

ALESSANDRA CRISTINA DAMETTO

Bioprospecção em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae)

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em
Química

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

D157b Dametto, Alessandra Cristina
Bioprospecção em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae) / Alessandra
Cristina Dametto. - Araraquara : [s.n], 2010
139 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Química
Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

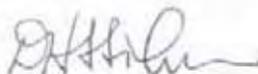
1. Produtos naturais. 2. Quimioprevenção. 3. Antocianinas.
4. Antioxidante. I. Título.

ALESSANDRA CRISTINA DAMETTO

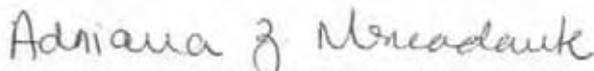
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 05 de março de 2010.

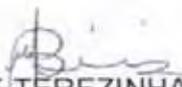
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª ADRIANA ZERLOTTI MERCADANTE
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas



Profª Drª MARILDE TEREZINHA BORDIGNON LUIZ
Centro de Ciências Agrárias – UFSC, Florianópolis

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, Roberto e Regina, aos meus irmãos, Patrícia e Gabriel e ao meu namorado, Marco.

*A Deus, meu Amado Pai,
pela força, paz e amor!*

*Aos meus queridos e amados pais, Roberto e Regina,
pelo amor, ensinamento, apoio e abnegação!*

*Aos meus irmãos adorados, Patrícia e Gabriel,
pelo companheirismo, amizade, amor e carinho!*

*Ao meu querido namorado, Marco, pelo amor, paciência,
companheirismo, amizade e compreensão!*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, coragem, alegria, paz e amor e a Nossa Senhora pela intercessão e proteção.

Aos meus pais, irmãos, cunhado e ao meu namorado que estão sempre ao meu lado compartilhando as alegrias e me incentivando nos momentos difíceis.

Aos meus tios Maria Helena e Sebastião que estiveram tão presentes em minha vida acadêmica e vibraram comigo cada conquista e vitória.

A toda minha família que ficou ao meu lado no momento mais difícil de minha vida e com isso trouxe-me muita alegria e conforto.

A Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva pela orientação, paciência, amizade, ensinamento e por me proporcionar condições para o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos funcionários do departamento de Química Orgânica por toda a ajuda e em especial ao Albertinho pela amizade, paciência e ensinamento, ao Nivaldo por compartilhar conhecimentos e amizade e ao Marquinho por toda a ajuda no laboratório.

Ao laboratório de Produtos Naturais e aos amigos Marcelo e Ana Lúcia por toda a ajuda e ensinamento da técnica de cromatografia em contracorrente.

Ao Prof^o. Dr^o Norberto Peporini Lopes e ao José Carlos Tomaz pelos ensinamentos da técnica Espectrometria de Massas e pelo auxílio no tratamento dos resultados.

A todos os colaboradores do NuBBE e a Caroline que realizaram os Ensaio Biológicos.

As secretárias da Seção de Pós-Graduação Sandra, Célia, Patrícia e Wennia pelo atendimento atencioso e amigável.

As bibliotecárias pela amizade e eficiente atendimento.

Aos funcionários do IQ pelo atendimento sempre atencioso e amigável.

Aos professores e alunos do NuBBE pela amizade e pelo companheirismo no laboratório.

Aos amigos do IQ, Adriana, Patricia, Rose, Jorge, Sheila, Flávia, João, Aroldo, Thayz, Lidiane, Daniel, Vânia, Glenda, Caroline, Marília, Fernando, Renata, Néia, Ademir, Josi, Márcio, Elaine, André, Juliana, Fernando, Cláudio Rodrigo, Vanessa, Carol, Miller e Phaniel (me perdoem se esqueço de alguém), pela amizade, pelas nossas discussões em grupos de estudos durante as disciplinas, pelo aprendizado e pelos momentos de descontração e alegria.

A Daniara que é uma das minhas grandes amigas pela amizade sincera e pelo exemplo de força e coragem. Dani, nem sei como lhe agradecer por você ter me indicado a Dulce, pois só assim pude trabalhar com este projeto com qual me apaixonei e me realizei profissionalmente. Também não poderia me esquecer dos ótimos momentos que tivemos juntas durante todos estes anos. Muito Obrigada!

À Capes pela Bolsa concedida.

Soneto da Fidelidade

*De tudo ao meu amor serei atento
Antes, e com tal zelo, e sempre, e tanto
Que mesmo em face do maior encanto
Dele se encante mais meu pensamento.*

*Quero vivê-lo em cada vão momento
E em seu louvor hei de espalhar meu canto
E rir meu riso e derramar meu pranto
Ao seu pesar ou seu contentamento*

*E assim, quando mais tarde me procure
Quem sabe a morte, angústia de quem vive
Quem sabe a solidão, fim de quem ama*

*Eu possa me dizer do amor (que tive):
Que não seja imortal, posto que é chama
Mas que seja infinito enquanto dure.*

Vinícius de Moraes

RESUMO

Eugenia jambolana é uma planta da família Myrtaceae, oriunda da Índia Oriental. No Brasil é conhecida como jabolão e suas folhas contêm uma mistura de polifenóis, especialmente flavonóides glicosilados, taninos elágicos e ácidos fenólicos. Os frutos contêm vitamina C, ácido gálico, taninos e antocianinas. As antocianinas constituem o maior grupo de flavonóides responsáveis pelas cores rosa, vermelho, violeta e azul encontradas em muitas flores, frutos e folhas. As antocianinas apresentam forte atividade antioxidante, e efeitos inibitórios no desenvolvimento de algumas linhagens de células cancerígenas. As condições de extração e de análise cromatográfica dos frutos foram otimizadas e oito antocianinas: delphinidina-diglicosídeo, cianidina-diglicosídeo, petunidina-diglicosídeo, malvidina-diglicosídeo, delphinidina-glicosídeo, cianidina-glicosídeo, petunidina-glicosídeo e malvidina-glicosídeo, presentes no extrato bruto dos frutos foram identificadas por CLAE-DAD e CLAE-EM/EM. As frações foram submetidas a diferentes técnicas de fracionamento, incluindo cromatografia em contracorrente de alta velocidade, cromatografia de permeação em gel, cromatografia em coluna usando sílica em fase reversa e cromatografia líquida de alta eficiência no modo preparativo. Estes fracionamentos, resultaram no isolamento e identificação de três antocianinas: delphinidina-3-O-gentiobiosídeo, petunidina-3-O-gentiobiosídeo e malvidina-3-O-gentiobiosídeo, através de análises de EM e RMN. Os extratos brutos dos frutos e das folhas e as frações obtidas das partições líquido-líquido foram testadas quanto às suas bioatividades e mostraram elevada ação sequestradora de radicais livres e quimiopreventiva, detectadas pelos ensaios com DPPH e pela indução da enzima quinona-redutase. Adicionalmente, as frações de *E. jambolana* testadas apresentaram atividade antimalárica, antifúngica frente a patógenos-humanos e anticolinesterásica.

Palavras-chave: *Eugenia jambolana*, antocianinas, antioxidante, quimioprevenção, Myrtaceae.

ABSTRACT

Eugenia jambolana is a plant from Myrtaceae, originally from eastern India. In Brazil it is known as “jambolão” and its leaves contain a mixture of polyphenols, especially flavonoid glycosides, ellagitannins and phenolic acids. The fruits contain vitamin C, gallic acid, tannins and anthocyanins. Anthocyanins are the largest group of flavonoids responsible for pink, red, violet and blue colors found in many flowers, fruits and leaves. The aglicone of anthocyanins is structurally based on the flavilium ion at pH <3. Anthocyanins exhibit strong antioxidant activity besides inhibitory effects on the development of some cancer cell lines. The conditions of extraction and chromatographic analysis of fruits were optimized and identification of eight anthocyanins: delphinidin-diglucoside, cyanidin-diglucoside, petunidin-diglucoside, malvidin-diglucoside, delphinidin-glucoside, cyanidin-glucoside, petunidin-glucoside and malvidin-glucoside, from the crude extract was carried out using HPLC-DAD and HPLC-MS/MS. Crude extracts and semipurified samples were subjected to various fractionation techniques, including HSCCC, GPC and reversed phase CC and preparative HPLC, which resulted in the isolation of three anthocyanins: delphinidin-3-O-gentiobioside, petunidin-3-O-gentiobioside and malvidin-3-O-gentiobioside through MS and NMR spectrometric analysis. Crude extracts of fruits and leaves, and the fractions resulting from liquid-liquid partition were evaluated for their bioactivity and displayed potent free radical scavenging and chemopreventive activities, using the DPPH and quinone-reductase induction assays. Additionally, the tested samples from *E. jambolana* presented antimalarial, antiacetylcholinesterase and antifungal activities towards human pathogenic fungi.

Keywords: *Eugenia jambolana*, anthocyanins, antioxidant, chemoprevention, Myrtaceae.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Frutos e folhas, árvore e flores de *Eugenia jambolana*. 28
- Figura 2:** Estrutura de uma antocinidina (A) e de uma antocianina (B). 31
- Figura 3:** Biossíntese das antocianinas. 32
- Figura 4:** Estruturas das antocianidinas mais comuns. 33
- Figura 5:** Estrutura da riccionidina (A) e rosacianina (B). 33
- Figura 6 :** Estrutura de uma piranoantocianina. 34
- Figura 7:** Estruturas químicas das antocianinas dependendo do pH do meio. 35
- Figura 8:** Mecanismo de estabilização do radical formado durante processos oxidativos. (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009) 39
- Figura 9:** Cromatograma analítico via CLAE-UV do grupo 2 [fase reversa C18, eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA) e detecção a $\lambda=254\text{nm}$]. 67
- Figura 10:** Antocianinas identificadas do EB-Fr [fase reversa C18-Hydro, eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA), 1mL min⁻¹, e detecção a $\lambda=520\text{nm}$]. 75
- Figura 11:** Otimização da condição cromatográfica usando o EB-Fr (fase reversa C18-Hydro, eluição gradiente, 1mL min⁻¹, e detecção a $\lambda=520\text{nm}$). 76

- Figura 12:** Análise cromatográfica via CLAE-DAD das frações Ac-Fr [fase reversa C18-Hydro; eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA), 1mL min⁻¹, e detecção a $\lambda = 254\text{nm}$]. 77
- Figura 13:** Análise cromatográfica via CLAE-DAD das frações Bu-Fr [fase reversa C18-Hydro; eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA) e detecção a $\lambda = 254\text{nm}$]. 77
- Figura 14:** Análise cromatográfica via CLAE-DAD das frações Ha-Fr (fase reversa C18-Hydro; eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA) e detecção a $\lambda = 254\text{nm}$). 78
- Figura 15:** Perfil cromatográfico das frações dos frutos [fase reversa C18-Hydro, eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA) e detecção a $\lambda = 254\text{nm}$]. 78
- Figura 16:** Espectros de UV-vis das antocianinas identificadas no EB-Fr. 79
- Figura 17:** Fragmentograma da antocianina **(1)**: delphinidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 627 por ESI-ToF-positivo (20eV)]. 81
- Figura 18:** Fragmentograma da antocianina **(2)**: cianidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 611 por ESI-ToF-positivo (15eV)]. 81
- Figura 19:** Fragmentograma da da antocianina **(3)**: petunidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 641 por ESI-ToF-positivo (15eV)]. 81
- Figura 20:** Fragmentograma da antocianina **(4)**: malvidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 655 por ESI-ToF-positivo (15eV)]. 82

- Figura 21:** Fragmentograma da antocianina **(5)**: delphinidina-glicosídeo [EM/EM por íons precursores de 465 por ESI-ToF-positivo (10eV)]. 82
- Figura 22:** Fragmentograma da antocianina **(6)**: cianidina-glicosídeo [EM/EM por íons precursores de 449 por ESI-ToF-positivo (10eV)]. 82
- Figura 23:** Fragmentograma da antocianina **(7)**: petunidina-glicosídeo [EM/EM por íons precursores de 479 por ESI-ToF-positivo (10eV)]. 83
- Figura 24:** Fragmentograma da antocianina **(8)**: malvidina-glicosídeo [EM/EM por íons precursores de 493 por ESI-ToF-positivo (20eV)]. 83
- Figura 25:** Proposta de fragmentação para a antocianina **(5)**: delphinidina-3-O-glicosídeo. 83
- Figura 26:** Proposta de fragmentação para a antocianina **(6)**: cianidina-3-O-glicosídeo. 84
- Figura 27:** Proposta de fragmentação para a antocianina **(7)**: petunidina-3-O-glicosídeo. 84
- Figura 28:** Proposta de fragmentação para a antocianina **(8)**: malvidina-3-O-glicosídeo. 84
- Figura 29:** Espectros no UV-vis das antocianinas isoladas de *E. jambolana*. 85
- Figura 30:** Espectro de RMN ¹H de Ha-Fr C18 – 10 [500 MHz δ CD₃OD/ CF₃COOD (19:1)]. 127
- Figura 31:** Espectro de RMN ¹H de Ha-Fr C18 – 10 ampliado na região aromática [500 MHz δ CD₃OD/ CF₃COOD (19:1)]. 128

Figura 32: Expansão do espectro de RMN tocsy-1d do H-1” da Ha-Fr C18 – 10 [500 MHz δ CD ₃ SOCD ₃ / CF ₃ COOD (19:1)].	129
Figura 33: Expansão do espectro de RMN tocsy-1d do H-1” da Ha-Fr C18 – 10 [500 MHz δ CD ₃ SOCD ₃ / CF ₃ COOD (19:1)].	130
Figura 34: Espectro de gHMQC da Ha-Fr C18 – 10 [500 MHz δ CD ₃ OD / CF ₃ COOD (19:1)].	131
Figura 35: Espectro de gHMBC da Ha-Fr C18 – 10 [500 MHz δ CD ₃ OD / CF ₃ COOD (19:1)].	132
Figura 36: Algumas correlações observadas no espectro de gHMBC da substância 4 .	87
Figura 37: Estrutura da antocianina (4): malvidina-3-O-gentiobiosídeo.	87
Figura 38: Espectro de RMN ¹ H de Ha-Fr C18 – 6 [500 MHz δ CD ₃ OD/ CF ₃ COOD (19:1)].	133
Figura 39: Espectro de RMN ¹ H de Ha-Fr C18 – 6 ampliado na região aromática [500 MHz δ CD ₃ OD/ CF ₃ COOD (19:1)].	134
Figura 40: Estrutura da antocianina petunidina glicosilada.	89
Figura 41: Estrutura da antocianina (1): delfinidina-3-O-gentiobiosídeo.	90
Figura 42: Estrutura da antocianina (3): petunidina-3-O-gentiobiosídeo.	90
Figura 43: Estrutura da antocianina (2): cianidina-3-O-gentiobiosídeo.	90

- Figura 44:** Fragmentograma da antocianina **(1)**: delphinidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 627 por ESI-ToF-positivo (15eV)]. 91
- Figura 45:** Fragmentograma da antocianina **(3)**: petunidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 641 por ESI-ToF-positivo (10eV)]. 92
- Figura 46:** Fragmentograma da antocianina **(4)**: malvidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 655 por ESI-ToF-positivo (15eV)]. 92
- Figura 47:** Proposta de fragmentação para a antocianina **(1)**: delphinidina-3-O-gentiobiosídeo. 93
- Figura 48:** Proposta de fragmentação para a antocianina **(2)**: cianidina-3-O-gentiobiosídeo. 93
- Figura 49:** Proposta de fragmentação para a antocianina **(3)**: petunidina-3-O-gentiobiosídeo. 94
- Figura 50:** Proposta de fragmentação para a antocianina **(4)**: malvidina-3-O-gentiobiosídeo. 94
- Figura 51:** Perfil cromatográfico dos extratos das folhas [fase reversa C18; eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA) e detecção a $\lambda=254\text{nm}$]. 95
- Figura 52:** Estruturas dos triterpenos e esteróis detectados nas folhas e nos frutos de *E. jabolana*. 98
- Figura 53:** Mecanismo da reação do radical DPPH com um antioxidante. 99

Figura 54: Inibição de DPPH no ensaio de ação sequestradora de radicais livres.	100
Figura 55: Princípio do ensaio da quinona redutase.	103
Figura 56: Resultado da atividade antifúngica para os fungos <i>C. cladosporioides</i> (A) e <i>C. sphaerospermum</i> (B).	106
Figura 57: Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterásica.	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massa dos extratos e frações obtidos das duas metodologias de partição.	62
Tabela 2: Gradiente exploratório MeOH:H ₂ O.	62
Tabela 3: Gradiente MeOH:H ₂ O.	63
Tabela 4: Fracionamento da Ac-Fr dos frutos de <i>E. jambolana</i> por CPG.	64
Tabela 5: Fracionamento da Bu-Fr dos frutos de <i>E. jambolana</i> por HSCCC.	65
Tabela 6: Fracionamento da Bu-Fr dos frutos de <i>E. jambolana</i> por CPG	66
Tabela 7: Fracionamento da Ha-Fr dos frutos de <i>E. jambolana</i> por C18.	68
Tabela 8: Antocianinas identificadas no EB-Fr de <i>E. jambolana</i> .	80
Tabela 9: Dados RMN de ¹ H [δ CD ₃ OD/CF ₃ COOD e CD ₃ SOCD ₃ / CF ₃ COOD (19:1)].	88
Tabela 10: Dados RMN de ¹ H [δ CD ₃ OD/CF ₃ COOD (19:1)].	89
Tabela 11: Identificação das antocianinas isoladas por Espectrometria de massas por ESI-ToF-positivo.	91
Tabela 12. Valores da retenção relativa das amostras com o colesterol na coluna SBP-5.	96
Tabela 13. Valores da retenção relativa das amostras com o colesterol na coluna SBP-50.	96

Tabela 14. Substâncias detectadas no extrato hexânico das folhas e na fração hexânica dos frutos <i>E. jambolana</i> .	97
Tabela 15: Valores de IC ₅₀ das amostras com atividade antioxidante.	101
Tabela 16. Atividade inibitória <i>in vitro</i> no ensaio de formação de β -Hematina	102
Tabela 17: Resultados de indução para as subfrações e fração dos frutos de <i>E. jambolana</i> .	104
Tabela 18: Resultados de indução para os extratos e frações das folhas de <i>E. jambolana</i> .	104
Tabela 19: Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos, frações e subfrações de <i>E. jambolana</i> .	107
Tabela 20: Valores de Rf das amostras com atividade anticolinesterásica.	108

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1:** Metodologia de partição líquido-líquido para o extrato dos frutos de *E. jambolana*. 61
- Fluxograma 2:** Metodologia de partição líquido-líquido para as folhas. 69

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Fórmula da constante de distribuição.	49
Equação 2: Cálculo do erro para as substâncias identificadas por EMAR.	58
Equação 3: Porcentagem de seqüestro do radical livre.	70
Equação 4: Porcentagem de inibição da formação de β -hematina.	71

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- [M – 162 – 162]⁺ - íon pico molecular menos duas unidades glicosídicas
- [M – 162]⁺ - íon pico molecular menos uma unidade glicosídica
- [M]⁺ - íon pico molecular
- μl h⁻¹ - microlitro por hora
- Ac-Fo - fração acetato folha
- Ac-Fr - fração acetato fruto
- AcoEt - acetato de etila
- ACY - antocianina
- APCI - ionização química a pressão atmosférica
- arranjos de diodos
- BAW - n-butanol:ácido acético:água
- BNF - β-naftoflavona
- Bu-Fo - fração n-butanólico folha
- Bu-Fr - fração n-butanólico fruto
- C18 - fase reversa
- CC - cromatografia em coluna
- CCD - cromatografia em camada delgada
- CD - células não tratadas
- CD₃OD - metanol deuterado
- CD₃SOCD₃ - dimetilsulfóxido deuterado
- CF₃COOD - ácido trifluoroacético deuterado
- CIL - Cambridge Isotope Laboratories
- CIM - concentração inibitória mínima
- CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
- CLAE-DAD - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de
- CLAE-EM - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
- CLAE-EM/EM - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
- CLAE-prep - cromatografia líquida de alta eficiência no modo preparativo

cm - centímetro
CPG - cromatografia de permeação em gel
DA - doença de Alzheimer
DP - desvio padrão
DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EB - extrato bruto dos frutos congelados
EB-Fo - extrato bruto das folhas
EB-Fr - extrato bruto dos frutos
EFS – extração em fase sólida
EHex-Fo - extrato hexânico das folhas
EI - impacto de elétrons
EM - espectrometria de massas
EMAR - espectrometria de massas de alta resolução
ESI - ionização por spray de elétrons
ESI-MS - espectrometria de massas por ionização por spray de elétrons
FAB - bombardeamento rápido de elétrons
gHMBC - gradiente de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C de longa distância
gHMQC - gradiente de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C
 H_2O - água
 H_2SO_4 - ácido sulfúrico
Ha-Fo - fração hidroalcoólica folha
Ha-Fr - fração hidroalcoólica fruto
HCl - ácido clorídrico
HEX - hexano
Hex-Fr - fração hexânico dos frutos
HSCCC - cromatografia em contracorrente de alta velocidade
 IC_{50} - concentração que inibe 50%
IQ - índice de quimioprevenção
 L min^{-1} - litro por minuto
m - metro
m/z - razão massa/carga
MeOH - metanol
 mg mL^{-1} - miligrama por mililitro

MHz - megahertz
mL- mililitro
mL min⁻¹ - mililitro por minuto
mm - milímetro
MTT - 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
mult. – multiplicidade
°C - grau Celsius
pag. - página
QR - quinona redutase
RMN - ressonância magnética nuclear
rpm - rotações por minuto
RR - retenção relativa
SPB-5 - 5% fenil-metil-silicone
SPB-50 - 50% fenil-metil-silicone
Tocsy -1D - espectroscopia totalmente correlacionada unidimensional
UV - ultravioleta
UV-vis - ultravioleta e visível
δ - deslocamento químico
λ_{máx.} - comprimento de onda de absorção máxima
μL - microlitro
μm - micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1 <i>Eugenia jambolana</i> (Myrtaceae)	27
1.3 Antocianinas	30
1.4 Estabilidade das Antocianinas	34
1.4 Influência do pH.....	34
1.4.2 Efeito da co-pigmentação	35
1.5 Bioatividade das antocianinas	36
1.6 Potencial antioxidante das antocianinas	37
1.7 Câncer	40
1.8 Agentes quimiopreventivos	41
1.9 Doença de Alzheimer (DA)	43
1.10 Malária	44
1.11 Fungos patógenos-humanos	45
1.12 Extração de antocianinas	46
1.13 Identificação e caracterização das Antocianinas	46
1.14 Técnicas cromatográficas e Espectrométricas	47
1.14.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	47
1.14.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	47
1.14.3 Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC)	48

1.14.4 Espectrometria de Massas (EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM)	49
1.14.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	51
2.OBJETIVOS	52
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1 Solventes	53
3.2 Reagentes.....	53
3.3 Concentração dos extratos	53
3.4 Extração das antocianinas	54
3.5 Métodos Cromatográficos.....	54
3.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	54
3.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	55
3.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de massas (CLAE-EM).....	55
3.5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no modo preparativo com detector UV (CLAE-prep-UV)	56
3.5.5 Cromatografia em coluna (CC)	56
3.5.6 Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC)	56
3.5.7 Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama (CG-DIC).....	57
3.6 Métodos Espectrométricos	58
3.6.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	58
3.6.2 Espectrometria de Massas (EM).....	58

3.7 Metodologia de preparo das amostras para as análises	59
4.PARTE EXPERIMENTAL	60
4.1 Coleta do material vegetal	60
4.2 Preparação do extrato bruto dos frutos (EB-Fr)	60
4.3 Partição do extrato bruto dos frutos	60
4.4 Otimização das condições de análise cromatográfica	62
4.5 Identificação das antocianinas presentes no EB-Fr	63
4.6 Fracionamento das frações dos frutos	63
4.6.1 Fracionamento da Fração Acetato (Ac-Fr).....	63
4.6.2 Fracionamento da fração n-butanólica (Bu-Fr).....	64
4.6.3 Fracionamento da fase hidroalcoólica (Ha-Fr)	67
4.7 Preparação do extrato bruto das folhas (EB-Fo)	68
4.8 Desreplicação da fração hexânica dos frutos (Hex-Fr) e do extrato hexânico das folhas (Hex-Fo)	69
4.9 Ensaio biológicos	70
4.9.1 Atividade seqüestradora de radicais livres	70
4.9.2 Ensaio antimalárico	71
4.9.3 Ensaio Quimiopreventivo por indução de Quinona-Redutase (QR)	71
4.9.4 Ensaio antifúngico fitopatógeno	73
4.9.5 Ensaio antifúngico patógeno-humano.....	73
4.9.6 Ensaio Anticolinesterásico	74
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	75

5.1 Preparação do Extrato Bruto dos Frutos	75
5.2 Otimização das condições de Análise Cromatográfica.....	75
5.3 Metodologia de partição	76
5.4 Estudo Químico dos Frutos	79
5.4.1 Identificação das antocianinas presentes no EB-Fr por CLAE-EM.....	79
5.4.2 Elucidação Estrutural das Antocianinas	85
5.5 Metodologia de partição das folhas.....	94
5.6 Identificação dos metabólitos secundários das folhas e dos frutos de <i>E. jabolana</i>.....	95
5.7 Ensaio Biológicos	99
5.7.1 Atividade antioxidante usando DPPH	99
5.7.2 Atividade antimalárica.....	101
5.7.3 Ensaio de Quimioprevenção por indução da enzima Quinona-Redutase (QR)	102
5.7.4 Ensaio antifúngico para fitopatógenos	106
5.7.5 Ensaio antifúngico patógeno-humano.....	106
5.7.6 Ensaio anticolinesterásico	107
6.CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS	112
ANEXO A	126
ANEXO B	135

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Eugenia jambolana* (Myrtaceae)

A família Myrtaceae é nativa de regiões tropicais, principalmente América do Sul e Sudeste da Ásia e Austrália, compreende cerca de 75 gêneros e 3000 espécies. Plantas desta família são ricas em óleos voláteis muito usados na medicina. A subfamília Myrtoide, pertencente a esta família, possui plantas com grande importância econômica, pois podem ser usadas como alimentos, na agricultura e como plantas ornamentais. Dentro desta subfamília estão os gêneros *Myrtus* (murta), *Psidium* (goiaba), *Myrciaria* (jaboticaba), *Eugenia* (pitanga), *Syzygium* (cravo-da-Índia), *Plinia* (cambucá) e *Luma*. (KUSKOSKI et al., 2003; MAHMOUD et al., 2001; REYNERTSON et al., 2008)

Assim como muitos gêneros pertencentes a subfamília Myrtoide o gênero *Eugenia* possui plantas que apresentam atividade antiinflamatória, analgésica, antipirética, antifúngica e é usada no tratamento de úlceras peptídicas. (KUSKOSKI et al., 2003; MAHMOUD et al., 2001). Além disso, muitas espécies de *Eugenia* são relatadas como plantas ricas em polifenóis, derivados de ácido gálico e elágico, taninos e flavonóides glicosilados. (MAHMOUD et al., 2001)

Eugenia jambolana (Lamb.), ou *Myrtus cumini* L., ou *Syzygium jambolanum* (Lamb.) DC, ou *Syzygium cumini* (L.) ou *Eugenia cumini* Druce é uma árvore da família Myrtaceae, originária da Índia oriental, (Figura 1) com até 30m de altura de copa ampla, muito ramificada. (SHARMA et al., 2008; SHARMA, BALOMAJUNDER & ROY, 2008; LI et al., 2009) Possui flores creme ou brancas com bastante néctar, pétalas arredondadas caracteristicamente em forma de capuz (Figura 1). Frutifica de janeiro a maio e seu fruto possui uma semente única e grande. Multiplica-se por sementes, desenvolve-se bem em qualquer tipo de solo, porém permeáveis e profundos. Prefere climas quentes e úmidos, principalmente de regiões litorâneas. É cultivada como planta ornamental e na medicina tradicional possui aplicações como adstringente,

estomáquica, diurética e anti-diabética. (LOGUERCIO et al., 2005; LI, ZHANG & SEERAM, 2009; SHARMA et al., 2008; SHARMA, BALOMAJUNDER & ROY, 2008; PEPATO et al., 2005; GROVER et al., 2000) Na Índia é conhecida como “Jamum” ou “Jambul”, nos Estados Unidos como “Java plum” e no Brasil como “Jambolão”, “Jamelão”, “Jambol” (BRITO et al., 2007; LI et al., 2009; GROVER et al., 2000) e, por seu fruto (Figura 1) ser semelhante ao formato, cor e tamanho da azeitona, também pode ser assim chamado.

As folhas de *E. jambolana* (Figura 1) contêm uma mistura de polifenóis, especialmente flavonóides glicosilados e alguns ácidos fenólicos, e são ricas em taninos e saponinas. O extrato hidroalcoólico a 10% (m/v) das folhas apresenta atividade antibacteriana frente a 17 tipos de bactérias, não sendo observada diferença de sensibilidade entre microorganismos Gram positivos e Gram negativos. (LOGUERCIO et al., 2005; BANERJEE et al., 2005; MAHMOUD et al., 2001)

Testes preliminares do extrato etanólico (70%) das cascas de *E. jambolana* indicaram a presença de taninos e a ausência de terpenos, flavonóides, alcalóides e glicosídeos. Este extrato apresentou uma potente ação antiinflamatória contra diferentes fases de inflamação, sem qualquer efeito colateral em mucosa gástrica. (MURUGANANDAN et al., 2001) Na medicina popular, as propriedades adstringentes, da casca são utilizadas contra diarréias crônicas, disenteria e menorragia. A decocção da casca é um eficaz enxaguante bucal no tratamento de aftas, estomatites, afecções da garganta e outras doenças das vias orais. (LOGUERCIO et al., 2005)



Figura 1: Frutos e folhas, árvore e flores de *Eugenia jambolana*.

Tradicionalmente, as sementes de *E. jabolana* são conhecidas por sua ação hipoglicêmica e antioxidante. Estudos mostram que os extratos das sementes são ricos em flavonóides e que os efeitos anti-hiperglicêmicos e anti-hiperlipidêmicos estão associados a estas substâncias. (SHARMA, BALOMAJUNDER & ROY, 2008; GROVER et al., 2000; BANERJEE et al., 2005) Os extratos metanólico e aquoso da sementes apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica contra 15 microorganismos testados, os quais consistem de seis tipos de bactérias e nove tipos de fungos, todos relacionados a doenças de pele. (CHANDRASEKARAM & VENKATESALU, 2004)

Porém, estudos mostram que o chá das folhas e das sementes não possuem ação anti-hiperglicêmica. (BANERJEE et al., 2005)

Na medicina popular, o suco do fruto verde é usado para preparar vinagre que é considerado um medicamento estomacal, carminativo e diurético e o suco dos frutos é maduros é utilizado como adstringente, diurético, antidiabético e estomáquico. Na indústria alimentícia o fruto maduro é usado para fazer conservas, sucos e geléias. Os frutos de *E. jabolana* são comestíveis e seus extratos apresentam forte atividade antioxidante devido a presença de vitamina C, ácido gálico, taninos e antocianinas. (BANERJEE et al., 2005; VEIGA et al., 2007)

Na literatura há relatos recentes de algumas antocianinas identificadas nos frutos de *E. jabolana*: delphinidina-3,5-diglicosídeo, cianidina-3,5-diglicosídeo, petunidina-3,5-diglicosídeo, peonidina-3,5-diglicosídeo e malvidina-3,5-diglicosídeo. (LI et al., 2009; LI, ZHANG & SEERAM, 2009; BRITO et al., 2007). Em 1975, JAIN & SESHADRI identificaram três antocianinas: delphinidina-3-gentiobiosídeo, petunidina-3-gentiobiosídeo e malvidina-3-lamaribiosídeo. Em 2009, NUENGCHAMNONG & INGKANINAN identificaram uma nova antocianina nos frutos de *E. jabolana*, a malvidina-3-O-*p*-coumaroilglicosídeo. Em trabalhos realizados em nosso laboratório foram identificadas quatro antocianinas cianidina-3-xilosídeo, cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-(6''-acetoil)-glicosídeo. (PLAZA, 2007)

Estudos realizados utilizando o extrato rico em delphinidina-diglicosídeo, cianidina-diglicosídeo, petunidina-diglicosídeo, peonidina-diglicosídeo e malvidina-diglicosídeo mostraram que este extrato apresentou atividade

citotóxica e efeitos quimiopreventivos contra células cancerígenas (MCF-7 e MDA-MB 231) responsáveis pelo desenvolvimento do câncer de mama. (LI et al., 2009)

1.3 Antocianinas

As antocianinas (do grego anthos=flores e kianos=azul) são metabólitos secundários e 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. Nas plantas servem como atrativos para pássaros e insetos responsáveis pela polinização, protegem contra raios ultravioleta, herbívoros e infecções fungo-patogênicas. (ANDERSEN & MARKHAM, 2006; MESKIN et al., 2004; MARÇO et al., 2008, EINBOND et al., 2004, BRIDLE & TIMBERLAKE, 1996; CHANDRA et al., 1992; ALCALDE-EON et al., 2004; RENAULT et al., 1997; CHARRON et al., 2009)

As antocianidinas apresentam como estrutura fundamental o cátion flavílico (Figura 2A). A estrutura das antocianidinas consiste de 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). Quando as antocianidinas são encontradas em suas formas glicosiladas elas são chamadas de antocianinas (Figura 2B). (PASCUAL-TERESA & SANCHEZ-BALLESTA, 2008; ANDERSEN & MARKHAM, 2006; CASTANEDA-OVANDO et al., 2009, MARÇO et al., 2008).

Os pigmentos ocorrem geralmente na forma de antocianina. As unidades glicosídicas mais comuns são a glicose, xilose, arabinose, ramnose e galactose. Normalmente, a unidade glicosídica está ligada na antocianidina na posição 3 do anel C. Quando há mais de um glicosídeo este pode estar ligado nas posições 5 ou 7 do anel A e, pouco frequentemente, nas posições 3' e 5' do anel B, ou então pode estar ligado ao glicosídeo da posição 3, formando um diglicosídeo. Os diglicosídeos mais conhecidos são soforose, rutinose, sambubiose, gentiobiose e laminariobiose. O açúcar presente nas moléculas de antocianinas confere maior hidrossolubilidade e estabilidade a estes

pigmentos quando comparados com as antocianidinas. (PASCUAL-TERESA & SANCHEZ-BALLESTA, 2008; ANDERSEN & MARKHAM, 2006; CASTANEDA-OVANDO et al., 2009, MARÇO et al., 2008; COOKE et al., 2005; RENAULT et al., 1997; TÜRKER & ERDOGDU, 2006)

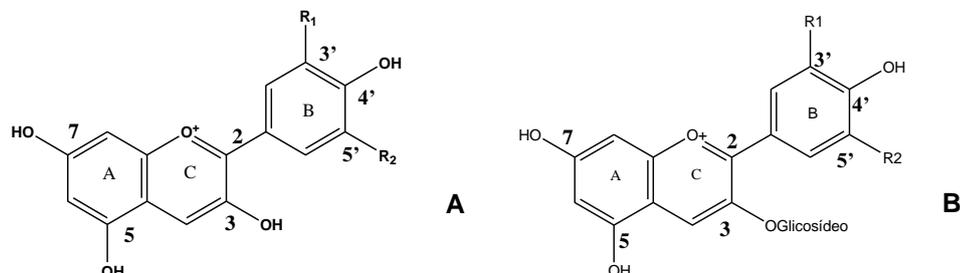


Figura 2: Estrutura de uma antocinidina (A) e de uma antocianina (B).

Além disso, mais de 65% das antocianinas são aciladas. Os grupos acila mais frequentes nestas substâncias são os ácidos *p*-coumáricos, cafeico, ferúlico, sinápico e ácidos alifáticos como ácido acético, málico, malônico, oxálico e succínico. (PASCUAL-TERESA & SANCHEZ-BALLESTA, 2008; ANDERSEN & MARKHAM, 2006; TÜRKER & ERDOGDU, 2006) A acilação das antocianinas faz com que estas sejam mais estáveis que as não aciladas, pois o grupo acila protege o cátion flavílico contra os fatores de degradação. (ALCALDE-EON et al., 2004; TÜRKER & ERDOGDU, 2006; MAILEN-AUBERT et al., 2001)

A biossíntese das antocianinas está relacionada com a Via do Ácido Chiquímico e a Via Acetato (Figura 3). (DEWICK, 1997)

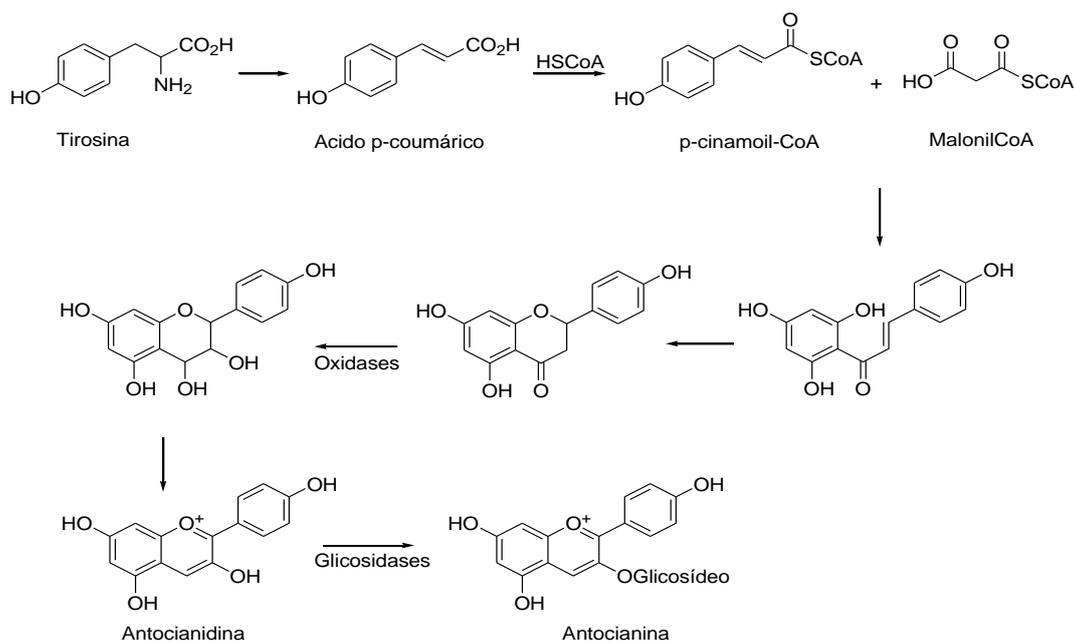
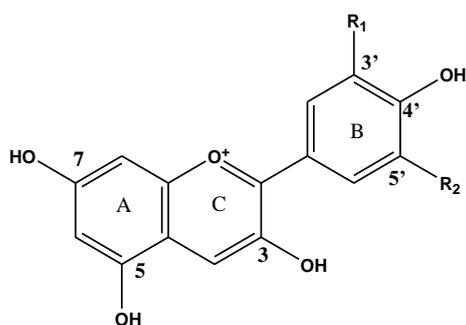


Figura 3: Biossíntese das antocianinas.

Na literatura, até o ano 2006, havia relatos de 539 antocianinas isoladas de plantas e de 23 antocianidinas diferentes. Porém, cerca de 90% de todas as antocianinas são baseadas em 6 antocianidinas (Figura 4): pelagordina (Pg), cianidina (Cy), peonidina (Pn), delphinidina (Dp), petunidina (Pt) e malvidina (Mv). As diferenças entre as várias antocianinas estão no número de hidroxilas presentes na molécula, no grau de metilação destes grupos, na natureza e no número de glicosídeos ligados à molécula e na posição dessas ligações, bem como na natureza e no número de ácidos alifáticos e/ou aromáticos ligados aos glicosídeos presentes na molécula de antocianina. (ANDERSEN & MARKHAM, 2006; CASTANEDA-OVANDO et al., 2009; MESKIN et al., 2004, MARÇO et al., 2008; COOKE et al., 2005; WU & PRIOR, 2005a; WU & PRIOR, 2005b; GOIFFON et al., 1999; GIUSTI, RODRIGUEZ-SAONA, WROLSTAD, 1999)



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

Figura 4: Estruturas das antocianidinas mais comuns.

Nas plantas, as antocianinas estão presentes em diferentes órgãos, como frutos, flores, caules, folhas e raízes. Estes pigmentos são, normalmente, encontrados dissolvidos no fluido da célula vegetal, que geralmente apresenta pH levemente ácido. Entretanto, em certas espécies de plantas, as antocianinas estão localizadas em regiões discretas do vacúolo celular chamadas de antocianoplastos. (ANDERSEN & MARKHAM, 2006; MARÇO et al., 2008; PASCUAL-TERESA & SANCHEZ-BALLESTA, 2008) As antocianinas presentes em uma espécie podem variar de fruto para fruto devido a influências internas e externas como fatores genéticos e agrônômicos, temperatura, luz e armazenamento. (PASCUAL-TERESA & SANCHEZ-BALLESTA, 2008)

Na literatura, há relatos de algumas antocianinas incomuns como a riccionidina (Figura 5A) isoladas de *Ricciocarpos natans* e rosacianina (Figura 5B) isoladas de *Rosa hybrida*. (ANDERSEN & MARKHAM, 2006)

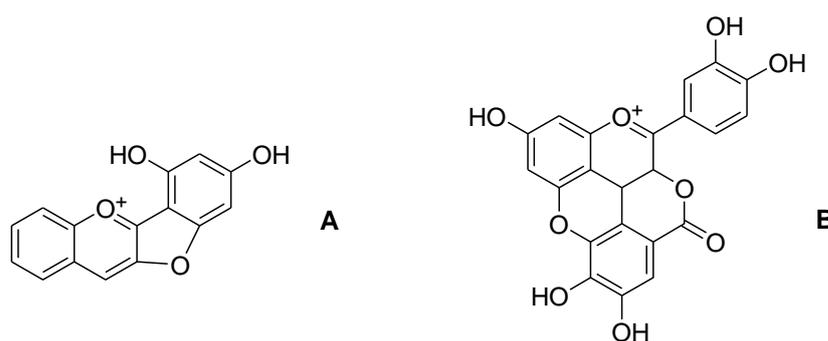


Figura 5: Estrutura da riccionidina (A) e rosacianina (B).

-Piranoantocianidinas:

As piranoantocianidinas (Figura 6) são formadas pela ciclização entre o C-4 e o grupo hidroxila do C-5 do cátion flavílico com moléculas de baixo peso molecular. Esta ciclização resulta em um quarto anel (D) que é responsável

pela maior estabilidade destas substâncias. (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009; ANDERSEN & MARKHAM, 2006)

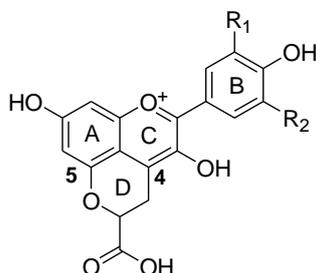


Figura 6 : Estrutura de uma piranoantocianina.

1.4 Estabilidade das Antocianinas

As antocianinas isoladas são altamente instáveis e muito suscetíveis a degradação. A sua estabilidade é afetada por fatores como pH, temperatura de armazenamento, concentração, luz, oxigênio, solventes, presença de enzimas, flavonóides, proteínas e íons metálicos. (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009; ANDERSEN & MARKHAM, 2006; MARÇO et al., 2008; BRIDLE & TIMBERLAKE, 1996; OLIVEIRA, EPERANÇA & ALMOSTER, 2001; MAILEN-AUBERT et al., 2001)

1.4 Influência do pH

As antocianinas são muito solúveis em água e soluções alcoólicas. Quando em água elas são mais estáveis a pH baixos. Entretanto, em solução aquosa elas coexistem em equilíbrio com quatro espécies principais: o cátion flavílico (vermelho), a base quinoidal (azul), pseudobase carbinol (incolor) e chalcona (amarelo) (Figura 7). Para valores altos de pH, as antocianidinas poderão ser completamente degradadas formando como produtos ácido fenólico e aldeído. (PASCUAL - TERESA & SANCHEZ - BALLESTA, 2008; CASTANEDA-OVANDO et al., 2009, ANDERSEN & MARKHAM, 2006; MARÇO et al., 2008; COOKE et al., 2005; LAPIDOT et al., 1999; CHANDRA et al., 1992; REVILLA, RYAN & MARTIN-ORTEGA, 1998)

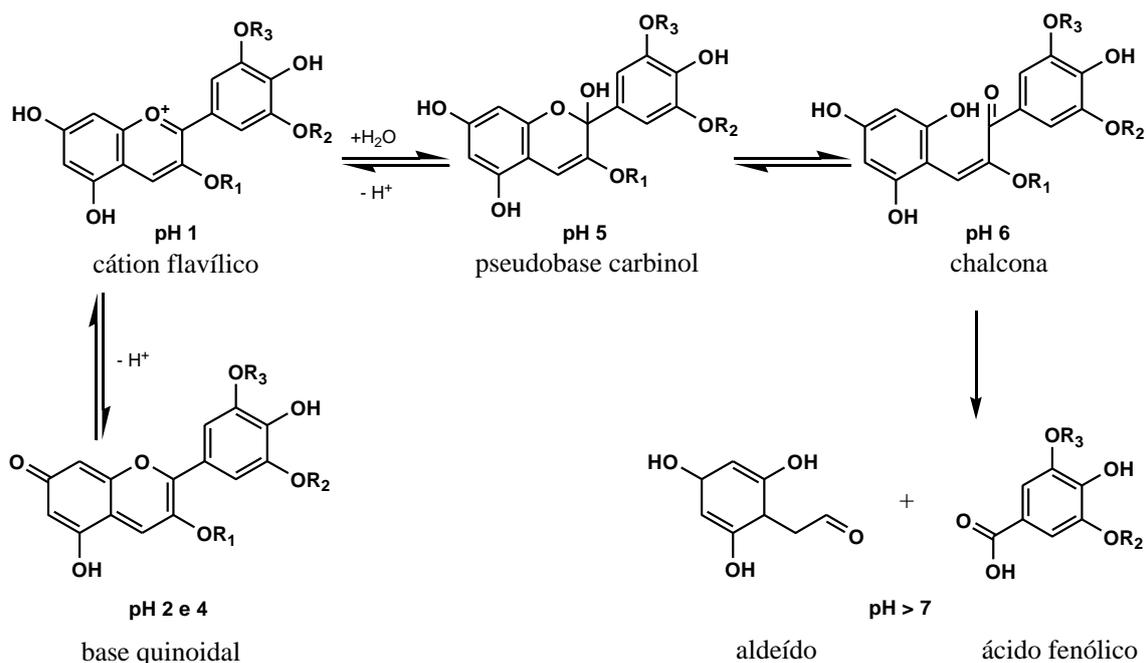


Figura 7: Estruturas químicas das antocianinas dependendo do pH do meio.

1.4.2 Efeito da co-pigmentação

A co-pigmentação é um efeito no qual pigmentos como compostos orgânicos pouco coloridos ou íons metálicos se associam às antocianinas causando uma mudança na cor ou aumentando a sua intensidade. Algumas investigações sugerem que a co-pigmentação das antocianinas com outros compostos é o principal mecanismo de estabilização da cor nas plantas. Os co-pigmentos (flavonóides, alcalóides, aminoácidos, nucleotídeos, polissacarídeos, metais e outras antocianinas) são sistemas ricos em elétrons π , os quais são capazes de se associarem aos cátions flavílicos que são pobres em elétrons. Esta associação protege o cátion flavílico do ataque nucleofílico da água e de outras espécies como os peróxidos e dióxido de enxofre. A interação das antocianinas com os co-pigmentos produz um efeito hiperacrômico e um deslocamento batocrômico na região do UV-Vis. (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009, MAILEN-AUBERT et al., 2001; BRIDLE & TIMBERLAKE, 1996; ORDAZ-GALINDO et al., 1999; CHANDRA et al., 1993; GIUSTI, RODRIGUEZ-SAONA, WROLSTAD, 1999)

Quando o co-pigmento é outra molécula de antocianina ocorre uma co-pigmentação intramolecular ou auto-associação; quando a interação é com um metal ocorre uma complexação; e quando é uma outra substância, ocorre co-pigmentação intermolecular. (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009; MAILEN-AUBERT et al., 2001; RENAULT et al., 1997)

Alguns estudos sobre a estabilidade das cores sugerem que as interações entre metais como Al, Fe, Cu, Sn, Mg ou Mo e antocianinas são responsáveis pela coloração azul das plantas. (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009; ANDERSEN & MARKHAM, 2006)

1.5 Bioatividade das antocianinas

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, além de possuir forte atividade antioxidante. (ANDERSEN & MARKHAM, 2006; BRIDLE & TIMBERLAKE, 1997; REYNERTSON et al., 2008; VAREED et al., 2006, DU & XU, 2008; COOKE et al., 2005; PASCUAL -TERESA & SANCHEZ -BALLESTA, 2008; ZHANG et al., 2008b; MESKIN et al., 2004; VEIGAS et al., 2007; BRITO et al., 2007; CHEN et al., 2006; CHARRON et al., 2009)

As antocianinas em geral não são tóxicas e nem mutagênicas, ao contrário, possuem propriedades terapêuticas. Por esta razão, estes compostos são considerados importantes nutracêuticos, pois são capazes de inibir, através da alimentação, os processos oxidativos e inflamatórios, e com isso prevenir várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo. (ANDERSEN & MARKHAM, 2006; MULABAGAL et al., 2009; BRIDLE & TIMBERLAKE, 1996; MAILEN-AUBERT et al., 2001).

Por serem benéficas à saúde, as antocianinas têm despertado grande interesse na indústria de alimentos, pois podem ser usadas como corantes,

substituindo os corantes artificiais que podem ser tóxicos à saúde, e como suplementos alimentares com aplicações preventivas e terapêuticas. (ANDERSEN & MARKHAM, 2006; VAREED et al., 2006; SEERAM et al., 2002; CHANDRA et al., 1992; ORDAZ-GALINDO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2001; GOIFFON et al., 1999; MAILEN-AUBERT et al., 2001) Porém, a baixa estabilidade das antocianinas é um fator limitante para o seu uso como corante. (MAILEN-AUBERT et al., 2001)

As antocianinas são menos absorvidas que outros flavonóides, sendo que, a absorção pode depender do número de hidroxilas, dos glicosídeos e dos grupos acila presentes na molécula. Sendo assim, as antocianinas possuem baixa biodisponibilidade e isto se deve a sua estrutura. (CHARRON et al., 2009; PASCUAL-TERESA & SANCHEZ-BALLESTA, 2008) As antocianinas não-aciladas possuem maior biodisponibilidade que as antocianinas aciladas e a presença dos grupos hidroxilas na aglicona também estão associadas com a diminuição da biodisponibilidade. (CHARRON et al., 2009). Porém, a baixa biodisponibilidade não impede que elas sejam bioativas.

Alguns estudos indicam que as antocianinas permanecem intactas quando passam do trato digestivo para a circulação sanguínea. Várias antocianinas, como a cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-diglicosídeo, malvidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-rutinosídeo, foram detectadas no plasma e/ou na urina de ratos, porcos e humanos. (BANERJEE et al., 2005, MESKIN et al., 2004, EINBOND et al., 2004; MIYAZAWA et al., 1999) Porém, não foram encontradas antocianidinas no plasma sugerindo, então, que a forma glicosilada pode ser responsável pela biodisponibilidade destas substâncias. (MIYAZAWA et al., 1999)

1.6 Potencial antioxidante das antocianinas

Radicais livres são espécies que possuem elétrons desemparelhados. Os radicais como superóxido (O_2^-) e hidroxila ($\cdot OH$) são alguns exemplos das espécies reativas de oxigênio (EROS), produzidas naturalmente nos seres humanos durante a respiração como resultado do metabolismo oxidativo. Porém, elas são regeneradas ou destruídas por enzimas específicas como a

superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. (REYNERTSON et al., 2008; BANERJEE et al., 2005; LAPIDOT et al., 1999)

A grande produção de radicais livres, juntamente com a redução dos níveis das enzimas mencionadas e a falta de vitaminas A, C e E são considerados a principal causa do estresse oxidativo. A geração de radicais livres de maneira desordenada provoca danos oxidativos em macromoléculas biológicas como lipídeos, proteínas e DNA, alterando suas propriedades, estruturas, funções das membranas celulares e do material genético causando mutações que podem estar associados ao início do desenvolvimento de tumores. Portanto, os danos causados por radicais livres estão ligados a doenças neurodegenerativas e ao câncer. A oxidação das lipoproteínas de baixa densidade é o principal causador de doenças do coração e arteriosclerose. A atividade anti-inflamatória e quimiopreventiva de muitos flavonóides, inclusive das antocianinas, está relacionada com as propriedades antioxidantes. Portanto, substâncias antioxidantes são necessárias para proteger o organismo contra o estresse oxidativo. (PASCUAL -TERESA & SANCHEZ - BALLESTA, 2008; BANERJEE et al., 2005; EINBOND et al., 2004; MULABAGAL et al., 2009; HOGAN et al., 2010; DAI et al., 2009; SHWARZ et al., 2003) O estresse oxidativo, além disso, é também o maior causador de isquemia cerebral, pois o cérebro consome grande quantidade de oxigênio. (SHIN, PARK & KIM, 2005)

As propriedades antioxidantes estão relacionadas a vários mecanismos de ação incluindo a captura de radicais livres e a inibição da geração de espécies reativas durante o metabolismo celular. (ZHANG et al., 2008b; HOGAN et al., 2010)

As antocianinas são consideradas substâncias antioxidantes, pois são capazes de estabilizar os radicais livres por doação de hidrogênio radicalar (Figura 8) (BANERJEE et al., 2005; PASCUAL-TERESA & SANCHEZ-BALLESTA, 2008). Esta capacidade está relacionada, principalmente, ao grupo catecol presente no anel B, que é facilmente oxidado, formando uma espécie extremamente estável(Figura 8). Portanto, é de se esperar que as cianidinas, delfinidinas e petunidinas possuam atividade antioxidante maior que as

pelagornidinas, peonidinas e malvidinas. (BANERJEE et al., 2005; PASCUAL-TERESA & SANCHEZ-BALLESTA, 2008; CASTANEDA-OVANDO et al., 2009)

Estudos mostram que as antocianinas isoladas (delfinidina-3-O-glicosídeo e delfinidina-3-O-rutinosídeo) são capazes de inibir a peroxidação lipídica (LPO) e as enzimas ciclooxygenase (COX-1 e COX-2). A LPO é iniciada por reações radiculares e, juntamente com o estresse oxidativo, é responsável pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes, enquanto que as enzimas COX-1 e COX-2 estão relacionadas com o processo inflamatório e, mais especificamente, a COX-2 também pode estar associada à indução de carcinogênese. (MULABAGAL et al., 2009; VAREED et al., 2006)

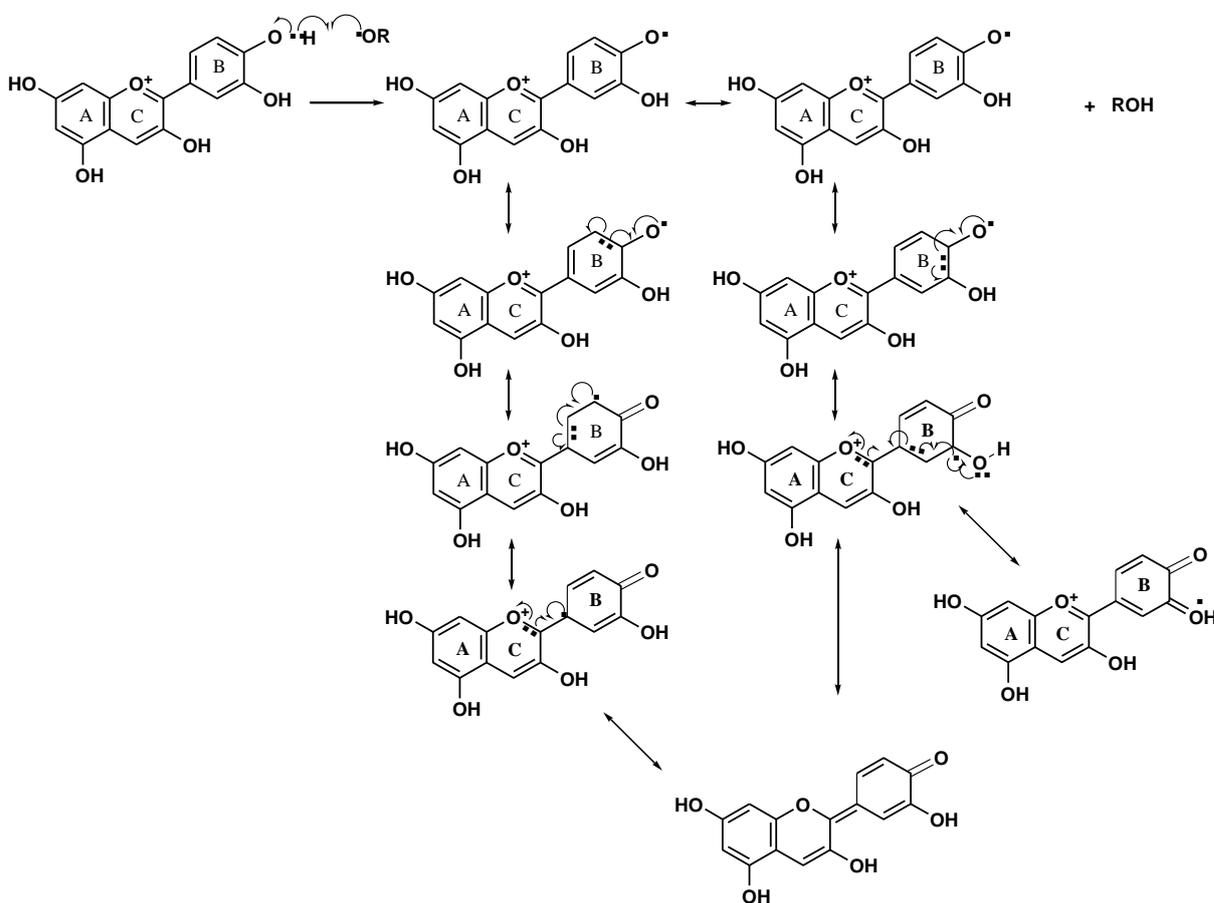


Figura 8: Mecanismo de estabilização do radical formado durante processos oxidativos. (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009)

1.7 Câncer

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é o nome dado a doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos podendo se espalhar para outras partes do organismo. O processo de formação do câncer ou carcinogênese passa por vários estágios até chegar à formação do tumor. São eles: (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009a; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009c)

- Primeiro estágio ou estágio de iniciação: as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos ou carcinógenos que alteram alguns de seus genes. Neste estágio, não há formação do tumor.

- Segundo estágio ou estágio de promoção: as células geneticamente modificadas sofrem os efeitos dos oncopromotores (agentes cancerígenos que possuem os oncogenes). Dessa forma, a célula modificada se transforma em uma célula maligna lenta e gradualmente. Se a exposição ao agente cancerígeno promotor for suspensa, o processo de carcinogênese pode ser interrompido neste estágio.

- Terceiro estágio ou estágio de progressão: as células multiplicam-se de maneira descontrolada, mais rapidamente que as células normais e invadem os tecidos à sua volta. Estas células têm a capacidade de formar vasos sanguíneos que as nutrirão e manterão o seu crescimento descontrolado. O acúmulo dessas células forma os tumores malignos.

Essas células adquirem a capacidade de se desprender e migrar, invadindo inicialmente os tecidos vizinhos podendo chegar ao interior de um vaso linfático ou sanguíneo, e assim, disseminar-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou.

O câncer pode ser causado por fatores internos ou externos ao organismo, estando ambos inter-relacionados. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas (hormônios, condições imunológicas e mutações genéticas) e as causas externas relacionam-se com o meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e

cultural (substâncias químicas, irradiação e vírus). (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009b)

1.8 Agentes quimiopreventivos

A maior parte dos cânceres humanos pode ser prevenida quando os fatores exógenos são controlados ou até mesmo removidos. Outra forma de prevenir o câncer é fazer uso de agentes quimiopreventivos que podem ser classificados em três categorias: inibição da formação da carcinogênese; agentes bloqueadores, ou seja, anti-iniciação; agentes supressores, ou seja, antiproliferação/antiprogessão. (PEZZUTO et al., 2005)

Estratégias para proteger as células do processo de iniciação tumoral incluem diminuir a atividade metabólica das enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas (Fase 1) ou aumentar o nível de enzimas responsáveis por desativarem os radicais e os eletrófilos conhecidos por interferirem no processo celular normal (Fase 2). A fase 2 consiste em induzir a formação de enzimas, como a quinona-redutase, que possui um papel importante na desintoxicação do organismo, pois converte quinona em hidroquinonas reduzindo assim o ciclo oxidativo. Ensaio *in vitro* e *in vivo* mostram que substâncias capazes de induzir a produção de quinona redutase possuem atividade quimiopreventiva contra a iniciação do câncer. (PEZZUTO et al., 2005)

Alimentos ricos em antioxidantes reduzem a incidência e a mortalidade causada por alguns tipos de câncer. As frutas que contêm altos níveis de substâncias antioxidantes como polifenóis, ácidos fenólicos, carotenóides, flavonóides e antocianinas podem reduzir os níveis de EROs nos organismos dos mamíferos e assim, evitar danos ao DNA e impedir as mutações que iniciam a progressão tumoral. (HOGAN et al., 2010; ZHANG et al., 2008b)

Extratos ricos em antocianinas exibem forte atividade antiproliferativa contra diferentes linhagens de células cancerígenas. O extrato de morango, contendo cianidina-3-glicosídeo, pelagornidina, pelagornidina-3-glicosídeo, pelagornidina-3-rutinosídeo e ácido elágico, apresentou inibição contra células

de câncer de boca (Cal-27 e KB), câncer de próstata (LNCaP e DU-145) e câncer de cólon (HT-29 e HCT-116). (ZHANG et al., 2008b)

Outros extratos enriquecidos apresentaram efeitos citotóxicos contra células de leucemia (HL-60), câncer de mama (MCF-7) e carcinoma de cólon (HT-29). (DAI et al., 2009) Extratos de açaí demonstraram forte atividade contra a proliferação de células de câncer de cabeça (C-6), mas não contra células (MDA-468) responsáveis pelo câncer de mama. (HOGAN et al., 2010)

Estudos mostram que antocianinas isoladas também apresentam atividade inibitória contra diferentes linhagens de células cancerígenas. Por exemplo, a delphinidina-3-O-glicosídeo e a delphinidina-3-O-rutinosídeo inibiram o crescimento de células de câncer de cólon (HCT-116), câncer de mama (MCF-7), câncer de pulmão (NCI-H460), câncer do sistema nervoso central (SF-268) e câncer no estômago (AGS). (VAREED et al., 2006). A cianidina-3-glicosídeo possui atividade quimiopreventiva e quimioterapêutica contra células do câncer de mama (HS578T). (DAI et al., 2009)

A cianidina-3-rutinosídeo e a cianidina-3-glicosídeo possuem forte atividade anticâncer, pois são capazes de inibir a invasão de células metastáticas responsáveis pelo câncer de pulmão (A549) apresentando uma nova estratégia para a quimioprevenção do câncer. (CHEN et al., 2006)

Extratos ricos em antocianinas, antocianinas purificadas e antocianidinas promovem indução de apoptose em células de leucemia (HL-60) e células de câncer de cólon (HCT-116), sendo esta outra forma de quimioprevenção. (KATSUBE et al., 2003)

COOKE et al., 2005 relata a atividade inibitória, contra diferentes linhagens celulares, de antocianidinas, antocianinas e de extratos ricos com estas substâncias e os mecanismos pelos quais ocorrem a inibição.

Estes estudos realizados *in vitro* mostram que as antocianinas possuem atividades preventivas e/ou terapêuticas contra muitas linhagens de células tumorais. Portanto, uma dieta rica em frutas e vegetais contendo antocianinas pode ajudar a reduzir o risco de doenças como o câncer.

1.9 Doença de Alzheimer (DA)

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa e está relacionada com deficiência do neurotransmissor acetilcolina. Uma das formas de tratamento desta doença é inibir a indução da enzima acetilcolinesterase (AChE) que é responsável pela hidrólise da acetilcolina. (MARSTON et al., 2002; VIEGAS et al., 2005; SILVA et al., 2006)

Algumas drogas sintéticas como tacrina e donepezil são usadas para o tratamento da DA como inibidores reversíveis da AChE. Porém, a tacrina, o primeiro inibidor de AChE licenciado pelo FDA (Food and Drug Association), não é seletivo atuando também em outras enzimas. Além disso, possui efeito hepatotóxico e um tempo de vida curto no plasma sendo necessária quatro doses por dia para a terapêutica efetiva. Já o donepezil é seletivo, atuando apenas na inibição da AChE, possui um tempo de vida maior que a tacrina, sendo necessária apenas uma dose diária, porém causa disfunções gastrointestinais. (SILVA et al., 2006)

Diante deste contexto, a busca por novas drogas menos tóxicas e mais eficientes tornou-se inadiável. Há relatos na literatura de compostos extraídos de fontes naturais usados no tratamento da DA como por exemplo, a galantamina, isolada de *Galanthus nivalis*. (MARSTON et al., 2002) A galantamina tem sido usada como protótipo para o desenvolvimento de drogas inibidoras de AChE. A possibilidade de explorar distintos modos de ação tem estimulado estudos fitoquímicos visando a obtenção de novos modelos. Portanto, várias espécies tem sido investigadas como fontes de inibidores de AChE baseando-se, principalmente, no conhecimento popular. (VIEGAS et al., 2005). Além disso, estudos indicam que alimentos ricos em antioxidantes possuem um papel importante na prevenção de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson. (BANERJEE et al., 2005; EINBOND et al., 2004; MULABAGAL et al., 2009; MACZ-POP et al., 2006; RAMIREZ et al., 2005; CHARRON et al., 2009)

1.10 Malária

A malária é considerada uma doença infecto-parasitária grave, transmitida por protozoários do gênero *Plasmodium*, aflige mais de 500 milhões de pessoas causando, pelo menos, um milhão de óbitos anuais, tendo como agravante a resistência do parasita à quimioterapia e a falta de uma vacina eficaz.

Os casos de malária estão localizados, principalmente, na África, seguido da Índia e do Brasil, estando presente também no sudoeste da Ásia, na América Central, América do Sul e na Oceania. No Brasil, a região amazônica concentra mais de 99% da transmissão da malária, representando um dos maiores problemas de saúde pública.

Uma das mais importantes estratégias na busca de novos fármacos é a identificação de novos alvos e a subsequente descoberta de substâncias que sejam capazes de agir nestes alvos. Um destes alvos é a polimerização de heme. (ROSENTHAL, 2003) No vacúolo digestivo ácido, o *Plasmodium* degrada 75% da hemoglobina do hospedeiro e utiliza os seus aminoácidos para a síntese de proteínas. Nesse processo, heme tóxica é liberada, armazenando-se na forma de um polímero inerte chamado hemozoína ou pigmento malárico, onde o grupo propionato do heme liga-se ao Fe^{3+} do outro heme. Sendo assim, substâncias capazes de inibir a síntese de hemozoína podem servir de modelos para a terapia da malária. (TRIPATHI et al., 2004)

A hemozoína parece ser estruturalmente idêntica à β -hematina que pode formar-se espontaneamente em condições não fisiológicas sem a adição de nenhuma proteína. O conhecimento bioquímico deste processo experimental permitiu o desenvolvimento de um método rápido, barato e eficiente na busca de substâncias que inibam a polimerização do heme. A formação de β -hematina *in vitro* pode ser realizada através de vários procedimentos experimentais como, por exemplo, a incubação de hemina bovina. (BAELMANS et al., 2000)

1.11 Fungos patógenos-humanos

As infecções causadas por fungos patógenos-humanos têm aumentado a um ritmo alarmante nos últimos 20 anos, principalmente entre os indivíduos imunocomprometidos. Entre estes fungos, os fungos da espécie *Candida* é um dos principais agentes causadores de doenças em seres humanos, pois a candidemia não só é associada a uma alta mortalidade, mas também se estende a duração da internação e aumenta os custos da assistência médica. Dentre os fungos pertencentes a esta espécie o fungo mais freqüente é o *Candida albicans* seguido por de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, enquanto *C. kefyr* e *C. guilliermondii* são encontradas ocasionalmente. (SCORZONI et al., 2007)

O fungo *Cryptococcus neoformans* é o segundo maior responsável por infecções fúngicas oportunistas em pacientes com AIDS. Porém, pode causar a doença em seres humanos saudáveis. (SCORZONI et al., 2007)

De maneira geral, as manifestações clínicas da infecção podem variar de uma colonização assintomática do trato respiratório, a ampla divulgação, dependendo da resposta imune do hospedeiro. Quando a disseminação ocorre, o sistema nervoso central é comumente envolvido. Os fatores de risco são: estágio avançado de HIV, uso de corticóides, linfomas, transplantes e doenças imunossupressoras.

As drogas antifúngicas mais comuns são essencialmente limitadas a anfotericina B, os compostos azólicos, como fluconazol e itraconazol, e flucitosina (5-fluorocitosina). Porém, estas substâncias apresentam efeitos colaterais e podem levar a uma série de complicações como por exemplo, o limite da dose de nefrotoxicidade associada a anfotericina B, o rápido desenvolvimento de resistência à flucitosina, interações medicamentosas, modo de ação fungistática mas não fungicida e resistência aos azóis. (SCORZONI et al., 2007)

Portanto, há uma necessidade urgente de novos antifúngicos com um amplo espectro de ação fungicida e com menos limite da dose de efeitos colaterais e como as plantas de diferentes biomas brasileiros, como do Cerrado e da Amazônia já são utilizadas como medicamentos naturais pela população

local no tratamento de doenças tropicais este estudo visa a ação fungida de *Eugenia jambolana*.

1.12 Extração de antocianinas

Como as antocianinas são solúveis em solventes polares, devem ser extraídas utilizando-se soluções alcoólicas de metanol ou etanol ou em soluções aquosas contendo ácido. O ácido empregado na solução previne a degradação das antocianinas. (FIORINI, 1995; ANDERSEN et al., 2004; ZHANG et al., 2004; KUSKOSKI et al., 2003; VAREED et al., 2006, SEERAM et al., 2002; MULABAGAL et al., 2009; VEIGAS et al., 2007; REVILLA RYAN & MARTIN-ORTEGA, 1998)

Entre todos os solventes usados para extrair as antocianinas o metanol é o mais eficiente, porém devido a toxicidade deste solvente para a indústria alimentícia, o etanol e a água têm sido usados como opção para extrair antocianinas. (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009) Porém, o etanol apresenta maior capacidade para extrair as antocianinas que a água. (DAI et al., 2009)

1.13 Identificação e caracterização das Antocianinas

A identificação e caracterização das antocianinas é de fundamental importância, para isto, podem ser empregadas várias técnicas desde as mais simples como cromatografia de papel (CP) e cromatografia em camada delgada (CCD), até técnicas mais avançadas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em contra corrente de alta velocidade (HSCCC), espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear (RMN), eletroforese capilar por zonas (ECZ), além de equipamentos que combinam estas e outras técnicas (técnicas hífenadas). (MARÇO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2001; WU & PRIOR, 2005a; CASTANEDA-OVANDO et al., 2009)

Neste trabalho, para a identificação e caracterização das antocianinas, foram utilizadas técnicas como CCD, CLAE, CLAE-DAD, HSCCC, EM, CLAE-

EM, RMN. A identificação dos compostos presentes no extrato hexânico foi realizada por CG-DIC.

1.14 Técnicas cromatográficas e Espectrométricas

1.14.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

É utilizada como análise preliminar para identificar se as antocianinas estão presentes na amostras. É mais versátil e sensível que a CP pois pode ser usado diferentes fases estacionárias possibilitando diferentes mecanismos de separação. (MARÇO et al., 2008)

1.14.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

A CLAE é a técnica mais utilizada, e uma das principais, para a caracterização, separação ou purificação de antocianinas. A separação das antocianinas ocorre de acordo com a sua hidrofobicidade usando colunas de fase reversa. (GOIFFON et al., 1999) Esta técnica emprega colunas fechadas, recheadas de materiais específicos e uma fase móvel que é eluída através da coluna a altas pressões. Apresenta a capacidade de realizar separações de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras em um curto período de tempo, porém com alta resolução, eficiência e sensibilidade. (MARÇO et al., 2008; HONG & WROLSTAD, 1990)

A espectrofotometria no UV é uma ferramenta auxiliar muito importante na análise de antocianinas, principalmente quando acopladas a técnicas como CLAE (CLAE-DAD). (MARÇO et al., 2008; HARBONE, 1957; HONG & WROLSTAD, 1990)

As antocianinas possuem duas bandas específicas uma em 270nm e a outra em 520nm. Vários trabalhos mostram que a análise do espectro no UV-VIS de uma antocianina fornece informações preliminares importantes sobre

sua estrutura incluindo a natureza da aglicona, a posição do glicosídeo e a presença de ácidos aromáticos. (HONG & WROLSTAD, 1990)

Quando as antocianinas são diglicosiladas é possível prever se estes glicosídeos estão na posição 3 apenas, ou estão nas posições 3 e 5 analisando o espectro na região de 440nm que apresentam um ombro característico quando os glicosídeos estão nas duas posições. (MARÇO et al., 2008)

Através do espectro de UV é possível prever se a antocianina possui ácido cinâmico ou um derivado analisando a região em 310nm. Se o espectro apresentar uma banda intensa nesta região indica que há na molécula este ácido ou algum derivado. Porém, a acilação com ácido acético e ácido malônico não apresenta a banda em 310nm, pois estes ácidos não absorvem na região do ultravioleta. (HARBONE, 1957; HONG & WROLSTAD, 1990; MACZ-POP et al., 2006; ALCALDE-EON et al., 2004; ZHANG, LIAO, CHEN, WU & HU, 2008)

1.14.3 Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC)

A cromatografia em contracorrente de alta velocidade (HSCCC) é uma das técnicas empregadas na separação de antocianinas. Esta técnica está baseada na partição de um soluto entre dois líquidos imiscíveis, no qual uma fase líquida é retida na espiral da coluna por força centrífuga, enquanto uma segunda fase líquida imiscível passa continuamente por ela. Portanto, não há suporte sólido como fase estacionária. (MARÇO et al., 2008; SILVA, VILEGAS & SANTOS, 2008; DU et al., 2005; SALAS et al., 2005; DEGENHARDT et al., 2000b, DU et al., 2004; SCHWARZ et al., 2003)

A proporção do soluto que passa para cada uma das fases é determinada pela constante de distribuição (KD) (Equação 1) de cada uma das substâncias presentes na amostra. A constante de distribuição é uma constante física, característica de cada substância. (MARÇO et al., 2008; SILVA, VILEGAS & SANTOS, 2008; SALAS et al., 2005; SCHWARZ et al., 2003)

$$KD = \frac{[S]_{Faseorgânica}}{[S]_{Faseaquosa}}$$

Equação 1: Fórmula da constante de distribuição.

Cada substância dissolvida reparte-se em equilíbrio entre as duas fases líquidas não miscíveis de uma forma constante e reprodutível. Nas condições ideais, esta constante depende, além do sistema de solvente, da temperatura. Daí a importância da constante de distribuição na cromatografia líquido/líquido.

A principal etapa desta técnica é a escolha do sistema de solventes que formam a fase móvel e a fase estacionária. A escolha do melhor sistema baseia-se na proporção de soluto em cada uma das fases, ou seja, no coeficiente de distribuição que deve ser igual a 1. Porém, esta escolha deve respeitar alguns pré-requisitos: as misturas têm que formar sistemas imiscíveis, o sistema de solvente tem que solubilizar a amostra, as duas fases têm que se separar rapidamente após agitação (< 30 seg.), preparar o mesmo volume aproximado para as duas fases, não formar emulsão, formar mistura pouco viscosa, apresentar pequena diferença de densidade entre a fase aquosa e a fase orgânica. (SILVA, VILEGAS & SANTOS, 2008; SCHWARZ et al., 2003)

As vantagens que esta técnica apresenta quando comparada com CLAE preparativa são a não adsorção das substâncias de interesse na fase estacionária; menor quantidade de fase móvel; recuperação total da amostra; apresenta uma versatilidade na escolha dos sistemas de solventes usados nas separações e boa resolução em separações semi-preparativa; além de ser uma técnica rápida, fator muito importante para substâncias que sofrem degradação. (SILVA, VILEGAS & SANTOS, 2008; DEGENHARDT et al., 2000a; MARÇO et al., 2008; SCHWARZ et al., 2003)

1.14.4 Espectrometria de Massas (EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

Uma técnica que pode disponibilizar excelentes informações sobre a fórmula molecular de compostos flavonoídicos, 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, que consiste de uma série de linhas variando em intensidade em diferentes unidades de massa. A vantagem da técnica de espectrometria de massas está na capacidade de indicar a fórmula molecular exata da substância sem a necessidade de grandes quantidades de amostra, pois a técnica pode trabalhar com quantidades a nível de traço. No entanto, deve-se tomar cuidado com a presença de isômeros, o que provavelmente é seu fator limitante. A melhor forma de prevenção contra este erro deve estar nas etapas de purificação e isolamento. (MARÇO et al., 2008; SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2007a)

Diferentes formas de ionização têm sido usadas para a análise de antocianidinas e antocianinas, incluindo ionização por impacto de elétrons (Electron Impact – EI), ionização química a pressão atmosférica (Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI), fontes de bombardeamento rápido de átomos (Fast Atom Bombardment – FAB) e ionização por spray de elétrons (Electrospray Ionization – ESI). (MARÇO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2001; RYAN et al., 1999; WU & PRIOR, 2005a)

Embora todas as técnicas citadas acima possam ser usadas para a análise de antocianinas, a ESI é uma técnica mais branda de ionização e por isso pode produzir íons intactos 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, como 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 análise de rotina das antocianinas. (WU & PRIOR, 2005a; CASTANEDA-OVANDO et al., 2009)

1.14.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia por RMN é basicamente uma forma de espectroscopia de absorção, em que, sob condições apropriadas em campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequências em uma frequência regida pelas características estruturais da molécula, sendo que a absorção é função de determinados núcleos da molécula. (SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2007b)

Para a identificação de antocianinas por RMN as amostras devem ser preparadas com solventes polares acidificados para evitar a degradação dessas substâncias. (DU et al., 2008; DEGENHARDT et al., 2000a; DEGENHARDT et al., 2000b; SCHWARZ et al., 2003; EINBOND et al., 2004; MULABAGAL et al., 2009)

A principal limitação do uso da RMN para antocianinas está associada à baixa resolução dos espectros, especialmente de RMN de ^1H , decorrente da carga das substâncias.

2. OBJETIVOS

- (A) Identificação das antocianinas presentes em *Eugenia jambolana*.
- (B) Isolamento e determinação estrutural das antocianinas presentes nos frutos de *Eugenia jambolana*.
- (C) Avaliação do potencial de bioatividade dos extratos e frações das folhas e dos frutos de *Eugenia jambolana* (ensaios antioxidante, antimalárico, antifúngico, anticolinesterásico e quimiopreventivo).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Solventes

- metanol: grau HPLC das marcas JT Baker[®] e Tedia;
- água: purificada com sistema Milli-Q da marca Millipore;
- hexano: grau HPLC da marca JT Baker[®];
- acetato de etila: grau HPLC da marca JT Baker[®];
- n-butanol: grau PA da marca Synth;
- acetato de etila, metanol e etanol: grau PA;
- ácido trifluoroacético: grau HPLC da marca Tedia;
- ácido clorídrico: grau HPLC da marca JT Baker[®].

Os solventes deuterados (metanol - d₄, ácido trifluoroacético - d, dimetilsulfóxido - d₆ e clorofórmio - d) foram da marca Cambridge Isotope Laboratories (CIL).

3.2 Reagentes

- Solução de anisaldeído (0,5mL de anisaldeído, 10,0mL de ácido sulfúrico concentrado e 85,0mL de MeOH) foi preparada com a adição dos reagentes em banho de gelo. Tal solução foi acondicionada em vidro âmbar e armazenada a 8 °C.
- Solução de β-caroteno: Preparou-se uma solução de 0,02% de β-caroteno (Aldrich[®]) em metanol. Após a nebulização das cromatoplacas, essas foram expostas ao ar e luz natural, por cerca de 6 horas, a fim de catalisar a oxidação do β-caroteno.

3.3 Concentração dos extratos

Para concentrar os extratos das folhas e dos frutos foram usados dois rotaevaporadores:

-Rotavapor R-220, marca: Büchi, com bomba de vácuo Vacuum Contoller V-805, marca: Büchi e circulador de água.

-Rotavapor Waterbath B-480, marca: Büchi, com bomba de vácuo MA-057/3, marca: Marconi e circulador de água.

3.4 Extração das antocianinas

As antocianinas foram extraídas com metanol acidificado com 1% de HCl. Para a separação da parte solúvel, contendo as antocianinas, do resíduo foi utilizada centrífuga RC 5C Plus da marca Sorvall a 10000g e 4°C. (HONG & WROLSTAD, 1990; SEERAM et al., 2002; VAREED et al., 2006; CHANDRA et al., 1992; CHANDRA et al., 1993; ZHANG et al., 2004; NETZEL et al., 2006; FIORINI 1995; MAILEN-AUBERT et al., 2001; REVILLA RYAN & MARTIN-ORTEGA., 1998)

3.5 Métodos Cromatográficos

3.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Como uma análise preliminar, todas as frações e as subfrações obtidas foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica fase normal (20 x 20 cm X 0,2 mm) ou em sílica de fase reversa (C18) (20 x 20 cm X 0,2 mm) ambas da marca Sorbent. A aplicação das amostras foi realizada com o aplicador de placas Automatic TLC Sampler 4 da marca CAMAG utilizando o software *winCATS*.

A revelação das cromatoplasmas foi feita utilizando solução de anisaldeído e, como forma de biomonitoramento, solução de β -caroteno para as frações das folhas.

3.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos foi muito importante na obtenção do perfil cromatográfico dos extratos das folhas e dos frutos de *E. jambolana* e também para monitoramento das subfrações obtidas através da purificação dos extratos provenientes das partições. Neste trabalho foram utilizados dois cromatógrafos:

- O cromatógrafo *Varian* equipado com duas bombas modelo *Pro Star 240*, injetor automático modelo 410, detector de arranjo de diodos UV-VIS modelo *Pro star 330* (Varian). A aquisição e o tratamento de dados foram realizados via computador tipo *Pentium III 500MHz* utilizando software *Star Chromatography Workstation* (versão 5.31) e *Polyview 2000* (Varian).
- O cromatógrafo *Shimadzu* equipado com duas bombas *Shimadzu LC-10AD*, auto injetor *Shimadzu SIL 10A*, detector de arranjo de diodos UV-VIS modelo *Shimadzu SPD MX AVP*. A aquisição e o tratamento de dados foram realizados via computador tipo *Pentium II 500MHz* utilizando software *Shimadzu CLASS-LC10* (versão 1.64A)

As análises realizadas em ambos os cromatógrafos foram no modo analítico na condição para gradiente exploratório em coluna cromatográfica *Phenomenex C18-Hydro* (250 x 4,6mm, 4 μ m) a temperatura ambiente, fluxo de 1mL min⁻¹, volume de injeção foi de 30 μ L.

3.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de massas (CLAE-EM)

A identificação das antocianinas no extrato bruto foi realizada através de um cromatógrafo *Shimadzu CBM-20* com detector de arranjos de diodo (*Shimadzu SPD-M20A*), bombas de alta pressão (*Shimadzu LC-20AD*), degaseificador (*Shimadzu DGU-20A-5*) e bomba de infusão *Cole Parmer* acoplado ao Espectrômetro de Massas de Alta Resolução ultrOToF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), com ionização por spray de elétrons (ESI),

analisador do tipo QqToF (analisadores tipo quadrupolo, tempo de voo em seqüência), fluxo de $300\mu\text{l h}^{-1}$ e modo de ionização positivo. Como gás nebulizador foi utilizado nitrogênio a 180°C , 4 bar e fluxo de 8L min^{-1} . Uma solução de NA-TFA a 10mg mL^{-1} foi usada para calibração interna.

A condição analítica foi gradiente MeOH:H₂O, coluna cromatográfica *Phenomenex C18-Hydro* (250 x 4,6mm, 4 μm) a temperatura ambiente, fluxo de 1mL min^{-1} , volume de injeção foi de $10\mu\text{L}$.

3.5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no modo preparativo com detector UV (CLAE-prep-UV)

Para purificar as substâncias foi usado um cromatógrafo Shimadzu equipado com duas bombas LC-8A, desgaseificador DGU-14A, injetor manual Rheodyne, com detector UV modelo SPD-10VP, coletor de frações FRC-10A e *software* Class-VP. Foi utilizado modo preparativo, gradiente exploratório e coluna cromatográfica *Phenomenex C18-Hydro* (150 x 21,6mm, 4 μm) a temperatura ambiente, fluxo de 15mL min^{-1} , volume de injeção foi de $500\mu\text{L}$.

3.5.5 Cromatografia em coluna (CC)

Foram utilizadas colunas de vidro de dimensões compatíveis com a massa das amostras. A escolha da série de eluente e da fase estacionária foi feita de acordo com as características da amostra. Como adsorvente foram utilizadas sílica de fase reversa (C18) e Sephadex[®] LH-20.

3.5.6 Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC)

A HSCCC é utilizada, por exemplo, na separação de substâncias de alta polaridade como as antocianinas. Por esta razão, esta técnica foi escolhida para a purificação da fração Bu-Fr dos frutos.

O cromatógrafo usado foi o High Speed Countercurrent Chromatography P.C. Ind. equipado com coluna de Teflon de 130m x 1,6 mm de d.i., volume 325

ml e com injetor de amostra P.C. Ind. com *loop* de 16 ml e bomba FMI Q2. A velocidade foi ajustada com um controlador a 860rpm. O fluxo foi controlado com a bomba de fluxo constante *Waters 4000* (Milford, MA-USA) sendo que o fluxo para o enchimento da coluna foi de 2mL min^{-1} e o fluxo da fase móvel foi de $1,2\text{mL min}^{-1}$.

A coluna foi inicialmente preenchida com a fase estacionária, e em seguida, com a fase móvel no sentido periferia-centro. Após as fases entrarem em equilíbrio hidrodinâmico na coluna, 16mL de solução contendo a amostra foi injetado com fluxo de $1,2\text{mL min}^{-1}$. As frações foram coletadas a cada 5mL com o coletor automático (*Pharmacia, Uppsala, Sweden*).

Os sistemas testados foram escolhidos de acordo com os dados da literatura e a polaridade das substâncias. (DEGENHARDT et al., 2000a; DEGENHARDT et al., 2000b; SALAS et al., 2005; DU et al., 2004; ITO, 2005) A escolha do sistema de solventes foi realizada analisando a eficiência de separação das fases e a proporção dos compostos em cada fase através de cromatografia de camada delgada (CCD). (SILVA, VILEGAS & SANTOS, 2008; SCHWARZ et al., 2003)

3.5.7 Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama (CG-DIC)

A CG-DIC foi muito importante para identificar as substâncias presentes nas frações apolares. O cromatógrafo usado foi *Varian*, modelo CP-3800, com detector de ionização em chama. As condições usadas foram coluna capilar SPB-50 (50% fenil-metil-silicone, 30m x 0,25mm x 0,25 μm), em temperatura de 280°C (isoterma), detector ajustado a temperatura de 290°C e o injetor a 260°C. Para a coluna SPB-5 (5% fenil-metil-silicone, 30m x 0,25mm x 0,25 μm), a temperatura inicial foi 250°C, permanecendo nesta temperatura por 12 minutos e, na sequência, incremento de 6°C min^{-1} até 280°C, permanecendo nesta temperatura por 30 minutos. A temperatura do detector e do injetor foram de 310°C e 260°C, respectivamente. O volume de injeção foi de 1 μL .

As retenções relativas (RR) de triterpenos e esteróis foram comparados com as RR dos padrões já tabelados. Colesterol foi usado como padrão interno.

Os triterpenos e esteróis usados como padrões foram previamente isolados em nossos laboratórios e identificados por dados espectrais (RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT 135°).

3.6 Métodos Espectrométricos

Para a identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas foram utilizadas duas técnicas espectrométricas: a espectrometria de ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massas.

3.6.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN mono e bidimensionais das antocianinas isoladas foram obtidos no Espectrômetro Varian Inova 500®.

3.6.2 Espectrometria de Massas (EM)

Os fragmentogramas das substâncias isoladas foram obtidos através de um Espectrômetro de Massas de Alta Resolução ultrOToF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), com ionização por eletrospray (ESI), analisador do tipo QqToF (analisadores tipo quadrupolo, tempo de voo em seqüência), fluxo de 300 $\mu\text{l h}^{-1}$ e modo de ionização positivo para as antocianinas. Como gás nebulizador foi utilizado nitrogênio a 150°C, 2 bar e fluxo de 4L min^{-1} . Para a calibração interna foi usada uma solução de NA-TFA a 10mg mL^{-1} .

O cálculo do erro (ppm) foi realizado de acordo com a equação abaixo (Equação 2):

$$Erro = \frac{M_{teórica} - M_{experimental}}{M_{teórica}} * 10^6$$

Equação 2: Cálculo do erro para as substâncias identificadas por EMAR.

3.7 Metodologia de preparo das amostras para as análises

- Análises por CCD: As amostras são solubilizadas em solventes voláteis e aplicadas nas cromatoplasmas na forma de soluções. A eluição ocorre em cubas cromatográficas saturadas com a fase móvel escolhida.

- Análises por CLAE e CLAE-EM dos frutos: as amostras foram submetidas à extração em fase sólida (EFS) usando cartuchos C18. Inicialmente, alguns miligramas de amostra foram solubilizados em 1,5mL de água (0,1%TFA) e colocados em cartucho C18 previamente ativado com MeOH (0,1%TFA) (2-3V_m) e equilibrado com H₂O (0,1%TFA) (2-3V_m). As antocianinas e outros compostos fenólicos ficaram retidos no cartucho enquanto que os açúcares, ácidos e outros compostos solúveis em água foram eluídos. Para a remoção das antocianinas foi adicionado 1,5mL de uma solução MeOH:H₂O (95:5, v:v) ambos acidificados com 0,1% TFA. Todas as amostras foram filtradas com filtro 0,2µm. (GIUSTI et al., 1999; ALCALDE-EON et al., 2004; MACZ-POP et al., 2006; GOIFFON et al., 1999)

- Análises por CLAE das folhas: as amostras foram solubilizadas em uma solução MeOH:H₂O (95:5, v:v) e submetidos à extração em fase sólida (EFS) usando cartuchos C18 previamente ativados com MeOH (2-3V_m) e equilibrado com a mistura MeOH:H₂O (95:5, v:v) (2-3V_m).

A limpeza do cartucho foi feita com MeOH puro e, quando necessário, com DCM. Por se tratar de estudo químico qualitativo, a concentração das amostras não foi calculada.

-Análise por CG-DIC: aproximadamente 20mg de amostra foi diluída em DCM e eluída em uma coluna de sílica, celite e carvão ativo, previamente equilibrada com DCM. Após a secagem da amostra, esta foi solubilizada em uma mistura de Hex:AcOEt (7:3).

- Análise por RMN: As amostras foram preparadas com metanol - d₄ ou dimetilsulfóxido - d₆ com ácido deuterado (19:1). (DU et al., 2008; DEGENHARDT et al., 2000a; DEGENHARDT et al., 2000b; SCHWARZ et al., 2003; EINBOND et al., 2004; MULABAGAL et al., 2009)

- Análise por HSCCC: Cerca de 800mg de amostra foi diluída em 16mL do sistema de solventes (8mL da fase móvel e 8mL da fase estacionária).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Coleta do material vegetal

Os frutos maduros e as folhas de *Eugenia jambolana* foram coletados no dia 27 de março de 2008 em uma praça na cidade de Araraquara, estado de São Paulo e identificadas pela botânica Dra. Maria Inês Cordeiro. As exsiccatas foram depositadas no IBot-SP.

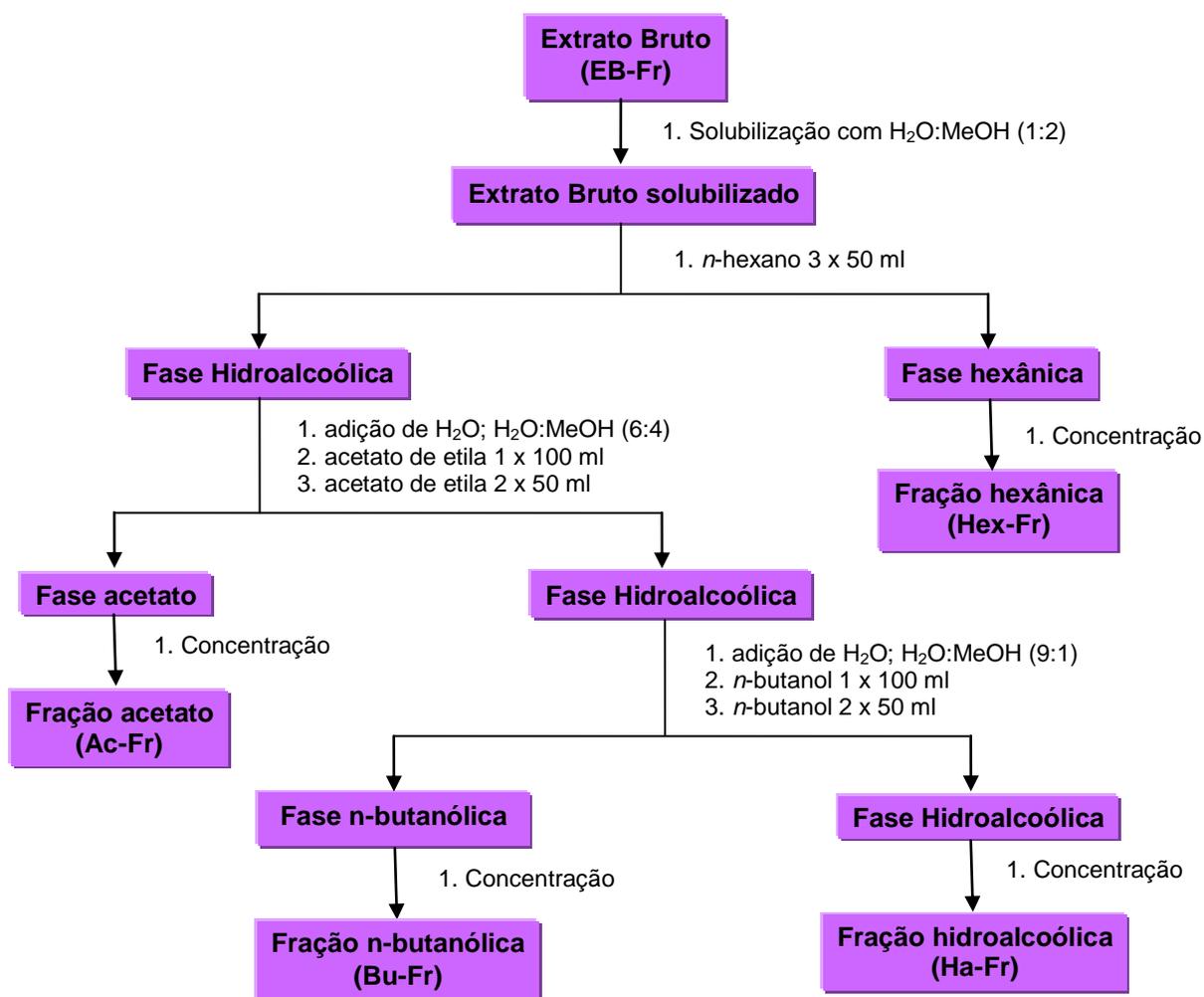
4.2 Preparação do extrato bruto dos frutos (EB-Fr)

Foram coletados e utilizados cerca de 550g de frutos maduros. Após a coleta foi realizada a separação das sementes e estas foram armazenadas. A polpa da fruta e a casca, ricas em antocianinas, renderam cerca de 428g. Em um liquidificador, as polpas e as cascas foram trituradas com 80mL de metanol (1% HCl) por aproximadamente três minutos. Após a trituração, para separar a parte solúvel da parte insolúvel, a mistura foi centrifugada a 10000rpm por 10 minutos a 4° C. Este procedimento foi realizado mais duas vezes, adicionando ao resíduo (2 x 100mL) metanol (1% HCl). O HCl foi escolhido de acordo com dados da literatura (HONG & WROLSTAD, 1990; SEERAM et al., 2002; VAREED et al., 2006; CHANDRA et al., 1992; CHANDRA et al., 1993; ZHANG et al., 2004; NETZEL et al., 2006; FIORINI 1995; MAILEN-AUBERT et al., 2001) e é importante para manter o equilíbrio deslocado na direção de formação do cátion flavílico (Figura 7) (PASCUAL-TERESA & SANCHEZ-BALLESTA, 2008; CASTANEDA-OVANDO et al., 2009, ANDERSEN & MARKHAM, 2006; LAPIDOT et al., 1999; CHANDRA et al., 1992)

O extrato bruto (64g) foi obtido após a concentração de 280 mL do sobrenadante a pressão reduzida a aproximadamente 35°C.

4.3 Partição do extrato bruto dos frutos

O extrato bruto dos frutos foi submetido a partição líquido-líquido (Fluxograma 1) com solventes de diferentes polaridades: *n*-hexano, acetato de etila e *n*-butanol.



Fluxograma 1: Metodologia de partição líquido-líquido para o extrato dos frutos de *E. jambolana*.

Devido à grande instabilidade das antocianinas mediante ao pH, foram testadas duas metodologias de partição.

- *Metodologia 1:* Partição líquido-líquido com apenas a água usada para solubilizar o extrato bruto acidificada.
- *Metodologia 2:* Partição líquido-líquido com a água usada em todo processo acidificada e com metanol acidificado.

Após a concentração das fases, foram obtidas suas respectivas frações (Tabela1).

Tabela1: Massa dos extratos e frações obtidos das duas metodologias de partição.

Extrato e Frações	Massa (g) Frutos A	Massa (g) Frutos A
	Metodologia 1	Metodologia 2
Bruto	36,2189	22,9717
Hex-Fr	0,0096	0,0175
Ac-Fr	0,1484	4,9881
Bu-Fr	0,7108	0,4675
Ha-Fr	35,3501	17,4986

4.4 Otimização das condições de análise cromatográfica

Foram testadas duas condições de análise:

- *Condição 1:* gradiente exploratório MeOH:H₂O (0,1% TFA) (Tabela 2); coluna Phenomenex C18-Hydro (250 x 4,60mm, 4µm).

- *Condição 2:* gradiente exploratório MeOH (0,1% TFA):H₂O (0,1% TFA) (Tabela 2); coluna Phenomenex C18-Hydro (250 x 4,60mm, 4µm). (ANDERSEN et al., 2004; NETZEL et al., 2006; ALCALDE-EON et al., 2004)

Tabela 2: Gradiente exploratório MeOH:H₂O.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%H ₂ O	MeOH
inicial	1,0	95	5
40	1,0	0	100
50	1,0	0	100
51	1,0	95	5
60	1,0	95	5

O perfil cromatográfico das frações foi obtido após a otimização das condições cromatográficas.

4.5 Identificação das antocianinas presentes no EB-Fr

A identificação das antocianinas presentes no EB-Fr foi realizada, primeiramente, por CLAE- DAD, usando a condição 2 e o gradiente exploratório mostrado na tabela 2. Após a confirmação da presença de antocianinas, pelos espectros no Uv-Vis, o EB-Fr foi submetido às análises em CLAE-EM e CLAE-EM/EM utilizando o gradiente mostrado na tabela 3.

Tabela 3: Gradiente MeOH:H₂O.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%H₂O	MeOH
inicial	1,0	95	5
14	1,0	65	35
25	1,0	65	35
30	1,0	0	100
35	1,0	0	100
40	1,0	95	5
45	1,0	95	5

4.6 Fracionamento das frações dos frutos

Para avaliar qual método seria mais eficiente no isolamento e/ou obtenção de frações enriquecidas com antocianinas, diferentes métodos de purificação foram usados no fracionamento das frações dos frutos.

4.6.1 Fracionamento da Fração Acetato (Ac-Fr)

A purificação da Ac-Fr dos frutos de *E. jabolana* foi realizada através da cromatografia de permeação em gel (CPG - Sephadex LH-20) utilizando uma coluna de 175 x 3,5cm. Foi escolhido modo de eluição isocrático usando como fase móvel MeOH (0,1%TFA). As 47 subfrações foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) com placas de C18 e reunidas, posteriormente em 14 novas subfrações (Tabela 4) que foram analisadas por CLAE-DAD.

Este fracionamento resultou no isolamento da antocianina 1.

Tabela 4: Fracionamento da Ac-Fr dos frutos de *E. jambolana* por CPG.

Subfração	Fração	Massa (mg)
Ac-Fr seph 1	1-7	147,9
Ac-Fr seph 2	8-10	257,8
Ac-Fr seph 3	11-13	1681,3
Ac-Fr seph 4	14-16	623,7
Ac-Fr seph 5	17-18	75,7
Ac-Fr seph 6	19-20	36,8
Ac-Fr seph 7	21-22	10,1
Ac-Fr seph 8	23-25	13,0
Ac-Fr seph 9	26-27	9,3
Ac-Fr seph 10	28-30	19,1
Ac-Fr seph 11	31-33	5,2
Ac-Fr seph 12	33-34	3,0
Ac-Fr seph 13	35-39	9,4
Ac-Fr seph 14	40-47	8,0

4.6.2 Fracionamento da fração *n*-butanólica (Bu-Fr)

A Bu-Fr foi submetida, inicialmente, ao fracionamento por Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade. Para isto, foram testados seis sistemas escolhidos de acordo com a literatura (DEGENHARDT et al., 2000a; DEGENHARDT et al., 2000b; SALAS et al., 2005; DU et al., 2004; ITO, 2005) e com a polaridade das substâncias.

Sistema 1: *n*-butanol:água (0,1% TFA) (1:1; v,v)

Sistema 2: acetato de etila:água (0,1% TFA) (1:1; v,v)

Sistema 3: acetato de etila:*n*-butanol:água (0,1% TFA) (1:1:1; v,v,v)

Sistema 4: acetato de etila:*n*-butanol:água (0,1% TFA) (2:3:5; v,v,v)

Sistema 5: acetato de etila:*n*-butanol:água (0,1% TFA) (1,5:3,5:5; v,v,v)

Sistema 6: acetato de etila:*n*-butanol:metanol:água (0,1% TFA) (2:3:1:5; v,v,v,v)

Os seis sistemas foram colocados em tubos de ensaio, agitados e, em seguida, observou-se a separação das fases. Cerca de 1mg da fração *n*-butanólica foi adicionada em cada tubo de ensaio e estes foram novamente agitados e deixados em repouso. Então, a fase superior e a fase inferior foram aplicadas em placa de C-18 utilizando *n*-butanol:ácido acético:água (4:1:5; v,v,v) (BAW) como eluente e as placas foram visualizadas através de luz ultravioleta (UV) e reveladas com anisaldeído.

Os sistemas 4 e 5 apresentaram coeficiente de distribuição próximo de 1, então se optou por fazer uma eluição em gradiente começando com o sistema 5 e finalizando com o 4.

Aproximadamente 800mg da fração *n*-butanólica foi solubilizada em 16mL da mistura 1:1 (fase superior : fase inferior) do sistema escolhido para iniciar o gradiente. Esta solução foi filtrada e injetada nas de acordo com as condições de análise descritas.

Foram coletadas 65 subfrações do sistema 5, 113 subfrações do sistema 4 e 35 subfrações correspondentes a fase estacionária.

As subfrações (Sistema 5) apresentaram apenas coloração rosa escuro, roxa e rosa claro, indicando a presença de antocianinas. As frações coletadas do sistema 4 eram incolores. As 35 frações coletadas da coluna apresentaram coloração amarela e incolor.

Todas as frações foram, inicialmente, analisadas por CCD fase normal, eluídas em BAW (4:1:5) e reveladas com anisaldeído . Então, as subfrações com o mesmo R_f, foram reunidas em 10 grupos e analisadas por CLAE-DAD.

Após a análise dos cromatogramas as subfrações foram novamente reunidas em dois grupos (Tabela 5): grupo 1 (amostras 1 a 4) e grupo 2 (amostras 5 a 7). As subfrações 8, 9 e 10 não apresentaram nenhuma substância detectável.

Tabela 5: Fracionamento da Bu-Fr dos frutos de *E. jambolana* por HSCCC.

Grupo	Subfrações	Massa (mg)
Grupo 1	1-4	330,4
Grupo 2	5-7	110,9

O grupo 1 foi fracionado novamente através de CPG (Sephadex LH-20) com eluição isocrática e fase móvel MeOH:H₂O (30:70; 0,1% TFA). (ZANG et al., 2008a)

As 39 subfrações coletadas foram submetidas à CCD fase reversa (C18), eluídas com BAW (4:1:5) e reveladas com anisaldeído. As subfrações com mesmo R_f foram reunidas em 12 novas subfrações (Tabela 6) que foram analisadas por CLAE-DAD. Este fracionamento resultou no isolamento das antocianinas **3** e **4** das subfrações Bu-Fr CCC seph 6 e 4, respectivamente.

O grupo 2, que apresentou as antocianinas **1**, **3** e **4** (Figura 9), foi submetido à CLAE – preparativo com modo de eluição gradiente MeOH:H₂O (condição 2) e fluxo de 15mL min⁻¹ e λ=254nm. Este procedimento foi importante para a obtenção das antocianinas **1**, **3** e **4** purificadas.

Tabela 6: Fracionamento da Bu-Fr dos frutos de *E. jambolana* por CPG

Subfração	Subfração	Massa (mg)
Bu-Fr CCC seph 1	1-4	31,8
Bu-Fr CCC seph 2	5-6	28,0
Bu-Fr CCC seph 3	7	27,1
Bu-Fr CCC seph 4	8-9	28,7
Bu-Fr CCC seph 5	10	26,4
Bu-Fr CCC seph 6	11-14	28,9
Bu-Fr CCC seph 7	15-17	27,7
Bu-Fr CCC seph 8	18-22	33,4
Bu-Fr CCC seph 9	23-26	29,4
Bu-Fr CCC seph 10	27-29	32,2
Bu-Fr CCC seph 11	30-36	38,3
Bu-Fr CCC seph 12	37-39	30,7

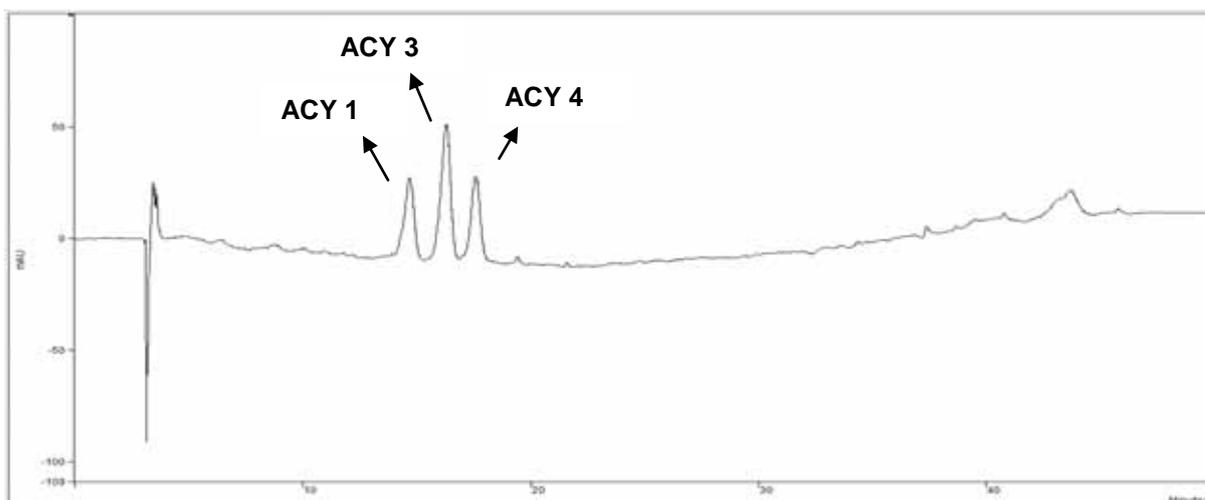


Figura 9: Cromatograma analítico via CLAE-UV do grupo 2 [fase reversa C18, eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA) e detecção a $\lambda = 254\text{nm}$].

4.6.3 Fracionamento da fase hidroalcoólica (Ha-Fr)

A Ha-Fr foi fracionada através de uma coluna cromatográfica aberta com sílica de fase reversa (C18) com dimensões 17,3 x 3,2cm, eluição gradiente MeOH:H₂O com ambas as fases acidificadas com 0,1% TFA começando com 5% de MeOH e finalizando com 100% de MeOH. Todas as 17 subfrações obtidas nesse fracionamento foram analisadas por CCD C18 e eluídas em BAW (4:1:5). Após esta análise inicial em CCD, apenas as 10 primeiras frações (Tabela 7), por conterem antocianinas, foram analisadas por CLAE-DAD. A análise dos cromatogramas mostrou que a antocianina **4** foi novamente isolada nas subfrações Ha-Fr C18 - 7, 9 e 10.

As subfrações Ha-Fr C-18 3, 5 e 6 foram submetidas à análise por CLAE-preparativo com modo de eluição gradiente MeOH:H₂O (condição 2) com fluxo de 15 mL min⁻¹ e $\lambda = 254\text{nm}$. Este procedimento também resultou no isolamento das antocianinas **1**, **3** e **4**.

Tabela 7: Fracionamento da Ha-Fr dos frutos de *E. jambolana* por C18.

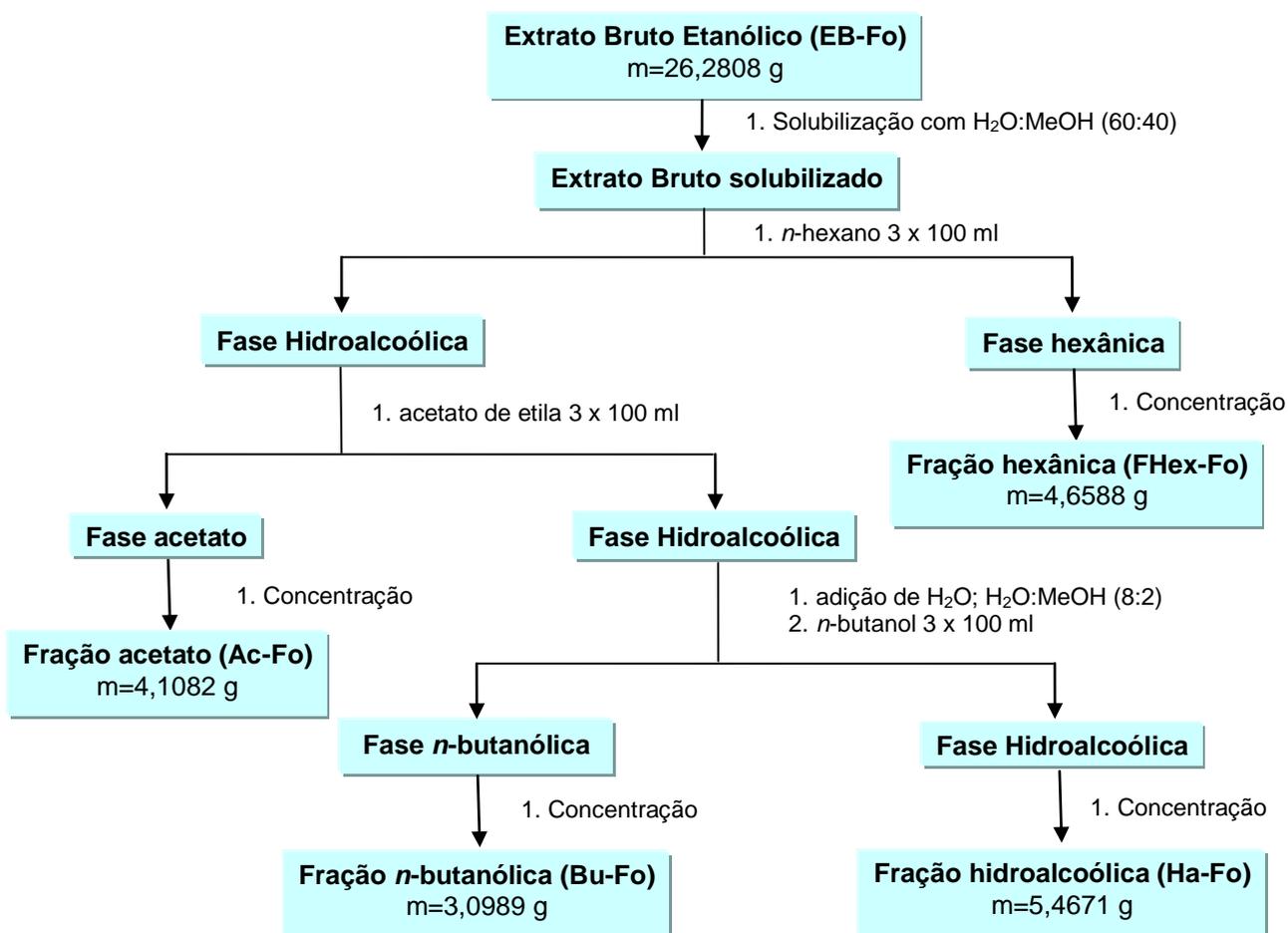
Subfração	Massa (mg)
Ha-Fr C18 – 1	1071,0
Ha-Fr C18 – 2	2845,4
Ha-Fr C18 – 3	373,7
Ha-Fr C18 – 4	34,2
Ha-Fr C18 – 5	39,8
Ha-Fr C18 – 6	37,2
Ha-Fr C18 – 7	33,3
Ha-Fr C18 – 8	30,5
Ha-Fr C18 – 9	31,2
Ha-Fr C18 – 10	36,9

4.7 Preparação do extrato bruto das folhas (EB-Fo)

Separaram-se as folhas dos galhos e estas foram secas ao ar livre, mas protegidas da luz solar. Posteriormente, elas foram trituradas em moinho elétrico. Aproximadamente 560g das folhas moídas foram submetidas à extração exaustiva com hexano, e, após concentração do solvente a pressão reduzida, obteve-se o extrato hexânico (Hex-Fo).

A segunda extração exaustiva foi realizada com etanol, e, após a concentração do solvente a pressão reduzida, obteve-se o extrato bruto etanólico das folhas (EB-Fo). O EB-Fo foi submetido à partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades e após a concentração das fases foram obtidas as respectivas frações das folhas (Fluxograma 2).

Como forma de biomonitoramento, EB-Fo e as frações acetato (Ac-Fo), *n*-butanólica (Bu-Fo) e hidroalcoólica (Ha-Fo) foram submetidos à análise por CCD em fase normal, eluídas com AcOEt:MeOH (1:1) e nebulizadas com solução de β -caroteno, pois esta solução indica a presença de substâncias com propriedades antioxidantes. As substâncias com esta propriedade são evidenciadas em manchas amarelas após o descoramento do fundo da placa. Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante.



Fluxograma 2: Metodologia de partição líquido-líquido para as folhas.

4.8 Desrepliação da fração hexânica dos frutos (Hex-Fr) e do extrato hexânico das folhas (Hex-Fo)

A Hex-Fr e o Hex-Fo foram submetidos à Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama para analisar e identificar possíveis metabólitos secundários presentes nessas amostras.

4.9 Ensaios biológicos

4.9.1 Atividade seqüestradora de radicais livres¹

Os extratos EB-Fr, EB-Fo e Hex-Fo, as frações acetato, n-butanólica e hidroalcoólica dos frutos e das folhas e as subfrações grupo 1, grupo 2, Ha-Fr C18 - 4 e Ha-Fr C18 - 5 obtidas dos fracionamentos dos frutos tiveram sua ação seqüestradora de radicais livres avaliada através de ensaios espectrofotométricos com DPPH.

- DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)

O radical DPPH apresenta absorção máxima em 517nm. Neste comprimento de onda, avalia-se a absorbância na ausência e na presença das amostras-teste, sendo que na presença de agentes antioxidantes ocorre aumento da transmitância. A solução de DPPH (200µM) foi preparada em MeOH. Na placa de 96 poços, foram adicionados: Amostra: 200µL de DPPH e 100µL de amostra em diversas diluições. Controle positivo: 200µL de DPPH e 100µL de antioxidante padrão. Controle negativo: 200µL de DPPH e 100µL de solvente. A placa foi mantida por 30 minutos no escuro. A avaliação da forma reduzida do DPPH gerado foi determinada através da diminuição da absorbância a 517nm. (PAULETTI et al., 2003)

A porcentagem de seqüestro do radical livre foi obtida utilizando a seguinte equação 3:

$$\% = \frac{\Delta A_{517\text{-controle}} - \Delta A_{517\text{-amostra}}}{\Delta A_{517\text{-controle}}} * 100$$

Equação 3: Porcentagem de seqüestro do radical livre.

¹Ensaio realizado pelas alunas Caroline Mariana Pereira e Alessandra Cristina Dametto, no Instituto de Química, Araraquara - UNESP.

4.9.2 Ensaio antimalárico¹

Os extratos EB-Fr, EB-Fo, as frações acetato, n-butanólica e hidroalcoólica dos frutos e das folhas foram testados para avaliar o potencial antimalárico de *E. jambolana*.

Este ensaio foi realizado em pH 3,8 em microtubos de 1,5mL de acordo com o artigo de BAELMANS et al. (2000). A solução estoque de hemina bovina (6,4mM; 4,16mg em 1000µL de NaOH 0,2 N) foi preparada 60 minutos antes da execução do ensaio, incubada a 37°C e protegida da luz. Após o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas por 5 minutos e o precipitado lavado duas vezes com 200µL de DMSO. O precipitado foi então dissolvido em 200µL de NaOH 0,1M e uma alíquota de 20µL foi transferida para uma placa de 96 poços onde foram adicionados mais 180µL de NaOH 0,1M. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 405nm. A porcentagem de inibição da formação de β-hematina é dada pela equação 4.

$$\% = \frac{A_{controle+} - A_{amostra}}{A_{controle+}} * 100$$

Equação 4: Porcentagem de inibição da formação de β-hematina.

4.9.3 Ensaio Quimiopreventivo por indução de Quinona-Redutase (QR)²

Os extratos EB-Fr, EB-Fo e Hex-Fo, as frações acetato, n-butanólica e hidroalcoólica dos frutos e das folhas e as subfrações Ha-Fr C18 - 4 e Ha-Fr C18 - 5 foram submetidos ao ensaio de quimioprevenção por indução da enzima quinona-redutase.

Para realizar a quantificação de indução enzimática com o ensaio de quinona redutase foi necessário preparar os seguintes reagentes. Solução de lise com 0,8% de digitonina e 2mM de EDTA, pH 7,8. “Solução de parada” contendo 0,1 M de HCl. Solução de ensaio feita de 25mM de Tris-HCl, pH 7,4, 1mM de glicose-6-fosfato, 50µM de menadiona, 30µM de NADPH, 5µM de

² Ensaio realizado pela pós-graduanda Tarsia Giabardo no Laboratório de Citologia e Biologia Celular, sob supervisão da Profa. Dra. Christiane P Soares, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp.

FAD, 0,07% (m/v) de soro-albumina bovina, 0,03% (m/v) de MTT, 0,01% (v/v) de Tween-20 e 2 unidades mL⁻¹ de glicose-6-fosfato desidrogenase.

As células Hepa 1c1c7 foram cultivadas em meio de cultivo nas placas de 96 cavidades por 24h, cerca de 10⁴ células em cada cavidade. Em seguida, foram expostas a diferentes concentrações dos extratos de plantas solubilizados em meio de cultura por 48h para que ocorra a indução enzimática. Em cada coluna da placa foi colocada uma concentração, seguindo diluição seriada 1:3. Depois do tratamento, o meio de cultura foi descartado e 50µL de solução de lise foram adicionados. A placa foi então incubada por 10 minutos a 37°C. Para facilitar a lise das células, elas foram agitadas em agitador de placas por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a lise, a atividade da QR foi avaliada com a adição de 200µL da solução de ensaio. A placa foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e 50µL de solução HCl 0,1M foram adicionados para parar a reação. Um controle de reagente branco foi preparado adicionando-se a “solução de parada” em uma coluna de cada placa antes de colocar a solução de uso. A absorbância foi medida usando um leitor de microplacas a 595nm. (PROCHASKA & SANTAMARA, 1988; GROSS et al., 2000; KANG et al., 2004)

Os dados foram normalizados subtraindo da média de absorbância obtida de cada concentração, a média de absorbância do controle de reagente branco. O desvio padrão da média em cada coluna, geralmente, é menor que 10%. Porém, pode ocorrer um desvio maior que 50% em um poço devido a uma desigualdade na densidade celular. (GROSS et al., 2000) A densidade celular foi determinada em uma placa feita paralelamente, corada com violeta cristal e, assim, a concentração que inibe em 50% o crescimento celular (IC₅₀) foi determinada. (PROCHASKA & SANTAMARA, 1988)

A potência de indução enzimática da QR por extratos de plantas foi expressa em unidades por g (unidades g⁻¹). Uma unidade de atividade indutora de QR foi definida como a quantidade de produto natural necessário para duplicar a atividade específica da QR em relação a células não tratadas (CD). (PROCHASKA & SANTAMARA, 1988; GROSS et al., 2000) Alguns compostos possuem o índice de indução enzimático muito próximo da concentração

citotóxica. Por isso, o índice de quimioprevenção (IQ) dessas substâncias foi calculado dividindo a IC₅₀ pelo CD. (FAHEY et al., 2004) Os resultados foram comparados com controle negativo (DMSO) e controle positivo (β -naftoflavona).

4.9.4 Ensaio antifúngico fitopatígeno³

O teste antifúngico foi realizado para os extratos brutos, as frações acetato, n-butanólica e hidroalcoólica dos frutos e das folhas de *E. jambolana*.

Os extratos brutos foram preparados na concentração de 400 μ g 10 μ l⁻¹ e as frações provenientes da partição na concentração de 200 μ g 10 μ l⁻¹. Todas as amostras foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica fase normal, porém os extratos dos frutos foram eluídos em MeOH:H₂O (20:80) e os extratos das folhas foram eluídos em AcOEt:MeOH (70:30) e Hex:AcOEt (80:20). As três placas foram nebulizadas com a suspensão dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* e incubadas em câmara úmida a 25 °C, no escuro, por 48 horas. (HOMANS & FUCHS, 1970)

4.9.5 Ensaio antifúngico patógeno-humano⁴

Este ensaio foi realizado para os extratos EB-Fr, EB-Fo e Hex-Fo, as frações acetato, n-butanólica e hidroalcoólica dos frutos e das folhas e para a subfração Ha-Fr C18 - 4 dos frutos de *E. jambolana*.

O teste incluiu os organismos *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012.

A atividade antifúngica foi realizada seguindo a metodologia descrita no documento M27-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com algumas modificações. O meio utilizado foi RPMI 1640 com L-glutamina e ácido morfolinopropanosulfônico 0,165 M (pH: 7,0) acrescido com 2% glicose.

³ Ensaio realizado por Vanessa Fuentes sob a orientação da Dra. Maria Cláudia Marx Yong, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica.

⁴ Ensaio realizado por Fernanda Gullo sob a orientação da Dra. Maria Maria José M. Giannini, no Departamento de Análises Clínicas/Laboratório de Micologia Clínica, Araraquara-UNESP.

As amostras foram preparadas em DMSO numa concentração de 250µg ml⁻¹. A suspensão das células foi preparada em uma solução 0,85% salina e inoculada numa placa de microtubos previamente preparada com as amostras diluídas numa concentração entre 250µg mL⁻¹ para 0,48µg mL⁻¹. As placas foram incubadas sob agitação a 37°C por 24 h para a espécie *Candida* e 48 h para *Cryptococcus neoformans*.

Os controles utilizados foram a anfotericina B e o fluconazol dissolvidos com DMSO.

4.9.6 Ensaio Anticolinesterásico⁵

O ensaio foi realizado para os extratos brutos, as frações acetato, n-butanólica e hidroalcoólica dos frutos e das folhas e para a subfração Ha-Fr C18 - 4 dos frutos de *E. jambolana*.

Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com a solução da enzima acetilcolinesterase (6,66 U) acrescida de albumina bovina fração V (0,1%) e o solvente evaporado novamente. A placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida fechada a 37°C por 20 minutos, e em seguida borrifada com uma mistura das soluções: etanólica de 1-naftil acetato (5mL; 0,25%) e aquosa do sal Fast Blue B (20mL; 0,25%). (MARSTON et al., 2002)

A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha branca (indicação de inibição da reação enzimática), sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase.

Os cromatogramas obtidos foram observados em λ 254 nm e 366 nm, e fotografados em câmera fotográfica Epson. Os valores de Rf (fator de retenção) foram calculados onde houve inibição da reação enzimática, ou seja, presença de halos de cor branca indicadores de inibição da acetilcolinesterase. Como controle positivo foi utilizado galantamina (0,5µg) dissolvida em MeOH.

⁵ Ensaio realizado por Maura Casari Sartori sob a supervisão da Dra. Dra. Maria Cláudia Marx Yong, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação do Extrato Bruto dos Frutos

O procedimento usado foi eficiente para extração e manutenção da integridade das estruturas das antocianinas, pois foram detectadas em $\lambda=520$ sete antocianinas por CLAE-DAD (Figura 10). Essa eficiência está associada ao uso de MeOH (1% HCl) durante o processo de extração dos frutos.

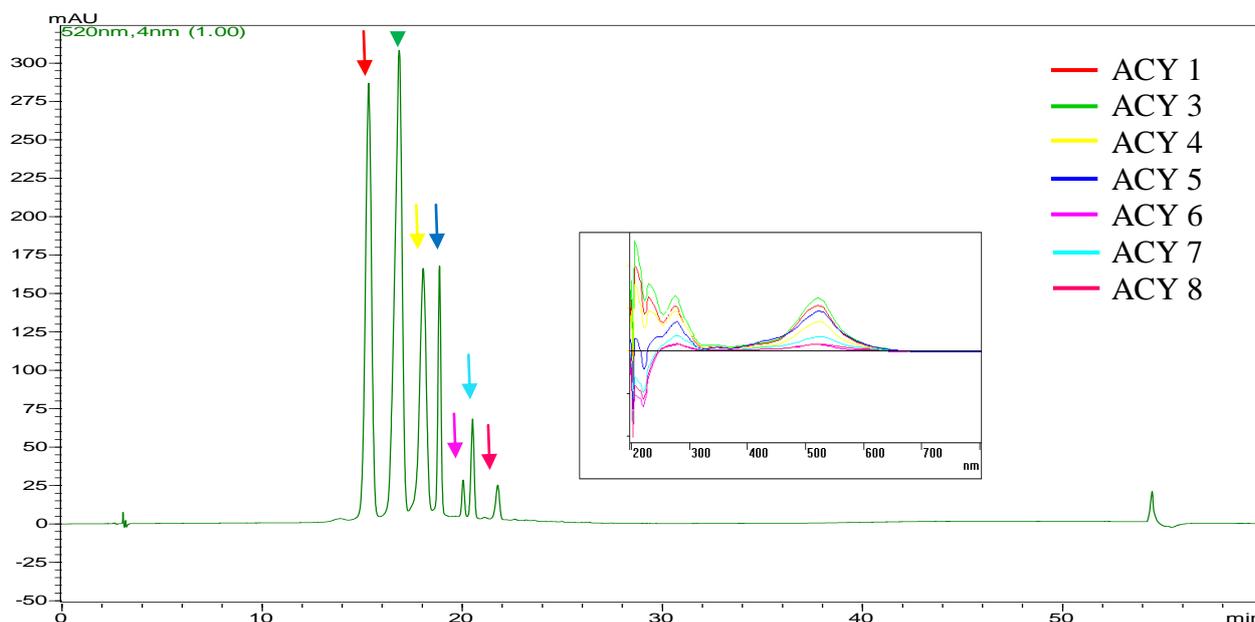


Figura 10: Antocianinas identificadas do EB-Fr [fase reversa C18-Hydro, eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA), 1 mL min⁻¹, e detecção a $\lambda=520$ nm].

5.2 Otimização das condições de Análise Cromatográfica

A otimização das condições cromatográficas também foi muito importante para evitar a degradação das substâncias em estudo na coluna cromatográfica.

Neste trabalho foram testadas duas condições analíticas em que a primeira consistia em acidificar apenas a fase aquosa e a segunda consistia em acidificar a fase orgânica e a fase aquosa, pois desta forma a concentração de ácido se manteria constante durante toda a análise cromatográfica. O TFA foi escolhido, pois é um ácido volátil e solúvel nos solventes utilizados.

A diferença entre as duas condições foi muito pequena (Figura 11). Porém, quando as duas fases foram acidificadas a intensidade dos picos aumentou significativamente, além disso, a resolução entre os picos 6 e 7 melhorou. Portanto, nas análises seguintes a condição 2 (pag. 62) foi usada.

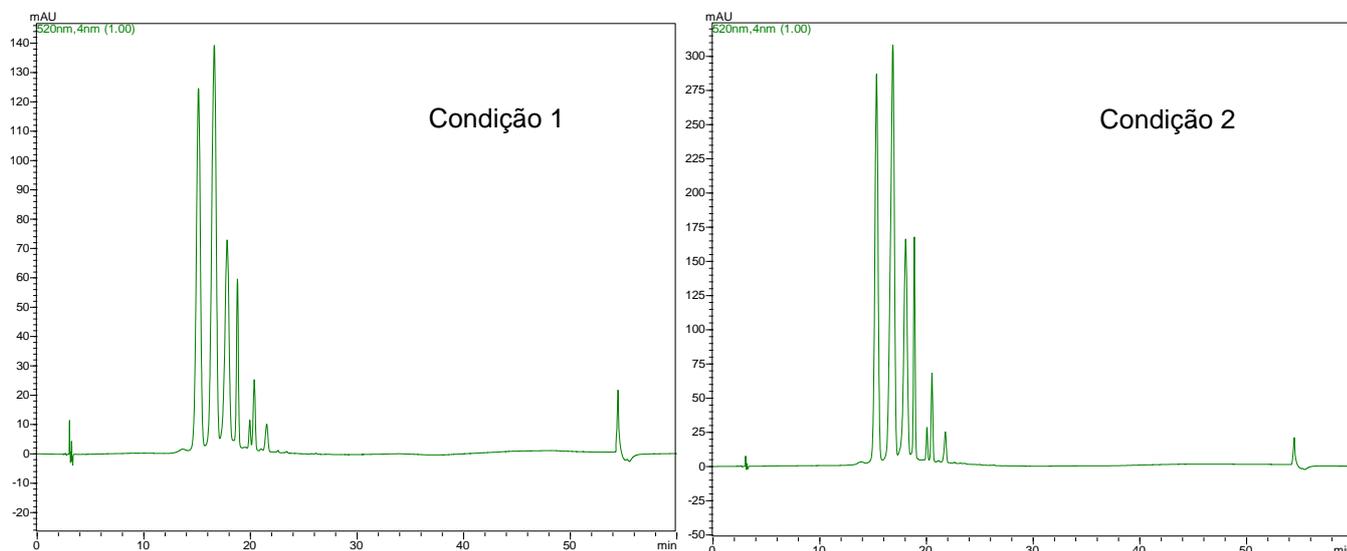


Figura 11: Otimização da condição cromatográfica usando o EB-Fr (fase reversa C18-Hydro, eluição gradiente, 1 mL min^{-1} , e detecção a $\lambda = 520\text{ nm}$).

5.3 Metodologia de partição

Quando a partição foi realizada usando a metodologia 2 (pag. 61), observou-se melhor extração e conservação das antocianinas nas frações (Figuras 12 a 14). Sendo que ao utilizar esta metodologia antocianinas foram extraídas na fração Ac-Fr, pois apresentou coloração vermelha indicando a presença dessas substâncias. Na metodologia 1 (pag. 61), a cor deste extrato era amarela. A análise dos espectros no UV-vis comprovou a presença de antocianinas (Figura 12).

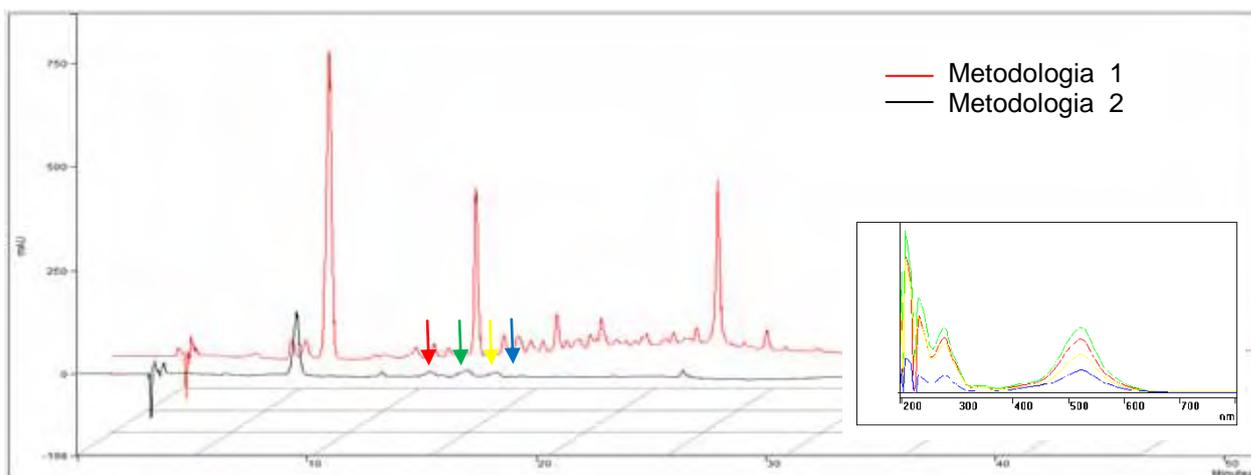


Figura 12: Análise cromatográfica via CLAE-DAD das frações Ac-Fr [fase reversa C18-Hydro; eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA), 1mL min⁻¹, e detecção a $\lambda = 254\text{nm}$].

Na fração Bu-Fr, usando a metodologia 2 (pag. 61) (Figura 13), foi possível detectar quatro antocianinas majoritárias, enquanto que na fração Bu-Fr obtida a partir da metodologia 1 (pag. 61), apenas três antocianinas foram detectadas. A análise dos cromatogramas mostrou uma melhor resolução quando a metodologia 2 (pag. 61) foi aplicada.

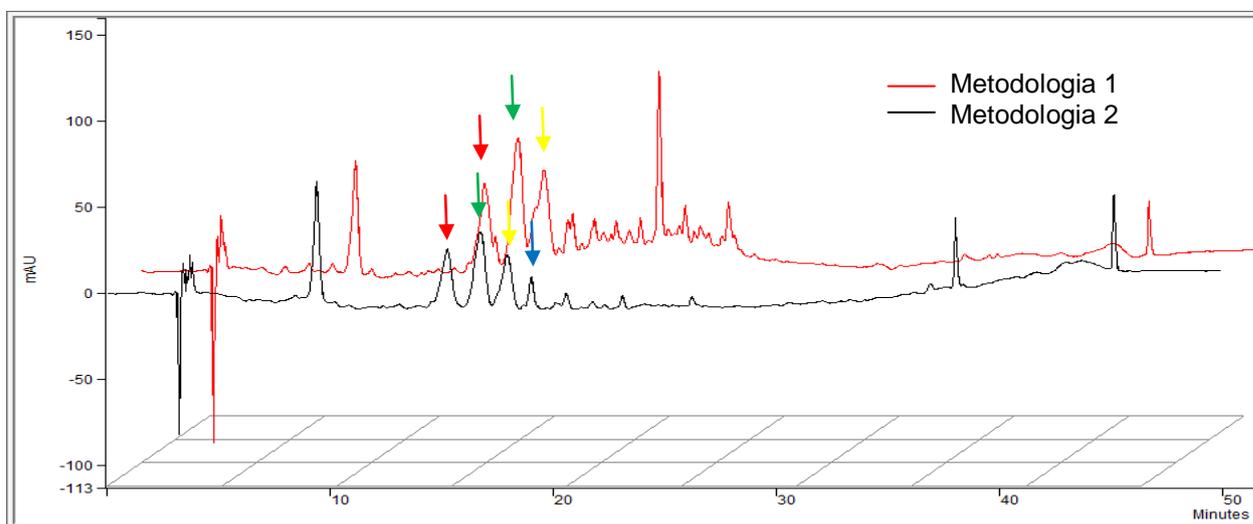


Figura 13: Análise cromatográfica via CLAE-DAD das frações Bu-Fr [fase reversa C18-Hydro; eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA) e detecção a $\lambda = 254\text{nm}$].

Não foram observadas diferenças significativas entre as frações Ha-Fr obtidas usando a metodologia 1 (pag. 61) e a 2 (pag. 61) (Figura 14).

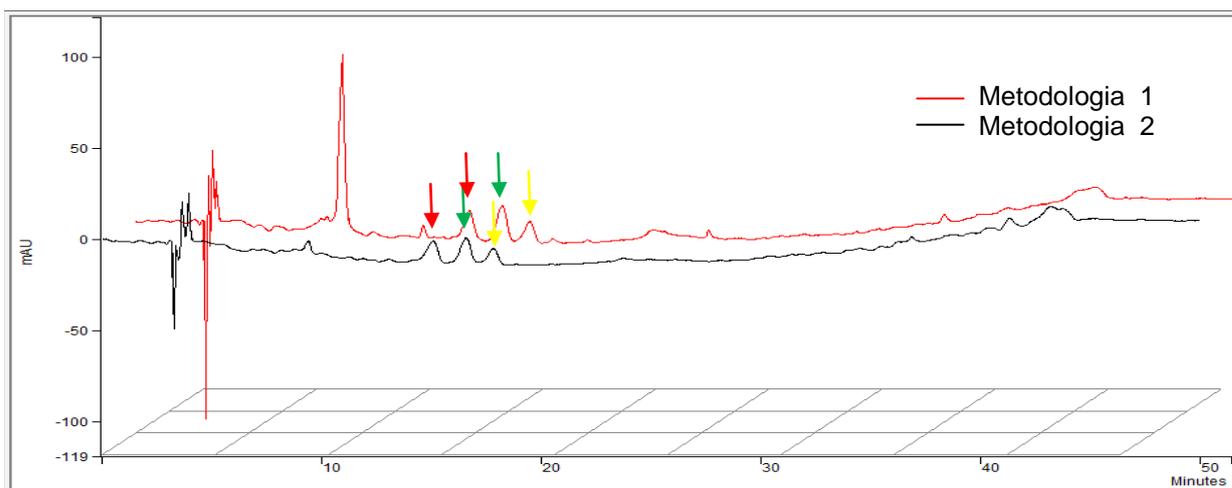


Figura 14: Análise cromatográfica via CLAE-DAD das frações Ha-Fr (fase reversa C18-Hydro; eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA) e detecção a $\lambda = 254\text{nm}$).

Após a otimização da condição cromatográfica e de estabelecida a metodologia de partição líquido-líquido, o perfil cromatográfico de todas as frações foi traçado (Figura 15).

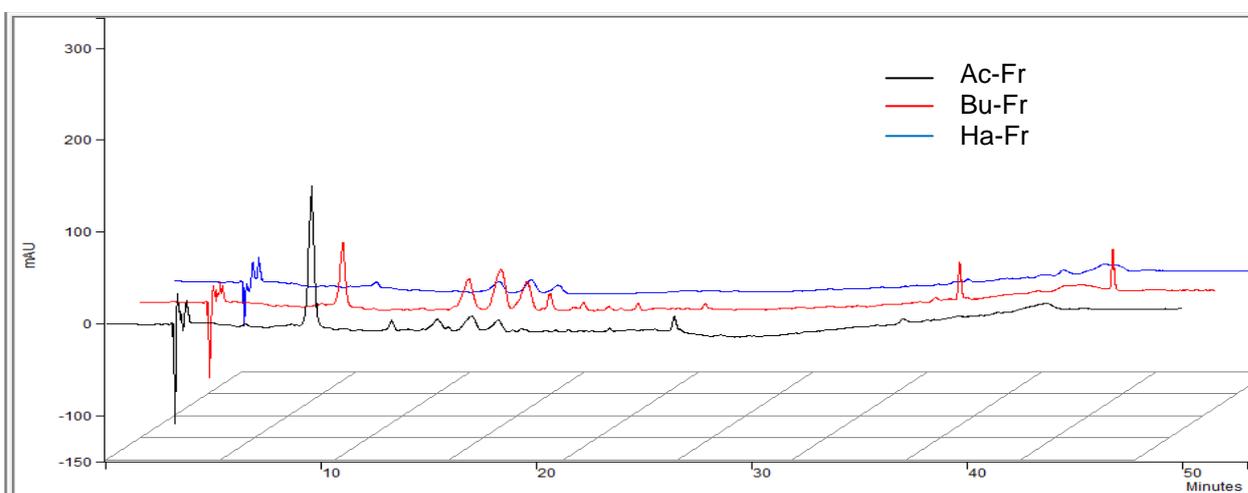


Figura 15: Perfil cromatográfico das frações dos frutos [fase reversa C18-Hydro, eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA) e detecção a $\lambda = 254\text{nm}$].

É importante salientar que para detectar o maior número de substâncias presentes nas frações a detecção dos cromatogramas mostrados (Figuras 12 a 15) foi realizada em 254nm.

5.4 Estudo Químico dos Frutos

5.4.1 Identificação das antocianinas presentes no EB-Fr por CLAE-EM

As antocianinas presentes no EB-Fr foram primeiramente identificadas pelos espectros no UV-vis os quais apresentaram duas bandas, uma em 274nm e outra ao redor de 520nm, características de antocianinas (Figura 16).

Como pode ser observado nos espectros, estes não apresentam nenhuma banda intensa na região de 310nm indicando que estas antocianinas não são aciladas por um derivado de ácido cinâmico. (HARBONE, 1957; HONG & WROLSTAD, 1990; MACZ-POP et al., 2006; ALCALDE-EON et al., 2004)

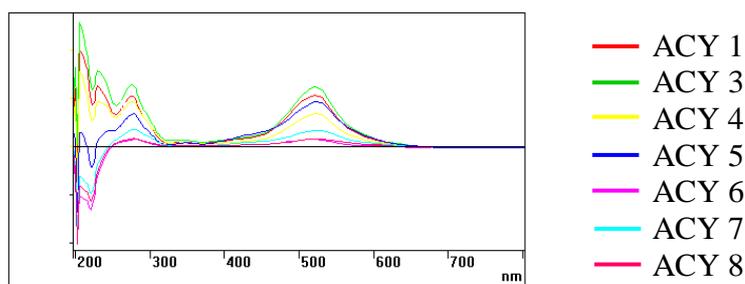


Figura 16: Espectros de UV-vis das antocianinas identificadas no EB-Fr.

O EB-Fr foi submetido às análises por CLAE-EM e CLAE-EM/EM para identificar quais antocianinas estavam presentes neste extrato. As antocianinas identificadas foram delphinidina-diglicosídeo, cianidina-diglicosídeo, petunidina-diglicosídeo, malvidina-diglicosídeo, delphinidina-glicosídeo, cianidina-glicosídeo, petunidina-glicosídeo e malvidina-glicosídeo (Tabela 8).

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 envolvendo a perda do glicosídeo e resultando em íons que contêm somente a aglicona. (OLIVEIRA, ESPERANÇA & ALMOSTER FERREIRA, 2001; ANDERSEN & MARKHAN, 2006)

Tabela 8: Antocianinas identificadas no EB-Fr de *E. jambolana*.

Antocianina	Tr (min)	Erro (ppm)	[M] _{cal.}	[M] ⁺ (m/z)	M-162] ⁺ (m/z)	[M-162-162] ⁺ (m/z)
(1) delphinidina-diglicosídeo	15,9	28,9	627,1561	627,1742	465	303
(2) cianidina-diglicosídeo	16,7	29,1	611,1612	611,1790	449	287
(3) petunidina-diglicosídeo	17,6	32,8	641,1718	641,1928	479	317
(4) malvidina-diglicosídeo	19,7	34,3	655,1874	655,2099	493	331
(5) delphinidina-glicosídeo	22,1	42,8	465,1033	465,1232	303	-
(6) cianidina-glicosídeo	25,9	45,0	449,1084	449,1286	287	-
(7) petunidina-glicosídeo	28,4	51,8	479,1189	479,1437	317	-
(8) malvidina-glicosídeo	29,3	35,01	493,1346	493,1519	331	-

A ESI-MS primeiramente produziu íons moleculares intactos [M]⁺ e a fragmentação ocorreu variando as condições de ionização.

As antocianinas diglicosiladas apresentaram como padrão de fragmentação a perda de duas unidades glicosídicas (Figuras 17, 18, 19 e 20). Este padrão indica que as antocianinas são glicosiladas nas posições 3 e 5, pois quando submetidas à EM/EM, as antocianinas 3,5-diglicosiladas apresentam duas perdas de unidades glicosídicas, sendo a primeira perda referente ao glicosídeo ligado ao C-3 e a segunda ao glicosídeo ligado ao C-5. As antocianinas diglicosiladas no C-3, com exceção do rutinosídeo, apresentam apenas a perda de um fragmento referente às duas unidades de açúcar ligadas entre si. (GIUSTI et al., 1999; WU & PRIOR, 2005a; WU & PRIOR, 2005b; OLIVEIRA et al., 2001)

Uma proposta de estrutura para estas antocianinas diglicosiladas será feita após a identificação das substâncias isoladas.

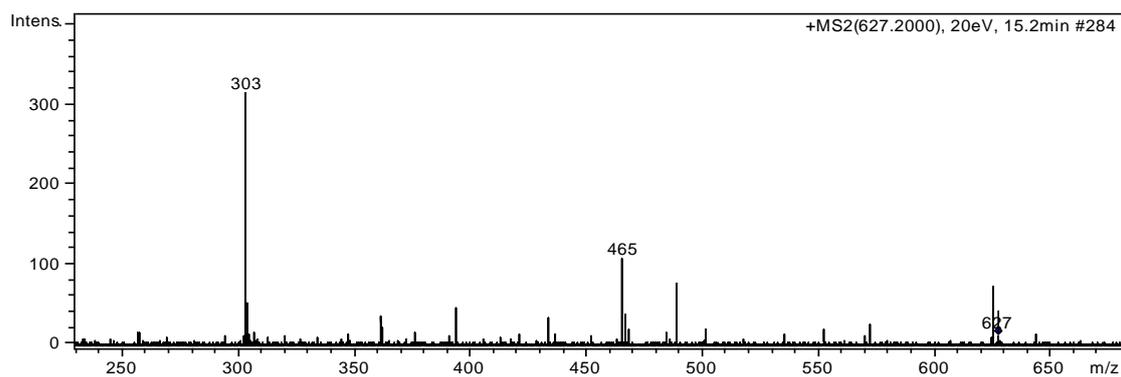


Figura 17: Fragmentograma da antocianina (1): delfinidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 627 por ESI-ToF-positivo (20eV)].

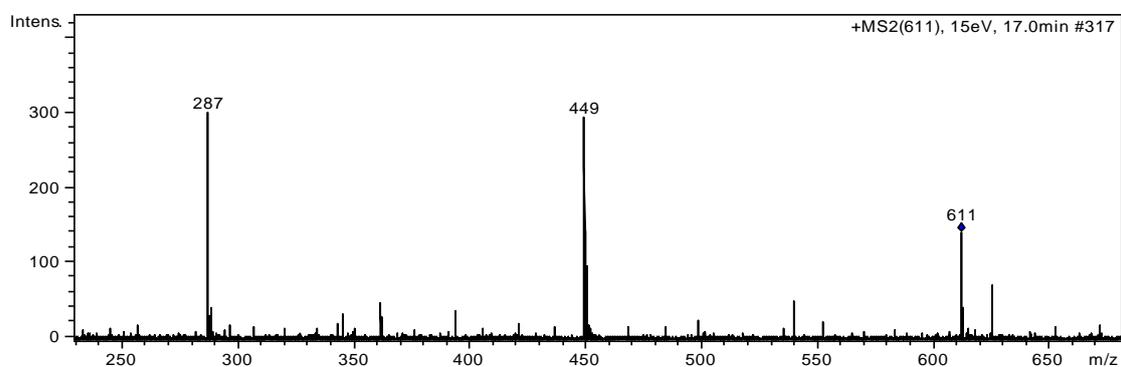


Figura 18: Fragmentograma da antocianina (2): cianidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 611 por ESI-ToF-positivo (15eV)].

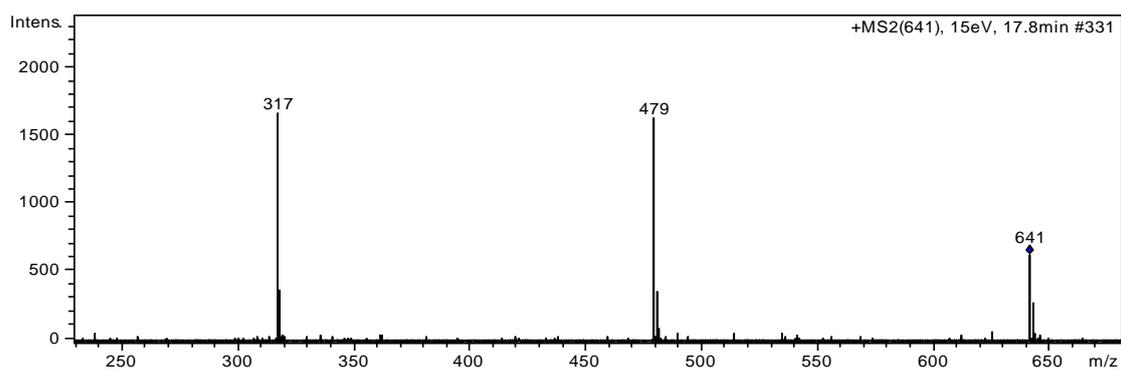


Figura 19: Fragmentograma da da antocianina (3): petunidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 641 por ESI-ToF-positivo (15eV)].

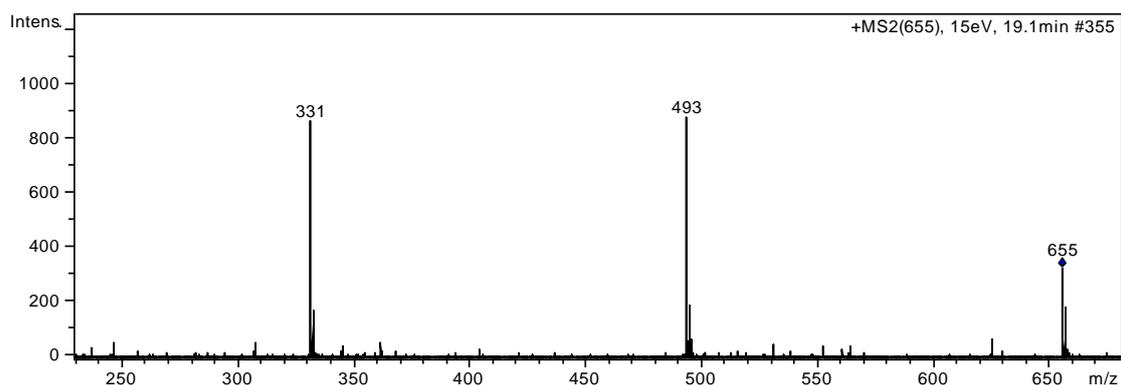


Figura 20: Fragmentograma da antocianina (4): malvidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 655 por ESI-ToF-positivo (15eV)].

As antocianinas monoglicosiladas apresentaram apenas uma perda de massa referente à unidade glicosídica (Figuras 21, 22, 23 e 24). Normalmente, a unidade glicosídica está ligada na antocianidina na posição 3 do anel C. (PASCUAL-TERESA & SANCHEZ-BALLESTA, 2008; CASTANEDA-OVANDO et al., 2009; COOKE et al., 2005)

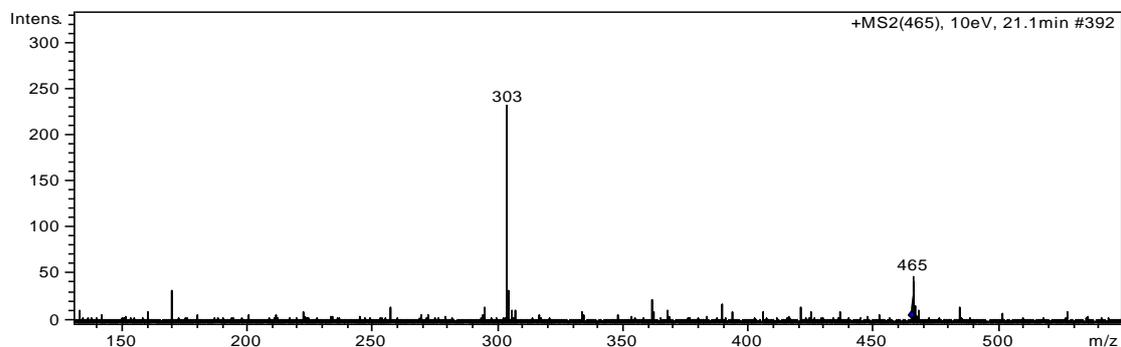


Figura 21: Fragmentograma da antocianina (5): delphinidina-glicosídeo [EM/EM por íons precursores de 465 por ESI-ToF-positivo (10eV)].

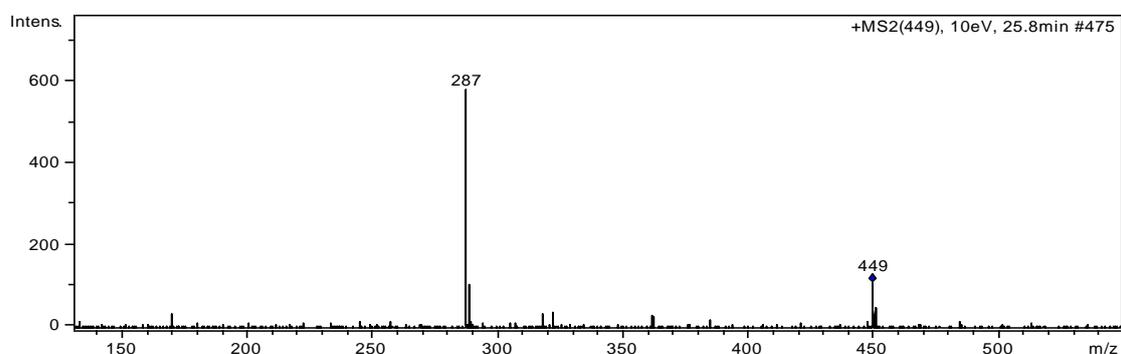


Figura 22: Fragmentograma da antocianina (6): cianidina-glicosídeo [EM/EM por íons precursores de 449 por ESI-ToF-positivo (10eV)].

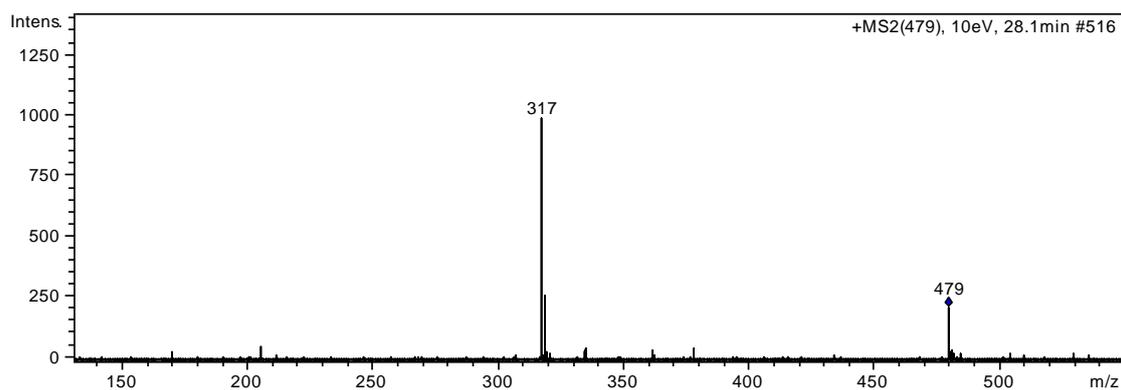


Figura 23: Fragmentograma da antocianina (7): petunidina-glicosídeo [EM/EM por íons precursores de 479 por ESI-ToF-positivo (10eV)].

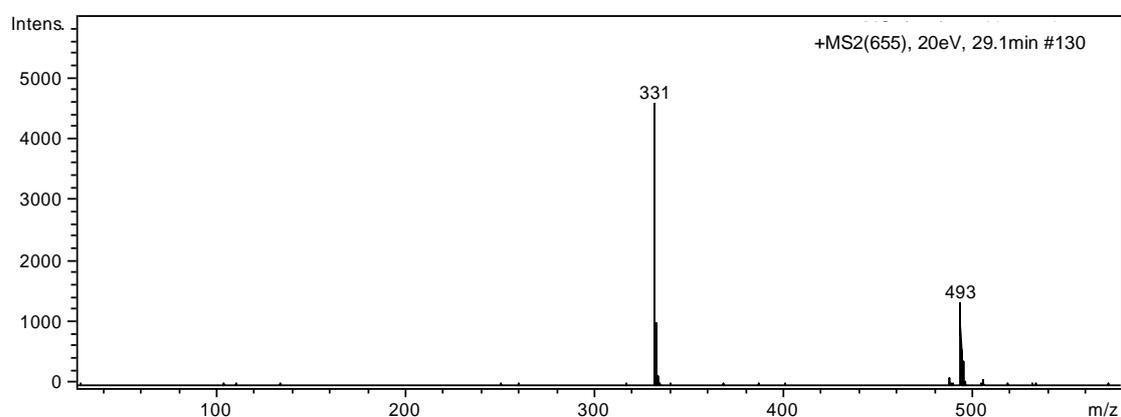


Figura 24: Fragmentograma da antocianina (8): malvidina-glicosídeo [EM/EM por íons precursores de 493 por ESI-ToF-positivo (20eV)].

As propostas de fragmentação para estas antocianinas estão apresentadas nas figuras 25, 26, 27 e 28.

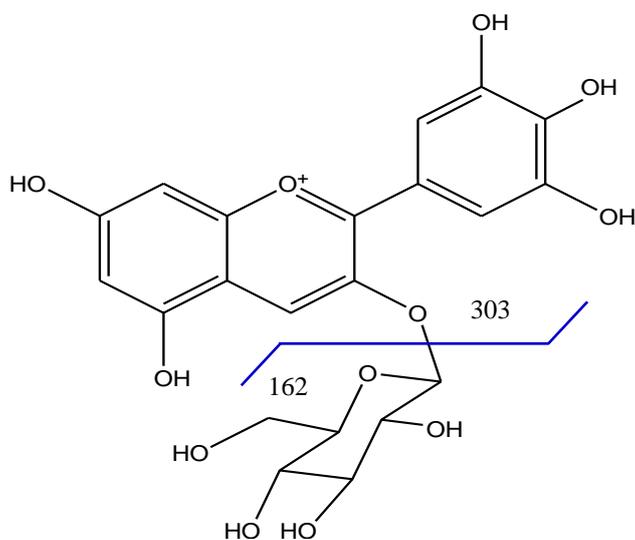


Figura 25: Proposta de fragmentação para a antocianina (5): delphinidina-3-O-glicosídeo.

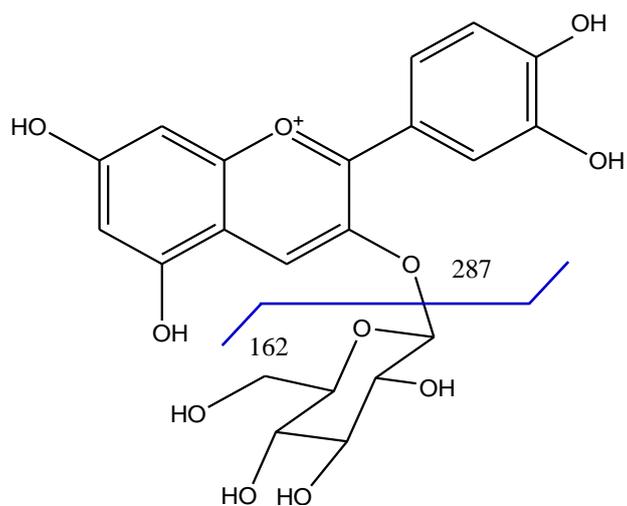


Figura 26: Proposta de fragmentação para a antocianina **(6)**: cianidina-3-O-glicosídeo.

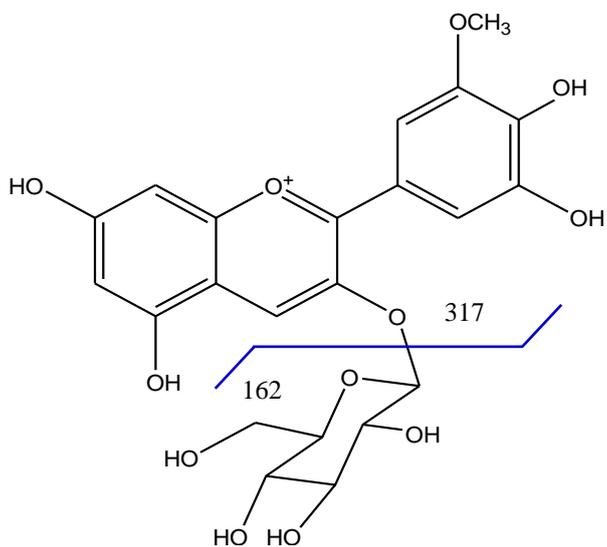


Figura 27: Proposta de fragmentação para a antocianina **(7)**: petunidina-3-O-glicosídeo.

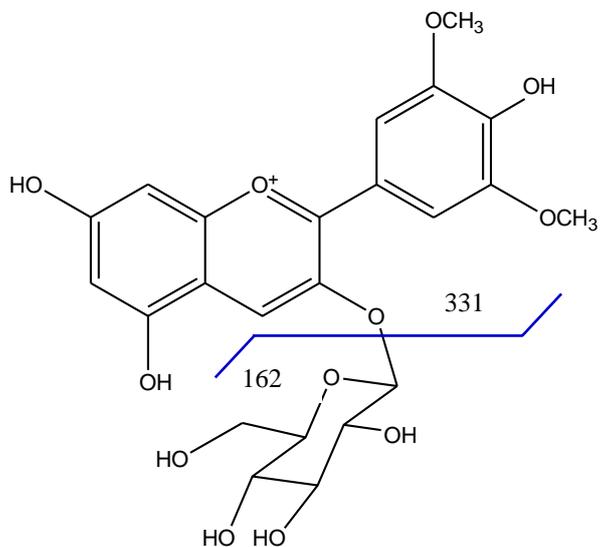


Figura 28: Proposta de fragmentação para a antocianina **(8)**: malvidina-3-O-glicosídeo.

5.4.2 Elucidação Estrutural das Antocianinas

As antocianinas **1**, **3** e **4** também foram analisadas, primeiramente, pelos espectros no UV-vis que apresentaram duas bandas, uma em 274nm e outra ao redor de 520nm, características de antocianinas (Figura 29).

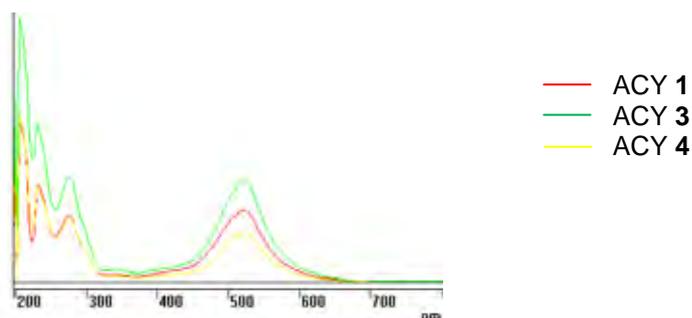


Figura 29: Espectros no UV-vis das antocianinas isoladas de *E. jambolana*.

A subfração Ha-Fr C18 - 10 foi submetida à análise por RMN permitindo a caracterização da antocianina **4**. O espectro de RMN de ^1H mostrou perfil característico de antocianinas (Figuras 30 e 31 – Anexo A), pois apresentou um singlete em δ_{H} 9,17 associado ao H-4, dois dubletos em δ_{H} 7,14 e 7,09 (d, $J=2,0$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente, singlete em δ_{H} 8,04 correspondente aos hidrogênios H-2' e H-6' e por fim um singlete em δ_{H} 4,02 associado aos hidrogênios metoxílicos. Além disso, apresentou sinais entre δ 3 e 5 indicativos da presença de açúcar. Esses dados sugerem que a antocianina **4** apresenta um anel A 5,7,9,10-tetrassubstituído e um anel B 1',3',4',5'-tetrassubstituído característicos de malvidinas glicosiladas.

Os sinais dos hidrogênios anoméricos foram obtidos por TOCSY-1d (Figuras 32 e 33 - Anexo A) quando a amostra foi preparada em $\text{CD}_3\text{SOCD}_3:\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1). Aos hidrogênios anoméricos H-1'' e H-1''' foram atribuídos os dubletos em δ_{H} 5,38 (dois multipletos em 3,55-3,49 e 3,42-3,23) e 4,27 (dois multipletos em 3,14-3,04 e 2,92-2,88), respectivamente. A constante de acoplamento de 7,5 Hz calculada para estes dois sinais sugerem uma configuração β para estas unidades de glicose. Os deslocamentos químicos para os dubletos anoméricos das duas unidades glicosídicas estão de acordo com a literatura. (SHOYAMA et al., 1990)

Os dados do espectro *g*HMQC (CD₃OD : CF₃COOD (19:1)) foi importante para se obter informações sobre as ligações diretas entre carbono e hidrogênio e com isso fornecer os deslocamento químicos dos carbonos (Figura 34 - Anexo A), já que o espectro de RMN de ¹³C não foi obtido devido a pouca massa de amostra. Os dados obtidos foram comparados com dados encontrados na literatura. (GIUSTI et al., 1998; SAKAGUCHI et al., 2008)

O espectro *g*HMBC (Figura 35 - Anexo A) obtido para a amostra preparada em CD₃OD : CF₃COOD (19:1) mostra correlações a longa distância entre carbonos e hidrogênios. Foram observadas correlações entre o hidrogênio H-4 e os carbonos C-2, C-3, C-5 e C-9 com sinais em δ_C 165,0; 147,0; 156,9 e 156,9; respectivamente. Os hidrogênios H-6 e H-8 apresentaram as mesmas correlações com os carbonos C-7 e C-10 com sinais em δ_C 179,1 e 113,7; respectivamente. As correlações observadas para os hidrogênios simétricos H-2' e H-6' com os carbonos C-1' e C-4' foram em δ_C 111,2 e 148,0; respectivamente.

O espectro apresentou dois sinais em δ_C 147,0 um referente a correlação entre o H-4 e o C-3 e o outro referente a correlação entre o hidrogênio anomérico H-1'' e o carbono aglicônico C-3. Não apresentou nenhum sinal de correlação entre o carbono aglicônico C-5 e o hidrogênio anomérico H-1'''. Porém, apresentou um sinal em δ_C 103,6 referente à correlação entre H₂-6'' → C-1''' (Figura 36).

Os dados obtidos e apresentados na tabela 9 estão de acordo com os dados da literatura. (GIUSTI et al., 1998)

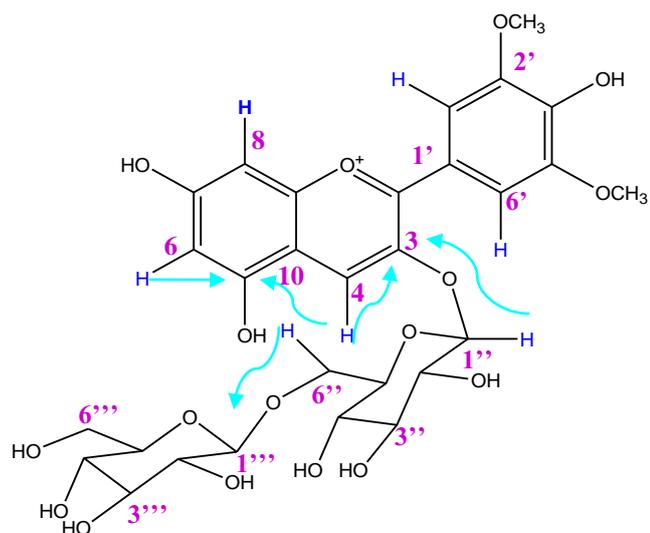


Figura 36: Algumas correlações observadas no espectro de *g*HMBC da substância **4**.

Estes dados indicam que o diglicosídeo ligado a aglicona malvidina é o gentiobiosídeo. Portanto, a substância **4** é uma malvidina 3-O-gentiobiosídeo (Figura 37).

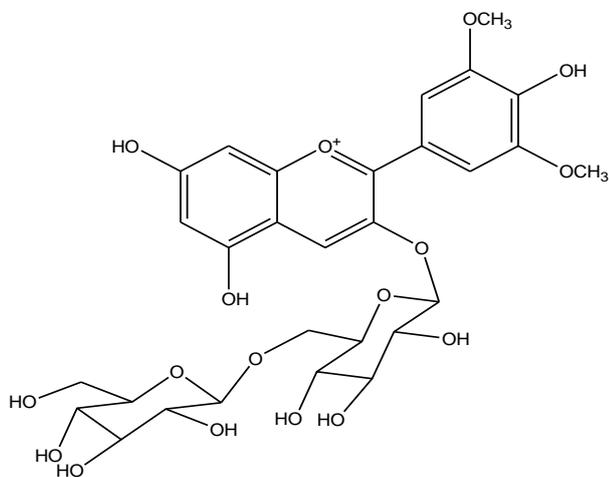


Figura 37: Estrutura da antocianina (**4**): malvidina-3-O-gentiobiosídeo.

Tabela 9: Dados RMN de ^1H [δ $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CF}_3\text{COOD}$ e $\text{CD}_3\text{SOCD}_3/\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1)].

Posição	δ_{H} (ppm); mult.; J (Hz)	TOCSY-1d; mult.; J (Hz)	gHMQC	gHMBC
2	-	-	-	165,0
3	-	-	-	147,0
4	9,17; s	-	126,4	-
5	-	-	-	156,9
6	7,09; d; (2,0)	-	96,1	-
7	-	-	-	170,1
8	7,14; d (2,0)	-	87,7	-
9	-	-	-	156,9
10	-	-	-	113,7
1'	-	-	-	111,2
2'	8,04; s	-	100,7	-
3'	-	-	-	148,2
4'	-	-	-	148,0
5'	-	-	-	148,2
6'	8,04; s	-	100,7	-
O-CH ₃	4,02; s	-	47,2	-
O-CH ₃	4,02; s	-	47,2	-
H-1''	-	5,38; d (7,5)	94,3	-
H-2'' a H-6''(a e b)	-	3,55-3,49; m 3,42-3,23; m	-	-
H-1'''	-	4,27; d; (7,5)	103,6	-
H-2''' a H-6'''(a e b)	-	3,14-3,04; m 2,92-2,88; m	-	-

A subfração Ha-Fr C18 - 6 que apresenta uma mistura de duas antocianinas também foi submetida a análise por RMN permitindo a determinação da aglicona da antocianina **3**. A outra substância presente nesta mistura é a antocianina **4**.

O espectro de RMN de ^1H para a antocianina **3** (Figuras 38 e 39 - Anexo A) apresentou um singlete em δ_{H} 9,14 referente ao H-4. Os dois dubletos em δ_{H} 8,02 e 7,86 (d, $J= 2,0$ Hz), atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-6', respectivamente e os dois dubletos em δ_{H} 7,11 e 7,08 (d, $J= 2,0$ Hz)

correspondem aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente, e o singlete em δ_H 4,02 aos hidrogênios metoxílicos. O espectro apresentou sinais em δ em 3-5, indicativos da presença de açúcar. Os dados sugerem que a antocianina **3** apresenta um anel A 5,7,9,10-tetrassubstituído e um anel B 1',3',4',5'-tetrassubstituído, associado portanto, à aglicona petunidina (Figura 40). Os dados estão apresentados na tabela 10.

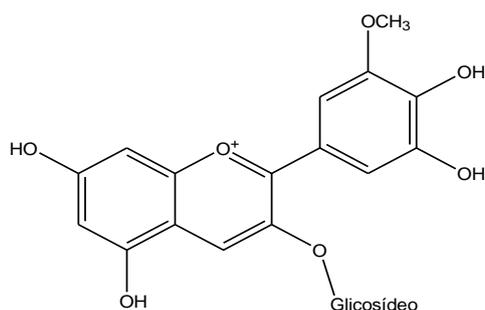


Figura 40: Estrutura da antocianina petunidina glicosilada.

Tabela 10: Dados RMN de ^1H [δ $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1)].

Posição	δ_H (ppm); mult.; J (Hz)
H-4	9,14; s
H-6	7,08; d; (2,0)
H-8	7,11; d; (2,0)
H-2'	8,02; d; (2,0)
H-6'	7,86; d; (2,0)
O-CH ₃	3,94; s

As antocianinas podem ser distribuídas em dois grupos nomeados como açúcar-determinante e antocianidina-determinante. No grupo açúcar-determinante, as mesmas unidades glicosídicas estão ligadas a diferentes antocianidinas. No grupo antocianidina-determinante, a mesma aglicona está ligada a diferentes açúcares. (WU & PRIOR, 2005a; WU & PRIOR, 2005b) Por isso, é muito provável que as outras duas antocianinas isoladas sejam delfinidina-3-O-gentiobiosídeo (Figura 41) e petunidina-3-O-gentiobiosídeo (Figura 42) e a outra antocianina diglicosilada que não foi isolada seja cianidina-3-O-gentiobiosídeo (Figura 43). As antocianinas presentes em *E. jambolana* são, portanto, açúcar-determinante.

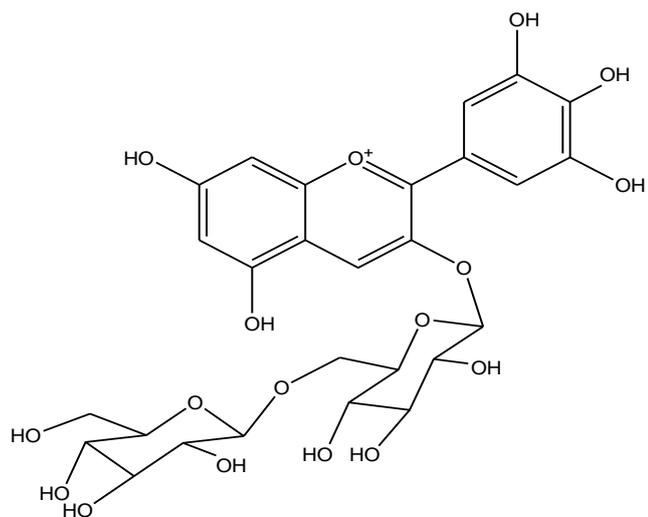


Figura 41: Estrutura da antocianina **(1)**: delfinidina-3-O-gentiobiosídeo.

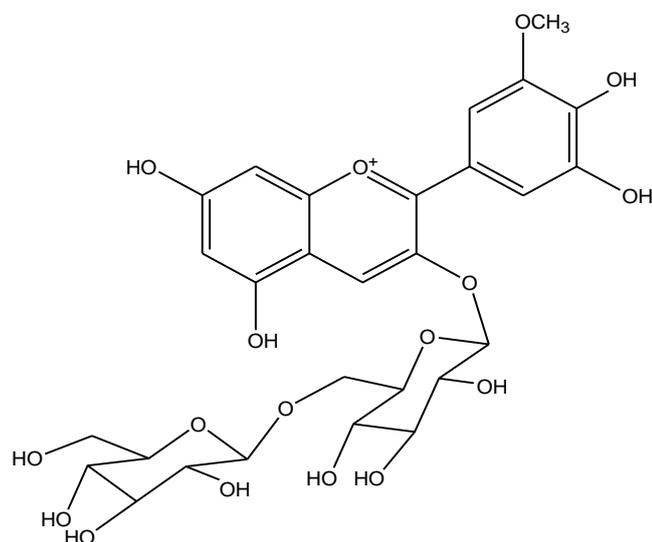


Figura 42: Estrutura da antocianina **(3)**: petunidina-3-O-gentiobiosídeo.

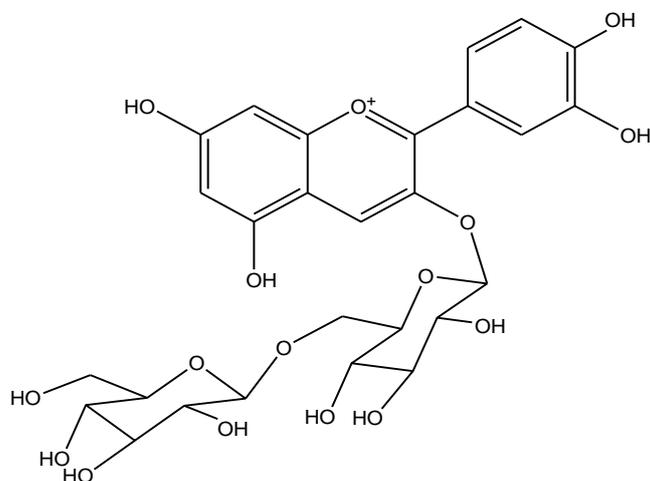


Figura 43: Estrutura da antocianina **(2)**: cianidina-3-O-gentiobiosídeo.

Estas antocianinas isoladas foram submetidas à EM/EM. A espectrometria de massas por ESI-ToF-positivo foi muito importante para indicar as estruturas das antocianinas **1**, **3** e **4**.

As principais informações obtidas por esta técnica foi a massa molar das antocianinas através da identificação do pico íon molecular $[M]^+$ e as fragmentações indicando as perdas de unidades de açúcar (Tabela 11).

Tabela 11: Identificação das antocianinas isoladas por Espectrometria de massas por ESI-ToF-positivo.

ACY	Erro (ppm)	$[M]_{cal.}$	$[M]^+$ (m/z)	$[M-162]^+$ (m/z)	$[M-162-162]^+$ (m/z)	Antocianina
1	1,43	627,1561	627,1552	465		Delfinidina -3-O-gentiobiosídeo
3	6,39	641,1718	641,1661	479	317	Petunidina3-O-gentiobiosídeo
4	2,13	655,1874	655,1860	493	331	Malvidina-3-O-gentiobiosídeo

A antocianina **1** possui $[M]^+ = 627,1552$ e $[M-162]^+ = 465$, indicando a presença de delfinidina-diglicosídeo (Figura 44). A antocianina **3** possui $[M]^+ = 641,1718$; $[M-162]^+ = 479$ e $[M-162-162]^+ = 317$ característicos de petunidina-diglicosídeo (Figura 45). A antocianina **4** possui $[M]^+ = 655,1860$, $[M-162]^+ = 493$ e $[M-162-162]^+ = 331$, estes picos são característicos de malvidina-diglicosídeo (Figura 46). O erro calculado para as massas das antocianinas isoladas está dentro do valor permitido (30 ppm) para substâncias já descritas na literatura.

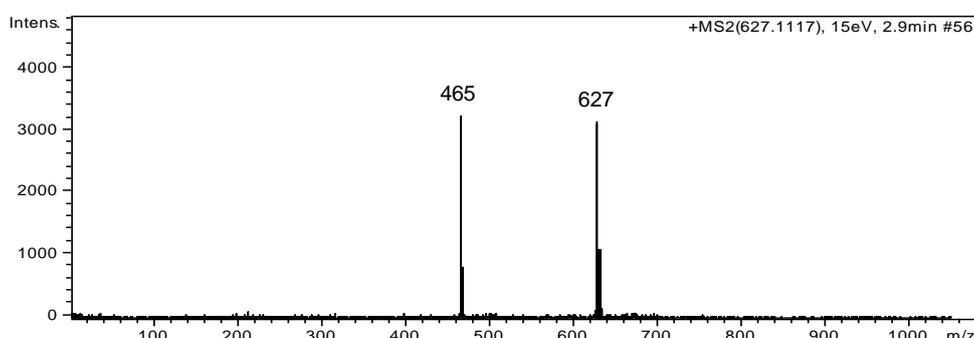


Figura 44: Fragmentograma da antocianina (**1**): delfinidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 627 por ESI-ToF-positivo (15eV)].

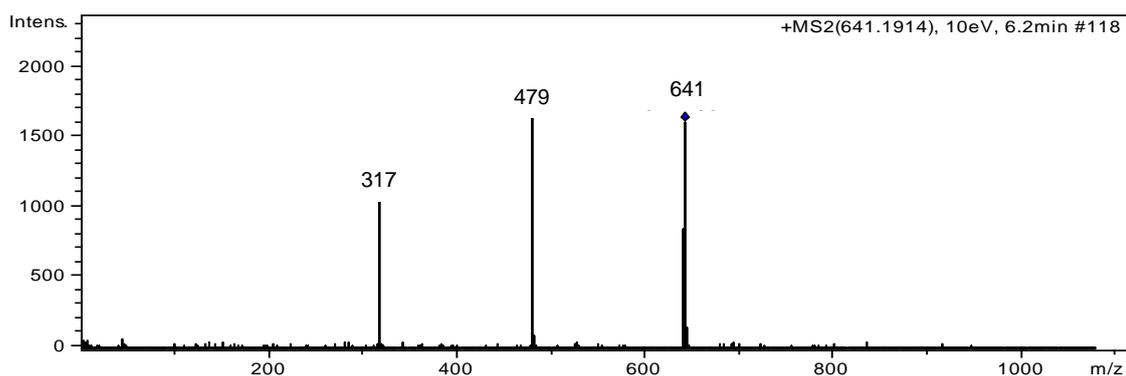


Figura 45: Fragmentograma da antocianina (3): petunidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 641 por ESI-ToF-positivo (10eV)].

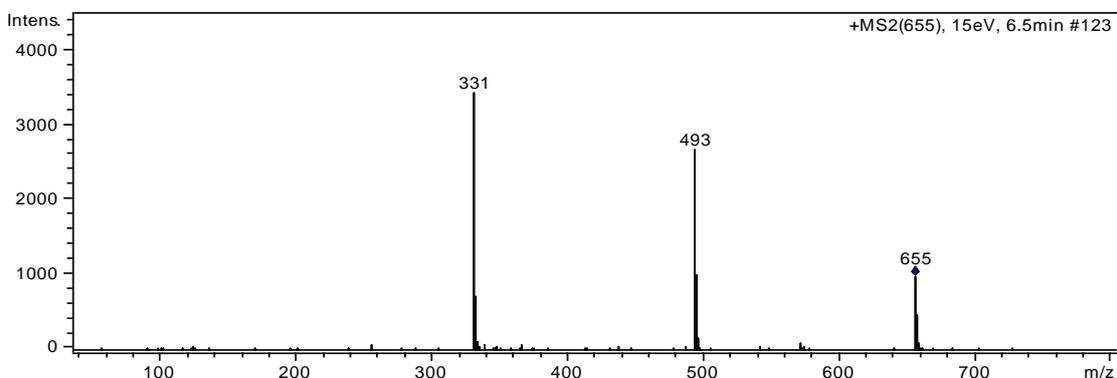


Figura 46: Fragmentograma da antocianina (4): malvidina-diglicosídeo [EM/EM por íons precursores de 655 por ESI-ToF-positivo (15eV)].

Os dados de RMN obtidos para a malvidina diglicosilada indicam que ela possui um gentiobiosídeo ligado ao C-3 e que este diglicosídeo apresenta dois fragmentos referentes às unidades de glicose que estão ligadas entre si. Na literatura, não foram encontrados dados sobre a fragmentação deste diglicosídeo. Então, as propostas de fragmentação das quatro substâncias diglicosiladas sugerem que o gentiobiosídeo, assim como o rutinosídeo, possui dois fragmentos referentes às duas unidades de glicose (Figuras 47, 48, 49 e 50).

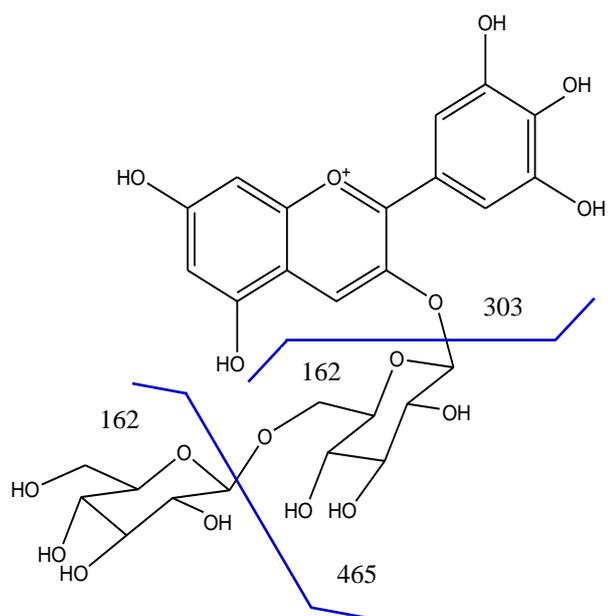


Figura 47: Proposta de fragmentação para a antocianina **(1)**: delphinidina-3-O-gentiobiosídeo.

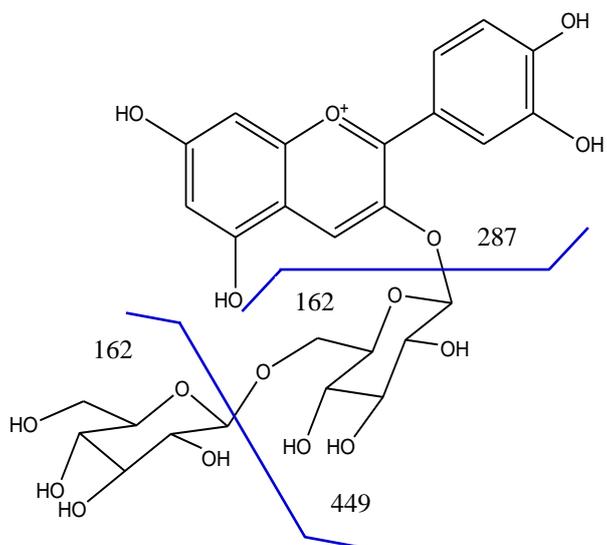


Figura 48: Proposta de fragmentação para a antocianina **(2)**: cianidina-3-O-gentiobiosídeo.

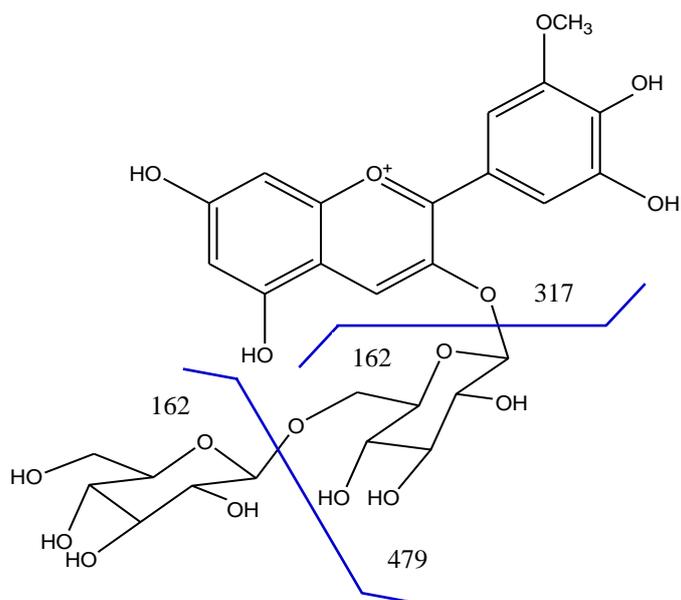


Figura 49: Proposta de fragmentação para a antocianina **(3)**: petunidina-3-O-gentiobiosídeo.

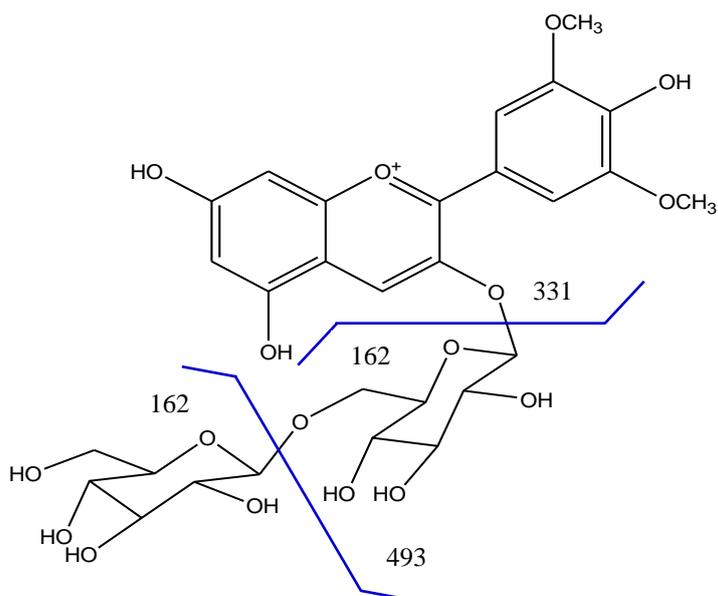


Figura 50: Proposta de fragmentação para a antocianina **(4)**: malvidina-3-O-gentiobiosídeo.

5.5 Metodologia de partição das folhas

Após a partição líquido-líquido do extrato bruto das folhas (EB-Fo) de *E. jambolana*, o perfil cromatográfico do extrato fruto e das frações acetato (Ac-Fo), n-butanólica (Bu-Fo) e hidroalcoólica (Ha-Fo) foi obtido através da análise por CLAE-DAD (Figura 51).

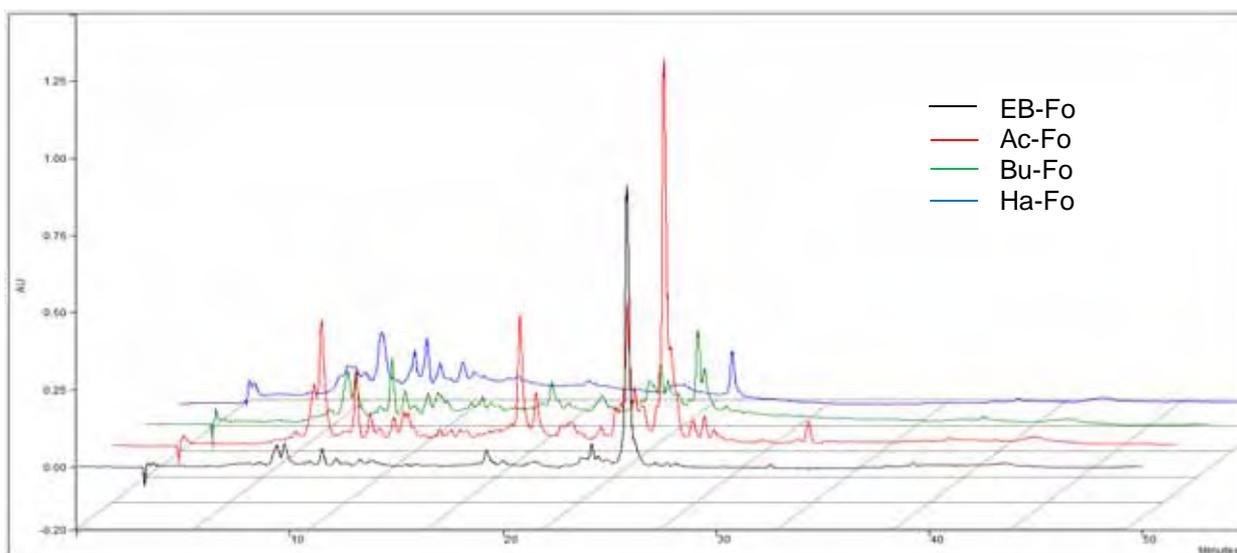


Figura 51: Perfil cromatográfico dos extratos das folhas [fase reversa C18; eluição gradiente MeOH(0,1% TFA):H₂O(0,1% TFA) e detecção a $\lambda = 254\text{nm}$].

5.6 Identificação dos metabólitos secundários das folhas e dos frutos de *E. jambolana*

Extratos vegetais de baixa polaridade podem apresentar atividade biológica e farmacológica, devido à presença de uma série de triterpenos e esteróides. No entanto, essas substâncias são encontradas em misturas de difícil separação e elucidação estrutural. Diante desse contexto, a identificação destas substâncias pode ser realizada usando métodos de desreplicação por CG-DIC e/ou CG-EM, pois estes métodos permitem a identificação de grande quantidade de constituintes em um curto período de tempo sem a necessidade de isolar estas substâncias em escala preparativa.

O extrato hexânico das folhas e a fração hexânica dos frutos de *Eugenia jambolana* foram submetidos à análise por CG-DIC, para identificar as substâncias presentes nestes extratos. Os tempos de retenções relativos (RR) dos triterpenos e esteróides foram comparados com os RR dos padrões já tabelados nas colunas SPB-5 e SPB-50 (Tabela 12 e 13).

Tabela 12. Valores da retenção relativa das amostras com o colesterol na coluna SBP-5.

Compostos	RR folhas	RR frutos	RR padrões
α -amirina	-	1,39	1,38
Taraxerol	-	1,28	1,28
acetato de β -amirina	1,48	-	1,49
Lupenona	-	1,35	1,34
α -amirinona	1,34	1,35	1,34
β -amirinona	-	1,28	1,28
germaniconona	1,26	-	1,26
campesterol	1,13	1,14	1,13
estigmasterol	-	1,17	1,17

Tabela 13. Valores da retenção relativa das amostras com o colesterol na coluna SBP-50.

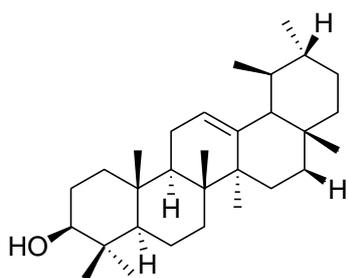
Compostos	RR folhas	RR frutos	RR padrões
α -amirina	-	2,01	2,02
Taraxerol	-	1,74	1,75
acetato de β -amirina	1,93	-	1,93
Lupenona	-	2,01	2,01
α -amirinona	1,93	1,93	1,94
β -amirinona	-	1,74	1,73
Germaniconona	1,65	-	1,66
Campesterol	1,24	1,24	1,23
Estigmasterol	-	1,31	1,30

As substâncias presentes no extrato hexânico das folhas são acetato de β -amirina (**11**), α -amirinona (**13**), germaniconona (**15**) e campesterol (**16**). Na fração hexânica dos frutos foram identificados os compostos α -amirina (**9**), taraxerol (**10**), lupenona (**12**), α -amirinona (**13**), β -amirinona (**14**), campesterol (**16**) e estigmasterol (**17**). (Tabela 14).

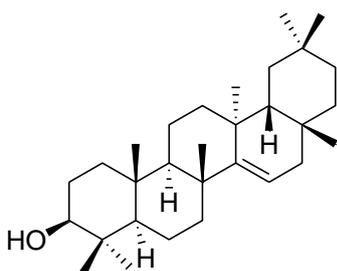
Tabela 14. Substâncias detectadas no extrato hexânico das folhas e na fração hexânica dos frutos *E. jambolana*.

Composto	Folhas	Frutos	Substância
α -Amirina	-	+	9
β -Amirina	-	-	-
Lupeol	-	-	-
Taraxerol	-	+	10
Acetato de α -amirina	-	-	-
Acetato de β -amirina	+	-	11
Acetato de lupeol	-	-	-
Acetato de bauerenila	-	-	-
Acetato de taraxerol	-	-	-
Acetato de friedelanoila	-	-	-
Friedelina	-	-	-
Lupenona	-	+	12
α -amirinona	+	+	13
β -amirinona	-	+	14
Germaniconona	+	-	15
Campesterol	+	+	16
Estigmasterol	-	+	17
β -Sitosterol	-	-	-

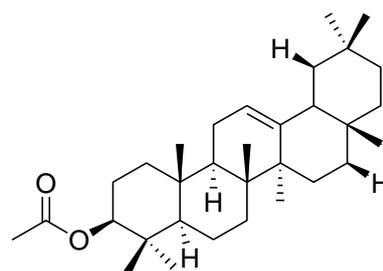
As estruturas destas substâncias detectadas estão mostradas na figura 52. (ALBUQUERQUE et al., 2007; CONEGERO et al., 2003; VIEIRA-JÚNIOR, SOUZA & CHAVES, 2005)



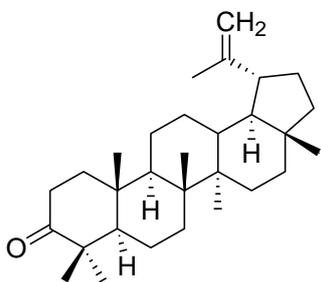
Substância 9



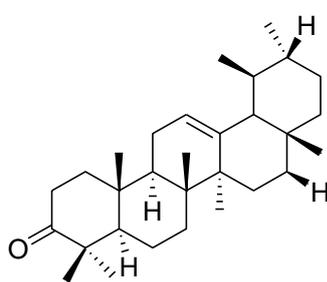
Substância 10



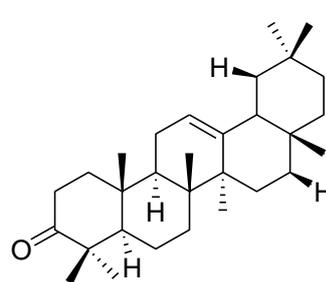
Substância 11



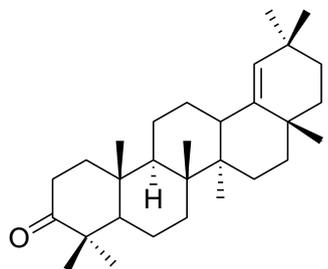
Substância 12



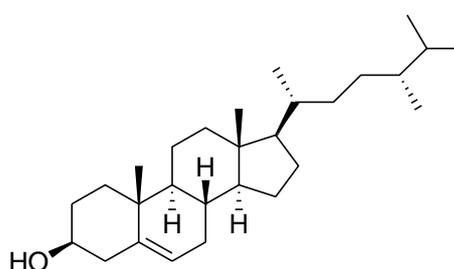
Substância 13



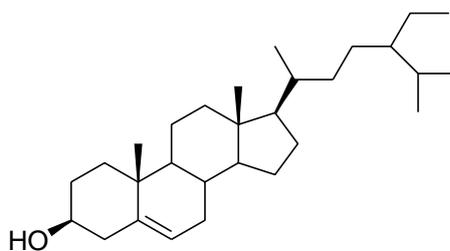
Substância 14



Substância 15



Substância 16



Substância 17

Figura 52: Estruturas dos triterpenos e esteróis detectados nas folhas e nos frutos de *E. jambolana*.

5.7 Ensaios Biológicos

Os extratos brutos, as frações dos frutos e das folhas de *E. jambolana* foram enviados para os bioensaios de ação seqüestradora de radicais livres usando DPPH, de quimioprevenção por indução de quinona-reductase, inibição da hemozoína (antimalárica), antifúngico para fitopatógenos, antifúngico para patógenos-humanos e anticolinesterásica.

As subfrações enriquecidas com antocianinas Grupo 1 (delfinidina-3-O-gentiobiosídeo, petunidina-3-O-gentiobiosídeo, malvidina-3-O-gentiobiosídeo e outros compostos fenólicos) , Grupo 2 (delfinidina-3-O-gentiobiosídeo, petunidina-3-O-gentiobiosídeo, malvidina-3-O-gentiobiosídeo), Ha-Fr C18 - 4 (delfinidina-3-O-gentiobiosídeo, petunidina-3-O-gentiobiosídeo e compostos fenólicos) e Ha-Fr C18 - 5 (petunidina-3-O-gentiobiosídeo e malvidina-3-O-gentiobiosídeo) foram analisadas quanto à sua atividade seqüestradora de radicais livres usando DPPH. As subfrações Ha-Fr C18 - 4 e Ha-Fr C18 - 5 foram submetidas ao ensaio de quimioprevenção e somente a subfração Ha-Fr C18 - 4 foi submetida aos ensaios antifúngico para fungos patógenos-humanos e anticolinesterásico.

5.7.1 Atividade antioxidante usando DPPH

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo ensaio que determina a porcentagem de seqüestro de radicais livres da molécula de DPPH (Figura 53).

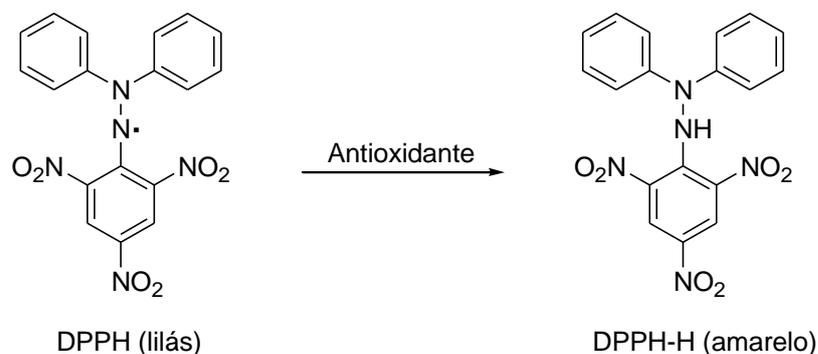


Figura 53: Mecanismo da reação do radical DPPH com um antioxidante.

Os extratos EB-Fr e Hex-Fo, e as frações Ac-Fr, Bu-Fr, Ha-Fr e a subfração Ha-Fr C18 - 4 dos frutos não apresentaram atividade quanto à sua ação seqüestradora de radicais livres. Porém, as subfrações enriquecidas em antocianinas Grupo 1, Grupo 2 e Ha-Fr C18 - 5 e o extrato EB-Fo e todas as frações das folhas apresentaram forte atividade quando comparadas com o padrão quercetina (Figura 54).

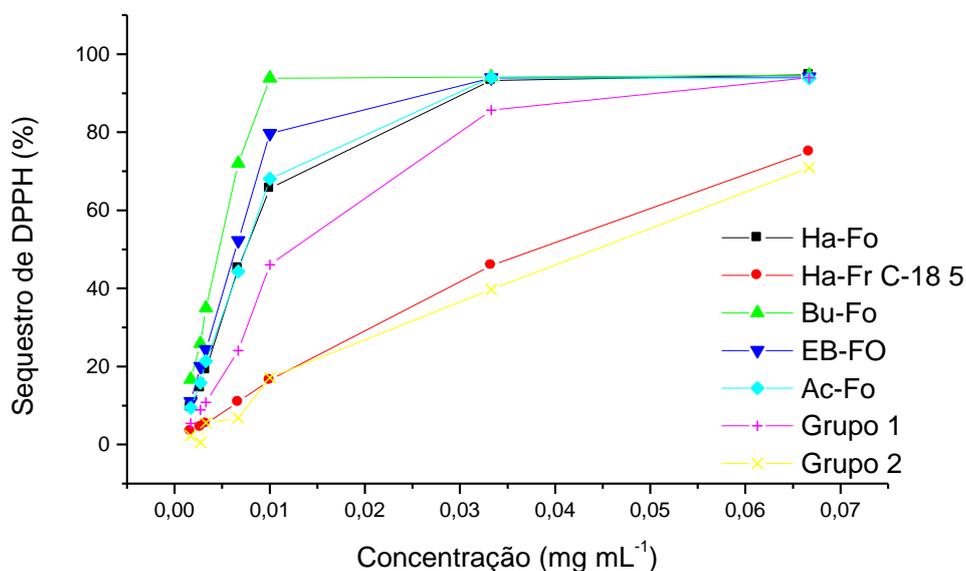


Figura 54: Inibição de DPPH no ensaio de ação seqüestradora de radicais livres.

O valor de IC₅₀ é a concentração na qual 50% dos radicais DPPH são seqüestrados e esses valores foram variaram de 0,0048 a 0,045 mg mL⁻¹. O valor para a quercetina foi de 1,72 mg mL⁻¹ evidenciando um potencial de ação seqüestradora de radicais livres maior para as frações Grupo 1, Grupo 2, Ha-Fr C-18 5, EB-Fo, Ac-Fo, Bu-Fo e Ha-Fo (Tabela 15).

Tabela 15: Valores de IC₅₀ das amostras com atividade antioxidante.

Amostra	Valores de IC₅₀ (mg mL⁻¹)
EB-Fr	Não ativa
Ac-Fr	Não ativa
Bu-Fr	Não ativa
Ha-Fr	Não ativa
Ha-Fr C-18 4	Não ativa
Hex-Fo	Não ativa
Grupo 1	0,013
Grupo 2	0,045
Ha-Fr C-18 5	0,038
EB-Fo	0,0065
Ac-Fo	0,0076
Bu-Fo	0,0048
Ha-Fo	0,0076
Padrão	1,72

5.7.2 Atividade antimalárica

A atividade antimalárica é evidenciada pela não polimerização da β -hematina. Quando a substância é capaz de inibir esta polimerização, ela pode ser capaz de inibir a síntese de hemozoína e, assim, servir de modelo para o desenvolvimento de agentes para terapia da malária. (TRIPATHI et al., 2004)

Ensaio empregando o extrato EB-Fo das folhas de *E. jambolana* evidenciaram uma interação com o grupo heme, em valores de inibição de $32 \pm 2\%$ a $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Após a partição, a fração Bu-Fo mostrou a maior atividade com inibição de $71 \pm 1\%$ a $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$, sugerindo a presença de substâncias com potencial atividade antimalárica nesta fração (Tabela 16).

Tabela 16. Atividade inibitória *in vitro* no ensaio de formação de β -Hematina

Amostras	% Inibição (2,5 mg mL⁻¹)
EB-Fr	não ativa
Ac-Fr	não ativa
Bu-Fr	não ativa
Ha-Fr	não ativa
EB-Fo	32 \pm 2
Ac-Fo	51 \pm 6
Bu-Fo	71 \pm 1
Ha-Fo	9 \pm 3
Quinina	90 \pm 1
Cloroquina	98 \pm 0

5.7.3 Ensaio de Quimioprevenção por indução da enzima Quinona-Redutase (QR)

Este ensaio foi realizado para as frações Ac-Fr e Ac-Fo e para as subfrações Ha-Fr C18 - 4 e Ha-Fr C18 - 5.

O ensaio da quinona-redutase (QR) constitui um método simples, para uma rápida detecção e avaliação da indução da enzima quinona-redutase, que destoxifica carcinógenos (enzima de fase 2), por produtos naturais, e é baseado na medida direta da atividade da QR em células de hepatocarcinoma celular (Hepa 1c1c7). (PROCHASKA & SANTAMARA, 1988) A quinona-redutase catalisa a redução da menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona), a menadiol mediada por NADPH como doador de elétrons. O MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) é então reduzido não-enzimaticamente pelo menadiol, resultando na formação de em sal precipitado com cor azul (azul de formazan) que pode ser quantificado em leitor de absorbância de microplacas (Figura 55). (PROCHASKA & SANTAMARA, 1988; FAHEY et al., 2004)

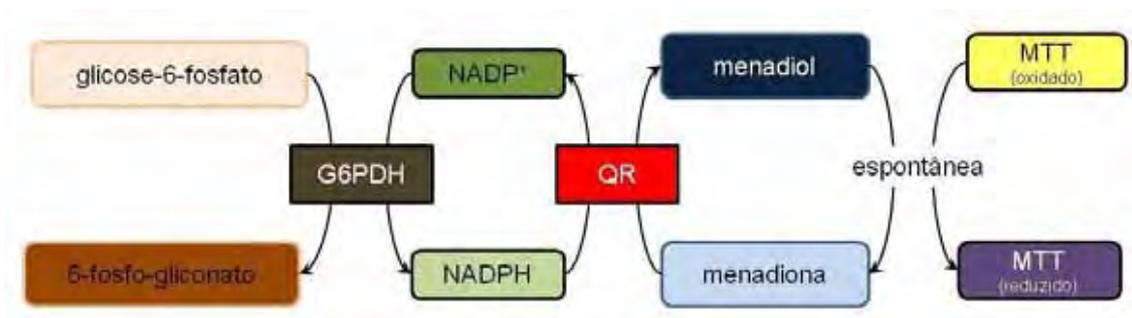


Figura 55: Princípio do ensaio da quinona redutase.

A linhagem derivada de hepatocarcinoma celular murino-Hepa 1c1c7 contém quantidades de QR indutíveis facilmente mensuráveis que fornecem um confiável sistema de detecção de indutores de enzimas de fase 2. (PROCHASKA & SANTAMARA, 1988; FAHEY et al., 2004; CUENDET et al., 2006)

A amostra é considerada um agente quimiopreventivo se a média de indução é maior ou igual a 2. Os valores obtidos foram comparados com o padrão β -naftoflavona ($0,1\mu\text{M}$) que é um agente indutor. Para as amostras que não foram solúveis em água foi feito o controle com DMSO.

As subfrações Ha-Fr C18 - 4 contendo delphinidina-3-O-gentiobiosídeo, petunidina-3-O-gentiobiosídeo e compostos fenólicos não induziram a formação da enzima QR. A subfração Ha-Fr C18 - 5 contendo apenas petunidina-3-O-gentiobiosídeo e malvidina-3-O-gentiobiosídeo, embora tenha apresentado atividade antioxidante não apresentou atividade quimiopreventiva por indução de QR. A fração Ac-Fr que contém as antocianinas identificadas como delphinidina-3-O-gentiobiosídeo, cianidina-3-O-gentiobiosídeo, petunidina-3-O-gentiobiosídeo, malvidina-3-O-gentiobiosídeo, delphinidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo, petunidina-3-O-glicosídeo, malvidina-3-O-glicosídeo e outros compostos fenólicos apresentou indução da enzima QR em diferentes concentrações, mas não apresentou atividade antioxidante (Tabela 17).

Tabela 17: Resultados de indução para as subfrações e fração dos frutos de *E. jambolana*.

Concentração	Ha-Fr C18-4		Ha-Fr C18-5		AC-Fr
	média	DP	média	DP	Média
20,000 µg/mL	1,83	0,061	1,39	0,141	1,76
10,000 µg/mL	1,64	0,115	1,49	0,117	2,21
5,000 µg/mL	1,64	0,116	1,49	0,161	3,88
2,500 µg/mL	1,49	0,101	1,23	0,146	2,81
1,250 µg/mL	1,62	0,091	1,31	0,122	2,03
0,625 µg/mL	1,31	0,114	1,31	0,123	2,84
0,312 µg/mL	1,66	0,063	1,45	0,220	3,34
0,156 µg/mL	1,74	0,094	1,61	0,169	3,68
BNF	1,53	0,030	1,79	0,075	3,26

O EB-Fo e as frações Ac-Fo e Bu-Fo que contém uma mistura de compostos fenólicos, apresentaram indução da enzima QR (Tabela 18).

As amostras que apresentaram indução da enzima QR poderão ser usadas como agentes quimiopreventivos.

Tabela 18: Resultados de indução para os extratos e frações das folhas de *E. jambolana*.

Concentração	EB-Fo		Ac-Fo		Bu-Fr		Ha-Fr		Hex-Fo	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	média	DP
20,000 µg/mL	2,51	0,04	3,6	0,08	2,54	0,09	0,8	0,03	0,4	0,06
10,000 µg/mL	1,81	0,06	2,5	0,44	2,13	0,19	0,6	0,07	0,6	0,03
5,000 µg/mL	1,73	0,06	2,5	0,15	2,26	0,03	0,8	0,07	0,5	0,07
2,500 µg/mL	1,35	0,10	1,5	0,06	2,42	0,02	0,6	0,09	0,5	0,09
1,250 µg/mL	2,08	0,06	1,8	0,05	1,99	0	0,8	0,12	0,5	0,06
BNF	2,2	0,07	2,2	0,03	2,20	0	2,1	0,06	2,1	0,03
DMSO	1,6	-	1,6	-	1,6	-	-	-	-	-

5.7.4 Ensaio antifúngico para fitopatógenos

Os extratos EB-Fr (1), EB-Fo (5) e Hex-Fo (9), as frações Ac-Fr (2), Bu-Fr (3), Ha-Fr (4), Ac-Fo (6), Bu-Fo (7) e Ha-Fo (8) dos frutos e das folhas de *E. jabolana* não apresentaram atividade para os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* no ensaio realizado por bioautografia (Figura 56). A atividade antifúngica foi verificada pela presença de halos brancos na placa indicando que não houve crescimento do fungo..

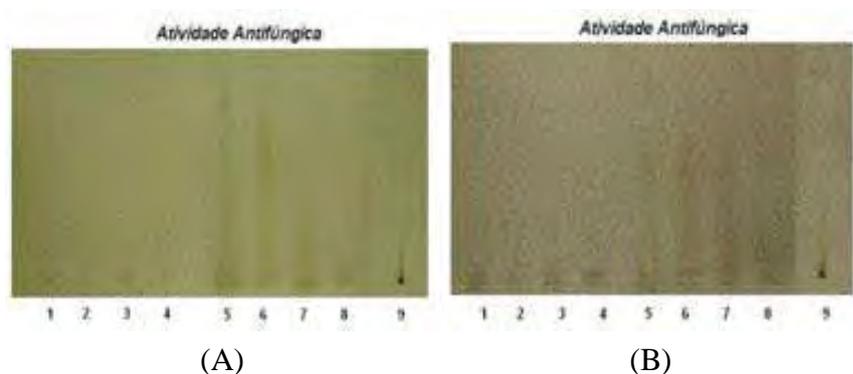


Figura 56: Resultado da atividade antifúngica para os fungos *C. cladosporioides* (A) e *C. sphaerospermum* (B).

5.7.5 Ensaio antifúngico patógeno-humano

As amostras que apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) menor que $75\mu\text{g mL}^{-1}$ possuem forte atividade, entre 75 e $150\mu\text{g mL}^{-1}$ atividade moderada, entre 150 e $250\mu\text{g mL}^{-1}$ a atividade é fraca e maior que $250\mu\text{g mL}^{-1}$ é inativa. (SCORZONI et al., 2007)

Portanto, as amostras testadas possuem atividade inibitória de fraca a alta contra os fungos testados, sendo que somente o extrato Hex-Fo e a subfração Ha-Fr C18 - 4 foram inativas para *Candida parapsilosis* (Tabela 19).

Tabela 19: Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos, frações e subfrações de *E. jambolana*.

Amostras	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	CIM	CIM	CIM	CIM
EB-Fr	250	250	250	250
Ac-Fr	250	250	250	125
Bu-Fr	250	250	250	250
Ha-Fr	125	250	250	250
EB-Fo	125	3,9	31,25	125
Ac-Fo	31,25	3,9	125	125
Bu-Fo	62,5	0,97	1,95	62,5
Ha-Fo	31,25	3,9	1,95	31,25
Hex-Fo	250	31,25	>250	62,5
Ha-Fr C-18 4	125	250	>250	250

5.7.6 Ensaio anticolinesterásico

O princípio deste método é a reação entre o acetato de naftil e a enzima acetilcolinesterase. A enzima converte o acetato de naftil a α -naftol o qual reage com o sal de Fast Blue B e forma um azo composto de cor roxa. Quando ocorre inibição da enzima acetilcolinesterase uma mancha branca é observada indicando que não houve a formação do composto de coloração roxa. (MARSTON et al., 2002)

Apenas as amostras EB-Fo (5), Ac-Fo (6) e Bu-Fo (7) apresentaram atividade inibitória da enzima acetilcolinesterásica (Figura 57). Os valores de Rf estão apresentados na tabela 20.

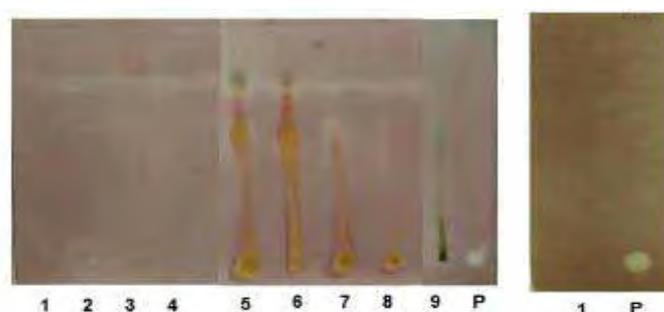


Figura 57: Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterásica.

Tabela 20: Valores de Rf das amostras com atividade anticolinesterásica.

Amostras	Rf	Identificação
EB-Fr	-	1
Ac-Fr	-	2
Bu-Fr	-	3
Ha-Fr	-	4
EB-Fo	0,53	5
Ac-Fo	0,5	6
Bu-Fo	0,46	7
Ha-Fo	-	8
Hex-Fo	-	9
Ha-Fr C-18 4	-	1
Fisostigmina	0,13	P

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, as antocianinas de *Eugenia jambolana* foram estabilizadas em meio ácido desde a extração, otimizada pelo emprego de metanol acidificado, até a caracterização das substâncias isoladas. Devido a estes cuidados foi possível identificar oito antocianinas no extrato bruto dos frutos (EB-Fr): delphinidina-diglicosídeo, cianidina-diglicosídeo, petunidina-diglicosídeo, malvidina-diglicosídeo, delphinidina-glicosídeo, cianidina-glicosídeo, petunidina-diglicosídeo, malvidina-diglicosídeo. As antocianinas diglicosiladas, por apresentarem um padrão de fragmentação com duas perdas de unidades glicosídicas foram identificadas por outros pesquisadores como sendo antocianinas-3,5-diglicosiladas. (BRITO et al, 2007; LI, ZHANG & SEERAM, 2009)

As frações Ac-Fr, Bu-Fr e Ha-Fr, foram submetidas aos diferentes métodos de fracionamento CPG, HSCCC e CC em fase reversa, respectivamente. A CPG comparada aos outros métodos foi mais demorada e consumiu mais solvente, mas proporcionou a purificação da antocianina **1**. A HSCCC foi uma técnica rápida e eficiente na obtenção de frações ricas em antocianinas e, associada à CPG e CLAE-prep, proporcionaram a obtenção das antocianinas **1**, **3** e **4** purificadas. A CC em fase reversa foi uma técnica muito rápida e resultou na obtenção de frações ricas em antocianinas e na purificação da antocianina **4**. As frações ricas em antocianinas foram submetidas à CLAE-prep e as antocianinas **1**, **3** e **4** foram re-isoladas. Portanto, todas as técnicas utilizadas foram importantes para a obtenção de frações ricas em antocianinas, um dos principais objetivos deste trabalho, assim como na obtenção de antocianinas purificadas. As técnicas mais rápidas podem ser consideradas melhores, pois diminuem o risco de degradação das dessas substâncias.

A antocianina **4** foi identificada por RMN de ^1H , TOCSY 1d, gHMQC, gHMBC e EM como malvidina-3-O-gentiobiosídeo. As antocianinas presentes nesta espécie devem pertencer ao grupo açúcar-determinante (WU & PRIOR, 2005a; WU & PRIOR, 2005b) e, portanto, foi proposta para as outras antocianinas diglicosiladas, a identificação como delphinidina-3-O-gentiobiosídeo,

cianidina-3-O-gentiobiosídeo e petunidina-3-O-gentiobiosídeo. Anteriormente, apenas a delphinidina-3-O-gentiobiosídeo e petunidina-3-O-gentiobiosídeo haviam sido identificadas em *E. jambolana*.

Os fragmentogramas obtidos para as antocianinas diglicosiladas mostraram a perda de dois fragmentos de glicose. Então, uma proposta de fragmentação foi feita para o gentiobiosídeo, pois esse diglicosídeo, assim como o rutinosídeo, apresenta dois fragmentos, sendo, portanto, exceção aos outros dissacarídeos.

O extrato hexânico das folhas (Hex-Fo) e a fração hexânica dos frutos (Hex-Fr) foram submetidos à análise por CG-DIC, o que permitiu a identificação de triterpenos pentacíclicos e esteróides. No Hex-Fo foram identificadas as substâncias acetato de β -amirina, α -amirinona, germanicona e campesterol, e na Hex-Fr foram identificados os compostos α -amirina, taraxerol, lupenona, α -amirinona, β -amirinona, campesterol e estigmasterol. Não foram encontrados na literatura dados sobre a presença destas substâncias na espécie em estudo.

Portanto, foram identificadas 17 substâncias, sendo 8 antocianinas e 9 esteróides e triterpenos, das folhas e frutos de *E. jambolana*.

As subfrações enriquecidas com antocianina, Grupo 1, Grupo 2, Ha-Fr C18 - 5, apresentaram forte atividade antioxidante quando comparadas com o padrão quercetina. A Ac-Fr, contendo uma mistura de sete antocianinas, apresentou forte indução da enzima quinona-redutase, indicando ser um potencial agente quimiopreventivo. O EB-Fr e as frações Ac-Fr, Bu-Fr, Ha-Fr e Ha-Fr C18 - 4, apresentaram atividade antifúngica de fraca a moderada contra os fungos testados, enquanto a subfração Ha-Fr C18 - 4 foi inativa contra o fungo *Candida parapsilosis*.

O EB-Fo, e as frações Ac-Fo, Bu-Fo e Ha-Fo apresentaram forte ação seqüestradora de radicais livres quando comparados com o padrão utilizado (quercetina). Apresentaram também inibição de fraca a moderada da polimerização de β -hematina, indicativa de potencial antimalárico, com valores de até $71 \pm 1\%$ a $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ para a fração Bu-Fo. Além disso, o EB-Fo e as frações Ac-Fo e Bu-Fo mostraram atividade indutora da enzima quinona-redutase, sendo este um dos mecanismos de quimioprevenção. O EB-Fo, Hex-Fo e as frações Ac-Fo, Bu-Fo e Ha-Fo apresentaram concentração inibitória

mínima de forte a moderada contra os fungos patógenos- humanos testados, com exceção do Hex-Fo, inativo contra o fungo *Candida parapsilosis*. Adicionalmente, o EB-Fo e as frações Ac-Fo e Bu-Fo apresentaram atividade inibitória contra a enzima acetilcolinesterase.

A espécie em estudo, *E. jambolana*, submetida ao presente estudo de bioprospeccao, forneceu diversas respostas atrativas, por possuir atividade antioxidante, quimiopreventiva, antimalárica, antifúngica e anticolinesterásica em extratos e/ou frações específicas, que podem ser incluídos em estudos mais aprofundados para o desenvolvimento de agentes nutracêuticos e/ou terapêuticos.

Portanto, o estudo de bioprospecção foi muito importante para se conhecer o potencial biológico da espécie em estudo, e dessa forma, direcionar novas pesquisas em busca das substâncias bioativas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, I. L. de; ALVES, L. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q. BRAZ FILHO, R. Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em própolis do ceará. *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 828-831, 2007.

ALCALDE-EON, C.; SAAVEDRA, G.; PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J. C. Identification of anthocyanins of pinta boca (*Solanum stentomum*) tubers. *Food Chemistry*, v. 86, p. 441-448, 2004.

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

ANDERSEN, O. M.; FOSSEN, T.; TORSKANGERPOLL, K.; FOSSEN, A.; HAUGE, U. Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelagornidin. *Phytochemistry*, v. 65, p. 405-410, 2004.

BAELMANS, R.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; MUNOZ, V.; QUENEVO, C.; SAUVAIN, M.; GINSBURG, H. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, p. 271-275, 2000.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*, v. 90, p. 727-733, 2005.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours- selected aspects. *Food Chemistry*, v. 58, p.103-109, 1996.

BRITO, E. S. de; ARAÚJO, M. C. P. de; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 9389-9394, 2007.

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.

CHANDRA, A.; NAIR, M. G.; IEZZONI, A. F. Evaluation and characterization of the anthocyanin pigments in tart cherries (*Prunus cerasus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 967-969, 1992.

CHANDRA, A.; NAIR, M. G.; IEZZONI, A. F. Isolation and stabilization of anthocyanin from tart cherries (*Prunus cerasus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, p. 1062-1065, 1993.

CHANDRASEKARAM, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 91, p. 105-108, 2004.

CHARRON, C. S.; KURILICH, A. C.; CLEVIDENCE, B. A.; SIMON, P. W.; HARRISON, D. J.; BRITZ, S. J.; BAER, D. J.; NOVOTNY, J. A. Bioavailability of anthocyanins from purple carrot juice: effects of acylation and plant matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 1226-1230, 2009.

CHEN, P.-N.; CHU, S.-C.; CHIOU, H.-L.; KUO, W.-H.; CHIANG, C.-L.; HSIEH, Y.-S. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside, and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of human lung cancer cell line. *Cancer Letters*, v. 235, p. 248-259, 2006.

CONEGERO, L. S.; IDE, R. M.; NAZARI, A. S.; SARRAGIOTTO, M. H.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E. de; FOGGIO, M. A. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Química Nova*, v. 26, n. 6, p. 825-827, 2003.

COOKE, D.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J.; MARCZYLO, T. Anthocyanins from edible fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *European Journal of Cancer*, v. 41, p. 1931-1940, 2005.

CUENDET, M.; OTEHAM, C. P.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 460-463, 2006.

DAI, J.; GUPTA, A.; GATES, L.; MUMPER, R. J. A comprehensive study of anthocyanins-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 837-847, 2009.

DEGENHARDT, A.; KNAPP, H.; WINTERHALTER, P. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 338-343, 2000.

DEGENHARDT, A.; HOFMANN, S.; KNAPP, H.; WINTERHALTER, P. Preparative isolation of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and application of the color activity concept to red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 5812-5818, 2000.

DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: _____. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 2nd ed. London: Wiley, 1997. Cap. 4, p. 121-164.

DU, Q.; JERZ, G.; WINTERHALTER, P. Isolation of two anthocyanin sambubiosides from bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1045, p. 59-63, 2004.

DU, Q.; ZHENG, J.; XU, Y. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p. 390-395, 2008.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, v. 84, p. 23-28, 2004.

FAHEY, J. W.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; STEPHENSON, K. K.; TALALAY, P. The "Prochaska" microtiter plate bioassay for inducers of NQ01. *Methods in Enzymology*, v. 382, p. 243-258, 2004.

FIORINI, M. Preparative high-performance liquid chromatography for the purification of natural anthocyanins. *Journal of Chromatography A*, v. 692, p. 213-219, 1995.

GIUSTI, M. M.; GHANADAN, H.; WROLSTAD, R. E. Elucidation of the structure and conformation of red radish (*Raphanus sativus*) anthocyanins using one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 4858-4863, 1998.

GIUSTI, M. M.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Electrospray and tandem molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 4631-4637, 1999.

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.

GOIFFON, J. P.; MOULY, P. P.; GAYDOU, E. M. Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v. 382, p. 39-50, 1999.

GROSS, H. B.; DALEBOUT, T.; GRUBB, C. D.; ABEL, S. Functional detection of chemopreventive glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, v. 159, p. 265-272, 2000.

GROVER, J. K.; VATS, V.; RATHI, S. S. Anti-hyperglycemic effect of *Eugenia jambolana* and *Tinospora cordifolia* in experimental diabetes and their effects on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. *Journal Ethnopharmacology*, v. 73, p. 461-470, 2000.

HARBONE, J. B. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochemical Journal*, v. 70, p. 22-28, 1958.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanins-rich extract from açai. *Food Chemistry*, v.118, p. 208-214, 2010.

HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography*. v. 51, p. 327-329, 1970.

HONG, V.; WORLSTAD, R. E. Use of HPLC separation /photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, p. 708-715, 1990.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. *O que é o câncer?* Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322> . Acesso em: 20 dez. 2009a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. *O que causa o câncer?* Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322> . Acesso em: 20 dez. 2009b.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. *Como é o processo de carcinogênese?* Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319>. Acesso em: 20 dez. 2009c.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1065, p. 145-168, 2005.

JAIN, M. C.; SESHADRI, T. R. Anthocyanins of *Eugenia jambolana* fruits. *Indian Journal of Chemistry*, v. 13, p. 20-23, 1975.

KANG, Y. H.; PEZZUTO, J. M. Induction of quinone reductase as primary screen for natural product anticarcinogens. *Methods in Enzymology*, v. 382, p. 380-414, 2004.

KATSUBE, N.; IWASHITA, K.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 68-75, 2003.

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.

LAPIDOT, T.; HAREL, S.; AKIRI, B.; GRANIT, R.; KANNER, J. pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 67-70, 1999.

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.

LI, L.; ADAMS, L. S.; CHEN, S.; KILLIAN, C.; AHMED, A.; SEERAM, N. P. Structure of *Eugenia jambolana* Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 826-831, 2009.

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.

MACZ-POP, G. A.; RIVAS-GONZALO, J. C.; PÉREZ-ALONSO, J. J.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, v. 94, p. 448-456, 2006.

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.

MAILEN-AUBERT, C.; DANGLES, O.; AMIOT, M. J. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 170-176, 2001.

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.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*, v. 13, p. 51-54, 2002.

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*. Flórida: CRC Press, 2004. Cap. 1, p. 1-16.

MIYAZAWA, T.; NAKAGAWA, K.; KUDO, M.; MURAISHI, K.; SOMEYA, K. Direct intestinal absorption of red fruits anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n. 47, p. 1083-1091, 1999.

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

MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; CHANDRA, S.; TANDAN, S. K.; LAL, J.; RAVIPRAKASH, V. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. *Fitoterapia*, v. 72, n. 4, p. 369-375, 2001.

NETZEL, M.; NETZEL, G.; TIAN, Q.; SCHWARTZ, S.; KONCZACK, I. Sources of antioxidant activity in australia aative aruits. Identification and quantification of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, p. 9820-9826, 2006.

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

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.

ORDAZ-GALINDO, A.; WESCHE-EBELING, P.; WROLSTAD, R. E.; RODRIGUEZ-SAONA, L.; ARGAIZ-JAMET, A. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins. *Food Chemistry*, v. 65, p. 201-206, 1999.

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

PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; BOLZANI, V. S. New antioxidant C-glucosylxanthenes from the stems of *Arrabidaea samydoides*. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 10, p. 1384-1387, 2003.

PEPATO, M. T.; MORI, D. M.; BAVIEIRA, A. M.; HARAMI, J. B.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. Fruit of jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, p. 43-48, 2005.

PEZZUTO, J. M.; KOSMEDER II, J. W.; PARK, E. J.; LEE, S. K.; CUENDET, M.; GILLS, J.; BHAT, K.; GRUBJESIC, S.; PARK, H. S.; MATA-GREENWOOD, E.; TAN, Y. M.; YU, R.; LANTVIT, D. D.; KINGHORN, A. D. Characterization of natural product chemopreventive agents. *Cancer Chemoprevention: Strategies for Cancer Chemoprevention*. Totowa: Humana Press, 2005. v. 2, cap. 1, p. 3-37, 2005.

PLAZA, C. V. Investigação fitoquímica e avaliação antioxidante das folhas e frutos de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae). 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

PROCHASKA, H. J.; SANTAMARIA, A. B. Direct measurement of NAD(P)H: quinone reductase from cells cultured in microtiter poços screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Analytical Biochemistry*, v. 169, n. 2, p. 328-336, 1988.

RAMIREZ, M. R.; IZQUIERDO, I.; RASEIRA, M. C. B.; ZUANAZZI, J. A.; BARROS, D.; HENRIQUES, A. T. Effect of liophilised *Vaccinium* berries on memory, anxiety and locomotion in adults rats. *Pharmacology Research*, v. 53, p. 457-462, 2005.

RENAULT, J-H.; THÉPENIER, P.; ZÈCHES-HANROT, M.; MEN-OLIVIER, L. L.; DURAND, A.; FOUCAULT, A.; MARGRAFF, R. Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 763, p. 345-352, 1997.

REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G. Comparasion of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 4592-4597, 1998.

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.

ROSENTHAL, P. J. Antimalrial drug discovery: old and new approaches. *Journal of Experimental Biology*, v. 206, n. 21, p. 3735-3744, 2003.

RYAN, D.; ROBARDS, K.; PRENZLER, P.; ANTOLOVICH, M. Applications of mass spectrometry to plant phenols. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 18, n. 5, p. 362-372, 1999.

SAKAGUCHI, Y.; OZAKI, Y.; MIYAJIMA, I.; YAMAGUCHI, M.; FUKIU, Y.; IWASA, K.; MOTOKI, S.; SUZUKI, T.; OKUBO, H. Major anthocyanins from purple asparagus (*Asparagus officinalis*). *Phytochemistry*, v. 69, p. 1763-1766, 2008.

SALAS, E.; DUENAS, M.; SCHWARZ, M.; WINTERHALTER, P.; CHEYNIER, V.; FULCRAND, H. Characterization of pigments from different high speed countercurrent chromatography wine fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 4536-4546, 2005.

SCHWARZ, M.; HILLEBRAND, S.; HABBEN, S.; DEGENHARDT, A.; WINTERHALTER, P. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochemical Engineering Journal*, v. 14, p. 179-189, 2003.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n. 1, p. 25-34, 2007.

SEERAM, N. P.; SCHUTZKI, R.; CHANDRA, A.; NAIR, M. G. Characterization, quantification, and bioactivities of anthocyanins in *Cornus* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 2519-2523, 2002.

SHARMA, B.; BALOMAJUMBER, C.; ROY, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 2376-2383, 2008.

SHARMA, B.; VISWANATH, G.; SALUNKE, R.; ROY, P. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chemistry*, v. 110, p. 697-705, 2008.

SHIN, W-H.; PARK, S-J.; KIM, E-J. Protective effect of anthocyanins in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of cerebral ischemia in rats. *Life Science*, v. 79, p. 130-137, 2006.

SHOYAMA, Y.; NISHIOKA, I.; HERATH, W.; UEMOTO, S.; FUJIEDA, K.; OKUBO, H. Two acylated anthocyanins from *Dioscorea alata*. *Phytochemistry*, v. 29, p. 2999-3001, 1990.

SILVA, C. H. T. P. da; CAMPO, V. L.; CARVALHO, I.; TAFT, C. A. Molecular modeling, docking and ADMET studies applied to the design of a novel hybrid for treatment of Alzheimer's disease. *Journal and Molecular Graphics and Modeling*, v. 25, p. 169-175, 2006.

SILVA, M. A.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. *Cromatografia em contracorrente*. Araraquara: Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2008. 1 CD-ROM.

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, 2007a. Cap. 1, p. 1-35.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Espectrometria de RMN de hidrogênio. In: _____. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2007b. Cap. 3, p. 123-169.

TRIPATHI, A. K.; KHAN, S. I.; WALKER, L. A.; TEKWANI, B. L. Spectrophotometric determination of hemozoin/ β -hematin formation *in vitro* assay. *Analytical Biochemistry*, v. 325, n. 1, p. 85-91, 2004.

TÜRKER, N.; ERDOĞDU, F. Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.). *Journal of Food Engineering*, v. 76, p. 579-583, 2006.

VAREED, S. K.; REDDY, M. K.; SCHUTZKI, R. E.; NAIR, M. G. Anthocyanins in *Cornus alterfolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits. *Life Science*, 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.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; PIMENTEL, L. S. B.; CASTRO, N. G.; CABRAL, R. F.; COSTA, R. S.; FLOYD, C.; ROCHA, M. S.; YOUNG, M. C. M.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 4184-4190, 2005.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; SOUZA, C. M. L. de; CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2005.

WU, X.; PRIOR, R. L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 2589-2599, 2005a.

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, 2005b.

ZHANG, Y.; LIAO, X.; CHEN, F.; WU, J.; HU, X. Isolation, identification, and color characterization of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-sophoroside from red raspberry. *European Food Research Technology*, v. 226, p. 395-403, 2008a.

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 Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 670-675, 2008b.

ZHANG, Z.; XUEQUN, P.; YANG, C.; JI, Z.; JIANG, Y. Purification and structural analysis of anthocyanins from litchi pericarp. *Food Chemistry*, v. 84, p. 601-604, 2004.

ANEXO A

Espectros de RMN das antocianinas **3** e **4**.

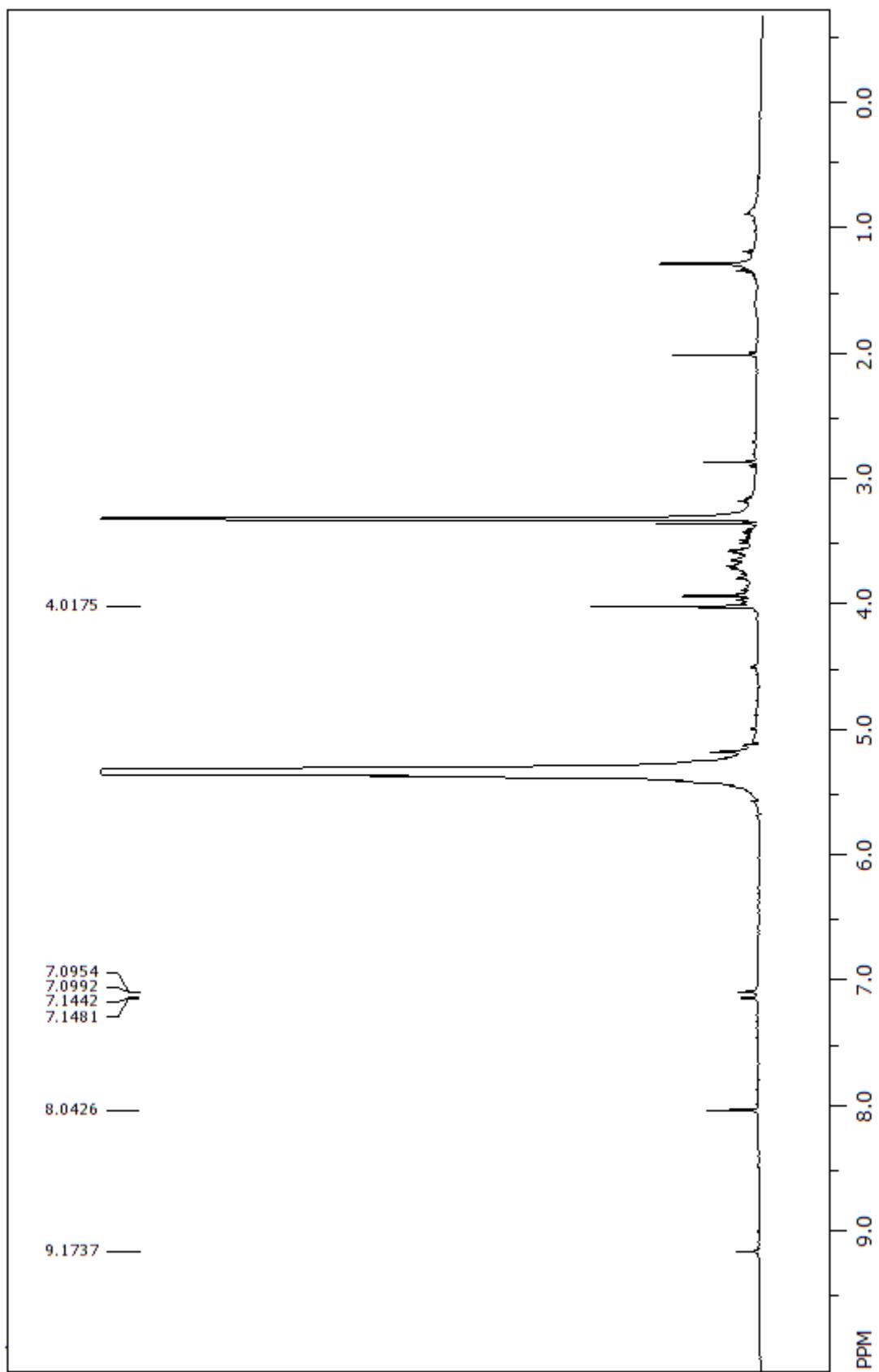


Figura 30: Espectro de RMN ^1H de Ha-Fr C18 – 10 [500 MHz δ CD_3OD / CF_3COOD (19:1)].

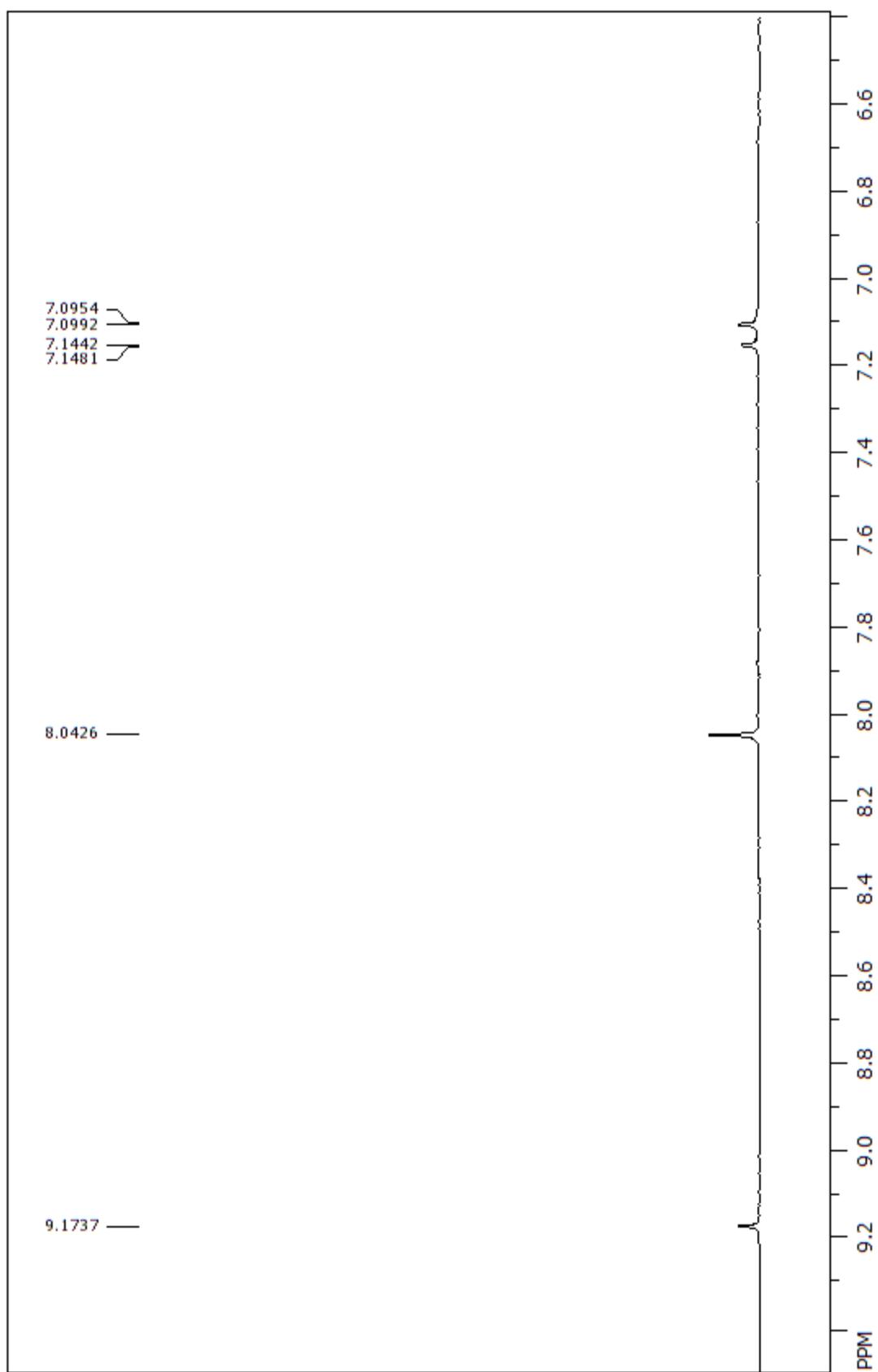


Figura 31: Espectro de RMN ^1H de Ha-Fr C18 – 10 ampliado na região aromática [500 MHz δ $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1)].

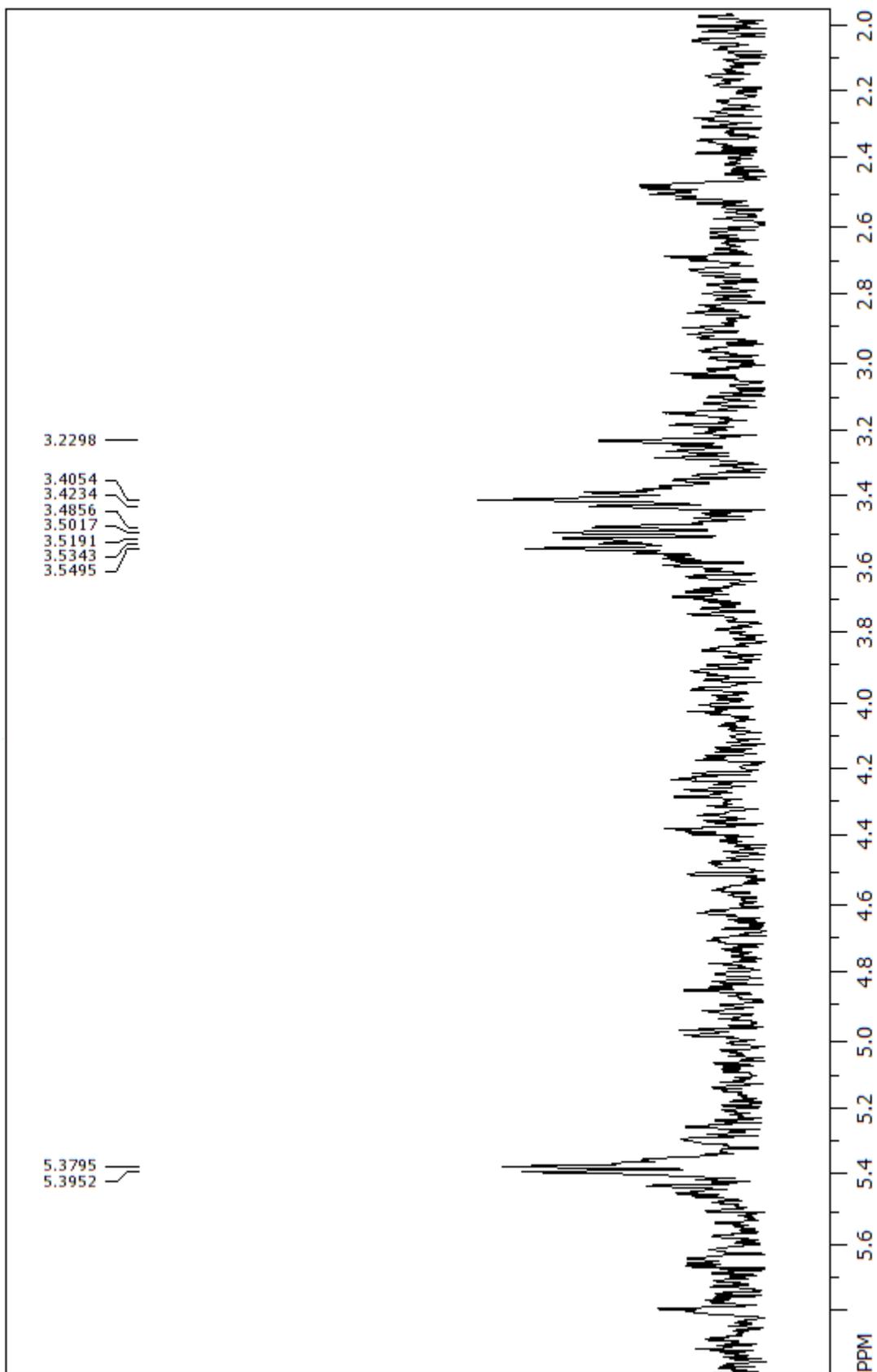


Figura 32: Expansão do espectro de RMN tocsy-1d do H-1' da Ha-Fr C18 – 10 [500 MHz δ CD₃SOCD₃ / CF₃COOD (19:1)].

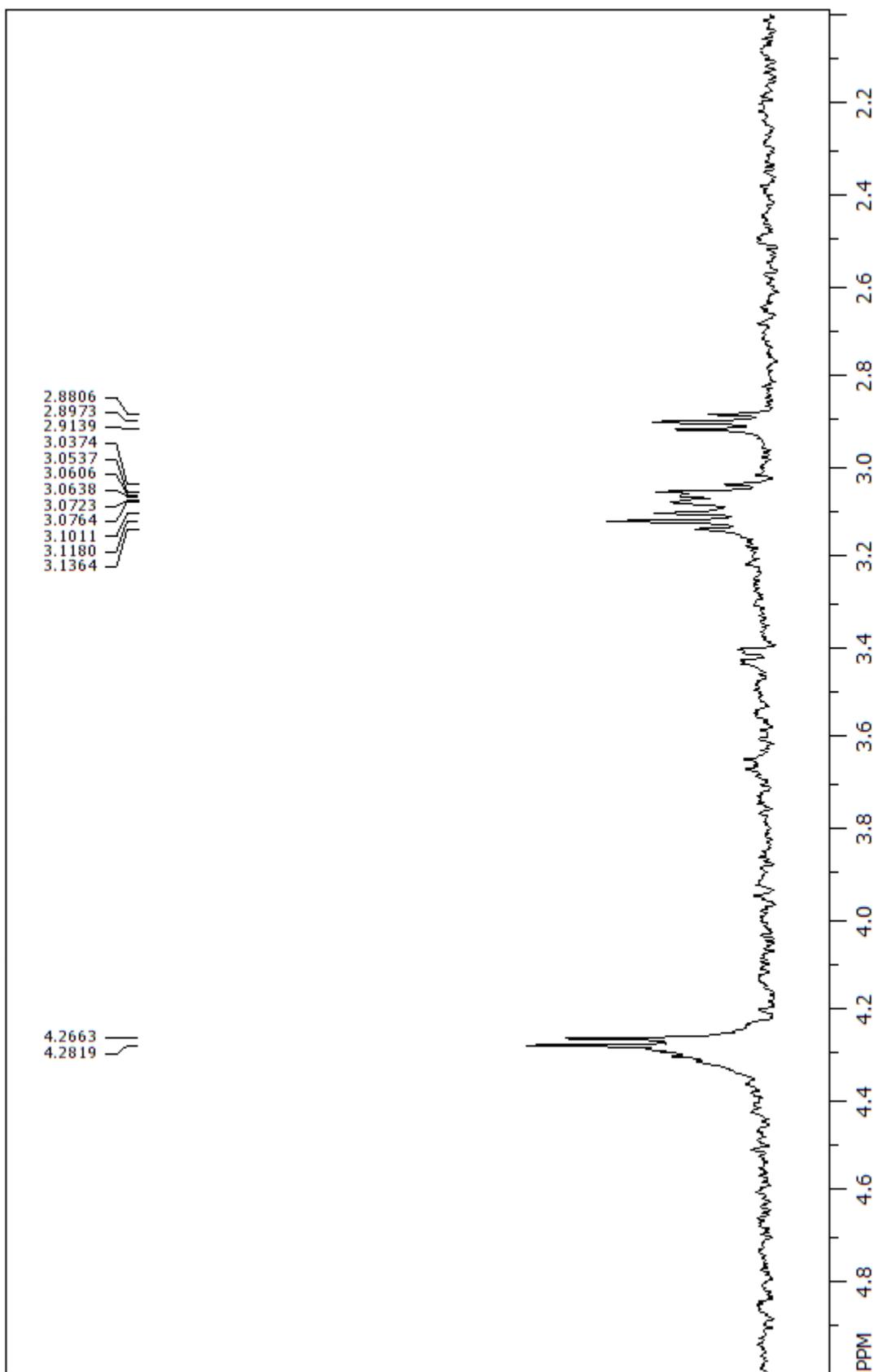


Figura 33: Expansão do espectro de RMN tocsy-1d do H-1^m da Ha-Fr C18 – 10 [500 MHz δ CD₃SOCD₃ / CF₃COOD (19:1)].

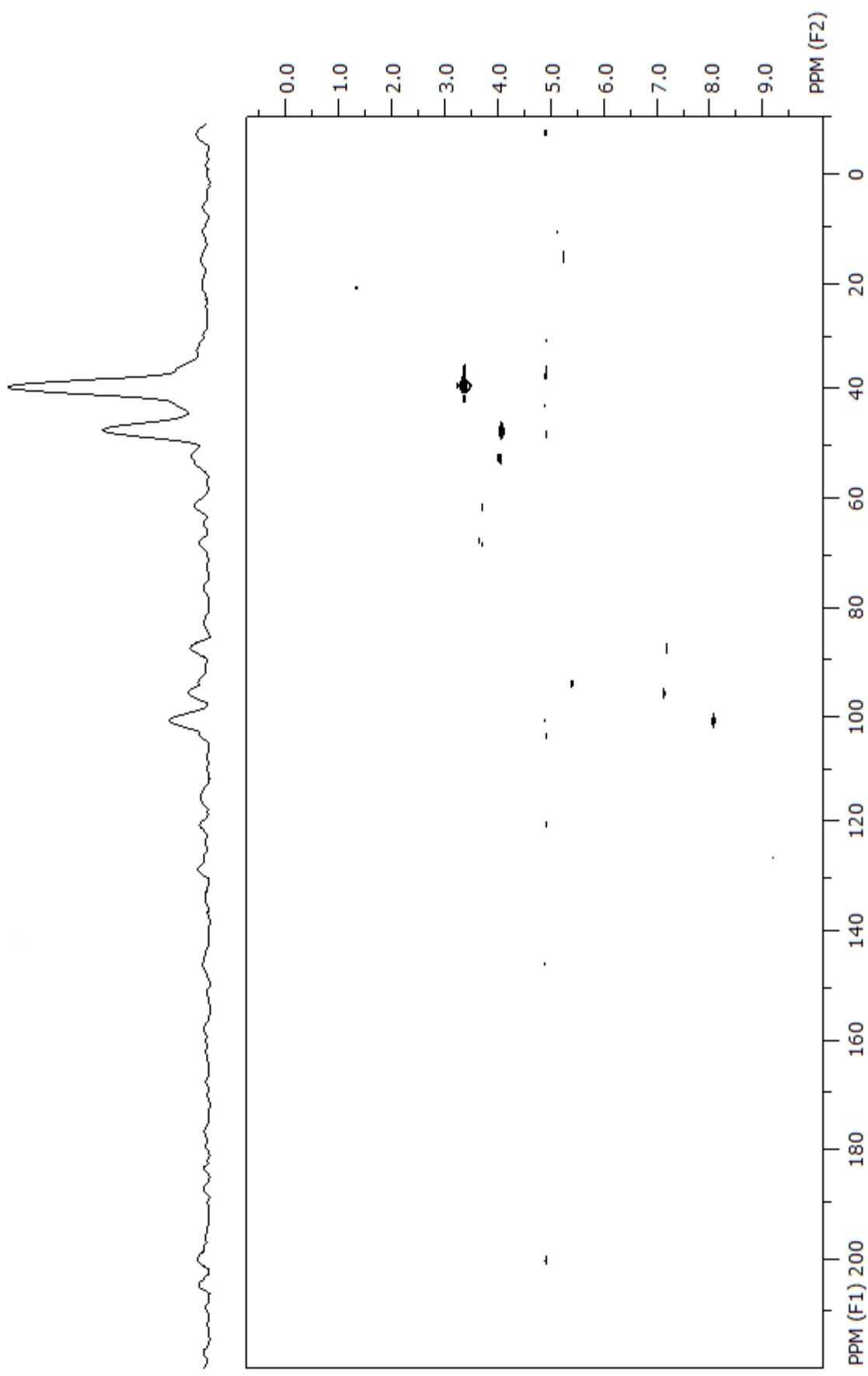


Figura 34: Espectro de gHMBC da Ha-Fr C18 – 10 [500 MHz δ CD₃OD / CF₃COOD (19:1)].

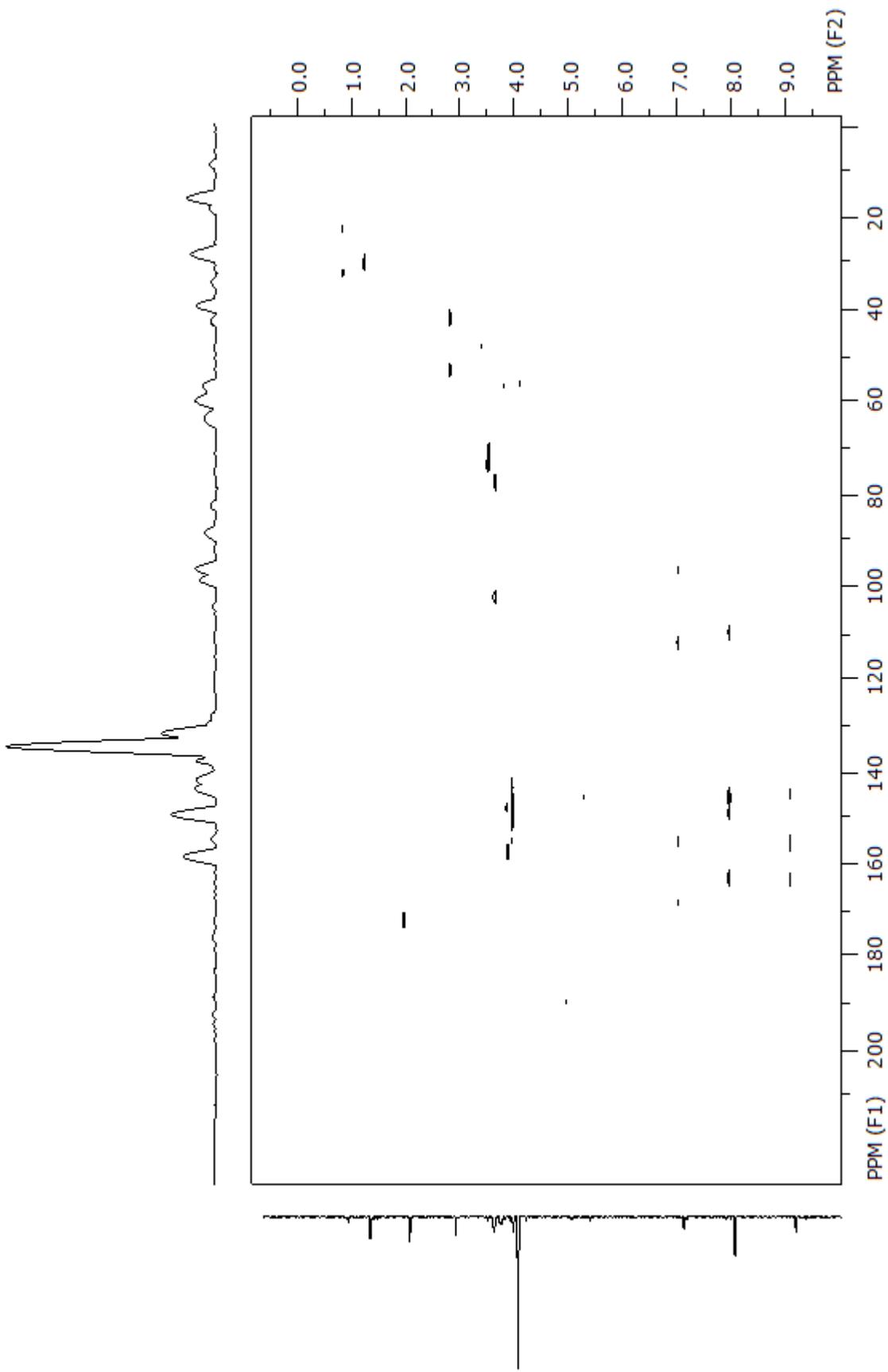


Figura 35: Espectro de gHMBC da Ha-Fr C18 – 10 [500 MHz δ CD₃OD / CF₃COOD (19:1)].

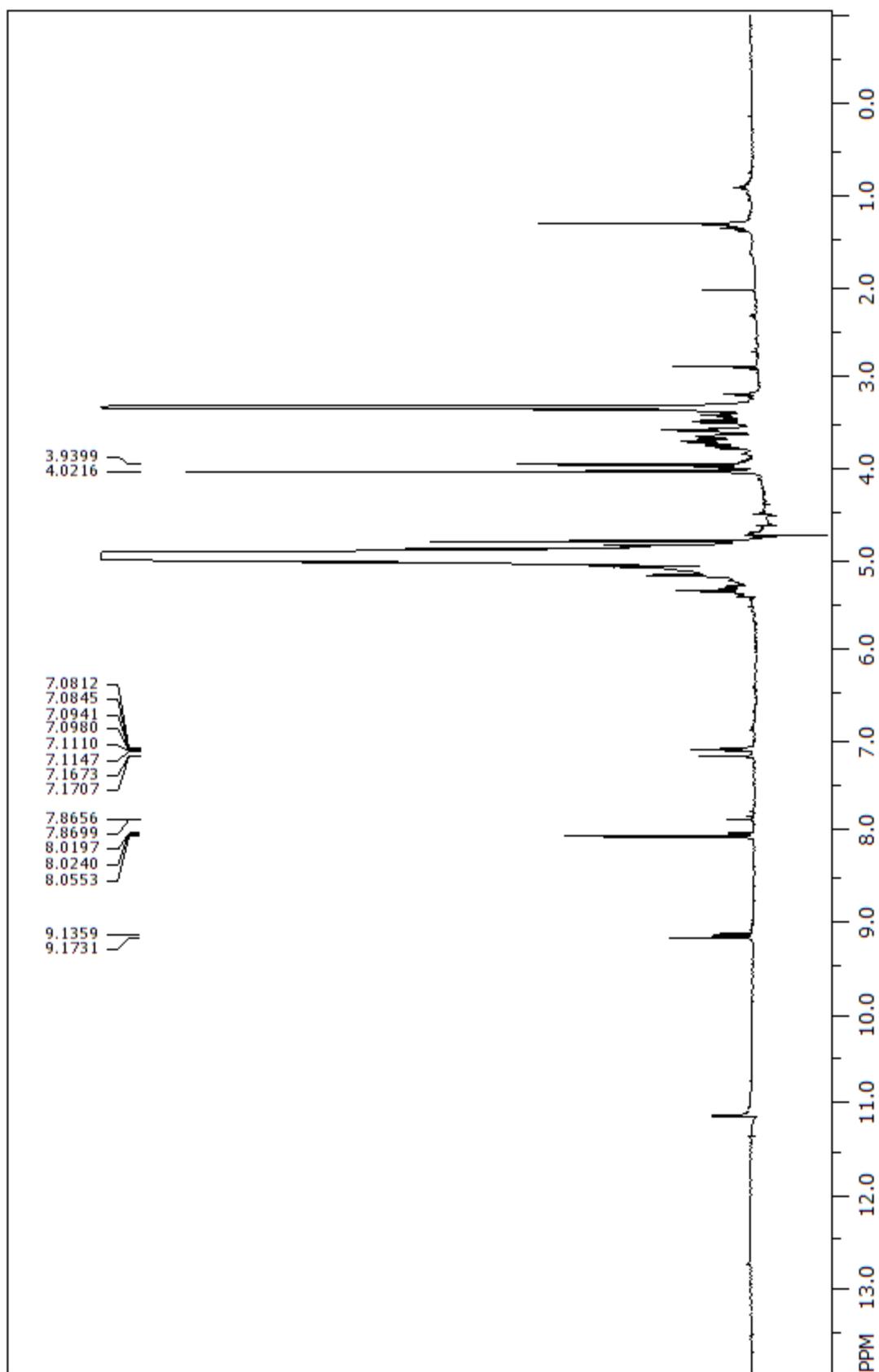


Figura 38: Espectro de RMN ^1H de Ha-Fr C18 – 6 [500 MHz δ $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1)].

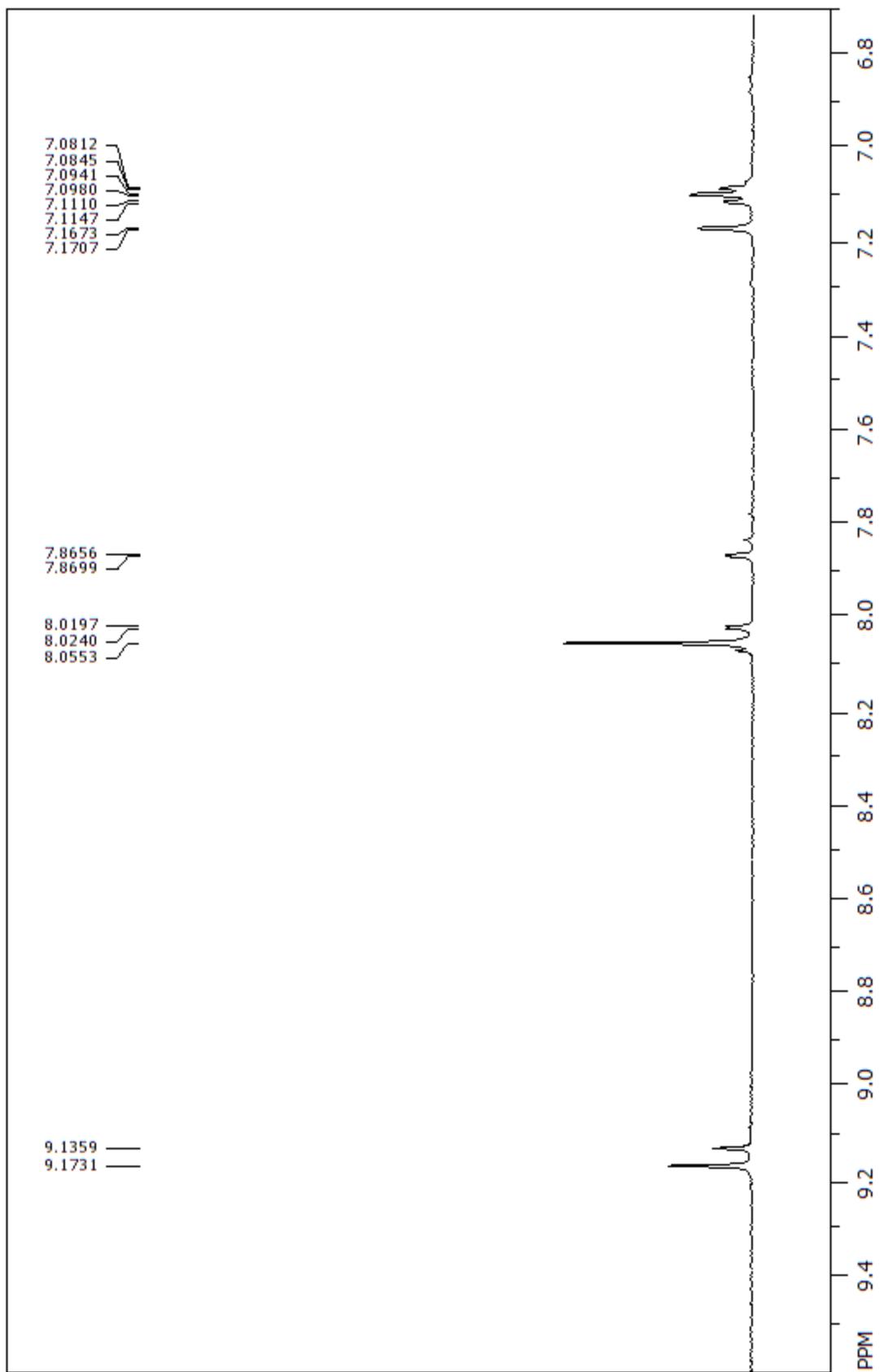


Figura 39: Espectro de RMN ^1H de Ha-Fr C18 – 6 ampliado na região aromática [500 MHz δ $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1)].

ANEXO B

Dados Curriculares

Alessandra Cristina Dametto

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Alessandra Cristina Dametto
Nascimento 22/07/1983 - Araraquara/SP - Brasil
CPF 32900011809

Formação Acadêmica/Titulação

- 2008** Mestrado em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
Título: Estudo químico, atividade antioxidante e biológica de Eugenia jambolana
Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2003 - 2007** Graduação em Licenciatura em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
Orientador: Clóvis Augusto Ribeiro
Bolsista do(a): Fundação de Apoio à Ciência, Tecnologia e Educação
-

Formação complementar

- 2008 - 2008** Curso de curta duração em A import. téc. acopladas p/ desc. de novas moléc..
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Controle de Qual. de Mat. Primas de origem Vegetal.
XV Congresso Paulista de Farmacêuticos, CRF-SP, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Registro de Medicamentos da União Européia.
XV Congresso Paulista de Farmacêuticos, CRF-SP, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Incerteza da Medição em Calibração e Ensaios.
Conselho Regional de Química - IV Região - SP/MS, CRQ, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Elaboração de Resumos.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Química Forense.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Biotec. e QM no Combate às Doenças Trop..
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Jogos Didáticos.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Aproveitando cores para ensinar e aprender

	Química. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Reciclagem de Papel. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Vizualizando conceitos químicos em sala de aula. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Biotec. Anaeróbica no Trat. de Resíduos Químicos. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Florais de Back. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Saneamento Ambiental: Água, Esgoto e Meio Ambiente. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta duração em Utilização de proc. biotec. p/ remoção de metais. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta duração em Produção de Proteínas de Interesse Biotecnológico. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta duração em O cotidiano do Ensino Médio. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ, UNESP, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IQ - UNESP

Vínculo institucional

2008 - 2010	Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Mestrado em Química , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva
2004 - 2008	Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 24, Regime: Parcial
2004 - 2004	Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Monitoria em Cálculo Diferencial e Integral , Carga horária: 10, Regime: Parcial
2003 - 2004	Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Bolsista BAE , Carga horária: 10, Regime: Parcial

Atividades

2008 - 2010	Projetos de pesquisa, UNESP, Instituto de Química <i>Participação em projetos: Estudo químico, atividade antioxidante e biológica de Eugenia jambolana</i>
--------------------	---

Projetos

2008 - 2010 Estudo químico, atividade antioxidante e biológica de *Eugenia jambolana*
Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa
Integrantes: Alessandra Cristina Dametto (Responsável); ;
Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SANTOS, A. F., POLESE, L., RIBEIRO, C. A., ERNANDES, J. R., DAMETTO, A. C., Mangili, Lilian Silveira, KESSERLINGH, 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.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. DAMETTO, A. C., PEREIRA, C. M. M., SILVA, D. H. S., LOPES, N. P., TOMAZ, J. C.
Antioxidant Anthocyanins from the fruits and Antimalarial Extracts from the Leaves of *Eugenia jambolana* (Myrtaceae) In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) and XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM), 2009, São Pedro.
2nd BCNP and XXVIII RESEM. , 2009. v.Único.

2. PEREIRA, C. M. M., DAMETTO, A. C., PAULETTI, P. M., SILVA, M. A., NASSER, A. L. M., SILVA, D. H. S.
Estudo Fitoquímico e das Atividades Antioxidante e Antimalárica de *Myrciaria cauliflora* Berg. (Myrtaceae) In: 56ª Jornada Farmacêutica da UNESP, 2009, Araraquara.
56ª Jornada Farmacêutica da UNESP. , 2009.

3. PEREIRA, C. M. M., DAMETTO, A. C., PAULETTI, P. M., SILVA, M. A., NASSER, A. L., SILVA, D. H. S.
Estudo Fitoquímico e das Atividades Antioxidante e Antimalárica de *Myrciaria cauliflora* Berg. (Myrtaceae) In: 17º Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009, Araraquara.
17º Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti - Bioenergia. , 2009. v.Único.

4. DAMETTO, A. C., POLESE, L., VIEIRA-JUNIOR, G. M., SILVA, D. H. S.
Identificação de Triterpenos e Esteróides de folhas e frutos de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae) usando CG-DIC In: 17º Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009, Araraquara.
17º Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti - Bioenergia. , 2009. v.Único.

5. PEREIRA, C. M. M., DAMETTO, A. C., PAULETTI, P. M., SILVA, M. A., NASSER, A. L. M., SILVA, D. H. S.
Phytochemical Study and Evaluation of the Antioxidant and Antimalarial Activity of *Myrciaria cauliflora* Berg. (Myrtaceae) In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) and

XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM), 2009, São Pedro.

2nd BCNP and XXVIII RESEM. , 2009. v.Único.

6. DAMETTO, A. C., SILVA, M. A., NASSER, A. L., PEREIRA, C. M. M., SILVA, D. H. S. Separation of Anthocyanins from *Eugenia jambolana* by High-Speed Countercurrent Chromatography and Screening for Antioxidant Activity In: 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2009, Ribeirão Preto.

Biodiversity in the technological and health development. , 2009. v.Único.

7. Mangili, Lilian Silveira, POLESE, L., DAMETTO, A. C., ERNANDES, J. R., RIBEIRO, C. A. Determinação de Praziquantel e Febantel em Formulações de Uso Veterinário In: Congresso Latino Americano de Cromatografia (COLACRO XII), 2008, Florianópolis.

COLACRO XII. , 2008.

8. Mangili, Lilian Silveira, POLESE, L., DAMETTO, A. C., ERNANDES, J. R., CILLI, E. M., RIBEIRO, C. A.

Determination of Oxytocin in Medications of Veterinary Use In: 6º International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2007

CIFARP 2007 6º International Congress of Pharmaceutical Sciences. , 2007.

9. DAMETTO, A. C., POLESE, L., Mangili, Lilian Silveira, ERNANDES, J. R., RIBEIRO, C. A. VALIDATION OF A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF OXYTETRACICLINE IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS In: 6º International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2007, Ribeirão Preto.

CIFARP 2007 6º International Congress of Pharmaceutical Sciences. , 2007.

10. DAMETTO, A. C., CAVICCHIOLI, M., MASSABNI, Antonio Carlos SÍNTESE E ESTUDOS PRELIMINARES DE UM COMPLEXO DE Pt(II) COM TIAMINA In: XIV Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, 2006

Anais de Eventos da UFSCar. , 2006. v.2.

11. GUILHERME, Luciana Rebelo, MASSABNI, Antonio Carlos, CASTELLANO, E. E., SUMAN, A., DAMETTO, A. C.

Preparation and Crystal Structure of a New Decavanadate In: XII BRAZILIAN MEETING ON INORGANIC CHEMISTRY (XII BMIC) II JOINT BRAZILIAN/ITALIAN INORGANIC CHEMISTRY MEETING, 2004

XII BRAZILIAN MEETING ON INORGANIC CHEMISTRY (XII BMIC) II JOINT BRAZILIAN/ITALIAN INORGANIC CHEMISTRY MEETING. , 2004.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. DAMETTO, A. C., FERNANDES, D. C., SKRZEK, S. C. G., SILVA, D. H. S. Perfil Cromatográfico po HPLC-DAD e Atividade Biológica dos Extratos dos Frutos de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae) In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza.

Químicos para uma potência emergente. , 2009. v.Único.

2. DAMETTO, A. C., MASSABNI, Antonio Carlos, CAVICCHIOLI, M., CRESPI, M. S. Síntese e caracterização de complexos de Pt(II) com tiamina In: XVIII CIC Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2006, Bauru.

XVIII CIC Congresso de Iniciação Científica. , 2006.