeo, cianidina-3-O-arabnosídeo, delphinidina-3-O-pentosídeo, cianidina-3-O-xilosídeo, malvidina-3-O-glicosídeo, delphinidina-3-O-glicosídeo, cianidina e delphinidina, além de ácido elágico e flavonoides como miricetina, quercetina, quercitrina e rutina. As antocianinas, os taninos elágicos e os flavonoides são os responsáveis pela forte atividade antioxidante do extrato destes frutos (REYNERSTON et al., 2008, FLORES et al., 2012).

Figura 4 – Árvores, folhas e frutos de *Eugenia brasiliensis*.



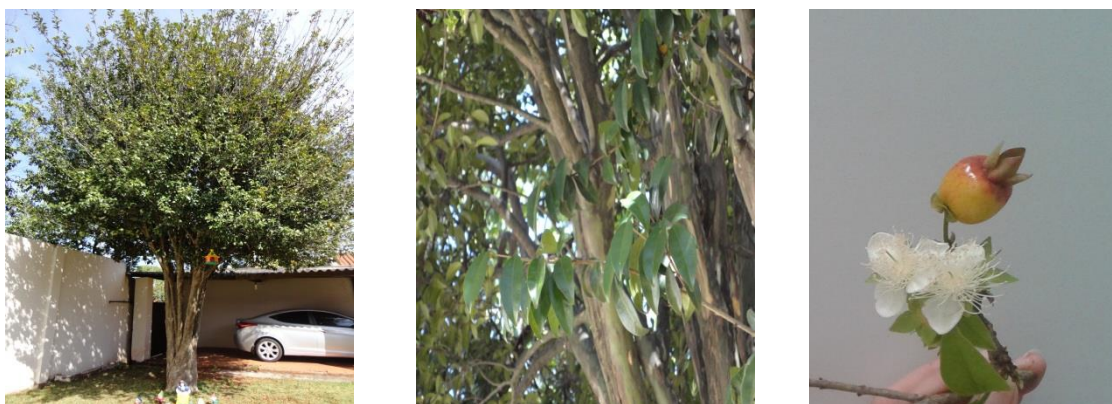
Fonte: Arquivo pessoal

1.4 A espécie *Eugenia involucrata* DC.

Eugenia involucrata é uma espécie de origem brasileira, mais especificamente da região de Mata Atlântica, conhecida popularmente como cerejeira-do-mato ou cereja-do-rio-grande. As árvores desta espécie (Figura 5) podem atingir até 15 m de altura e possui potencial madeireiro, frutícola, paisagístico, ambiental e medicinal. Os frutos (Figura 5) são comestíveis e usados na fabricação de sucos e geleias e as flores (Figura 5) são melíferas (GOLLE & REINIGER, 2003; CARVALHO, 2008).

Na literatura, não há muitos trabalhos sobre a composição química de *E. involucrata*. O extrato das folhas é rico em compostos fenólicos e flavonoides e possuem atividade anti-inflamatória e antialérgica. O óleo essencial das folhas possui como constituinte químico majoritário viridifloreno, enquanto o óleo essencial dos frutos tem o β -cariofileno majoritariamente (MARIN et al., 2008; HENRIQUES et al., 2008; LIMA et al., 2005).

Figura 5 - Árvores, folhas, flores e fruto (não maduro) de *Eugenia involucrata*.



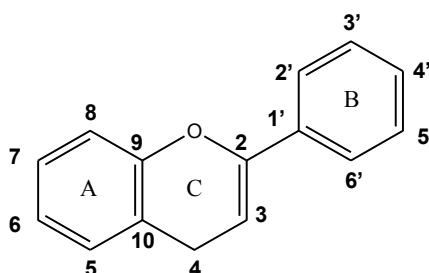
Fonte: Arquivo pessoal

1.5 Flavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários com ampla distribuição na natureza sendo que mais de 9000 flavonoides já foram documentados nos últimos anos. Nas plantas servem como atrativos para pássaros e insetos responsáveis pela polinização, protegem contra o excesso de radiação luminosa e raios ultravioleta, herbívoros e infecções fungo-patogênicas.

A estrutura fundamental dos flavonoides (Figura 6) é constituída por 15 átomos de carbonos e apresentam um anel aromático (anel A) ligado a um anel pirano (anel C) que está ligado por uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático (anel B) (ZUANASSI, 2002).

Figura 6 - Estrutura fundamental dos flavonoides.

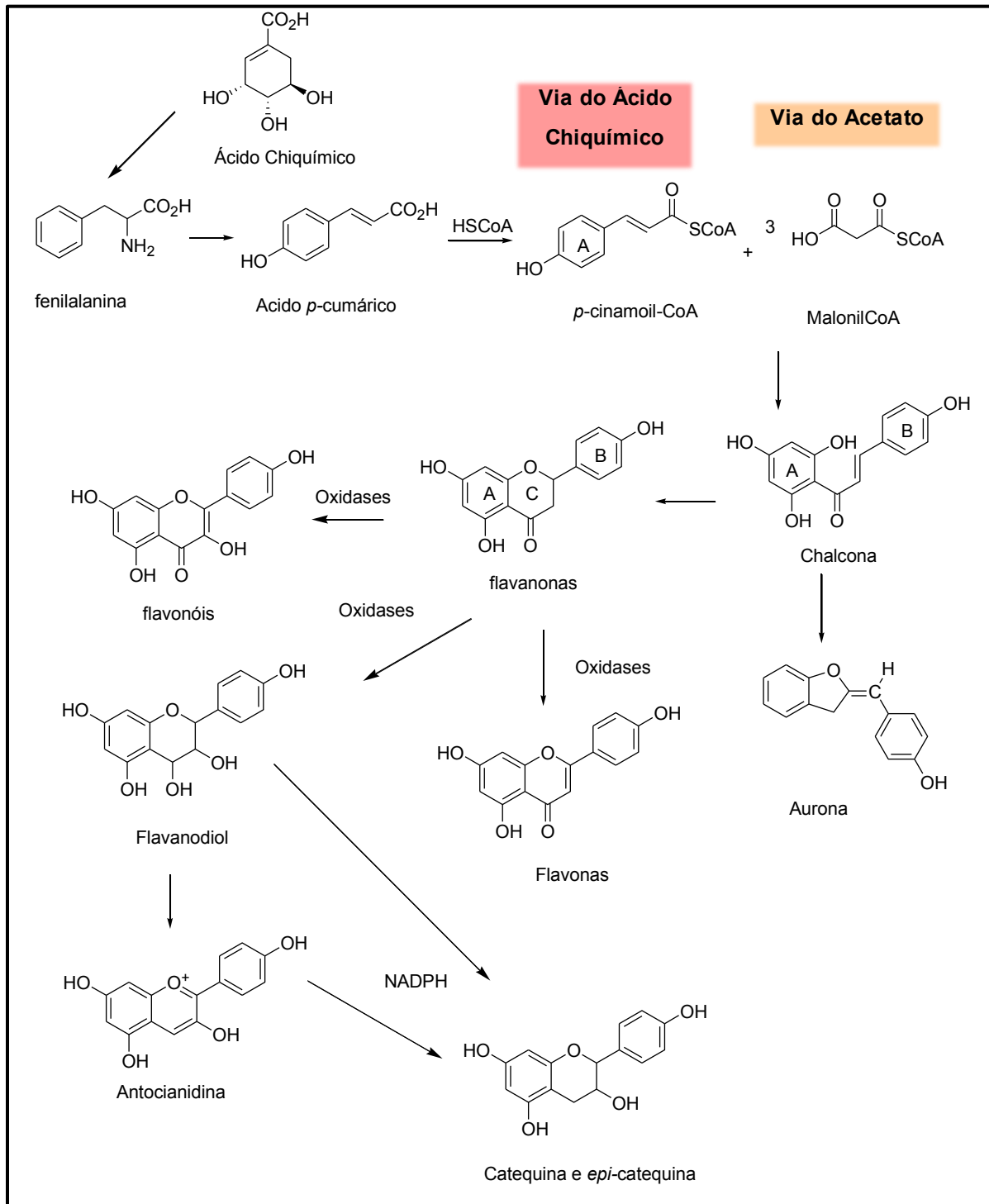


Fonte: Dewick, 2009.

É importante salientar que os anéis A, B e C são nomeados de acordo com via biossintética e formam a estrutura fundamental $C_6-C_3-C_6$ característica dos flavonoides. Os anéis B e C que formam a estrutura C_6-C_3 são provenientes da via do ácido chiquímico e o anel A, proveniente da via do acetato, constitui o outro anel aromático (C_6). Portanto, biossíntese dos flavonoides é mista (DEWICK, 2009).

O ácido chiquímico é convertido a fenilalanina através de diversas reações enzimáticas. A enzima PAL (fenilalanina amônia liase) converte a fenilalanina ao ácido cinâmico e este é convertido ao ácido *p*-cumárico pela enzima C4H (cinamato 4-hidroxilase). A enzima 4CL (4-cumaroil CoA ligase) catalisa a formação do *p*-cinamoil CoA, a partir do ácido *p*-cumárico. A biossíntese dos flavonoides começa com a condensação entre uma molécula do *p*-cinamoil CoA com três moléculas do ácido malônico proveniente da Via do Acetato. Essa condensação é catalisada pela enzima CHS (chalcona sintase) e forma uma chalcona. Na etapa seguinte ocorre o fechamento do anel C catalisado pela enzima CHI (chalcona isomerase) formando uma flananona que será o precursor para muitos subtipos de flavonoides (Figura 7) (DEWICK, 2009; WANG, CHEN & YU, 2011).

Figura 7 - Esquema simplificado da biossíntese dos flavonoides.

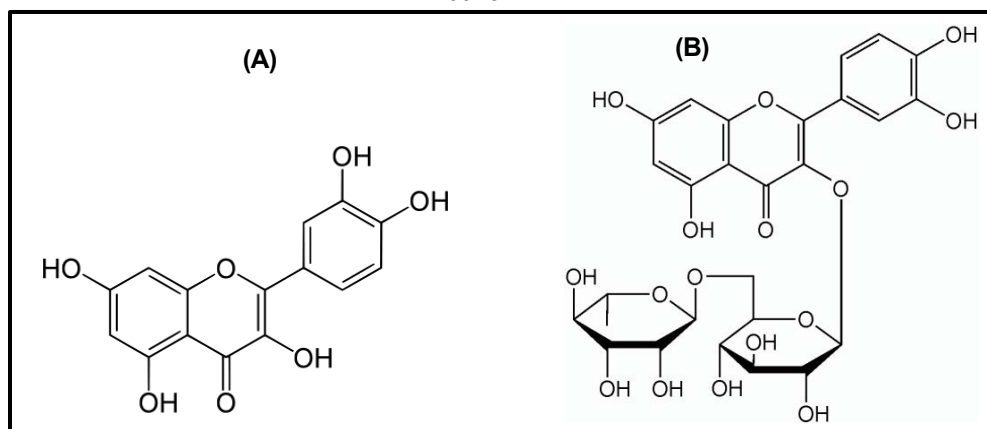


Fonte: Figura adaptada de DEWICK, 2009 e ONO et al., 2006.

Na natureza, os flavonoides podem ocorrer na forma livre, ou seja, não conjugado com nenhum heterosídeo (aglicona), como por exemplo, a

quercetina ou então, na forma conjugada, ligado a uma unidade glicosídica, como a rutina (Figura 8).

Figura 8 - Exemplos de flavonoides na forma livre e na forma glicosilada: **(A)** quercetina e **(B)** rutina.



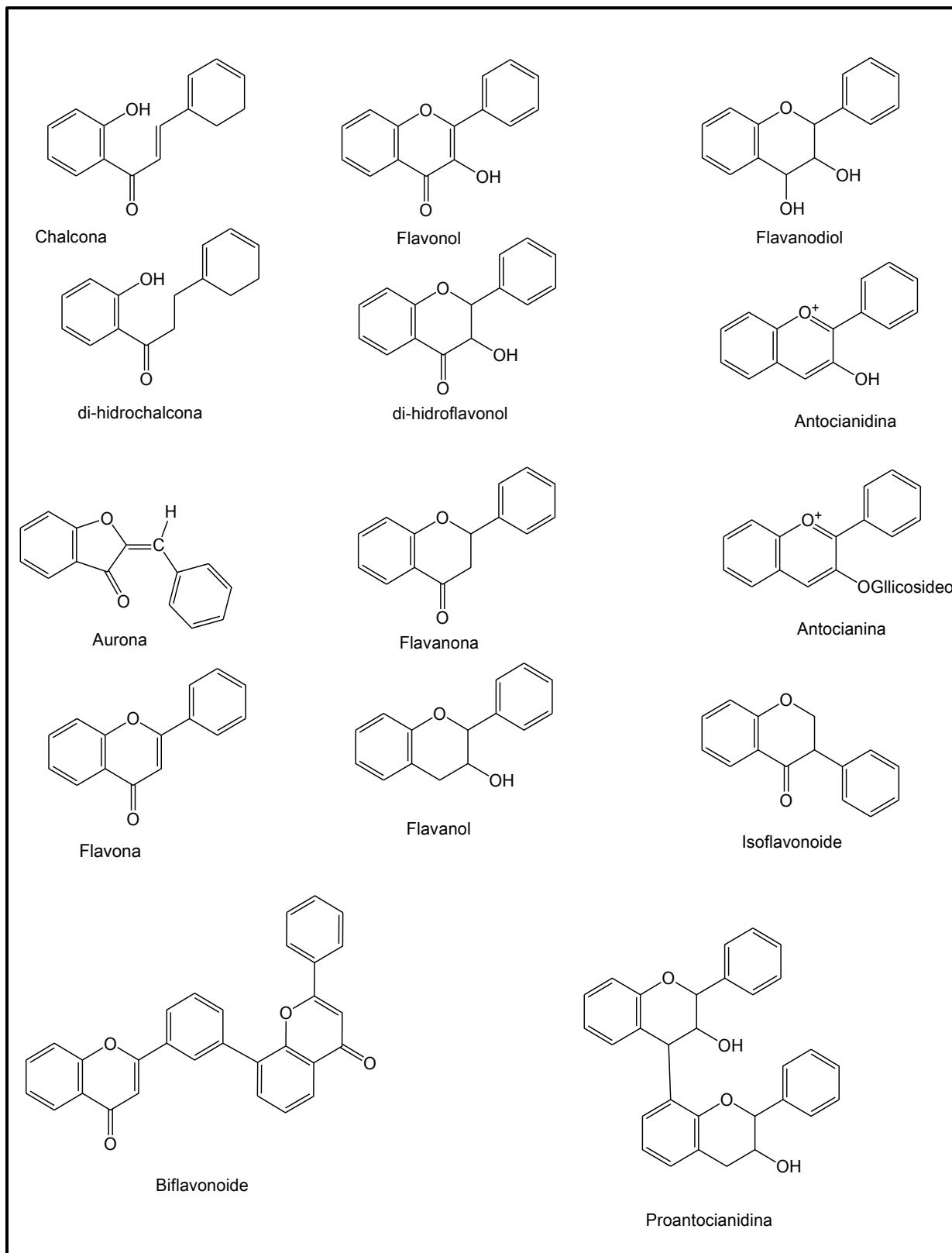
Fonte: DEWICK, 2009.

Quando eles estão na forma conjugada, eles podem ser O-heterosídeos ou C-heterosídeos. Os flavonoides C-heterosídeos são diferenciados dos O-heterosídeos pela ligação entre o carbono anomérico do açúcar e um dos carbonos na posição 6 e/ou posição 8 do anel A (BRAVO, 1998).

Os flavonoides são, normalmente, encontrados em vegetais, frutas, cereais e vinho, e podem ser usados como constituintes de suplementos alimentares, pois possuem potencial antioxidante, anti-inflamatório, de redução do LDL-colesterol, aumento do teor de insulina, redução de mediadores de expressão associados à aterosclerose, além de potencial anti-hipertensivo, anticâncer, atividade neuroprotetora contra neurotoxinas, e de promoção do aumento da memória, do aprendizado e das funções cognitivas e proteção contra doenças cardiovasculares (XU et al., 2013; KRUGER et al., 2014; LILAMAND et al., 2014).

Eles podem ser divididos em 13 subclasses: chalcona, di-hidrochalcona, aurona, flavona, flavonol, di-hidroflavonol, flavanona, flavanol, flavanodiol (leucoantocianidina), antocianidina, antocianina, isoflavonoide, biflavonoide e proantocianidina (tanino condensado) (Figura 9).

Figura 9 - Estruturas das subclasses dos flavonoides.



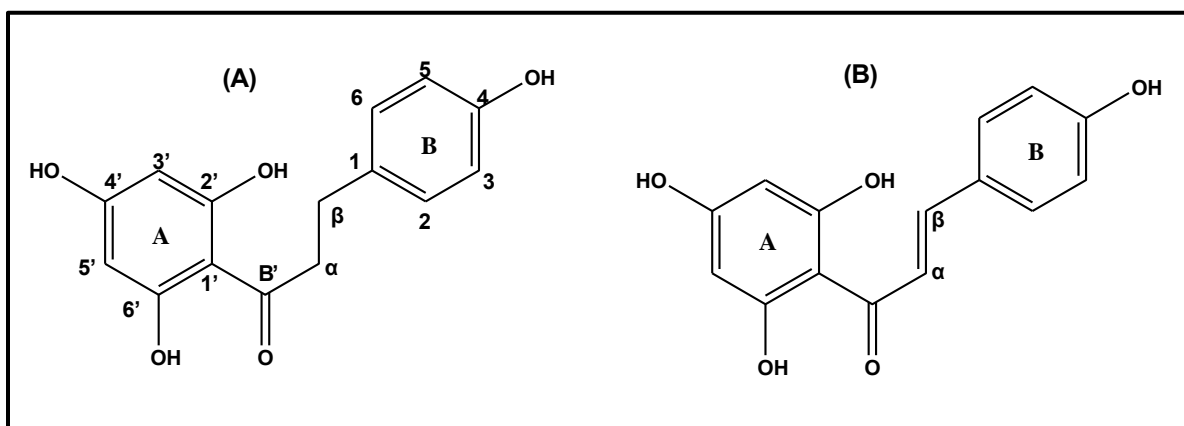
Fonte: DEWICK, 2009 e BRAVO, 1998.

Neste trabalho, serão destacadas as di-hidrochalconas, os flavonóis, as flavonas, as flavanonas, os flavanóis, as proantocianidinas e as antocianinas em função de sua predominância nas espécies estudadas.

1.5.1 Di-hidrochalconas

As di-hidrochalconas são uma subclasse dos flavonoides e possuem estrutura fundamental semelhante a das chalconas, sendo a única diferença associada à ligação simples entre os carbonos α e β das di-hidrochalconas (Figura 10A), enquanto que as chalconas possuem uma ligação dupla nesta mesma posição (Figura 10B) (DEWICK, 2009).

Figura 10 - Estrutura de uma di-hidrochalcona (A) e de uma chalcona (B).



Fonte: DEWICK, 2009.

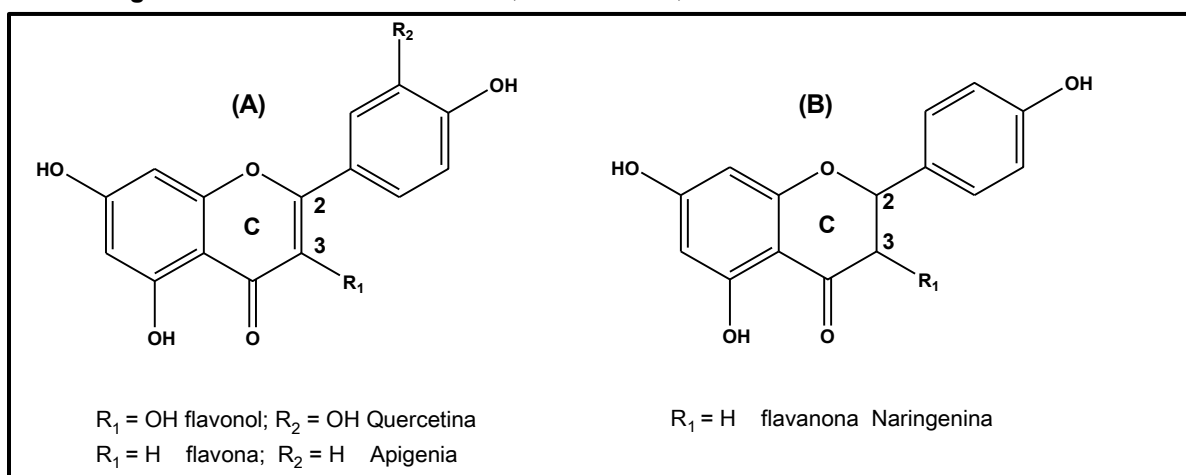
Existem relatos de aproximadamente 200 di-hidrochalconas provenientes de mais de 30 famílias de plantas como Ericaceae, Lauraceae, Piperaceae e Rosaceae, dentre outras. Inúmeros trabalhos descrevem os benefícios destas substâncias à saúde humana, principalmente devido a sua propriedade antioxidante. Estudos recentes mostram que a di-hidrochalcona diglicosilada Talassodendrona possui atividade de inibição do vírus da influenza A (GAUCHER et al, 2013; MOHAMMED et al., 2014).

1.5.2 Flavona, flavonol e flavanona

Os flavonóis e as flavonas possuem estruturas muito parecidas, sendo a principal diferença associada à presença de hidroxila na posição 3 do anel C de flavonóis enquanto que as flavonas não possuem esta hidroxila (Figura 11A). A quercetina e a apigenina estão entre os exemplos mais conhecidos de flavonol e flavona, respectivamente (Figura 11A) (TSANOVA-SAVOVA & RIBAROVA, 2013). A quercetina, em particular, é o flavonoide mais frequentemente relatado em plantas (DEWICK, 2009).

A flavanona, diferentemente dos flavonóis e das flavonas, possui uma ligação simples entre os carbonos 2 e 3 do anel C e devido a isso, possui um centro assimétrico no carbono 2 (Figura 11B).

Figura 11 - Estrutura dos flavonóis, das flavonas, di-hidroflavonol e flavanona.



Fonte: DEWICK, 2009.

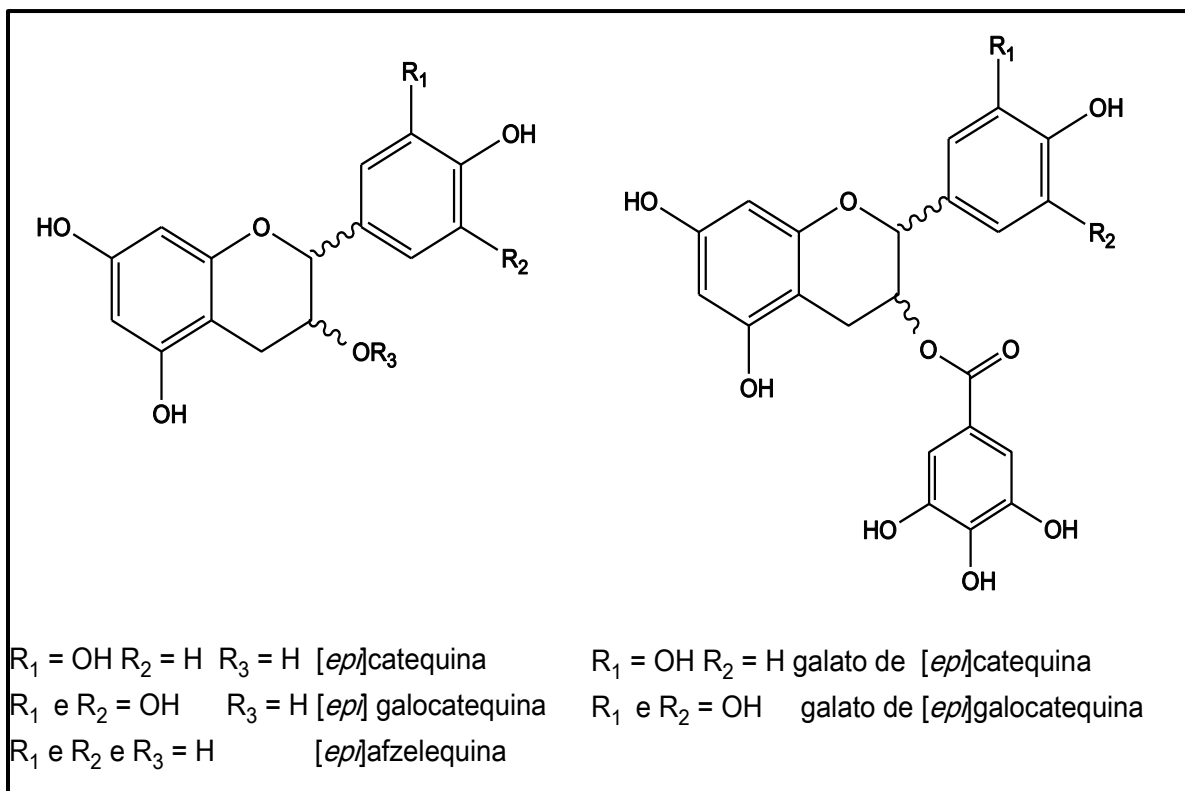
É importante salientar que as flavanonas são intermediárias biossintéticas da maioria dos flavonoides como pode ser observado na figura 7, e que a presença do centro assimétrico no carbono 2 do anel C dá origem a misturas de estereoisômeros e a bioatividades particulares pelo envolvimento de interações com receptores específicos em sistemas biológicos (DEWICK, 2009; ZUANASSI, 2002).

1.5.3 Flavanol e proantocianidina

Flavanol ou flavan-3-ol é a maior subclasse dos flavonoides e incluem as catequinas e seus derivados monoméricos e poliméricos (proantocianidinas). Acredita-se que esta classe de flavonoides seja a mais consumida em alimentos nos Estados Unidos chegando num consumo diário de 83,5% em relação ao consumo diário total de flavonoides (NEILSON & FERRUZZI, 2010).

A catequina e seus derivados são os representantes mais comuns dessa classe de substâncias. A [epi]catequina possui um grupo catecol no anel B, a [epi]galocatequina possui uma hidroxila adicional na posição 5' do anel B e a [epi]afzelequina possui apenas uma hidroxila na posição 4' do anel B (Figura 12A). Outros derivados da catequina são os galatos de [epi]catequina e [epi]galocatequina que possuem um grupo galoil ligado ao oxigênio na posição do anel C (Figura 12B) (NEILSON & FERRUZZI, 2010, DEWICK, 2009).

Figura 12 - Estruturas de flavanóis comuns encontrados em alimentos. (A) catequina e seus derivados e (B) galato de catequina e seus derivados.

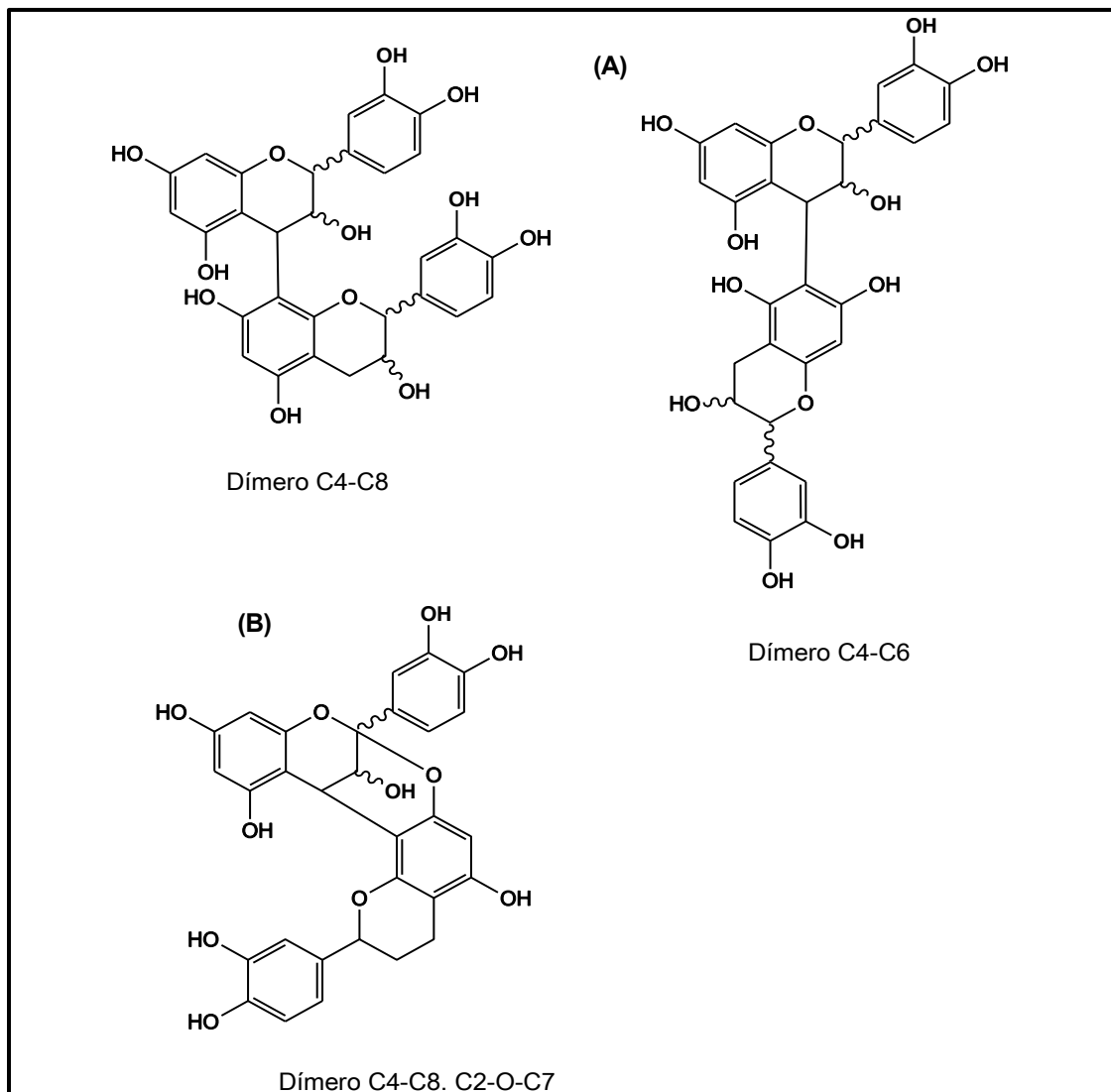


Fonte: NEILSON & FERRUZZI, 2010, DEWICK, 2009.

As proantocianidinas conhecidas como taninos condensados são polímeros formados pela ligação entre os flavanois. Esta ligação ocorre, principalmente, entre os carbonos C4-C8 ou C4-C6 e são chamadas de ligação tipo-B (Figura 13A). Quando ocorrem duas ligações interflavanoídicas, uma entre os carbonos C4-C8 e outra entre C2-O-C7, recebe o nome de ligação tipo-A (Figura 13B) (NEILSON & FERRUZZI, 2010 e GU et al., 2003).

Os flavanois mais comuns que formam as proantocianidinas são [epi]catequina, [epi]afzelequina e [epi]galocatequina. As proantocianidinas formadas apenas por [epi]catequinas são chamadas de procianidinas e as proantocinidinas formadas por [epi]afzelequina ou [epi]galocatequina são chamadas de propelargonidina e prodelfinidina, respectivamente (GU et al., 2003).

Figura 13 - Exemplo de proantocianidinas. (A) Ligação tipo-B e (B) ligação tipo-A.



Fonte: NEILSON & FERRUZZI, 2010.

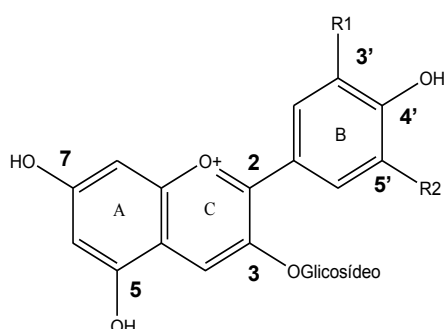
Os flavanóis e as proantocianidinas são normalmente encontrados em frutas e vegetais, como maçã, uva, cacau e também em muitos chás, como por exemplo, o chá verde e representam importante fonte de antioxidantes na dieta humana, sendo associados a muitos benefícios à saúde, em especial, a proteção contra câncer e doenças neurodegenerativas (NEILSON & FERRUZZI, 2010; CALANI, et al., 2012).

1.5.4 Antocianinas

As antocianinas (do grego anthos=flores e kyanos=azul) constituem o maior grupo de flavonóides responsáveis pelas cores rosa, vermelho, violeta e azul encontradas em muitas flores, frutos e folhas. Algumas vezes, estão presentes em raízes, tubérculos e caules. (ANDERSEN & MARKHAM, 2006)

As antocianinas apresentam como estrutura fundamental o cátion flavílico e pelo menos uma unidade glicosídica, que está, geralmente, ligada na posição 3 do anel C. Basicamente, a diferença estrutural entre antocianinas ocorre no padrão de oxigenação' do anel B, em especial nas posições 3' e 5' (Figura 14) (PASCUAL-TERESA & SANCHEZ-BALLESTA, 2008; CASTANEDA-OVANDO *et al*, 2009).

Figura 14 - Estruturas das antocianinas.

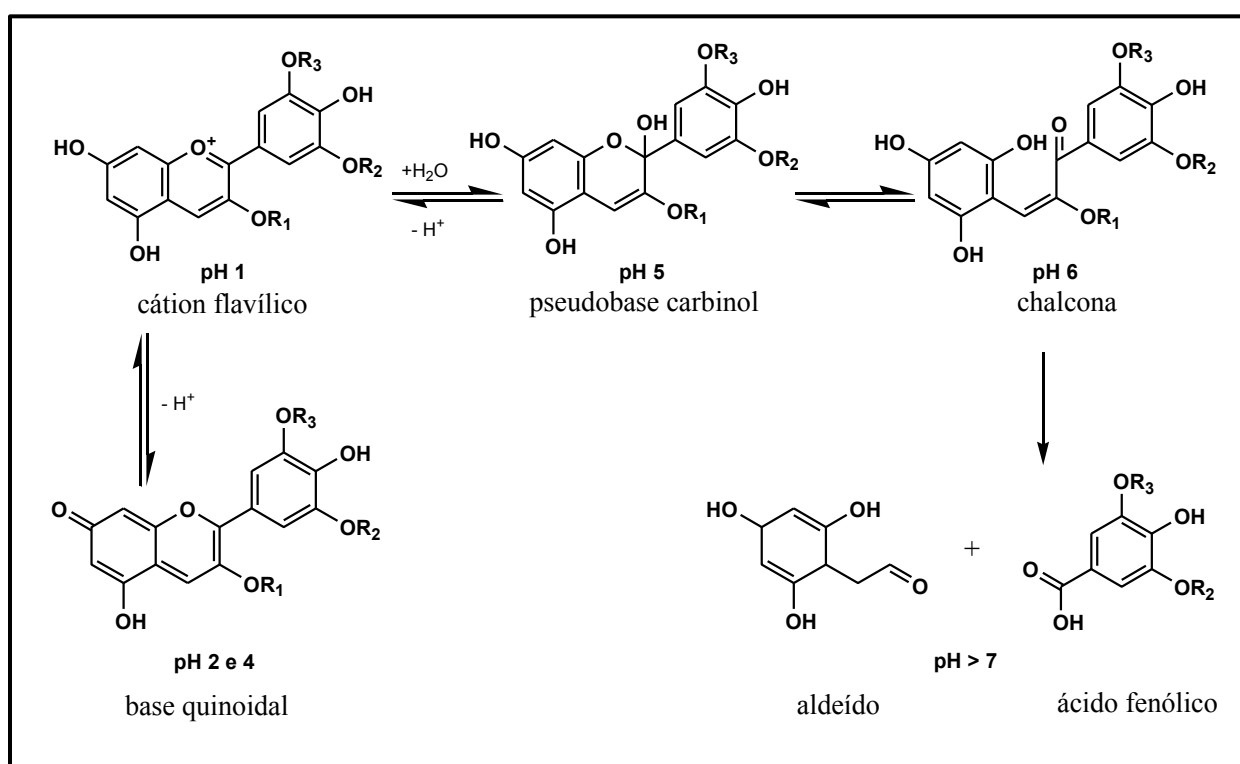


R1	R2	Antocianidina
H	H	Pelagomidina
OH	H	Cianidina
OH	OH	Delfinidina
OH	OCH ₃	Petunidina
OCH ₃	H	Peonidina
OCH ₃	OCH ₃	Malvidina

Fonte: ANDERSEN & MARKHAM, 2006.

O anel C das antocianinas possui um oxigênio carregado positivamente e por isso elas são substâncias instáveis e muito suscetíveis a degradação. A sua estabilidade é afetada por fatores como pH (Figura 15), temperatura de armazenamento, concentração, luz, oxigênio, solventes, presença de enzimas, flavonóides, proteínas e íons metálicos. (CASTANEDA-OVANDO *et al*, 2009; ANDERSEN & MARKHAM, 2006)

Figura 15 - Alterações estruturais em antocianinas dependendo do pH do meio.



Fonte: CASTANEDA-OVANDO *et al*, 2009.

As antocianinas em geral não são tóxicas e nem mutagênicas, ao contrário, possuem propriedades terapêuticas. O consumo regular de antocianinas e de outros flavonóides em frutas, vegetais, geléias e vinhos é associado com a provável redução dos riscos de doença cardiovascular, diabetes, inibição viral, atividade antimicrobiana, doenças no fígado, devido a sua propriedade hepatoprotetora, problemas gástricos, problemas relacionados à visão, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, inflamações, doenças crônicas como o câncer, devido ao seu efeito antimutagênico, e atividade quimiopreventiva. Várias destas propriedades são associadas a sua

forte atividade antioxidante. Por esta razão, estas substâncias são consideradas importantes alimentos funcionais, pois são capazes de reduzir, através da alimentação, o risco de desenvolver várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo. (REYNERTSON *et al*, 2008; PASCUAL -TERESA & SANCHEZ - BALLESTA, 2008; ZHANG *et al*, 2008; MESKIN *et al*, 2004; ANDERSEN & MARKHAM, 2006; MULAGABAL *et al*, 2009).

1.6 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas (espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio) e agentes antioxidantes. Este desequilíbrio pode causar sérios danos a biomoléculas e células importantes tendo um impacto em todo o organismo. Um organismo submetido a este desequilíbrio por um longo tempo apresenta danos na estrutura e nas funções celulares. Por isso, o estresse oxidativo é o responsável por diversas doenças crônicas, incluindo as inflamações, o câncer, as doenças cardiovasculares, diabetes, aterosclerose, obesidade e as doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (TANG & HALLIWELL, 2010; HALLIWELL, 2011).

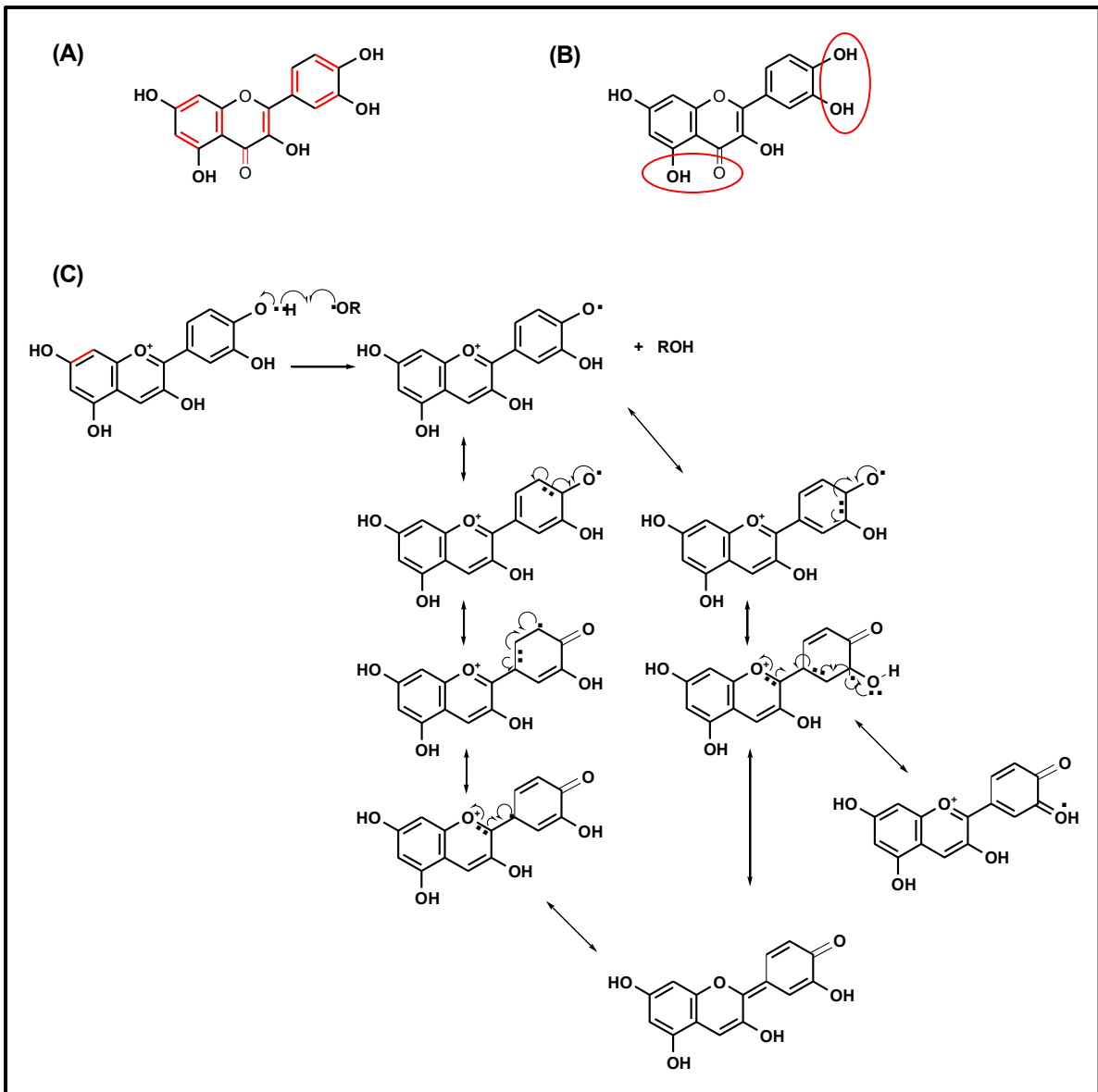
As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produtos do metabolismo celular normal e desempenham um papel vital na estimulação das vias de sinalização em plantas e animais em resposta às mudanças intra ou extracelulares e condições ambientais. As ERO são produzidas durante a respiração celular: durante as reações metabólicas endógenas, as células aeróbias produzem ERO, tais como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^*). A fonte mais importante de espécies reativas nos seres humanos é o sistema imune. Sob condições de hipóxia, as mitocôndrias também produzem óxido nítrico (NO), que pode gerar as espécies reativas de nitrogênio (ERN). Porém, estas espécies reativas também podem ser geradas por fontes exógenas como poluição, radiações ultravioleta, cigarro, medicamentos e alimentos industrializados (REUTER *et al.*, 2010; HALLIWELL, 2011).

As substâncias antioxidantes são capazes de inibir, prevenir ou retardar o processo oxidativo, mesmo que esteja presente em baixas concentrações. Portanto, para proteger o organismo contra os efeitos nocivos destes agentes pró-oxidantes existe um sistema complexo de antioxidantes enzimáticos como, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase, catalase, além de um sistema de antioxidantes não-enzimáticos micromoleculares como a glutatona (GSH) e as vitaminas E, C e D, que devem ser adquiridos através da dieta. Os conservantes de alimentos aprovados pelo *Food and Drugs Administration* (FDA), *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ), butil-hidroxitolueno (BHT) e butil-hidroxianisol (BHA) também são excelentes exemplos de antioxidantes usados comercialmente (REUTER et al., 2010, LIU & NAIR, 2010; ZHANG et al., 2008; HALLWELL, 2011; GUTTERIDGE & HALLWELL, 2011).

Quando as espécies reativas são geradas no organismo vivo, diversos agentes antioxidantes são ativados. No entanto, é importante salientar que a ação de cada agente antioxidante depende de quais ERO foram geradas, de como e de onde elas foram geradas (HALLWELL, 1995).

Os flavonoides constituem também importante sistema de proteção contra o desequilíbrio redox em sistemas biológicos por três mecanismos: podem agir como filtro da radiação ultravioleta, devido ao seu sistema altamente conjugado (Figura 16 A); podem quelar metais devido a presença do grupo catecol no anel B ou então, devido a presença de uma carbonila na posição 4 do anel C e de uma hidroxila na posição 5 do anel A (Figura 16 B); e por último podem estabilizar o radical livre formado no organismo pela doação de um hidrogênio radicalar. Com a doação deste hidrogênio radicalar, outro radical é formado. No entanto, este radical é fenoxílico e, portanto, estabilizado pelas diversas estruturas de ressonância (Figura 16C).

Figura 16 - Mecanismos de estabilização do radical formado durante processos oxidativos: (A) estrutura altamente conjugada; (B) quelação de metais (C) estabilização do radical formado.



Fonte: CASTANEDA-OVANDO *et al*, 2009.

1.7 Inflamação

A inflamação pode ser dividida em aguda e crônica. A inflamação aguda é o estágio inicial de inflamação (imunidade inata), a qual é mediada através da ativação do sistema imune. Este tipo de inflamação persiste apenas por um curto tempo e é, normalmente, um sinal de alerta para o paciente. A inflamação crônica dura um longo período de tempo e é a segunda fase da inflamação.

Esta fase pode expor o paciente a diversas doenças crônicas (REUTER et al., 2010).

O processo inflamatório pode ser causado por diversas fontes como infecções virais e microbianas, exposição a alérgenos, radiação, substâncias químicas ou tóxicas, além de doenças autoimunes e crônicas, obesidade, consumo de álcool, uso de tabaco e uma dieta altamente calórica. O maior problema da persistência do processo inflamatório é o aumento do risco do desenvolvimento do câncer.

O processo inflamatório se inicia quando ocorre uma lesão na membrana celular. A membrana celular é constituída basicamente por fosfolípideos e, quando lesionada, a enzima fosfolipase A₂ presente nos leucócitos e nas plaquetas é ativada por citocinas pró-inflamatórias. Esta enzima leva à degradação dos fosfolípideos da membrana resultando na produção de ácido araquidônico. Este, ao ser metabolizado, forma os leucotrienos pela ação da enzima lipo-oxigenase, e as prostaglandinas, as prostaciclina e os tromboxanos pela ação das enzimas ciclo-oxigenases (COX).

Existem três isoformas principais da COX: a COX-1, a COX-2 e a COX-3. A COX-1 é uma isoenzima constitutiva e está presente na maioria dos tecidos, como nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino e rins. Esta enzima está associada à produção de prostaglandinas que resultam em diversos efeitos fisiológicos, como proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal. Por outro lado, a COX-2 é considerada uma enzima indutiva e está presente em apenas alguns tecidos. Esta enzima é induzida durante os processos inflamatórios e tumorais, portanto ela catalisa a formação de prostaglandinas como a prostaglandina E₂ (PGE₂) que possui ação pirogênica e no aumento da sensibilidade à dor. Além disso, a PGE₂ está relacionada com o crescimento de células tumorais pela inibição da apoptose dessas células. A COX-3 está presente no sistema nervoso central (CASÓS et al., 2011; ZHANG, MILLS & NAIR, 2002; HILARIO, TERRERI & LEN, 2006).

2 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi produzir dados que contribuíssem para o uso sustentável da biodiversidade brasileira. Para tanto, os seguintes procedimentos foram necessários:

- (A) Identificação das antocianinas presentes nos frutos de *E. brasiliensis* e *E. involucrata*;
- (B) Validação de metodologia analítica para quantificar as antocianinas presentes nos extratos dos frutos;
- (C) Isolamento das substâncias majoritárias das folhas de *E. brasiliensis*;
- (D) Identificação dos compostos químicos presentes nos chás das folhas das espécies de *Eugenia* em estudo;
- (E) Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante dos extratos das folhas de *E. brasiliensis*, empregando os bioensaios de atividade inibitória da peroxidação lipídica, atividade antioxidante pela redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) e atividade anti-inflamatória pela inibição de ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2).

3 Justificativa

Os metabólitos secundários das plantas têm despertado grande interesse e têm sido alvos de inúmeras pesquisas, principalmente no que se refere à suas atividades biológicas. No entanto, estes metabólitos formam matrizes complexas de difícil separação, e devido a isso, surge a necessidade de pesquisas voltadas para desenvolvimento de análises que permitam a identificação desses compostos nestas matrizes

As espécies *E. brasiliensis* Lam. e *E. involucrata* DC. foram escolhidas para este trabalho por serem espécies nativas brasileiras, comestíveis e usadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças inflamatórias como o reumatismo e a artrite e por não haver muitos trabalhos publicados na literatura sobre os constituintes químicos e a atividade biológica destas espécies.

Desta forma, torna-se grande o interesse em determinar os constituintes químicos (metabólitos secundários) presentes em *E. brasiliensis* e *E. involucrata* e estabelecer as principais semelhanças e diferenças na composição química entre estas espécies e compará-las com outras espécies do gênero *Eugenia*.

4 Materiais e métodos

4.1 Solventes e reagentes

Os solventes orgânicos, metanol, hexano acetato de etila e acetonitrila, utilizados nas etapas de extração, purificação e análises cromatográficas foram de grau cromatográfico da marca JT Baker[®] (Center Valley, PA, USA). A água utilizada foi destilada e deionizada (resistividade mínima de 18,2 MΩ.cm, a 25°C). O ácido trifluoracético foi de grau cromatográfico da marca JT Baker[®] e os ácidos clorídrico, acético e fórmico, de grau analítico da marca Synth[®].

Os solventes deuterados foram comprados da *Cambridge Isotope Laboratories* (Andover, MA, USA).

O padrão de antocianina, cianidina 3-O-glicosídeo, usado neste trabalho, foi doado pelo laboratório do Dr. Muraleedharan G. Nair (Michigan State University, East Lansing, MI, USA). A enzima COX-1 foi preparada a partir de vesículas seminais de carneiro compradas da *Oxford Biomedical Research, Inc.* (Oxford, MI, USA) e a enzima COX-2 foi obtida a partir uma preparação de lisado celular de inseto, diluído com tampão Tris (pH 7) até concentração final aproximada de 1,5 mg de proteína/mL. O ácido araquidônico foi comprado da *Oxford Biomedical Research, Inc.* (Oxford, MI, USA). A Aspirina foi obtida da *Sigma-Aldrich Chemical Company* (Saint Louis, MO, USA) e o Celebrex foi doado pelo Dr. Subash Gupta (*Sparrow Hospital* – Lansing, MI, USA).

O lipídeo, 1-estearoil-2-linoleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina, foi comprado da *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, AL, USA) e a sonda fluorescente, ácido 3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]-fenilpropionico, foi comprada da *Molecular Probes* (Eugene, OR, USA). Os controles positivos usados no ensaio de lipoperoxidação: butil-hidroxianisol (BHA), *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) e butil-hidroxitolueno (BHT) e FeCl₂.4H₂O usado para iniciar as reações radiculares foram comprados da *Sigma-Aldrich Chemical Company* (Saint Louis, MO, USA).

O sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-tetrazolium (MTT) usado no ensaio antioxidante foi comprado da *Sigma-Aldrich Chemical Company* (Saint Louis, MO, USA).

4.2 Equipamentos

4.2.1 Cromatógrafo usado para a validação do método analítico

O cromatógrafo usado na validação e quantificação das antocianinas foi um cromatógrafo líquido da *Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão)* com módulo de comunicação CBM-20A, duas bombas LC-10 AD, injetor automático SIL-10^a e detector de arranjo de diodos SPD-M10A_{vp}. A aquisição e o tratamento de dados foram realizados com o *software LC Solution*.

4.2.2 Cromatógrafos usados para a identificação das antocianinas nos extratos dos frutos

O cromatógrafo usado na etapa inicial de identificação das antocianinas foi o cromatógrafo líquido da *Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão)* com módulo de comunicação CBM-20A, duas bombas LC-10 AD, injetor automático SIL-10^a e detector de arranjo de diodos SPD-M10A_{vp}. A aquisição e o tratamento de dados foram realizados com o *software LC Solution*.

A segunda etapa de identificação das antocianinas foi realizada através de um cromatógrafo *Agilent 1200 Series (Santa Clara, CA, USA)* com injetor automático (*Agilent autosampler 1200 Series*), detector com arranjo de diodos (*Agilent 1260*), bomba quaternária (*Agilent 1200*) e forno para coluna (*Agilent 1200*) acoplado ao Espectrômetro de Massas 3200 QTRAP (quadrupolo – *Ion Trap linear*), AB SCIEX (Darmstadt, DE), com ionização por *electrospray (ESI - Turbo Ion Spray)* e modo de ionização positivo. Os parâmetros da fonte de ionização no modo positivo foram: *Ion Spray*: 5500 V; *curtain gas (gás de dessolvatação)*: 12 psi; temperatura: 550°C; gás ON; DP (*Declustering Potential*) 20,0 V; EP (*Entrance Potential*) 10,0 V e CEP (*Cell entrance potential*) 22,0 V. A faixa das massas de aquisição foi no intervalo de 200 a 1000 Da.

4.2.3 Espectrômetro de Massas

Para a identificação das substâncias presentes nas infusões das espécies *E. brasiliensis* e *E. involucrata* foi usado um Espectrômetro de Massas 3200 QTRAP (quadropolo – *Ion Trap linear*), AB SCIex (Darmstadt, DE), com ionização por *electrospray* (ESI - *Turbo Ion Spray*) e modo de ionização positivo. Os parâmetros da fonte de ionização no modo positivo foram: *Ion Spray*: 5500 V; *curtain gas*: 12 psi; temperatura: 550°C; gás 1: 45 psi; gás 2: 45 psi; *interface heater*: ON; DP (*Declustering Potential*) 20,0 V; EP (*Entrance Potential*) 10,0 V e CEP (*Cell entrance potential*) 22,0 V. A faixa das massas de aquisição foi no intervalo de 150 a 1500 Da.

4.2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN das substâncias isoladas foram obtidos utilizando o Espectrômetro Varian Inova 300[®] operando a 300 MHz na frequência do hidrogênio e em 75 MHz na frequência do carbono, Espectrômetro Varian VRX 500[®] operando a 500 MHz na frequência do hidrogênio e em 125 MHz na frequência do carbono e Espectrômetro Bruker Ascend III 600[®] operando a 600 MHz na frequência do hidrogênio e em 175 MHz na frequência do carbono. Os valores dos deslocamentos químicos podem ser apresentados por δ ou ppm e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz). Os espectrômetros usados são da marca *Varian Medical Systems, Inc* (Palo Alto, CA, USA) e da marca *Bruker Corporation* (Germany).

4.2.5 Dicroísmo Circular

As medidas de dicroísmo circular foram realizadas no Espectropolarímetro de dicroísmo circular Jasco J-815 (Jasco, Inc. Easton, MD, USA).

4.2.6 Outros equipamentos

- O rotavapor modelo R-220 usado na concentração dos extratos, frações e substâncias puras foi obtido da *Büchi* (Flawil, Switzerland, Germany) com bomba de vácuo modelo *Vacuum Controller V-805* da Büchi e circulador de água.
- Balança Analítica *Mettler Toledo* (Columbus, OH, USA) e balança analítica modelo MARK-210A (Bel Engineering, IT) com sensibilidade de 0,1mg.
- Centrífuga modelo RC5C, marca *Sorvall Instruments* (Hoffman Estates, IL, USA)
- O fluorímetro usado no ensaio de lipoperoxidação foi *Turner Model 450 Digital Fluorometer* da *Barnstead Thermolyne* (Debuque, IA, USA).
- A câmara de oxigênio modelo 5300 usada no ensaio de inibição das enzimas COX-1 e COX-2 foi obtida da *Yellow Spring Instrument, Inc.* (Yellow Springs, OH, USA).
- No ensaio antioxidante, a absorbância foi medida usando um leitor de placas *Microplate Autoreader EL311* da *Biotek Instruments* (Winooski, VT, USA).

4.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

A cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foi realizada utilizando placas de sílica gel (250 µm de diâmetro). As placas utilizadas são da marca *Analtech, Inc.* (Newark, DE, USA). A revelação das placas foi feita, inicialmente, por irradiação Ultravioleta - UV (254 e 366 nm) e quando necessário, foi utilizada uma solução de 10% de ácido sulfúrico concentrado em metanol para revelar os compostos que não absorvem na região do ultravioleta.

4.4 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

A cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi realizada para purificar as substâncias presentes nas folhas de *E. brasiliensis*. Foram

utilizadas placas de sílica gel (20 X 20 cm, 250 µm e 500 µm de diâmetro). As placas utilizadas neste trabalho foram compradas da *Analtech, Inc.* (Newark, DE, USA). A revelação das placas foi feita, inicialmente, por irradiação Ultravioleta - UV (254 e 366 nm) e quando necessário, foi utilizada uma solução de 10% de ácido sulfúrico concentrado em metanol para revelar os compostos que não absorvem na região do ultravioleta.

4.5 Cromatografia líquida de média pressão (MPLC – Medium Pressure Liquid Chromatography)

As separações cromatográficas em coluna de média pressão foram realizadas para fracionar os extratos das folhas de *E. brasiliensis*. Foram utilizados dois sistemas: no primeiro sistema foi utilizado sílica gel (35–70 µm) da marca *Merck* (Gibbstown, NJ, USA) como fase estacionária e duas colunas de vidro com dimensões de 350 x 40 mm e de 300 x 22 mm e fluxo de 3,0 mL.min⁻¹ e 1,7 mL.min⁻¹, respectivamente; e no segundo foi utilizado uma coluna RediSep® Rf fase reversa C-18 (86 g, 40–63 µm) da marca *Isco, Inc.* (Lincoln, NE, USA) e um cromatógrafo CombiFlash® Rf da marca *Isco, Inc.* (Lincoln, NE, USA) equipado com duas bombas (5-200 ml/min. 0-200 psi), auto injetor e detector de ultravioleta (200–360 nm).

4.6 Coleta do material botânico

Os frutos e as folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. foram coletados no jardim do SENAI (Araraquara, SP, Brasil - 21°48'22,7" Lat. S e 48°11'31,9" Log. W). Os frutos foram coletados em novembro/2013 no período da manhã e as folhas foram coletadas julho/2012 no período da manhã. A exsicata foi preparada, enviada ao IBt (Instituto Botânico - SP) identificada e arquivada no Herbário "Maria Eneida Kauffmann" com o número SP 454124.

Os frutos e as folhas de *Eugenia involucrata* DC. foram coletados no jardim do Instituto de Química (UNESP, Araraquara, SP, Brasil - 21°48'22,0" Lat. S e 48°11'33,2" Log. W). Os frutos foram coletados em outubro/2013 no período da manhã e as folhas foram coletadas novembro/2013 no período da

manhã. A exsicata foi preparada, enviada ao IBt (Instituto Botânico - SP) identificada e arquivada no Herbário “Maria Eneida Kauffmann” com o número SP 454125.

4.7 Estudo químico dos frutos de *E. brasiliensis* e *E. involucrata*

4.7.1 Identificação das antocianinas presentes no extrato metanólico dos frutos por Cromatografia Líquida de alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de diodos e Espectrômetro de Massas (CLAE-DAD-EM/EM)

4.7.1.1 Preparação dos extratos

Os frutos congelados (100 gramas) foram picados e a extração das antocianinas foi realizada com 100 mL de metanol (0,1% HCl, 3 x) por 15 minutos sob constante agitação, a 21° C e ao abrigo da luz. Ao término de cada extração, a mistura foi filtrada e, ao resíduo vegetal foi adicionado mais 100 mL de metanol (0,1% HCl). O resíduo foi descartado e o filtrado foi submetido à secagem à pressão reduzida para a eliminação de metanol e, em seguida liofilizado para a obtenção dos extratos brutos dos frutos (EB1-Fr, 1,95 g - *E. brasiliensis*; EB2-Fr, 5,13 g - *E. involucrata*) (Tabela 2).

O extrato bruto (1,0 g) foi solubilizado em 50 mL de água e submetido ao fracionamento em resina XAD-16 para a eliminação, principalmente, de açúcares. As antocianinas ficaram adsorvidas na resina, que foi então lavada com água (2 x 1L). A fração aquosa, por conter majoritariamente os açúcares, foi descartada. As antocianinas adsorvidas foram eluídas com metanol (2 x 750 mL) e ao eluato foram adicionadas algumas gotas de HCl para evitar a degradação das antocianinas. A fração metanólica foi submetida à secagem à pressão reduzida para a eliminação de metanol e, em seguida liofilizada para a obtenção de frações metanólicas (Me1-Fr, 0,32g - *E. brasiliensis*; Me2-Fr, 0,26g - *E. involucrata*).

O procedimento de extração e de fracionamento das antocianinas mencionado acima seguiu o protocolo usado no *Bioactive Natural Products and Phytochemicals (BNPP) Laboratory* com algumas modificações (MULABAGAL et al., 2010; MULABAGAL et al, 2009b).

As frações Me1-Fr e Me2-Fr, ricas em antocianinas, foram analisadas por CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM/EM para a identificação das antocianinas.

Tabela 2: Massa obtida para os extratos e frações

Extrato e Frações	Massa obtida (g)
EB1*-Fr	1,95
EB2*-Fr	5,13
Me1**-Fr	0,32
Me2**-Fr	0,26

*Extrato bruto.

** Frações metanólicas.

4.7.1.2 Preparação das amostras para análise por CLAE-DAD-EM/EM

As amostras analisadas por CLAE-DAD-EM/EM foram submetidas à extração em fase sólida usando cartuchos de fase reversa C18 (Strata, 500 mg/ 3 mL; 55µm, 70A). Uma alíquota de cada amostra (10 mg) foi solubilizada em 1,5 mL de uma solução de H₂O:MeOH (1:1, v/v) acidificada com 0,1% de ácido fórmico, eluída em cartucho C18 e filtrada usando membrana de Nylon (0,22 µm; 13 mm de diâmetro).

4.7.1.3 Condições cromatográficas por CLAE-DAD-EM/EM

A identificação das antocianinas por CLAE-DAD-EM/EM foi realizada utilizando uma coluna cromatográfica *Phenomenex*[®] C18-Hydro (250 x 4,6mm; d.i.; 4 µm), temperatura ambiente, fluxo de 0,75 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. O sistema de solventes utilizado foi H₂O (1% ácido fórmico) como

fase aquosa (A) e acetonitrila (1% Ácido fórmico) como fase orgânica (B) e modo de eluição em gradiente (Tabela 3).

Tabela 3: Condições cromatográficas para identificar as antocianinas por CLAE-DAD-EM/EM.

Tempo (min)	Fluxo (mL.min⁻¹)	%H₂O	%ACN
Inicial	0,75	90	10
26	0,75	70	30
30	0,75	90	10
40	0,75	90	10

4.7.2 Validação do método para quantificar as antocianinas presentes no extrato metanólico dos frutos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

4.7.2.1 Preparação do padrão e das soluções de trabalho

A solução estoque (1 mg.g⁻¹) foi preparada a partir do padrão de cianidina-3-O-glicosídeo (Cy-3g) e diluída em H₂O (0,1% de HCl) em balão volumétrico apropriado. Alíquotas de 5, 10, 25, 50, 100, 250 µl foram retiradas da solução estoque e diluídas a 1,0 mL com H₂O (0,1% de HCl) para preparar as seis soluções de trabalho de concentrações 5, 10, 25, 50, 100, 250 µg.g⁻¹. Cada solução de trabalho foi preparada em triplicata, filtrada em membrana (0,22 µm) e injetada em triplicata no cromatógrafo (MULAGABAL et al., 2009b).

As áreas foram obtidas pela integração dos picos obtidos a 520 nm e submetidas ao Teste de Huber para rejeição dos anômalos em relação à mediana dos valores obtidos (k=2) (VALENTE, AUGUSTO & RIEDO, 2003).

As curvas analíticas foram construídas a partir dos valores não rejeitados.

4.7.2.2 Preparação das amostras para o teste de exatidão

A RE899 da ANVISA de 2003 (ANVISA) recomenda que a exatidão do método seja avaliada, a partir de, no mínimo, nove determinações que estejam no intervalo de linearidade do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada.

Seguindo essas recomendações, as amostras para os testes de exatidão foram preparadas de acordo com o procedimento a seguir: nove porções contendo três frutos verdes cada (aproximadamente 4,0 g) foram pesadas, os frutos picados e três porções enriquecidas com 50 µL, três porções com 250 µL e três porções com 1000 µL da solução padrão de Cy-3g (1 mg.mL^{-1}). Então, foi adicionado 10 mL de MeOH (0,1 % HCl) e a solução final foi pesada. Esta solução foi mantida sob constante agitação em mesa agitadora por duas horas ao abrigo da luz. As soluções foram filtradas em membrana de *Nylon* (0,22 µm e 13 mm de diâmetro) e injetadas no cromatógrafo.

4.7.2.3 Preparação das amostras para quantificar as antocianinas

Os frutos maduros foram coletados cuidadosamente para evitar a danificação da casca que contém as antocianinas. As amostras analisadas foram preparadas no mesmo dia em que os frutos foram coletados de acordo com o seguinte procedimento: três frutos foram escolhidos ao acaso foram pesados e picados. A estes frutos foi adicionado 20 mL de MeOH (0,1% HCl) e a solução resultando foi pesada. As antocianinas foram extraídas por duas horas sob constante agitação em mesa agitadora e ao abrigo da luz. Cada solução foi filtrada em membrana de *Nylon* (0,22 µm e 13 mm de diâmetro) e injetada em triplicata no cromatógrafo (MULAGABAL et al., 2009b).

É importante salientar que a massa dos três frutos variou entre 9,0 g e 14,0 g dependendo da espécie analisada.

4.7.2.4 Condições cromatográficas para validação do método

A validação do método e a quantificação das antocianinas foram realizadas utilizando uma coluna cromatográfica *Phenomenex*[®] C18-Hydro (250 x 4,6mm; d.i.; 4 µm), temperatura ambiente, fluxo de 0,75 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20µL. O sistema de solventes utilizado foi H₂O (0,1% TFA) como fase aquosa (A) e H₂O: Acetonitrila: Ácido Acético:TFA (50,4:48,5:1:0,1) como fase orgânica (B) e modo de eluição em gradiente (Tabela 4) (Mulabagal et al, 2009).

Tabela 4: Condições cromatográficas para quantificar as antocianinas por CLAE-DAD.

Tempo (min)	Fluxo (mL.min ⁻¹)	%A	%B
Inicial	0,75	80	20
26	0,75	40	60
30	0,75	80	20
40	0,75	80	20

4.8 Estudo fitoquímico das folhas de *Eugenia brasiliensis*

4.8.1 Preparação dos extratos

As folhas de *Eugenia brasiliensis* foram secas em estufa a 40°C. Em seguida, foram finamente divididas em moinho de facas a fim de facilitar a extração de seus constituintes químicos.

Considerando o uso do chá das folhas na medicina tradicional, este foi preparado no laboratório de acordo com o seguinte protocolo (MULAGABAL et al., 2009a): 200 g de folhas secas, aproximadamente, foram adicionados 2,0 L de água fervente. Esta mistura ficou sob constante agitação por 75 min e após este período, foi filtrada e o sobrenadante foi liofilizado para a obtenção do extrato aquoso (EA-Fo, 46,2 g). Então, o material vegetal resultante foi

empacotado em uma coluna de vidro e submetido à extração exaustiva com metanol (1,5 L, 6 horas, 6x) para a obtenção do extrato metanólico. O extrato metanólico resultante foi centrifugado: o sobrenadante foi, primeiramente, submetido à secagem à pressão reduzida para a eliminação de metanol e, em seguida liofilizado para a obtenção do extrato metanólico 1 das folhas (EM1- Fo, 20,1 g); o precipitado foi solubilizado em metanol e submetido à secagem a pressão reduzida para a obtenção extrato metanólico 2 (EM2 - Fo, 16,5 g). É importante salientar que o metanol usado para a obtenção do extrato metanólico foi reaproveitado usando no máximo 2,0L de metanol em toda a extração.

Os três extratos foram submetidos à cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). O extrato aquoso e o extrato metanólico 1 por apresentaram perfis semelhantes foram misturados, solubilizados em água e mantidos em um refrigerador por 24 horas. Após este período, a solução foi centrifugada. O sobrenadante e o precipitado foram liofilizados para a obtenção do extrato aquoso 1 (EA1-Fo, 50,8 g) e extrato aquoso 2 (EA2-Fo, 13,2 g), respectivamente.

4.8.1.1 Estudo do Extrato Aquoso 1 (EA1-Fo)

A fim de mimetizar as condições *in vivo*, ou seja, a hidrólise que ocorre no estômago dos seres vivos, duas alíquotas de 5 g do EA1-Fo foram dissolvidas em 250 mL de água (37°C e pH 2) e mantidas em incubadora, sendo que uma solução foi mantida por 6 horas e a outra por 24 horas. Após o tempo de incubação as amostras foram liofilizadas obtendo-se, assim, as amostras hidrolisadas.

Uma alíquota (2,00 g) de cada amostra hidrolisada foi agitada com 25 mL de metanol por 10 minutos (2x) e centrifugada, resultando na parte solúvel em MeOH (1,90 g) e na parte insolúvel em MeOH (0,03 g). Este resíduo mostrou-se insolúvel em água e em metanol, e foi considerado como sendo uma pequena porção de material vegetal.

As frações solúveis em MeOH foram analisadas por CCDC usando sílica gel (250 µm) como fase estacionária e CHCl₃:MeOH:H₂O (5:4:1) como fase móvel. Como não foi observada diferença significativa no perfil cromatográfico

obtido por CCDC das duas frações, a fração proveniente da amostra incubada por 6 horas foi escolhida para os procedimentos de purificação.

4.8.1.2 Estudo da fração solúvel em MeOH – 6 horas (FrSMe-6)

Uma alíquota (1,09 g) da fração FrSMe-6 foi submetida ao fracionamento com coluna RediSep® Rf fase reversa C-18 (86 g, 40–63 µm) e modo de eluição gradiente linear com MeOH:H₂O (5% - 100% de MeOH, fluxo de 5,0 ml/min, 30 minutos). Neste procedimento, obteve-se 40 frações que foram combinadas de acordo com o perfil cromatográfico obtido por CCDC para formar quatro frações (Fr₁ - 324 mg; Fr₂ - 432,5 mg; Fr₃ - 46,3 mg; Fr₄ - 37,9 mg). Após a obtenção das quatro frações, estas foram submetidas a secagem do solvente a pressão reduzida em evaporador rotativo e testadas novamente em CCDC. As frações Fr₂ - Fr₄ apresentaram perfil cromatográfico com baixa resolução e característico de substâncias muito polares. Portanto, somente a fração Fr₁, foi escolhida para a etapa seguinte de purificação.

Uma alíquota da fração Fr₁ (314 mg) foi dissolvida em metanol e centrifugada. A parte solúvel em metanol (280 mg) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) usando sílica gel (500 µm) como fase estacionária e CHCl₃:MeOH:H₂O (10:5:0,5) como fase móvel. A placa cromatográfica foi eluída duas vezes e este procedimento forneceu a substância **1** (26,5 mg).

4.8.1.3 Estudo do Extrato Aquoso 2 (EA2-Fo)

O EA2-Fo foi submetido à diversas etapas de fracionamento, porém, não foi possível isolar nenhuma substância. A análise por CCDC deste extrato mostrou baixa resolução cromatográfica e alta polaridade o que sugere a presença de taninos e explica a dificuldade em isolar as substâncias presentes.

4.8.1.4 Estudo do Extrato Metanólico 2 (EM2 - Fo)

O extrato EM2 - Fo (4.0 g) foi agitado sequencialmente com hexano (20 ml, 20 minutos), acetato de etila (20 ml, 20 minutos) e metanol (20 ml, 20 minutos). As soluções resultantes em cada etapa foram centrifugadas e os sobrenadantes concentrados a pressão reduzida (35 °C) para se obter a fração hexânica (FrHx - 0,42 g), a fração acetato (FrAc - 2,58 g) e a fração metanólica (FrMe - 0,74 g), respectivamente.

As frações resultantes foram analisadas por CCDC. A fração hexânica mostrou um perfil cromatográfico semelhante à fração acetato e ambas as frações foram combinadas para formar a fração FrHxAc. A comparação dos perfis cromatográficos mostrou que as frações hexânica e acetato possuem as substâncias majoritárias e que a fração metanólica possui compostos muito polares e baixa resolução cromatográfica.

4.8.1.5 Estudo da fração FrHxAc

Uma alíquota da fração acetato combinada com a fração hexânica (FrHxAc - 1,9 g) foi submetida ao fracionamento por cromatografia líquida de média pressão (*MPLC*) usando coluna de sílica gel (350 x 40 mm; 35–70 µm), fluxo de 3,0 mL.min⁻¹ e eluída com CHCl₃: AcOEt (3:1) para se obter 69 frações (10 ml cada), CHCl₃: MeOH (3:1) para se obter 4 frações (50 - 125 ml) e 100% MeOH para se obter 2 frações (200 e 300 ml). As frações foram analisadas por CCDC e combinadas em quatro frações de acordo com o perfil cromatográfico: A (0,66 g), B (0,24 g), C (0,60 g) e D (0,50 g). A fração A por conter as substâncias majoritárias foi escolhida para os fracionamentos subsequentes.

Uma alíquota da fração A (0,56 g) foi submetida ao fracionamento por *MPLC* usando coluna de sílica gel (300 x 22 mm; 35-70 µm), fluxo de 1,7 mL.min⁻¹ e duas fases móveis: hexano: acetona (4:1) para se obter 37 frações (5,0 ml cada) e hexano: acetona (1:1) para se obter 40 frações (5,0 ml cada). As frações resultantes foram combinadas com base no perfil cromatográfico por CCDC em seis sub-frações (A1, 31 mg; A2, 151 mg; A3, 150 mg; A4, 130

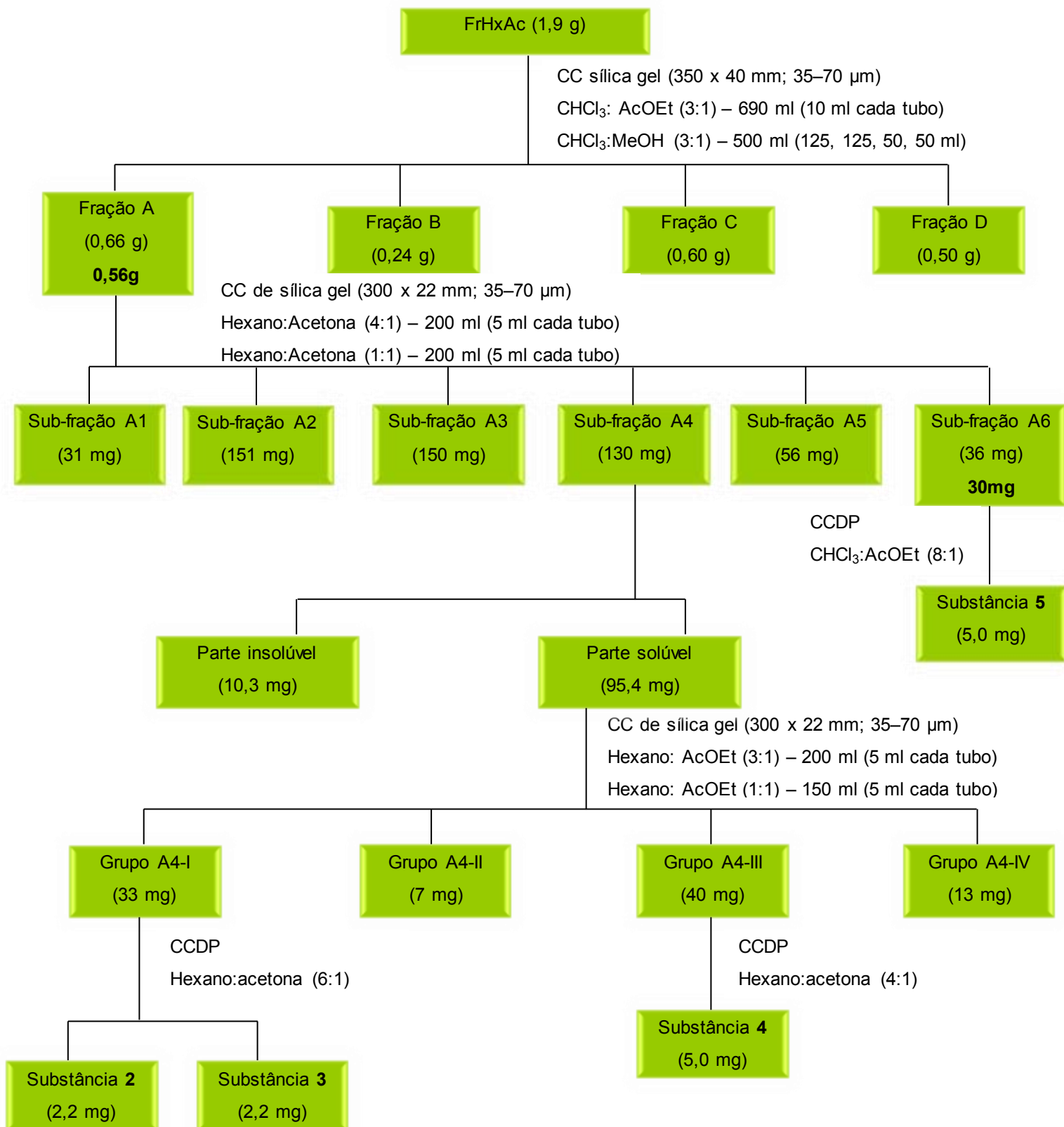
mg; A5, 56mg; A6, 36 mg). As substâncias majoritárias foram identificadas nas sub-frações A4 e A6.

Uma alíquota da sub-fração A4 (106 mg) foi dissolvida em hexano:acetato de etila (3:1) e centrifugada a fim de se obter a parte solúvel (95,4 mg) e a parte insolúvel (10,3 mg) separadas. A parte solúvel foi submetida ao fracionamento por *MPLC* usando coluna de sílica gel (300 x 22 mm; 35–70 µm), fluxo de 1,7 ml/min e duas fases móveis: hexano: acetato de etila (3:1) para se obter 40 frações (5 ml cada) e hexano: acetato de etila (1:1) para se obter 30 frações (5 ml cada). Novamente, as frações resultantes foram analisadas por CCDC e reunidas em 4 grupos (A4-I, 33,1 mg; A4-II, 7,2 mg; A4-III, 40 mg; A4-IV, 13 mg). Os grupos A4-I e A4-III foram escolhidos para as etapas subsequentes de purificação, pois continham as substâncias majoritárias e melhor resolução cromatográfica. O grupo A4-I foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) usando sílica gel (250 µm) como fase estacionária e hexano:acetona (6:1) como fase móvel, e forneceu as substâncias **2** (2,2 mg) e **3** (2,2 mg). O grupo A4-III foi submetido à CCDP usando usando sílica gel (250 µm) como fase estacionária e hexano:acetona (4:1) como fase móvel, e forneceu a substância **4** (5,0 mg).

A sub-fração A6 (30 mg) foi submetida à CCDP usando sílica gel (250 µm) como fase estacionária e CHCl₃:MeOH (8:1) como fase móvel e forneceu a substância **5** (5,0 mg).

Portanto, o fracionamento de FrHxAc possibilitou o isolamento de 4 substâncias majoritárias presentes na espécie em estudo (Figura 17).

Figura 17 - Esquema do fracionamento de FrHxAc.



4.9 Estudo químico das infusões de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata*

4.9.1 Preparação das infusões de *E. brasiliensis* e *E. involucrata*

As folhas de ambas as espécies foram secas em estufa a 40°C. Em seguida, foram moídas em moinho de facas a fim de facilitar a extração. Considerando o uso das folhas na forma de chá na medicina tradicional, as infusões foram preparadas em laboratório usando o protocolo de preparo do extrato EA-Fo (item 4.8.1) com algumas modificações: para cada 100 g de folhas e moídas foram adicionados 1,0 L de água fervente. A mistura ficou em repouso por 30 min e após este período, foi filtrada e o sobrenadante foi liofilizado para a obtenção da infusão liofilizada (Tabela 5). Este material foi armazenado em freezer para evitar a degradação e uso posterior.

Tabela 5 - Rendimentos obtidos para as infusões liofilizadas das folhas de *E. brasiliensis* e *E. involucrata*.

Espécie	Código	Massa de folhas secas e moídas (g)	Massa obtida (g)
<i>E. brasiliensis</i>	IEb-Fo	200,0	39,18
<i>E. involucrata</i>	IEi-Fo	100,0	14,63

4.9.2 Identificação dos constituintes químicos presentes nas infusões das folhas (IEb-Fo e IEi-Fo) por Espectrometria de Massas

As infusões IEb-Fo e IEi-Fo foram submetidas à análise por Espectrometria de Massas usando o modo de inserção direta da amostra, com o objetivo de identificar os constituintes químicos presentes nas infusões que pudessem ser associados à atividade anti-inflamatória descrita na medicina tradicional. Para esta análise, 1,5 mg de cada amostra de infusão liofilizada foi pesada, diluída em 1,5 mL de solução MeOH:H₂O (1:1, v/v) e filtrada em membrana de Nylon com poro de 0,22 µm. Cada amostra filtrada foi diluída e

introduzida diretamente na fonte de ionização por seringa automática com diâmetro de 4,6 mm e fluxo de 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.10 Metodologia dos ensaios biológicos

4.10.1 Ensaio antioxidante usando MTT¹

O ensaio com MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] foi realizado de acordo com a metodologia descrita por LIU & NAIR, 2010 com algumas modificações. As soluções estoque dos extratos testados, controles positivos e MTT foram preparadas em DMSO (10, 1 e 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente). Uma alíquota de 780 μl da solução de MTT e 20 μl dos extratos e controles positivos foi agitada em vortex por 1 minuto. A mistura reacional foi incubada a 37°C por 24 horas. Então, uma alíquota de 200 μl da mistura reacional foi transferida para uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida a 570 nm. As amostras foram testadas em duplicata. Os controles positivos usados foram ácido ascórbico (vitamina C - VC) e *tert*-butil-hidroquinona (TBHQ) e o controle negativo usado foi DMSO. A absorbância de cada amostra foi calculada utilizando a equação 1:

Equação 1 - Cálculo de absorbância após a reação com MTT em ensaio antioxidante.

$$Ab = \Delta A_{570\text{-amostra}} - \Delta A_{570\text{-controlengativo}}$$

¹Ensaio realizado pela pós-graduanda Alessandra Cristina Dametto, na Michigan State University, MSU, East Lansing, USA.

4.10.2 Ensaio de inibição da lipoperoxidação²

No modelo proposto, os ensaios antioxidantes foram conduzidos pela análise da oxidação de lipossomos padronizados por espectroscopia de fluorescência. O lipídeo 1-estearoil-2-linoleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina e a sonda fluorescente ácido 3-[*p*-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]-fenilpropiónico foram dissolvidos em DMF e secos a vácuo a temperatura ambiente. As vesículas unilamelares grandes (*LUV*'s, lipossomas) foram produzidas pela ressuspensão da mistura lipídeo + sonda (0,15M NaCl, 0,1mM EDTA e 0,01M MOPS mantida sobre resina Chelex) seguida de 10 operações de congelamento/degelo em banho de gelo seco e etanol, seguidas de extrusão (29x) através de membrana de tamanho de poro 100nm. A lipoperoxidação foi iniciada pela adição de 20 µL FeCl₂.4H₂O à solução do ensaio [HEPES (100 µl), 1 M NaCl (200 µl), água aspergida com N₂ (1,64 ml), amostra ou DMSO (20 µl)] e 20 µl da suspensão de lipossoma. A fluorescência foi medida a 384 nm e monitorada a 0, 1, 3 e a cada 3 minutos até 21 minutos, usando um fluorímetro digital. O decréscimo da intensidade de fluorescência relativa com o tempo indicou a taxa de peroxidação. Os extratos foram testados na concentração de 100 µg/ml e os padrões usados como controle positivo, butil-hidroxianisol (BHA), *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) e butil-hidroxitolueno (BHT), foram testados na concentração de 1 µg/ml. Todas as amostras foram testadas em duplicata e a porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a Equação 2. O DMSO foi usado como controle negativo (RAMSEWAK et al, 1999).

Equação 2 - Inibição da lipoperoxidação em ensaio fluorimétrico.

$$\% = \frac{F_t}{F_0} * 100 .$$

Sendo F_t a fluorescência num dado ponto e F_0 a fluorescência em $t=0$ min.

²Ensaio realizado pela pós-graduanda Alessandra Cristina Dametto, na Michigan State University, MSU, East Lansing, USA.

4.10.3 Ensaio de inibição das enzimas COX-1 e COX-2³

A enzima COX-1 foi preparada a partir de vesículas seminais de carneiro (ca. 0,46 mg proteína/mL em tampão Tris 30 mM, pH 7) e a enzima COX-2 foi preparada a partir de lisado celular de inseto diluído com tampão Tris (pH 7) até concentração final aproximada de 1,5 mg de proteína.mL⁻¹. As amostras foram testadas quanto à sua atividade anti-inflamatória pelo monitoramento da taxa de consumo de O₂ (LIU & NAIR, 2011). Um eletrodo foi usado para monitorar a taxa de consumo de O₂ a 37° C. As amostras (6 µl de uma solução de 250 µg.mL⁻¹) foram injetadas em uma câmara contendo solução tampão do ensaio, que é uma mistura de tampão Tris (0,6 ml; 0,1 M e pH 7), fenol (1 mM) e hemoglobina (85 µg). As enzimas COX-1 (10 µl) e COX-2 (10 µl) foram adicionadas separadamente, e incubadas por 2 minutos. Após o tempo de incubação, o ácido araquidônico (10 µl da solução de 1 mg.mL⁻¹) foi adicionado para iniciar a reação. As análises foram realizadas em duplicata. Os controles positivos usados, Aspirina, Celebrex, Vioxx, Naproxeno e Ibuprofeno, foram testados na concentração de 108, 1, 1, 15 and 12 µg.mL⁻¹, respectivamente e o controle negativo usado foi DMSO. A porcentagem de inibição das enzimas foi calculada de acordo com a equação 3 (RAMSEWAK et al., 2000).

Equação 3 - Inibição das enzimas COX-1 e COX-2 em ensaio anti-inflamatório.

$$\% = \frac{\text{Consumo}_{O_2\text{-controle}} - \text{Consumo}_{O_2\text{-amostra}}}{\text{Consumo}_{O_2\text{-controle}}} * 100$$

³Ensaio realizado pela pós-graduanda Alessandra Cristina Dametto, na Michigan State University, MSU, East Lansing, USA.

5 Resultados e Discussão

5.1 Identificação das antocianinas

Os extratos brutos obtidos para *E. brasiliensis* e *E. involucrata* foram primeiramente submetidos ao fracionamento em CC com XAD-16 para eliminar açúcares e outros interferentes, fazendo com que o extrato ficasse mais concentrado em antocianinas. Então, o extrato bruto e a fração metanólica obtida após o procedimento com XAD-16 foram analisados por CLAE-DAD. Pode-se observar através da comparação dos cromatogramas que houve um aumento na concentração das antocianinas após o fracionamento (Figura 18).

A comparação das expansões dos perfis cromatográficos obtidos para as duas espécies mostra que a espécie *Eugenia brasiliensis* possui maior variedade estrutural de antocianinas que a espécie *E. involucrata* (Figura 19). As antocianinas presentes foram inicialmente identificadas pelos espectros no UV-Vis, os quais apresentaram duas bandas, uma em 278nm e outra em, aproximadamente, 520nm, características de antocianinas (Figura 20).

Figura 18 - Separação cromatográfica por CLAE-DAD dos Extratos Brutos e das Frações metanólicas das espécies *E. brasiliensis* (A), *E. involucrata* (B), $\lambda = 520$ nm. Coluna cromatográfica Phenomenex® C18-Hydro (250 x 4,6mm x d.i.; 4 μ m), temperatura ambiente, fluxo de 0,75 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 μ L. (condições cromatográficas veja tabela 3, pag. 65).

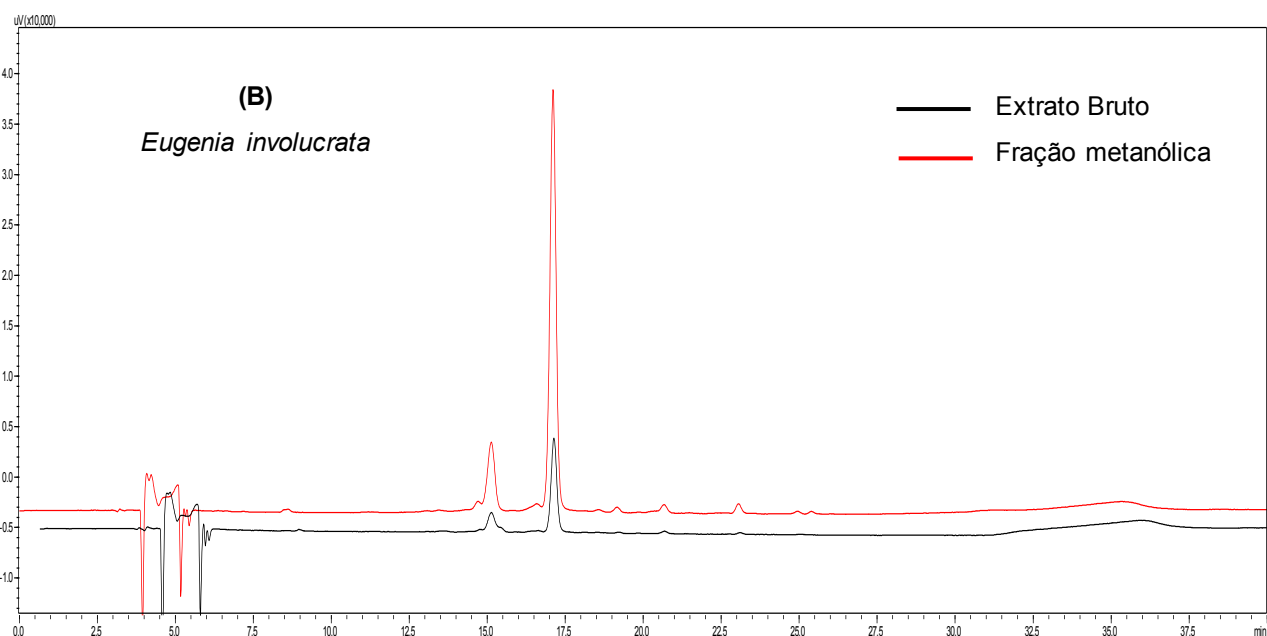
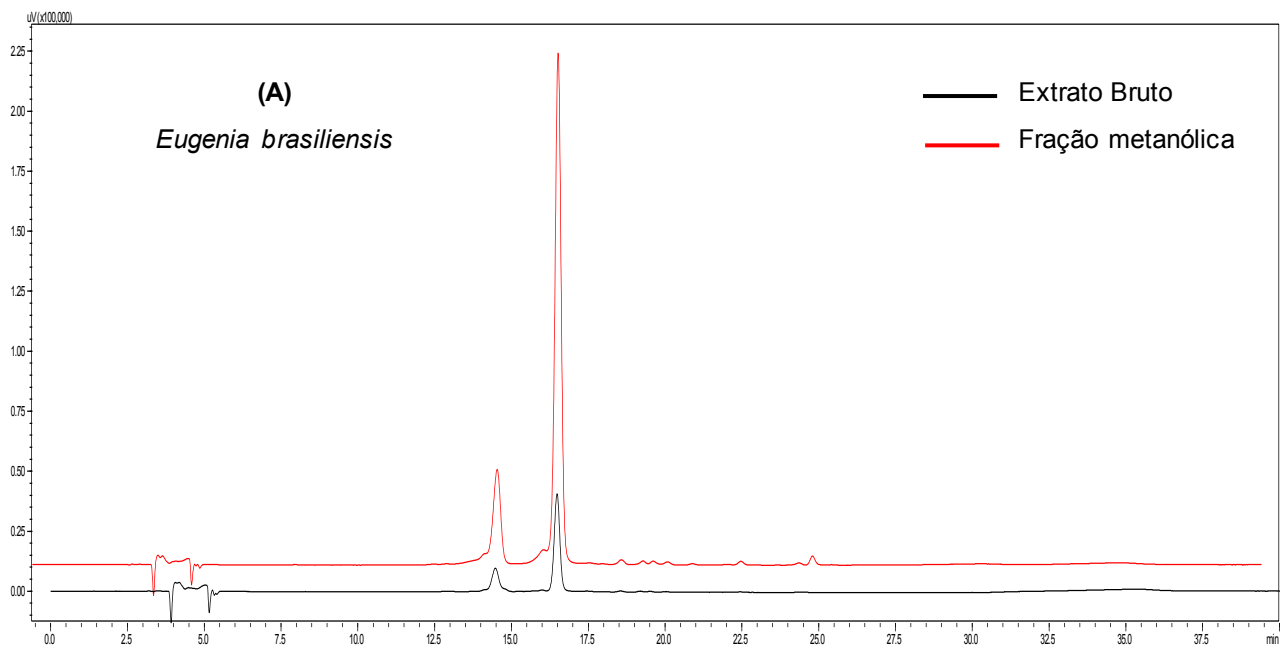


Figura 19 - Expansão do perfil cromatográfico (11 minutos a 26 minutos) obtido por CLAE-DAD das frações metanólicas de (A) - *E. brasiliensis* e (B) - *E. involucrata* e espectros do UV-Vis das antocianinas. Coluna cromatográfica Phenomenex® C18-Hydro (250 x 4,6mm x d.i.; 4 µm), temperatura ambiente, fluxo de 0,75 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20µL. (condições cromatográficas veja tabela 3, pag. 65).

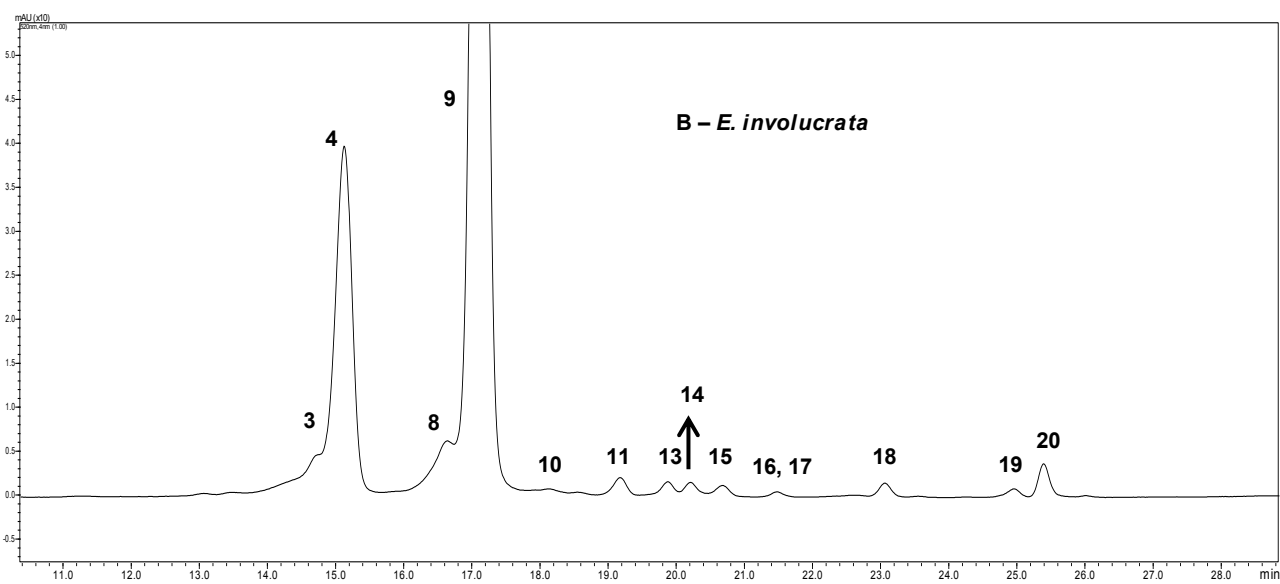
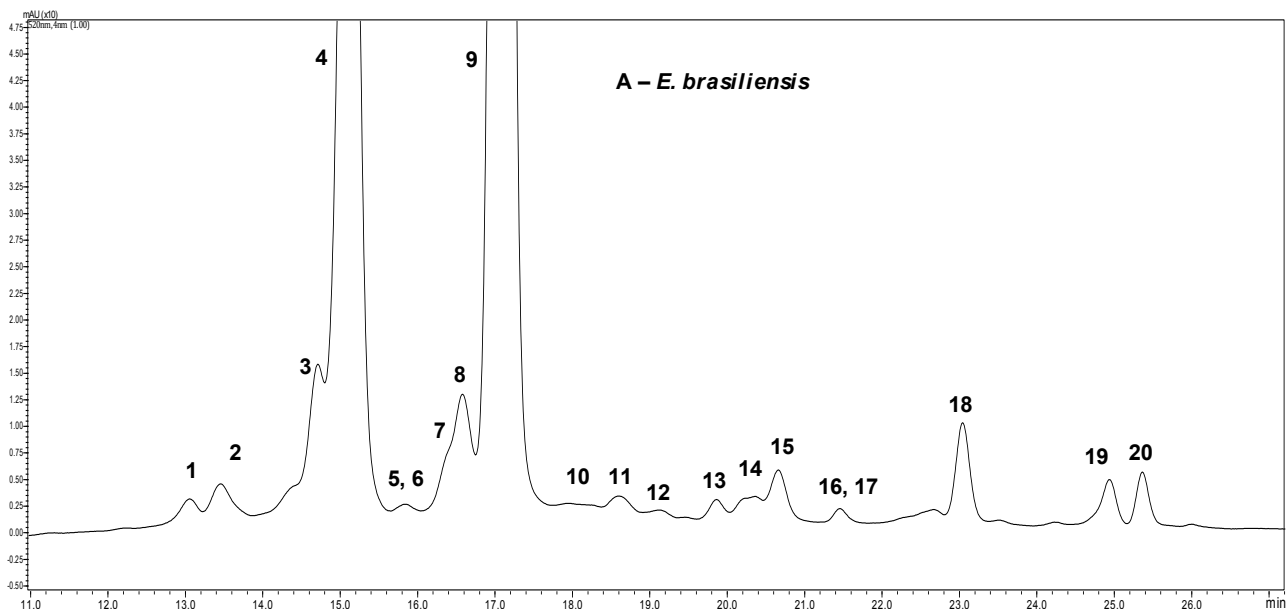
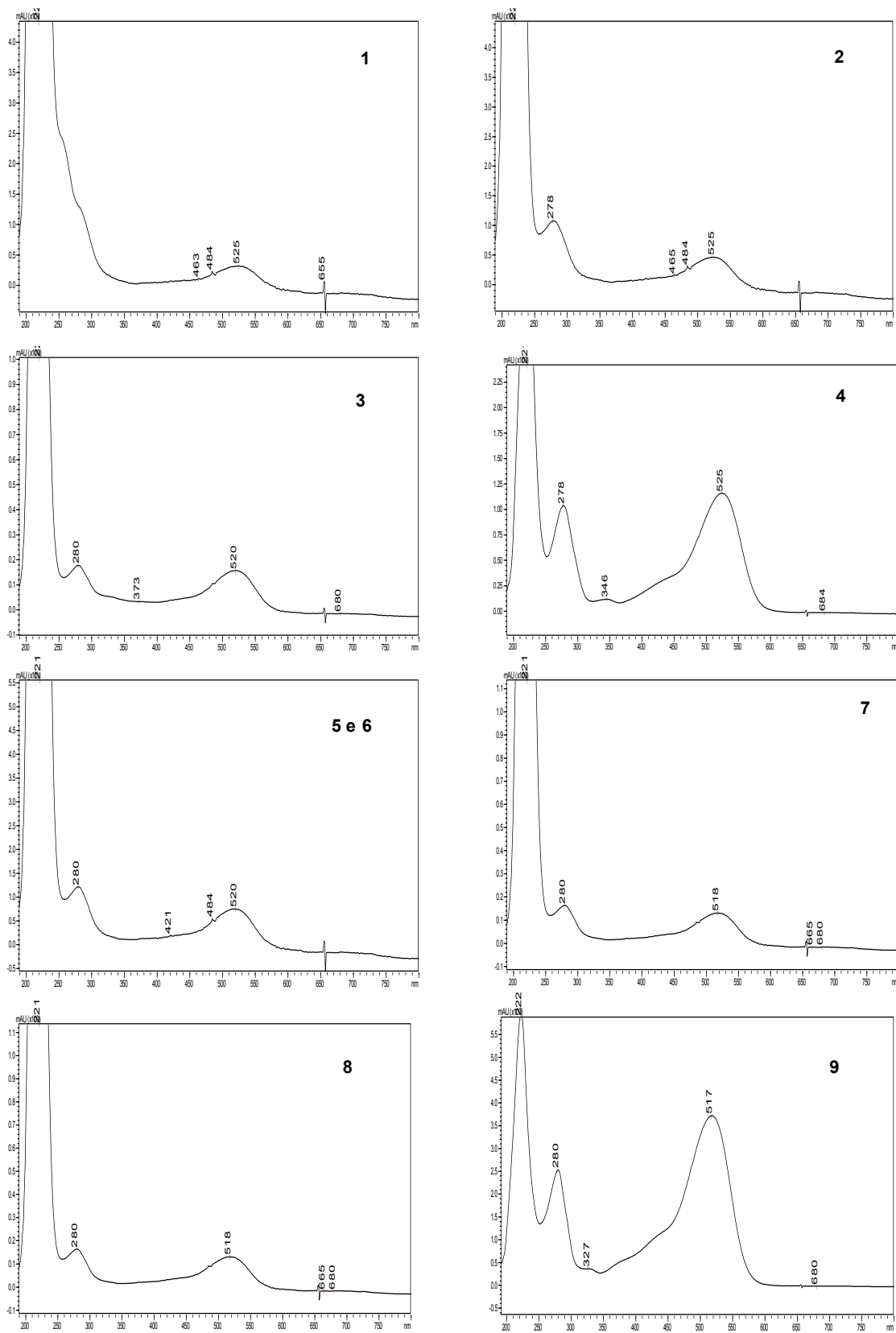
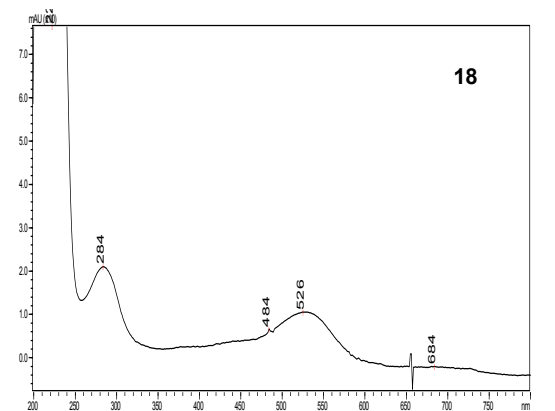
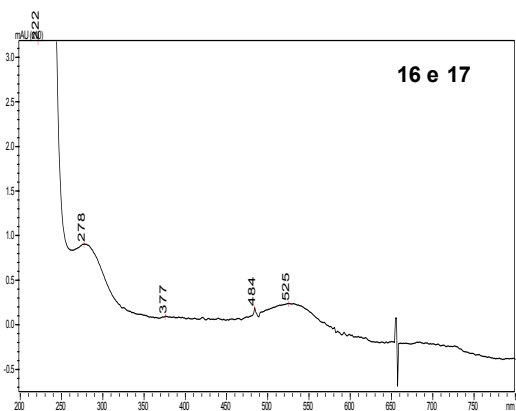
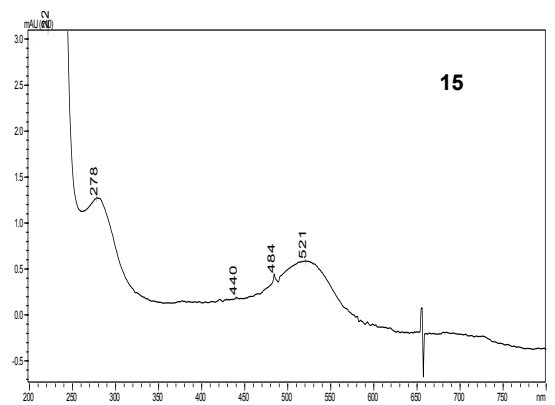
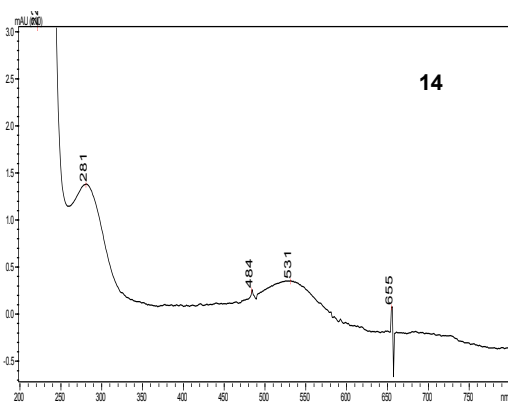
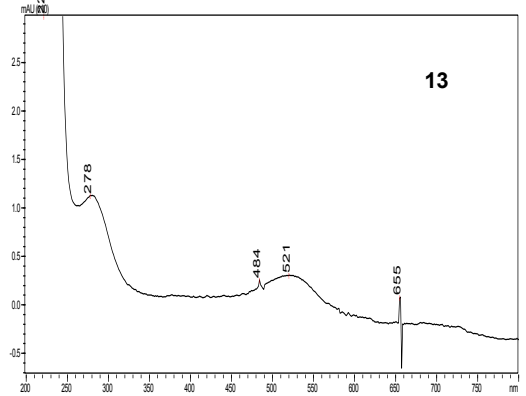
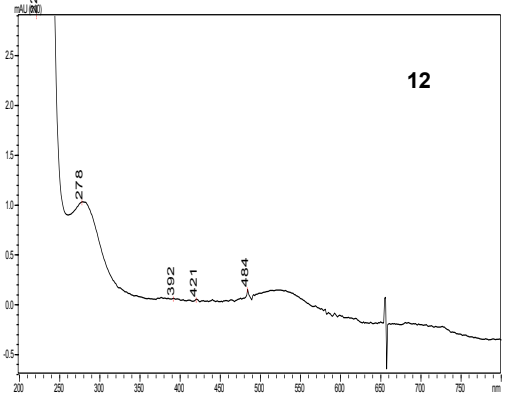
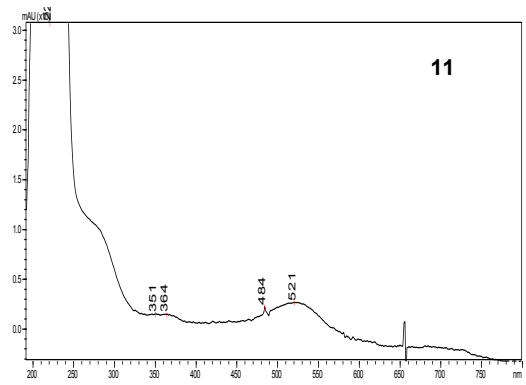
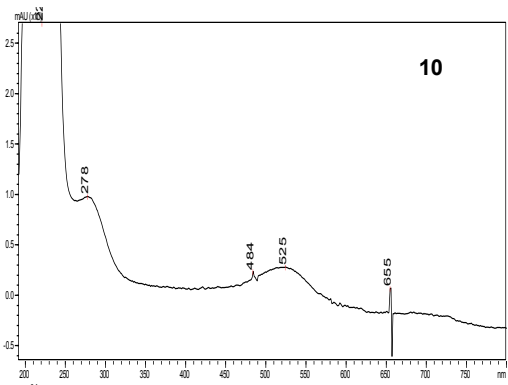
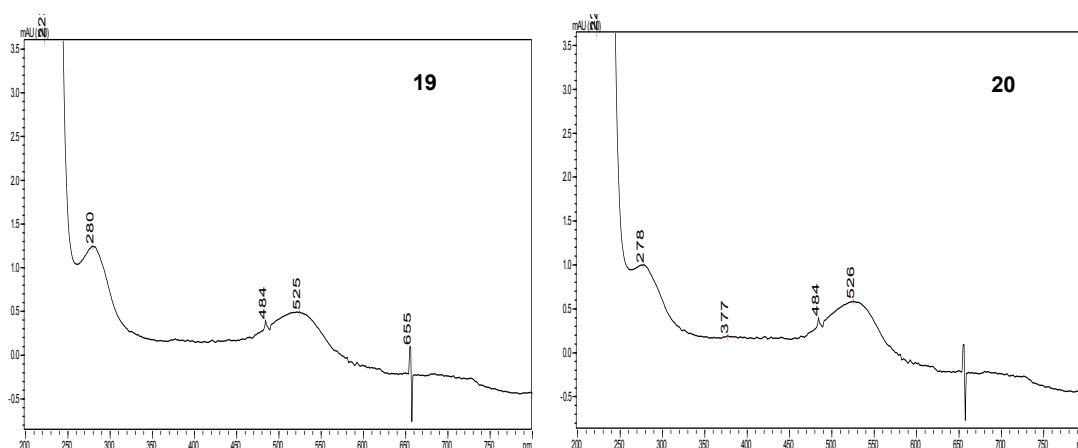


Figura 20 - Espectros no UV-vis obtido para as antocianinas.







5.1.1 Análise por CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM/EM

Uma técnica que pode fornecer excelentes informações sobre a fórmula molecular de compostos flavonóidicos, como as antocianinas, é a espectrometria de massas (EM). A espectrometria de massas, em sua essência, consiste na geração de íons pela fragmentação das moléculas da amostra e a detecção dos fragmentos é feita de acordo com suas massas. Os íons carregados produzidos são acelerados em um campo magnético ou elétrico que dispersa e permite medidas relativas de íons de diferentes razões massa/carga. O resultado da medida da abundância dos íons *versus* a massa constitui o espectro de massas. Uma das vantagens da técnica de espectrometria de massas está na capacidade de indicar a fórmula molecular da substância sem a necessidade de grandes quantidades de amostra. Adicionalmente, pode-se selecionar determinado íon para fragmentações subsequentes (EM sequencial, EM/EM), enriquecendo as informações estruturais e contribuindo para a identificação dos constituintes químicos da amostra (MARÇO et al., 2008; SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2007).

A forma de ionização mais utilizada para análise de antocianinas é a ionização por *electrospray* (*Electrospray Ionization* – ESI). A ESI é uma técnica mais branda de ionização e por isso pode produzir íons não fragmentados da substância analisada. É aplicada para amostras termicamente lábeis, não voláteis e polares. Uma característica importante da ESI está no fato de que as amostras devem ser introduzidas na forma de solução, tornando possível o acoplamento com muitas técnicas de separação, em especial com a CLAE.

(GIUSTI et al., 1999; RYAN et al., 1999; KUSKOSKI et al., 2003) A CLAE-EM tornou-se uma das técnicas mais utilizadas para identificação de antocianinas. (WU & PRIOR, 2005; CASTANEDA-OVANDO et al., 2009)

Diante destas informações, as frações metanólicas (Me-Fr) dos extratos de *Eugenia* em estudo foram submetidas às análises por CLAE-EM e CLAE-EM/EM a fim de identificar quais antocianinas estavam presentes nestas espécies. Os espectros de massas em *full-scan* indicaram a presença de várias antocianinas (pag. 80; Figura 19). A fragmentação para cada um desses íons levou à identificação de diversas antocianinas.

É importante salientar que as antocianinas são formadas, basicamente, por uma aglicona (antocianidina) e uma unidade de açúcar, geralmente mono ou dissacarídeo. No entanto, algumas antocianinas possuem, além da aglicona e da unidade de açúcar, um grupo acila. Algumas características estruturais das antocianinas provocam fragmentações peculiares, muitas vezes imprescindíveis para sua correta identificação, como é destacado a seguir.

Como o cátion flavílico é muito estável e não possui sítio de fácil ruptura da ligação, o espectro das antocianinas apresentam um pico intenso $[M]^+$. As antocianinas normalmente são O-glicosiladas, portanto a fragmentação dessas antocianinas O-glicosiladas envolve a clivagem da ligação glicosídica acompanhada por transferência de próton pela perda do glicosídeo, e resultando em íons que contêm somente a aglicona (OLIVEIRA, ESPERANÇA & ALMOSTER FERREIRA, 2001; ANDERSEN & MARKHAN, 2006).

A unidade de açúcar presente, geralmente, está ligada na posição 3 do anel C. No entanto, se estiverem presentes duas moléculas de açúcar, elas podem estar ligadas na posição 3, ou então, uma na posição 3 do anel C e outra na posição 5 do anel A. Os dados da literatura indicam que, quando presentes, os dissacarídeos sambubiose, latirose, sofrorse, laminaribiose, gentiobiose e rutinose sempre estão ligados na posição 3 do anel C (WU & PRIOR, 2005). GIUSTI et al., 1999 propõem que os espectros dos íons precursores (MS^2) das antocianinas diglicosiladas possui um padrão: as antocianinas diglicosiladas apenas na posição 3 possuem um espectro de massas com o íon precursor M^+ e com o íon produto referente à aglicona. A única exceção a este padrão seria o diglicosídeo rutinose que apresenta um espectro de massas com o íon precursor, com o íon m/z $[M-146]^+$ e com o íon

referente à aglicona, evidenciando a quebra da ligação interglicosídica. Isso acontece devido a ramnose e a glicose formarem um dissacarídeo com ligação interglicosídica 1→6. O gentiobiosídeo, que também possui ligação interglicosídica 1→6 entre as duas moléculas de glicose, apresentou o mesmo padrão de fragmentação que o rutinosídeo (DAMETTO, 2010). Já as antocianinas diglicosiladas nas posições 3 e 5 apresentam espectros de massas com o íon molecular M^+ , com o íon $[M-162]^+$ e com o íon produto $[M-162-162]^+$.

O espectro de MS^2 para as antocianinas 3,5-diglicosiladas com um grupo acila adicional em uma das posições gera um íon acil-glicosídeo com alta intensidade. Se houver dois grupos acila ligados em ambas posições, a intensidade do pico referente à aglicona é geralmente muito baixa, às vezes não detectável (WU & PRIOR, 2005).

Outro fator que deve ser considerado é a ordem de eluição das antocianinas usando coluna de fase reversa (C-18), determinado não só por sua polaridade, mas também por fatores estruturais que propiciem interação mais efetiva com a fase estacionária. Primeiramente, leva-se em consideração o tipo de aglicona presente, que elui na seguinte ordem: delphinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina e malvidina, em função de seu padrão de oxigenação (Figura 14, pag. 53). O próximo parâmetro a ser analisado é a glicosilação e/ou acilação das antocianinas. Por exemplo, para a mesma antocianidina (cianidina) a ordem de eluição é cianidina-3,5-diglicosídeo, cianidina-3-diglicosídeo, cianidina-3-galactosídeo, cianidina-3-sambubiosídeo, cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-arabinosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, cianidina-3-(maloil)-glicosídeo, cianidina-3-xilosídeo, cianidina-3-(6"-malonoil)-glicosídeo, cianidina-3-(6"-acetoil)-glicosídeo e cianidina-3-(6"-cumaroil)-glicosídeo (WU & PRIOR, 2005).

Com base nestas informações e nas informações obtidas dos espectros de UV-Vis, foi possível determinar as estruturas das antocianinas presentes nas amostras analisadas de *E. brasiliensis* e de *E. involucrata*.

A fração Me1-Fr, obtida para *E. brasiliensis*, foi submetida à análise por CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM para identificar as antocianinas presentes e os resultados obtidos foram usados para auxiliar na determinação das

antocianinas presentes em *E. involucrata*. Todas as antocianinas identificadas nas duas espécies estão mostradas na tabela 6.

Tabela 6: Antocianinas identificadas em *Eugenia brasiliensis* e *E. involucrata*.

Pico	Antocianina	Tr (min)	[M] ⁺ (m/z)	Ions produto (m/z)
1	A ₁ - cianidina-3-O-soforosídeo	13,0	611	287
2	A ₂ - delphinidina-3-O-laminaribiosídeo	13,4	627	303
3	A ₃ - delphinidina-3-O-galactosídeo	14,7	465	303
4	A ₄ - delphinidina-3-O-glicosídeo	15,1	465	303
5	A ₅ - cianidina-3-O-galactosídeo	15,8	449	287
6	A ₆ - cianidina-3-O-laminaribiosídeo	15,8	611	287
7	A ₇ - cianidina-3-O-sambubiosídeo	16,2	581	287
8	A ₈ - cianidina-3-O-cafeoil-diglicosídeo	16,6	773	287
9	A ₉ - cianidina-3-O-glicosídeo	17,1	449	287
10	A ₁₀ - cianidina-3-O-cafeoil-glicosídeo	18,0	611	287
11	A ₁₁ - delphinidina-3-O-cumaroil-glicosídeo	18,6	581	303
12	A ₁₂ - pelargonidina-3-O-glicosídeo	19,1	433	271
13	A ₁₃ - cianidina-3-O-maloil-glicosídeo	19,8	565	287
14	A ₁₄ - cianidina-3-O-acetoil-glicosídeo	20,4	623	287
15	A ₁₅ - cianidina-3-O-pentosídeo	20,6	419	287
16	A ₁₆ - NI*	21,4	719	557, 395, 287
17	A ₁₇ - NI*	21,4	573	303
18	A ₁₈ - NI*	23,0	573	303
19	A ₁₉ - NI*	24,9	557	287
20	A ₂₀ - delphinidina	25,4	303	-

*Antocianina não-identificada.

O íon precursor de m/z 611 apresentou 3 picos em diferentes tempos de retenção: 13,0 minutos, 15,8 minutos e 18,0 minutos. A fragmentação deste íon, nos diferentes tempos de retenção, gerou o íon de m/z 287 [M-324]⁺ com a eliminação de um fragmento neutro de 324 Da. Baseando-se nos tempos de retenção e nos espectros de fragmentação, estas antocianinas foram identificadas como cianidina-3-O-soforosídeo (Figura 21), cianidina-3-O-laminaribiosídeo (Figura 22) e cianidina-3-O-(cafeoil)-glicosídeo (Figura 23).

Figura 21 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 611 (tempo de retenção: 13,0 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-soforosídeo, compatível com os dados apresentados.

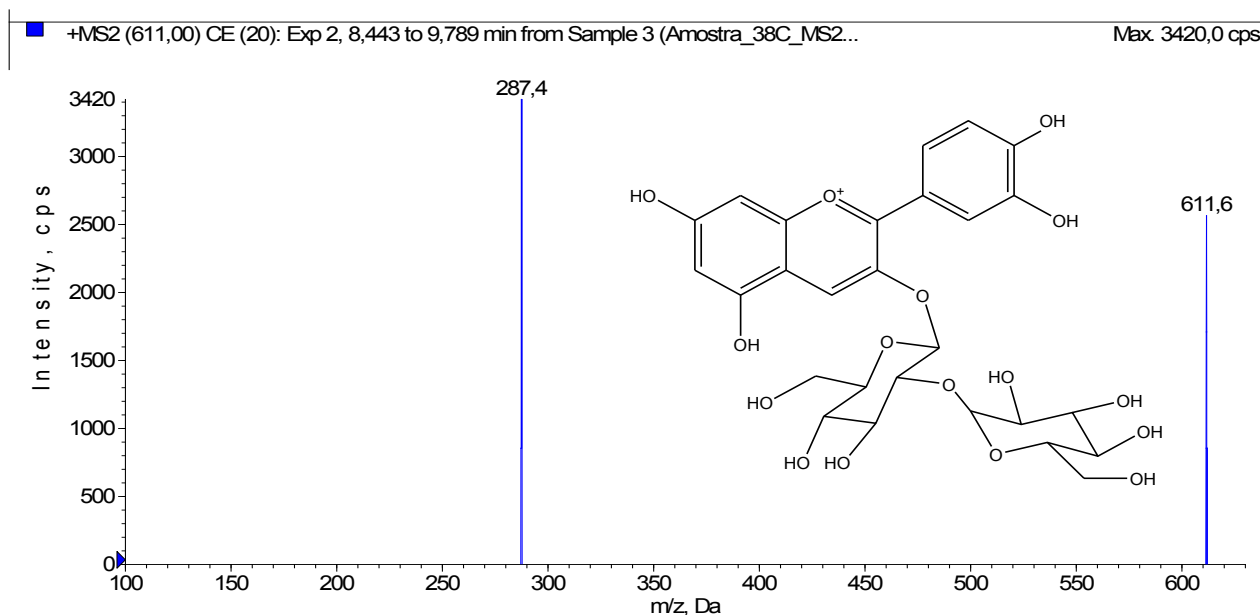


Figura 22 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 611 (tempo de retenção: 15,8 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-laminaribosídeo, compatível com os dados apresentados.

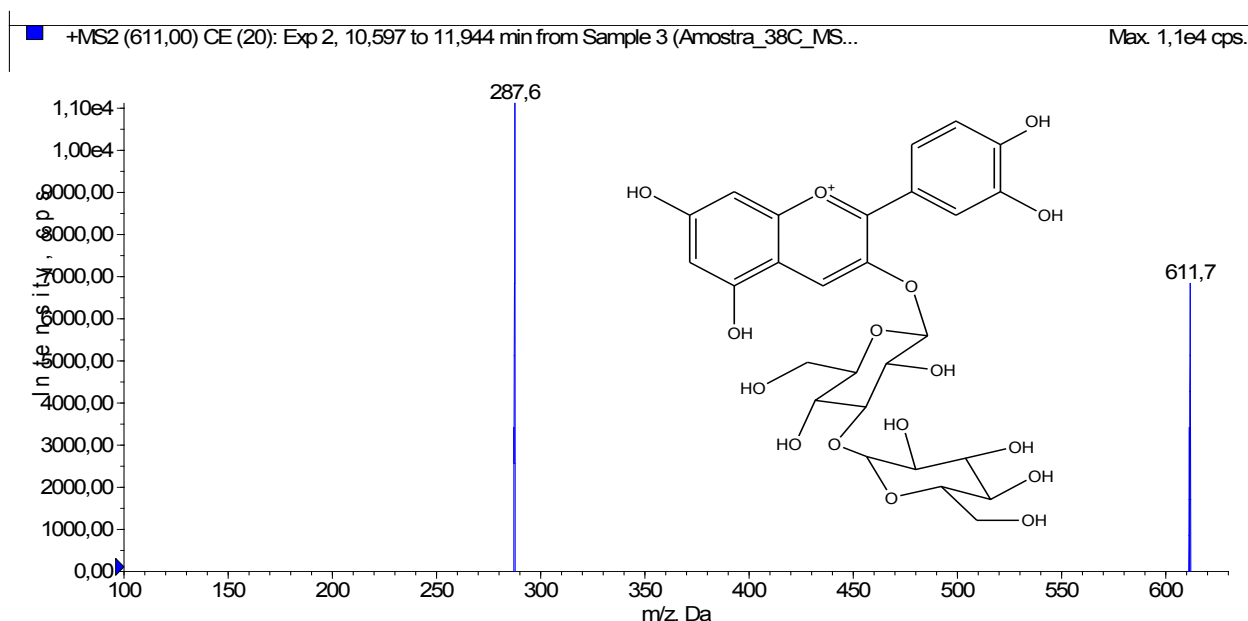
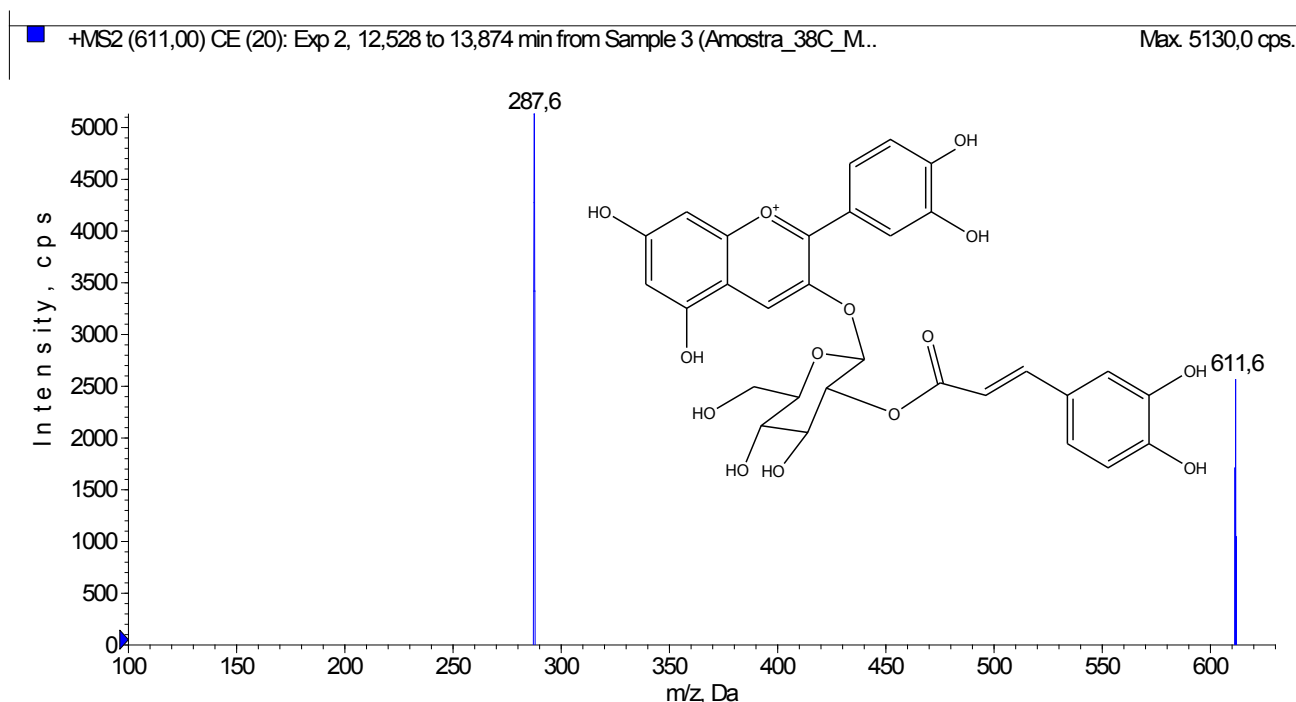


Figura 23 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 611 (tempo de retenção: 18,0 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-(cafeoil)-glicosídeo, compatível com os dados apresentados.



A fragmentação do íon precursor de m/z 627 mostra a eliminação de um fragmento neutro de 324 Da e formação de um íon produto de m/z 303 [M-324]⁺. Como há apenas o pico do íon precursor e o pico referente à aglicona, os dados indicam que esta antocianina é diglicosilada apenas na posição 3. Portanto, este espectro é compatível com a substância delphinidina-3-O-laminaribiosídeo (Figura 24).

O íon precursor de m/z 465 foi detectado em dois tempos de retenção diferentes: 14,7 minutos e 15,1 minutos. A fragmentação desse íon precursor gerou a eliminação de um fragmento neutro de 162 Da e o íon de m/z 303 [M-162]⁺ característico de delphinidina. Estas antocianinas foram identificadas como delphinidina 3-O-galactosídeo (Figura 25) e delphinidina-3-O-glicosídeo (Figura 26), ambas já identificadas em *E. brasiliensis* (REYNERTSON et al., 2008; FLORES et al., 2012).

Figura 24 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 627 (tempo de retenção: 13,4 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da delfinidina-3-O-laminaribosídeo, compatível com os dados apresentados.

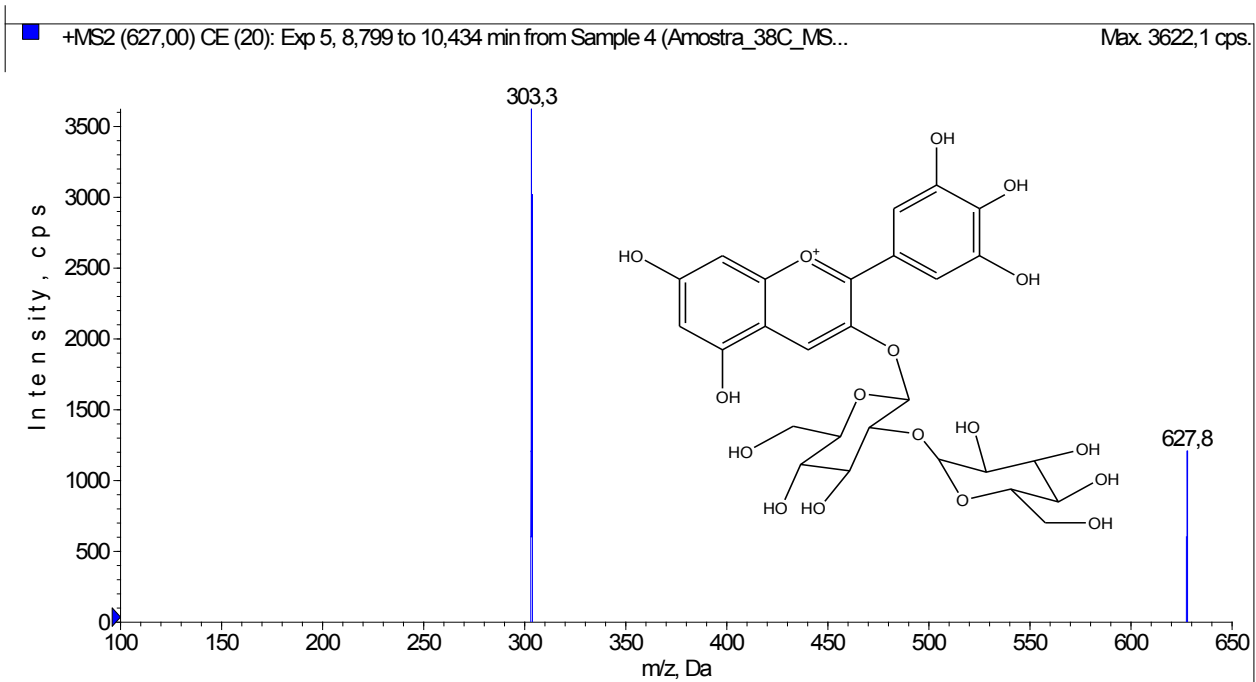


Figura 25 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 465 (tempo de retenção: 14,7 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da delfinidina-3-O-galactosídeo, compatível com os dados apresentados.

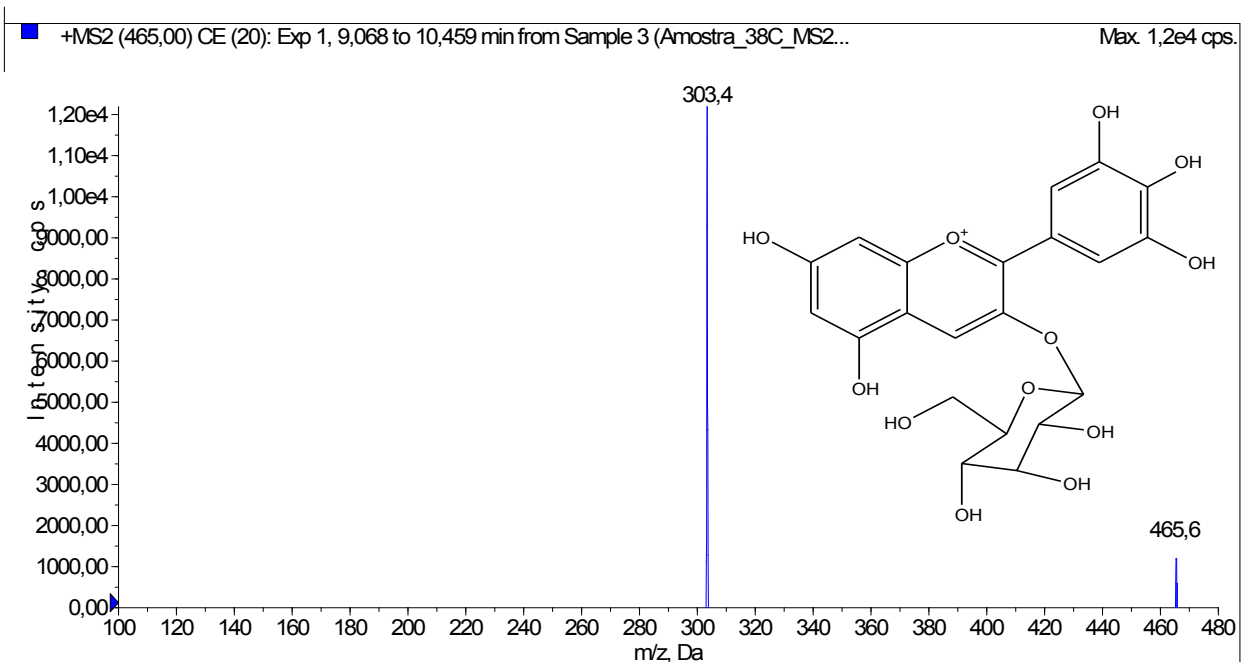
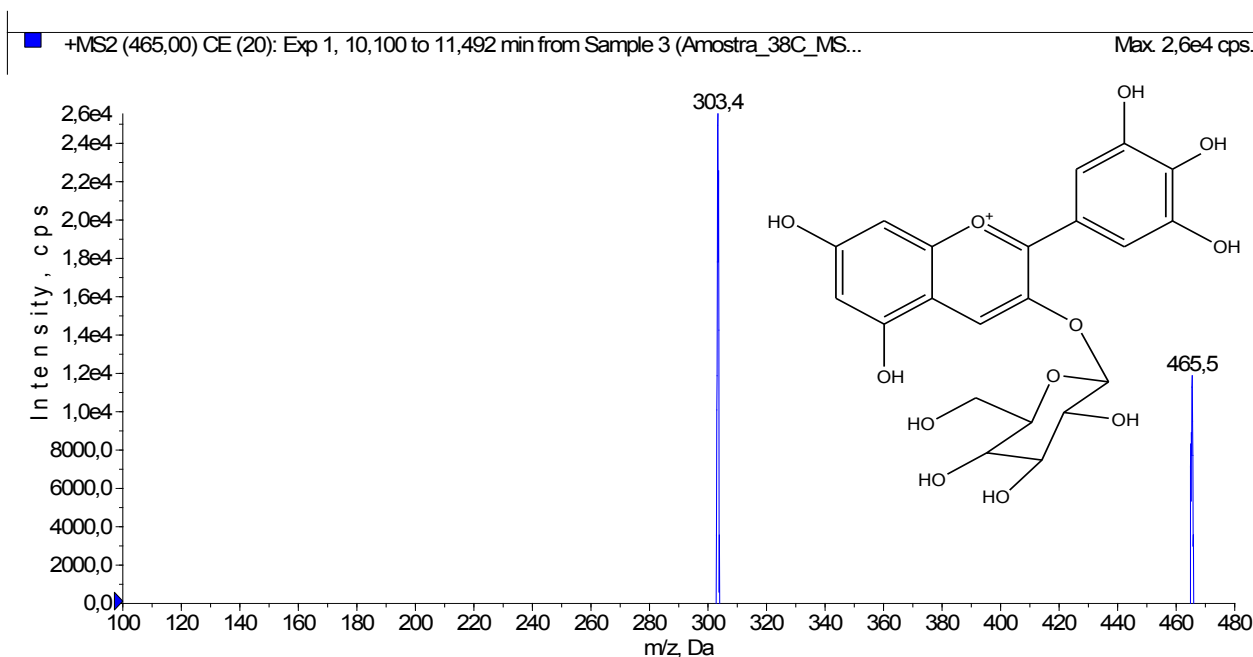


Figura 26 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 465 (tempo de retenção: 15,1 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da delfinidina-3-O-glicosídeo, compatível com os dados apresentados.



Outro íon precursor que apresentou picos em dois tempos de retenção diferentes (15,8 minutos e 17,1 minutos) foi o íon de m/z 449. A fragmentação deste íon precursor, nos dois tempos de retenção, gerou o íon m/z 287 [M-162]⁺, devido a eliminação de um fragmento neutro de 162 Da. Estas antocianinas foram determinadas como cianidina-3-O-galactosídeo (Figura 27) e cianidina-3-O-glicosídeo (Figura 28), ambas identificadas anteriormente em *E. brasiliensis* (REYNERTSON et al., 2008; FLORES et al. 2012).

O íon precursor de m/z 581 também possui dois picos em diferentes tempos de retenção: 16,2 minutos e 18,6 minutos. Porém, a fragmentação deste íon precursor mostrou espectros de fragmentações diferentes para os diferentes tempos de retenção. A fragmentação para o íon em 16,2 minutos gerou o íon de m/z 287 [M-294]⁺ e a eliminação de um fragmento neutro de 294 Da, indicando que esta antocianina é a cianidina-3-O-sambubiosídeo (Figura 29) e a fragmentação para o íon em 18,6 minutos gerou o íon de m/z 303 [M-278]⁺ e a eliminação de um fragmento neutro de 278 Da, indicando que esta antocianina é a delfinidina-3-O-(cumaroil)-pentosídeo (Figura 30).

Figura 27 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 449 (tempo de retenção: 15,8) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-galactosídeo, compatível com os dados apresentados.

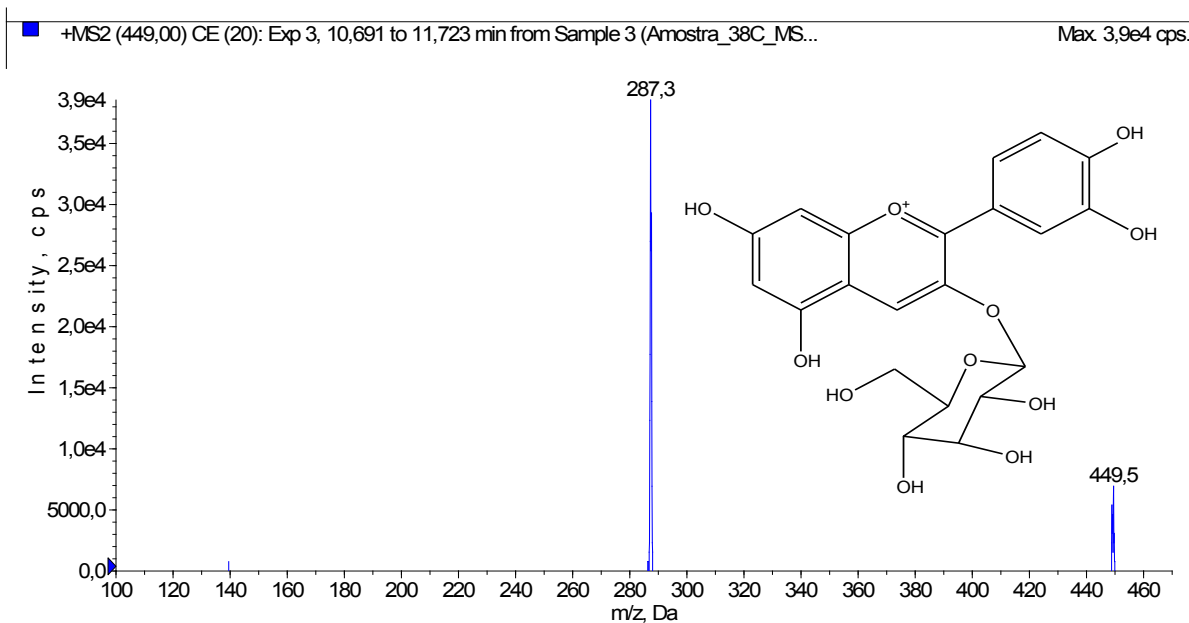


Figura 28 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 449 (tempo de retenção: 17,1 min) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-glicosídeo, compatível com os dados apresentados.

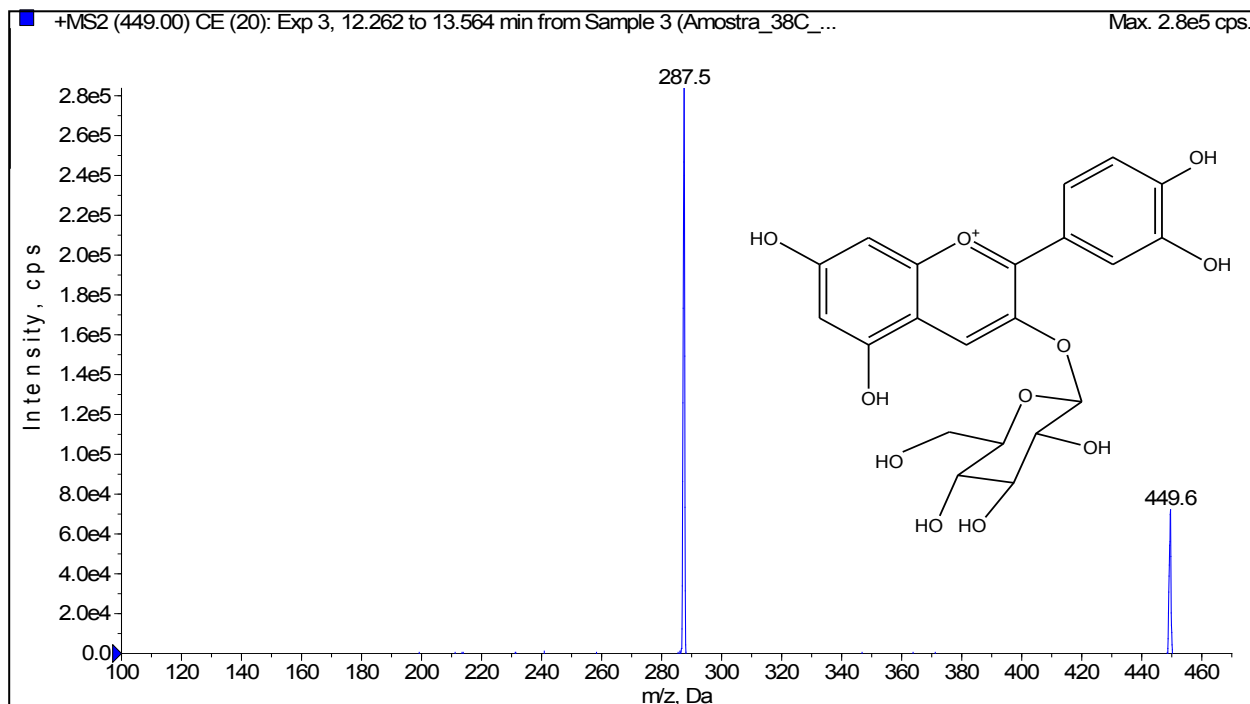


Figura 29 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 581 (tempo de retenção: 16,2) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da cianidina-3-*O*-sambubiosídeo, compatível com os dados apresentados.

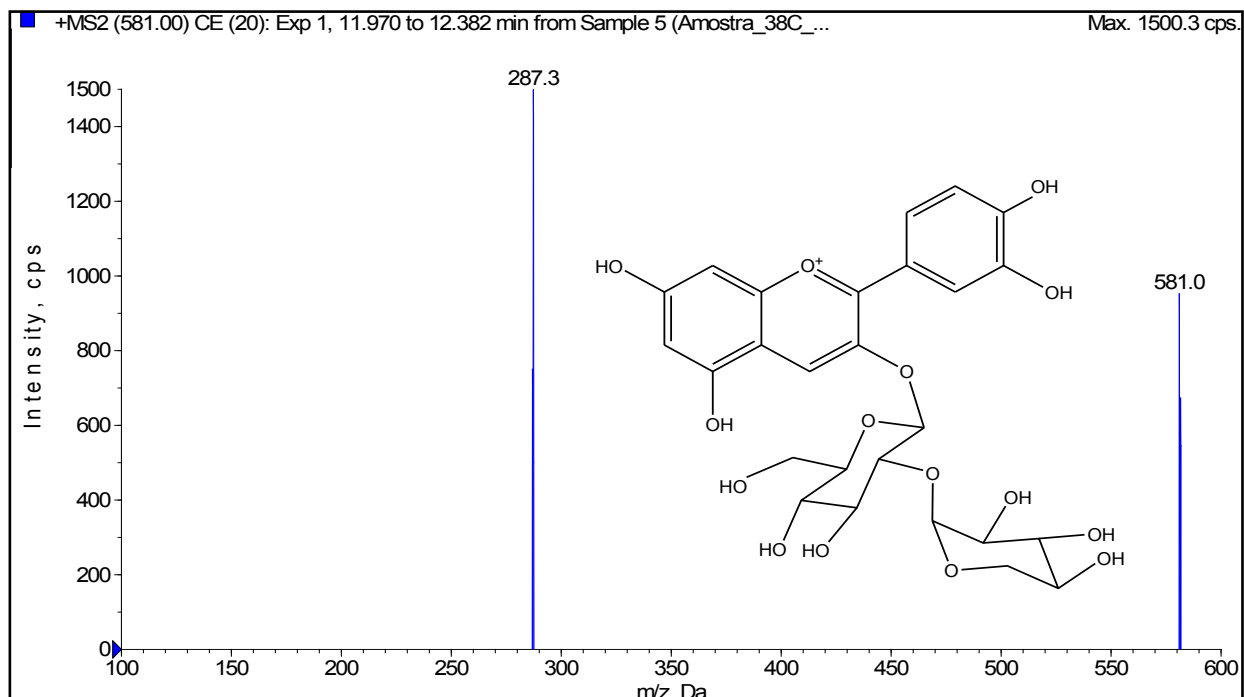
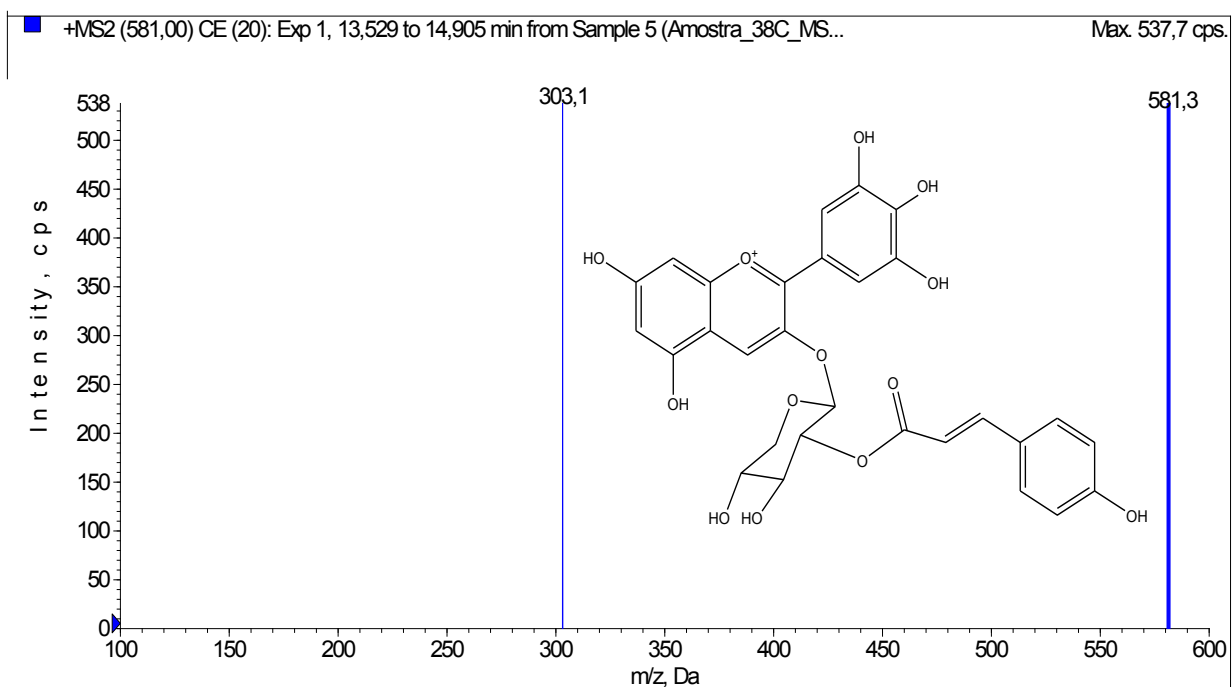


Figura 30 - Espectro de massas do íon precursor m/z 581 (tempo de retenção: 18,6) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da delphinidina-3-*O*-(cumaroil)-pentosídeo, compatível com os dados apresentados.



A fragmentação do íon precursor de m/z 773 mostra a eliminação de um fragmento neutro de 486 Da e a formação de um íon de m/z 287 $[M-486]^+$ que é característico de uma cianidina. Este íon pode corresponder a uma molécula de antocianina triglicosilada ou a uma molécula de antocianina ligada a um diglicosídeo conjugado com o ácido cafeico. Como o tempo de retenção desta substância foi maior que das antocianinas diglicosiladas (cianidina-3-O-soforosídeo, cianidina-3-O-laminaribiosídeo e cianidina-3-O-sambubiosídeo), concluiu-se que este íon corresponde a uma antocianina ligada a um diglicosídeo conjugado com o ácido cafeico que foi determinada como cianidina-3-O-(cafeoil)-diglicosídeo (Figura 31).

O íon precursor de m/z 433 corresponde a uma antocianina glicosilada. A fragmentação deste íon eliminou o fragmento neutro de 162 Da, gerando o íon produto de m/z 271 $[M-162]^+$. Esta antocianina foi identificada como pelargonidina-3-O-glicosídeo (Figura 32).

A fragmentação do íon precursor de m/z 565 gerou o íon produto de m/z 287 $[M-278]^+$. O fragmento neutro eliminado de 278 Da é referente a uma glicose ligada ao ácido málico. A antocianina foi identificada como cianidina-3-(maloil)-O-glicosídeo (Figura 33).

O íon precursor de m/z 623, após a fragmentação, gerou o íon produto de m/z 287 $[M-336]^+$. Houve a eliminação de um fragmento neutro de 336 Da, referente a uma unidade de sambubiose ligada a ácido acético. Estes dados indicam a identificação desta antocianina como cianidina-3-O-(acetoil)-sambubiosídeo (Figura 34).

A fragmentação do íon precursor de m/z 719 gerou o íon de m/z 557 $[M-162]^+$, o íon de m/z 395 $[M-162-162]^+$ e o íon de m/z 287 $[M-162-162-108]^+$ através da eliminação dos fragmentos neutros de 162 Da, 162 Da e 108 Da, respectivamente. Este fragmento de 108 Da é incomum para as antocianinas. O espectro de fragmentação está mostrado na Figura 35.

O íon precursor de m/z 573 apresentou dois picos em tempos de retenção diferentes: 21,4 minutos e 23,0 indicando que há dois isômeros dessas antocianinas. A fragmentação de desse íon, gerou o íon de m/z 303 $[M-270]^+$ através da eliminação de um fragmento neutro de 270 Da. Este fragmento é incomum para as antocianinas (Figura 36 e Figura 37).

Figura 31 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 773 (tempo de retenção: 16,6 min) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-(cafeoil)-diglicosídeo, compatível com os dados apresentados.

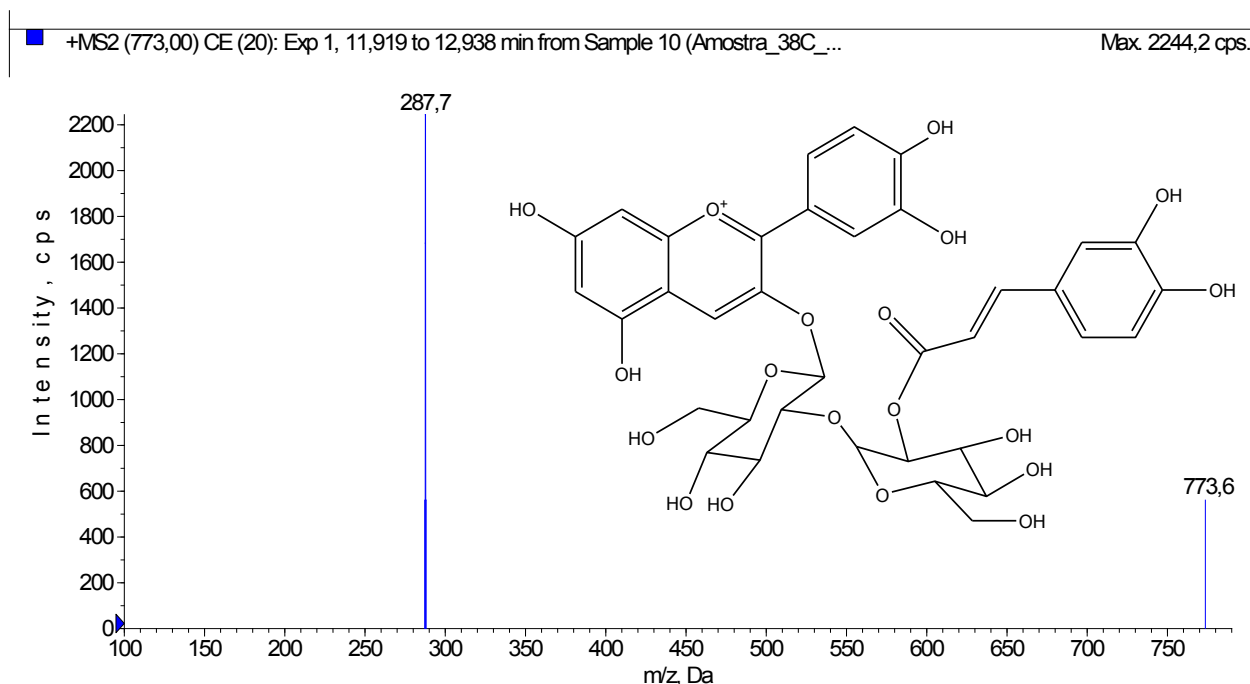


Figura 32 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 433 (tempo de retenção: 19,1 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da pelargonidina-3-O-glicosídeo, compatível com os dados apresentados.

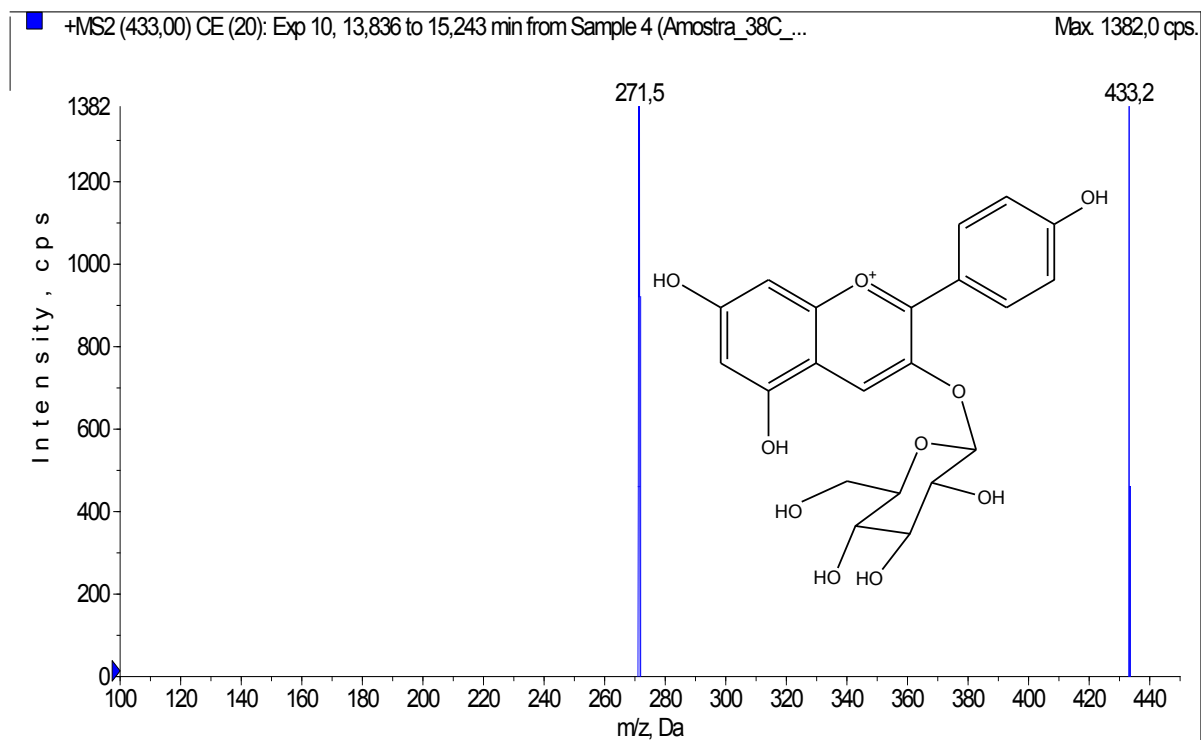


Figura 33 - Espectro de massas do íon precursor m/z 565 (tempo de retenção: 19,8 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-(maloil)-O-glicosídeo, compatível com os dados apresentados.

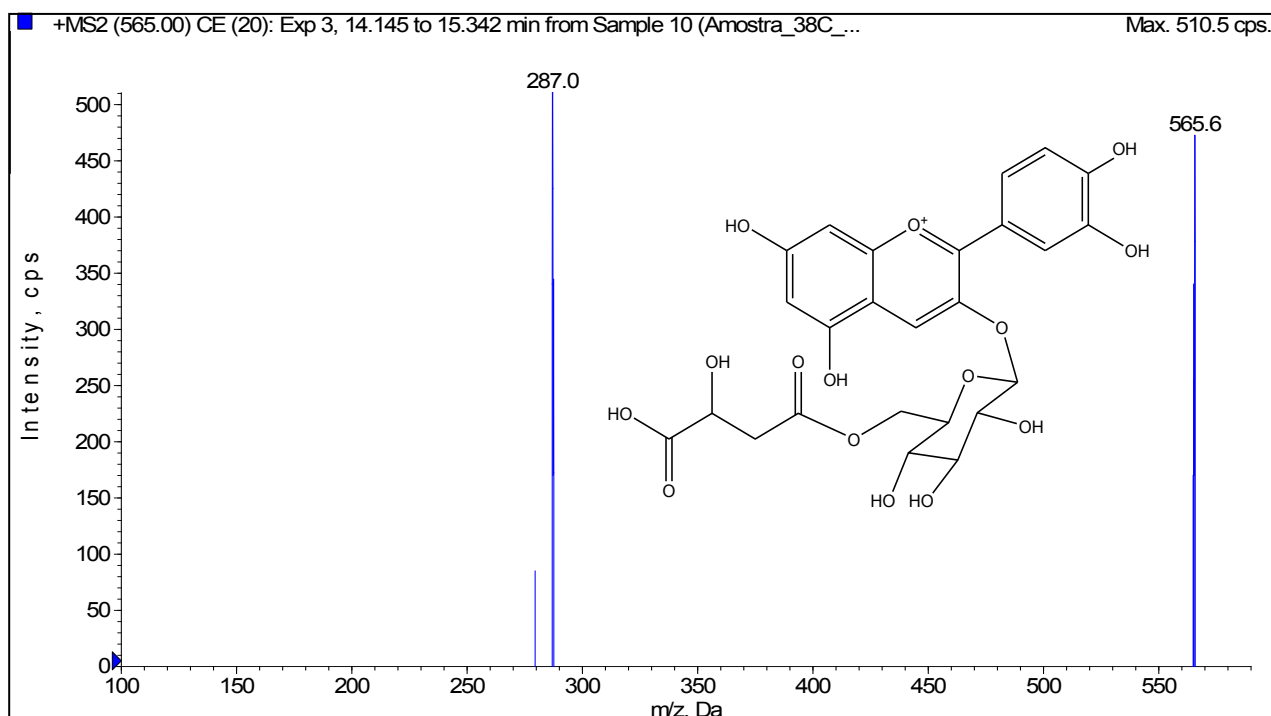


Figura 34 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 623 (tempo de retenção: 20,4 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-(acetil)-sambubiosídeo, compatível com os dados apresentados.

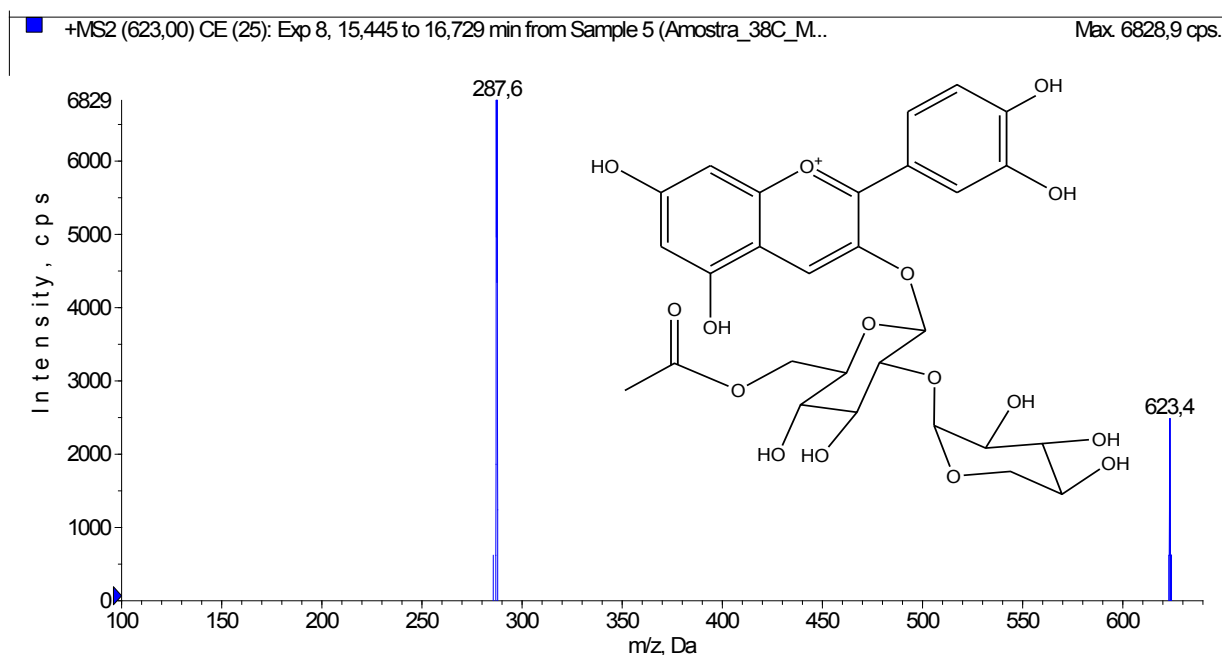


Figura 35 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 719 (tempo de retenção: 21,4 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e antocianina não-identificada.

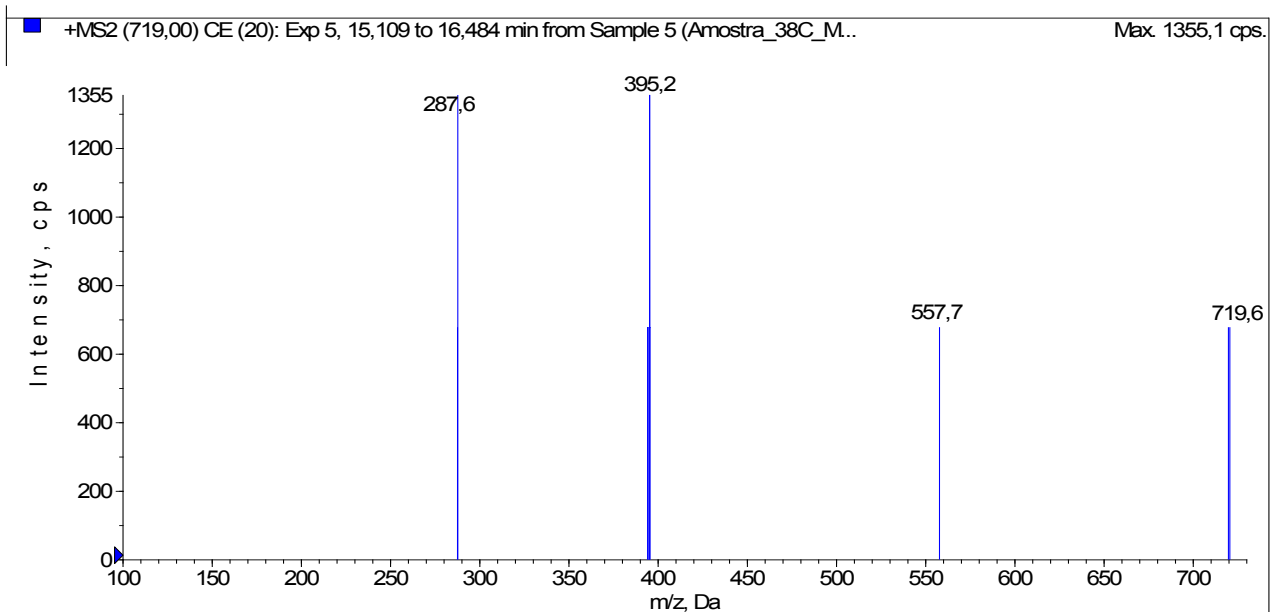


Figura 36 - Espectro de massas o íon precursor de m/z 573 (tempo de retenção: 21,4 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e antocianina não-identificada.

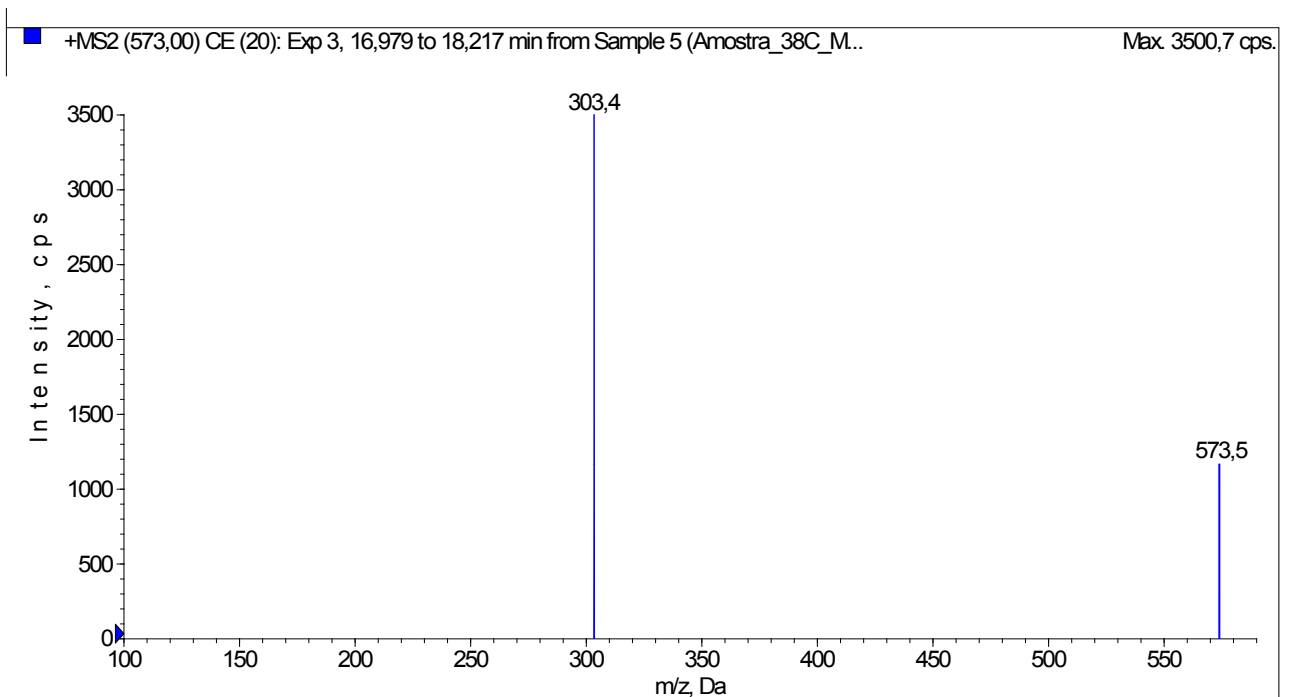
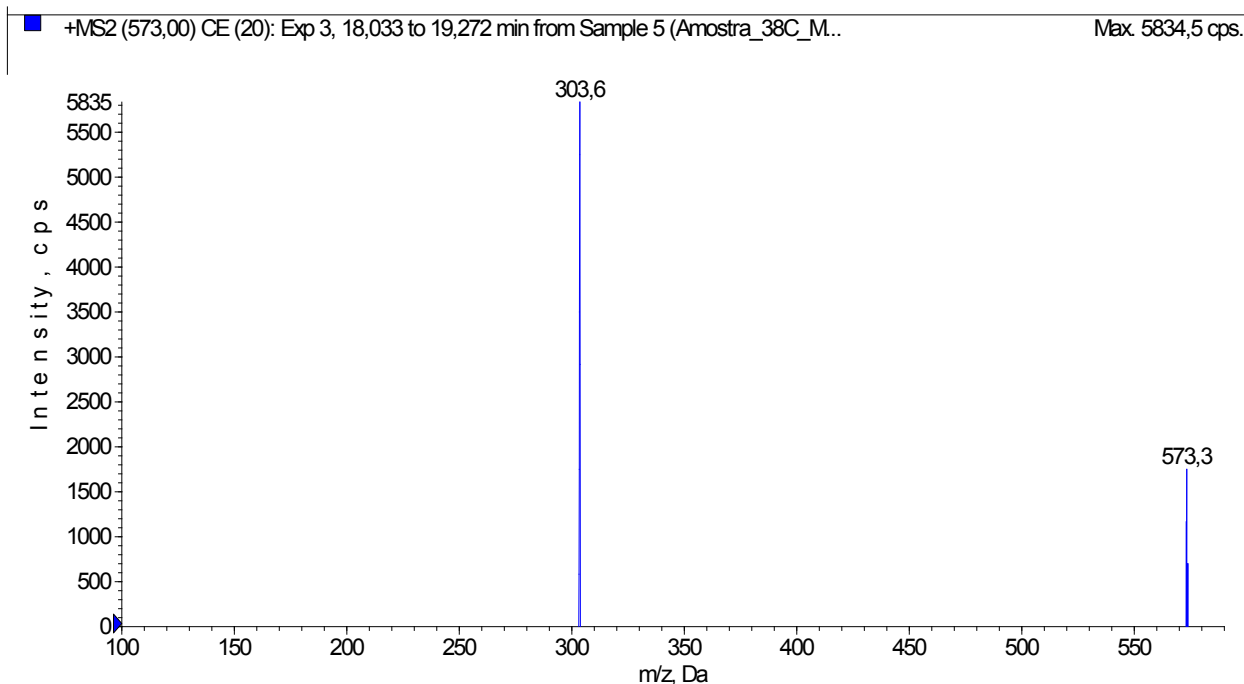


Figura 37 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 573 (tempo de retenção: 23,0 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e antocianina não-identificada.



A fragmentação do íon precursor de m/z 557 gerou o íon produto de m/z 287 $[M-270]^+$ e a eliminação de um fragmento neutro de 270 Da (Figura 38).

Apenas com os dados obtidos, não foi possível propor estruturas para as antocianinas com os íons precursores de m/z 719, 573 e 557. No entanto, foi possível identificá-las como antocianinas, pois os espectros fragmentação destes íons precursores apresentaram os íons produto de m/z 287, 303 e 287, respectivamente, característicos de cianidina (m/z 287) e delphinidina (m/z 303) e a perda de fragmentos neutros de 162 Da..

O íon precursor de m/z 419 é indicativo de uma cianidina-3-O-arabinosídeo, pois a fragmentação deste íon gerou o íon produto de m/z 287 $[M-132]^+$, indicando a eliminação de um fragmento neutro de 132 Da. Esta antocianina já foi identificada em *E. brasiliensis* (REYNERTSON et al., 2008; FLORES et al., 2012) (Figura 39).

Figura 38 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 557 (tempo de retenção: 24,9 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e antocianina não-identificada.

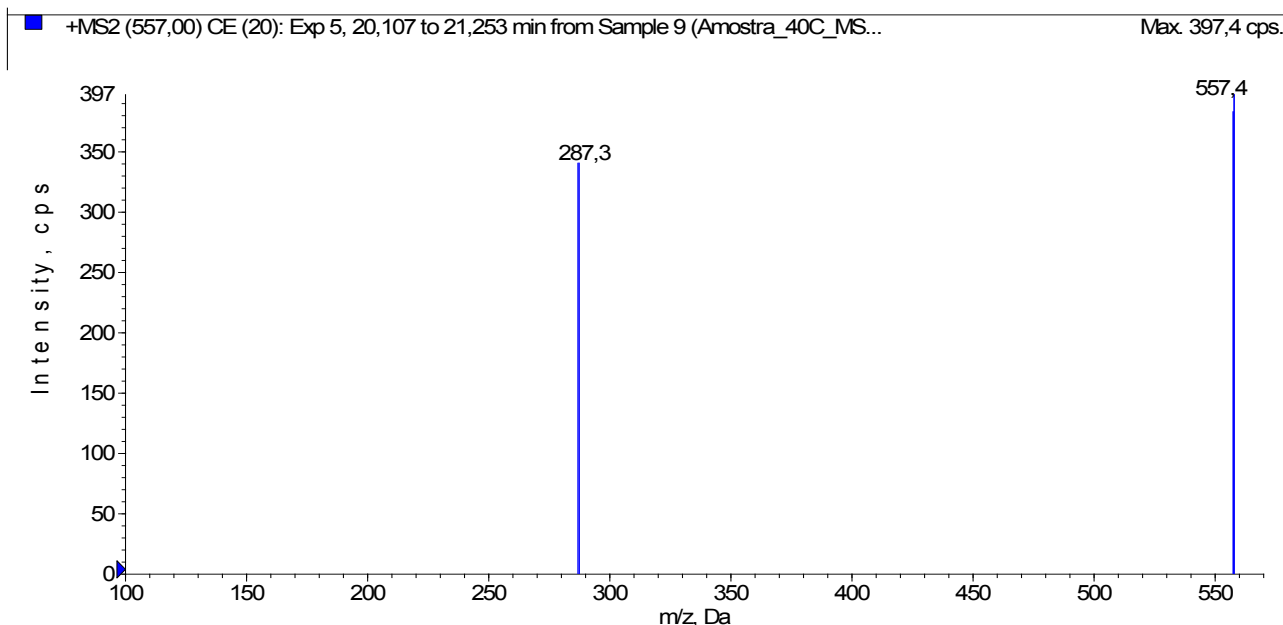
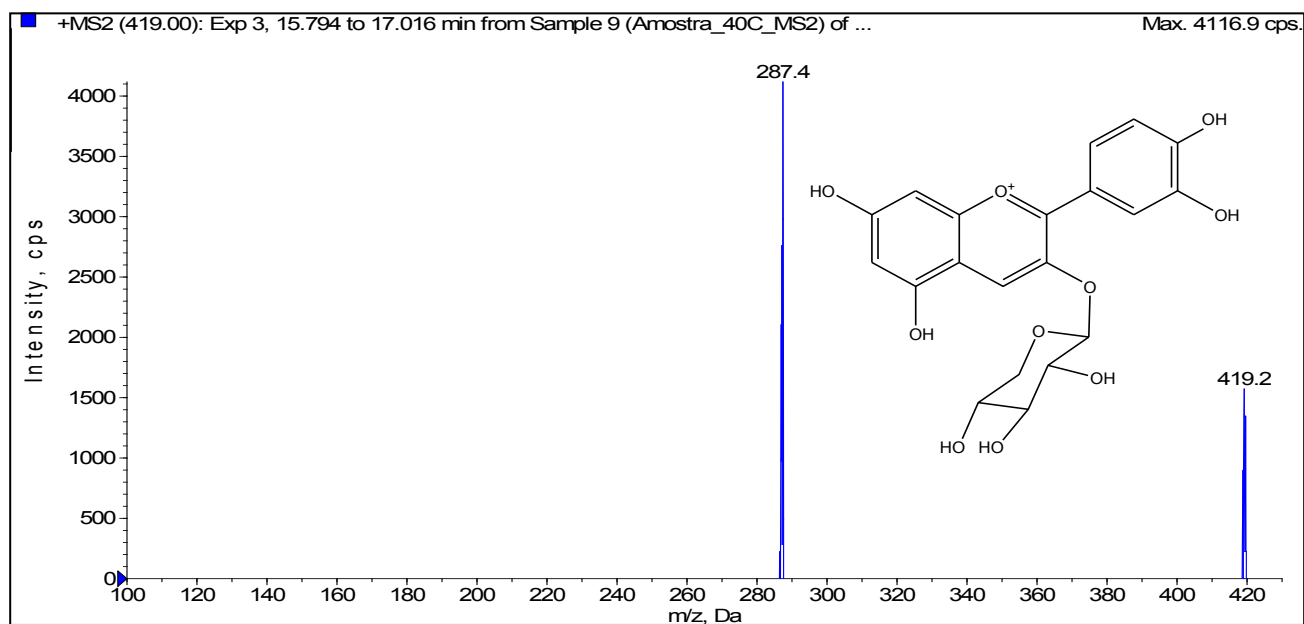


Figura 39 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 419 (tempo de retenção: 20,6 minutos) em modo positivo com energia de colisão 20 eV (condições de análise pag. 59 e pag. 63) e estrutura da antocianina cianidina-3-O-arabinosídeo, compatível com os dados apresentados.

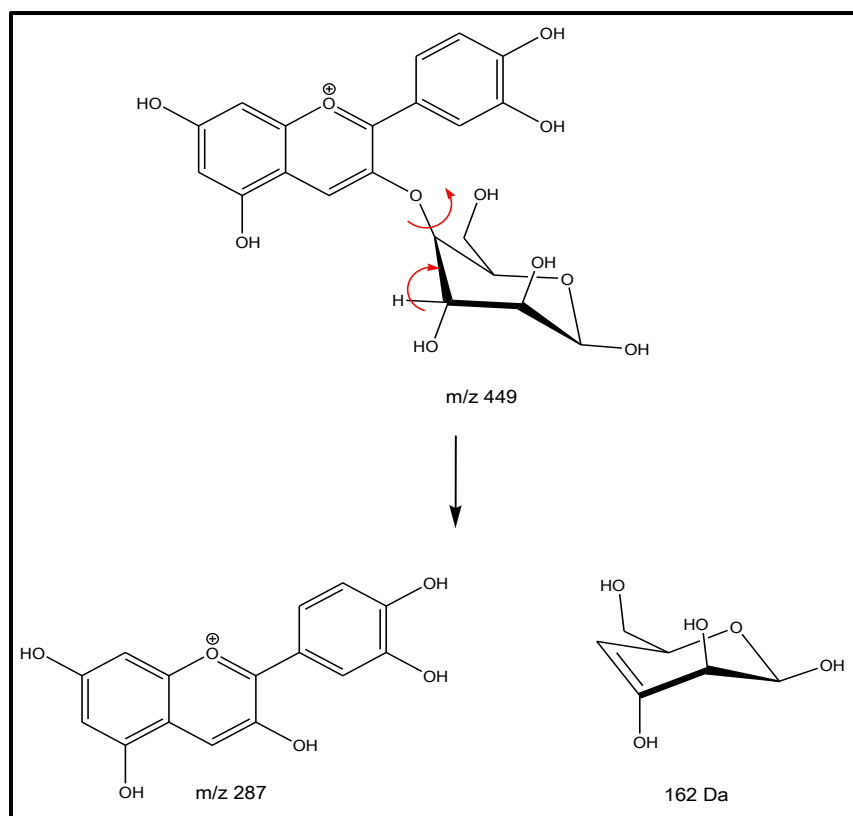


A última antocianina identificada no tempo de retenção de 25,4 minutos

foi a delphinidina.

De acordo com os fragmentogramas apresentados, em todos os casos ocorre a liberação de um fragmento neutro. Este fragmento forma-se devido a um Rearranjo 1,3 (Figura 40).

Figura 40 - Proposta de fragmentação para as antocianinas.



5.2 Validação do método analítico e quantificação das antocianinas

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo costuma ser denominado de validação (BRITO et al., 2003). De acordo com a resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Portanto, com o intuito de garantir a confiabilidade dos resultados analíticos foram determinados os principais parâmetros de validação do método: seletividade, linearidade,

intervalo de trabalho, limite de quantificação, limite de detecção, precisão, exatidão e robustez. O método validado neste trabalho é usado pelo grupo de pesquisa *Bioactive Natural Products and Phytochemicals (BNPP) Laboratory of Michigan State University* na separação cromatográfica de antocianinas (MULAGABAL et al., 2009b).

Devido ao fato dos padrões de antocianinas serem muito caros e ao fato das diferentes antocianinas apresentarem espectros no UV-vis muito semelhantes, neste trabalho, a validação do método foi realizada apenas com a antocianina cianidina-3-O-glicosídeo que é a antocianina majoritária nestes frutos identificada previamente por espectrometria de massas (item 5.1.1, pag. 82).

5.2.1 Seletividade

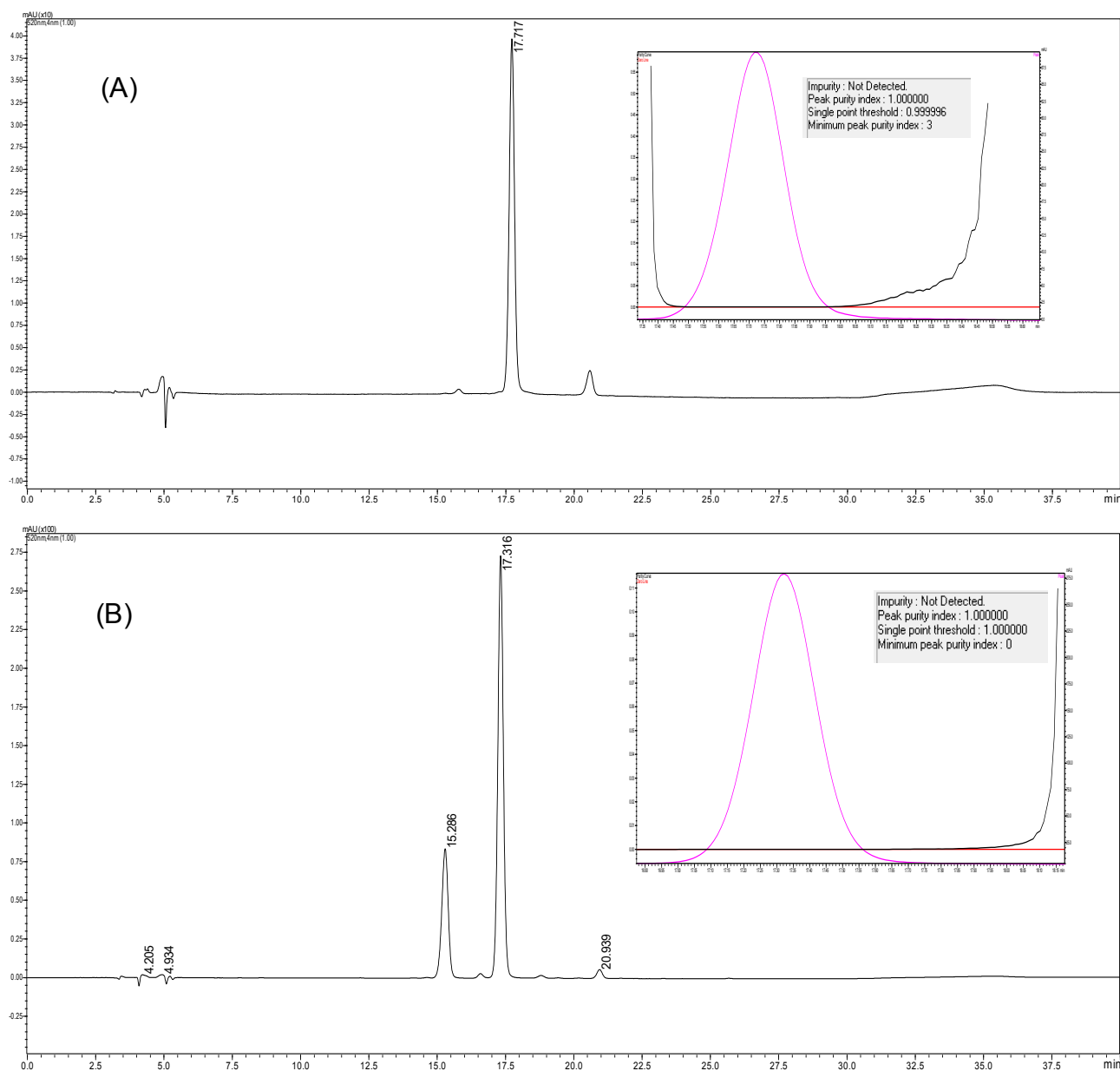
A seletividade de um método analítico avalia as substâncias de interesse na presença de componentes que possam interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Neste trabalho, a seletividade do método foi avaliada usando um detector de arranjo de diodos (DAD). Os resultados obtidos demonstram que o método é seletivo para as antocianinas, pois quando o espectro do pico da Cy-3g obtido na separação da amostra foi comparado com o do padrão, este pico obteve 100% de pureza igual ao padrão (Figura 41).

5.2.2 Linearidade, intervalo de trabalho, limite de quantificação e limite de detecção

Os valores das áreas dos picos obtidos para as seis soluções de trabalho nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ preparadas em triplicata injetadas em triplicata (9 injeções para cada concentração) foram submetidos ao Teste de Huber para a rejeição dos anômalos. Fazendo $k=2$ foram rejeitados 11, sendo 6 valores correspondentes à concentração de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 2 valores correspondentes à concentração de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e 3 valores

correspondentes à concentração de $50 \mu\text{g.g}^{-1}$ (MULAGABAL et al., 2009c; VALENTE, AUGUTO & RIEDO)

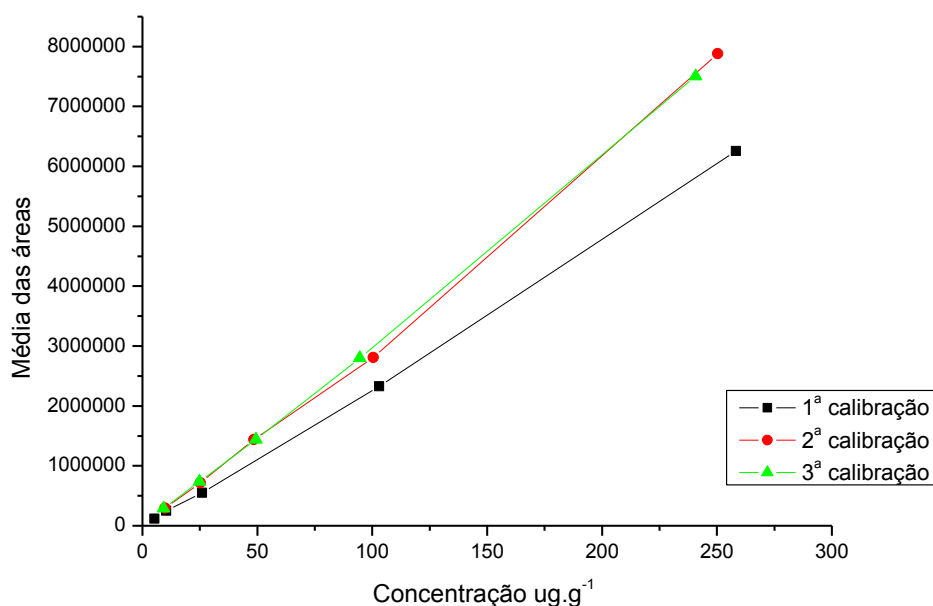
Figura 41 - Cálculo de pureza gerado pelo software LC Solutinos do pico de Cy-3g para o padrão (A) e para a amostra de *E. brasiliensis* (B). Coluna cromatográfica Phenomenex® C18-Hydro (250 x 4,6mm x d.i.; 4 μm), temperatura ambiente, fluxo de $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $20\mu\text{L}$. (condições cromatográficas veja tabela 4, pag. 67).



Os valores não rejeitados pelo Teste de Huber foram usados para construir as três curvas de calibração do padrão Cy-3g (Figura 42). As três curvas apresentaram coeficientes de correlação igual a 0,999, sendo que o

recomendado pela ANVISA é de no mínimo 0,99. Portanto, uma resposta diretamente proporcional à concentração foi obtida no intervalo estudado (4,91 a 249,76 $\mu\text{g g}^{-1}$). Embora todas as curvas apresentem coeficientes de correlação igual a 0,999, a primeira curva de calibração apresentou valores inferiores de área quando comparada com as outras duas curvas. Isso pode ter acontecido devido à falta de condicionamento da coluna cromatográfica.

Figura 42 - Resposta analítica (absorbância) em função das diferentes concentrações das soluções de Cy-3g.



A partir dos parâmetros obtidos das curvas de calibração, foi possível determinar o limite de quantificação e o limite de detecção (Equação 4). Os valores do limite de quantificação (LQ) e do limite de detecção da Cy-3g foram de $9,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $2,7 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente.

Equação 4: Cálculo do limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).

$$LQ = \frac{DP_c \cdot 10}{IC} \qquad LD = \frac{DP_c \cdot 3}{IC}$$

LQ: limite de quantificação
 LD: limite de detecção
 DP_c : desvio padrão
 IC: inclinação da reta as para três curvas

Fonte: ANVISA

5.2.3 Precisão

A precisão de um método analítico pode ser avaliada de acordo com a repetitividade (precisão intra-corrída), a precisão intermediária (precisão inter-corrída) e a reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) e é expressa pelo coeficiente de variação (CV) de uma série de medidas (Equação 5). No entanto, neste trabalho, a precisão foi avaliada considerando apenas a repetibilidade e a precisão intermediária.

Equação 5: Cálculo do coeficiente de variação.

$$CV = \frac{DP_c \cdot 100}{CMD}$$

CV: coeficiente de variação DP _c : desvio padrão CMD: concentração média determinada

Fonte: ANVISA

A repetitividade do método foi avaliada em nove determinações, ou seja, em três concentrações baixas (25 µg.g⁻¹), em três concentrações médias (50 µg.g⁻¹) e em três concentrações altas (100 µg.g⁻¹), cada uma injetada em triplicata. A avaliação da precisão intermediária foi realizada em dias diferentes e em equipamentos diferentes. Os valores obtidos estão mostrados na tabela 7.

Tabela 7: Precisão do método cromatográfico*.

Concentração da Cy-3g	CV da área do pico (%)	CV da área do pico (%)
	Repetitividade	Precisão intermediária
25 µg.g ⁻¹	2,7	1,5
50 µg.g ⁻¹	1,3	1,7
100 µg.g ⁻¹	1,7	3,4

*Coluna cromatográfica Phenomenex® C18-Hydro (250 x 4,6mm x d.i.; 4 µm), temperatura ambiente, fluxo de 0,75 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20µL. (condições cromatográficas veja tabela 4, pag. 70).

A RE n° 899 de 2003 determina que o valor máximo aceitável para o coeficiente de variação é de 5%. Como pode ser observado na Tabela 7, todos os valores ficaram abaixo do valor recomendado (ANVISA).

5.2.4 Exatidão

De acordo com RE n° 899 de 2003, os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência certificados; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI, et al., 2004).

O uso de materiais de referências certificados seria a primeira escolha para avaliar a exatidão de um método, porém muitas vezes não há estes materiais para a amostra analisada e quando há eles são muito caros. Por esta razão, neste trabalho, a exatidão do método foi avaliada por ensaios de recuperação para o padrão Cy-3g, que apresenta resposta analítica muito similar ao das antocianinas identificadas por espectrometria de massas.

As análises de exatidão foram realizadas em três diferentes níveis de concentração: 5 µg.g⁻¹; 25 µg.g⁻¹ e 100 µg.g⁻¹ e em triplicata para cada nível. Essas análises foram realizadas usando o extrato metanólico dos frutos verdes da espécie *Eugenia brasiliensis*, pois as outras espécies possuem um perfil cromatográfico similar ao da espécie escolhida.

O cálculo da exatidão foi realizado seguindo a equação 6.

Equação 6: Cálculo da exatidão do método.

$$\%R = \frac{(Cf - Cnf)}{Cp} * 100$$

%R: recuperação

Cf: concentração da amostra fortificada

Cnf: concentração da amostra não fortificada (branco)

Cp: Concentração do padrão adicionado

Fonte: ANVISA

Os valores médios obtidos (média±DP; n=3) para o teste de exatidão nos três níveis e os respectivos desvios padrão estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Exatidão do método cromatográfico*.

	% Recuperação		
	5 µg.g ⁻¹	25 µg.g ⁻¹	100 µg.g ⁻¹
	101	122	130
	71	109	133
	108	124	94
Média±DP	94±15	118±6	119±14
CV**	16,1	5,3	14

*Coluna cromatográfica Phenomenex® C18-Hydro (250 x 4,6mm x d.i.; 4 µm), temperatura ambiente, fluxo de 0,75 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20µL. (condições cromatográficas veja tabela 4, pag. 70).

**CV – Coeficiente de variação

Estes resultados também estão de acordo com os limites aceitos (CV menor que 20%) para o intervalo de concentração estudado (RIBANI et al., 2004).

5.2.5 Robustez

A fim de avaliar a robustez do método analítico pequenas variações dos parâmetros analíticos como tipo coluna e marca do solvente foram realizadas.

a) Coluna

Foram feitas análises com coluna cromatográfica *Phenomenex*® C18-Hydro (250 x 4,6mm; d.i.; 4 µm) e com coluna cromatográfica *Phenomenex*® C18 Gemini (250 x 4,6mm; d.i.; 5 µm). Os resultados quantitativos estão mostrados na Tabela 9.

b) Marca do solvente

A fase orgânica deste método cromatográfico consiste de 48,5% de acetonitrila. Por esta razão, foram testadas duas marcas de acetonitrila: JTBaker® e Tedia. Os resultados quantitativos estão mostrados a seguir (Tabela 10).

Tabela 9: Robustez com colunas diferentes.

	Fator de resposta de Cy-3g no padrão	Concentração de Cy-3 na amostra (mg.g⁻¹)
Coluna C18-Hydro	12213	3,3
	12673	3,3
	12701	3,3
Coluna C18 Gemini	10421	3,3
	10594	3,3
	10997	3,3
Média	11600	3,3
CV	8%	0

Tabela 10: Valores da robustez com marcas de solventes diferentes. Coluna cromatográfica Phenomenex® C18-Hydro (250 x 4,6mm x d.i.; 4 µm).

	Fator de resposta de Cy-3g no padrão	Concentração de Cy-3 na amostra (mg.g⁻¹)
Solvente A	12213	3,3
	12673	3,3
	12701	3,3
Solvente B	12351	3,7
	13007	3,7
	12903	3,7
Média	12716	3,5
CV	2%	5%

Com base no teste de robustez realizado com colunas diferentes, pode-se perceber que não houve nenhuma diferença quantitativa em relação à

determinação da concentração do analito Cy-3g na amostra, enquanto em relação à concentração do padrão Cy-3g, houve uma variação de 8%. O teste realizado com solvente de marcas diferentes apresentou uma variação pouco significativa.

As variações apresentadas nos parâmetros avaliados podem ter ocorrido devido à ausência de padrão interno, ao uso de balança e vidraria não calibradas e à falta de condicionamento da coluna cromatográfica. Neste método, não foi usado um padrão interno devido à dificuldade em se obter um padrão que fosse solúvel no solvente utilizado e que absorvesse na região do visível como as antocianinas.

A fim de garantir a confiabilidade dos dados obtidos para os parâmetros avaliados foi injetado o branco dos padrões e das amostras.

A partir de todos os ensaios de validação realizados, pode-se garantir que o método analítico para a determinação de antocianinas nos extratos vegetais encontra-se validado e, portanto, pode ser seguramente aplicado em laboratórios de controle. No entanto, é importante salientar que a validação deste método foi realizada apenas em um laboratório e que para uma validação completa são necessários estudos interlaboratoriais.

5.2.6 Quantificação das antocianinas

Após a determinação dos parâmetros de validação, o procedimento foi aplicado aos extratos metanólicos de duas espécies de *Eugenia* contendo antocianinas.

Os perfis cromatográficos (Figura 18, pag. 79) das espécies analisadas mostraram que elas possuem pelo menos 20 antocianinas. Porém, somente as antocianinas majoritárias, delphinidina-3-O-glicosídeo e cianidina 3-O-glicosídeo foram quantificadas (Figura 43). Os resultados obtidos (média±DP; n=3) estão apresentados na Tabela 11. Os resultados estão expressos em miligramas de antocianinas por grama de fruto fresco e demonstram a precisão da metodologia descrita.

De acordo com os resultados apresentados, a espécie *Eugenia brasiliensis* é a espécie que possui maior concentração de antocianinas e o

método validado para esta espécie pode ser usado para quantificar antocianinas presentes em outras espécies do mesmo gênero.

Figura 43 – Antocianinas majoritárias nas amostras de *E. brasiliensis* e *E. involucrata*. Coluna cromatográfica Phenomenex® C18-Hydro (250 x 4,6mm x d.i.; 4 µm), temperatura ambiente, fluxo de 0,75 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20µL. (condições cromatográficas veja tabela 4, pag. 70).

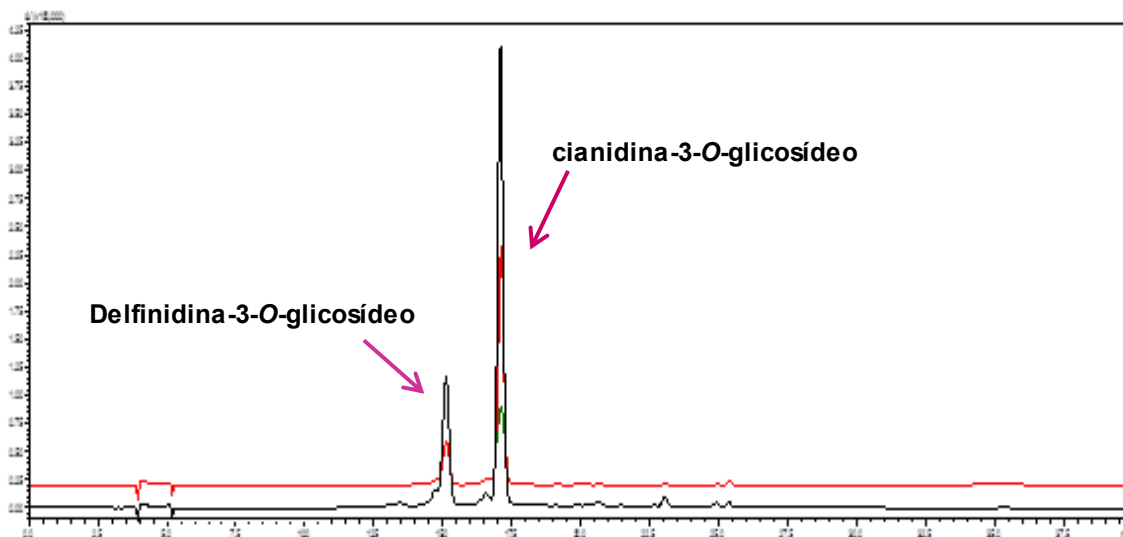


Tabela 11: Quantificação das antocianinas majoritárias presentes nas amostras de *E. brasiliensis* e *E. involucrata*.

Espécies	Média do teor de antocianinas (mg.g ⁻¹) ± DP; n=3	
	delfinidina-3-O-glicosídeo	cianidina-3-O-glicosídeo
<i>Eugenia brasiliensis</i>	1,15 ± 0,15	3,01± 0,32
<i>Eugenia involucrata</i>	0,58 ± 0,08	2,02± 0,18

A validação de um método cromatográfico para quantificar antocianinas presentes em extratos vegetais é de suma importância, pois como as antocianinas possuem atividade quimiopreventiva a informação sobre o teor dessas substâncias em frutos agrega valor ao estudo de bioprospecção das espécies estudadas. A cianidina-3-O-glicosídeo, que é a antocianina majoritária presente em *E. brasiliensis* e *E. involucrata*, possui atividade de indução das enzimas glutathione redutase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase que são enzimas, indução da enzima de fase II - quinona redutase, inibição da lipoperoxidação e inibição das ciclo-oxigenases. A delfinidina-3-O-glicosídeo, a

segunda antocianina majoritária em *E. brasiliensis* e *E. involucrata*, inibe o crescimento de diversas linhagens cancerígenas, inibe a lipoperoxidação e inibe as ciclo-oxigenases (SHIH, YEH, YEN, 2007; MULABAGAL et al., 2007; VAREED et al., 2006).

No entanto, não foram feitos estudos comparativos com frutos coletados em locais diferentes e este fator pode ser importante para a quantificação de antocianinas. Assim, dependendo dos objetivos da quantificação, análises adicionais podem ser necessárias para a obtenção de dados complementares.

5.3 Estudo químico das folhas de *Eugenia brasiliensis*

O estudo químico das folhas de *Eugenia brasiliensis* resultou no isolamento de cinco substâncias, sendo um dissacarídeo, duas flavanonas, uma di-hidrochalcona e uma lignana. A proposta estrutural de cada substância foi efetuada com base nas análises dos dados espectrométricos de RMN de ^1H e de ^{13}C unidimensionais.

5.3.1 Dados espectrométricos das substâncias isoladas

-Substância 1: RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ 5,38 (1H; d; $J= 4,0$ Hz; H-1'), 4,08 (1H; d; $J= 8,0$ Hz; H-1), 4,01 (t; $J= 8,0$ Hz), 3,81-3,68 (m), 3,62 (dd; $J= 12$ e 22), 3,42 (dd; $J= 4$ e 9,75 Hz). RMN de ^{13}C (300 MHz, CD_3OD): δ 105,3 (C-1'), 93,6 (C-1), 83,8; 79,4; 75,7; 74,6; 74,4; 73,2; 71,4; 64,0; 63,4 e 62,2.

-Substância 2: RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD): δ 11,98 (1H; s; OH), 7,43 (5H; m; H-1'- H-6'), 5,94 (1H; s; H-8), 5,46 (1H; dd; $J= 3,0$ e 12 Hz, H-2), 3,05 (1H; dd; $J= 12$ e 17 Hz; H-3a), 2,80 (1H; dd; $J= 3$ e 17 Hz; H-3b), 1,96 (3H, s; CH_3 -6). RMN de ^{13}C (300 MHz, CD_3OD): δ 197,7 (C-4), 163,0 (C-7), 161,4 (C-5), 140,7 (C-1'), 129,7 (C-2' e C-6'), 129,5 (C-4'), 127,2 (C3'e C-5'), 104, 7 (C-6), 103, 5 (C-10), 96,4 (C-8), 80,1 (C-2), 44,1 (C-3), 7,7 (CH_3 -6).

-Substância 3: RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ 7,42 (5H; m; H-1'- H-6'), 5,43 (1H; dd; $J= 3,0$ e 13 Hz; H-2), 3,05 (1H; dd; $J= 13$ e 17 Hz; H-3a), 2,80 (1H; dd; $J= 3$ e 17 Hz; H-3b), 2,01 (3H; s; CH_3 -8), 1,999 (3H; s; H-6). RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3): δ 160,7 (C-5 e/ou C-7), 138,9 (C-1'), 128,8 (C-2'e C-6'), 128,6 (C-4'), 125,9 (C-3'e C-5'), 102,9 (C-6), 102,0 (C-8), 78,7 (C-2), 43,5 (C-3), 7,6 (CH_3 -6), 6,8 (CH_3 -8).

-Substância 4: RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD): δ 14,16 (1H; s; OH-2'), 7,20 (5H; m; H-1- H-6), 5,98 (1H; s; H-5'), 3,81 (3H; s; OCH_3 -4'), 3,26 (2H; t; $J= 8,0$ Hz; H- α), 2,93 (2H; t; $J= 8,0$ Hz; H- β), 1,94 (3H; s; CH_3 -3'). RMN de ^{13}C (300 MHz, CD_3OD): δ 205,7 (C=O), 165,9 (C-4'), 163,9 (C-6'), 162,5 (C-2'), 143,1 (C-1), 129,4 (C-2 e C-6; C-3 e C-5), 126,9 (C-4), 105,7 (C-1'), 104,9 (C-3'), 91,1 (C-5'), 55,9 (OCH_3 -4'), 47,0 (C- α), 32,3 (C- β), 7,3 (CH_3 -3').

-Substância 5: RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ 6,75 (1H; s; H-2'), 6,74 (1H; s; H-2), 6,60 (1H; s; H-5), 6,57 (1H; s; H-5'), 3,86 (3H; 1s; OCH_3 -3'), 3,86 (3H; 1s; OCH_3 -3), 2,63 (1H; dd; $J= 7,5$ e 14 Hz; H-7'a), 2,42 (1H; d; $J= 14$ Hz; H-7'b), 2,24 (1H; dd; $J= 10$ e 13,5 Hz; H-7b), 2,04 (1H; d; $J= 13,5$ Hz; H-7a), 1,91 (1H; m; H-8'), 1,82 (1H; m; H-8), 1,02 (3H; d; $J= 7,5$ Hz; H-9), 0,80 (3H; d; $J= 7,5$ Hz; H-9'). RMN de ^{13}C (500 MHz, CD_3OD): δ 148,5 (C-3'), 147,4 (C-3), 145,3 (C-4), 145,0 (C-4'), 135,5 (C-6 e C-6'), 134,4 (C-1'), 130,2 (C-1), 117,3 (C-5), 117,0 (C-5), 116,5 (C-2'), 113,3 (C-2), 56,6 (OCH_3 -3'), 56,5 (OCH_3 -3), 41,8 (C-8), 39,7 (C-7'), 36,0 (C-7), 34,9 (C-8'), 22,0 (C-9), 12,7 (C-9').

5.3.2 Substância 1: dissacarídeo

A substância 1 foi obtida após o fracionamento por CCDP [CHCl_3 : MeOH : H_2O (10:5:0,5)] da fração Fr_1 (pag. 68). O espectro de RMN de ^{13}C 12 sinais indicando que a substância em estudo é um diglicosídeo.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 51, pag. 120) possui sinais de dois hidrogênios anoméricos δ_{H} 5,38 (d, $J= 4$ Hz, H-1') e δ_{H} 4,08 (d, $J= 8$ Hz, H-1). A constante de acoplamento de 4 Hz observada para o primeiro sinal sugere configuração α para esta unidade e a constante de acoplamento de 8 Hz

sugere configuração β para segunda unidade. Segundo dados encontrados na literatura, os hidrogênios anoméricos de monossacarídeos, principalmente glicose e galactose, com configuração α apresentam dubletos com deslocamentos químicos em torno de δ_H 4,8 - 5,3 e constante de acoplamento numa faixa de 1-4 Hz, enquanto que hidrogênios anoméricos com configuração β , desses mesmos monossacarídeos, apresentam dubletos com deslocamentos químicos em torno de δ_H 4,4 - 4,8 e constante de acoplamento numa faixa de 6-8 Hz (AGRAWAL,1992).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 52, pag. 121) apresenta dez sinais de carbonos metínicos e metilênicos (δ 83,8 a 62,2) e dois sinais característicos de carbonos anoméricos δ_C 105,3 (C-1') e δ_C 93,6 (C-1). Análises de RMN de ^{13}C para monossacarídeos e dissacarídeos indicam que os carbonos metínicos e metilênicos possuem sinais em uma faixa de δ 51-86 e que carbonos anoméricos livres, ou seja, que não estão ligados a nenhuma aglicona, provenientes de O-glicosídeo apresentam sinais numa faixa de δ 90-98, enquanto que carbonos anoméricos O-ligados a uma segunda unidade glicosídica apresentam sinais entre δ_C 98-112. Com base nestas informações, o sinal em δ_C 105,3 pode ser atribuído à segunda unidade glicosídica enquanto que o sinal em δ_C 93,6 pode ser atribuído à primeira unidade (AGRAWAL, 1992).

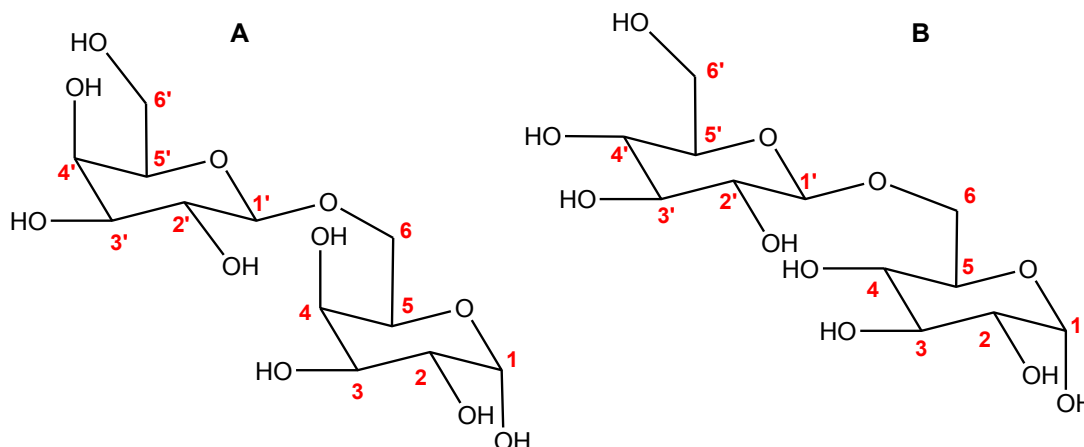
Com base nestes dados, pode-se concluir que a substância em questão é constituída por duas unidades de glicose, ou por duas unidades de galactose, ou ainda, uma unidade de glicose e uma de galactose. O dissacarídeo formado por uma unidade de glicose e uma de galactose é conhecido como lactose e é encontrado principalmente no leite. Portanto, sugere-se que seja mais provável que esta substância seja constituída por duas unidades de galactose, ou por duas unidades de glicose (Figura 44).

As informações obtidas a partir dos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C não foram suficientes para estabelecer todos os sinais aos respectivos átomos de hidrogênio e carbono.

É importante salientar que não há relatos na literatura de carboidratos isolados de *Eugenia brasiliensis*. Essa informação agrega importância ao estudo químico e biológico da espécie em estudo, pois os carboidratos são essenciais para diversos processos biológicos, incluindo o metabolismo

energético. Alguns carboidratos como D-glicose, D-frutose, D-galactose e lactose são usados como combustível pelo organismo enquanto que carboidratos como o glicogênio são considerados reservas energéticas (PEREIRA, 2011).

Figura 44 - Propostas estruturais da substância **1**: **(A)** - galactopiranosil-(1→6)-galactopiranosídeo e **(B)** - glicopiranosil-(1→6)-glucopiranosídeo



5.3.3 Substâncias **2** e **3**: (S)-7,5-di-hidroxi-6-metilflavanona e (S)-7,5-di-hidroxi-6,8-di-metilflavanona

- Substância **2**: (S)-7,5-di-hidroxi-6-metilflavanona

A substância **2** foi obtida após o fracionamento por CCDP [hexano:acetona (6:1)] do subgrupo A4-I (pag. 72).

O espectro de ^1H (Figura 53, pag. 122) apresenta sinais característicos de uma flavanona: um hidrogênio metínico em δ_{H} 5,46 (dd; $J = 3$ e 12 Hz, H-2) e dois hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,05 (dd, $J = 12$ e 17 Hz, H-3a) e em δ_{H} 2,80 (dd, $J = 3$ e 17 Hz, H-3b). As constantes de acoplamento indicam que estes três hidrogênios acoplam entre si. Foi observado um sinal de uma hidroxila em δ_{H} 11,98 (s) referente à OH-5 quelada com a carbonila na posição 4, de outro hidrogênio metínico em δ_{H} 5,94 (s, H-8) e de uma metila δ_{H} 1,96 (s, CH_3 -6). Os sinais descritos são provenientes dos anéis A e C do núcleo flavonoídico. Os

sinais referentes ao anel B foram observados em δ_H 7,43 (m, H-1'-H-6'), integrando para 5 hidrogênios, indicando que este anel é monossustituído.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 54, pag. 123) mostra os sinais de um carbono metínico sp^3 em δ_C 80,1 (C-2) e um carbono metilênico sp^3 em δ_C 44,1(C-3). Estes sinais são característicos de uma flavanona. Foi também observado o sinal de uma carbonila em δ_C 197,7 (C-4), os sinais de dois carbonos quaternários sp^2 oxigenados em δ_C 163,0 (C-7) e em δ_C 161,4 (C-5), os sinais de dois carbonos quaternários sp^2 em δ_C 104,7 (C-6) e em δ_C 103,5 (C-10), o sinal de um carbono metínico sp^2 em δ_C 96,4 (C-8), o sinal de um grupo metílico em δ_C 7,7 (CH₃-6) e sinais de seis carbonos metínicos sp^2 de um sistema aromático monossustituído em δ_C 140,7 (C-1'); 129,7 (C-2' e C-6'); 129,5 (C-4') e 127,2 (C-3' e C-5'). O sinal para o carbono quaternário sp^2 na posição C-9 não foi observado.

O espectro de dicroísmo circular evidencia configuração (S) para flavanonas quando mostra efeito Cotton positivo em 320 nm referente a transição $n \rightarrow \pi^*$ e efeito efeito Cotton negativo em 290 nm referente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Já a configuração (R) é associada a um efeito Cotton negativo em 320 nm referente a transição $n \rightarrow \pi^*$ e um efeito efeito Cotton positivo em 290 nm referente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (ALLARD et al., 2011). O espectro de DC obtido para a substância **2** (Figura 45) apresenta um efeito negativo na região de 290 nm e um efeito positivo em 320 nm, portanto a configuração absoluta dessa substância é (S).

As informações obtidas foram comparadas com os dados da literatura, e isso possibilitou propor a estrutura (S)-7,5-di-hidroxi-6-metilflavanona para a substância **2** (Figura 46).

Figura 45 - Espectro de Dicroísmo Circular para a substância **2**

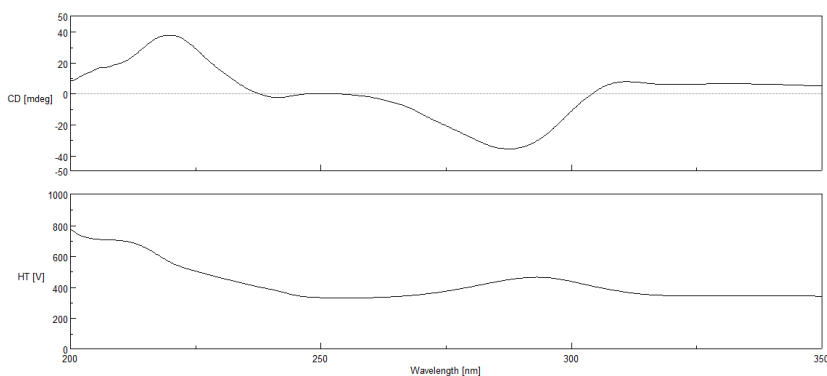
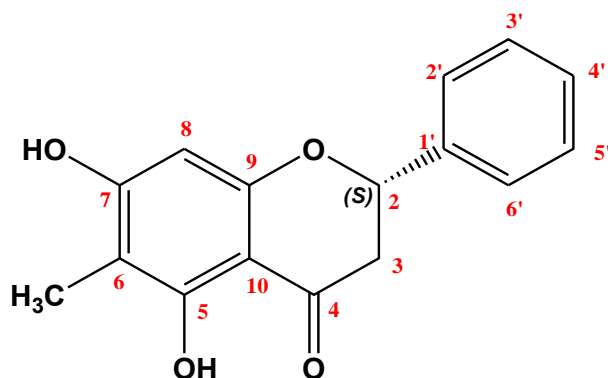


Figura 46 - Proposta estrutural da substância 2



O levantamento bibliográfico realizado na base de dados SciFinder mostrou que a substância **2** foi encontrada em 2 espécies: *Myrica gale* (Myricaceae) (FANG, PAETZ & SCHNEIDER, 2011) e *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae), espécie pertencente à mesma família da espécie em estudo. Os extratos contendo a substância **2** possuem atividade antioxidante e anti-*Mycobacterium*, bactéria causadora de tuberculose (PAVAN et al., 2009). Da espécie em estudo, esta é a primeira vez em que a substância **2** foi isolada.

-Substância **3**: 7,5-di-hidroxi-6,8-di-metilflavanona

A substância **3** foi obtida após o fracionamento por CCDP [hexano:acetona (6:1)] do subgrupo A4-I (pag. 72).

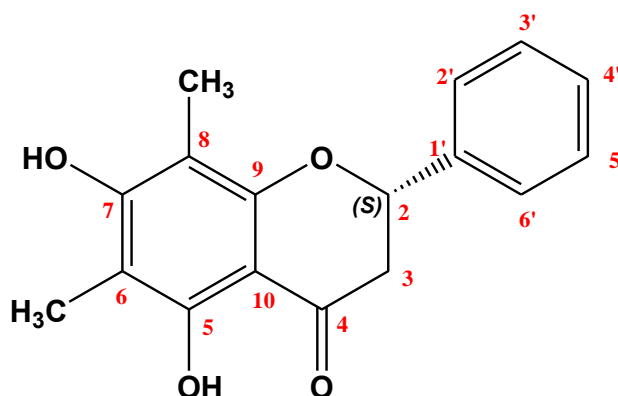
O espectro de ^1H (Figura 55, pag. 124) da substância **3** também possui sinais característicos de uma flavanona, pois apresenta um hidrogênio metínico em δ_{H} 5,43 (dd; $J= 3$ e 13 Hz, H-2) e dois hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,05 (dd, $J= 13$ e 17 Hz, H-3a) e em δ_{H} 2,80 (dd, $J= 3$ e 17 Hz, H-3b). Foram observados dois sinais de metila em δ_{H} 2,01 (s, CH_3 -8) e em δ_{H} 2,00 (s, CH_3 -6), indicando que o anel A é totalmente substituído. Os sinais descritos são provenientes dos anéis A e C do núcleo flavonoídico. Os sinais referentes ao anel B foram observados em δ_{H} 7,42 (m, H-1'-H-6'), integrando para 5 hidrogênios, indicando que, assim como para a substância **2**, este anel é monossustituído. Foi observado um sinal pouco intenso em δ_{H} 12,26 referente à hidroxila na posição 5 quelada com a carbonila na posição 4.

O espectro de ^{13}C (Figura 56, pag. 125) mostrou os sinais de um carbono metínico sp^3 em δ_{C} 78,7 (C-2) e um carbono metilênico sp^3 em δ_{C} 43,5 (C-3) sugerindo que esta estrutura é uma flavanona.

Foi observado um sinal de carbono sp^2 oxigenado em δ_{C} 160,7 (C-5 ou C-7), sinais de dois carbonos quaternários sp^2 em δ_{C} 102,9 (C-6) e em δ_{C} 102,0 (C-8), os sinais de dois grupos metílicos em δ_{C} 7,6 (CH_3 -6) e em δ_{C} 6,8 (CH_3 -8) e os sinais de seis carbonos metínicos sp^2 de um sistema aromático monossustituído em δ_{C} 138,9 (C-1'); 128,8 (C-2' e C-6'); 128,6 (C-4') e 125,9 (C-3' e C-5'). Não foram observados os sinais para os carbonos quaternários sp^2 nas posições C-9 e C-10 e para a carbonila na posição 4.

Com base nos dados obtidos e nos dados da literatura, a estrutura da substância **3** foi determinada como (S)-7,5-di-hidroxi-6,8-di-metilflavanona (Figura 47).

Figura 47 - Proposta estrutural da substância **3**



O levantamento bibliográfico realizado na base de dados SciFinder mostrou que a substância **3** foi encontrada nas mesmas espécies que a substância **2**: *Myrica gale* (Myricaceae) (FANG, PAETZ & SCHNEIDER, 2011) e *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). Os extratos contendo a substância **3** também apresentam atividade antioxidante e anti-*Mycobacterium* (PAVAN et al., 2009). Esta é a primeira vez em que a substância **3** foi isolada na espécie em estudo.

5.3.4 Substância 4: 2',6'-di-hidroxi-3'-metil-4'-metoxi-di-hidrochalcona

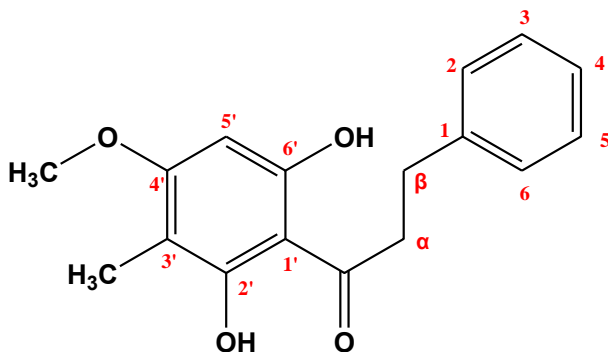
A substância 4 foi obtida após o fracionamento por CCDF [hexano:acetona (4:1)] do subgrupo A4-III (pag. 72).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 57, pag. 126) possui sinais característicos de uma di-hidrochalcona, pois apresenta hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,26 (t, $J= 8,0$ Hz, H- α) e em δ_{H} 2,93 (t, $J= 8,0$ Hz, H- β). Foi observado também o sinal de um hidrogênio metínico em δ_{H} 5,98 (s, H-5'), o sinal de uma metila em δ_{H} 1,94 (s, CH_3 -3'), de uma metoxila em δ_{H} 3,81 (s, CH_3 -4'), de uma hidroxila quelada com a carbonila em δ_{H} 14,16 (s, OH-2') e os sinais de um anel aromático monossustituído em δ_{H} 7,20 (m, H-1-H-6).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 58, pag. 127) mostrou os sinais de dois carbonos metilênicos sp^3 em δ_{C} 47,0 (C- α) e em δ_{C} 32,3 (C- β) característicos de uma di-hidrochalcona. Foi observado o sinal de um carbono metínico sp^2 em δ_{C} 91,1 (C-5'), os sinais de dois carbonos sp^2 ligados a uma hidroxila em δ_{C} 163,9 (C-6') e em δ_{C} 162,4 (C-2'), o sinal de um carbono sp^2 ligado a uma metoxila em δ_{C} 165,9 (C-4'), os sinais de dois carbonos quaternários sp^2 em δ_{C} 104,9 (C-3') e em δ_{C} 105,7 (C-1'), e ainda o sinal de uma metila em δ_{C} 7,3 (CH_3 -3'), o sinal de uma metoxila em δ_{C} 55,9 (OCH_3 -4') e seis sinais de carbonos metínicos sp^2 de um sistema aromático monossustituído em δ_{C} 143,1 (C-1); 129,4 (C-2 e C-6; C-3 e C-5) e 126,9 (C-4).

Os dados obtidos, quando comparados com a literatura, permitiram determinar a estrutura da substância 4 como a 2',6'-di-hidroxi-3'-metil-4'-metoxi-di-hidrochalcona ou Mirigalona G (Figura 48).

Figura 48 - Proposta estrutural da substância 4



O levantamento bibliográfico na base de dados *SciFinder* sobre a substância **4** mostrou que esta foi isolada em algumas espécies pertencentes à família Myrtaceae como a *Syzygium jambos* (JAYASINGHE et al., 2006), a *Syzygium aqueum* (MANAHARAN et al., 2002) e a *Eucalyptus maculata* (TAKAHASHI, KOKUBO & SAKAINO, 2004) e em espécies como a *Myrica gale* (Myricaceae) (FANG, PAETZ & SCHNEIDER, 2011) e a *Myrica serrata* (Myricaceae) (GAFNER et al., 1996). A substância **4** possui diversas atividades biológicas como por exemplo, atividade antioxidante, atividade anti-hiperglicêmica, atividade antifúngica e antibacteriana. Não foi encontrado nenhum relato da substância **4** em *E. brasiliensis*.

5.3.5 Substância **5**: (R)-7,8,7',8'-tetra-hidro-8,8'-dimetil-3,3'-dimetoxi-4,4'-di-hidroxi-dibenzociclo-octadieno

A substância **5** foi obtida após o fracionamento por CCDP [CHCl₃:MeOH (8:1)] do grupo A6 (pag. 72).

No espectro de RMN de ¹H (Figura 59 e 60, pag. 128 e 129, respectivamente) observam-se quatro sinais que correspondem a quatro hidrogênios nas posições *para* de dois anéis aromáticos tetrassubstituídos em δ_H 6,75 (s; H-2'), δ_H 6,74 (s; H-2), δ_H 6,60 (s; H-5) e em δ_H 6,57 (s; H-5'), além de dois sinais referentes a duas metoxilas em δ_H 3,86 e 3,86 (2s, OCH₃-3 e OCH₃-3') e sinais compatíveis com uma unidade ciclo-octadieno em δ_H 2,63 (dd; *J*= 7,5 e 14 Hz; H-7'a), δ_H 2,42 (d; *J*= 14 Hz; H-7'b), δ_H 2,24 (dd; *J*= 10 e 13,5 Hz; H-7b), δ_H 2,04 (d; *J*= 13,5 Hz; H-7a), δ_H 1,91 (m; H-8'), δ_H 1,82 (m; H-8), δ_H 1,02 (d; *J*= 7,5 Hz; H-9), δ_H 0,80 (d; *J*= 7,0 Hz; H-9'). O experimento HOMODEC foi realizado para analisar as alterações (simplificações) no espectro de RMN de ¹H do ciclo-octadieno. Ao irradiar no multipeto em δ_H 1,91, este mostrou interação com os sinais em δ_H 2,63; 2,42 e 0,80. A irradiação no multipeto em δ_H 1,822 mostrou interação com os sinais em δ_H 2,24; 2,04 e 1,82. O experimento de NOESY-1D mostrou que ao irradiar em δ_H 1,02, este interage apenas com o sinal em δ_H 0,80 (Figura 61, pag. 130) enquanto que a irradiação em δ_H 0,80 afeta os sinais em δ_H 1,02 e em δ_H 6,75 (Figura 62, pag. 131).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 63, pag 132) apresenta sinais de dois anéis aromáticos em δ_{C} 148,5 (C-3'), δ_{C} 147,4 (C-3), δ_{C} 145,3 (C-4), δ_{C} 145,0 (C-4'), δ_{C} 135,5 (C-6 e C-6'), δ_{C} 134,4 (C-1'), δ_{C} 130,2 (C-1), δ_{C} 117,3 (C-5), δ_{C} 117,0 (C-5'), δ_{C} 116,5 (C-2'), δ_{C} 113,3 (C-2), dois sinais de carbonos metilênicos benzílicos em δ_{C} 39,7 (C-7') e em δ_{C} 36,0 (C-7), e dois sinais de carbonos metínicos em δ_{C} 41,8 (C-8) e em δ_{C} 34,9 (C-8'), além de sinais de dois grupos metílicos em δ_{C} 22,0 (C-9) e em δ_{C} 12,7 (C-9') e de duas metoxilas em δ_{C} 56,6 (OCH_3 -3') e em δ_{C} 56,5 (OCH_3 -3). O número de grupos metínicos, metilênicos e metílicos e de carbonos quaternários foi determinado pelo experimento DEPT 45°, 90° e 135°. Dados encontrados na literatura indicam que, em lignanas dibenzociclo-octânicas, metoxilas nas posições 3 e 3' apresentam sinais de RMN de ^{13}C em δ_{C} 55-56, enquanto que nas posições 4, 4', 5 e 5', estes sinais aparecem em δ_{C} 60-61. Portanto, a presença de dois sinais em δ 56,5 e 56,6 indica que as metoxilas estão ligadas aos carbonos C-3 e C-3' (YANG et al., 2010). Os sinais observados para as metilas em δ_{C} 12,7 e δ_{C} 22,0 indicam que elas estão nas posições axial e equatorial, respectivamente (AGRAWAL & THAKUR, 1985). É importante salientar que as atribuições dos carbonos foram feitas com base no espectro de RMN bidimensional HSQC (Figura 64, pag, 133).

De acordo com a literatura, quando o espectro de dicroísmo circular (DC) apresenta um efeito Cotton positivo em 225 nm e negativo em 250 nm a molécula possui configuração *S*-bifenil e quando o espectro de DC mostra um efeito Cotton negativo em 225 nm e positivo em 250 nm a configuração é *R*-bifenil. Para a substância **5**, o espectro de DC (Figura 49) exibiu um efeito Cotton negativo próximo a 225 nm e um efeito Cotton positivo próximo a 250 nm indicando a configuração *R*-bifenila (SONG, FRONCZEK & FISCHER, 2000)

Os dados obtidos a partir dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , NOESY-1D, HSQC e DC evidenciam que a substância **5** é uma lignana dibenzociclo-octânica em que o ciclo-octadieno é formado pela ligação C-6 \rightarrow C-6' dos dois anéis aromáticos e pela ligação C-8 \rightarrow C-8' das suas cadeias propanoídicas. Essa substância recebeu o nome de (*R*)-7,8,7',8'-tetrahydro-8,8'-dimetil-3,3'-dimetoxi-4,4'-di-hidroxi-dibenzociclo-octadieno (Figura 50) (AGRAWAL & THAKUR, 1985).

Figura 49 - Espectro de dicroísmo circular (DC) para a substância 5.

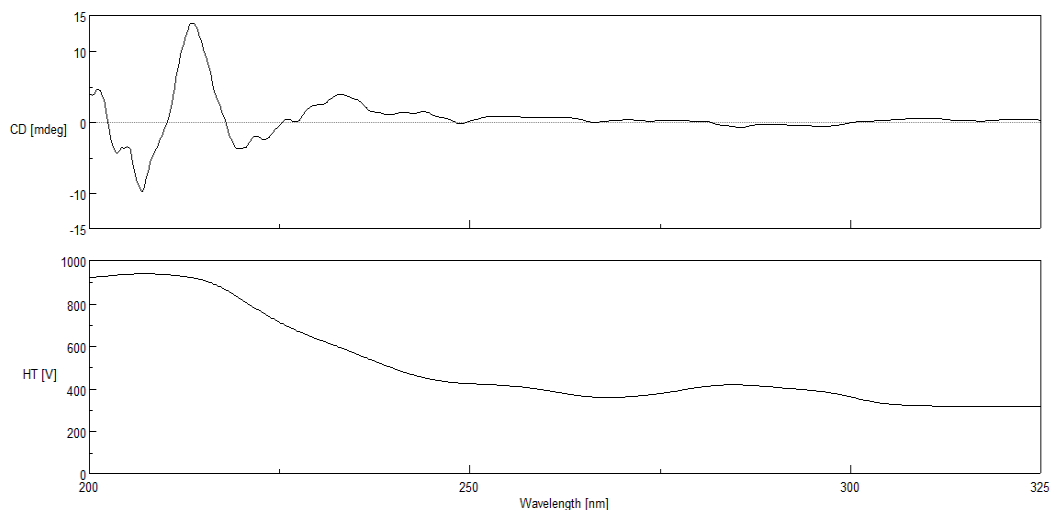
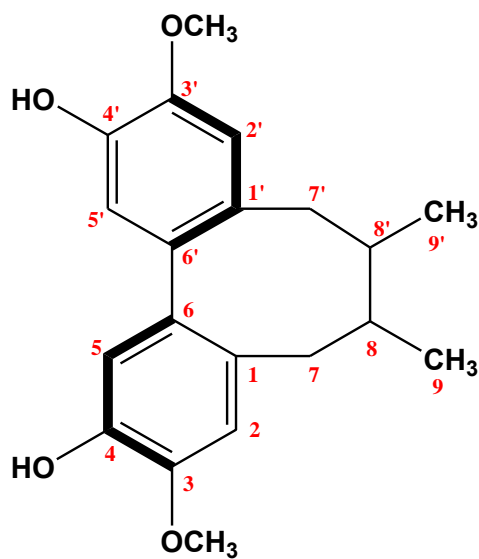


Figura 50 - Proposta estrutural da substância 5



O levantamento bibliográfico na base de dados *SciFinder* evidenciou que a substância **5** é inédita. Este levantamento mostrou também que outras lignanas com o mesmo esqueleto químico possuem atividade anti-HIV-1 (YANG et al., 2010).

5.4 Material Complementar: Espectros de RMN para as substâncias isoladas

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para as substâncias **1**, **2**, **3**, e **4** estão mostradas nas figuras 51 a 58. Os espectros de ^1H , NOESY-1D, ^{13}C e HSQC para a substância **5** estão mostrados nas figuras 59 a 64.

Figura 51 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância **1** (região entre 0 e 6,0 ppm) (500 MHz, CD_3OD).

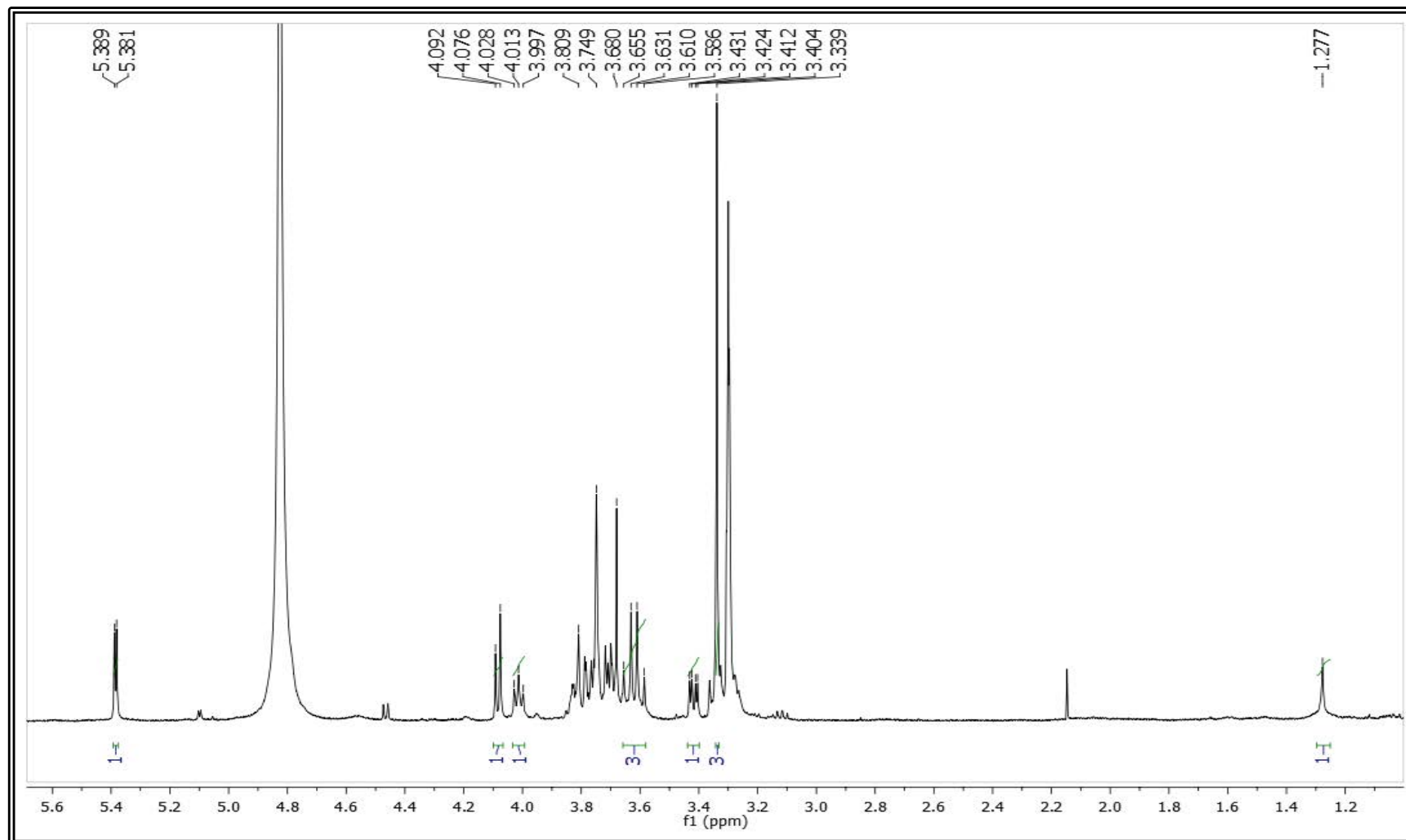


Figura 52 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da substância **1** (75 MHz, CD_3OD).

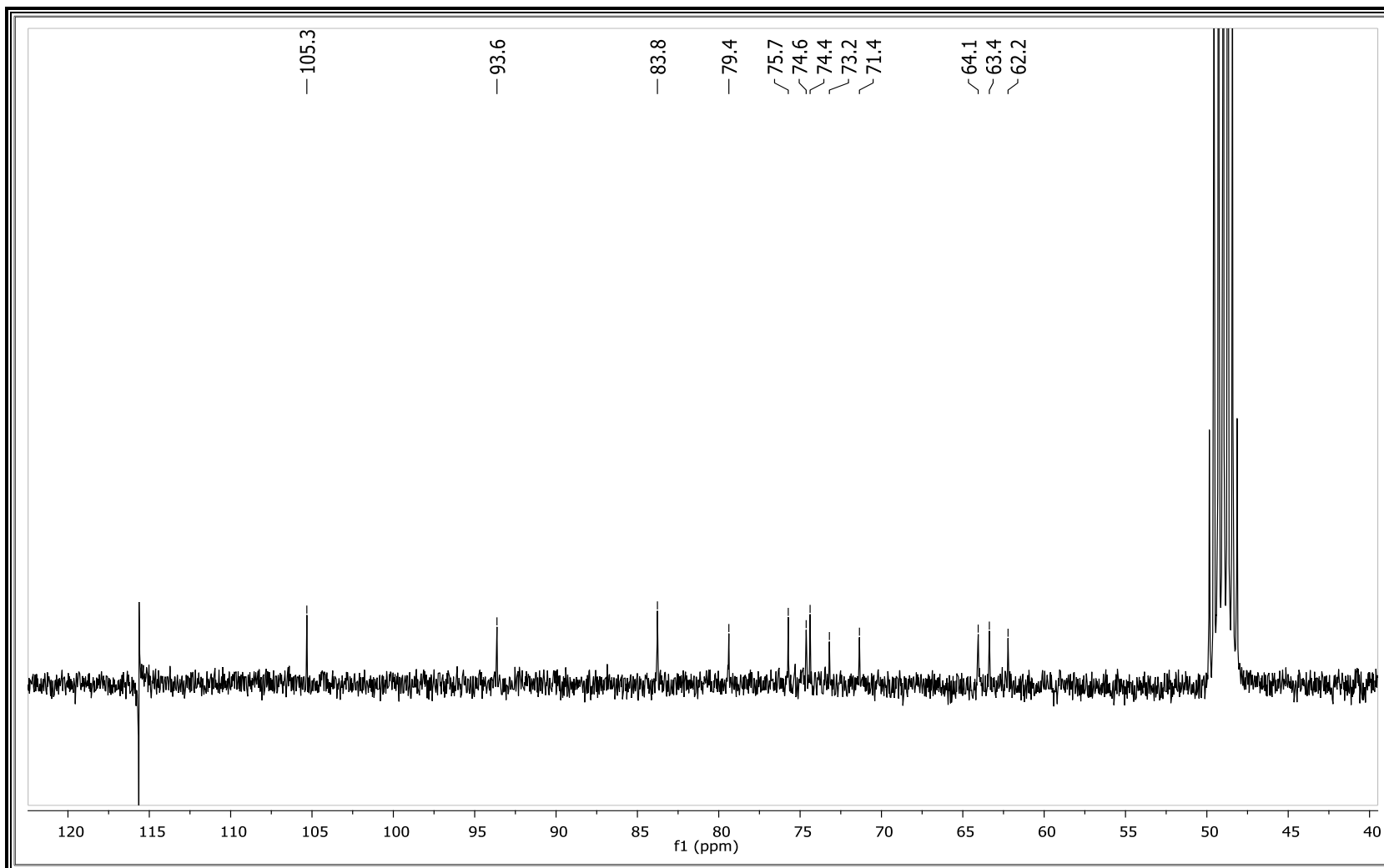


Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H da substância 2 (300 MHz, CD_3OD).

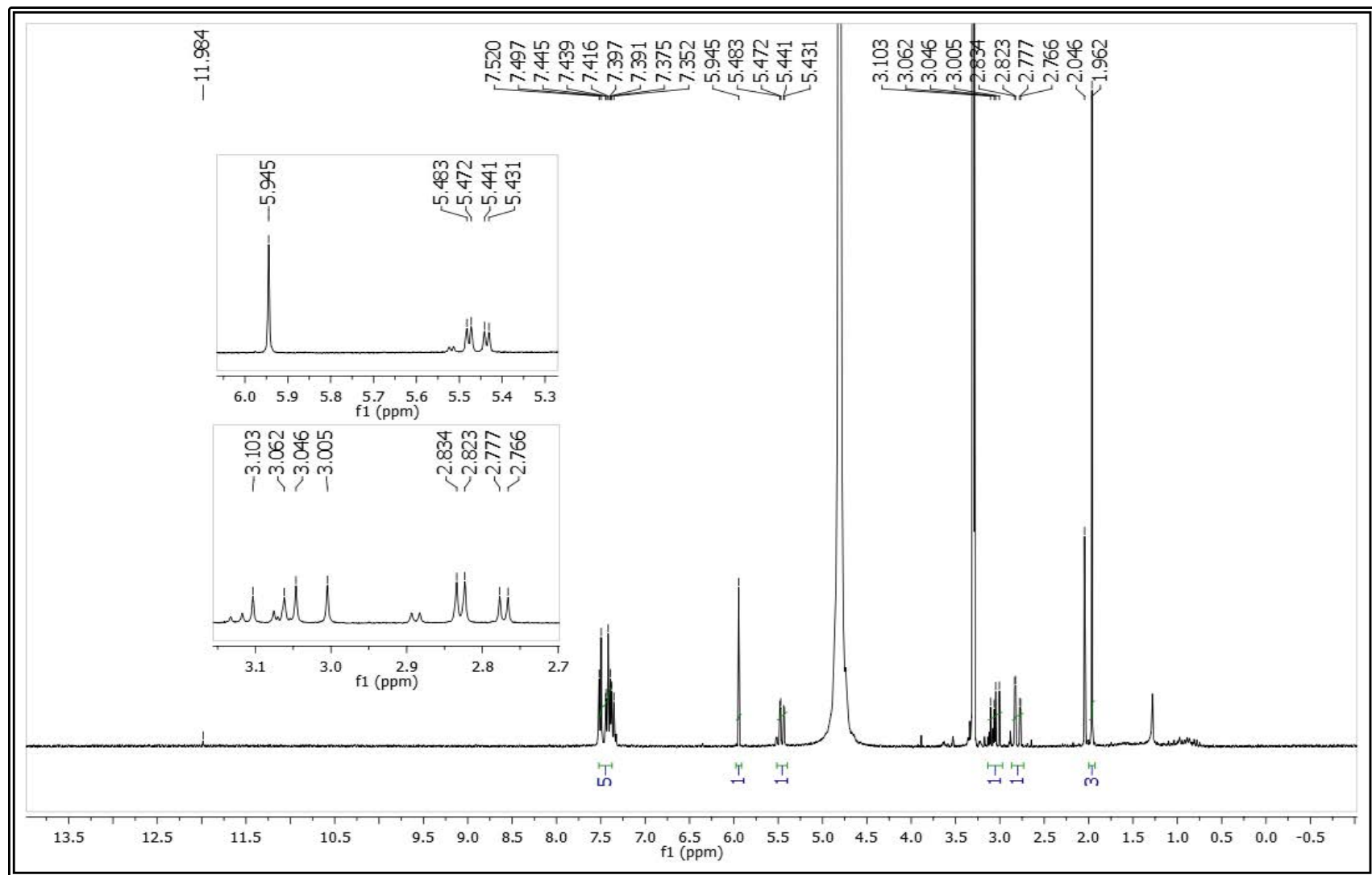


Figura 54 -Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da substância 2 (75 MHz, CD_3OD).

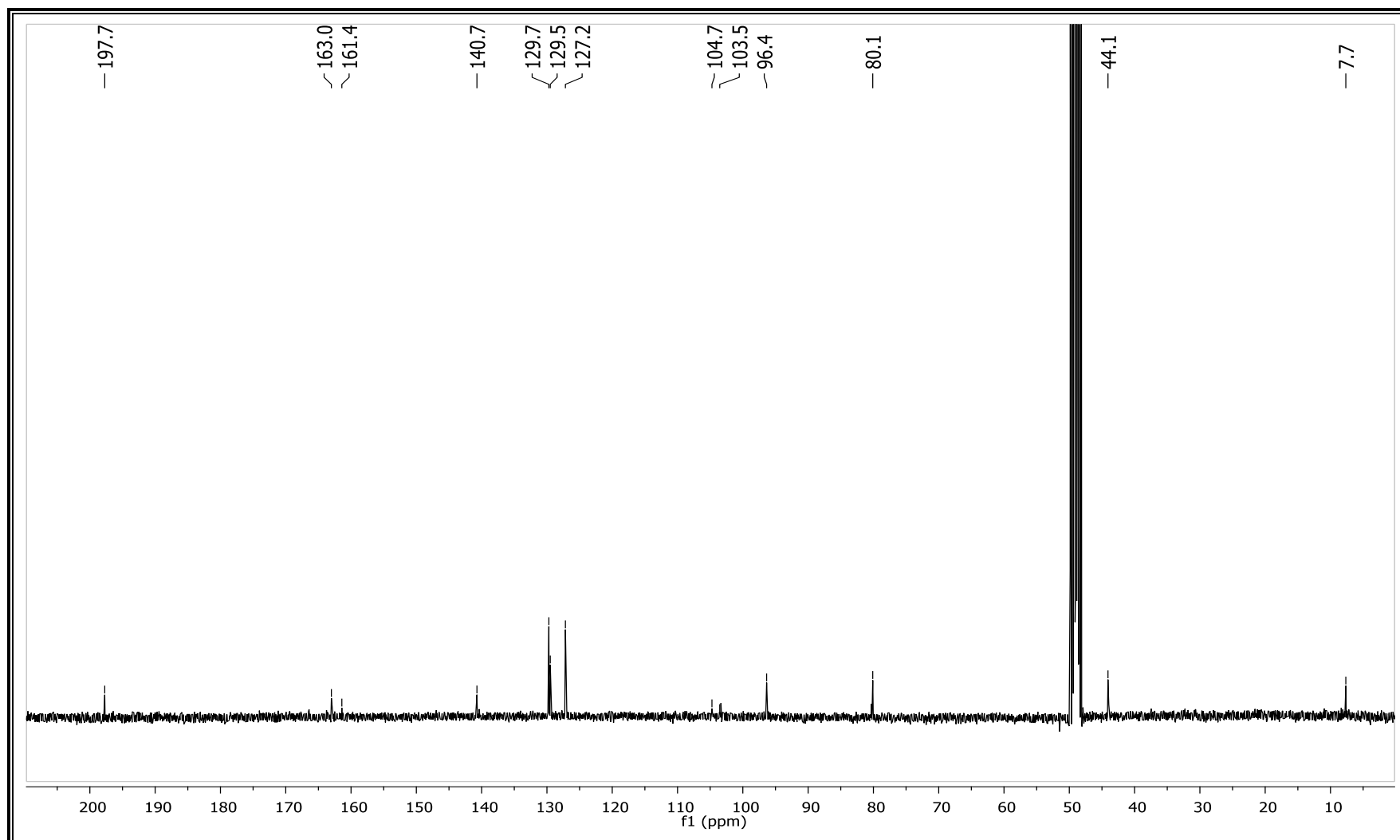


Figura 55 - Espectro de RMN de ^1H da substância **3** (500 MHz, CD_3OD).

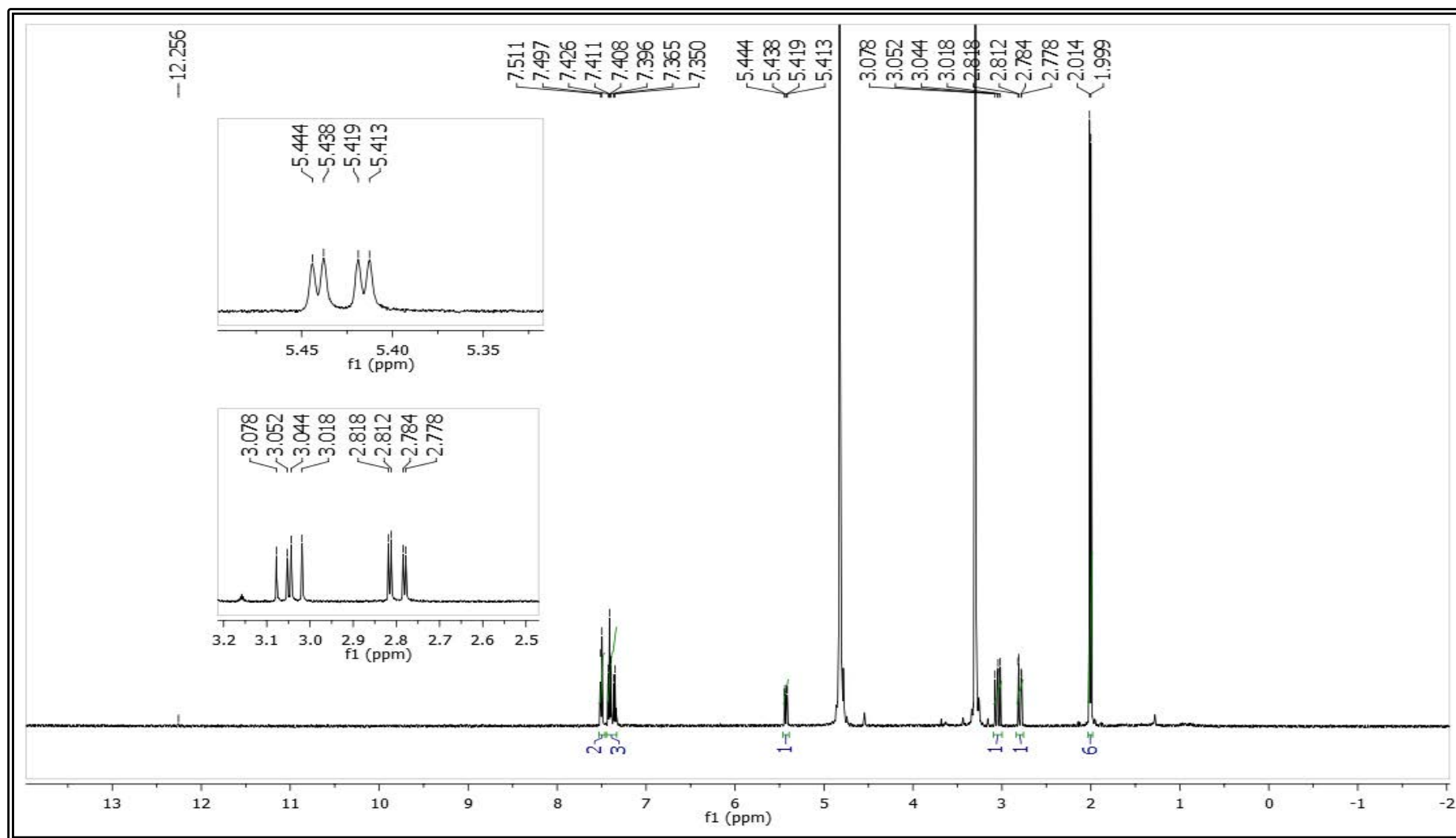


Figura 56 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da substância **3** (125 MHz, CDCl_3).

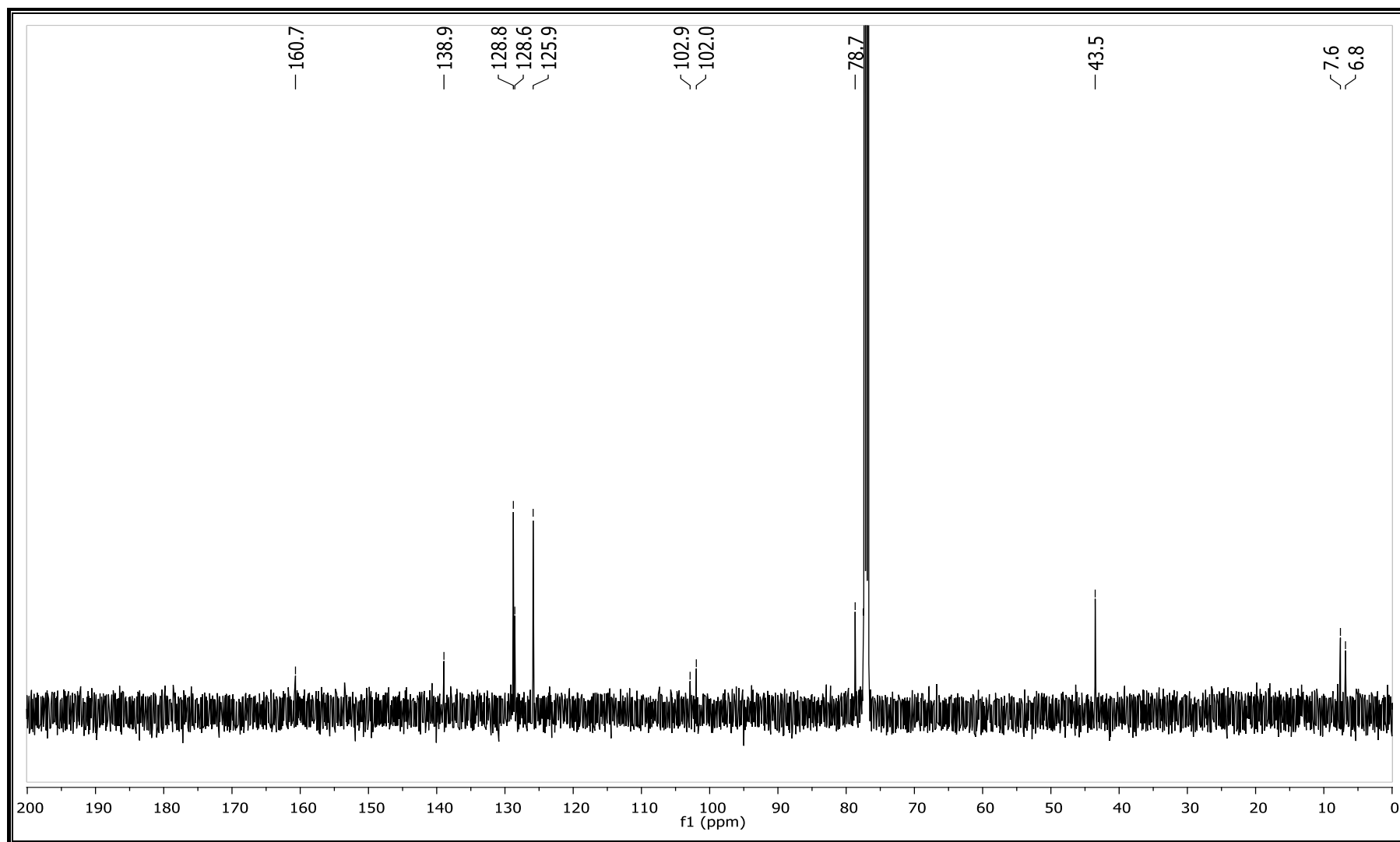


Figura 57 - Espectro de RMN de ^1H da substância **4** (300 MHz, CD_3OD).

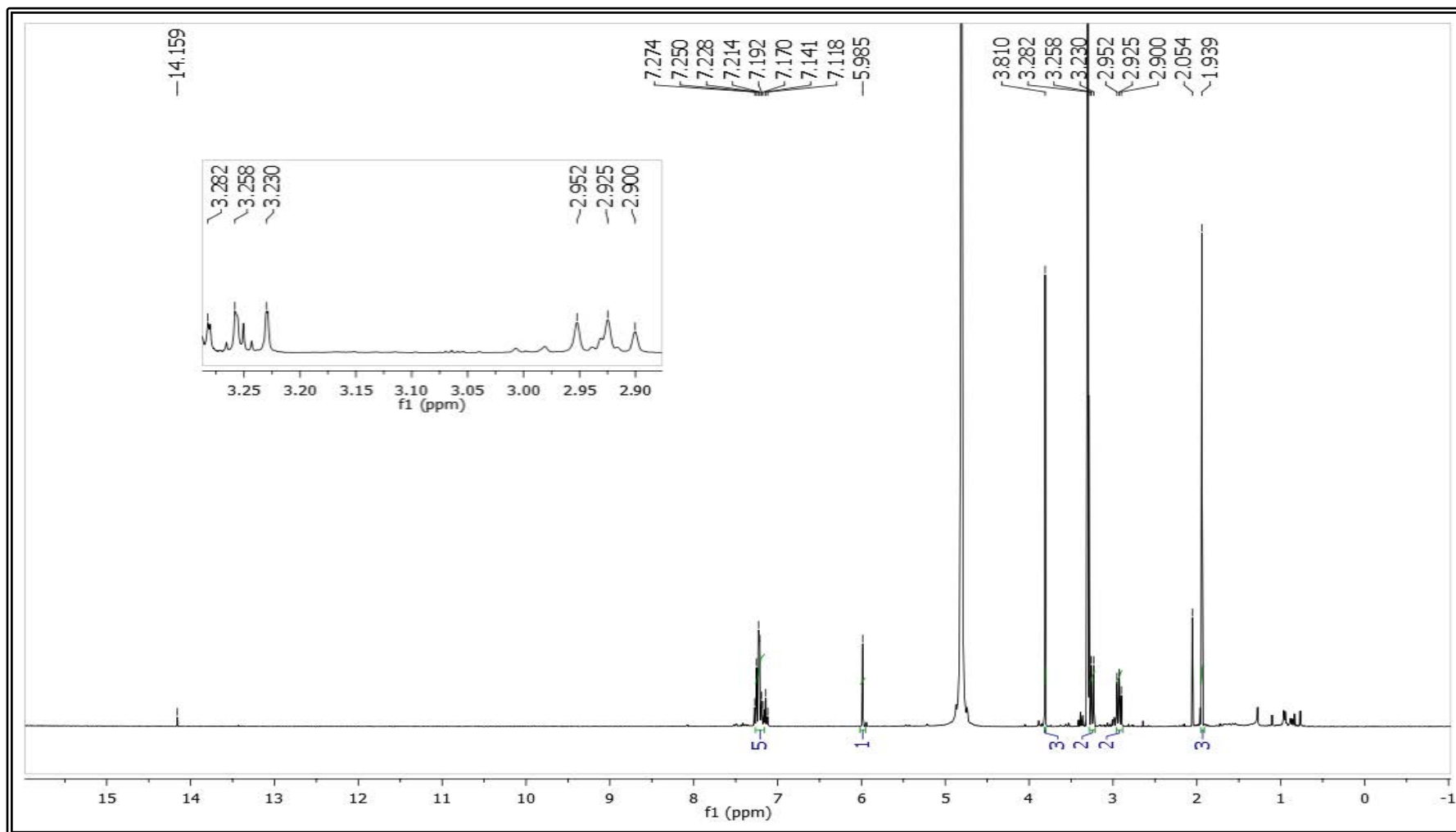


Figura 58 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4 (75 MHz, CD_3OD).

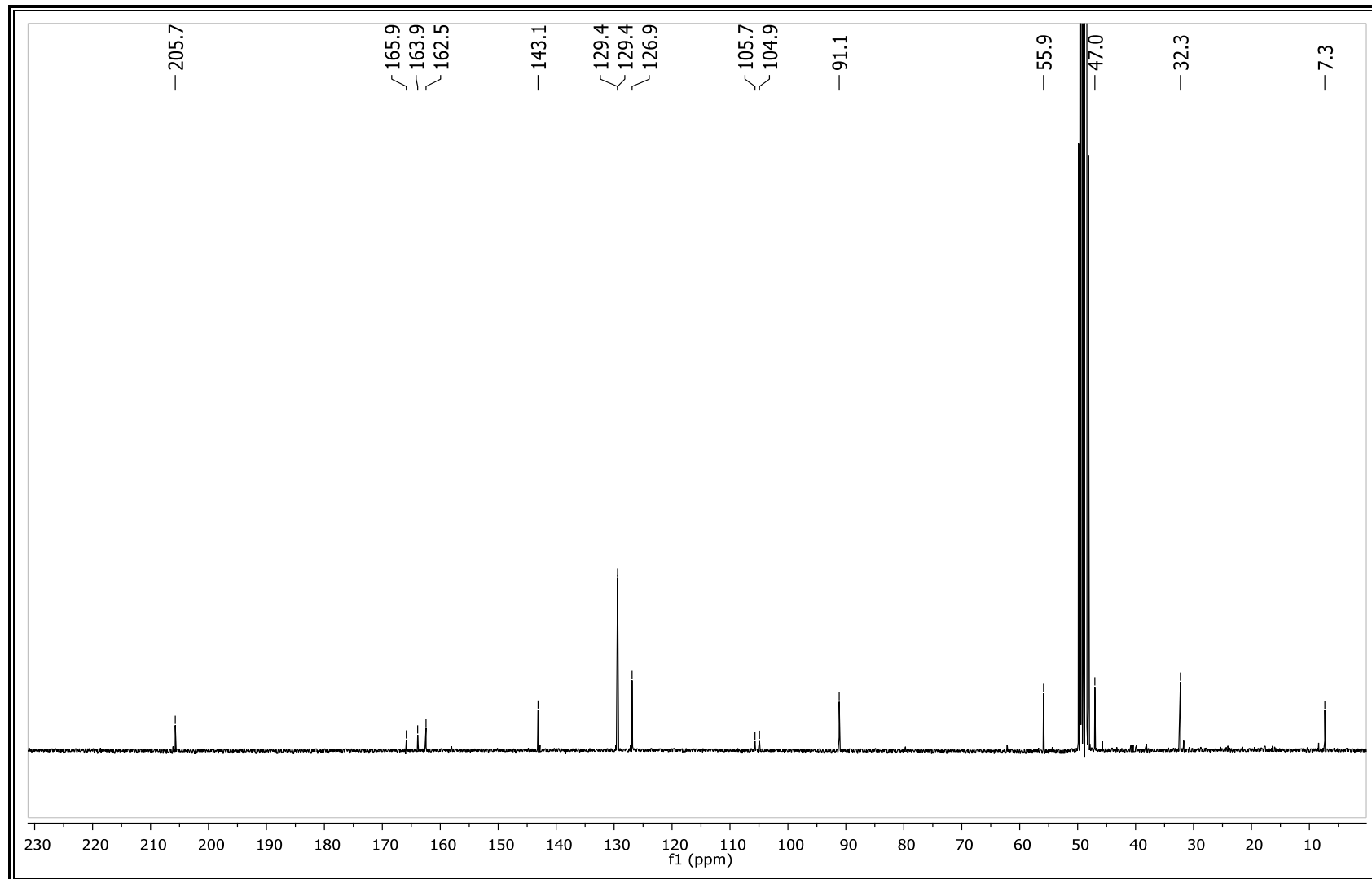


Figura 59 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância **5** (500 MHz, CD_3OD).

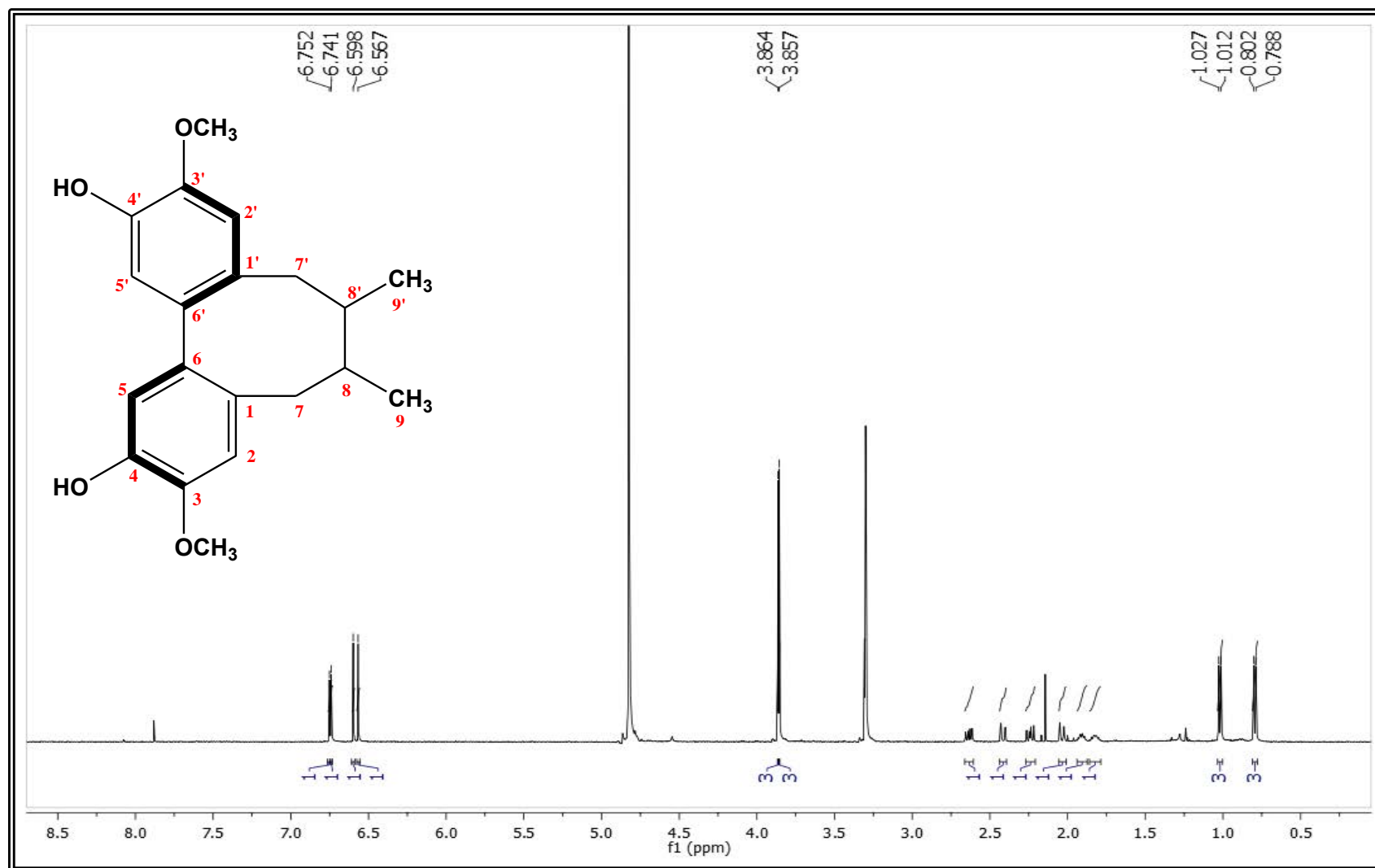


Figura 60 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância **5** (500 MHz, CD_3OD).

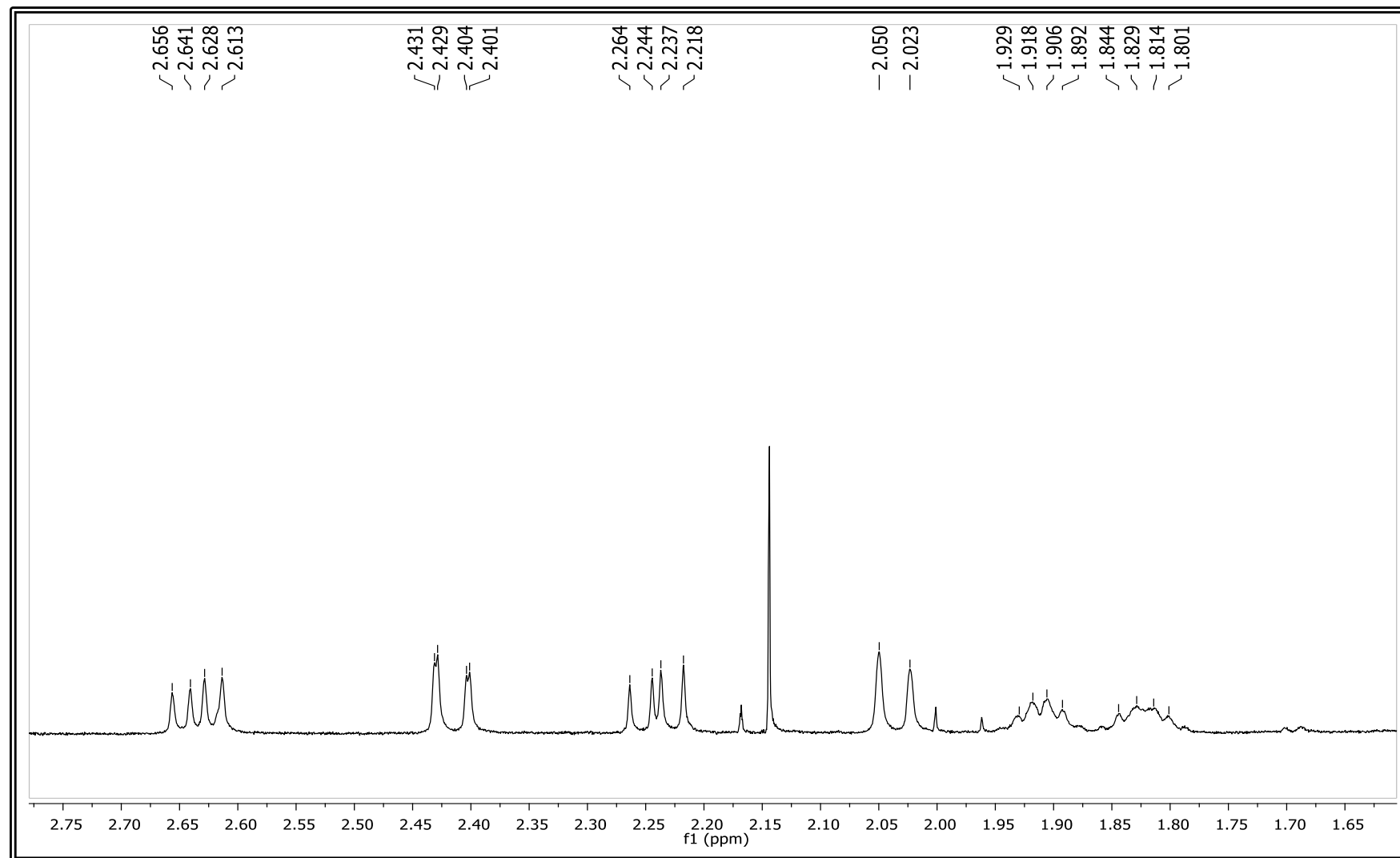


Figura 61 - Espectro de NOESY – 1D para a substância 5: irradiação em δ_H 1,020 (300 MHz, CD₃OD).

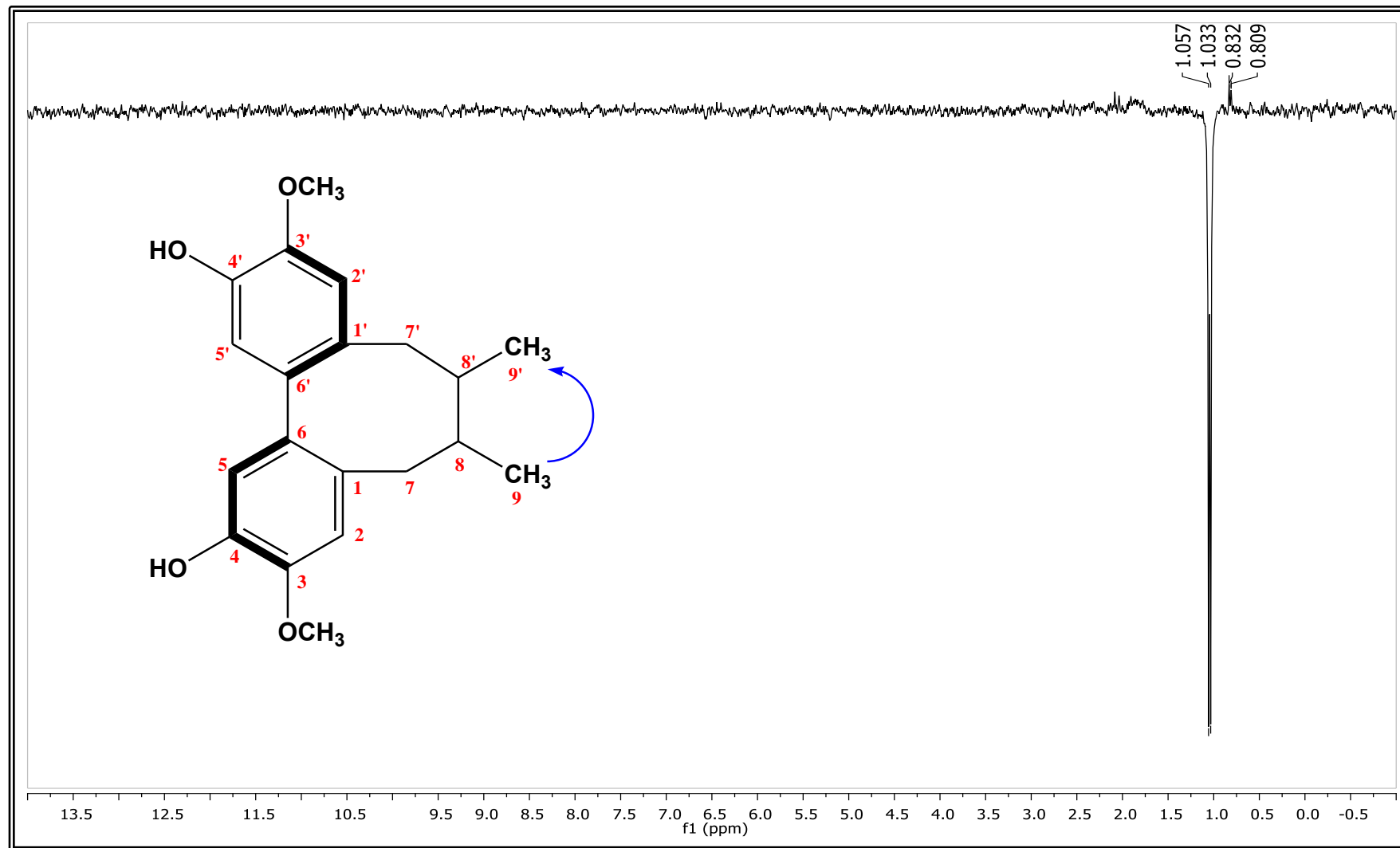


Figura 62 - Espectro de NOESY – 1D para a substância 5: irradiação em $\delta_{\text{H}} 0, 795$ (300 MHz, CD_3OD).

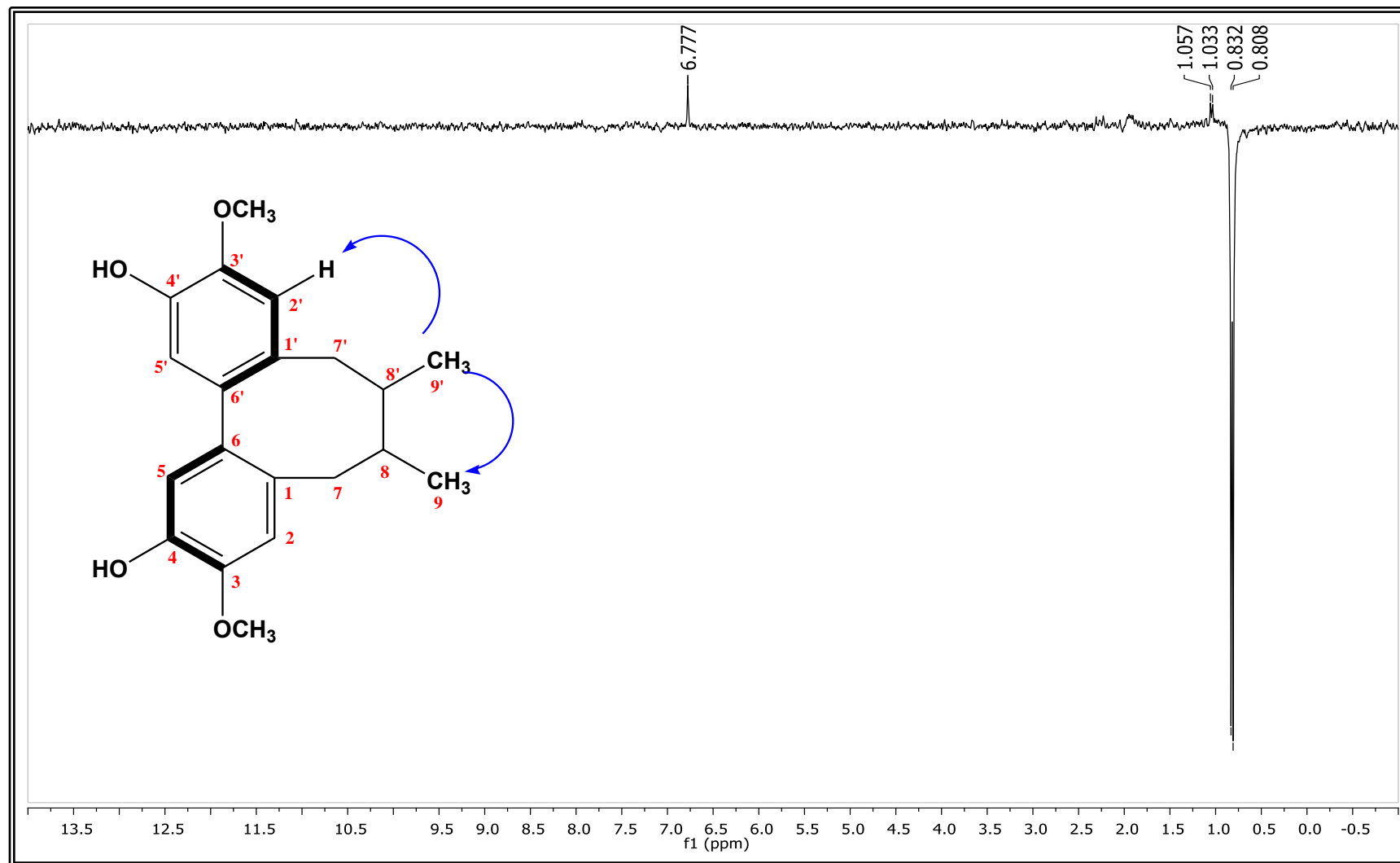


Figura 63 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 5 (125 MHz, CD_3OD).

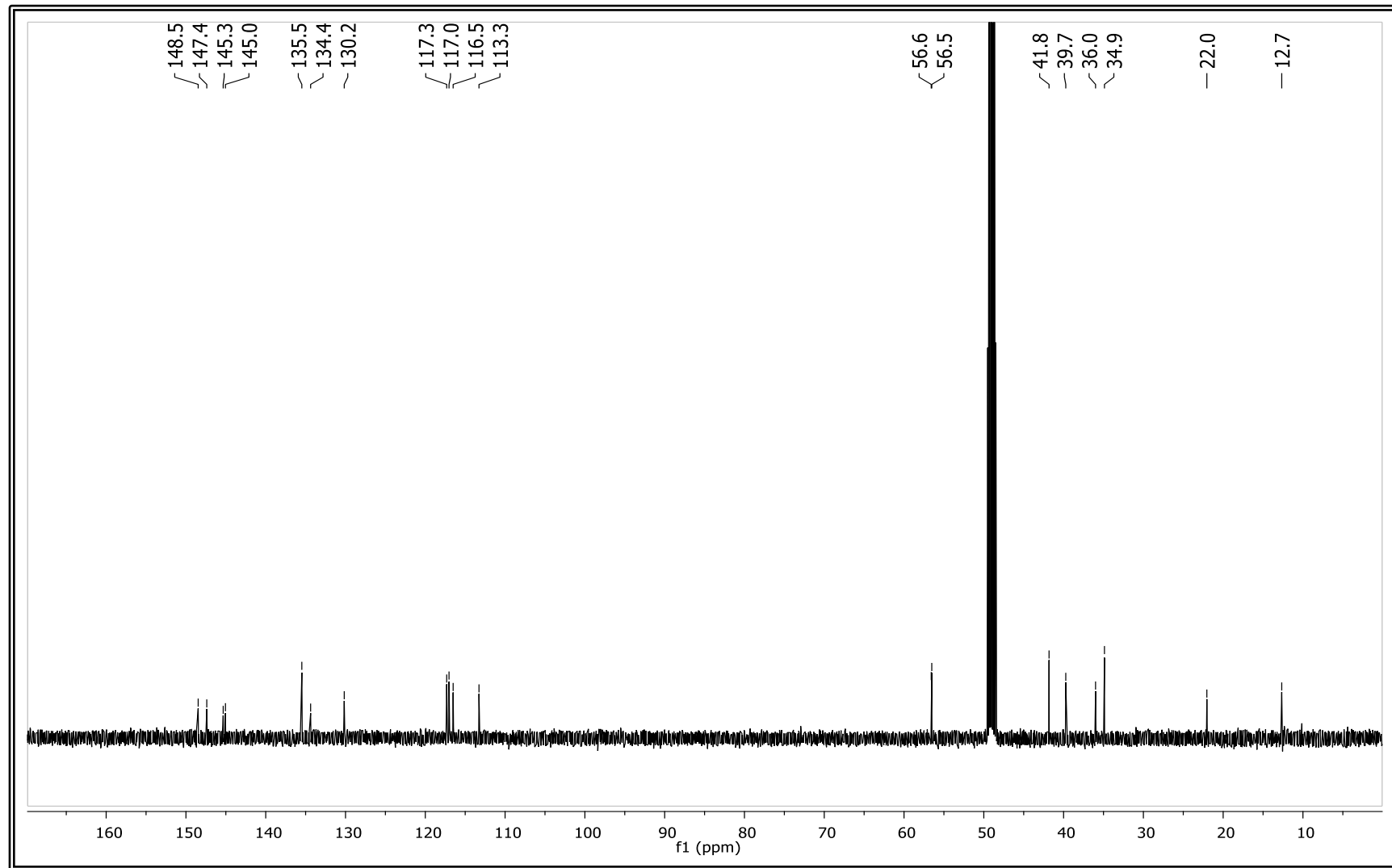
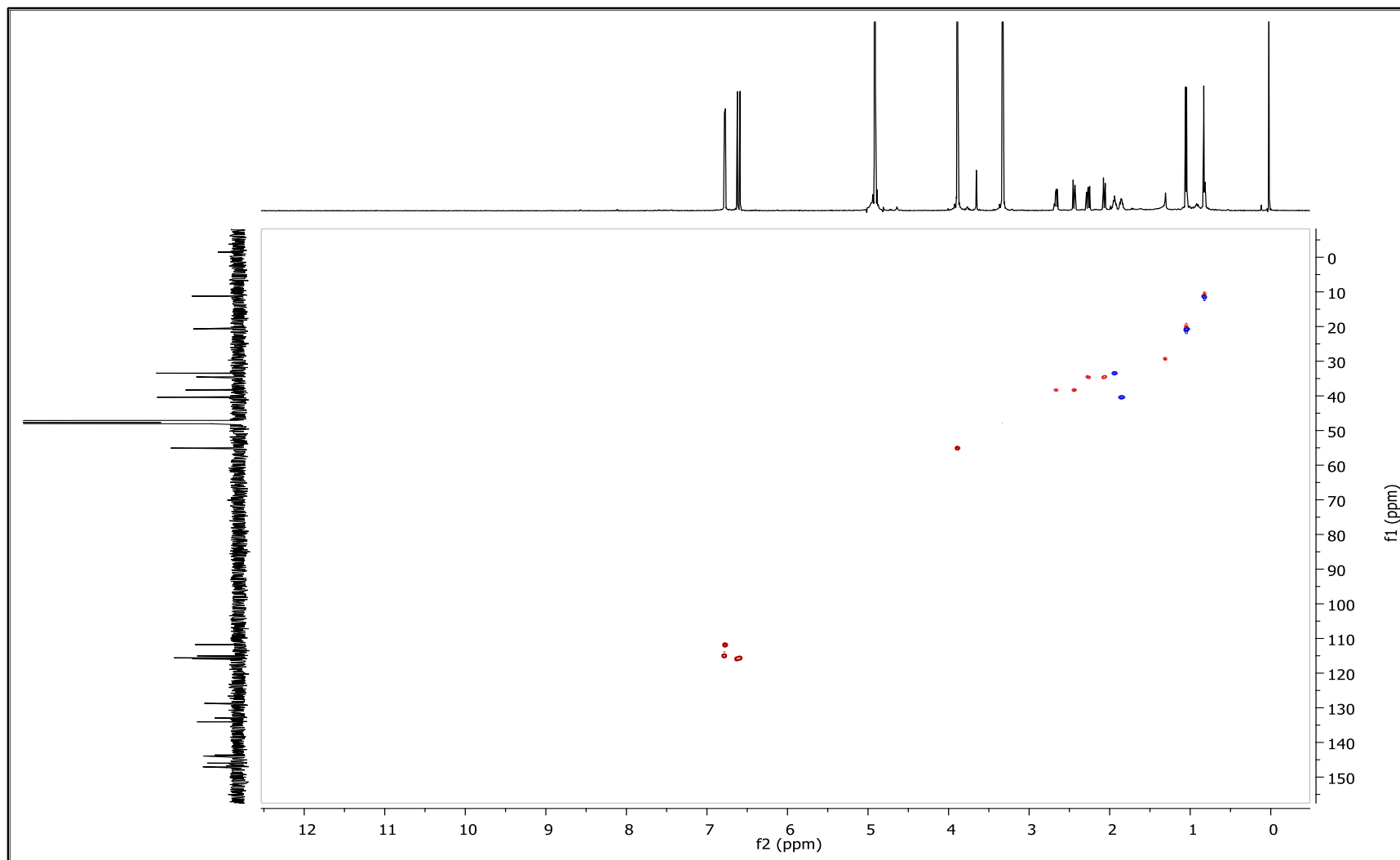


Figura 64 - Espectro de RMN bidimensional (HSQC) da substância **5** (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD).



5.5 Identificação dos constituintes químicos presentes nas infusões de *E. brasiliensis* (IEb-Fo) e *E. involucrata* (IEi-Fo).

No item 4.8.1.2 (pag. 68) várias tentativas foram realizadas a fim de se obter substâncias isoladas do EA-Fo1. No entanto, foi possível isolar apenas uma substância proveniente deste extrato e esta substância foi determinada como um dissacarídeo (pag. 108).

Novamente, a análise preliminar por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) usando $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:8) mostrou que as substâncias presentes nas infusões de ambas as espécies possuíam baixa resolução cromatográfica (Figura 65).

Figura 65 - Cromatografia em camada delgada comparativa das infusões de *E. brasiliensis* (1) e *E. involucrata* (2).



Diante dessas observações, a identificação dos constituintes químicos presentes nas infusões foi realizada por Espectrometria de Massas usando o modo de inserção direta da amostra, pois para a realização desta análise são necessários apenas os procedimentos de filtração e diluição da amostra, sem etapas prévias de preparo de amostra. É importante salientar que a espectrometria de massas por inserção direta da amostra tem sido amplamente aplicada para análise de alimentos, bebidas e medicamentos a fim de estabelecer um *fingerprint* da amostra possibilitando assim a detecção de

adulteração desses produtos (SALDANHA, VILEGAS & DOKKEDAL, 2013; GOODACRE et al., 2002).

Os espectros *full scan* obtidos na faixa de 150 a 1500 Da para as infusões IEb-Fo (Figura 66) e IEi-Fo (Figura 67) mostram que ambas não possuem grande diversidade de metabólitos secundários. No entanto, é possível observar algumas diferenças entre as espécies analisadas.

A análise das figuras 66 e 67 mostra que há algumas diferenças entre os perfis das duas espécies, pois a espécie *E. involucrata* não apresenta os íons de *m/z* 169, 305 e 593 e apresenta o íon de *m/z* 561. A fragmentação para cada íon precursor selecionado levou à identificação de diversos metabólitos presentes nas infusões. As substâncias identificadas nas infusões de *E. brasiliensis* e *E. involucrata* estão apresentadas na tabela 12.

Figura 66 - Espectros de massas de primeira ordem, em *full-scan*, da infusão da espécie *E. brasiliensis* no modo negativo. Faixa de íons 150 a 1500 Da (condições de análise pag. 62).

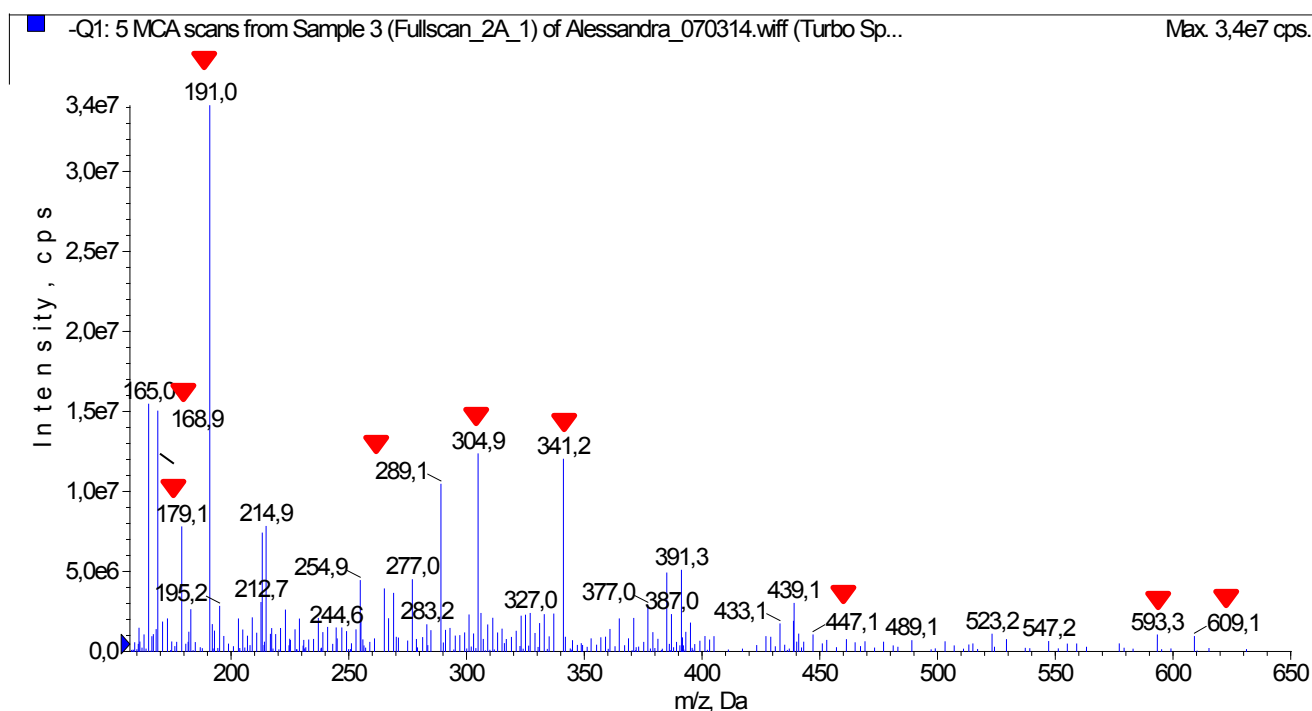


Figura 67 - Espectros de massas de primeira ordem, em *full-scan*, da infusão da espécie *E. involucrata* no modo negativo. Faixa de íons 150 a 1500 Da (condições de análise pag. 60).

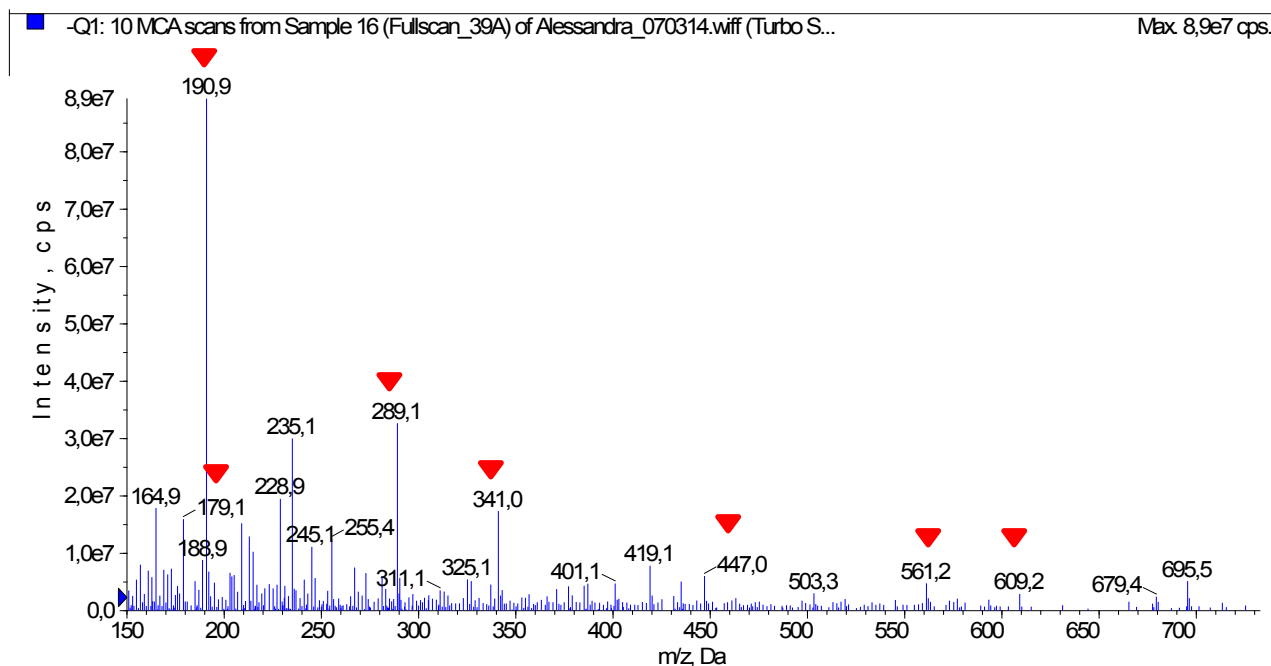


Tabela 12 - Substâncias identificadas nas infusões de *E. brasiliensis* e *E. involucrata*.

Substâncias	[M-H] ⁻ (m/z)	EM/EM (m/z)
C ₁ - Ácido gálico	169	125
C ₂ - Ácido cafeico	179	135,71
C ₃ - Ácido quínico	191	127, 85
C ₄ - [epi]catequina	289	271, 151, 137
C ₅ - [epi]galocatequina	305	167, 137, 125
C ₆ - Ácido cafeoil-O-glicosídeo	341	179
C ₇ - Quercetina-3-O-ramnosídeo	447	301
C ₈ - [epi]afzelequina-[epi]catequina	561	289
C ₉ - [epi]galocatequina-[epi]catequina	593	425, 407, 289
C ₁₀ - [epi]galocatequina-[epi]galocatequina	609	441, 423, 305

Os íons precursores de *m/z* 169, 179 e 191 são referentes ao ácido gálico desprotonado, ácido cafeico desprotonado e ao ácido quínico desprotonado, respectivamente. A fragmentação do íon precursor de *m/z* 169 gerou o íon produto de *m/z* 125 [M-44-H]⁻ referente à perda de CO₂ (Figura 68). O íon precursor de *m/z* 179, após a fragmentação, gerou o íon de *m/z* 135 [M-44-H]⁻ e o íon de *m/z* 71 [M-108-H]⁻, referente à perda de C₆H₄O₂ (Figura 69). O

espectro de fragmentação do íon precursor de m/z 191 apresentou os íons de m/z 127 $[M-2H_2O-CO-H]^-$, 111 $[M-2H_2O-CO_2-H]^-$, 93 $[M-3H_2O-CO_2-H]^-$ e 85 $(C_4H_5O_2) [M-106-H]^-$ (Figura 70), característicos de ácido quínico.

A fragmentação do íon precursor de m/z 341 resultou na formação do íon produto de m/z 179 $[M-162-H]^-$ referente à perda de uma unidade de glicose. Portanto, esta substância foi determinada como ácido cafeoil-O-glucosídeo (Figura 71) (SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2005).

Figura 68 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 169 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura do ácido gálico.

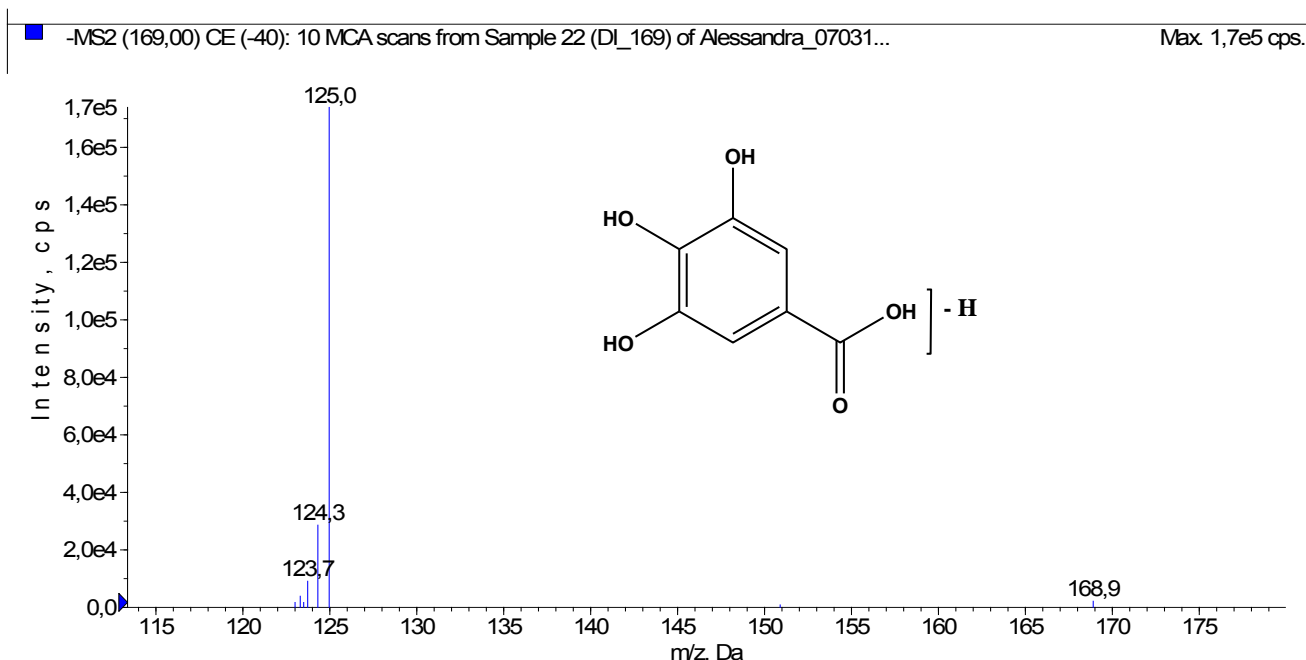


Figura 69 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 179 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura do ácido cafeico.

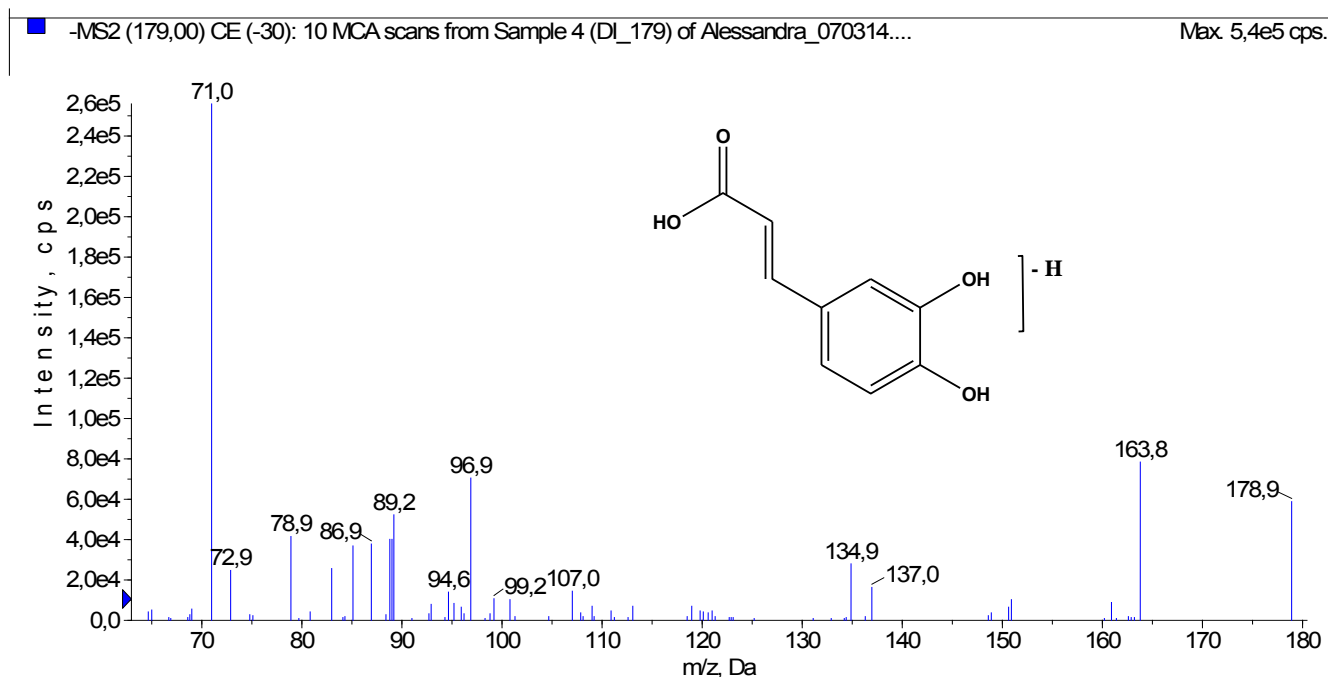


Figura 70 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor m/z 191 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura do ácido quínico.

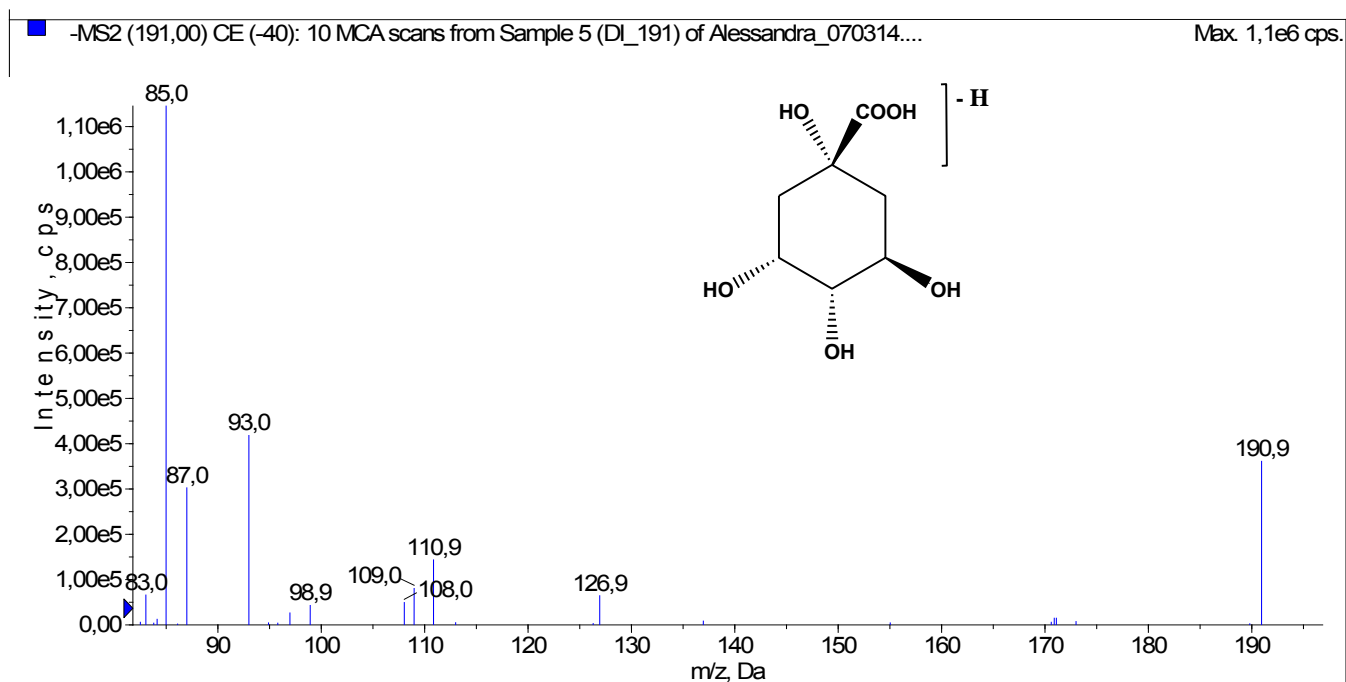
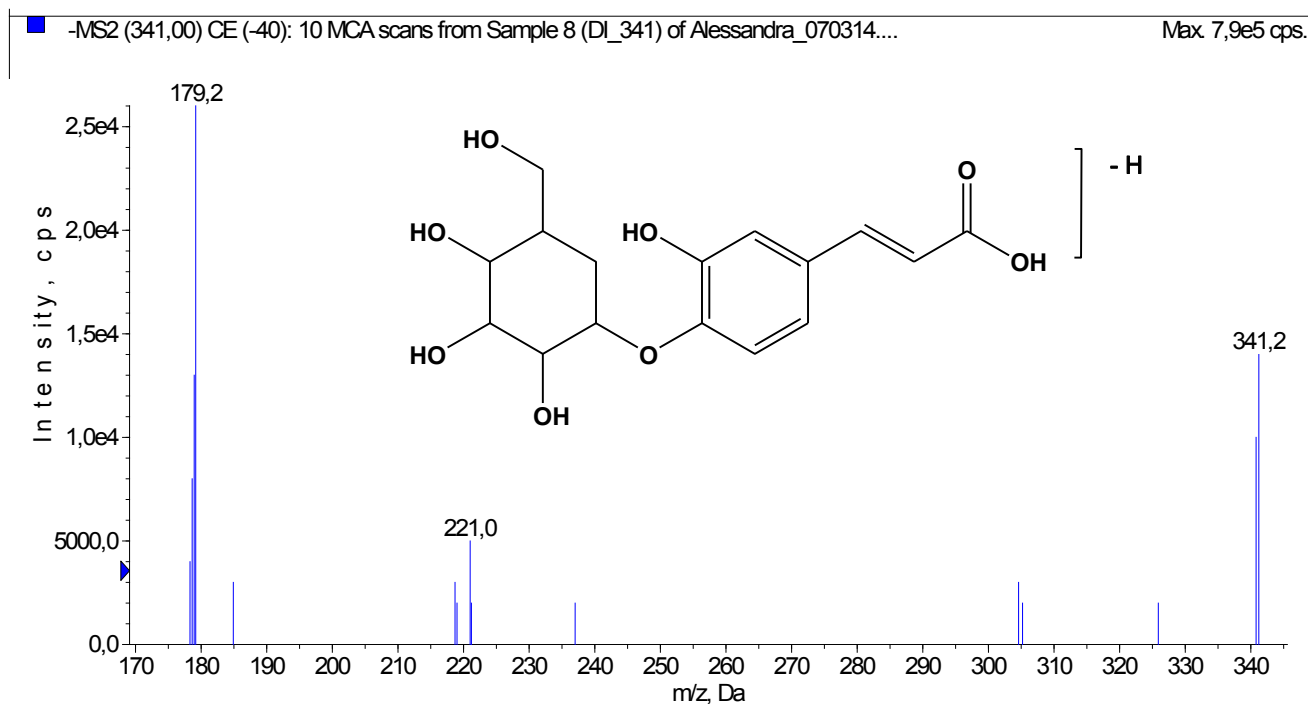


Figura 71 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 341 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura do ácido cafeoil-*O*-glicosídeo, compatível com os dados apresentados.



As propostas de fragmentação para o ácido gálico, ácido cafeico e ácido ácido cafeoil-*O*-glicosídeo estão mostradas na figura 72.

O íon precursor de m/z 289 corresponde a [*epi*]catequina desprotonada. A fragmentação deste íon gerou os íons de m/z 271 [$289-18-H$]⁻ referente a perda de uma molécula de água, e os íons de m/z 137 e 151 formados pelo mecanismo Retro-Diels-Alder (GU et al., 2003) (Figura 73).

O íon precursor de m/z 305 é referente à [*epi*]galocatequina. Embora, o espectro de fragmentação apresente os íons de m/z 137 e 167 formados pelo mecanismo de fragmentação Retro-Diels-Alder, o íon com maior intensidade é o de m/z 125 formado pelo mecanismo de fragmentação clivagem heterocíclica (Figura 74) (GU et al., 2003).

Figura 72 - Proposta de fragmentação para o ácido gálico, ácido cafeico e ácido cafeoil-O-glicosídeo.

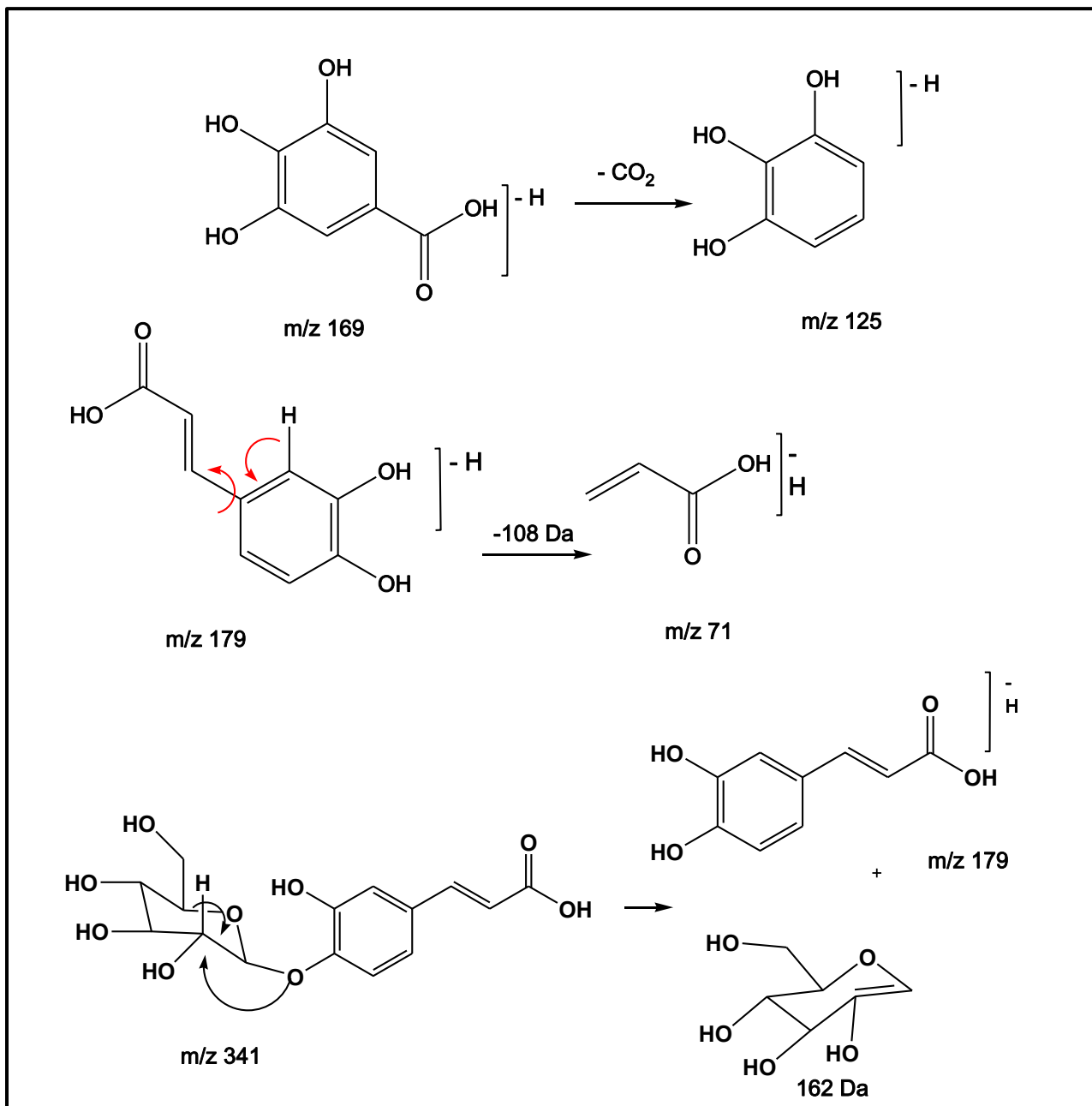


Figura 73 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 289 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura da [ep]catequina.

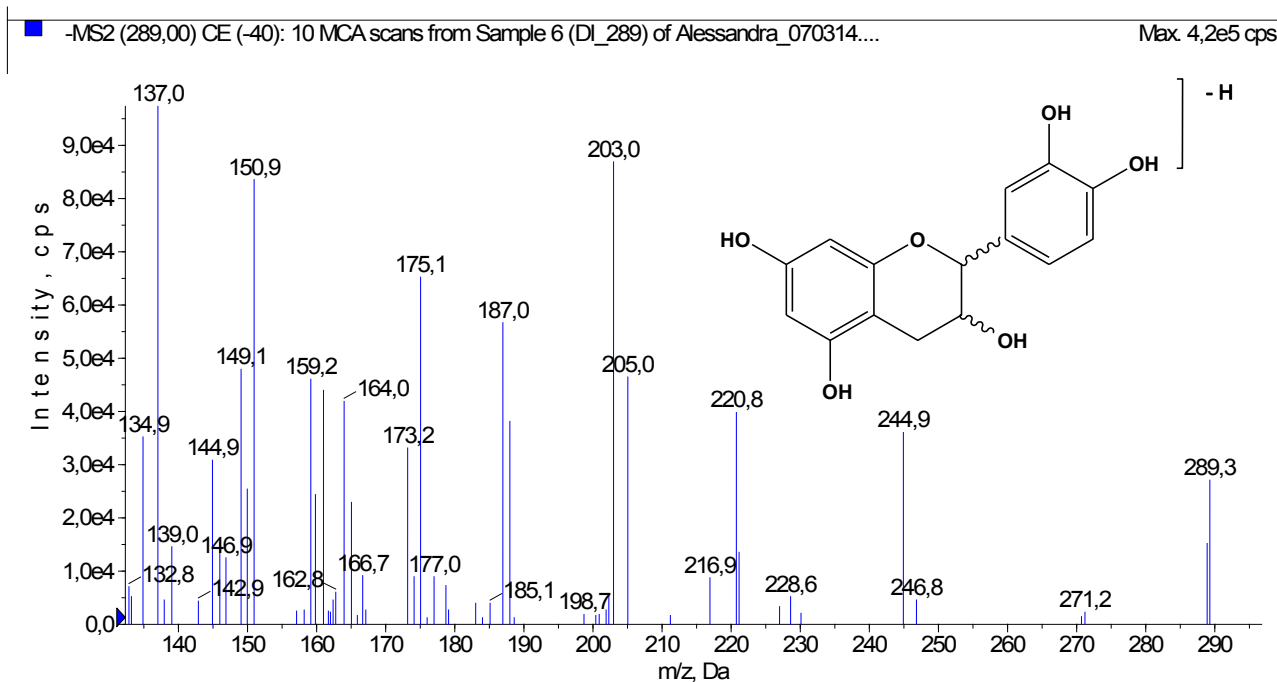
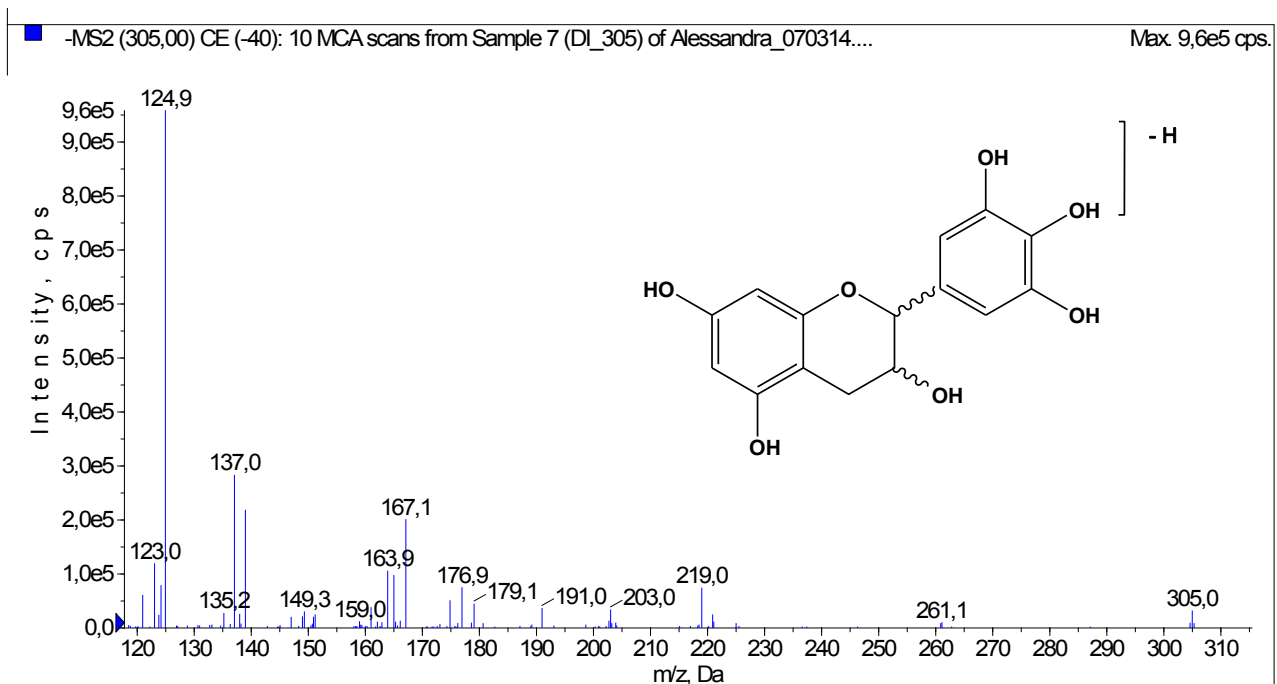
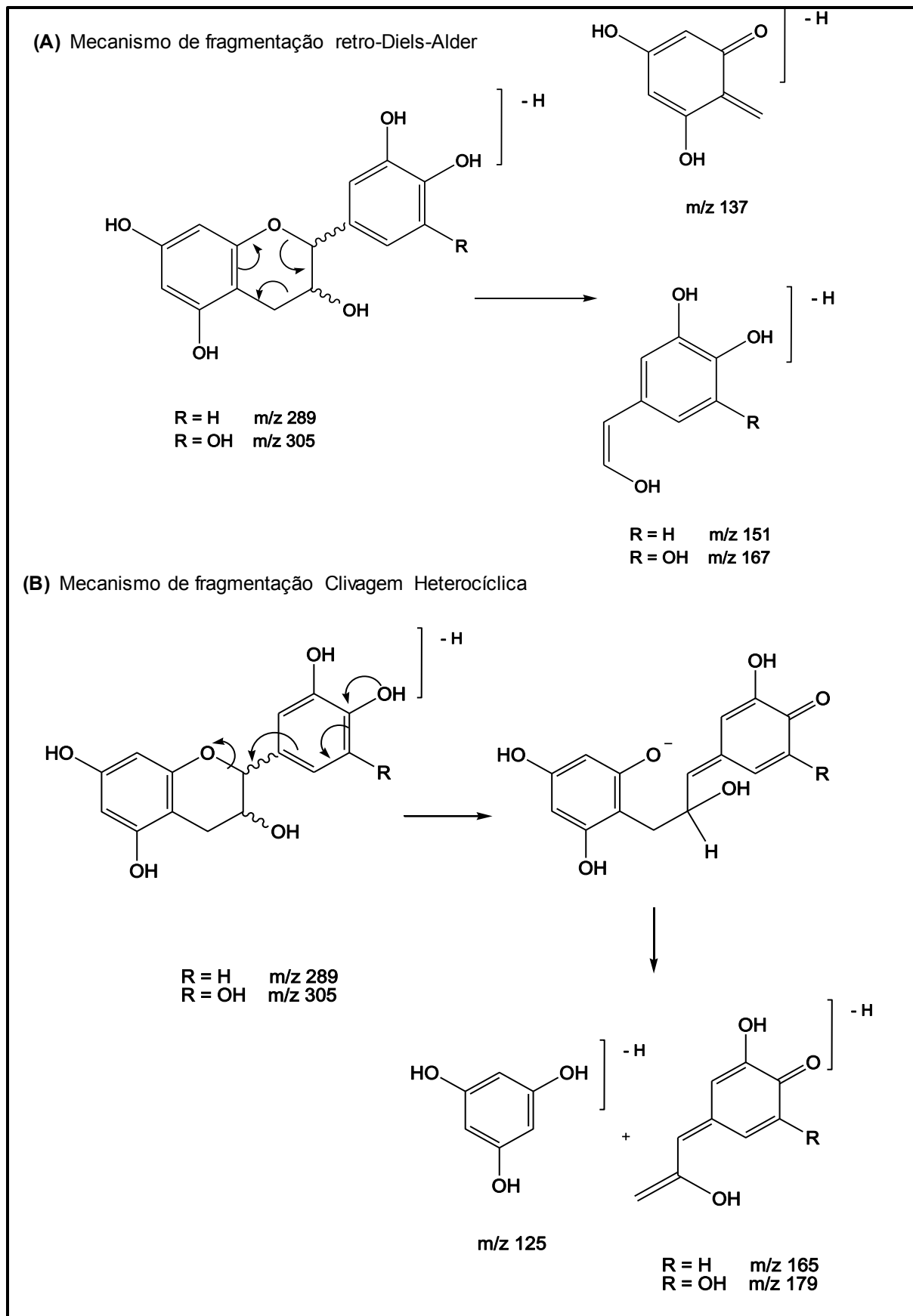


Figura 74 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 305 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura da [ep]galocatequina.



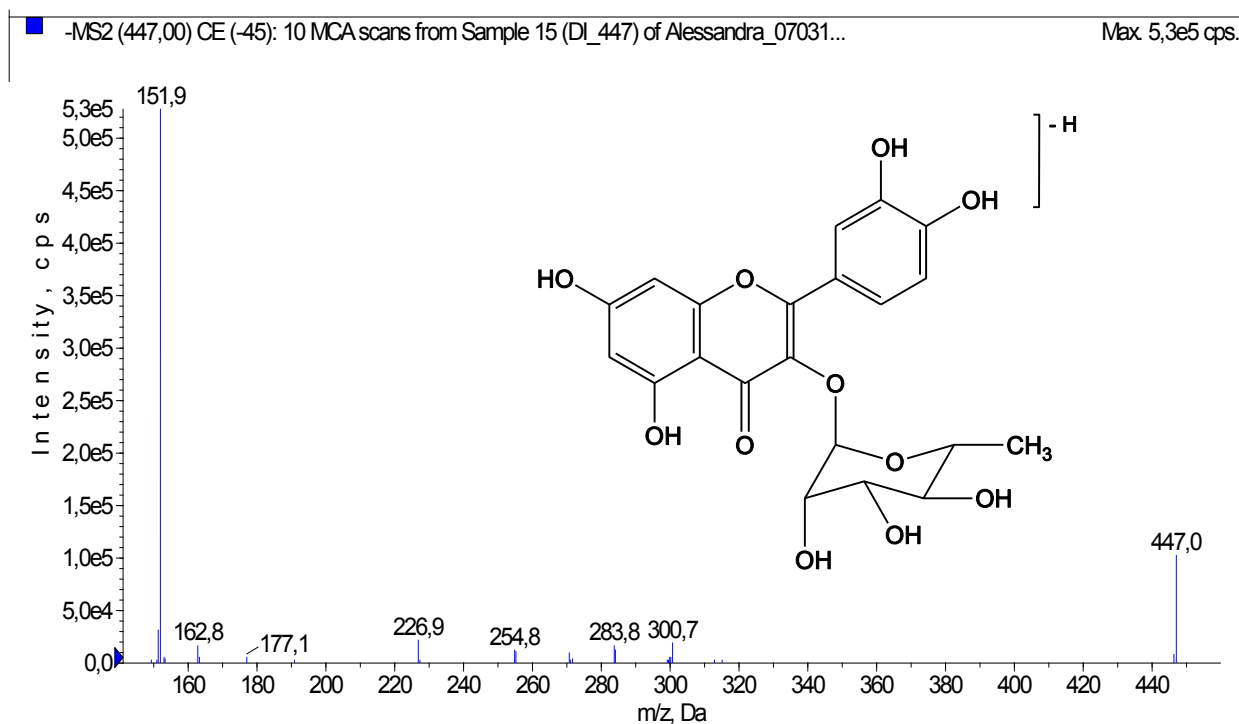
As propostas de fragmentação da [ep]catequina e [ep]galocatequina estão mostradas na figura 75.

Figura 75 - Proposta de fragmentação para a [epi]catequina e [epi]galocatequina. (A) Mecanismo de Fragmentação retro-Diels-Alder e (B) Mecanismo de fragmentação Clivagem Heterocíclica.



O íon precursor de m/z 447 corresponde a quercetina-3-O-ramnosídeo. A fragmentação desse íon (Figura 76) gerou o íon de m/z 301 [M-146-H]⁻ característico da quercetina desprotonada devido à perda de um fragmento neutro de 146 Da referente a uma unidade de ramnose. O íon de m/z 151 foi formado no mecanismo de fragmentação retro-Diels-Alder da quercetina. A proposta de fragmentação da quercetina-3-O-ramnosídeo para a eliminação do ramnosídeo é semelhante à eliminação dos glicosídeos nas antocianinas (Figura 40, pag. 98) e a formação do íon produto de m/z 151 pelo mecanismo de fragmentação Retro-Diels-Alder está apresentado na figura 75 (pag. 142).

Figura 76 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor m/z 447 em modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura da quercetina-3-O-ramnosídeo, compatível com os dados apresentados.



Os íons precursores de m/z 561, 593 e 609 são correspondentes a três dímeros de proantocianidinas, sendo que o espectro obtido para a espécie *E. brasiliensis* apresenta os dímeros de m/z 593 e 609 e o espectro obtido para a espécie *E. involucrata* apresenta os dímeros de m/z 561 e 609.

O espectro de fragmentação obtido para o íon precursor de m/z 561 (Figura 77) apresenta o íon de m/z 289 [M-272-H]⁻ referente à [epi]catequina e,

portanto, a eliminação de um fragmento neutro de 272 Da. De acordo com este espectro, este íon foi formado pelo mecanismo de fragmentação Quinona Metídeo (GU et al., 2003). A conexão deste dímero foi identificada como [epi]afzelequina - [epi]catequina.

A fragmentação do íon precursor de m/z 593 (Figura 78) gerou os íons de m/z 425 e 407 formados pelo mecanismo de fragmentação retro-Diels-Alder. A eliminação de um fragmento neutro de 304 Da gerou o íon de m/z 289 [M-272-H]⁻ referente à [epi]catequina formado pelo mecanismo de fragmentação Quinona Metídeo. Este dímero apresenta conexão [epi]galocatequina-[epi]catequina.

Após a fragmentação, o íon precursor de m/z 609 (Figura 79) gerou os íons de m/z 423 e 441 formados pelo mecanismo de fragmentação retro-Diels-Alder. O íon de m/z 305 [M-304-H]⁻ referente à [epi]galocatequina foi gerado devido à eliminação de um fragmento neutro de 304 Da pelo mecanismo de fragmentação Quinona Metídeo. Portanto, este dímero apresenta conexão [epi]galocatequina - [epi]galocatequina.

A proposta de fragmentação para os dímeros de m/z 561, 593 e 609 está mostrada na figura 80.

Figura 77 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor m/z 561 no modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura da [epi]afzelequina-[epi]catequina, compatível com os dados apresentados.

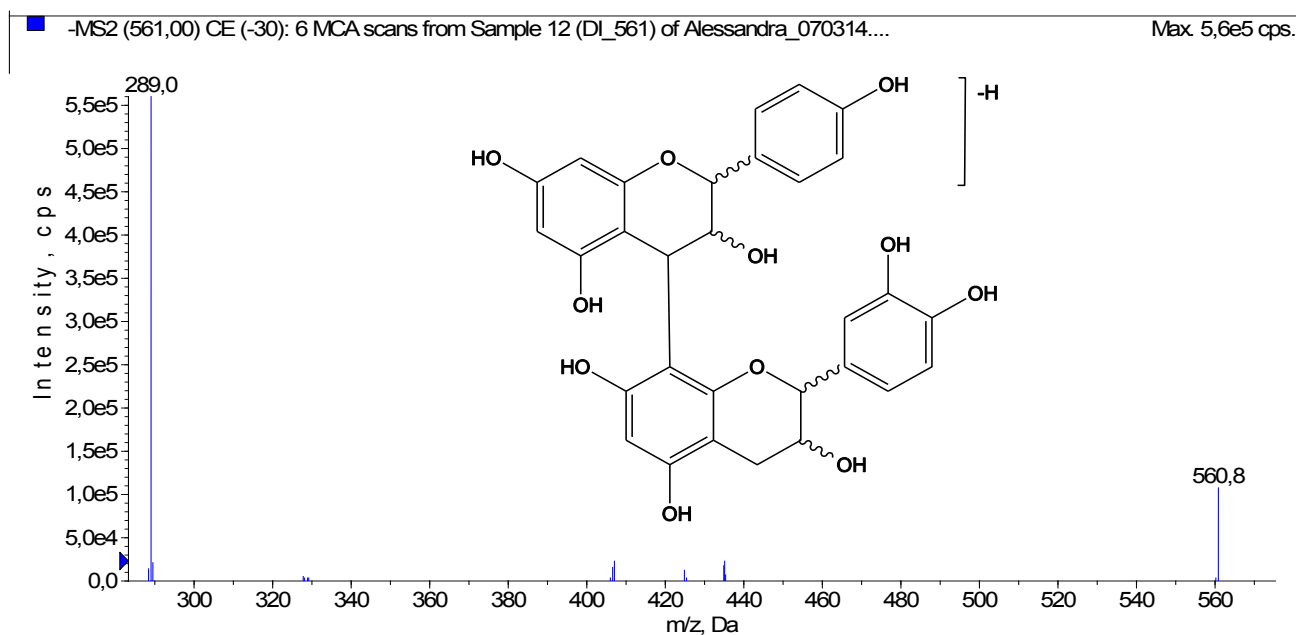


Figura 78 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor m/z 593 no modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura da [epi]galocatequina - [epi]catequina.

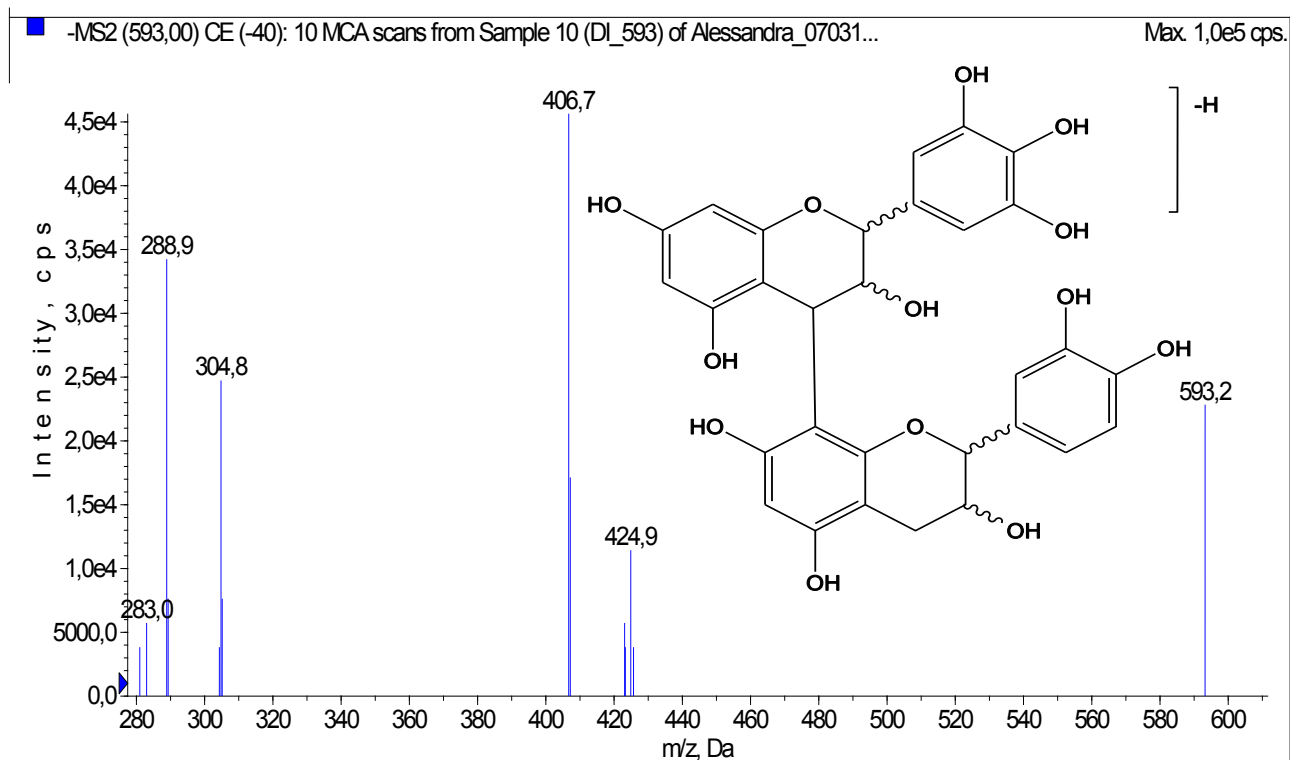


Figura 79 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor m/z 609 no modo negativo com energia de colisão 40 eV (condições de análise pag. 60) e estrutura da [epi]galocatequina - [epi]galocatequina.

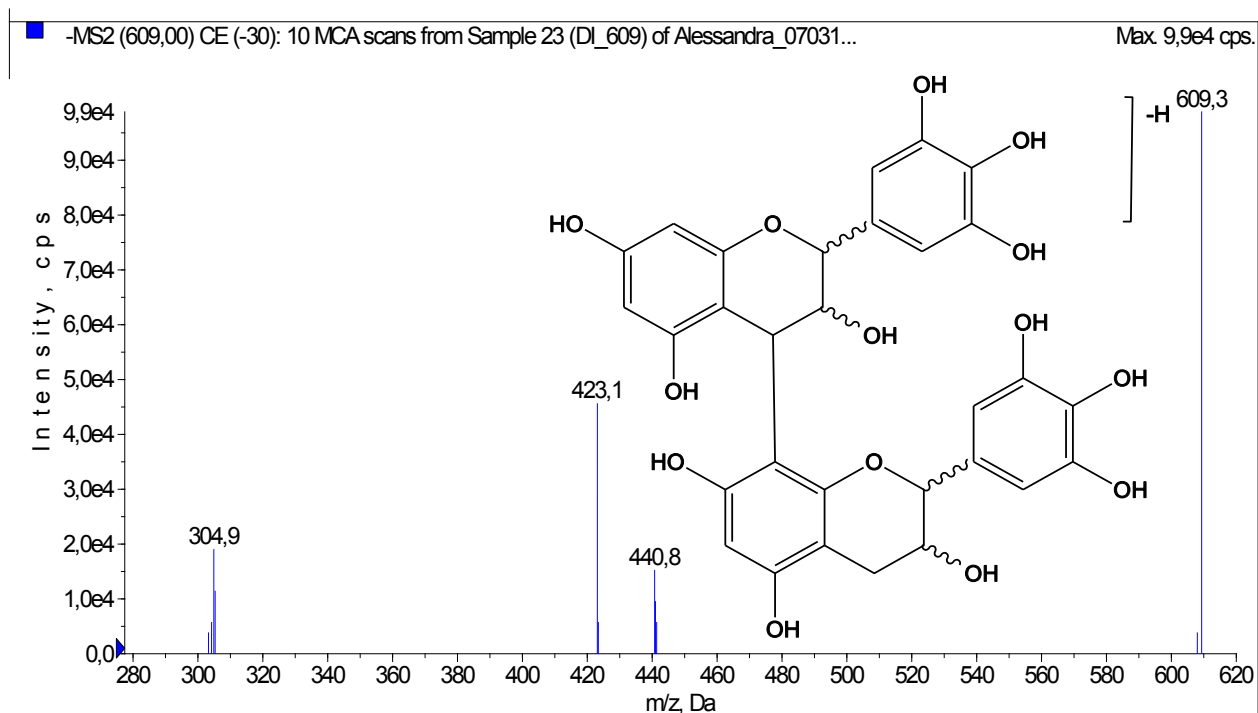
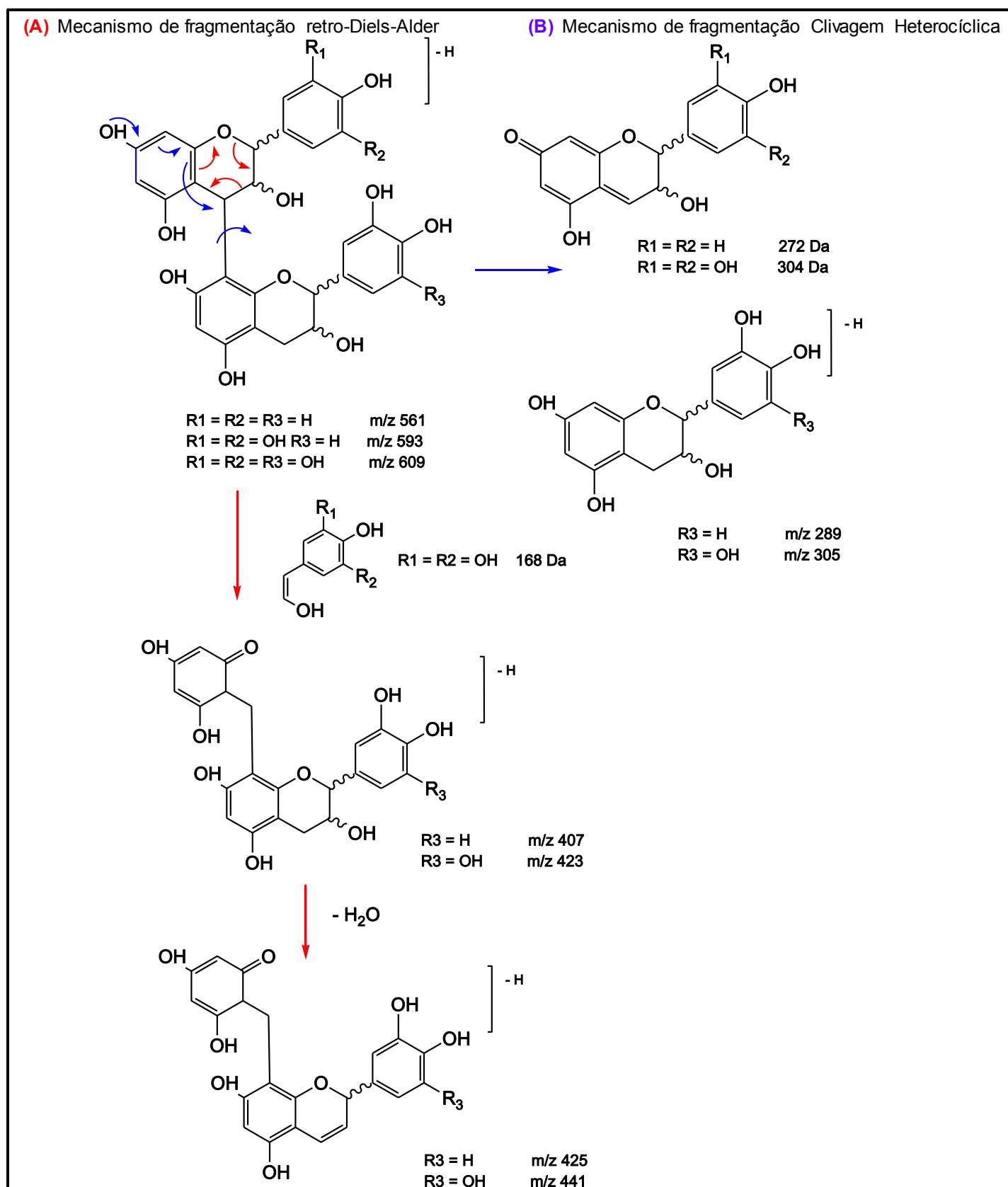


Figura 80 – Proposta de fragmentação para os dímeros presentes em *E. brasiliensis* e *E. involucrata*. (A) - Mecanismo de fragmentação retro-Diels-Alder e (B) - Mecanismo de fragmentação Quinona Metídeo.



Fonte: Figura adaptada de GU et al., 2003.

5.6 Ensaios Biológicos

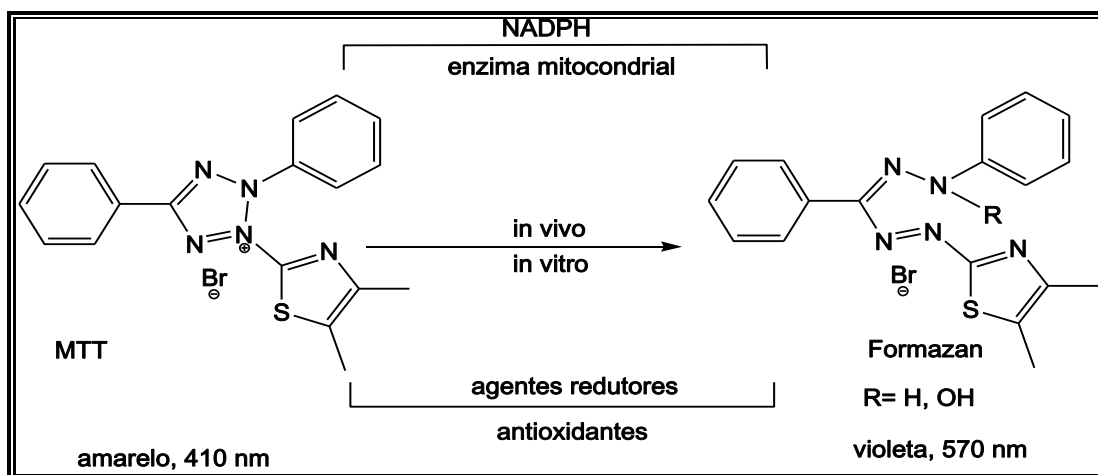
Os extratos EA - Fo, EM1 - Fo, EM2 - Fo, EA1 - Fo e EA2 - Fo foram testados quanto à sua atividade antioxidante através da redução do MTT e quanto à sua capacidade de inibir a oxidação de grandes vesículas unilamelares (*LUV's* - sigla em inglês). Os extratos das folhas EA - Fo, EM1 - Fo e EM2 - Fo foram testados também quanto à sua capacidade de inibição das enzimas COX-1 e COX-2.

5.6.1 Ensaio antioxidante usando MTT

O ensaio com MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-tetrazólio] é um ensaio colorimétrico usado para medir a atividade mitocondrial de células vivas. Essa atividade é medida através da conversão do MTT (amarelo - 410 nm) a formazana (violeta - 570 nm) que ocorre devido a uma reação de redução enzimática (Figura 81).

Tendo como base este princípio, o ensaio antioxidante com MTT foi desenvolvido para avaliar a habilidade das amostras testadas em participar das reações de óxido-redução (LIU & NAIR, 2010), permitindo extrapolar sua atividade em sistemas biológicos, por comparação com a ação da enzima redutora NADPH.

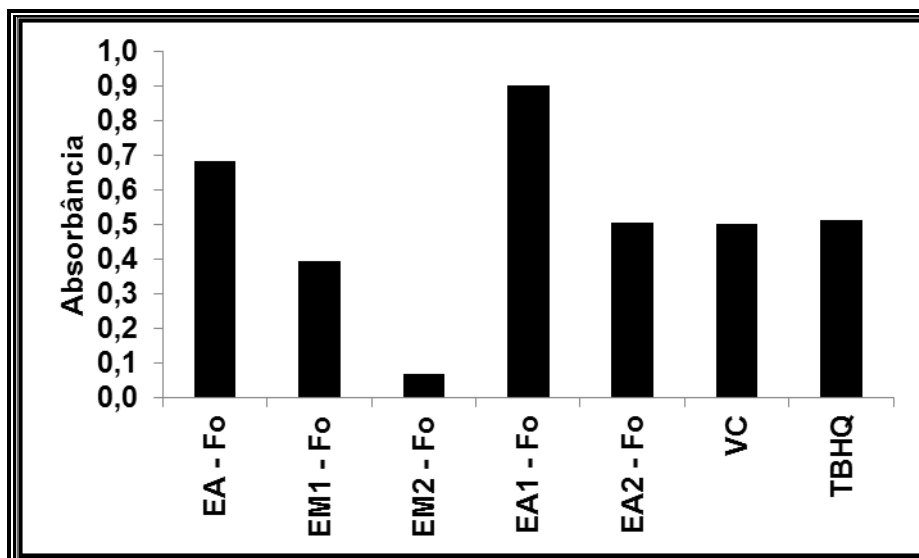
Figura 81 - Esquema de conversão do MTT (amarelo) a formazan (violeta).



Fonte: LIU & NAIR, 2010

Os extratos EA - Fo, EM1 - Fo, EM2 - Fo, EA1 - Fo e EA2 - Fo, na concentração de 250 µg/ml, reagiram com MTT e apresentaram absorvância de 0,69; 0,39; 0,07; 0,90 e 0,50, respectivamente, a 570 nm (Figura 82).

Figura 82 - Absorvância a 570nm obtida após a reação entre os extratos das folhas de *E. brasiliensis* e MTT (250 ppm).



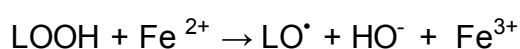
O extrato EA - Fo mostrou atividade maior que os controles positivos testados vitamina C e *terc*-butil-hidroquinona (VC e TBHQ). Após a combinação dos extratos EA - Fo e EM1 - Fo obteve-se dois novos extratos EA1 - Fo e EA2 - Fo que apresentaram absorvância maior e igual aos padrões utilizados, respectivamente. O extrato EA1 - Fo apresentou atividade 40% maior que os controles utilizados (vitamina C e TBHQ) e 30% maior que os extratos de origem (EA - Fo e EM1 - Fo). O aumento na absorvância observado para este extrato pode ser explicado pelo sinergismo que ocorreu entre as substâncias após a combinação dos extratos.

A atividade antioxidante por redução do MTT para os extratos aquosos é, provavelmente, devido à presença de catequina e seus derivados nestes extratos (LIU & NAIR, 2010).

Os resultados obtidos indicam que as substâncias presentes nos extratos de *E. brasiliensis* são capazes de reduzir o MTT por um mecanismo semelhante ao da enzima mitocondrial e do NADPH, evidenciando seu potencial antioxidante.

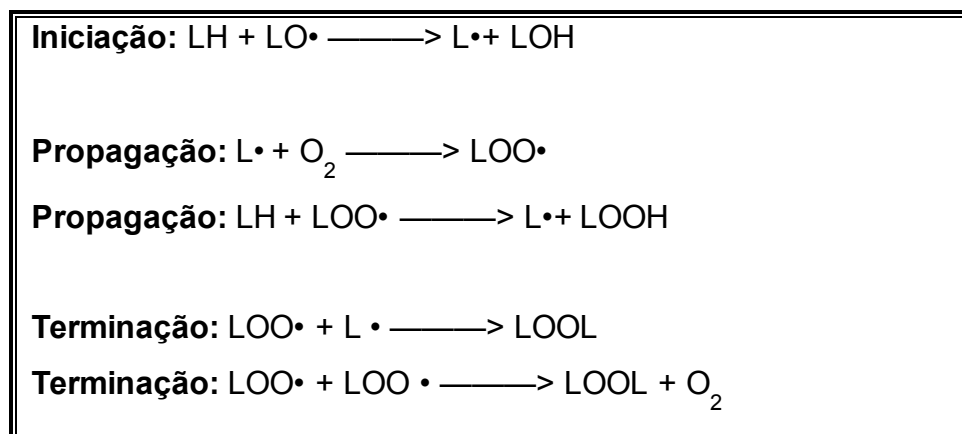
5.6.2 Ensaio de inibição da lipoperoxidação

Este ensaio tem como princípio avaliar a capacidade das amostras testadas em inibir a oxidação da membrana celular. Para isto, a membrana celular foi mimetizada por vesículas unilamelares grandes, formadas na reação entre o lipídio e a sonda fluorescente, ácido 3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]-fenilpropiônico. Após adição de amostras teste ou de padrões positivos (BHA, BHT, ou TBHQ), a oxidação destas vesículas foi catalisada pela adição de Fe^{2+} :



O radical livre formado desencadeia o processo de reações radicalares que possui três estágios: iniciação, propagação e terminação (Figura 85) (LIMA & ABDALLA, 2001).

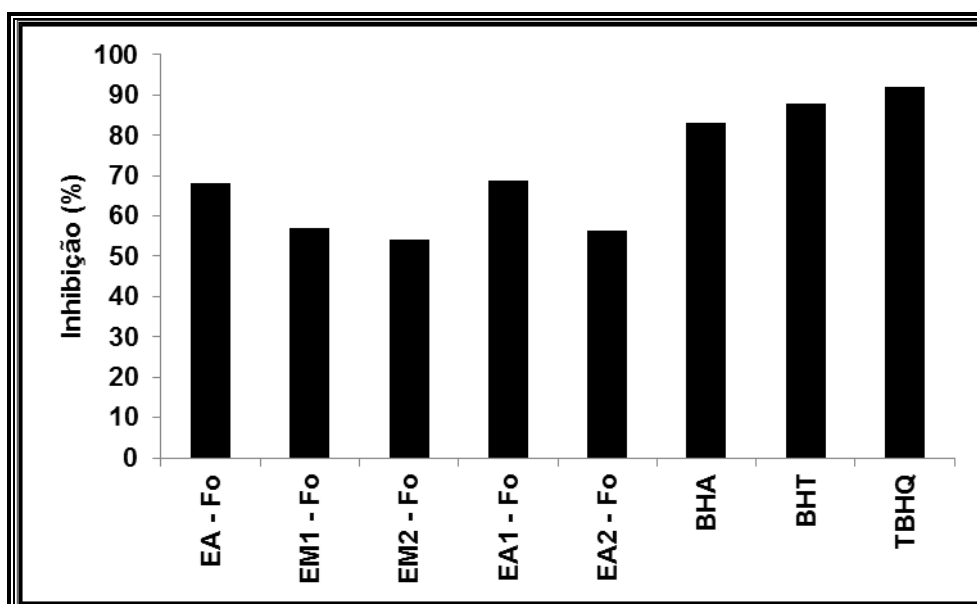
Figura 83 - Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica.



Fonte: LIMA & ABDALLA, 2001

A inibição da lipoperoxidação foi medida pela capacidade das substâncias presentes nas amostras em capturar os radicais livres formados. Os extratos EA - Fo, EM1 - Fo, EM2 - Fo, EA1 - Fo e EA2 - Fo na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ inibiram 68%, 57%, 54%, 67% e 56% da oxidação das vesículas unilamelares, respectivamente (Figura 86), evidenciando potencial moderado de inibição da peroxidação lipídica neste modelo.

Figura 84 - Capacidade de inibição de oxidação das vesículas unilamelares dos extratos das folhas de *E. Brasiliensis*



A atividade antioxidante por inibição da lipoperoxidação para os extratos aquosos é, provavelmente, devido à presença de catequina e seus derivados nestes extratos (SEERAM et al., 2003).

5.6.3 Ensaio de inibição das enzimas COX-1 e COX-2

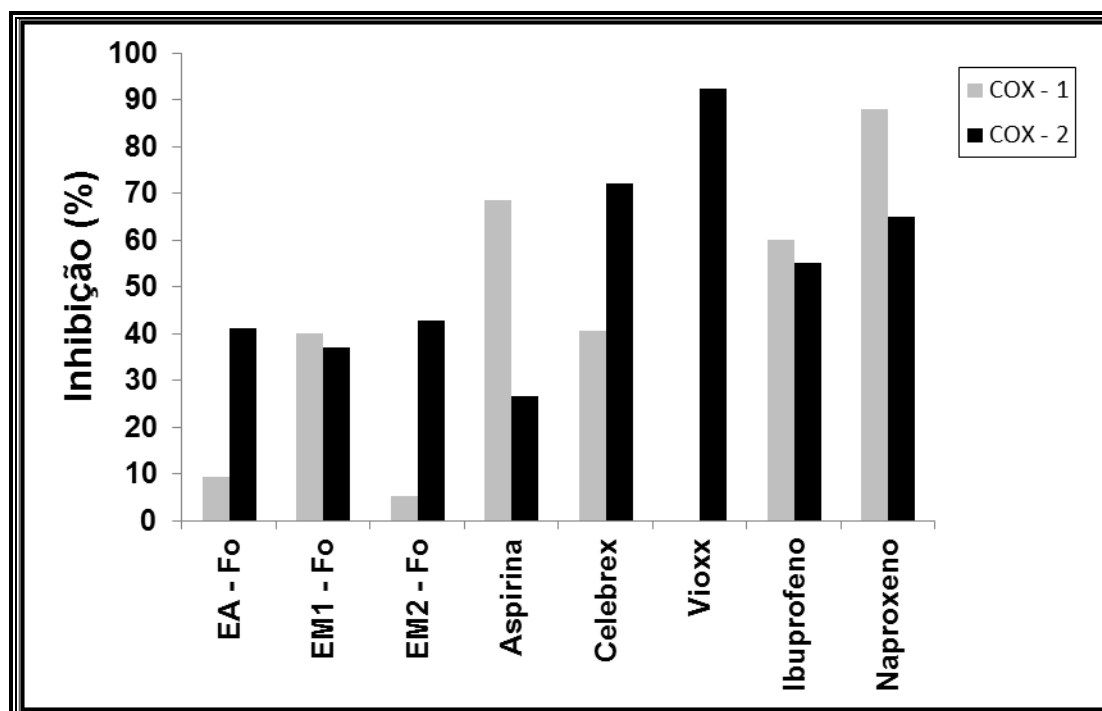
As enzimas cicloxigenases (COX) ou prostaglandina endoperóxido H sintases (PGHS) podem ser usadas para se medir os efeitos anti-inflamatórios de produtos naturais e são o alvo farmacológico para a descoberta de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAID).

Estudos mostram que as substâncias capazes de inibir a atividade enzimática das COX podem prevenir diferentes tipos de câncer, pois bloqueiam a síntese das prostaglandinas que são associadas ao processo de carcinogênese ou de progressão do câncer. Como a COX-2 é a responsável pela produção de prostaglandinas envolvidas em processos inflamatórios e cancerosos, é importante que haja a inibição seletiva desta enzima.

Os extratos EA - Fo, EM1 - Fo e EM2 - Fo na concentração de 100 µg/ml apresentaram valores de inibição para as enzimas COX-1 e COX-2 de 9% e

41%, 40% e 37%, 5% e 43%, respectivamente (Figura 63). Os extratos EA - Fo e EM2 - Fo foram seletivos para inibir a COX-2, enquanto que o extrato EM1 - Fo não mostrou seletividade significativa e inibiu as duas enzimas.

Figura 85 - Atividade de inibição das enzimas COX-1 and COX-2 pelos extratos das folhas de *E. brasiliensis*.



Os resultados obtidos estão de acordo com a medicina popular que relata o uso do chá das folhas de *E. brasiliensis* para o tratamento de doenças inflamatórias (PIETROVCKI et al., 2008). A atividade anti-inflamatória por inibição das ciclo-oxigenases para os extratos aquosos é, provavelmente, devido à presença de catequina e seus derivados nestes extratos (SEERAM et al., 2003).

6 Conclusões

O estudo químico das folhas e frutos de ambas as espécies possibilitou a identificação de 16 antocianinas [cianidina-3-O-soforosídeo (**A**₁), delphinidina-3-O-laminaribiosídeo (**A**₂), delphinidina-3-O-galactosídeo (**A**₃), delphinidina-3-O-glicosídeo (**A**₄), cianidina-3-O-galactosídeo (**A**₅), cianidina-3-O-laminaribiosídeo (**A**₆), cianidina-3-O-sambubiosídeo (**A**₇), cianidina-3-O-cafeoil-diglicosídeo (**A**₈), cianidina-3-O-glicosídeo (**A**₉), cianidina-3-O-cafeoil-glicosídeo (**A**₁₀), delphinidina-3-O-cumaroil-glicosídeo (**A**₁₁), pelargonidina-3-O-glicosídeo (**A**₁₂), cianidina-3-O-maloil-glicosídeo (**A**₁₃), cianidina-3-O-acetoil-glicosídeo (**A**₁₄), cianidina-3-O-pentósídeo (**A**₁₅) e delphinidina (**A**₂₀)] nos frutos, o isolamento de 5 substâncias [dissacarídeo (**1**), 2-(S)-7,5-di-hidroxi-6-metilflavanona (**2**), 2-(S)-7,5-di-hidroxi-6,8-dimetilflavanona (**3**), 2'-6'-di-hidroxi-3'-metil-4'-metoxi-di-hidrochalcona (**4**) e (*R*)-7,8,7',8'-tetra-hidro-8,8'-dimetil-3,3'-dimetoxi-4,4'-di-hidroxi-dibenzociclo-octadieno (**5**)] das folhas de *E. brasiliensis* e a identificação de 11 substâncias nas infusões [ácido gálico (**C**₁), ácido cafeico (**C**₂), ácido quínico (**C**₃), [*epi*]catequina (**C**₄), [*epi*]galocatequina (**C**₅), ácido cafeoil-O-glicosídeo (**C**₆), quercetina-3-O-ramnosídeo (**C**₇), [*epi*]afzelequina-[*epi*]catequina (**C**₈), [*epi*]galocatequina-[*epi*]catequina (**C**₉) e [*epi*]galocatequina-[*epi*]galocatequina (**C**₁₀)]. Dentre as substâncias identificadas e isoladas, apenas as substâncias **A**₃, **A**₄, **A**₅, **A**₉, **C**₄ e **C**₅ foram previamente identificadas na espécie *E. brasiliensis*, enquanto as outras substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez nesta espécie e todas as substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez na espécie *E. involucrata*. A substância **5**, isolada das folhas de *E. brasiliensis* é uma estrutura inédita na literatura.

Este trabalho também teve como objetivo a validação de um método analítico para quantificar as antocianinas majoritárias presentes nos frutos das espécies estudadas. A validação seguiu os parâmetros preconizados pela resolução RE 899 da ANVISA e teve resultados condizentes com as especificações estabelecidas e, por isso, pode ser usado para quantificar antocianinas presentes em extratos de frutos, folhas e flores. Embora o tempo de análise seja de 40 minutos, este método possui como vantagem a baixa concentração de solvente orgânico usado na fase móvel sendo esta concentração de aproximadamente 50% de acetonitrila na fase orgânica. A

otimização de condições cromatográficas com composição reduzida de solventes orgânicos atende a princípios da Química Verde, importante tanto do ponto de vista de desenvolvimento de processos, como de estabelecimento de novos paradigmas na formação de recursos humanos.

Portanto, o estudo químico das folhas e frutos de *E. brasiliensis* e *E. involucrata*, realizado neste trabalho, forneceu informações valiosas sobre as substâncias presentes nestas espécies. O estabelecimento da composição química de espécies vegetais, em especial, daquelas usadas na medicina tradicional, é etapa de destacada importância e contribui para estudos subsequentes visando o aproveitamento da biodiversidade, por exemplo, no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos ou produtos fitoterápicos.

Os extratos das folhas de *Eugenia brasiliensis* apresentam atividade antioxidante evidenciada através de reações de óxido-redução (MTT) e reações radicalares (inibidoras de lipoperoxidação) e ainda, atividade anti-inflamatória, observada pela da inibição seletiva da enzima COX-2 para os extratos EA-Fo e EM2-Fo e inibição das enzimas COX-1 e COX-2 para o extrato EM1-Fo. A atividade anti-inflamatória encontrada nos extratos desta espécie contribui para justificar o uso das folhas na forma de chá na medicina popular para o tratamento de artrite e reumatismo. É importante salientar que o extrato EA-Fo é correspondente à infusão das folhas de *E. brasiliensis* e a presença de catequinas e seus derivados neste extrato evidencia seu potencial para justificar as atividades biológicas relatadas neste trabalho. Assim, pode-se destacar a importância de estudos de bioprospecção, incluindo estratégias de fracionamento biomonitorado, em que a detecção de bioatividade em extratos brutos orienta a seleção de amostras promissoras e permite o acompanhamento para obtenção de frações semipurificadas ou substâncias isoladas, responsáveis pela atividade biológica inicialmente verificada. No caso das espécies de *Eugenia* estudadas, os resultados obtidos destacam as atividades antioxidante e anti-inflamatória das amostras investigadas, confirmando o reconhecido potencial antiradicalar de flavonoides e outras substâncias fenólicas, importantes para manutenção do equilíbrio redox em sistemas biológicos. Adicionalmente, a associação das propriedades antioxidantes com a observação da inibição de ciclo-oxigenases, em especial, COX-2, pelas amostras analisadas, sugere potencial atividade

quimiopreventiva, importante para se evitar a instalação dos eventos iniciais relacionados à carcinogênese, por exemplo, induzindo a atividade de enzimas destoxicantes. Neste contexto, merece destaque a composição dos frutos das espécies de *Eugenia* investigados, ricos em antocianinas, que são reconhecidas por sua excelente atividade quimioprotetora, o que justifica o estímulo ao consumo de frutos vermelhos por órgãos como o NIH (National Institutes of Health, EUA), FAO (Food and Agriculture Organization, ONU) e Food and Feed Safety-European Commission (Europa).

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 de junho de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 12 dez. 2013.

AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3307-3330, 1992.

AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S. ¹³C NMR spectroscopy of lignan and neolignan derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 23, p. 389-418, 1985.

ALLARD, P. M.; DAU, E. T. H.; EYDOUX, C.; GUILLEMOT, J. C.; DUMONTET, V.; POUILLAIN, C.; CANARD, B.; GUÉRITTE, F.; LITAUDON, M. Alkylated flavanones from the bark of *Cryptocarya chartacea* as dengue virus NS5 polymerase inhibitors. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2446-2453, 2011.

AMORIM, A. C. L.; LIMA, C. K. F.; HOVELL, A. M. C.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (brazilian pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, p. 923-928, 2009.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. The anthocyanins. In: _____. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and application**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. Cap. 10, p. 471-523.

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Chemical composition of the essential oils of *Eugenia beaurepaireana* and *Eugenia pyriformis*: section *Dichotomae*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 191-192, 2004a

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Essential oil composition of *Eugenia florida* and *Eugenia mansoi*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 321-322, 2004b.

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Essential oils from *Eugenia* species. Part VII: sections *Phyllocalyx* and *Stenocalyx*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 135-138, 2004c.

APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; NTALANI, H.; VERIN, P.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Chemical Composition of the essential oils of *Eugenia hyemalis* and *Eugenia stigmata*. Part VI: section *Biflorae*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 437-439, 2004d.

APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; NTALANI, H.; VERIN, P.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Chemical composition of the essential oils from southern brazilian *Eugenia* species. Part II ^{1,2}. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, p. 259-262, 2002a.

APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; NTALANI, H.; VERIN, P.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Chemical composition of the essential oils from southern brazilian *Eugenia* species. Part II. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, p. 163-166, 2002b.

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Volatile constituents of *Eugenia mattsii* Legr. (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 284-285, 2005.

BANDYOPADHYAY, S. S.; GHOSHA, D.; MICARD, V.; SINHA, S.; CHATTERJEE, U. R.; RAY, B. Structure, fluorescence quenching and antioxidant activity of a carbohydrate polymer from *Eugenia jambolana*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 158-164, 2012.

BANNON, C. D.; EADE, R. A.; SIMES, J. J. H. Extractives of australian timbers. XVI. The constituents of the wood of *Eugenia crebrinervis* (syn. *Syzygium crebrinerve*) and *Eugenia gustavioides* (syn. *Cleistocalyx gustavioides*). **Australian Journal of Chemistry**, v. 29, p. 1135-1141, 1976.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Bioamas**. Disponível em: <www.mma.gov.br>. Acesso em: 06 jan 2014.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

CALANI, L.; RIO, D. D.; CALLEGARI, M. L.; MORELLI, L.; BRIGHENT, F. Updated bioavailability and 48h excretion profile of flavan-3-ols from green tea in humans. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, p. 513-521, 2012.

CARDOSO, L. M.; MARTINO, H. S. D.; MOREIRA, A. V. B.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Research International**, v. 44, p. 2151-2154, 2011.

CARVALHO, P. E. R. Cerejeira *Eugenia involucrata*. In: _____. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v. 8. p. 1-8.

CASÓS, K.; SIJERO, L.; FERNÁNDEZ-FIGUERAS, M. T.; LEÓN, X.; SARDÁ, M. P.; VILA, L.; CAMACHO, M. Tumor cells induce COX-2 and mPGES-1 expression in microvascular endothelial cells mainly by means of IL-1 receptor activation. **Microvascular Research**, v. 81, p. 261-268, 2011.

- CASTANEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859-871, 2009.
- CELLI, G. B.; PEREIRA NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v. 44, p. 2442-2451, 2011.
- CHANG, H. F.; YAN, L. L. Radical-scavenging and rat liver mitochondria lipid peroxidative inhibitory effects of natural flavonoids from traditional medicinal herbs. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 997-1006, 2012.
- COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 877-886, 2007.
- COSTA, D. P.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Seasonal variability of essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1287-1293, 2009.
- COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. M. A.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B. H. N.; SILVA, M. R. R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 111-117, 2000.
- CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical Review**, v. 109, p. 3012-3046, 2009.
- CRAVEIRO, A. A.; ANDRADE C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHAW, M. I. L. Essential oil of *Eugenia jambolana*. **Journal of Natural Products**, v. 46, p. 591-592, 1982.
- CRUZ, A. B.; MALHEIROS, A.; GARCIA, A. C.; MEYRE-SIVA, C.; QUINTÃO, N. L. M.; NIERO, N.; SILVA, R. M. L.; ANDRADE, S. F.; BRESOLIN, T. M. B.; CEQUINEL FILHO, V. Potencial terapêutico de algumas plantas medicinais da flora catarinense. In: _____. SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognisia coletânea científica**. Ouro Preto: Ed. UFOP, 2011. Cap. 3, p. 117-156.
- DAMETTO, A. C. **Bioprospecção em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae)**. 2010. 139 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

DEFAVERI, A. C. A.; SATO, A.; BORRÉ, L. B.; AGUIAR, D. L. M.; SAN GIL, R. A. S.; ARRUDAD, R. C. O.; RIEHL, C. A. S. *Eugenia neonitida* Sobral and *Eugenia rotundifolia* Casar. (Myrtaceae) essential oils: composition, seasonality influence, antioxidant activity and leaf histochemistry. **Journal Brazilian of Chemical Society**, v. 22, p. 1531-1538, 2011.

DELLACASSA, E.; LORENZO, D.; MONDELLO, L.; COTRONEO, A. Uruguayan essential oils. Part VII. Composition of leaf oil of *Eugenia uruguayensis* Camb. var. *uruguayensis* (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, p. 295-297, 1997.

DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: _____. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. London: Wiley, 2009. Cap. 4, p. 137-174.

DOMINGUES, E. A.; NAKAMURA, C. V.; SOUZA, M. C.; TEIXEIRA, T. S.; PEIXOTO, J. L. B.; SARRAGIOTTO, M. H.; VIDOTTI G. J. Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 23-2, 2010.

DUARTE, A. R.; NAVES, R. V.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Seasonal influence on the essential oil variability of *Eugenia dysenterica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 967-974, 2009.

DUARTE, A. R.; COSTA, A. R. T.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; NAVES, R. V. Changes in volatile constituents during fruit ripening of wild *Eugenia dysenterica* DC. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 30-32, 2008.

FANG, J.; PAETZ, C.; SCHNEIDER, B. C-methylated flavanones and dihydrochalcones from *Myrica gales* eeds. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 68-70, 2011.

FAQUETI, L. G.; PETRY, C. M.; MEYRE-SILVA, C.; MACHADO, K. E.; CRUZ, A. B.; GARCIA, P. A.; CECHINEL FILHO, V.; FELICIANO A. S.; MONACHE, F. D. Euglobal-like compounds from the genus *Eugenia*. **Natural Product Research**, v. 27, p. 28-31, 2013.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1571-1578, 2011.

FISCHER, D. C. H.; KATO, E. T. M.; KONISHI, S. T. Pharmacognostic characterization of leaves and stem barks of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 15-22, 2003.

FISCHER, D. C. H.; LIMBERGER, R. P.; HENRIQUES, A. T.; MORENO, P. R. H. Essential oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 499-500, 2005.

FLORES, G.; DASTMALCHI, K.; PAULINO, S.; WHALEN, K.; DABO, A. J.; REYNERTSON, K. A.; FORONJY, R. F.; D'ARMIENTO, J. M.; KENNELLY, E. J. Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1256-1262, 2012.

FRANCO, M. R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some Brazilian fruits: umbu-caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*), and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 48, p. 1263-1265, 2000.

FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R. M.; SILVA, A. M. P.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 338-343, 2005a.

FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R. M.; SILVA, A. M. P.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Purification of betulinic acid from *Eugenia florida* (Myrtaceae) by high-speed counter-current chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 411-415, 2005b.

GAFNER, S.; WOLFENDER, J. L.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and antibacterial chalcones from *Myrica serrata*. **Planta Medica**, v. 62, p. 67-69, 1996.

GAUCHER, M.; BERNONVILLE, T. D.; LOHOU, D.; GUYOT, S.; GUILLEMETTE, T.; BRISSET, M. N.; DAT, J. F. Histolocalization and physico-chemical characterization of dihydrochalcones: insight into the role of apple major flavonoids. **Phytochemistry**, v. 90, p. 78-89, 2013.

GIUSTI, M. M.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; GRIFFIN, D.; WROLSTAD, R. E. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4657-4664, 1999.

GODOY, R. L. O.; ALEGRIO, L. V.; DUARTE, A. A. Compositional analysis of the leaf oil of *Eugenia ovalifolia* Camb. (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 570-572, 1999.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S. Fitorreguladores e posição de explantes foliares na indução à calogênese em cerejeira-do-mato. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1759-1762, 2013.

GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; BIANCHI, G.; KELL, D. B. Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry for the characterisation of olive oils. **The Analyst**, v. 127, n. 11, p. 1457-1462, 2002.

GU, J. Q.; PARK, E. J.; LUYENGI, L.; HAWTHORNE, M. E.; MEHTAB, R. G.; FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventive activity. **Phytochemistry**, v. 58, p. 121-127, 2001.

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; ZHANG, Z.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R. L. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, p. 1272-1280, 2003.

GUPTA, G. S.; SHARMA, D. P. Triterpenoid and other constituents of *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 3, p. 2013-2014, 1974.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLWELL, B. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, p. 561-564, 2010.

HALLWELL, B. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, p. 125-126, 1995.

HALLWELL, B. Free radicals and antioxidants-*quo vadis?* **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HENRIQUES, A. T.; SOBRAL, M. E.; CAUDURO, A. D.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L.; LAMATY, G.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Aromatic plants from Brazil. II. The chemical composition of some *Eugenia* essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 5, p. 501-505, 1993.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 206-212, 2006.

HUSSEIN, S. A. M.; HASHEM, A. N. M.; SELIEM, M. A.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M. A. M. Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 883-889, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS. **SUS divulga lista de plantas medicinais**. Disponível em: <<http://www.ibflorestas.org.br/25-sustentabilidade/noticias/549-sus-divulga-lista-de-plantas-medicinais.html>>. Acesso em: 22 abr. 2014.

IWAMURO, H.; TAKENOKUCHI, H.; MATSUBARA, Y.; IIZUKA, Y. High-boiling constituents of clove oil (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) and hop oil (*Humulus lupulus* Linn.). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, p. 1099-2000, 1983.

JADEJA, R. N.; THOUAOJAM, M. C.; SANKHARI, J. M.; JAIN, M.; DEVKAR, R. V.; RAMACHANDRAN, A. V. Standardized flavonoid-rich *Eugenia jambolana* seed extract retards *in vitro* and *in vivo* LDL oxidation and expression of VCAM-1 and P-Selectin in atherogenic rats. **Cardiovascular Toxicology**, v. 12, p. 73-82, 2012.

JAYASINGHE, U. L. B.; RATNAYAKE, R. M. S.; MEDAWALA, M. M. W. S.; FUJIMOTO, Y. Dihydrochalcones with radical scavenging properties from the leaves of *Syzygium jambos*. **Natural Product Research**, v. 21, p. 551-554, 2007.

JUNGES, M. J.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; RODRIGUES FILHO, E. The use of ^{13}C and ^1H -NMR in the structural elucidation of a new nor-lupane triterpene. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 4, p. 317-320, 1999.

KALA, S. M. J.; BALASUBRAMANIAN, T.; SORIS, P. T.; MOHAN, V. R. GC-MS determination of bioactive components of *Eugenia singampattiana* Bedd. **International Journal of ChemTech Research**, v. 3, p. 1534-1537, 2011.

KIM, H. J.; LEE, J. S.; WOO, E. R.; KYUNG, K. M.; YANG, B. S.; YU, Y. G.; PARK, H.; LEE, Y. S. Isolation of virus-cell fusion inhibitory components from *Eugenia caryophyllata*. **Planta Medica**, v. 67, p. 277-279, 2001.

KRUGER, M. J.; DAVIES, N.; MYBURGH, K. H.; LECOUR, S. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, v. 59, p. 41-52, 2014.

KUIATE, J. R.; MOUOKEU, S.; WABO, H. K.; TANE, P. Antidermatophytic triterpenoids from *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 149-152, 2007.

KUSKOSKI, E. M.; VEGA, J. M.; RIOS, J. J.; FETT, R.; TRONCOSO, A. M.; ASUERO, A. G. Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5450-5454, 2003.

LAGO, J. H. G.; SOUZA, E. D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIM, M. A.; MARTINS, R. C. C.; BAROLI, A. A.; CARVALHO, B. A.; SOARES, M. G.; SANTOS, R. T.; SARTORELLI, P. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**, v. 16, p. 9827-9837, 2011.

LEE, M. H.; NISHIMOTO, S.; YANG, L. L.; YEN, K. Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 1343-1349, 1997.

LI, L.; ZHANG, Y.; SEERAM, N. P. Structure of anthocyanins from *Eugenia jambolana* fruit. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 2, p. 217-219, 2009.

- LILAMAND, M.; KELAIDITI, E.; GUYONNET, S.; INCALZI, R. A.; RAYNAUD-SIMON, A.; VELLAS, B.; CESARI, M. Flavonoids and arterial stiffness: promising perspectives. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, 2014. In press.
- LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p. 293-303, 2001.
- LIMA, N. P.; CERQUEIRA, S. H. F.; FÁVERO, O. A.; ROMOFF, P.; LAGO, J. H. G. Composition and chemical variation of the essential oil from leaves of *Eugenia brasiliensis* Lam. and *Eugenia* sp. (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 223-225, 2008.
- LIU, Y.; NAIR, M. G. An efficient and economical MTT assay for determining the antioxidant activity of plant natural product extracts and pure compounds. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 1193-1195, 2010.
- LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.
- LUNARDI, I.; PEIXOTO, J. L. B.; SILVA, C. C.; SHUQUEL, I. T. A.; BASSO, E. A.; VIDOTTI, G. J. Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 180-183, 2001.
- MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; WISNIEWSKI, A. Jr.; SIMIONATTO, E. L.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal Nature Medicine**, v. 63, p. 345-350, 2009.
- MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; DALMARCO, J. B.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 35, p. 1184-1188, 2012.
- MAHMOUD, I. I.; MARZOUK, M. S. A.; MOHARRAM, F. A.; EL-GIND, M. R.; HASSAN, A. M. K. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1239-1244, 2001.
- MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; LUZ, A. I. R. Essential oil of *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, p. 337-338, 1997.
- MALAMAN, F. S.; MORAES, L. A. B.; WEST, C.; FERREIRA, N. J.; OLIVEIRA, A. L. Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): relationship between the extracted compounds and the characteristic flavour intensity of the fruit. **Food Chemistry**, v. 124, p. 85-92, 2011.

- MANAHARAN, T.; APPLETON, D.; CHENG, H. M.; PALANISAMY, U. D. Flavonoids isolated from *Syzygium aqueum* leaf extract as potential antihyperglycaemic agents. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1802-1807, 2012.
- MANOHARAN, K. P.; SONG, F. J.; BENNY, T. K. H.; YANG, D. Triterpenoids from *Eugenia grandis*: structure elucidation by NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, p. 279-281, 2007.
- MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.
- MARIN, R.; APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P.; RASEIRA, M. C. B.; PEREIRA, J. F. M.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Volatile components and antioxidant activity from some Myrtaceae fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 172-177, 2008.
- MEDEIROS, J. R.; MEDEIROS, N.; MEDEIROS, H.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Composition of the bioactive essential oils from the leaves of *Eugenia stipitata* McVaugh ssp. *sororia* from the Azores. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 293-295, 2003.
- MELO, R. M.; CORRÊA, V. F. S.; AMORIM, A. C. L.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE C. M. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) leaf essential oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 179-183, 2007.
- MESKIN, M. S.; BIDLACK, W. R.; DAVIES, A. J.; LEWIS, D. S.; RANDOLPH, R. K. Absorption and metabolism of anthocyanins: potencial health effects. In: _____. **Phytochemical mechanisms of action**. Boca Raton: CRC Press, 2004. Cap. 1, p. 1-16.
- MOHAMMED, M. M. D.; HAMDY, A. H. A.; EL-FIKY, N. M.; METTWALLY, W. S. A.; EL-BEIH, A. A.; KOBAYASHI, N. Anti-influenza A virus activity of a new dihydrochalcone diglycoside isolated from the Egyptian seagrass *Thalassodendron ciliatum* (Forsk.) den Hartog. **Natural Product Research**, v. 28, p. 377-382, 2014.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 109-122, 2006.
- MORAES, M. M.; CAMARA, C. A. G.; SANTOS, M. L.; FAGG, C. W. Essential oil composition of *Eugenia langsdorffii* O. Berg.: relationships between some terpenoids and toxicity against *Tetranychus urticae*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1647-1656, 2012.

MORENO, P. R. H.; LIMA, M. E. L.; SOBRAL, M.; YOUNG, M. C. M.; CORDEIRO, I.; APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P.; HENRIQUES, A. T. Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. **Scientia Agricola**, v. 64, p.428-432, 2007.

MULABAGAL, V.; ALEXANDER-LINDO, R. L.; DEWITT, D. L.; NAIR, M. G. Health-beneficial phenolic aldehyde in *Antigonon leptopus* tea. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-6, 2009a.

MULABAGAL, V.; WANG, H.; NGOUAJIO, M.; NAIR, M. G. Characterization and quantification of health beneficial anthocyanins in leaf chicory (*Chicorium intybus*) varieties. **European Food Research Technology**, v. 230, p. 47-53, 2009b.

MULABAGAL, V.; LANG, G.; DEWITT, D.; DALAVOY, S.; NAIR, M. G. Anthocyanin content, lipid peroxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory activities of sweet and sour cherries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1239-1246, 2009c.

MULABAGAL, V.; NOCKER, S. V.; DEWITT, D.; NAIR, M. G. Cultivars of apple fruits that are not marketed with potential for anthocyanin production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8165-8169, 2007.

MULABAGAL, V.; NGOUAJIO, M.; NAIR, A.; ZHANG, Y.; GOTTUMUKKALA, A. L.; NAIR, M. G. *In vitro* evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. **Food Chemistry**, v. 118, p. 300-306, 2010.

NAKAMURA, M. J.; MONTEIRO, S. S.; BIZARRI, C. H. B.; SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S. Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1170-1175, 2010.

NEILSON, A. P.; FERRUZZI, M. G. Influence of formulation and processing on absorption and metabolism of flavan-3-ols from tea and cocoa. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 125-151, 2011.

NERI-NUMA, I. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; MORALES, J. P.; MALTA, L. G.; MURAMOTO, M. T.; FERREIRA, J. E. M.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, p. 70-76, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-447, 2007.

NONAKA, G. I.; ISHIMARU, K.; WATANABE, M.; NISHIOKA, I.; YAMAUCHI, T.; WAN, A. S. C. Tannins and related compounds. LI.¹⁾ Elucidation of the stereochemistry of the triphenoyl moiety in castalagin and vescalagin, and isolation of 1-O-galloyl castalagin from *Eugenia grandis*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 217-220, 1987.

NUENGCHAMNONG, N.; INGKANINAN, K. On-line characterization of phenolic antioxidants in fruits wines from family myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 297-302, 2009.

OGUNWANDE, I. A. ; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT, J. M.; SETZER, W. N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 147-152, 2005.

OLIVEIRA, A. L.; LOPES, R. B.; CABRAL, F. A.; EBERLIN, M. N. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, v. 99, p. 1-5, 2006.

OLIVEIRA, M. C.; ESPERANÇA, P.; ALMOSTER FERREIRA, M. A. Characterization of anthocyanins by electrospray ionization and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, p. 1525-1532, 2001.

OMAR, R.; LI, L.; YUAN, T.; SEERAM, N. P. α -glucosidase inhibitory hydrolyzable tannins from *Eugenia jambolana* seeds. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1505-1509, 2012.

ONO, E.; FUKUCHI-MIZUTANI, M.; NAKAMURA, N.; FUKUI, Y.; YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; YAMAGUCHI, M.; NAKAYAMA, T.; TANAKA, T.; KUSUMI, T. TANAKA, Y. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. **Proceeding of National Academy of Science**, v. 103, p. 11075-11080, 2006.

PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocynins: from plant to health. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 281-299, 2008.

PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I. D.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. A.; SATO, D. N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1222-1226, 2009.

PEREIRA, F. Prediction of the anomeric configuration, type of linkage, and residues in disaccharides from 1D ^{13}C NMR data. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 960-972, 2011.

PIETROVSKI, E. F.; MAGINA, M. D. A.; GOMIG, F.; PIETROVSKI, C. F.; MICKE, G. A.; BARCELLOS, M.; PIZZOLATTI, M. G.; CABRINI, D. A.; BRIGHENTE, I. M. C.; OTUKI, M. F. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 479-487, 2008.

PINO, J. A.; MARBOT, R.; PAYO, A.; CHAO, D.; HERRERA, P.; MARTÍ, M. P. Aromatic plants from western Cuba. I. Composition of leaf oil of *Gymnanthes lucida* Sw. and *Eugenia rhombea* (Berg) Krug et urban. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 278-280, 2005.

RAJ, G.; GEORGE, V.; SETHURAMAN, M. G. Chemical analysis of essential oil from the leaves of *Eugenia argentea* Bedd. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, p. 55-57, 2011.

RAJ, G.; GEORGE, V.; PRADEEP, N. S.; SETHURAMAN, M. G. Volatile constituents and antibacterial activity of *Eugenia rottleriana* Wight et Arn. leaf oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p. 588-590, 2007.

RAJASEKARAN, M.; BAPNA, J. S.; LAKSHMANANS, S. A. G.; NAIR, R.; VELIATH, A. J.; PANCHANADAM, M. Antifertility effect in male rats of oleanolic acid, a triterpene from *Eugenia jambolana* flowers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, p. 115-121, 1988.

RAMOS, M. F. S.; MONTEIRO, S. S.; SILVA, V. P.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Essential oils from Myrtaceae species of the Brazilian southeastern maritime forest (Restinga). **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 109-113, 2010.

RAMSEWAK, R. S.; DEWITT, D. L.; NAIR, M. G. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. **Phytomedicine**, v. 7, p. 303-308, 2000.

RAMSEWAK, R. S.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; DEWITT, D. L.; NITISS, J. L. Biologically active carbazole alkaloids from *Murraya koenigii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 444-447, 1999.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1603-1616, 2010.

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, p. 883-890, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. E. JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RYAN, D.; ROBARDS, K.; PRENZLER, P.; ANTOLOVICH, M. Applications of mass spectrometry to plant phenols. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 362-372, 1999.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSⁿ and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, v. 18, p. 8402-8416, 2013.

SEERAM, N. P.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G. Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins. **Nutrition and Cancer**, v. 46, n. 1, p. 101-106, 2003.

SENNA, L. M.; SOUZA, G. R.; BIZZO, H. R.; MOREIRA, D. L. Composição volátil das folhas de *Eugenia racemulosa* O. Berg. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, p. 51-54, 2011.

SHIH, P. H.; YEH, T. C.; YEN, G. C. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9427-9435, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Espectrometria de massas. In: _____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2007. Cap. 1, p. 1-35.

SONG, Q.; FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H. Dibenzocyclooctadiene-type lignans from *Magnolia pyramidata*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 653-661, 2000.

SOUZA, A.; LOPES, E. M. C.; SILVA, M. C.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M.; SOBRAL, M. E. G.; MORENO, P. R. H. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oils of *Myrcogenia myrcioides* (Cambess.) O. Berg and *Eugenia riedeliana* O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p.175-179, 2010.

STEFANELLO, M. E. A.; CERVI, A. C.; ITO, I. Y.; SALVADOR, M. J.; WISNIEWSKI, A. J.; SIMIONATTO, E. L. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 75-78, 2008.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 60-64, 2004.

TANG, S. Y.; HALLIWELL, B. Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, p. 1-5, 2010.

TIMBOLA, A. K.; SZPOGANICZ, B.; BRANCO, A.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 174-176, 2002.

- TSANOVA-SAVOVA, S.; RIBAROVA, F. Flavonols and flavones in some bulgarian plant foods. **Polish Journal of Food Nutrition Sciences**, v. 63, p. 173-177, 2013.
- VALENTE, A. L.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com/br/category/todos-os-artigos/cromatografia>>. Acesso em: 03 nov. 2013.
- VAREED, S. K.; REDDY, M. K.; SCHUTZKI, R. E.; NAIR, M. G. Anthocyanins in *Cornus alternifolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits. **Life Sciences**, v. 78, p. 777-784, 2006.
- VEIGAS, J. M.; NARAYAN, M. S.; LAXMAN, P. M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. **Food Chemistry**, v. 105, p. 619-627, 2007.
- VILA, R.; IGLESIAS, J.; CAÑIGUERAL, S.; SANTANA, A. I.; SOLÍS, P. N.; GUPTA, M. P. Constituents and biological activity of the essential oil of *Eugenia acapulcensis* Steud. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 384-386, 2004.
- WANG, Y.; CHEN, S.; YU, O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 91, p. 949-956, 2011.
- WU, X.; PRIOR, R. L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3101-3113, 2005.
- XU, S. L.; ZHU, K. Y.; BI, C. W. C.; CHOI, R. C. Y.; MIERNISHA, A.; YAN, A. L.; MAIWULANJIANG, M.; MEN, S. W. X.; DONG, T. T. X.; TSIM, K. W. K. Flavonoids induce the expression of synaptic proteins, synaptotagmin, and postsynaptic density protein-95 in cultured rat cortical neuron. **Planta Medica**, v.79, p. 1710-1714, 2013.
- YANG, G. Y.; LI, Y. K.; WANG, R. R.; LI, X. N.; XIAO, W. L.; YANG, L. M.; PU, J. X.; ZHENG, Y. T.; SUN, H. D. Dibenzocyclooctadiene lignans from *Schisandra wilsoniana* and their anti-HIV-1 activities. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 915-919, 2010.
- YANG, L. L.; LEE, C. Y.; YEN, K. Y. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 157, p. 65-75, 2000.
- YAZAKI, Y. Polyphenols and triterpenoids of *Eugenia gustavioides* wood. **Phytochemistry**, v. 16, p. 138-139, 1977.
- ZHANG, L. L.; LIN, Y. M. Antioxidant tannins from *Syzygium cumini* fruit. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 2301-2309, 2009.

ZHANG, P.; ZHANG, E.; XIAO, M.; CHEN, C.; XU, W. Enhanced chemical and biological activities of a newly biosynthesized eugenol glycoconjugate, eugenol α -D-glucopyranoside. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1043-1050, 2013.

ZHANG, Y.; MILLS, G.; NAIR, M. G. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7581-7585, 2002.

ZHANG, Y.; SEERAM, N. P.; LEE, R.; FENG, L.; HEBER, D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 670-675, 2008.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 999-1003, 1992.

ZOGHBI, M. G. B.; GUILHON, G. M. S. P.; SARGES, F. N.; PEREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. Chemical variability of the volatiles from the leaves of *Eugenia protenta* McVaugh (Myrtaceae) growing wild in the North of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39 p. 660-665, 2011.

ZUANASSI, J. A. S. Flavonoides. In: _____. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVISCK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 4. ed. Florianópolis: Ed. UFSC, 2002. Cap. 23, p. 499-426.