



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

RAQUEL MARIA FERREIRA DE SOUSA

ESTUDO QUÍMICO DE *Eugenia calycina* Cambess E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E INIBIDORA DE ALFA-
AMILASE

UBERLÂNDIA

2015

RAQUEL MARIA FERREIRA DE SOUSA

ESTUDO QUÍMICO DE *Eugenia calycina* Cambess E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E INIBIDORA DE ALFA-
AMILASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Sérgio A. L. de Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

UBERLÂNDIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S725e
2015 Sousa, Raquel Maria Ferreira de, 1981-
 Estudo químico de Eugenia calycina Cambess e avaliação das
 atividades antimicrobiana, antioxidante e inibidora de alfa-amilase /
 Raquel Maria Ferreira de Sousa. - 2015.
 222 f. : il.

Orientador: Sérgio Antônio Lemos de Moraes.
Coorientador: Alberto de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Antioxidantes - Teses. 3. Amilase - Teses. 4.
Flavonoides - Teses. I. Moraes, Sérgio Antônio Lemos de. II. Oliveira,
Alberto de. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Química. IV. Título.

RAQUEL MARIA FERREIRA DE SOUSA

ESTUDO QUÍMICO DE *Eugenia calycina* Cambess E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E INIBIDORA DE ALFA-
AMILASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Uberlândia, 20 de fevereiro de 2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Sérgio A. L. de Morais
(Orientador – UFU)

Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago
(Examinador – UNIFESP)

Prof. Dr. Antônio Jacinto Demuner
(Examinador – UFV)

Prof. Dr. Hugo de Souza Rodrigues
(Examinador – UFU)

Prof. Dr. Welington de Oliveira Cruz
(Examinador – UFU)



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 34/COPGQ.

DATA: 20/2/2015

DISCENTE: Raquel Maria Ferreira de Sousa

MATRÍCULA: 11113QMI005

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo químico de Eugenia calycina Cambess e avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e inibidora de alfa-amilase.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química dos Produtos Naturais

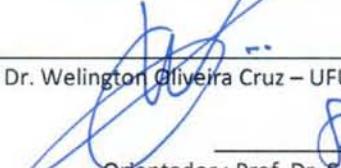
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Análise fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de Eugenia calycina (pitanga-do-cerrado).

Às quatorze horas do dia vinte de fevereiro do ano dois mil e quinze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, no Bloco 51, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Antônio Jacinto Demuner, da Universidade Federal de Viçosa e João Henrique Ghilardi Lago, da Universidade Federal de São Paulo; Welington Oliveira Cruz e Hugo de Souza Rodrigues, da Universidade Federal de Uberlândia e Sérgio Antônio Lemos de Moraes, professor orientador e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Regulamentar nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será O mesmo

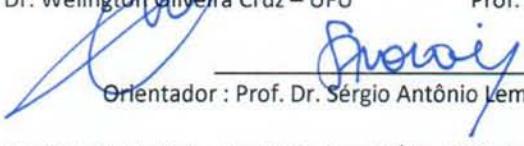
Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 18 horas e 51 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Antônio Jacinto Demuner – UFU


Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago – UNIFESP


Prof. Dr. Welington Oliveira Cruz – UFU


Prof. Dr. Hugo de Souza Rodrigues – UFU


Orientador : Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes – UFU

A Deus.

Aos meus amados pais, Albertino e Maria.

Às minhas irmãs e grandes amigas, Paula e Isabel.

Ao meu querido esposo, Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. Sérgio A. L. Moraes, pela orientação, ensinamentos, confiança e incentivo.

Ao professor Dr. Alberto de Oliveira, pela coorientação, pelas imensas ajudas e sugestões, pela paciência, pelos ensinamentos e amizade.

Ao professor Dr. Evandro A. do Nascimento, pela importante contribuição e ensinamentos.

Aos demais professores do NuPPeN (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais) do Instituto de Química da UFU, Dr. Roberto Chang, Dr. Francisco J. T. de Aquino e Dr. Marcos Pivatto pelos ensinamentos durante as reuniões e pelo auxílio no laboratório.

Ao professor Dr. Ricardo R. Soares da Engenharia Química da UFU pela utilização do CG-EM.

Às professoras Dra. Valeska B. Guzman e Dr. Danielle R. Napolitano e a aluna Raissa B. K. Vieira do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU, pelas análises de citotoxicidade.

Ao professor Dr. Foued S. Espindola e a pós-doc Dra. Neire M. Gouveira, do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, pelas análises de inibição da enzima α -amilase.

Ao professor Dr. Carlos H. G. Martins, do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da UNIFRAN, pelas análises antibacterianas.

Ao professor Dr. Thiago R. L. C. Paixão, do Instituto de Química da USP, pelas análises de RMN.

Ao professor Dr. Claudio Di Vitta do Instituto de Química da USP, pela utilização do polarímetro.

Às alunas de iniciação científica, Daiane M. de Oliveira e Mariana F. Carrijo que me auxiliaram neste trabalho; Ana C. C. Araújo e Tiara C. Silva que participaram em outros trabalhos desenvolvidos paralelamente.

Aos amigos do NuPPeN: Luis, Mário, Carla, Rose, Bruno, Fabiana, Edmilson, Kelly, Rodrigo e Yuri, pelo companheirismo, amizade e ajuda.

Aos meus pais, Albertino e Maria, pelo grande carinho e dedicação à minha formação.

Às minhas irmãs, Paula e Isabel, pelo apoio e carinho.

Ao meu esposo, Rodrigo A. A. Munoz, por todo carinho, ajuda e imensa paciência que teve durante o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida e a FAPEMIG por apoio a projetos relacionados ao trabalho.

E por fim, ao Instituto de Química da UFU e ao seu Programa de Pós-Graduação em Química, que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A química de produtos naturais se destaca na busca por moléculas bioativas como alternativa terapêutica contra bactérias e a substituição dos produtos sintéticos por naturais que podem ser utilizados como conservantes em alimentos e também como inibidores de enzimas digestivas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivos: identificar a composição química do óleo essencial (OE) da *Eugenia calycina*, determinar a sua atividade antimicrobiana contra bactérias da cavidade bucal, avaliar a atividade antioxidante e inibidora de α -amilase de extratos de folhas, flores e galhos e identificar compostos responsáveis por essas atividades. A composição química do OE foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). Sesquiterpenos oxigenados e não oxigenados foram identificados. O espatulenol (21,36%), o biciclogermacreno (19,30%) e o β -cariofileno (8,57%) foram os compostos majoritários. O OE foi fracionado e submetido à análise da atividade antimicrobiana com bactérias da cavidade bucal. O OE e a fração 1 (composta de apenas sesquiterpenos não oxigenados) apresentaram elevada atividade antibacteriana (concentração inibitória mínima, CIM, de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra *Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis*. As frações 3 e 4 (compostas por sesquiterpenos oxigenados) apresentaram elevada atividade (CIM's entre 200 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para a maioria das bactérias testadas (exceto a *Actinomyces naeslundii*). O OE e suas frações apresentaram baixa toxicidade para células HeLa. Os extratos das folhas, galhos e flores apresentaram teores de fenóis totais e proantocianidinas elevados, fato que justifica a elevada atividade antioxidante ($\text{CE}_{50} < 50 \mu\text{g mL}^{-1}$) determinada pelo método de sequestro do radical DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoleico. Os extratos foram fracionados por partição líquido-líquido. Através da voltametria por pulso diferencial (VPD) foi verificado que as frações com maior atividade antioxidante (acetato de etila e *n*-butanol) apresentaram maior carga e, portanto, maior concentração de compostos com atividade antioxidante. A prospecção química, o espectro de UV/Vis e a análise do teor de flavonoides revelaram a presença de flavonoides do tipo flavonóis na composição das folhas e flores, enquanto que os galhos apresentaram proantocianidinas e flavan-3-ois. As frações acetato de etila e *n*-butanol apresentaram elevada atividade inibidora da α -amilase, fato que está correlacionado

ao elevado teor de compostos fenólicos. A fração acetato de etila das folhas foi submetida à cromatografia em coluna sendo isolados e identificados (por UV-Vis, RMN e ESI-EM/EM) os flavonoides rutina, isoquercitrina e quercitrina e o flavan-3-ol (-)-epicatequina. Estes compostos apresentaram elevada atividade antioxidante e inibidora da α -amilase, que são os responsáveis pela atividade observada nos extratos. Através da análise de desreplicação por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-ESI-EM/EM) foi possível identificar a presença das procianidinas B2 e C1 na fração acetato de etila das folhas. Além disso, a fração acetato de etila das flores apresentou os mesmos compostos isolados nas folhas, enquanto que para os galhos foi verificada apenas a presença da epicatequina e das procianidinas B2 e C1. Os compostos isolados das folhas foram quantificados por CLAE. As folhas apresentaram elevada concentração de quercitrina e epicatequina na fração acetato de etila e de rutina na fração *n*-butanol. As flores apresentaram elevada concentração de quercitrina e rutina nas frações acetato de etila e *n*-butanol. Os galhos apresentaram elevada concentração de epicatequina na fração acetato de etila. Assim a *E. calycina* se mostra muito promissora para possíveis fármacos e fitoterápicos.

Palavras-chave: Antioxidantes. α -Amilase. Myrtaceae. *Eugenia calycina*. Flavonoides.

ABSTRACT

The chemistry of natural products is highlighted in the search for alternative therapy against bacteria and the replacement of synthetic products by natural ones, such as natural antioxidants, which can be used as preservatives in foods and as digestive enzyme inhibitors. In this context, this study aimed to identify the chemical composition of the essential oil (EO) of *Eugenia calycina*, determine its antimicrobial activity against oral cavity bacteria, evaluate the antioxidant capacity and α -amylase inhibitory activity of the extracts of leaves, flowers and branches from this species and identify some compounds responsible for these activities. The EO chemical composition was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Oxygenated and non-oxygenated sesquiterpenes were identified. The major compounds were spathulenol (21.36%), bicyclogermacrene (19.30%) and β -caryophyllene (8.57%). The EO was fractionated and submitted to analysis of antimicrobial activity with oral cavity bacteria. The EO and fraction 1 (containing only non-oxygenated sesquiterpenes) showed strong antibacterial activity (minimum inhibitory concentration, MIC, of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) against *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella nigrescens*. Fractions 3 and 4 (containing oxygenated sesquiterpene) showed strong activity (MIC's between 50 and 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for most bacteria tested (except the *Actinomyces naeslundii*). The EO and its fractions presented low toxicity to HeLa cells. Extract of the leaves, flowers and branches presented high concentration of the total phenolic content and proanthocyanidins, what justifies the high antioxidant capacity ($\text{EC}_{50}<50 \mu\text{g mL}^{-1}$) determined by DPPH scavenging method and α -carotene /linoleic acid system. The extracts were fractionated by liquid-liquid partition. By differential pulse voltammetry analysis (DPV) it was found that the fractions (ethyl acetate and *n*-butanol) with stronger antioxidant activity exhibited a high amount of charge and thus high concentration of compounds with antioxidant capacity. The chemical prospecting, the UV/Vis spectrum analysis and the flavonoid content showed the presence of flavonoids of the flavonols type in the composition of leaves and flowers, whereas branches showed proanthocyanidin and flavan-3-ols. Ethyl acetate and *n*-butanol fraction showed high α -amylase inhibitory activity, and this fact is correlated to the high phenolic compounds content. The ethyl acetate fraction of the leaves was subjected to column chromatography in which

flavonol rutin, isoquercitrin and quercitrin, and flavan-3-ol (-)-epicatechin were isolated and identified (by UV-Vis, NMR and ESI-MS/MS). These compounds showed high antioxidant capacity and α -amylase inhibitory activity, which are the responsible for the activity observed in the extracts. Through dereplication analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometer (HPLC-ESI-MS/MS), it was possible to identify the presence of B2 and C1 procyanidins in the ethyl acetate fraction of the leaves. Furthermore, the ethyl acetate fraction of the flowers showed the same compounds isolated in the leaves, while the branches found to be only the presence of epicatechin, B2 and C1 procyanidins. The compounds isolated were quantified by HPLC. Leaves showed high concentration of quercitrin and epicatechin in the ethyl acetate fraction and rutin in the *n*-butanol fraction. The flowers exhibited high concentration of quercitrin and rutin in the ethyl acetate and *n*-butanol fractions. The branches showed high concentration of epicatechin in the ethyl acetate fraction. Thus, *E. calycina* is very promising to develop possible drugs and herbal medicines.

Keywords: Antioxidant. α -Amilase. Myrtaceae. *Eugenia calycina*. Flavonoid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Origem dos fármacos lançados entre 1981-2010.....	21
Figura 2 - Estruturas das moléculas de alguns fármacos lançados entre 1981-2010.....	22
Figura 3 - Estrutura da tese.....	26
Figura 4 - Fluxograma simplificado das rotas metabólicas para compostos fenólicos, alcaloides e terpenoides.....	28
Figura 5 - Estrutura de alguns terpenos.....	29
Figura 6 - Via do ácido mevalônico para a produção de DMAP e IPP.....	30
Figura 7 - Via do metileritritol fosfato para a produção de DMAP e IPP.....	31
Figura 8 - Reação entre DMAP e IPP para a formação de terpenos.....	31
Figura 9 - Rearranjo de carbocátions que resultam em diferentes monoterpenos.....	32
Figura 10 - Vias metabólicas de síntese dos compostos fenólicos.....	32
Figura 11 - Estruturas de ressonância (a) e quelatação de metais (b) em flavonoides.....	35
Figura 12 - Reação da síntese de flavonoides.....	36
Figura 13 - Mecanismo de formação dos flavonoides.....	36
Figura 14 - Estrutura de taninos condensados e hidrolisáveis.....	37
Figura 15 - Exemplos de alcaloides.....	38
Figura 16 - Mecanismos de síntese dos alcaloides: a) derivado de arginina, b) derivado de tirosina e c) derivado de triptofano.....	39
Figura 17 - Fluxograma com a classificação da família Myrtaceae proposta pela APG.....	40
Figura 18 - Estruturas dos compostos isolados mostrados na Tabela 5.....	43
Figura 19 - Fotografias de frutos e flores da espécie <i>E. calycina</i>	44
Figura 20 - Oxidação lipídica: (a) fases do processo; (b) algumas reações.....	47
Figura 21 - Exsicata da <i>E. calycina</i> depositada no Herbário Uberlandenses.....	53
Figura 22 - Fluxograma do processo de partição líquido-líquido.....	59
Figura 23 - Esquema da célula eletroquímica utilizada.....	65
Figura 24 - Fluxograma do processo de isolamento de compostos bioativos na fração acetato de etila do extrato das folhas.....	68
Figura 25 - Perfil cromatográfico óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i> e de suas frações.....	77
Figura 26 - Espectro de massa do β-cariofileno: a) obtido da análise por CG-EM; b) biblioteca Wiley229.....	81
Figura 27 - Propostas de fragmentações do β-cariofileno.....	82
Figura 28 - Espectro de massa do biciclogermacreno: a) obtido da análise por CG-EM; b) biblioteca Wiley229.....	83
Figura 29 - Propostas de fragmentações do biciclogermacreno.....	84
Figura 30 - Espectro de massa do espatuleno: a) obtido da análise por CG-EM; b) biblioteca Wiley139.....	85
Figura 31 - Propostas de fragmentações do espatuleno.....	86
Figura 32 - Fórmula estrutural dos compostos identificados no óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i> e suas frações.....	89
Figura 33 - Proposta de rotas biossintéticas de sesquiterpenos no óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i> e suas frações.....	92
Figura 34 - Rendimento da partição líquido-líquido dos extratos de folhas, galhos e flores da <i>E. calycina</i>	98

Figura 35 - Reação entre o ácido gálico e o íon molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteau.	99
Figura 36 - Reação entre vanilina e um tanino catéquico.	101
Figura 37 - Mecanismo de reação entre a vanilina e um monômero do tanino catéquico em meio ácido.	102
Figura 38 - Estruturas de ressonância do ácido gálico (a), elágico (b) e tanino catéquico (c).	103
Figura 39 - Complexação de um flavonoide com AlCl_3	105
Figura 40 - Sistema de conjugação cinamoil e benzoil em flavonoides.	107
Figura 41 - Coeficiente de correlação entre as análises de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides das folhas, galhos e flores.	110
Figura 42 - Autovalores da matriz de covariância.	111
Figura 43 - Análise da componente principal das análises do teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides das frações dos extratos das folhas, galhos e flores.	111
Figura 44 - Reação entre um flavonoide e o reagente difenilboriloxetilamina (NP).	114
Figura 45 - Espectro de UV-VIS (200-600 nm) das frações acetato de etila e <i>n</i> -butanol do extrato das folhas, flores e galhos da <i>E. calycina</i>	115
Figura 46 - Estruturas de ressonância do radical fenoxila.	116
Figura 47 - Mecanismo de reação entre o radical DPPH e os compostos fenólicos.	117
Figura 48 - Espectro de absorção do radical DPPH e da hidrazina formada.	118
Figura 49 - Esquema representativo do cálculo do CE_{50}	119
Figura 50 - Coeficiente de correlação entre os métodos DPPH, fenóis totais (FT), flavonoides (Flav) e proantocianidinas (P).	122
Figura 51 - Voltametria por pulso diferencial: a) perfil da aplicação de potenciais em pulso, b) voltamograma.	123
Figura 52 - Reação de oxidação da quercetina.	124
Figura 53 - Coeficiente de correlação entre os métodos de voltametria por pulso diferencial (VPD), DPPH, fenóis totais (FT), flavonoides (Flav) e proantocianidinas (P).	126
Figura 54 - Análise da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico: a) oxidação do ácido linoleico gerando radical hidroxila; b) formação de radical na estrutura do β -caroteno; b) estruturas de ressonância estabilizadoras do radical no β -caroteno.	127
Figura 55 - Coeficiente de correlação entre a atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, sequestro do radical DPPH, teor de fenóis totais (FT), proantocianidinas (P) e flavonoides (Flav).	129
Figura 56 - Substrato GalG2-CNP: estrutura (a) e hidrólise (b).	131
Figura 57 - Mecanismo proposto de clivagem da ligação glicosídica pelo sítio ativo da enzima α -amilase.	133
Figura 58 - Estrutura da acarbose.	134
Figura 59 - Rendimentos do processo de isolamento de compostos das folhas.	136
Figura 60 - Estrutura da rutina.	137
Figura 61 - Espectro de UV-VIS (200-600 nm) do composto isolado FoE98-AE-C1.	137
Figura 62 - Complexação de um flavonoide com H_3BO_3	138
Figura 63 - Grupos presentes no composto isolado FoE98-AE-C1.	140
Figura 64 - Fragmentação observada no espectro de massas (modo negativo) do composto isolado FoE98-AE-C1.	140

Figura 65- Espectro de RMN de ^1H na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C1.	141
Figura 66 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de <i>g</i> HSQC (b) na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C1.	142
Figura 67 - Correlações H-H observadas no mapa de contorno de <i>g</i> COSY para os hidrogênios glicosídicos do composto FoE98-AE-C1.	143
Figura 68 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de <i>g</i> HSQC (b) na região de hidrogênios anoméricos (C1'' e C1''') e de hidrogênio do carbono 6'' (glicose) do composto isolado FoE98-AE-C1.	144
Figura 69 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de <i>g</i> HMBC (b) na região de hidrogênios anoméricos do composto isolado FoE98-AE-C1.	145
Figura 70 - Estrutura da isoquercitrina.	148
Figura 71 - Espectro de UV-VIS (200-600 nm) do composto isolado FoE98-AE-C2.	149
Figura 72 - Espectro de RMN de ^1H na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C2.	150
Figura 73 - Espectros de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de <i>g</i> HSQC (b) na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C2.	151
Figura 74 - Correlações H-H observadas no mapa de contorno de <i>g</i> COSY para o hidrogênio glicosídico do composto FoE98-AE-C2.	152
Figura 75 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de <i>g</i> HSQC (b) na região do hidrogênio do carbono 6'' do composto isolado FoE98-AE-C2.	153
Figura 76 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de <i>g</i> HMBC (b) na região do hidrogênio anomérico do composto isolado FoE98-AE-C2.	154
Figura 77 - Estrutura da quercitrina.	157
Figura 78 - Espectro de UV-VIS (200-600 nm) do composto isolado FoE98-AE-C3.	157
Figura 79 - Espectro de RMN de ^1H na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C3.	159
Figura 80 - Espectros de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de <i>g</i> HSQC (b) na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C3.	160
Figura 81 - Correlações H-H observadas no mapa de contorno de <i>g</i> COSY na região de hidrogênios glicosídicos do composto isolado FoE98-AE-C3.	161
Figura 82 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de <i>g</i> HSQC (b) na região de hidrogênios glicosídicos do composto isolado FoE98-AE-C3.	162
Figura 83 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de <i>g</i> HMBC(b) na região do hidrogênio anomérico do composto isolado FoE98-AE-C3.	163
Figura 84 - Estrutura da (-)-epicatequina.	166
Figura 85 - Espectro de UV-VIS (200-600 nm) do composto isolado FoE98-AE-C4.	166
Figura 86 - Fragmentação observada no espectro de massas (modo negativo) do composto isolado FoE98-AE-C4.	168
Figura 87 - Estrutura da (-)-catequina (a) e (-)-epicatequina (b).	169

Figura 88 - Espectro de RMN de ^1H na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C4.....	169
Figura 89 - Espectros de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de gHSQC (b) na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C4.....	170
Figura 90 - Correlações H-H observadas no mapa de contorno de gCOSY na região de hidrogênios glicosídicos do composto isolado FoE98-AE-C4.....	171
Figura 91 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de gHSQC (b) do composto isolado FoE98-AE-C4.....	171
Figura 92 - Cromatograma da análise CLAE-ESI-EM/EM em 280 nm (a) e 360 nm (b) e espectro de massas de alta resolução (c) da fração acetato de etila do extrato das folhas.....	174
Figura 93 - Espectro de massas (a), espectro EM/EM e espectro de UV/Vis (b) do íon molecular dos compostos 1-6 da fração acetato de etila do extrato das folhas.....	175
Figura 94 - Proposta de fragmentação para a procianidina B2 (a) e C1 (b).....	177
Figura 95 - Cromatograma da análise CLAE-ESI-EM/EM em 280 nm (a) e 360 nm (b) e espectro de massas de alta resolução (c) da fração acetato de etila do extrato das flores.....	178
Figura 96 - Espectro de massas (a), espectro EM/EM e espectro de UV/Vis (b) do íon molecular dos compostos 1-6 da fração acetato de etila do extrato das flores.....	179
Figura 97 - Cromatograma da análise CLAE-ESI-EM/EM em 280 nm (a) e 360 nm (b) e espectro de massas de alta resolução (c) da fração acetato de etila do extrato dos galhos.....	181
Figura 98 - Espectro de massas (a), espectro EM/EM e espectro de UV/Vis (b) do íon molecular dos compostos 1, 2 e 3 da fração acetato de etila do extrato dos galhos.....	182
Figura 99 - Proposta de rotas biossintéticas de compostos identificados nas frações acetato de etila e <i>n</i> -butanol de extratos de folhas, flores e galhos de <i>E. calycina</i>	186
Figura 100 - Estruturas de ressonância de radical formado em flavan-3-ol.	188

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos terpenos.....	29
Tabela 2 - Classificação dos compostos fenólicos.....	33
Tabela 3 - Classificação dos flavonoides.....	34
Tabela 4 - Espécies do gênero <i>Eugenia</i> utilizadas na medicina popular.....	41
Tabela 5 - Compostos isolados de espécies de <i>Eugenia</i>	43
Tabela 6 - Faixa de concentração dos extratos/frações das folhas, galhos, e flores utilizadas na análise da atividade antioxidante pelo sequestro de radical DPPH.....	62
Tabela 7 - Faixa de concentração dos extratos/frações das folhas, galhos e flores utilizadas na análise da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	64
Tabela 8 - Faixa de concentração dos extratos/frações das folhas, galhos e flores utilizadas na análise da inibição da enzima α -amilase.....	67
Tabela 9 - Rendimento do processo de extração do óleo essencial por hidrodestilação das folhas de <i>E. calycina</i>	74
Tabela 10 - Rendimento de óleo essencial de outras espécies.....	74
Tabela 11 - Composição química do óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i> e suas frações.....	78
Tabela 12 - Classificação dos compostos presentes no óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i> e suas frações.....	87
Tabela 13 - Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra bactérias da cavidade bucal e viabilidade celular (CC_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$) do óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i> e suas frações.....	93
Tabela 14 - Atividade antimicrobiana de outras espécies de plantas observada na literatura contra as bactérias da cavidade bucal estudadas neste trabalho.....	95
Tabela 15 - Atividade antimicrobiana de alguns compostos presentes no óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i>	95
Tabela 16 - Índice de seletividade do óleo essencial das folhas de <i>E. calycina</i> e suas frações.....	96
Tabela 17 - Rendimento do processo de extração por maceração à temperatura ambiente de folhas, galhos e flores da <i>E. calycina</i>	97
Tabela 18 - Teor de fenóis totais dos extratos de folhas, galhos e flores.....	100
Tabela 19 - Teor de fenóis totais das frações dos extratos de folhas, galhos e flores.....	101
Tabela 20 - Teor de proantocianidinas dos extratos de folhas, galhos e flores.....	104
Tabela 21 - Teor de proantocianidinas das frações dos extratos de folhas, galhos e flores.....	105
Tabela 22 - Teor de flavonoides dos extratos de folhas, galhos e flores.....	106
Tabela 23 - Comprimento de onda das bandas de absorção antes e após a complexação com AlCl_3 de alguns flavonoides.....	107
Tabela 24 - Teor de flavonoides das frações dos extratos de folhas, galhos e flores.....	108
Tabela 25 - Resultados de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides agrupados.....	109
Tabela 26 - Prospecção fitoquímica do extrato e frações das folhas e flores de <i>E. calycina</i>	113
Tabela 27 - Prospecção fitoquímica do extrato e frações dos galhos de <i>E. calycina</i>	113

Tabela 28 - Valores de CE ₅₀ da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH dos extratos de folhas, galhos e flores da <i>E. calycina</i>	119
Tabela 29 - Correlação entre os valores de CE ₅₀ e a intensidade da atividade antioxidante.....	120
Tabela 30 - Valores de CE ₅₀ da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH das frações dos extratos de folhas, galhos e flores da <i>E. calycina</i>	121
Tabela 31 - Potencial de oxidação observado pela voltametria por pulso diferencial dos extratos e frações, analisados em tampão acetato e fosfato.....	125
Tabela 32 - Carga do pico de oxidação observado pela voltametria por pulso diferencial dos extratos e frações, analisados em tampão acetato e fosfato....	125
Tabela 33 - Valores de CE ₅₀ da análise da atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico das frações em acetato de etila, <i>n</i> -butanol e água dos extratos das folhas, galhos e flores.....	128
Tabela 34 - Inibição de α-amilase pelos extratos das folhas, galhos e flores.	131
Tabela 35 - Inibição da α-amilase pelas frações dos extratos das folhas, galhos e flores.	132
Tabela 36 - CE ₅₀ da atividade inibidora da α-amilase pelas frações dos extratos das folhas, galhos e flores.	132
Tabela 37 - Valores de CE ₅₀ da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH das frações da coluna cromatográfica das folhas.....	135
Tabela 38 - Comprimento de onda das bandas de absorção I e II do composto isolado FoE98-AE-C1 em metanol e após a reação com reagentes de deslocamento.....	139
Tabela 39 - Atribuição dos hidrogênios no espectro de RMN de ¹ H do composto isolado FoE98-AE-C1.	146
Tabela 40 - Atribuição dos carbonos no espectro de RMN de ¹³ C do composto isolado FoE98-AE-C1.....	147
Tabela 41 - Comprimento de onda das bandas de absorção I e II do composto isolado FoE98-AE-C2 em metanol e após a reação com reagentes de deslocamento.....	149
Tabela 42 - Atribuição dos hidrogênios no espectro de RMN de ¹ H do composto isolado FoE98-AE-C2.	155
Tabela 43 - Atribuição dos carbonos no espectro de RMN de ¹³ C do composto isolado FoE98-AE-C2.....	156
Tabela 44 - Comprimento de onda das bandas de absorção I e II do composto isolado FoE98-AE-C3 em metanol e após a reação com reagentes de deslocamento.....	158
Tabela 45 - Atribuição dos hidrogênios no espectro de RMN de ¹ H do composto isolado FoE98-AE-C3.	164
Tabela 46 - Atribuição dos carbonos no espectro de RMN de ¹³ C do composto isolado FoE98-AE-C3.....	165
Tabela 47 - Comprimento de onda das bandas de absorção I e II do composto isolado FoE98-AE-C4 em metanol e após a reação com reagentes de deslocamento.....	167
Tabela 48 - Atribuição dos hidrogênios no espectro de RMN de ¹ H do composto isolado FoE98-AE-C4.	172

Tabela 49 - Atribuição dos carbonos no espectro de RMN de ^{13}C do composto isolado FoE98-AE-C4.....	173
Tabela 50 - Dados obtidos da análise da fração acetato de etila do extrato das folhas por CLAE-ESI-EM/EM.....	176
Tabela 51 - Dados obtidos da análise da fração acetato de etila do extrato das flores por CLAE-ESI-EM/EM.....	180
Tabela 52 - Dados obtidos da análise da fração acetato de etila do extrato dos galhos por CLAE-ESI-EM/EM.....	182
Tabela 53 - Parâmetros obtidos da curva analítica construída para epicatequina, rutina, isoquercitrina e quercitrina.....	183
Tabela 54 - Concentração de rutina, isoquercitrina, quercitrina e epicatequina nas frações acetato de etila e <i>n</i> -butanol dos extratos das folhas, galhos e flores.....	183
Tabela 55 - Análise de atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, potencial e carga por VPD, inibição de α -amilase dos compostos isolados da fração acetato de etila do extrato das folhas.....	187

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2-azinobis(3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico)
APG	<i>Angiosperm Phylogeny Group</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHT	2,6-di- <i>terc</i> -Butil-4-metilfenol
CAPES	Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior
CC ₅₀	Concentração citotóxica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE ₅₀	Concentração eficiente
CG-DIC	Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CHD	Dicloridrato de clorexidina
CIM	Concentração inibitória mínima
CNP	2-Cloro-4-nitrofenol
Da	Daltons
DMAP	3,3'-Dimetilalil pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilidrazila
DXP	1-Deoxi-D-xilulose-5-fosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ESI-EM/EM	Espectrometria de massas por ionização <i>electrospray</i>
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FPP	Farnesil pirofosfato
Gal	Galactose
Gal-G2- α -CNP	α -(2-Cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltosídeo
GPP	Geranil pirofosfato
HAT	<i>Hydrogen atom transfer</i>
HMG-CoA	3-Hidróxi-3-metilglutaril-CoA
HSA-f	Fração de saliva enriquecida de α -amilase
IA	Índice aritmético
IPP	3-Isopentenil pirofosfato

IQ	Instituto de Química
IS	Índice de seletividade
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de detecção
LPP	Linalil pirofosfato
LQ	Limite de quantificação
MEP	Metileritriol fosfato
MES	Tampão ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MVA	Mevalonato
NaOAc	Acetato de sódio
NP	Difenilboriloxietilamina
NPP	Neril pirofosfato
OE	Óleo essencial
PBS	Tampão fosfato salino
PEG 4000	Polietilenoglicol 4000
pNPM	<i>p</i> -nitrofenil- α -maltopentoglicosideo
RF	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SPLET	<i>Sequential proton loss electron transfer</i>
<i>t</i> -BHQ	<i>terc</i> -Butil hidroquinona
TBS	Caldo triptona de soja
TMS	Trimetilsilano
TPP	Tiamina difosfato
T _R	Tempo de retenção
Tris-HCl	Cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano
Tween 40	Monopalmitato de polioxietileno sorbitano (40)
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
USP	Universidade de São Paulo
UV/Vis	Ultravioleta/visível
VPD	Voltametria por pulso diferencial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DA TESE	21
1.2	OBJETIVOS.....	25
1.2.1	Objetivo geral.....	25
1.2.2	Metas para atingir os objetivos	25
1.3	ESTRUTURA DA TESE	26
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	27
2.1	METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS VEGETAIS E PRINCIPAIS COMPONENTES BIOSSINTETIZADOS	27
2.1.1	Terpenos.....	28
2.1.2	Compostos fenólicos	32
2.1.3	Alcaloides	38
2.2	<i>Eugenia calycina</i> : CARACTERÍSTICAS DA FAMÍLIA E DO GÊNERO.....	39
2.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA BACTÉRIAS DA CAVIDADE BUCAL ..	44
2.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	46
2.5	ATIVIDADE INIBIDORA DA α -AMILASE	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	52
3.2	REAGENTES E SOLUÇÕES	52
3.3	COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	53
3.4	UMIDADE	54
3.5	ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS	54
3.5.1	Extração do óleo essencial por hidrodestilação	54
3.5.2	Fracionamento do óleo essencial através de cromatografia em coluna.....	54
3.5.3	Análise do óleo essencial por cromatografia gasosa	55
3.5.4	Determinação da atividade antimicrobiana contra bactérias da cavidade bucal ..	55
3.5.4.1	<i>Microrganismos utilizados</i>	55
3.5.4.2	<i>Procedimento de análise da atividade antimicrobiana</i>	56
3.5.5	Determinação da citotoxicidade	57
3.6	EXTRATOS DAS FOLHAS, FLORES E GALHOS.....	58
3.6.1	Preparação dos extratos por maceração.....	58
3.6.2	Partição líquido-líquido dos extratos.....	58
3.6.3	Prospecção fitoquímica dos extratos e frações	59
3.6.4	Determinação do teor de flavonoides	60
3.6.5	Determinação do teor de fenóis totais	61
3.6.6	Determinação do teor de proantocianidinas	61

3.6.7	Determinação da atividade antioxidante.....	62
3.6.7.1	<i>Método do sequestro do radical DPPH</i>	62
3.6.7.2	<i>Método de oxidação pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico</i>	63
3.6.7.3	<i>Voltametria por pulso diferencial</i>	65
3.6.8	Determinação da atividade inibidora de α -amilase.....	66
3.6.8.1	<i>Preparo da fração de saliva enriquecida de α-amilase</i>	66
3.6.8.2	<i>Procedimento de análise da atividade inibidora de α-amilase</i>	66
3.6.9	Isolamento de compostos bioativos através de cromatografia em coluna	68
3.6.10	Análise espectroscópica UV-Vis das frações e substâncias isoladas	69
3.6.11	Análise por espectrometria massas.....	70
3.6.12	Análise de ressonância magnética nuclear	71
3.6.13	Análise por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) utilizada na quantificação dos compostos isolados	72
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	74
4.1	ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS	74
4.1.1	Identificação dos compostos presentes no óleo essencial.....	74
4.1.2	Atividade antibacteriana e citotóxica do óleo essencial.....	93
4.2	EXTRATOS DE FOLHAS, FLORES E GALHOS	97
4.2.1	Rendimento de extração e partição líquido-líquido	97
4.2.2	Análise do teor de fenóis totais.....	99
4.2.3	Análise do teor de proantocianidinas (taninos condensados)	101
4.2.4	Análise do teor de flavonoides.....	105
4.2.5	Comparação entre os resultados de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides através de análise estatística	109
4.2.6	Prospecção fitoquímica e análise do espectro de UV	112
4.2.7	Análise da atividade antioxidante: sequestro do radical DPPH, sistema β -caroteno/ ácido linoleico, potencial de oxidação	115
4.2.8	Atividade inibidora de enzima α -amilase	129
4.2.9	Isolamento e caracterização de compostos bioativos no extrato das folhas	134
4.2.9.1	<i>Identificação do composto isolado FoE98-AE-C1 (rutina)</i>	137
4.2.9.2	<i>Identificação do composto isolado FoE98-AE-C2 (isoquercitrina)</i>	148
4.2.9.3	<i>Identificação do composto isolado FoE98-AE-C3 (quercitrina)</i>	157
4.2.9.4	<i>Identificação do composto isolado FoE98-AE-C4 ((-)-epicatequina)</i>	166
4.2.10	Desreplicação da partição em acetato de etila dos extratos de folhas, flores e galhos através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a	

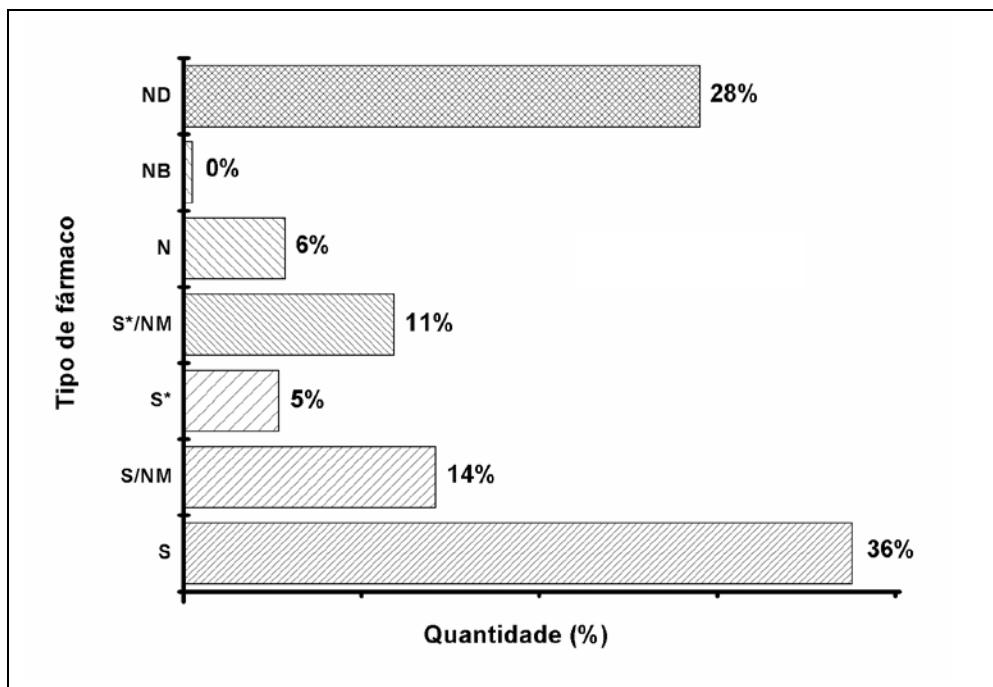
espectrometria de massas por ionização <i>electrospray</i> (CLAE-ESI- EM/EM) e quantificação dos compostos isolados.	173
4.2.11 Análise das atividade antioxidante e inibidora de α -amilase dos compostos isolados do extrato das folhas	187
5 CONCLUSÕES	190
REFERÊNCIAS	192
APÊNDICE A - Tempos de retenção dos padrões de alcanos (C8-C30) na análise por CG-EM	209
APÊNDICE B - Meios de cultura e soluções utilizadas na análise da atividade antimicrobiana.....	210
APÊNDICE C - Meio de cultura utilizado na análise da atividade citotóxica	212
APÊNDICE D - Matriz de análise	213
APÊNDICE E - Componentes principais	214
APÊNDICE F - Espectro de massas (ESI-EM/EM - modo negativo) da rutina isolada do extrato das folhas	215
APÊNDICE G - Espectro de massas (ESI-EM - modo positivo) da rutina isolada do extrato das folhas	216
APÊNDICE H - Nomenclatura dos íons de flavonoides glicosilados gerados pela fragmentação em spectrometrômetro de massas	217
APÊNDICE I - Espectro de massas (ESI-EM/EM - modo negativo) da isoquercitrina isolada do extrato das folhas.....	218
APÊNDICE J - Espectro de massas (ESI-EM/EM - modo negativo) da quercitrina isolada do extrato das folhas.....	219
APÊNDICE K - Espectro de massas (ESI-EM/EM - modo negativo) da epicatequina isolada do extrato das folhas.....	220

1 INTRODUÇÃO

1.1 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DA TESE

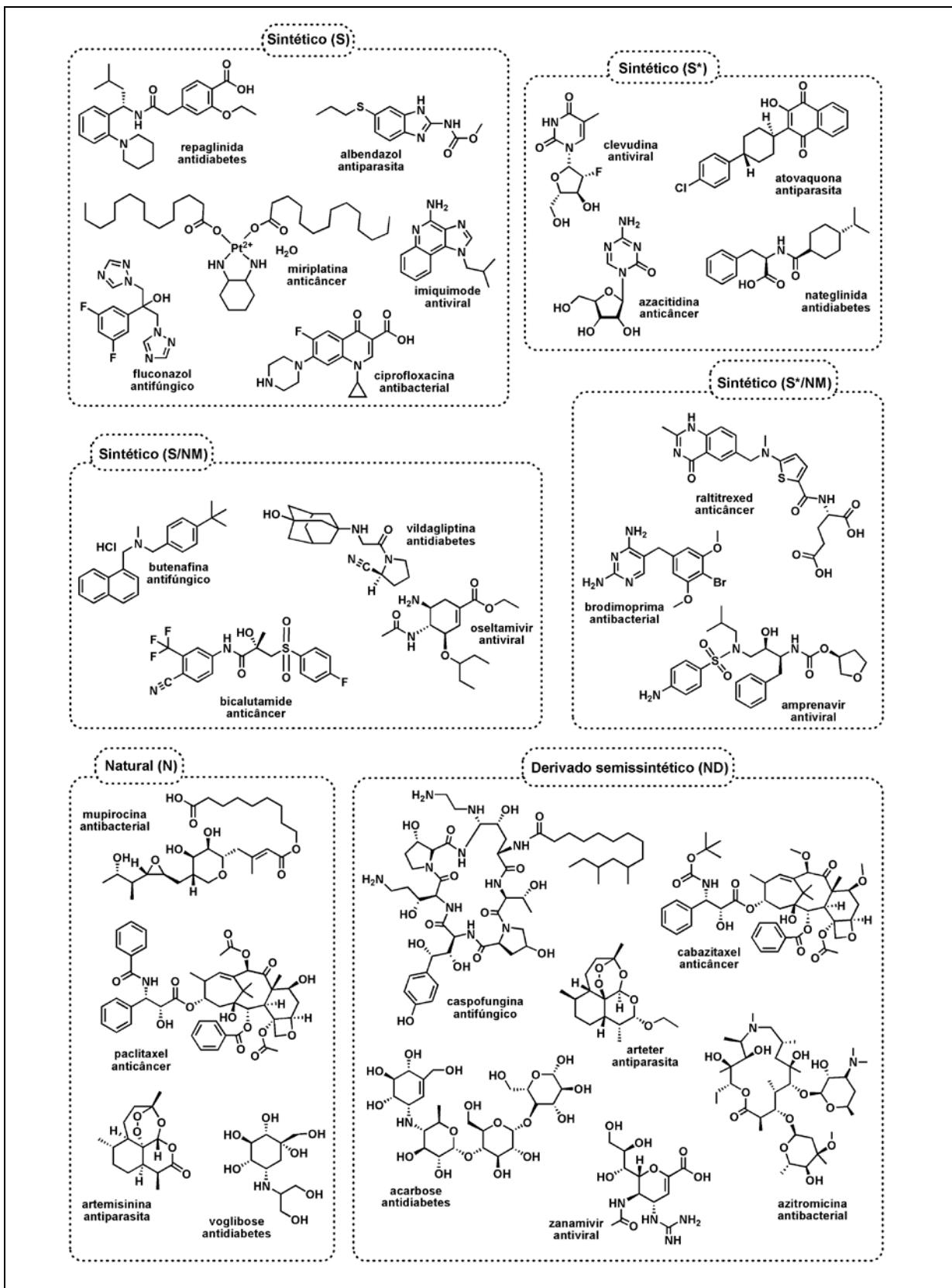
A importância da busca de produtos naturais com propriedades biológicas (antitumoral, antiparasitária, antibacterial, entre outras) pode ser observada através do estudo realizado por Newman e Cragg (2012), sobre a origem dos medicamentos lançados entre 1981 e 2010. Neste trabalho, os fármacos foram classificados da seguinte forma: isolado de produto natural (N), produto natural “botânico” (fitoterápicos) (NB), derivado semissintético de produto natural (ND), sintético (S), sintético com grupo farmacofórico de produto natural (S*) e aqueles desenvolvidos a partir do conhecimento adquirido de produto natural (NM). Através do gráfico mostrado na Figura 1 é possível verificar que 64% dos fármacos desenvolvidos em 30 anos apresentam sua origem em produtos naturais. Na Figura 2 se encontram estruturas das moléculas de alguns destes fármacos.

Figura 1 - Origem dos fármacos lançados entre 1981-2010.



Nota: N - produto natural; NB - fitoterápicos; ND - derivado semissintético de produto natural; S - sintético; S* - sintético com grupo farmacofórico de produto natural, NM - desenvolvidos a partir do conhecimento adquirido de produto natural. Fonte: adaptado de Newman e Gragg (2012).

Figura 2 - Estruturas das moléculas de alguns fármacos lançados entre 1981-2010.



Fonte: adaptado de Newman e Gragg (2012).

Dentre as atividades destes medicamentos, a antibacteriana e a anticancerígena apresentam maior número de fármacos desenvolvidos (cerca de 20% do total). Sendo que cerca de 80% deles apresentam sua origem em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012).

A resistência bacteriana é um dos problemas enfrentados no tratamento de infecções, tornando a procura de novas alternativas terapêuticas um desafio, e as plantas são um forte aliado na busca de compostos mais eficientes. Justificando a porcentagem elevada de fármacos com origem em produtos naturais.

Dentre os inúmeros estudos de agentes antimicrobianos, destacam-se aqueles contra as bactérias da cavidade bucal. Uma vez que, além da cárie ser um grave problema existente em crianças e adultos, que inclusive pode levar a perda dos dentes (essencial no processo digestivo dos alimentos), algumas bactérias bucais são associadas à pneumonia e a doenças cardiovasculares (DORN et al., 2010, KUMAR, 2013a). Assim, a utilização de compostos de origem natural contra bactérias bucais se torna muito interessante.

Em outros segmentos da indústria, a busca de compostos de origem natural tem se tornado também atrativa, devido à possível contaminação de determinados produtos sintéticos na saúde dos homens, dos animais e no meio ambiente. Antioxidantes sintéticos como 2,6-di-*terc*-Butil-4-metilfenol (BHT) e o *terc*-butil hidroquinona (*t*-BHQ), por exemplo, utilizados como conservantes de alimentos e cosméticos, têm mostrado efeitos colaterais tóxicos (BOTTERWECK et al., 2000, SASAKI et al., 2002) sugerindo a busca por antioxidantes de origem natural. Sabendo que as plantas são uma fonte promissora de compostos antioxidantes, inúmeros trabalhos têm se destacado nesta área. Os danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs), por exemplo, encontram-se associados a uma série de doenças, dentre elas o diabetes. Espécies antioxidantes vêm sendo estudadas como auxiliadoras no retardo da oxidação e, portanto, na redução ou prevenção dessas doenças. Alguns antioxidantes de origem natural, por exemplo, atuam como hipoglicemiantes no tratamento do diabetes através da inibição de enzimas envolvidas na digestão de carboidratos em pacientes diabéticos.

Com relação à disponibilidade de material vegetal para estudos de produtos naturais, o Brasil se destaca por apresentar uma área territorial de 8,5 milhões de quilômetros quadrados compostos de diferentes biomas (Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Amazônia e Caatinga) (TERRITÓRIO, 2009). A diversidade de solos e

climas favorece a grande variedade de vegetação existente. Portanto, a biodiversidade é uma fonte promissora para estudos químicos, fato que têm despertado grande interesse pelo conhecimento de atividades biológicas, composição química e toxicidade das diversas espécies existentes.

O Cerrado constitui o segundo maior bioma brasileiro e ocupa uma área de aproximadamente 23% do território nacional, apresentando cerca de 10.000 espécies de plantas, das quais 4.400 são endêmicas. Sua flora é ainda pouco estudada, acarretando em grande perda de conhecimento, uma vez que se estima que 40% desse bioma já tenham sido devastados, sendo que somente 1,5% de sua extensão é protegida por lei (MYERS et al., 2000, NETO; MORAIS, 2003). Isto mostra a importância do estudo de espécies desta região.

Neste contexto, este trabalho estudou a atividade antimicrobiana contra bactérias da cavidade bucal, antioxidante e inibidora de α -amilase da espécie *Eugenia calycina*, que é endêmica do bioma Cerrado. Além disso, a composição química do óleo essencial das folhas foi identificada e compostos responsáveis pelas atividades antioxidante e inibidora de α -amilase do extrato das folhas foram isolados, identificados e quantificados. Através de desreplicação, foram identificados compostos no extrato de galhos e flores. No momento, estudos relacionados à composição química desta espécie não existem na literatura, bem como qualquer atividade biológica avaliada. Apenas são encontrados estudos relacionados à área de agronomia, os quais destacam o elevado rendimento na produção de frutos desta espécie (BULLOW; CARMONA; PARENTE, 1994, CARDOSO; LOMÔNACO, 2003). Embora não existam relatos do uso da *E. calycina* na medicina popular várias espécies de *Eugenia*, são utilizadas popularmente no tratamento de enfermidades e tiveram as atividades comprovadas e os principais compostos identificados (EINBOND et al., 2004, VICTORIA et al., 2012, KATO et al., 2013, NERI-NUMA et al., 2013, SAHA et al., 2013, JUNIOR et al., 2014). Desta forma, o estudo químico da *E. calycina* é muito importante para agregar conhecimentos tanto sobre as espécies da região do Cerrado como também uma promissora fonte de compostos biologicamente ativos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral identificar os compostos presentes no óleo essencial das folhas de *E. calycina* e determinar a atividade antimicrobiana do óleo contra bactérias da cavidade bucal. Além disso, objetivou-se avaliar as atividades antioxidante e inibidora de α -amilase dos extratos das folhas, flores e galhos da *E. calycina*, bem como identificar e isolar substâncias bioativas.

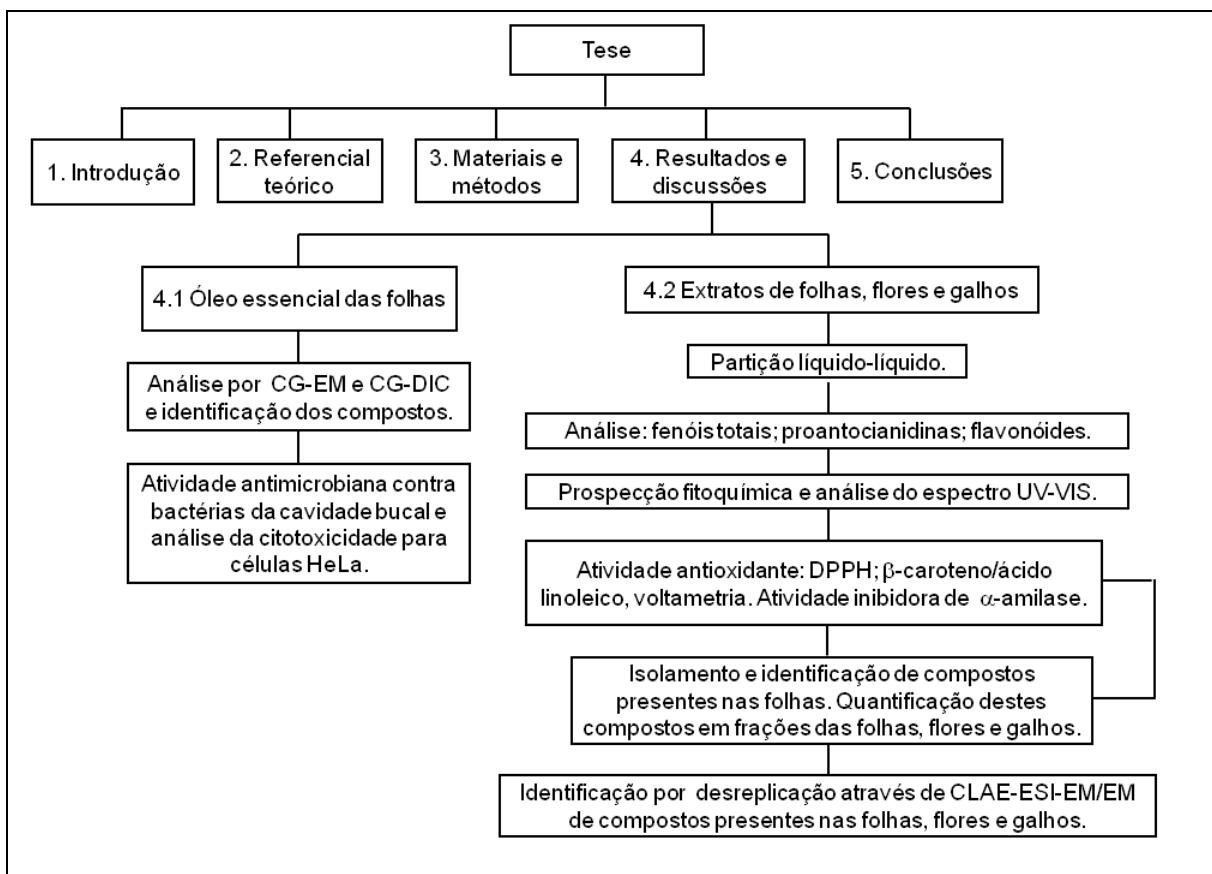
1.2.2 Metas para atingir os objetivos

- Coletar o material vegetal para o preparo da exsicata, identificação e depósito no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia;
- Obter óleo essencial das folhas frescas por hidrodestilação, fracionar em coluna cromatográfica e analisar, por CG-EM e CG-DIC, para identificar a composição química;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial no ensaio com bactérias da cavidade bucal e a citotoxicidade para células HeLa;
- Preparar os extratos em etanol 98% das folhas e dos galhos, e em acetona 80% das flores;
- Fracionar os extratos, através de partição líquido-líquido, utilizando solventes de polaridade crescente;
- Avaliar teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides nos extratos e frações;
- Avaliar a capacidade inibidora de α -amilase e a atividade antioxidante pelos métodos de sequestro do radical livre DPPH, sistema β -caroteno/ácido linoléico e potencial de oxidação/densidade de carga por VPD de extratos, frações e compostos isolados;
- Realizar fracionamento cromatográfico, isolar e identificar por RMN, ESI-EM e UV-VIS os compostos bioativos nas folhas;
- Quantificar os compostos isolados por CLAE nas das folhas, flores e galhos;
- Identificar compostos nas folhas, flores e galhos por desreplicação através de CLAE-ESI-EM/EM;

1.3 ESTRUTURA DA TESE

O estudo da espécie *E. calycina* foi realizado com o óleo essencial das folhas e com os extratos das folhas, flores e galhos. As propriedades químicas do óleo essencial e do extrato são distintas e, por isso, a tese foi dividida em estudos realizados com o óleo essencial e com os extratos, como mostrado na Figura 3. Dessa maneira, o item 2 trará um referencial teórico sobre os principais aspectos abordados na tese, fornecendo o suporte necessário ao entendimento dos resultados apresentados: metabolismo secundário dos vegetais e principais compostos biossintetizados; *E. calycina*: características do gênero e da família; atividade antimicrobiana contra bactérias da cavidade bucal; atividade antioxidante; atividade inibidora de α -amilase. O item 3 informará os equipamentos, reagentes e procedimentos utilizados nas análises. O item 4 discutirá os resultados obtidos, sendo dividido em óleo essencial (4.1) e extratos (4.2), enquanto que o item 5 trará as conclusões do trabalho.

Figura 3 - Estrutura da tese.



Fonte: autora.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS VEGETAIS E PRINCIPAIS COMPONENTES BIOSSINTETIZADOS

Os vegetais produzem uma série de compostos orgânicos que são classificados como metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são os carboidratos, lipídeos, nucleotídeos e aminoácidos encontrados em todas as plantas, sendo envolvidos no crescimento e sobrevivência, desenvolvendo funções metabólicas essenciais. Os metabólitos secundários são distribuídos diferentemente entre os grupos taxonômicos, muitas vezes se limitando à determinadas famílias e espécies. Isso ocorre porque são os genes que controlam a formação das enzimas, que serão os catalisadores biológicos para a síntese dos metabólitos. Deste modo, as rotas são controladas pela constituição genética do organismo (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

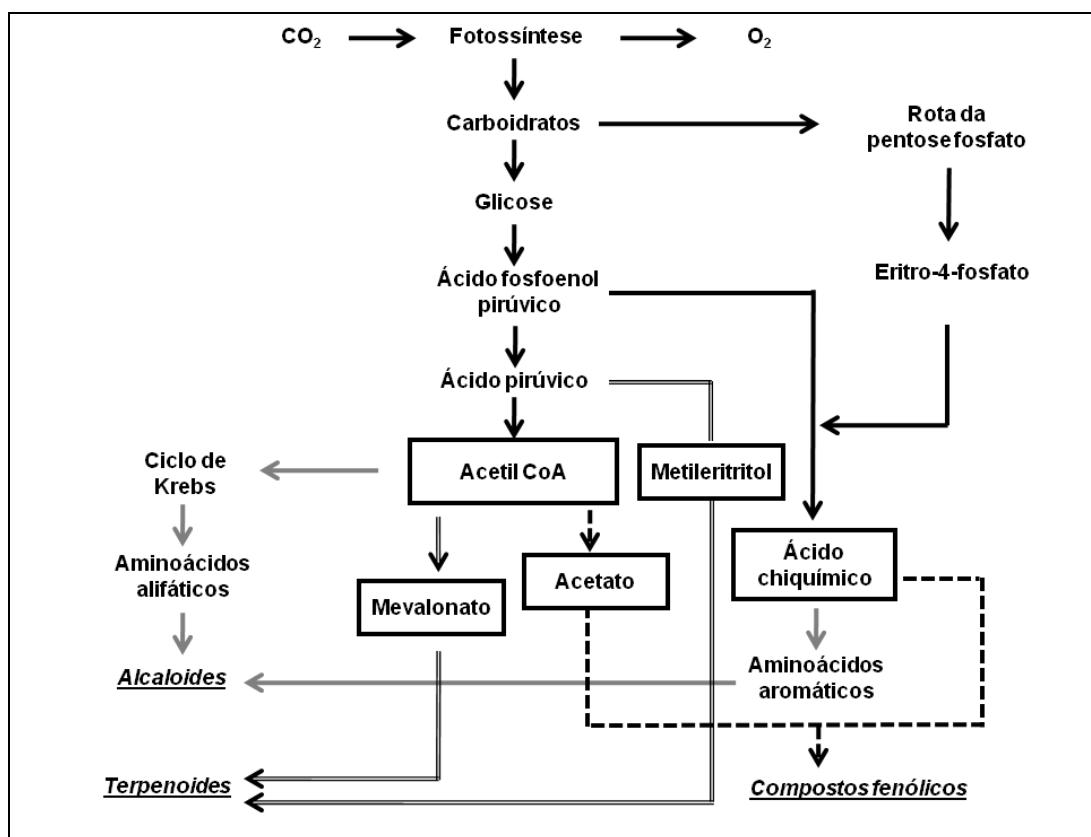
Os metabólitos secundários não são considerados essenciais para a vida do vegetal, mas são importantes para a sua sobrevivência. Isso porque se tem descoberto que muitos destes compostos são sintetizados para proteger a planta da ação de microrganismos, herbívoros, sinalização química para atrair polinizadores, animais para dispersar sementes, alelopatia, proteção da incidência luminosa, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os metabólitos secundários são armazenados em pequenas quantidades e sintetizados por via metabólica específica, sendo que os locais de produção podem variar de acordo com o tipo de composto sintetizado. Além disso, algumas moléculas podem ser sintetizadas por todos os tecidos das plantas, ao passo que outras são produzidas em determinados tecidos ou em regiões específicas das células. Compostos hidrofílicos estão principalmente armazenados no vacúolo de células chamadas de idioblastos, enquanto que compostos lipofílicos são comumente armazenados em dutos, laticíferos, tricomas e cutículas (YAZDANI et al., 2011).

O metabolismo secundário das plantas pode ser dividido em três grupos principais, de acordo com a sua via (também chamada de rota) biossintética de origem: terpenoides, compostos nitrogenados (alcaloides, glucosinolatos e cianidrinas) e fenilpropanoides também conhecidos como compostos fenólicos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). A Figura 4 apresenta um fluxograma das

rotas metabólicas para a produção de compostos fenólicos, alcaloides e isoprenoides ou terpenos. As principais vias metabólicas são: acetato, chiquimato (ou ácido chiquímico), mevalonato (MVA) e metileritritol (MEP). Os compostos fenólicos são sintetizados através das vias do ácido chiquímico e do acetato. Os terpenos podem ser sintetizados pela via do mevalonato ou pela via do metileritritol. Os compostos nitrogenados são sintetizados a partir dos aminoácidos alifáticos oriundos do ciclo de Krebs e dos aminoácidos aromáticos e indólicos oriundos da via do ácido chiquímico.

Figura 4 - Fluxograma simplificado das rotas metabólicas para compostos fenólicos, alcaloides e terpenoides.



Fonte: adaptado de Castro e outros (2004).

2.1.1 Terpenos

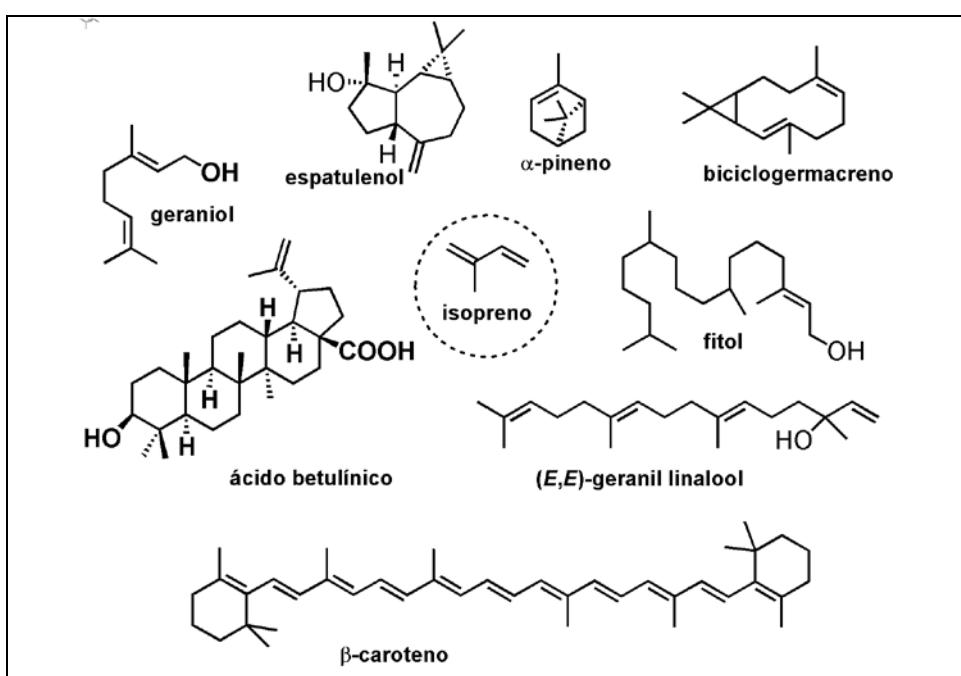
Os terpenoides ou terpenos constituem uma classe de compostos contendo em sua estrutura unidades de isopreno (2-metilbutadieno), oriunda da junção de cinco unidades de carbono. Portanto, os terpenos também são chamados de isoprenoides, entretanto é necessário ressaltar que o isopreno não é precursor desta

via metabólica (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; LOBO; LOURENÇO, 2007). Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno em sua estrutura, como mostrado na Tabela 1. Na Figura 5 são apresentados alguns exemplos de terpenos.

Tabela 1 - Classificação dos terpenos.

	Nº. de carbonos	Unidades de isopreno	Exemplos
Monoterpenos	10	2	geraniol, α -pineno
Sesquiterpenos	15	3	biciclogermacreno, espatulenol
Diterpenos	20	4	Fitol, (<i>E,E</i>)-geranil linalool
Triterpenos	30	6	ácido betulínico, esteroides, saponinas
Tetraterpenos	40	8	β -caroteno

Figura 5 - Estrutura de alguns terpenos.



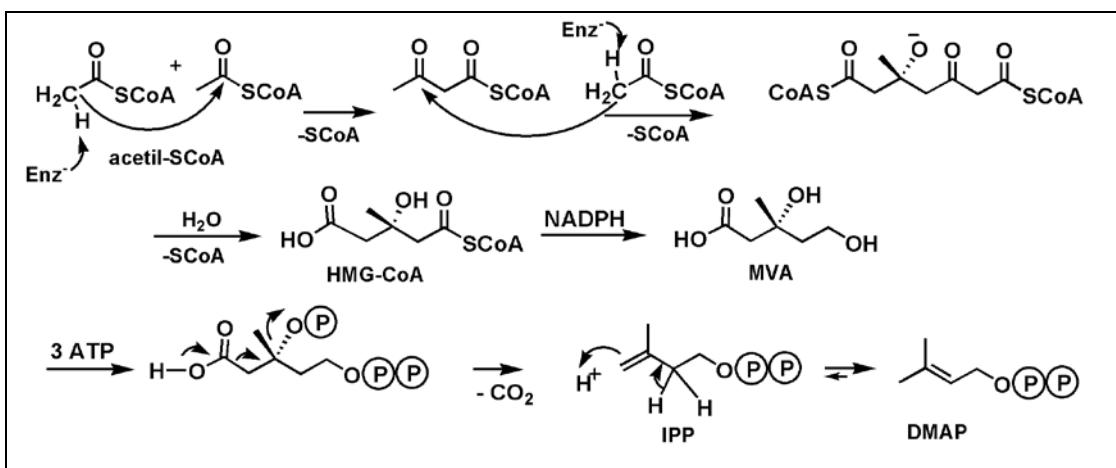
Fonte: autora.

Os terpenos são sintetizados a partir dos intermediários 3,3'-dimetilalil pirofosfato (DMAP) e 3-isopentenil pirofosfato (IPP). Esses intermediários são formados por duas vias metabólicas (Figuras 6 e 7).

Uma das vias é a do ácido mevalônico, que ocorre no citoplasma e retículo endoplasmático das células, na qual os triterpenos são produzidos. Nesta via, três moléculas de acetil-SCoA são condensadas (catalisada pelas enzimas tiolase e hidroximetilglutaril-CoA sintase). Nesta etapa, primeiramente duas moléculas de acetil-SCoA reagem por uma reação tipo condensação de Claisen, na sequência o

composto formado reage com mais uma molécula de acetil-SCoA através de condensação aldólica, formando o intermediário 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). O HMG-CoA sofre hidrólise seguida de redução enzimática formando o ácido mevalônico (MVA). Este sofre sucessivas fosforilações nos grupos hidroxilas, seguido de descarboxilação e eliminação do grupo pirofosfato, originando o IPP. A enzima isomerase é responsável pela conversão do IPP em DMAP (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000, LOBO; LOURENÇO, 2007).

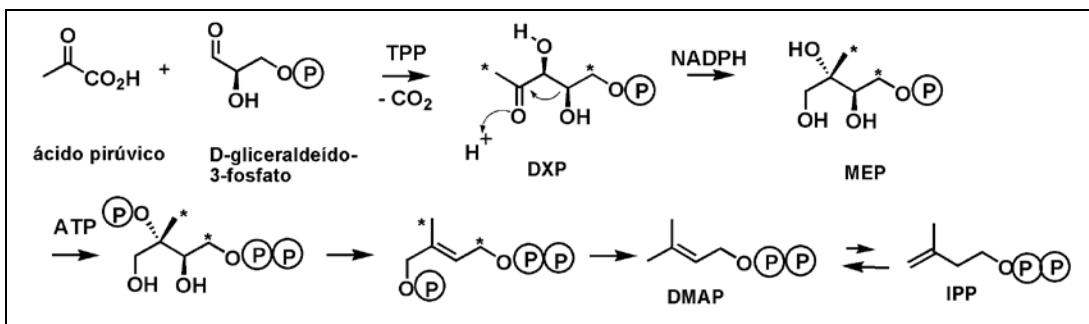
Figura 6 - Via do ácido mevalônico para a produção de DMAP e IPP.



Fonte: adaptado de Lobo e Lourenço (2007).

A outra rota sintética dos terpenos é a do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos das células vegetais, na qual monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e tetraterpenos são produzidos. Nesta via, a coenzima tiamina difosfato (TPP) catalisa a reação entre o ácido pirúvico e o D-gliceraldeído, formando o intermediário 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP). O DXP se transforma em 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP), através de um rearranjo tipo 1,2 de Wagner-Meerwein, no qual um grupo alquil migra de posição. Na sequência se observa a fosforilação seguida de eliminação, dando origem ao DMPA que é convertido por uma enzima isomerase à IPP (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000, EISENREICH et al., 2004, LOBO; LOURENÇO, 2007).

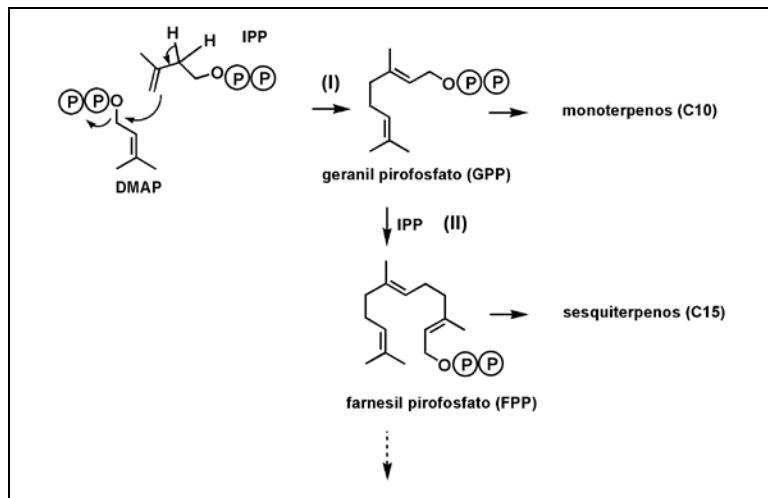
Figura 7 - Via do metileritol fosfato para a produção de DMAP e IPP.



Fonte: adaptado de Lobo e Lourenço (2007) e Eisenreich e outros (2004).

A produção dos terpenoides ocorre, portanto, através da condensação entre as unidades de DMAP e IPP (I), catalisada pela enzima preniltransferase, originando o geranil pirofosfato (GPP), que é precursor de monoterpenos, como mostrado na Figura 8. A condensação GPP com IPP (II) fornece a cadeia de farnesil pirofosfato (C15), e assim por diante (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000, LOBO; LOURENÇO, 2007).

Figura 8 - Reação entre DMAP e IPP para a formação de terpenos.

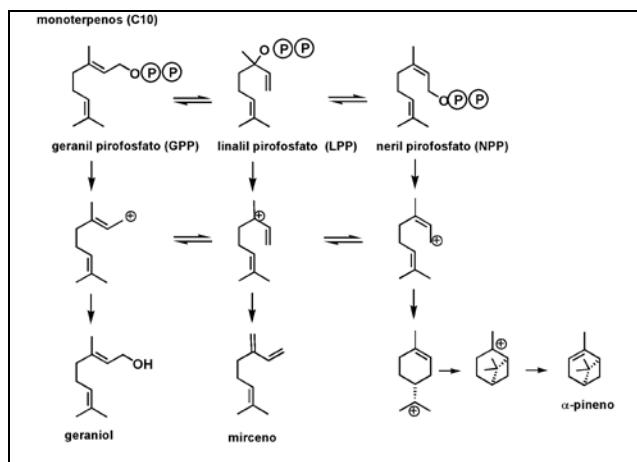


Fonte: adaptado de Lobo e Lourenço (2007).

A formação de terpenos oxigenados, cílicos e isômeros, ocorre devido à possibilidade de rearranjo de carbocátions oriundos do GPP, FPP etc.

A Figura 9 exemplifica alguns rearranjos que podem ocorrer a partir do geranil pirofosfato (GPP) originando o linalil pirofosfato (LPP) e o neril pirofosfato (NPP) que resultarão em variados monoterpenos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000, LOBO; LOURENÇO, 2007).

Figura 9 - Rearranjo de carbocátons que resultam em diferentes monoterpenos.

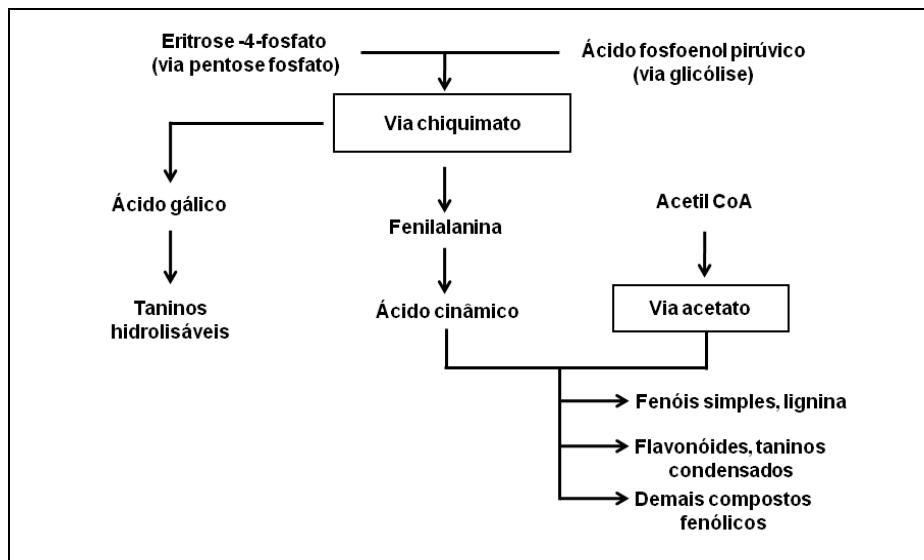


Fonte: adaptado de Lobo e Lourenço (2007).

2.1.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos produzidos nas plantas apresentam uma enorme diversidade estrutural e executam funções das mais diversas, desde proteção contra a radiação UV até funções de suporte e sustentação do vegetal. As principais vias de síntese dos compostos fenólicos são chiquimato e acetato (Figura 10).

Figura 10 - Vias metabólicas de síntese dos compostos fenólicos.



Fonte: adaptado de Taiz e Zeiger (2013).

A classificação destes compostos se baseia no número e no arranjo dos átomos de carbono, conforme pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação dos compostos fenólicos.

Nº. de carbonos	Esqueleto	Classificação	Estrutura básica
7	C ₆ -C ₁	ácido benzóico	
8	C ₆ -C ₂	acetofenona	
8	C ₆ -C ₂	ácido fenilacético	
9	C ₆ -C ₃	ácido cinâmico	
9	C ₆ -C ₃	cumarina	
10	C ₆ -C ₄	naftoquinona	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	xantona	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	estileno	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	flavonoide	

Fonte: Crozier, Clifford e Ashihara (2006).

Os flavonoides são compostos polifenólicos que apresentam em sua estrutura básica quinze átomos de carbono, sendo dois anéis aromáticos C₆ (anel A e B) e um anel heterocíclico benzopirano (anel C). O anel A se encontra acoplado ao C; e o anel B se encontra ligado ao anel C nas posições 2, 3 ou 4. A Tabela 3 apresenta a classificação dos flavonoides e alguns exemplos.

Tabela 3 - Classificação dos flavonoides.

Classe do flavonoide	Estrutura básica	Exemplo
Flavonoide geral		
Flavona		luteolina (C5, C7, C3', C4'=OH) crisina (C5, C7=OH)
Flavonol		queracetina (C5, C7, C3', C4'=OH) kaempferol (C5, C7, C4'=OH)
Flavanona		hesperetina (C5, C7, C3'=OH; C4'=OCH ₃) naringenina (C5, C7, C4'=OH)
Flavanonol		taxifolina (C5, C7, C3', C4'=OH)
Flavan-3-ol		catequina (C5, C7, C3', C4'=OH) epiafzelequina (C5, C7, C4'=OH)
Isoflavona		genisteina (C5, C7, C4'=OH) daidzeina (C7, C4'=OH)
Antocianina		cianidina (C5, C7, C3', C4'=OH) delfnidina (C5, C7, C3', C4, C5''=OH)

A substituição do anel heterocíclico de seis membros por um de cinco membros forma o composto chamado de auronas ou a forma acíclica chalconas (SISA et al., 2010). Os flavonoides são classificados de acordo com o estado de oxidação do anel C: flavan-3-ols, flavanonas, flavonas e flavonóis. Flavonoides podem existir como monômeros glicosilados ou como oligômeros de flavan-3-ol (proantocianidinas = taninos condensados).

Os sistemas altamente conjugados dos flavonoides fazem com que apresentem absorção de luz na região de 320-385 nm referentes às transições eletrônicas oriundas do anel B conjugado com o anel C (por exemplo, com uma carbonila) e 250-285 nm referentes ao anel A (KUMAR; PANDEY, 2013).

Essa propriedade de absorção da luz na região UV/Vis é responsável pelas cores associadas às flores, que desempenham papel fundamental na polinização e reprodução (SISA et al., 2010).

Além disso, a absorção de luz por estes compostos exerce uma propriedade importante que é a proteção da planta contra a radiação UV-B, que pode danificar as

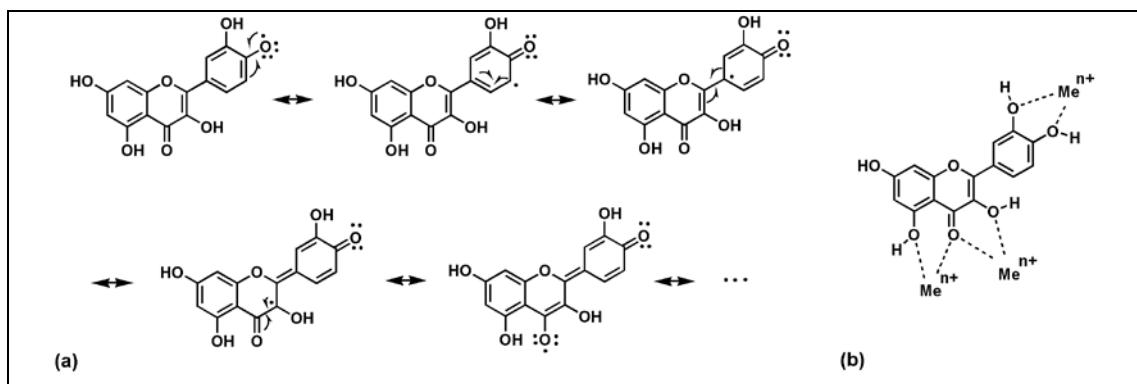
moléculas de DNA. Portanto, plantas que se encontram em regiões expostas a elevada intensidade de radiação UV, apresentam maior teor de flavonoides que em outras regiões de menor intensidade luminosa. Essa propriedade fotoprotetora desses compostos está relacionada com atividade antioxidante exercida por eles, através da remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são formadas devido à forte exposição à radiação UV (BOEGER; POULSON, 2006, KUMAR; PANDEY, 2013).

Estudos sugerem que, devido às propriedades antioxidantes dos flavonoides, o seu consumo regular, através de frutas e verduras, protege os humanos contra doenças degenerativas associadas com o estresse oxidativo, tais como a doença de Alzheimer, a arteriosclerose e envelhecimento. Além disso, é comprovado que os flavonoides apresentam várias outras propriedades farmacológicas como antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, vasodilatadora e anti-câncer (SISA et al., 2010, PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011, KUMAR; PANDEY, 2013).

A atividade antioxidante apresentada pelos flavonoides pode ocorrer devido: ao sequestro de radicais formados por ERO através da doação de hidrogênio e estabilização do radical formado; quelatação de metais envolvidos no estresse oxidativo, inibição de enzimas envolvidas na geração de EROs (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006, KUMAR; PANDEY, 2013).

Na Figura 11 são apresentadas as estruturas de ressonância (a) e quelatação de metais (b) em flavonoides.

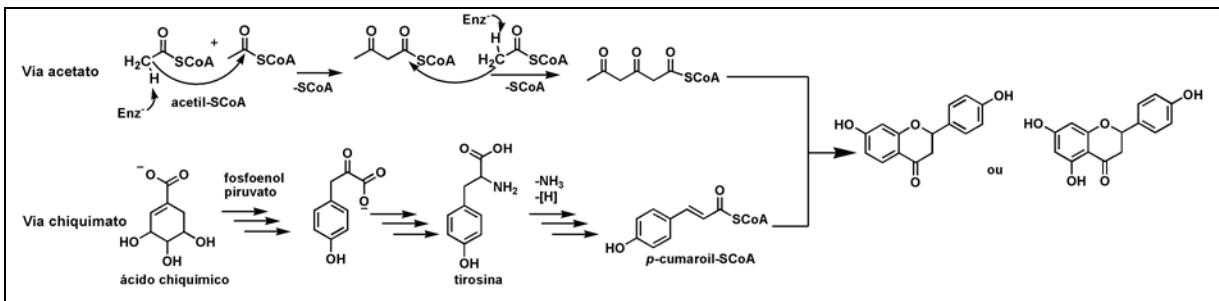
Figura 11 - Estruturas de ressonância (a) e quelatação de metais (b) em flavonoides.



Fonte: (a) Barreiros, David e David (2006); (b) Kumar e Pandey (2013).

Os flavonoides são sintetizados no citossol das células vegetais e armazenados nos vacúolos (YAZAKI, 2005, ZHAO; DIXON, 2010). As vias envolvidas na sua síntese são a do chiquimato e acetato. As estruturas fenilpropanoicas dos anéis B e C são sintetizadas a partir do ácido *p*-cumárico da via chiquimato, enquanto que o anel A é oriundo da condensação tipo Claisen de três acetil-SCoA da via acetato (Figura 12). Na via chiquimato, é produzido o cinamoil-SCoA (ou *p*-cumaroil-SCoA) a partir da tirosina através da perda de NH₃. A tirosina é um aminoácido formado a partir do ácido chiquímico (LOBO; LOURENÇO, 2007, DEWICK, 2009a).

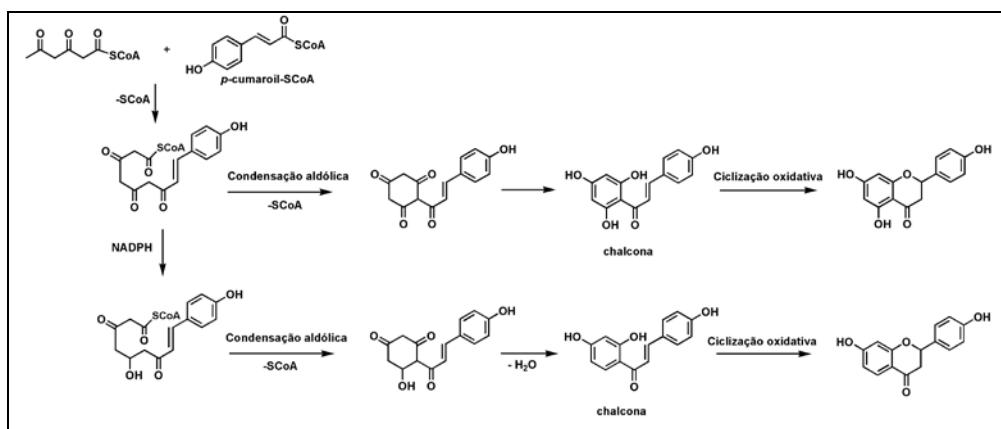
Figura 12 - Reação da síntese de flavonoides.



Fonte: adaptado de Lobo e Lourenço (2007) e Dewick (2009a).

Nesta síntese é formado um intermediário que pode sofrer redução enzimática de uma das carbonilas, o que resultará em um flavonóide não substituído na posição 5. Este intermediário sofre condensação aldólica formando a chalcona. Esta, por sua vez forma os flavonoides através de uma ciclização oxidativa dando origem ao flavonóide da classe flvanona (Figura 13).

Figura 13 - Mecanismo de formação dos flavonoides.



Fonte: adaptado de Lobo e Lourenço (2007) e Dewick (2009a).

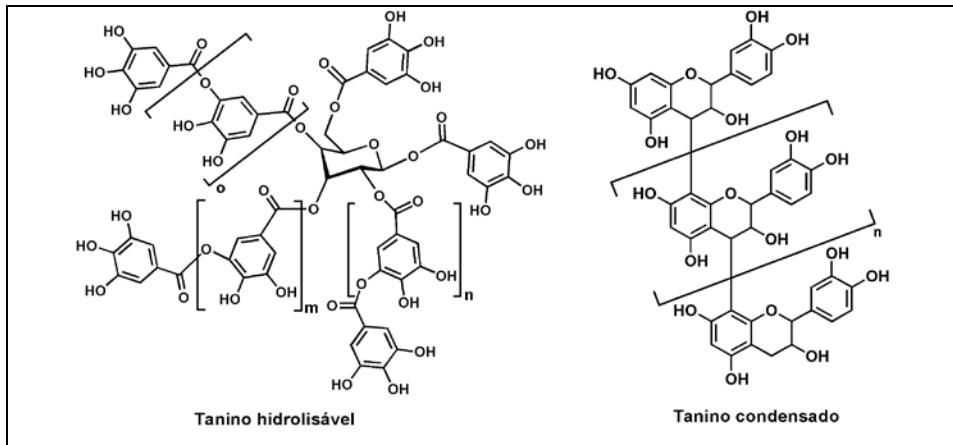
Através de reações de oxidação, a flavanona formada pode originar os demais flavonoides: flavonóis, diidroflavonóis, flavonas, flavan-3-ol, antocianidinas.

Outro tipo de compostos fenólicos sintetizados pelas plantas são os poliméricos: lignina e taninos.

As ligninas, depois da celulose, são os compostos mais abundantes nos vegetais. São formadas na via do chiquimato através de três precursores fenilpropanoides: o álcool coniferílico, o cumarílico e o sinapílico. As ligninas são ligadas covalentemente à celulose, o que dificulta o seu isolamento. A sua rigidez mecânica, fortalece os caules dos vegetais, permitindo o crescimento ascendente e possibilitando, principalmente, a condução de água e sais minerais. A proteção dos vegetais contra herbívoros e o bloqueio do crescimento de patógenos são outras funções atribuídas às ligninas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Taninos são polifenóis que apresentam massa molecular entre 500 a 3.000 Da e são classificados em proantocianidinas (taninos condensados) e taninos hidrolisáveis, como mostrado na Figura 14.

Figura 14 - Estrutura de taninos condensados e hidrolisáveis.



Fonte: adaptado de Croteau, Kutchan e Lewis (2000).

As proantocianidinas são oligômeros ou polímeros formados por condensação de unidades flavanoídicas que pode ser flava-3-ols (tanino de catequina ou catéquico), flavan-3,4-diol (tanino de leucoantocianinas) entre outros, portanto, assim como os flavonoides, elas são derivadas da via chiquimato e acetato. A hidrólise dos taninos condensados leva a formação de antocianidinas, por isso são chamados também de proantocianidinas. Os taninos hidrolisáveis são ésteres do ácido gálico e elágico contendo um monossacarídeo em sua estrutura. Portanto, são oriundos da via chiquimato. Estes taninos são divididos em

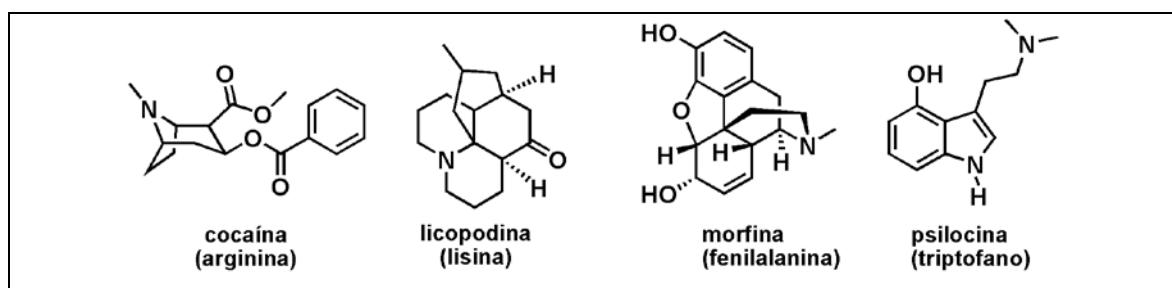
galotaninos (produzem ácido gálico após hidrólise) e elagitaninos (produzem ácido elágico após hidrólise) (QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO, 2002, SILVA et al., 2004, TAIZ; ZEIGER, 2013)

2.1.3 Alcaloides

Os alcaloides são metabólitos que contém nitrogênio em sua estrutura, e que, portanto apresentam caráter básico. Entretanto, não são aminoácidos, nucleotídeos ou cofatores, até porque estes são metabólitos primários, uma vez que estão presentes em toda célula vegetal, enquanto que os alcaloides são sintetizados por determinadas espécies de plantas. Os alcaloides são produzidos pelas plantas para protegê-las, por exemplo, de insetos e herbívoros, sendo armazenados nos vacúolos das células (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Alcaloides são classificados de acordo com a natureza da estrutura contendo nitrogênio, por exemplo, pirrolidina, piperidina, quinolina, isoquinolina, indol, etc. Os alcaloides podem ser derivados de aminoácidos alifáticos, mas existem também aqueles derivados de aminoácidos aromáticos (fenilalanina ou tirosina) ou do aminoácido triptofano (Figura 15) (LOBO; LOURENÇO, 2007, DEWICK, 2009b).

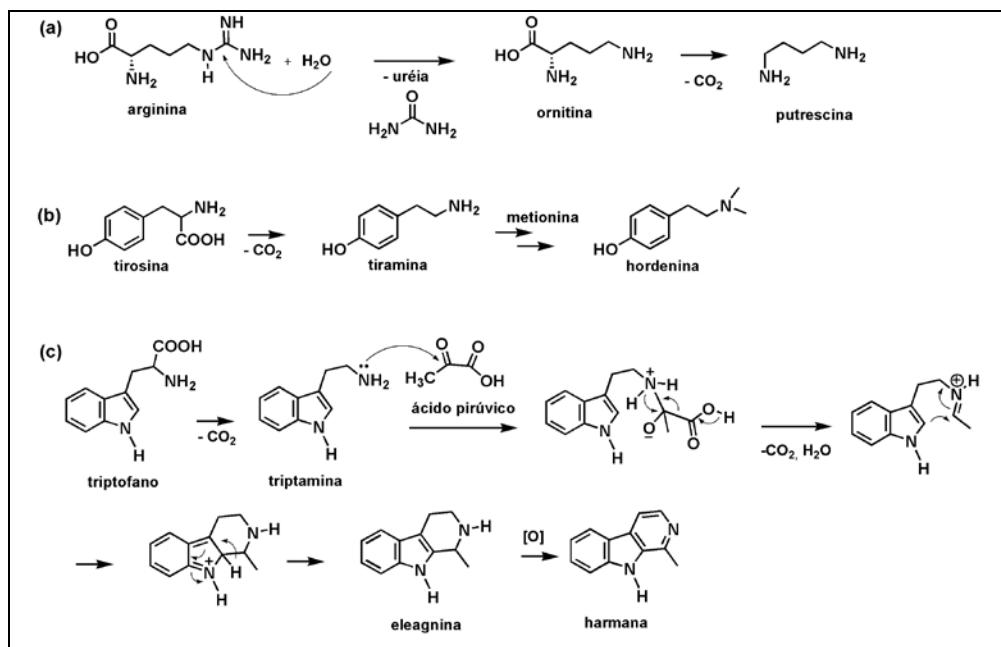
Figura 15 - Exemplos de alcaloides.



Fonte: Lobo e Lourenço (2007).

Os alcaloides oriundos de aminoácidos alifáticos, como a arginina, a ornitina e a lisina, dão origem às aminas simétricas putrescina e cadaverina. No caso dos alcaloides formados a partir de aminoácidos aromáticos e de aminoácidos indólicos, esses são oriundos da via do chiquimato. A Figura 16 exemplifica a reação de cada via de síntese dos alcaloides (LOBO; LOURENÇO, 2007).

Figura 16 - Mecanismos de síntese dos alcaloides: a) derivado de arginina, b) derivado de tirosina e c) derivado de triptofano.



Fonte: Lobo e Lourenço (2007).

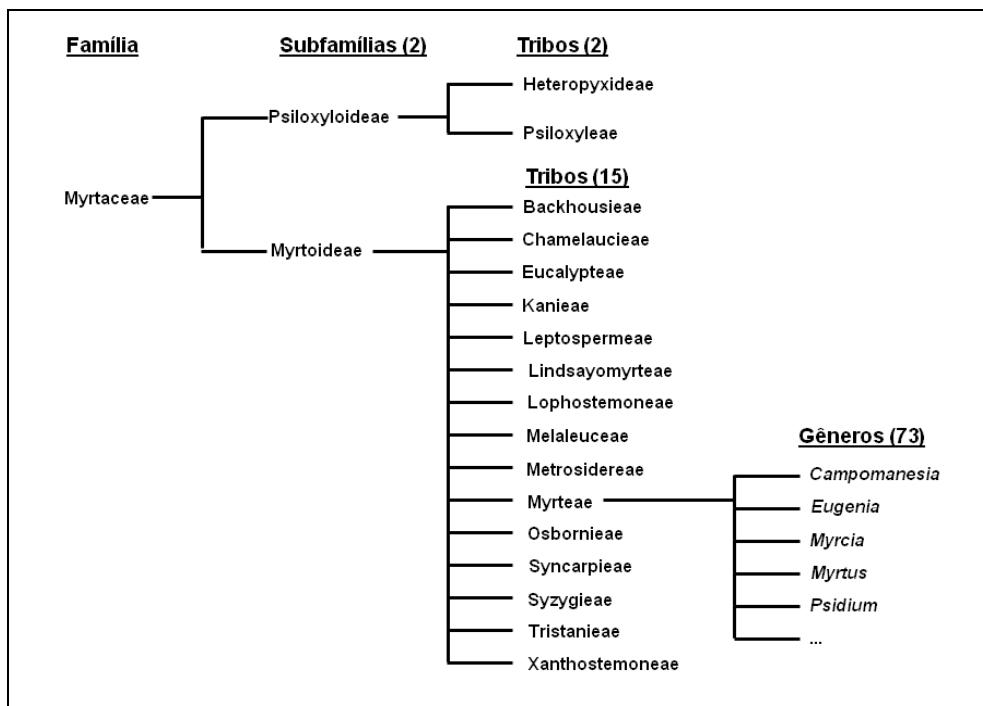
2.2 *Eugenia calycina*: CARACTERÍSTICAS DA FAMÍLIA E DO GÊNERO

A família Myrtaceae da qual a espécie *Eugenia calycina* pertence, é uma das maiores famílias botânicas, compreendendo 3.800-5.800 espécies de arbustos e árvores, apresentando cerca de 120 gêneros. É distribuída mundialmente, mas é encontrada principalmente nas zonas tropicais e subtropicais da América e Austrália (SIANI et al., 2000, STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009). No Brasil, pode-se destacar espécies importantes pela presença de frutos comestíveis como a pitanga, o jambo e a cagaita (*Eugenia*), a goiaba e o araçá (*Psidium*), a jaboticaba (*Myrciaria*), a cambucá (*Martierea*), a guabiroba (*Campomanesia*) e o cambuci (*Paivaea*) (BULLOW; CARMONA; PARENTE, 1994, BENFATTI et al., 2010). Espécies também comercialmente importantes desta família são: o Eucalipto (*Eucalyptus*) do qual a madeira e o óleo essencial são explorados e o cravo-da-índia (*Eugenia*) utilizado na indústria alimentícia.

Desde 2005, a família Myrtaceae apresenta uma nova classificação (Figura 17) que foi proposta por Wilson e outros (2005), baseada na análise filogenética do DNA de plastídios e que, portanto, segue a classificação proposta pela APG (“Angiosperm Phylogeny Group” ou “Grupo de Filogenia das Angiospermas”). Nesta

classificação, a família Myrtaceae é dividida em duas subfamílias: Psiloxyloideae e Myrtoideae. Cada subfamília é subdividida em tribos, e cada tribo é subdividida em gêneros. Assim, a subfamília Psiloxyloideae apresenta duas tribos: Heteropyxideae e Psiloxyleae; enquanto que a subfamília Myrtoideae apresenta quinze tribos: Backhousieae, Chamaelaucieae, Eucalypteae, Kanieae, Leptospermeae, Lindsayomyrteae, Lophostemoneae, Melaleuceae, Metrosidereae, Myrteae, Osbornieae, Syncarpieae, Syzygieae, Tristanieae e Xanthostemoneae. O gênero *Eugenia* pertence, portanto a tribo Myrteae da subfamília Myrtoideae.

Figura 17 - Fluxograma com a classificação da família Myrtaceae proposta pela APG.



Fonte: autora.

O gênero *Eugenia*, com cerca de 1.000 espécies, é um dos maiores da família Myrtaceae, com distribuição principalmente nas Américas Central e do Sul (DA SILVA; PINHEIRO, 2007). No Brasil, é representada por 385 espécies, das quais 299 são endêmicas (SOBRAL et al., 2014).

Muitas espécies de *Eugenia* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças. A Tabela 4 mostra algumas dessas espécies.

Tabela 4 - Espécies do gênero *Eugenia* utilizadas na medicina popular.

Espécie/nome popular	Uso na medicina popular	Referência
<i>E. brasiliensis</i> /grumixama, ibaporoti	folhas, frutas e cascas: antidiarreico, diuréticos , antirreumático	Revilla (2002); Cruz e Kaplan (2004)
<i>E. beaurepaireana</i> /ingabaú, guamirin-ferro	folhas: anti-inflamatório, úlcera	Revilla (2002)
<i>E. uniflora</i> /pitanga	frutas: anti-inflamatório, antidiarreico, diurético, antirreumáticos, antidiabéticos, redução do colesterol e controle da hipertensão	Alice e outros (1991), Oliveira e outros (2006), Stieven, Moreira e Silva (2009)
<i>E. dysenterica</i> /cagaiteira	folhas: antidiarreico, problema renal, cicatrizante	Septimio (1994) Cruz e Kaplan (2004)
<i>E. jambolana</i> /jambo roxo	sementes e cascas: diabetes, bronquite, asma, antidiarreico, úlcera	Craveiro e outros (1983), Baliga e outros (2011)
<i>E. malaccensis</i> /jambo vermelho	folhas: diabetes	Cruz e Kaplan (2004)

O uso das espécies do gênero *Eugenia* na medicina popular tem sido comprovado através da avaliação das atividades biológicas dos seus extratos e compostos isolados. Já foram identificadas espécies de *Eugenia* com atividade antimicrobiana (VICTORIA et al., 2012), antioxidante (NERI-NUMA et al., 2013, VICTORIA et al., 2013, JUNIOR et al., 2014), antidiabética (MARY JELASTIN KALA; TRESINA; MOHAN, 2012, OMAR et al., 2012) e anti-inflamatória (RAMIREZ et al., 2012, SAHA et al., 2013).

Os extratos de folhas e cascas da *E. malaccensis* (jambo), por exemplo, possuem atividade antiviral contra o vírus da Herpes e antibacteriana contra o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus pyogenes* (LOCHER et al., 1995). O extrato etanólico do cravo-da-índia (*E. caryophyllata*) apresenta atividade antioxidante (GÜLÇİN et al., 2004). O extrato etanólico das folhas da *E. uniflora* (pitanga) apresenta atividade anti-inflamatória (FIGUEIRO et al., 2013),

antibacteriana (CASTRO et al., 2010) e antioxidant (MARTINEZ-CORREA et al., 2011).

Com relação às espécies isoladas, os frutos de *E. uniflora*, por exemplo, mostraram a presença de antocianinas responsáveis pela atividade antioxidant (EINBOND et al., 2004). O hidroxicavicol isolado de folhas de *E. polyantha* apresentou atividade inibidora de lipase pancreática (KATO et al., 2013). O extrato das cascas e raiz de *E. jambolana*, contendo triterpenos pentacíclicos (fitoesteróis) como β -sitosterol, estigmasterol e lupeol, demonstrou atividade anti-inflamatória (SAHA et al., 2013).

Os compostos presentes nas espécies de *Eugenia* são geralmente fenólicos como flavonoides e taninos, além disso, são comumente encontrados triterpenos (CRUZ; KAPLAN, 2004).

O óleo essencial se destaca por apresentar majoritariamente sesquiterpenos cílicos, sendo os monoterpenos encontrados em menor quantidade. O β -cariofileno é o sesquiterpeno normalmente encontrado nas espécies de *Eugenia*, enquanto que o α -pineno é o monoterpeno mais encontrado (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

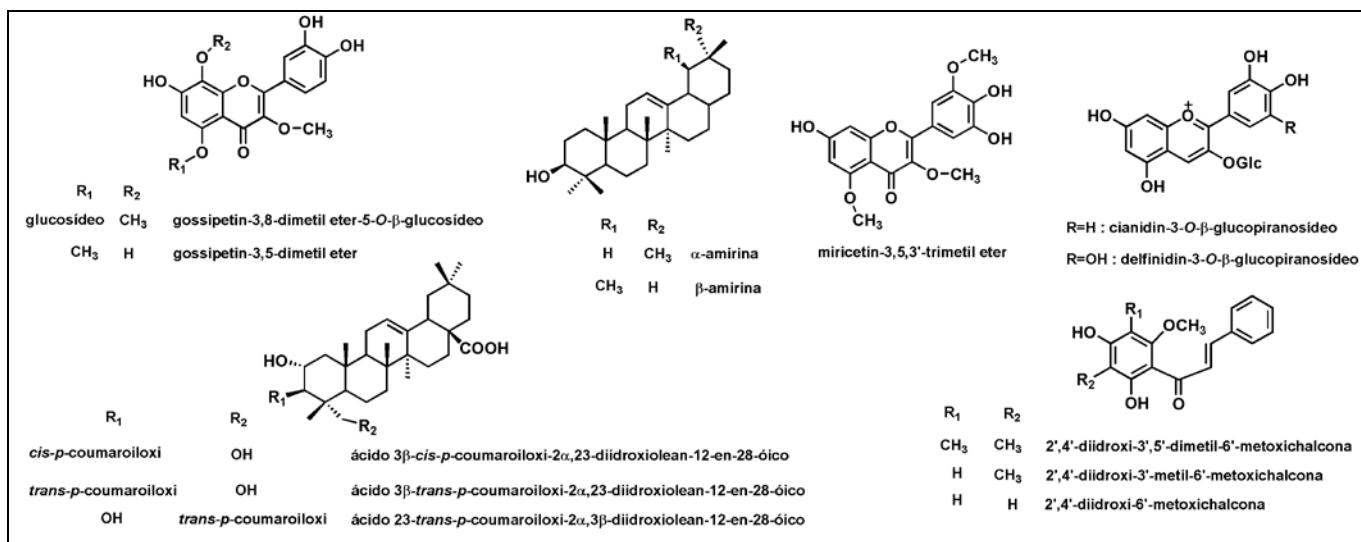
Poucas espécies de *Eugenia* produzem compostos alifáticos e aromáticos, podendo ser citada a *E. caryophyllata* que apresenta em seu óleo essencial ácido oleanólico e eugenol (KELECOM et al., 2002) e a *E. stigmatosa* que apresenta como maior componente o ácido (5 Z)-tetradecenóico (ácido fisenóico) (APEL et al., 2004).

Na Tabela 5 se encontram alguns compostos isolados e/ou identificados em algumas espécies de *Eugenia* e na Figura 18 são apresentadas as estruturas dos compostos indicados na Tabela 5.

Tabela 5 - Compostos isolados de espécies de *Eugenia*.

Espécie	Parte da planta	Compostos isolados	Referências
<i>E. edulis</i>	Folhas	Flavonoides (gossipetin-3,8-dimetil éter-5-O-β-glucosídeo; gossipetin-3,5-dimetil éter; miricetin-3,5,3'-trimetil éter)	Hussein e outros (2003)
<i>E. sandwicensis</i>	Galhos	Triterpenos (ácido 3β-cis-p-coumaroiloxi-2α,23-diidroxolean-12-en-28-óico; ácido 3β-trans-p-coumaroiloxi-2α,23-diidroxolean-12-en-28-óico; ácido 23-trans-p-coumaroiloxi-2α,3β-diidroxolean-12-en-28-óico)	Gu e outros (2001)
<i>Eugenia javanica</i> (<i>Syzygium samarangense</i>)	Frutos	Chalconas (2',4'-diidroxi-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona; 2',4'-diidroxi-3'-metil-6'-metoxichalcona; 2',4'-diidroxi-6'-metoxichalcona)	Simirgiotis e outros (2008)
<i>E. brasiliensis</i>	Folhas	Triterpenos (α -amirina e β -amirina)	Magina, Dalmarco e Dalmarco (2012)
<i>E. uniflora</i>	Frutos	Antocianinas (cianidina-3-O-β-glucopiranosídeo; delphinidina-3-O-β-glucopiranosídeo)	Einbond e outros (2004)

Figura 18 - Estruturas dos compostos isolados mostrados na Tabela 5.



Fonte: autora.

A *Eugenia calycina* Cambess é uma planta da família das Myrtaceae e endêmica do Brasil, sendo encontrada no Cerrado. A presença desta espécie já foi registrada nos estados de Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal (CARDOSO; LOMÔNACO, 2003). *E. calycina* é um arbusto, que tem até 1,5 m de altura, com flores brancas (agosto a novembro) e frutos comestíveis vermelhos (setembro a dezembro) (ARANTES; MONTEIRO, 2002). Na Figura 19 se pode observar os frutos e flores desta espécie.

Figura 19 - Fotografias de frutos e flores da espécie *E. calycina*.



Fonte: autora.

E. calycina se destaca pela produção de frutas no Cerrado (BULLOW; CARMONA; PARENTE, 1994), sendo de interesse na indústria alimentícia. Entretanto, existem poucos estudos desta espécie os quais se concentraram na área de agronomia e biologia (BULLOW; CARMONA; PARENTE, 1994, CARDOSO; LOMÔNACO, 2003), fato que mostra um potencial de atividades a ser avaliada, já que outras do mesmo gênero apresentaram resultados promissores.

2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA BACTÉRIAS DA CAVIDADE BUCAL

A utilização de plantas medicinais tem contribuído significativamente para os primeiros cuidados com a saúde, principalmente quando não se tem acesso a um sistema de saúde adequado. No Brasil, muitas plantas são utilizadas na forma de extratos, infusões ou emplastros para o tratamento de infecções comuns. Várias

pesquisas também vêm sendo desenvolvidas para o descobrimento de novos agentes antimicrobianos, devido ao surgimento de microrganismos resistentes aos medicamentos atuais e a infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes. O Brasil apresenta imensa biodiversidade vegetal e é, portanto, um país com grande potencial de estudos nessa área (OSTROSKY et al., 2008).

Assim, vem crescendo a busca por evidências científicas que comprovem o uso dessas plantas na medicina popular seja através da análise de seus extratos, ou através dos seus óleos essenciais (SUFFREDINI et al., 2004, MICHELIN et al., 2005, LIMA et al., 2006, ALVES et al., 2008, SILVA et al., 2010).

Uma das explicações da capacidade antimicrobiana das plantas é pela produção de compostos bioativos, gerados durante o metabolismo secundário, para se protegerem do ataque de microrganismos. O desenvolvimento da resistência microbiana é de importância global e, recentemente, os antimicrobianos de origem vegetal vêm ganhando atenção especial como possíveis produtos para o controle de bactérias, atrasando ou impedindo o crescimento (SILVA et al., 2010).

Existem relatos da utilização de fitoterápicos e de plantas medicinais no tratamento de algumas doenças relacionadas à saúde bucal (CORDEIRO et al., 2006). As infecções odontológicas tratadas mais comuns relatadas na literatura são: a cárie, a gengivite, a periodontite, a estomatite aftosa e a herpes simples. Algumas dessas infecções são tratadas por meio da fitoterapia utilizando espécies vegetais como o cravo-da-índia, romã, malva, amoreira e camomila (OLIVEIRA et al., 2007).

Assim, dentre as atividades antimicrobianas estudadas, aquelas envolvidas nas doenças bucais têm merecido atenção, tais como cárie e periodontite. A cárie é um problema grave de saúde bucal na maioria dos países industrializados, afetando 60-90% de crianças em idade escolar e a maioria dos adultos (PETERSEN, 2004). Além disso, estudos recentes sugerem que as bactérias orais podem estar associadas com muitas doenças sistêmicas, tais como pneumonia e doenças cardiovasculares (DORN et al., 2010, KUMAR, 2013a), fato que mostra a importância no desenvolvimento de novos antibióticos.

A cavidade bucal é colonizada por muitas espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas, formando biofilmes nas superfícies dos dentes, chamados de placas bacterianas ou placas dentárias. De acordo com Kumar (2013a), mais de 1.000 espécies de bactérias tem sido identificada em cavidades

bucal, sendo que cada pessoa carrega mais de 200 espécies de bactérias. É estimado que 1 mg de placa dental contem mais de dez bilhões de bactérias.

Placas dentárias podem ser removidas mecanicamente durante a escovação dos dentes, mas a utilização de solução para bochechar tem sido interessante para diminuir ou controlar o crescimento do biofilme. Produtos antibacterianos, tais como clorexidina, cloreto de cetilpiridínio e derivados fenólicos são frequentemente utilizados para este fim (BOTELHO et al., 2007).

A resistência dos patógenos às drogas é um dos maiores problemas no tratamento de doenças microbianas. Tem sido relatado que a clorexidina, muito utilizada em produtos de higiene bucal, tem sido pouco efetiva contra cárie dentária em alguns ensaios clínicos, sendo apontada como causa potencial da seleção de bactérias resistente a antibióticos (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2005). Associado a isto, estudos têm mostrado que a clorexidina sofre degradação formando *p*-cloroanilina, o qual é hematóxico e carcinogênico, assim o uso indiscriminado a torna um poluente emergente (ZONG; KIRSCH, 2012, LIMA et al., 2014). Neste contexto, têm sido investigados antimicrobianos de fontes de produtos naturais.

Os óleos essenciais têm se mostrado uma fonte promissora de antimicrobianos contra bactérias orais. Comercialmente já se pode verificar a utilização de óleos essenciais como agentes antiplaca em soluções de bochecho ou em formulações de gel (HAFFAJEE; YASKELL; SOCRANSKY, 2008, YENGOPAL, 2009, CHARLES et al., 2011). Os óleos essenciais de algumas espécies de plantas também tiveram a sua atividade antimicrobiana contra bactérias bucais investigadas, como *Inga laurina* (FURTADO et al., 2014), *Campomanesia pubescens* (CHANG et al., 2011), *Bidens sulphurea* (AGUIAR et al., 2013), *Cassia bakeriana* (CUNHA et al., 2013), *Chrysanthemum indicum* (JUNG, 2009) e *Artemisia iwayomogi* (CHA, 2007), mostrando resultados muito promissores contra variadas bactérias.

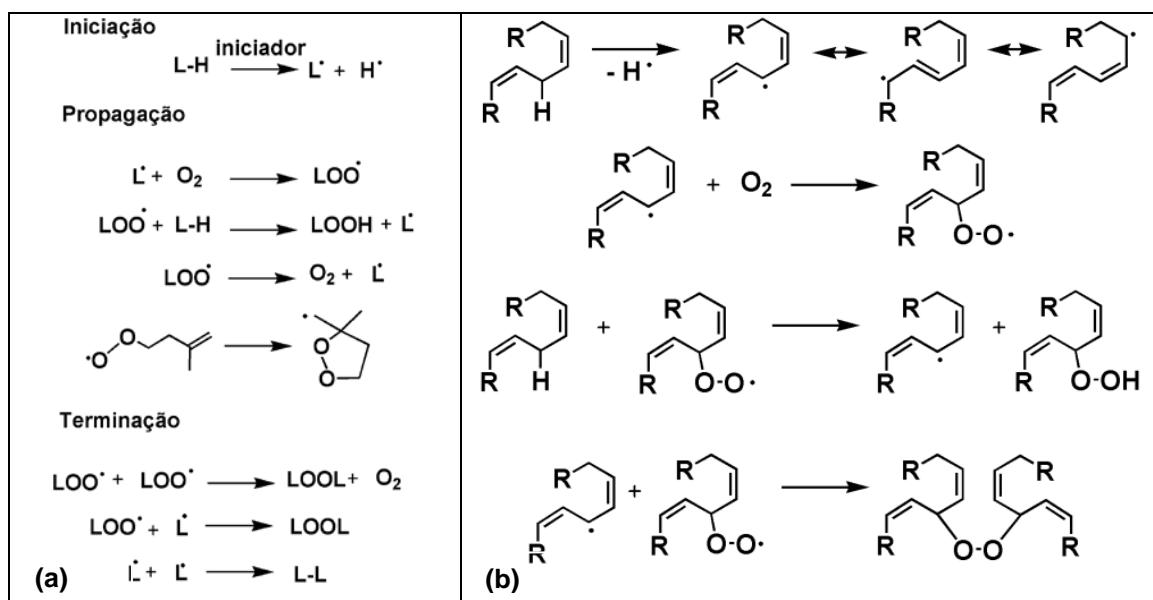
2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A oxidação compreende um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células, produzindo radicais (ROESLER et al., 2007). Todos os sistemas biológicos, exceto os microrganismos anaeróbicos, produzem espécies reativas de oxigênio (ERO), como resultado do seu metabolismo energético (FRIDOVICH, 1999, SORG, 2004). Os EROs são espécies

derivadas de oxigênio que podem ser radicais ou não. São EROs: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$); radical hidroxila (HO^{\bullet}) ou o radical hidroperoxila (HOO^{\bullet}); peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LIMA; BEZERRA, 2012). Em baixo nível, os EROs são importantes em muitos processos bioquímicos, entretanto o seu excesso pode causar sérios problemas celulares, como destruição de membrana celular e danos ao DNA (ZHENG; STORZ, 2000, LIMA; BEZERRA, 2012).

O desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e a degradação dos mesmos é chamado de estresse oxidativo (SIES, 1991). O estresse oxidativo tem sido associado ao processo de envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças como o câncer, diabetes, doenças cardíacas e degenerativas como Alzheimer (ROESLER et al., 2007). As membranas são os componentes celulares mais atingidos pelos EROs. A membrana celular é rica em lipídeos que são vulneráveis à oxidação, levando, portanto, a sua destruição. A Figura 20a mostra as etapas de um processo de oxidação lipídica nas quais são formados os radicais livres.

Figura 20 - Oxidação lipídica: (a) fases do processo; (b) algumas reações.



Fonte: adaptado de Porter, Caldwell e Mills (1995) e Laguerre, Lecomte e Villeneuve (2007).

Na fase inicial, observa-se a quebra homolítica de hidrogênio na posição alfa a dupla ligação através da ação de iniciadores (Figura 20a) que podem ser o radical peroxila (HO^{\bullet}) ou o radical hidroperoxila (HOO^{\bullet}). O L^{\bullet} é estabilizado por estruturas de ressonância (Figura 20b). A fase de propagação é iniciada com a adição de

oxigênio molecular ao L[•] obtido em primeira fase, para se obter o radical peróxido (LOO[•]). Na última fase, o radical peroxila é transformado em compostos de oxidação não radicalares. Este mecanismo principal envolve a cisão da dupla ligação, adjacente ao grupo hidroperoxila, levando à formação de hidrocarbonetos, éteres, aldeídos, álcoois e cetonas, aldeídos voláteis oxidados, triacilgliceróis e seus polímeros (PORTER; CALDWELL; MILLS, 1995, LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

Com a finalidade de proteger os organismos dos radicais gerados pelo estresse oxidativo, existem determinadas substâncias chamadas de antioxidantes. Esses compostos podem prevenir, impedir ou reduzir o dano de oxidação provocado pelos radicais livres (RAMARATHNAM et al., 1995). Eles minimizam o número de danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídeos (DIPLOCK et al., 1998). Portanto, são capazes de proteger o corpo humano de várias doenças (mal de Alzheimer, artrite reumatoide, catarata, diabetes, doença de Parkinson) que são atribuídas às reações com radicais livres que se encontram em excesso (TAKAO et al., 1994). Além disso, por retardarem a oxidação, podem ser utilizados como conservantes, para inibir ou reduzir a oxidação lipídica de alimentos, ração animal e outros produtos, como cosméticos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Atualmente, sabe-se que antioxidantes sintéticos como o 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT) e o *terc*-butil hidroquinona (*t*-BHQ) são prejudiciais à saúde uma vez que podem causar danos ao DNA (SASAKI et al., 2002). Associado a isto, a alta demanda por antioxidantes tem despertado a procura de compostos naturais que sejam alternativos aos sintéticos.

Os compostos fenólicos são essenciais para o crescimento e a reprodução das plantas, sendo originados do seu metabolismo secundário e produzidos em condições de estresse. São excelentes sequestradores de radicais livres, tornando os produtos naturais que os contém uma fonte atrativa de antioxidantes (ANGELO; JORGE, 2007).

A atividade antioxidante desses compostos é devida às suas propriedades redutoras correlacionadas a estrutura química, que desempenham um importante papel na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelatação de metais de transição. Esses compostos agem tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002, SOUSA et al., 2007).

2.5 ATIVIDADE INIBIDORA DA α -AMILASE

As α -amilases são enzimas digestivas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas, portanto, atuam no metabolismo de polissacarídeos (KANDRA, 2003, WHITCOMB; LOWE, 2007, SOUZA, 2011). Os inibidores de α -amilase podem ser utilizados no controle de insetos e pragas, uma vez que estes são dependentes de uma dieta rica em carboidratos para obtenção de energia. Para isso, o desenvolvimento de plantas que expressam inibidores de enzimas digestivas dos insetos representa uma ferramenta promissora para o controle de pragas e insetos. Uma vez que a enzima sendo inibida, a absorção de nutrientes pelo inseto é reduzida, afetando o seu desenvolvimento. Este fato contribui para a redução do uso de inseticidas, que além de selecionar populações de insetos mais resistentes, promove a contaminação da vegetação e, por consequência, dos humanos e animais (FRANCO et al., 2002, MARSARO JÚNIOR et al., 2005).

A inibição da absorção de carboidratos durante a digestão em humanos pode ser também uma alternativa terapêutica no controle glicêmico. Isso porque os picos de glicose pós-prandial podem ser reduzidos, auxiliando no tratamento de doenças, como o diabetes e a obesidade.

Além disso, a inibição desta enzima pode também auxiliar no tratamento de doenças orais (SALES et al., 2012). A enzima α -amilase salivar possui pelo menos três funções biológicas na cavidade bucal: quebra o amido em oligossacarídeos, exercendo a função na digestão de carboidratos; ligar-se ao esmalte dos dentes ou a hidroxiapatita, fato que pode levar a formação de placa dentária; alta afinidade com bactérias bucais, assim ao hidrolisar o amido em glicose, é utilizada como uma fonte de alimento para as bactérias. Por isso a sua inibição pode ser uma alternativa em tratamento de determinadas doenças bucais (KANDRA et al., 2004, FÁBIÁN et al., 2007, SALES et al., 2012).

O *diabetes mellitus* ocorre quando o pâncreas não produz a quantidade suficiente de insulina. A insulina é um hormônio que ajuda a regular o metabolismo, porque estimula a captação da glicose, que se encontra no sangue, para as células. Na *diabetes* tipo 1, o indivíduo não produz insulina, enquanto na *diabetes* tipo 2, o indivíduo até produz a insulina, entretanto essa produção ou é em quantidade insuficiente ou a pessoa se torna resistente a sua ação (DIEHL, 2013). O número de pessoas no mundo com diabetes é muito elevado, no ano 2.000 era cerca de 171

milhões, e estima-se que em 2.030 esse número chegue a 366 milhões de pessoas diabéticas (WILD et al., 2004).

Existem vários fármacos que atuam na estabilização da quantidade de glicose no sangue, dentre eles a acarbose, o miglitol e a metformina. Essas drogas são consideradas hipoglicemiantes porque, no intestino, retardam a digestão e absorção dos carboidratos através da inibição da α -amilase pancreática (responsável por hidrolisar os amidos complexos em oligossacarídeos no intestino delgado) e α -glicosidase da membrana intestinal (responsável pela conversão de oligossacarídeo, trissacarídeo e dissacarídeo em glicose). Com a inibição desta enzima, além de reduzir a hiperglicemia, o alimento leva mais tempo para concluir a digestão, reduzindo a necessidade de novas refeições, amenizando o aumento da glicose no sangue (DIEHL, 2013).

Existem diversos estudos que descrevem o potencial das plantas medicinais como inibidores de α -amilase. Fato importante, pois seria um tratamento alternativo ao existente pela injeção da acarbose, miglitol ou metformina, uma vez que essas drogas apresentam efeitos colaterais, como distensão abdominal, flatulência e diarréia. Esses efeitos colaterais são causados devido à inibição excessiva de α -amilase pancreática, resultando em fermentação bacteriana anormal de carboidratos no intestino. Assim, existe um crescente interesse na busca por novos inibidores de α -amilase com menores efeitos colaterais (SOUZA, 2011, VADIVEL; BIESALSKI, 2011).

Inibidores de α -amilase são encontrados nas sementes da espécie *Phaseolus vulgaris*, conhecido como feijão comum, e em outras espécies do gênero *Phaseolus* (SOUZA, 2011). Uma espécie da família Myrtaceae bastante estudada é a *Syzygium cumini* (*Eugenia jambolana*). Extratos das sementes e dos frutos apresentaram uma redução significativa dos níveis de glicose no sangue de ratos. Outro estudo relatou que o extrato das sementes dessa espécie obteve uma alta inibição sobre a atividade de α -amilase. Os compostos identificados com atividade de inibição foram o ácido betulínico e uma flavanona. Outros flavonoides como quercetina, luteolina, miricetina e eupafolina são descritos como inibidores de α -amilase (SOUZA, 2011). Compostos fenólicos, tais como os flavonoides, apresentam elevada atividade antioxidante, e muitos trabalhos tem mostrado que compostos

com atividade antioxidante também agem como bons inibidores de α -amilase (NWOSU et al., 2011, VADIVEL; BIESALSKI, 2011, KUNYANGA et al., 2012).

Extratos de plantas do Cerrado também mostraram inibição de α -amilase. Diferentes espécies *Byrsonima crassa*, *Calophyllum brasiliense*, *Kielmeyera coriacea* (Clusiaceae), *Qualea grandiflora* e *Qualea parviflora* (Cochsiaceae) apresentam inibições maiores que 70% (SOUZA, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Banho de aquecimento FISATOM modelo 550
- Balança analítica SHIMADZU modelo AUW220D
- Balança de luz infravermelha para determinação da umidade Quimis modelo Kett FD-600
- Rotaevaporador IKA modelo RV 10
- Liofilizador TERRONI modelo LS3000
- Potenciómetro Drop Sens μ Stat 200 e software Drop View 1.0
- Espectrofômetro Genesys 10S UV-Vis
- Espectrofômetro com leitor de microplaca Bioclin Mindray modelo MR 96A
- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) Shimadzu modelo QP2010
- Cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização de chama (CG-DIC) Agilent modelo 7890A
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu modelo SCL-10A VP, equipado com detector SPD-M10A VP tipo rede de diodos
- Espectrômetro de massas Bruker modelos MAxis 3G microTOF e Esquire 3000 Plus
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker modelo DPX500 e DPX300
- Polarímetro digital JASCO modelo DIP-370

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os solventes químicos utilizados foram de grau analítico. Ácido gálico, vanilina, polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) foram adquiridos da Vetec Química Fina LTDA). Rutina, catequina, mistura de alcanos C₈-C₃₀ (pares e ímpares), 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT), 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), β -caroteno, ácido linoleico, monopalmitato de polioxietileno sorbitano (tw/een 40), brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), resazurina, substrato α -(2-cloro-4-

nitrofenil)- β -1,4-galactopyranosilmaltoside (Gal-G2- α -CNP), dicloridrato de clorexidina (CHD) e cisplatina foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O reagente de Folin-Ciocalteau foi adquirido da Cromoline e a queracetina da Arborvita.

3.3 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

Galhos, folhas e flores da *Eugenia calycina* foram coletados na Estação Ecológica do Panga (19°10'52"-19°11'1"S; 48°23'26"-48°23'44"W), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e transportados para o laboratório do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN) da UFU. Em seguida sua exsicata foi preparada, identificada pela especialista Dra. Danielle Reis Napolitano e depositada no Herbário Uberlandenses da UFU com o número 55587. Na Figura 21 é mostrada a fotografia da exsicata obtida.

Figura 21 - Exsicata da *E. calycina* depositada no Herbário Uberlandenses.



Fonte: autora.

Folhas frescas, coletadas no período da manhã, foram utilizadas para a obtenção do óleo essencial. Para o preparo dos extratos de folhas, galhos e flores, os respectivos materiais vegetais foram secos em estufa a temperatura de 35-40 °C. A umidade foi constantemente monitorada até se encontrar entre 8-14%, faixa estabelecida pela Sociedade Brasileira de Farmacognosia (FARMACOPÉIA, 1988, HUBINGER; SALGADO; MOREIRA, 2009). Na sequência, o material vegetal seco

foi triturado em moinho de facas e armazenado em recipientes fechados de vidro até o preparo dos extratos.

3.4 UMIDADE

A umidade do material vegetal foi determinada pelo método gravimétrico através de uma balança de luz infravermelha. A análise foi realizada com cerca de 1,0 g de material vegetal sob temperatura de 105 ± 5 °C, até que o teor de umidade permanecesse constante.

3.5 ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS

3.5.1 Extração do óleo essencial por hidrodestilação

Cerca de 100,0 g de folhas frescas e trituradas foram colocadas em um balão de fundo redondo (capacidade de 2,0 L) e adicionado 1,5 L de água destilada. A extração do óleo essencial foi realizada com o auxílio de um aparelho Clevenger através de refluxo durante 4 horas. Após esse período, o óleo essencial foi removido da água com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, colocado em frasco de vidro e armazenado a -18 ± 5 °C.

3.5.2 Fracionamento do óleo essencial através de cromatografia em coluna

O óleo essencial foi fracionado em coluna de vidro de 30 cm de altura e 3 cm de diâmetro. Cerca de 60,0 g de sílica gel 60 com 0,63-0,2 mm (70-230 mesh) foi utilizada como fase estacionária. Utilizou-se como eluente cerca de 700 mL de diclorometano. Para o fracionamento foi utilizado 0,91 g de óleo essencial dissolvido em 0,5 mL de diclorometano. Foram coletadas 45 frações com cerca de 15,0 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com o perfil observado na cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando fase estacionária sílica gel (60G, indicador de fluorescência) e eluente contendo acetato de etila:metanol (8:2). Foram obtidas ao final 4 frações: F1 (0,67 g, 73,6%), F2 (0,02 g, 2,20%), F3 (0,03 g, 3,30%) e F4 (0,15 g, 16,48%).

3.5.3 Análise do óleo essencial por cromatografia gasosa

O óleo essencial foi analisado por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) para a identificação dos compostos. Foi utilizada uma coluna capilar do tipo DB-5 (5% de fenil e 95% de polidimetilsiloxano, J & W, USA - 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). A análise foi realizada pelo o método proposto por Adams (2007). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1 mL min⁻¹. A temperatura do detector e injetor foi de 220 e 240 °C, respectivamente. O volume de injeção foram de 1,0 μL de solução (5 mg mL⁻¹) em diclorometano (CH₂Cl₂). Foi utilizado o modo split (1:20) de injeção. A temperatura do forno foi programada para aquecer de 60 a 240 °C com velocidade de 3 °C min⁻¹. O detector de massas operou com energia de impacto de 70 eV e foram registrados os fragmentos de 40 a 650 *m/z*. A determinação da porcentagem relativa dos compostos presentes no óleo essencial foi realizada através da análise por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama (CG-DIC) utilizando as mesmas condições do CG-EM e mesma coluna capilar, entretanto foi utilizado nitrogênio como gás de arraste.

3.5.4 Determinação da atividade antimicrobiana contra bactérias da cavidade bucal¹

3.5.4.1 *Microrganismos utilizados*

Bactérias da cavidade bucal foram obtidas de padrões de cepas provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC). As bactérias aeróbicas utilizadas foram: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478). As bactérias anaeróbicas utilizadas foram: *Prevotella nigescens* (ATCC 33563), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285).

¹ As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca, com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

3.5.4.2 Procedimento de análise da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do óleo/frações foi realizada pelo método da microdiluição em caldo em microplacas (CARVALHO et al., 2011, PETROLINI et al., 2013). Neste método foi determinada a menor quantidade de amostra necessária para inibir o crescimento bacteriano, conhecida como “Concentração Inibitória Mínima” (CIM).

O meio de cultura utilizado com as bactérias aeróbicas foi o caldo triptona de soja (TSB) (CLSI, 2012b) e com as bactérias anaeróbicas foi o caldo Schaedler suplementado com hemina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e menadiona ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) (CLSI, 2012a). O preparo dos caldos utilizados se encontra descrito no Apêndice B. A análise da atividade antimicrobiana foi realizada em uma microplaca contendo 96 poços. O inóculo, o caldo e a amostra (óleo/frações) foram adicionados em cada orifício, obtendo-se um volume final de $100 \mu\text{L}$ para as bactérias aeróbicas e $200 \mu\text{L}$ para as anaeróbicas. O volume de inóculo adicionado nos orifícios da microplaca foi de $20 \mu\text{L}$ para os testes com bactérias aeróbicas e $40 \mu\text{L}$ para os testes com bactérias anaeróbicas. O preparo do inóculo se encontra descrito no Apêndice B. O volume de amostra ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de caldo variou conforme a concentração de amostra desejada no orifício. As amostras foram inicialmente preparadas com concentração de $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas para $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando o caldo. A faixa de concentração de amostras utilizada nos experimentos foi de $0,195$ a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. Como controle negativo foi utilizado o DMSO (concentração de 4%, v:v, na microplaca). Como controle positivo foi utilizado o dicloridrato de clorexidina (CHD) (dissolvido em água; $0,0115$ - $5,9 \mu\text{g mL}^{-1}$; concentração na microplaca). Foram realizados controles de esterilidade da CHD, dos caldos, das amostras e do DMSO.

Para os microrganismos aeróbios, as microplacas foram seladas com parafilme e incubadas em microaerofilia pelo sistema chama/vela a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionados $30 \mu\text{L}$ do indicador resazurina (0,01%, em água) em cada orifício. Os microrganismos anaeróbios foram incubados por 72 horas em câmara de anaerobiose (atmosfera contendo: 5 - 10% de H_2 , 10% CO_2 , 80-85% N_2) a 36°C , sendo revelado com o mesmo indicador. A

coloração azul após a adição do indicador representa a ausência de crescimento bacteriano, sendo a coloração vermelha a presença do crescimento bacteriano.

3.5.5 Determinação da citotoxicidade²

A análise da citotoxicidade foi realizada pelo método da microdiluição em microplacas [modificado de Mosmann (1983)] utilizando células epiteliais de linhagens de carcinoma do colo do útero humano (HeLa ECACC 93021013).

Inicialmente foi preparada uma suspensão contendo 5×10^4 células HeLa por mL, cultivada em meio RPMI-1640 suplementado com soro bovino fetal a 10%. No Apêndice C se encontra a descrição do procedimento. Em uma microplaca contendo 96 poços foram adicionados 200 μ L da suspensão de HeLa em RPMI-1640, a placa foi incubada por 4 horas 37 °C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂, ocorrendo à adesão das células no fundo dos poços. Na sequência, o meio de cultura (RPMI-1640) foi removido e as amostras (óleo/frações) foram adicionadas. As amostras foram inicialmente preparadas na concentração de 1.000 μ g mL⁻¹ em metanol e diluídas para a concentração de 640 μ g mL⁻¹ utilizando como solvente o meio RPMI-1640, a qual foi adicionada nos poços da microplaca juntamente com o meio RPMI-1640 para obtenção de concentrações na faixa entre 0,25 e 512 μ g mL⁻¹. O volume final em cada poço foi de 200 μ L e a quantidade de células presente foi de 1×10^4 . O meio RPMI-1640 foi utilizado como controle negativo (100% de células vivas) e a cisplatina foi utilizada como controle positivo (0,1 - 50,0 μ g mL⁻¹). As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera úmida e 5% de CO₂. Em seguida, 100 μ L de solução de brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-ilo)-2,5-difenilo (MTT) (0,5 mg mL⁻¹; dissolvido em RPMI-1640) foram adicionados em cada poço e a microplaca foi novamente incubada por 4 horas sob as mesmas condições. Em seguida, o meio contendo MTT foi substituído por 100 μ L de isopropanol para dissolver todos os cristais de formazana que foram formados. Através de um espectrofotômetro com leitor de microplaca, a absorbância foi medida em 630 nm. Foi calculada a porcentagem de viabilidade celular utilizando a absorbância do controle negativo como 100% de crescimento celular e a absorbância da reação com

² As análises foram realizadas no Laboratório de Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, com a colaboração da Profa. Dra. Valeska B. Guzman e da Dra. Danielle R. Napolitano.

as amostras. A concentração citotóxica para a qual 50% das células são viáveis (CC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de regressão não-linear gerado através da porcentagem de viabilidade celular *versus* as concentrações testadas.

3.6 EXTRATOS DAS FOLHAS, FLORES E GALHOS

3.6.1 Preparação dos extratos por maceração

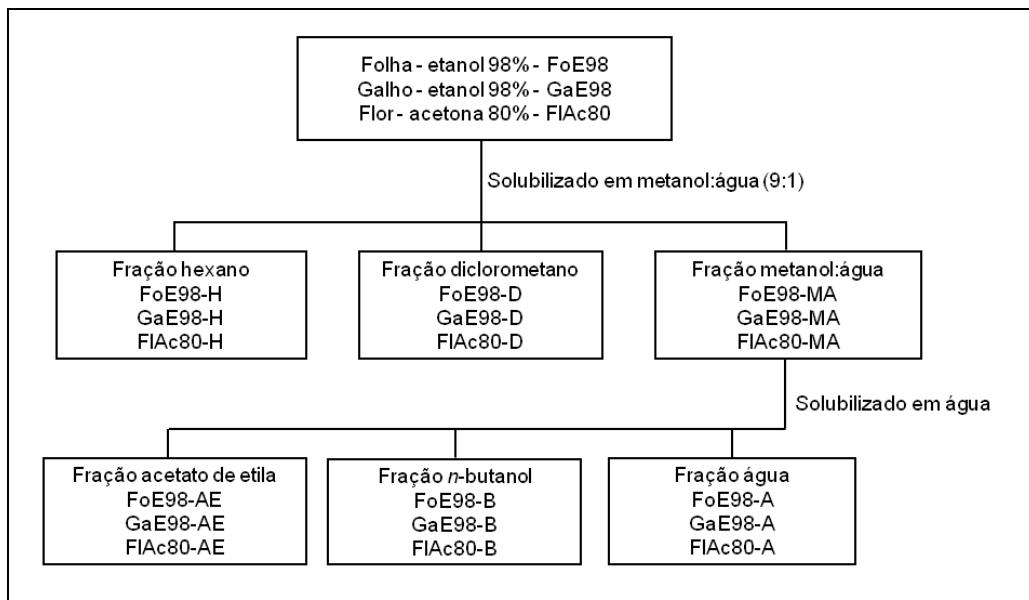
Os extratos do material vegetal foram obtidos através do processo de maceração à temperatura ambiente utilizando erlenmeyer de 2,0 L protegido da luz. Foram utilizados, respectivamente, 314,2, 377,6 e 109,2 g de folhas, galhos e flores previamente secos e triturados. A maceração de folhas e galhos foi realizada utilizando etanol 98% como solvente, para as flores foi utilizada acetona 80%. Cerca de 2,0 L de solvente foram adicionados aos erlenmeyers das folhas e galhos e 600,0 mL para as flores. O material vegetal foi deixado em maceração durante 7 dias. Após este período, a solução com os extrativos foi filtrada, o solvente foi removido em um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C. O extrato foi liofilizado para remoção da água. O processo de maceração com o material vegetal filtrado foi repetido até a exaustão da extração (4 vezes para galhos e 5 vezes para flores e folhas). Os extratos foram armazenados em frascos de vidro a -18 ± 5 °C.

3.6.2 Partição líquido-líquido dos extratos

Os extratos foram solubilizados em 100,0 mL de solução metanol:água (9:1). Com o auxílio de um funil de extração, a partição líquido-líquido foi realizada com solventes de polaridade crescente. Inicialmente foram obtidas as frações em hexano e diclorometano. O solvente da fração metanol:água foi removido por evaporação rotatória e o material resultante liofilizado. Na sequência, a fração metanol:água foi solubilizada em água, recolocada no funil de extração para obtenção das frações acetato de etila, *n*-butanol e água. Os solventes das frações foram removidos por rotoevaporação sob pressão reduzida e banho a 40 °C, sendo as frações submetidas à liofilização para remoção da água remanescente. As frações foram armazenadas em frascos de vidro a -18 ± 5 °C. O fluxograma mostrado na Figura 22

representa o processo de partição líquido-líquido das folhas, galhos e flores e as siglas atribuídas para cada fração obtida.

Figura 22 - Fluxograma do processo de partição líquido-líquido.



Fonte: autora.

3.6.3 Prospecção fitoquímica dos extratos e frações

Para a análise da classe de compostos presentes nos extratos e frações foram preparadas soluções em metanol na concentração de 1 mg mL⁻¹. As soluções foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) com fase estacionária de sílica gel (60G) e indicador de fluorescência. Foram utilizados dois tipos de eluentes (WAGNER; BLADT, 1996): a) hexano:acetato de etila:metanol (3:6:1); b) ácido fórmico:ácido acético: acetato de etila:água (1,1:1,1:10:2,6). Abaixo é descrita a metodologia, de acordo com Wagner e Bladt (1996), para o preparo dos reveladores utilizados na análise:

a) Detecção de terpenos, esteroides, fenol e açúcares

- anisaldeído-ácido sulfúrico: Preparou-se uma solução contendo anisaldeído 5% (v/v) em ácido acético glacial. A esta solução foi adicionado 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem. A placa CCD foi borrifada com o revelador e aquecida a 100 °C por 5 a 10 min.

b) Detecção de terpenos e esteroides

- Liebermann-Burchard: 5,0 mL de anidrido acético e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados cuidadosamente a 50,0 mL de etanol absoluto, sob banho de gelo. A placa foi pulverizada com 10,0 mL da solução e aquecida a 100 °C por 5 a 10 min. A placa foi observada em câmara luz UV (365 nm).

c) Detecção de terpenos, taninos, flavonoides e saponinas

-vanilina: Foi preparada uma solução A contendo vanilina 1% em etanol (m/v) e uma solução B contendo ácido sulfúrico 5% em etanol (v/v). A placa CCD foi borrifada com a solução A seguida da B e aquecida a 100 °C por 5 a 10 min.

d) Detecção de alcaloides

- Dragendorf: Foi preparada uma solução A dissolvendo 0,85 g de nitrato de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial e adicionados 40,0 mL de água destilada sob aquecimento; e uma solução B dissolvendo cerca de 8,0 g de iodeto de potássio em 30,0 mL de água. Preparou-se uma solução estoque misturando a solução (a) e (b) na mesma proporção. A solução reveladora foi preparada com 1,0 mL da solução estoque; 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água.

- Iodocloroplatinado: Foi preparada uma solução A contendo ácido hexacloroplatínico (IV) 5% em água (m/v) e uma solução B contendo iodeto de potássio 10% em água (m/v). A solução reveladora foi preparada com 1,0 mL da solução A, 9,0 mL da solução B estoque e 10,0 mL de água.

e) Detecção de flavonoides

- NP/PEG: Foi preparada uma solução A contendo difenilboriloxietilamina (NP) 1% (m v⁻¹) em metanol; e uma solução B contendo polietileno glicol-4000 (PEG4000) 5% (m v⁻¹) em etanol. A solução reveladora foi preparada com 10,0 mL da solução A e 8 mL da solução B. Após a borrifação, a placa CCD foi observada em câmara de luz UV (365 nm).

- Cloreto de alumínio: Preparou-se uma solução contendo AlCl_3 1% (m v⁻¹) em metanol. A placa CCD foi borrifada com o revelador e observada em luz visível.

3.6.4 Determinação do teor de flavonoides

Utilizando-se a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998), o teor de flavonoides foi determinado para os extratos e frações das folhas, galhos e flores. Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 2,0 mL de solução em metanol do extrato e frações (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 1,0 mL de solução em metanol de AlCl_3 5% (m v⁻¹) e

2,0 mL de metanol. A mistura foi deixada em repouso por 30 min a temperatura ambiente. Em um espectrofotômetro, a absorbância da mistura foi registrada em 425 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado substituindo a amostra por metanol. O resultado foi expresso em *mg* de equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato e material vegetal. Para isto, a quercetina, em variadas concentrações (40 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), foi reagida com a solução de AlCl_3 , sendo construída uma curva analítica da absorbância obtida *versus* concentração de quercetina utilizada.

3.6.5 Determinação do teor de fenóis totais

Utilizando-se a metodologia proposta por Morais e outros (2008), o teor de fenóis totais foi determinado para os extratos das folhas, galhos e flores. Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de solução metanólica do extrato (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 2,5 mL de solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v v^{-1}) e 2,0 mL de uma solução recém preparada de carbonato de sódio 7,5% (m v^{-1}). A mistura foi mantida por 5 min em banho a 50 °C. Em um espectrofotômetro, a absorbância da mistura foi medida em 760 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado utilizando 0,5 mL de metanol. O resultado foi expresso em *mg* de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato. Para isto, o ácido gálico, em variadas concentrações (10 a 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$), foi reagido com o Folin-Ciocalteu, sendo construída uma curva analítica da absorbância obtida *versus* concentração de ácido gálico utilizada.

3.6.6 Determinação do teor de proantocianidinas

Utilizando-se a metodologia proposta por Morais e outros (2008), o teor de proantocianidinas foi determinado para os extratos das folhas, galhos e flores. Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 2,0 mL de solução metanólica do extrato (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 3,0 mL de solução de vanilina (5 mg mL^{-1}) em ácido sulfúrico 70% (m m^{-1}). A mistura foi mantida por 15 min em banho a 50 °C. Em um espectrofotômetro, a absorbância da mistura foi medida em 500 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado utilizando 2,0 mL de metanol. O resultado foi expresso em *mg* de equivalente de catequina (EC) por grama de

extrato. Para isto, a catequina, em variadas concentrações (1 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), foi reagida com a vanilina, sendo construída uma curva analítica da absorbância obtida *versus* concentração de catequina utilizada.

3.6.7 Determinação da atividade antioxidante

3.6.7.1 Método do sequestro do radical DPPH

O procedimento foi realizado segundo Morais e outros (2008) pelo método espectrofotométrico em 517 nm. Inicialmente foi preparada uma solução de DPPH em metanol na concentração de 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (apresentando absorbância 0,99 em 517 nm). Em tubos de ensaio, protegidos da luz, foram adicionados 0,2 mL de solução dos extratos/frações e 2,8 mL DPPH. As soluções dos extratos/frações foram preparadas em metanol nas faixas de concentrações mostradas na Tabela 6 (concentração calculada na cubeta). A mistura contendo extrato/partição e DPPH foi deixada em repouso, a temperatura ambiente, durante 1 hora. Após esse intervalo, a absorbância foi medida no espectrofotômetro em 517 nm. O controle foi realizado substituindo 0,2 mL de extrato/fração por metanol. O branco foi realizado substituindo 2,8 mL de DPPH por metanol. O BHT foi utilizado como controle positivo.

Tabela 6 - Faixa de concentração dos extratos/frações das folhas, galhos, e flores utilizadas na análise da atividade antioxidante pelo sequestro de radical DPPH.

	Concentração de amostra na cubeta ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	Folhas	Galhos	Flores	BHT
extrato	7,1 - 47,2	2,7 - 17,9	2,5 - 33,5	-
hexano	50,0 - 333,3	25,0 - 166,7	31,6 - 267,6	-
diclorometano	16,4 - 109,2	5,7 - 38,0	15,4 - 102,7	-
metanol:água	4,4 - 13,7	2,0 - 13,0	1,4 - 9,6	-
acetato de etila	2,7 - 17,9	1,3 - 8,4	1,3 - 8,6	-
<i>n</i> -butanol	2,5 - 16,7	1,9 - 12,4	2,6 - 17,2	-
água	20,0 - 133,3	5,4 - 36,0	5,2 - 34,5	-
	-	-	-	2,5 - 25,5

Nota: hexano, diclorometano, metanol:água, acetato de etila, *n*-butanol e água são frações dos extratos.

Para o cálculo da porcentagem de atividade antioxidante (AA) que corresponde à porcentagem de DPPH sequestrado foi determinada pela Equação 1:

$$AA = DPPH_{sequestrado} (\%) = \left(\frac{Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{controle}} \right) 100 \quad \text{Equação 1}$$

Sendo: $Abs_{controle}$ é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH, $Abs_{amostra}$ é a absorbância da mistura reacional (DPPH + amostra) após 1 hora de reação, Abs_{branco} é a absorbância da amostra em metanol.

As medidas da concentração eficiente (CE_{50}), que representam a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH, foram calculadas através da regressão linear da curva analítica do gráfico da porcentagem de DPPH sequestrado após 1 hora de reação *versus* as concentrações de extrato/frações.

3.6.7.2 Método de oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

O procedimento foi realizado segundo Jayaprakasha, Singh e Sakariah (2001) pelo método espectrofotométrico a 470 nm. Em um bêquer (capacidade de 250,0 mL) foram adicionados: 20 mg de ácido linoleico, 200 mg de Tween-40 e 400 μ L de uma solução de β -caroteno ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) em clorofórmio. A mistura foi homogeneizada sob atmosfera de nitrogênio, o clorofórmio foi removido a 40 °C durante 40 minutos. Após este período de eliminação do clorofórmio, cerca de 50,0 mL de água destilada³ e previamente saturada de oxigênio⁴ foi adicionada ao bêquer, sendo agitada vigorosamente por cerca de dois minutos, ou até a obtenção de uma emulsão. Em tubos de ensaio foram adicionados 0,2 mL do extratos/frações e 4,0 mL da emulsão. As soluções dos extratos/frações foram preparadas em etanol nas faixas de concentrações mostradas na Tabela 7 (concentrações na cubeta). Foi preparada também uma solução controle contendo 0,2 mL de etanol e 4,0 mL da emulsão. Uma emulsão utilizada como branco para as amostras e o controle foi preparada como descrito anteriormente mas sem a presença do β -caroteno. A

³ O volume de água é adicionado até que a absorbância da emulsão fique entre a 0,6-0,7 em 470 nm.

⁴ A água saturada de oxigênio foi obtida borbulhando oxigênio em água destilada por 30 minutos a temperatura ambiente.

absorbância das misturas contidas nos tubos de ensaio foi medida em espectrofotômetro a 470 nm. Na sequência, os tubos de ensaio foram colocados em banho de aquecimento a 50 °C e a absorbância medida após 180 min de reação. O BHT foi utilizado como controle positivo.

Tabela 7 - Faixa de concentração dos extratos/frações das folhas, galhos e flores utilizadas na análise da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.

	Concentração de amostra na cubeta ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	Folhas	Galhos	Flores	BHT
extrato				-
acetato de etila	5,0 - 150,0	5,0 - 55,0	5,0 - 70,0	-
<i>n</i> -butanol	5,0 - 70,0	10,0 - 100,0	10,0 - 70,0	-
água	5,0 - 150,0	15,0 - 165,0	25,0 - 70,0	-
-	-	-	-	0,31 - 10,0

Nota: acetato de etila, *n*-butanol e água são frações dos extratos.

A atividade antioxidante dos extratos/frações que corresponde à porcentagem de β -caroteno inibida foi calculada através da Equação 2:

$$AA (\%) = \left[1 - \left(\frac{AA_0^{e'} - AA_{180}^{e'}}{AA_0^{c'} - AA_{180}^{c'}} \right) \right] 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$$AA_0^{e'} = A_0^e - A_0^{eb}$$

$$AA_{180}^{e'} = A_{180}^e - A_{180}^{eb}$$

$$AA_0^{c'} = A_0^c - A_0^{cb}$$

$$AA_{180}^{c'} = A_{180}^c - A_{180}^{cb}$$

Sendo: A_0^e a absorbância do extrato/fração descontando o branco em 0 min; A_0^e a absorbância do extrato/fração em 0 min; A_0^{eb} a absorbância do branco do extrato/fração em 0 min; A_{180}^e a absorbância do extrato/fração descontando o branco em 180 min; A_{180}^e a absorbância do extrato/fração em 180 min; A_{180}^{eb} a absorbância do branco do extrato/fração em 180 min; A_0^c a absorbância do controle descontando o branco em 0 min; A_0^c a absorbância do controle em 0 min; A_0^{cb} a absorbância do branco do controle em 0 min; A_{180}^c a absorbância do controle

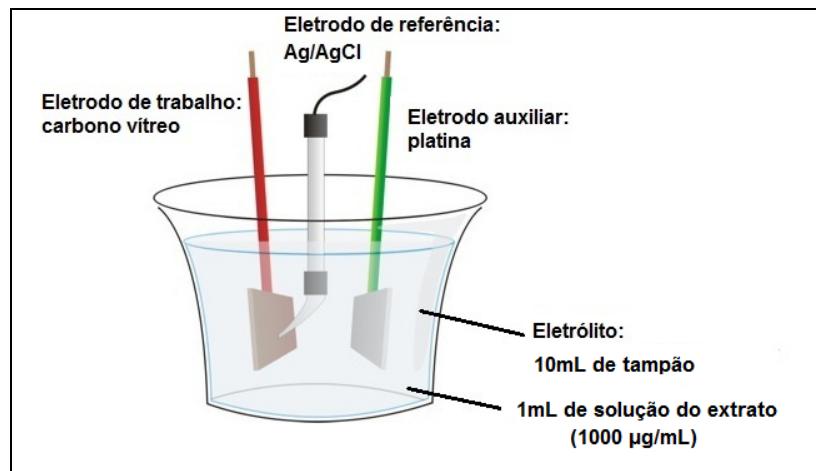
descontando o branco em 180 min; A^c_{180} a absorbância do controle em 180 min; A^{cb}_{180} a absorbância do branco do controle em 180 min.

A concentração do extrato/fração que inibi em 50% a oxidação do β -caroteno (CE_{50}) foi calculada a partir da regressão linear da curva analítica do gráfico de porcentagem de inibição *versus* a concentração do extrato/fração.

3.6.7.3 Voltametria por pulso diferencial

O ensaio por voltametria de pulso diferencial foi realizado no potenciómetro Drop Sens μ Stat 200 sendo utilizado o software Drop View 1.0 para a aquisição dos dados. Uma célula eletroquímica contendo um sistema com três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) foi utilizada no experimento (Figura 23) O eletrodo de trabalho utilizado foi o de carbono vítreo, o de referência de Ag/AgCl (saturado em KCl) e o auxiliar um fio de platina. Os eletrólitos utilizados constituíam de 10,0 mL de solução tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} , pH 7,0 contendo KCl 0,5 mol L^{-1} como eletrólito suporte e 10,0 mL de solução tampão acetato 0,2 mol L^{-1} , pH 4,5 contendo KCl 0,5 mol L^{-1} como eletrólito suporte. Utilizou-se 1,0 mL de solução de extrato/fração de 1000 μ g mL^{-1} em etanol. A velocidade de varredura (Srate) foi 25 mVs^{-1} , sendo aplicada uma faixa de potencial entre - 0,3 a 1,0 V. A altura do potencial (Epuls) foi de 60 mV. A duração do pulso (tpuls) foi de 10 ms. O degrau de potencial (Estep) foi de 6 mV. O tempo de coleta da corrente ("sampling period") foi de 50 ms. O eletrodo de carbono vítreo foi polido entre as medidas voltamétricas.

Figura 23 - Esquema da célula eletroquímica utilizada.



Fonte: adaptado de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Potencioscopia>.

3.6.8 Determinação da atividade inibidora de α -amilase⁵

3.6.8.1 Preparo da fração de saliva enriquecida de α -amilase

Uma fração de saliva enriquecida da enzima α -amilase (HSA-f) foi preparada através da coleta de saliva humana de cinco indivíduos e armazenada a -20 °C por 48 h. As salivas foram descongeladas e centrifugadas a 12.000 xg durante 10 min a 20 °C. O sobrenadante foi fracionado em uma coluna de Q-Sefarose utilizando como fase móvel 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), EDTA 10 mM e 10 mM de tampão EGTA. O volume de exclusão da coluna de Q-Sefarose foi dialisado três vezes em tampão de bicarbonato de amônio (pH 7,0), liofilizado e solubilizadas em tampão PBS (pH 7,2).

3.6.8.2 Procedimento de análise da atividade inibidora de α -amilase

A determinação da atividade inibidora de α -amilase foi realizada por método cinético da reação dela com o substrato α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltoside (Gal-G2- α -CNP), através de microplacas e detecção espectrofotométrica (GOUVEIA et al., 2014).

Uma fração de saliva enriquecida de α -amilase (HSA-f) foi diluída 1.000 vezes em 50 mM de tampão ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico (MES), contendo cloreto de cálcio (5 mM), tiocianato de potássio (140 mM) e cloreto de sódio (300 mM) e apresentando pH 6,0. Foi preparada uma amostra contendo 5 μ L de solução do extrato/fração e 45 μ L da HSA-f diluída 1.000 vezes. Essa amostra foi pré-incubada durante 30 minutos a 37 °C. Adicionaram-se na microplaca 8 μ L da amostra incubada com HSA-f e 320 μ L do substrato Gal-G2- α -CNP (12 mM), sendo a absorbância medida a 405 nm, durante 3 minutos, com intervalo de 1 minuto, a 37 °C. A acarbose foi utilizada como controle positivo. A solução dos extratos/frações e acarbose foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) com concentração de 24 μ g mL⁻¹ e nas faixas de concentrações mostradas na Tabela 8 (concentrações na microplaca).

⁵ As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com a colaboração do Prof. Dr. Foued Salmen Espindola.

Tabela 8 - Faixa de concentração dos extratos/frações das folhas, galhos e flores utilizadas na análise da inibição da enzima α -amilase.

	Concentração de amostra na microplaca ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	Folhas	Galhos	Flores	Acarbose
extrato	0,2 - 24,4	2,4 - 48,8	1,2 - 17,1	-
acetato de etila	0,2 - 12,2	0,6 - 24,4	0,2 - 2,4	-
<i>n</i> -butanol	0,2 - 24,4	0,6 - 24,4	0,2 - 4,9	-
água	2,4 - 64,4	2,4 - 48,8	1,2 - 22,2	-
-	-	-	-	0,0024 - 0,1220

Nota: acetato de etila, *n*-butanol e água são frações dos extratos.

O resultado é dado em porcentagem de inibição de α -amilase, calculado através da Equação 5. As Equações 3 e 4 determinam a atividade da enzima α -amilase em U mL^{-1} e %, respectivamente, e foram utilizadas no cálculo da inibição (Equação 5).

$$\text{Atividade de } \alpha - \text{amilase } (\text{U mL}^{-1}) = \frac{\left(\frac{\Delta \text{Abs}}{\text{min}} \right) V_f F_d}{(\xi V_s I)} \quad \text{Equação 3}$$

$$\text{Atividade de } \alpha - \text{amilase } (\%) = \left(\frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) 100 \quad \text{Equação 4}$$

$$\text{Inibição de } \alpha - \text{amilase } (\%) = 100 - (\text{Atividade de } \alpha - \text{amilase em \%}) \quad \text{Equação 5}$$

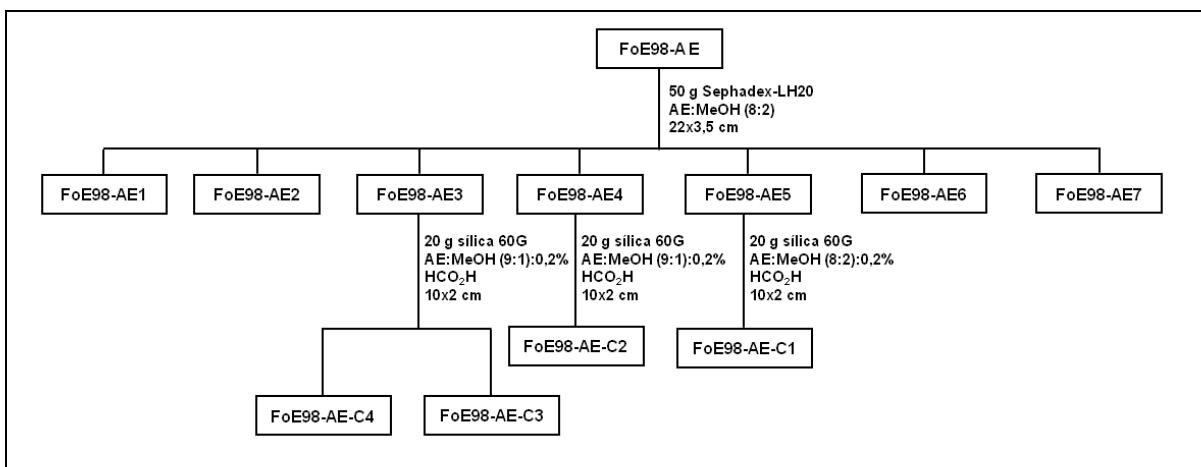
Onde: $\Delta \text{Abs/min} = [(\text{Abs}_3 - \text{Abs}_1)/2]$ é a diferença de absorbância por minuto (Abs = absorbância; 1 e 3 = minutos); V_f é o volume total da reação (328 μL); V_s é o volume de amostra (extrato/fração mais enzima α -amilase, 8 μL); F_d é o fator de diluição as saliva (1000); ξ é o coeficiente de absorvidade do 2-cloro-*p*-nitrofenol; I é o comprimento do percurso da luz (0,97); A_{controle} é a atividade da α -amilase e A_{amostra} é a atividade da α -amilase na presença do extrato/fração.

A concentração do extrato/fração que inibi em 50% a atividade da enzima α -amilase (CE_{50}) foi calculada a partir do gráfico de porcentagem de inibição *versus* a concentração do extrato/fração.

3.6.9 Isolamento de compostos bioativos através de cromatografia em coluna

Como a fração acetato de etila do extrato das folhas (FoE98-AE) apresentou excelente atividade antioxidante, foi utilizada esta fração para o isolamento de compostos bioativos através da cromatografia em coluna. Utilizou-se uma coluna de vidro de 22,0 cm de altura e 3,5 cm de diâmetro. Cerca de 50,0 g de resina sephadex-LH20 foi utilizada como fase estacionária. Na Figura 24 é mostrado um fluxograma com o processo de isolamento dos compostos bioativos.

Figura 24 - Fluxograma do processo de isolamento de compostos bioativos na fração acetato de etila do extrato das folhas.



Fonte: autora.

A eluição foi realizada em gradiente utilizando cerca de 1L de uma mistura de acetato de etila:metanol (8,5:1,5) até a fração 40, na sequencia a coluna foi eluída com 100,0 mL de mistura de acetato de etila:metanol na proporção 7:3, 100,0 mL de 6:4, 100,0 mL de 1:1, 100,0 mL de 3:7 e 200,0 mL contendo 100% de metanol. Para o fracionamento foi utilizado 0,60 g de FoE98-AE, o qual foi dissolvido em uma mistura de acetato de etila:metanol (8,5:1,5). Foram coletadas 110 frações com cerca de 15,0 mL cada.

As frações foram analisadas por CCD utilizando fase estacionária de sílica gel 60 (0,63-0,2 mm, 70-230 mesh, indicador de fluorescência) e eluente contendo uma mistura de ácido fórmico:ácido acético: acetato de etila, água (11:11:100:26). NP-PEG e a vanilina/H₂SO₄ foram utilizados como reveladores. Após análise comparativa da CCD, as frações foram reagrupadas de acordo com a similaridade dos RFs (fator de retenção) em 7 grupos, sendo denominados de FoE98-AE1,

FoE98-AE2, FoE98-AE3, FoE98-AE4, FoE98-AE5, FoE98-AE6 e FoE98-AE7. Essa coluna foi repetida com 0,62 g para que fosse obtido maior quantidade de massa. Nesta nova coluna, as frações foram reunidas respeitando o perfil de CCD definido na coluna anterior.

A atividade antioxidante das 7 frações foi analisada pelo método de sequestro do radical DPPH. De acordo com o perfil cromatográfico e o resultado da atividade antioxidante, as frações FoE98-AE2, AE3 e AE4 foram submetidas a outro fracionamento, sendo utilizado em cada fracionamento cerca de 20 g de sílica gel 60G como fase estacionária e uma coluna uma coluna de vidro de 10,0 cm de altura e 2,0 cm de diâmetro. No fracionamento de FoE98-AE5 foi utilizado 0,033 g e como eluente uma mistura de acetato de etila:metanol (8:2): 0,2% de ácido fórmico, sendo obtido 0,012 g de um composto denominado FOE98-AE5-C1. No fracionamento de FoE98-AE4 foi utilizado 0,45 g e como eluente uma mistura de acetato de etila:metanol (9:1): 0,2% de ácido fórmico, sendo obtido 0,016 g de um composto denominado FOE98-AE4-C2. No fracionamento de FoE98-AE3 foi utilizado 0,16 g e mesmo eluente de FoE98-AE4, sendo obtido 0,068 g de um composto denominado FOE98-AE3-C4 e 0,028 g de um composto denominado FOE98-AE3-C3.

3.6.10 Análise espectroscópica UV-Vis das frações e substâncias isoladas

A análise do espectro de UV-Vis das soluções de extratos/frações foi realizada em um espectrofotômetro utilizando uma varredura de 200 a 600 nm. Na análise foram utilizadas soluções de concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol.

Para compostos isolados, realizou-se o estudo do espectro de UV-VIS com reagentes de deslocamento (“shift reagent”) (BOHM, 1998), sendo eles: AlCl_3 , AlCl_3/HCl , NaOAc e H_3BO_3 .

Nesta análise foi preparada uma solução do composto isolado na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol. Adicionou-se 3,0 mL de solução na cubeta de quartzo para que o espectro fosse registrado. Foi adicionado quatro gotas de AlCl_3 na solução que se encontra na cubeta. Após 30 minutos o espectro foi registrado. A seguir, quatro gotas de HCl foram adicionadas na cubeta contendo a solução com AlCl_3 , sendo o espectro registrado após 30 minutos. Na análise utilizando o NaOAc , cerca de 100 mg do reagente foram adicionadas em 3,0 mL da solução do extrato, deixou-se em repouso por 30 minutos, sendo o espectro

registrado após esse período. Na sequencia, foram adicionadas cerca de 100 mg de H₃BO₃, deixou-se em repouso por 30 minutos para o registro do espetro.

3.6.11 Análise por espectrometria massas

Foram realizadas análises nos equipamentos abaixo:

- Espectrômetro de massas de alta resolução Bruker Daltonics modelo MAxis 3G microTOF com fonte de ionização por *electrospray* (ESI). As amostras foram solubilizadas em metanol e introduzidas utilizando seringa (500 µL), adaptada a uma bomba de infusão direta com fluxo de 200 µ hora⁻¹. O capilar foi aquecido a 200 °C com fluxo de gás nebulizante de 4 L min⁻¹ e 4,5 KV. Os dados foram adquiridos no modo negativo e positivo. A resolução do equipamento é de 2 ppm. Os dados obtidos são medidas de alta resolução de massa e comparadas através do erro (em ppm) calculado em relação a massa exata calculada pela Equação 6.

$$E_{ppm} = \left[\frac{(massa\ exata - massa\ experimental)}{massa\ exata} \right] 10^6 \quad \text{Equação 6}$$

- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas Bruker Daltonics modelo MAxis 3G microTOF com fonte de ionização por *electrospray* (CLAE-ESI-EM/EM). Utilizou-se os mesmos parâmetros do massas do item anterior. Os parâmetros do CLAE foram: coluna Phenomenex modelo Gemini, 4,6 mm de diâmetro interno, 25 cm de comprimento, partículas de 5 µm e poros de 110 Å de diâmetro, fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1%, V/V) (A) e acetonitrila acidificada com ácido fórmico (0,1%, v/v) (B). Foi utilizado o seguinte sistema gradiente de solventes: 5-40% de B (0-80 min); 40-100% de B (80-90 min); 100-40 min (90-100 min); 40-5% de B (100-110 min) e utilizou-se fluxo de 1 mL min⁻¹; fluxo: 1 mL/min, detecção: UV 280 e 360 nm.

- Espectrômetro de massas de baixa resolução Bruker Daltonics modelo Esquire 3000 Plus com fonte de ionização por *electrospray* (ESI). As amostras foram solubilizadas em metanol e introduzidas utilizando seringa (500 µL), adaptada a uma bomba de infusão direta com fluxo de 200 µL hora⁻¹. O capilar foi aquecido a 300 °C

com fluxo de gás nebulizante de 5 L min⁻¹ e 4 KV. Os dados foram adquiridos no modo negativo. A resolução do equipamento é de 50 ppm.

3.6.12 Análise de ressonância magnética nuclear

Os compostos isolados foram analisados por ressonância magnética nuclear (RMN) em equipamentos da marca Bruker modelos DPX300 e DPX 500. As amostras foram dissolvidas em metanol deuterado. As análises foram realizadas em uma dimensão de RMN de ¹H e ¹³C, DEPT135 e as bidimensionais por correlação COSY (“homonuclear correlation spectroscopy”, ¹H x ¹H), HSQC (“heteronuclear single quantum coherence”, ¹H x ¹³C) e HMBC (“heteronuclear multiplebond coherence”, ¹H x ¹³C). Algumas análises foram realizadas nas frequências de 500 e 125 MHz para hidrogênio e carbono, respectivamente, e outras em 300 e 75 MHz.

3.6.13 Determinação da rotação específica

Um dos compostos isolados (FoE98-AE-C1) foi identificado como sendo quiral e, portanto, para a determinação de sua estereoquímica foi determinada a sua rotação específica através da análise do desvio da luz polarizada. A rotação específica foi calculada através da Equação 7. Foi utilizado um polarímetro digital da marca JASCO modelo DIP-370. A amostra foi dissolvida em metanol com concentração de 2 g/ 100 mL. Utilizou-se uma cela com caminho óptico de 0,1 dm. Foi registrada uma temperatura ambiente de 25 °C.

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{100 \times \alpha}{l \times c}$$

Equação 7

Onde: $[\alpha]_D^{25}$ é a rotação específica, α é a rotação observada em graus, l o comprimento do tubo da amostra e c a concentração da amostra em g/100 mL.

3.6.13 Análise por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) utilizada na quantificação dos compostos isolados

Na quantificação dos compostos isolados, os perfis cromatográficos das frações em acetato de etila e *n*-butanol dos extratos de folhas, flores e galhos foram analisados por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD). Foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo SCL-10A VP; coluna de fase reversa C18 da marca Phenomenex modelo Luna, 4,6 mm de diâmetro interno, 25 cm de comprimento, partículas de 5 µm e poros de 100 Å de diâmetro. Foi injetado um volume de 20 µL de solução 3000 µg mL⁻¹. Utilizou-se na fase móvel água acidificada com ácido fórmico (0,1%, V/V) (fase móvel A) e acetonitrila acidificada com ácido fórmico (0,1%, v/v) (fase móvel B). Foi utilizado o seguinte sistema gradiente de solventes: 5-40% de B (0-80 min); 40-100% de B (80-90 min); 100-40 min (90-100 min); 40-5% de B (100-110 min) e utilizou-se fluxo de 1 mL min⁻¹.

Para a quantificação dos compostos isolados foi construída uma curva analítica através do gráfico da área (área do composto/área do padrão interno) em 245 nm *versus* a concentração. Foi utilizado o propilgalato como padrão interno (PI) na concentração de 20 µg mL. As curvas foram preparadas com as seguintes concentrações: rutina 2,29 - 496,0 µg mL; isoquercitrina 7,25 - 844,0 µg mL; quercitrina 8,63 - 932,00 µg mL; epicatequina: 7,25 - 852,00 µg mL. O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de cada curva analítica foi calculado de acordo com as equações mostradas abaixo (RILEY; ROSANSKE, 1996):

$$LD = 3 \left(\frac{\delta}{S} \right) \quad \text{Equação 8}$$

$$LQ = 10 \left(\frac{\delta}{S} \right) \quad \text{Equação 9}$$

Onde: δ é a área do maior ruído observado e S é o coeficiente angular da curva analítica.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar os resultados obtidos utilizou-se o método da Análise de Variância (ANOVA), sendo considerados estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram nível de significância menor que 5 % ($P < 0,05$). E para determinar as diferenças significativas entre as médias considerou-se o teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando o programa SigmaPlot 11.0. No caso da análise de componente principal foi utilizado o programa Statistica 7.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS

4.1.1 Identificação dos compostos presentes no óleo essencial

O óleo essencial (OE) das folhas de *E. Calycina* foi obtido por hidrodestilação utilizando o aparelho Clevenger. A Tabela 9 mostra o rendimento da extração, bem como a quantidade de óleo obtida.

Tabela 9 - Rendimento do processo de extração do óleo essencial por hidrodestilação das folhas de *E. calycina*.

Material vegetal (g)	Umidade (%)	Óleo (g)	Rendimento (%)
105,0±2,0	54,3±0,3	0,18±0,03	0,39±0,06

O rendimento de óleo extraído das folhas de *E. calycina* foi comparável ao obtido por folhas de outras espécies consideradas economicamente importante, como está mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 - Rendimento de óleo essencial de outras espécies.

Espécie	Rendimento do óleo essencial de folhas (%)	Referências
<i>Eugenia uniflora</i>	0,4-1,1	Melo e outros (2007)
<i>Eucalyptus globulus</i>	0,77-1,29	Muller da Silva, Brito e Da Silva Jr (2006)
<i>Psidium guajava</i>	0,13-0,45	Joseph e Priya (2010); Nisha e outros (2011)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	1-2	Carson, Hammer e Riley (2006)

Portanto, além da *E. calycina* apresentar potencial econômico em relação à sua elevada produção de frutos (BULLOW; CARMONA; PARENTE, 1994), esta espécie se destaca por apresentar elevado rendimento de óleo essencial; portanto, seu cultivo pode ser considerado promissor quando comparado ao de outras espécies da família Myrtaceae.

Em órgãos vegetativos e reprodutores das plantas são encontradas estruturas secretoras de produtos oriundos do metabolismo secundário. Estas estruturas minimizam o risco de autotoxicidade e permitem níveis crescentes de

componentes metabólicos em locais onde é necessária sua defesa e/ou atração. As estruturas secretoras variam conforme a família, resultado na diferenciação da composição do metabólito e em sua quantidade. As espécies da família Myrtaceae se destacam na produção de óleo essencial por apresentar cavidades (=bolsas) e canais secretores por toda superfície foliar (METCALFE; CHALK, 1979, FIGUEIREDO et al., 2008). Assim, justifica-se o elevado rendimento observado para a *E. calycina*.

Com a finalidade de correlacionar a atividade antimicrobiana do óleo essencial com a classe de compostos presentes, este óleo foi fracionado através de coluna cromatográfica utilizando diclorometano como eluente e sílica gel como fase estacionária, sendo obtida quatro frações: F1 (73,6%) F2 (2,2%), F3 (3,3%) e F4 (16,5%).

Através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi possível identificar os compostos presentes no óleo essencial e frações. A identificação dos compostos se baseou em três metodologias de análise dos dados do CG-EM.

Na primeira delas, os espectros de massas obtidos na análise foram comparados com os de bibliotecas presentes no software LabSolution-GCMS Solution (Nist08, Wiley139, Wiley229 and ShimDemo, Shim2205). Essa comparação foi realizada entre os padrões de fragmentação mostrados pela biblioteca e do composto analisado. Além disso, o software do equipamento fornece um índice de similaridade, resultante da comparação com os espectros dos compostos sugeridos por determinadas bibliotecas. Nessa análise, para a identificação dos compostos foi considerado apenas aqueles índices de similaridade com valores superiores à 94%.

Na segunda análise foi calculado um parâmetro chamado de índice aritmético (IA) que correlaciona o tempo de retenção dos compostos analisados aos de alkanos. Nesta correlação é considerado o número de carbonos dos alkanos que apresentam tempos de retenção próximos ao do composto analisado. O IA foi calculado através da Equação 10, utilizando o tempo de retenção do composto analisado e dos padrões de alkanos (C₈-C₃₀) previamente injetados utilizando a mesma metodologia.

$$IA(x) = 100 C(P_z) + 100 \left[\left(\frac{(T_R(x) - T_R(P_z))}{T_R(P_{z+1}) - T_R(P_z)} \right) \right] \quad \text{Equação 10}$$

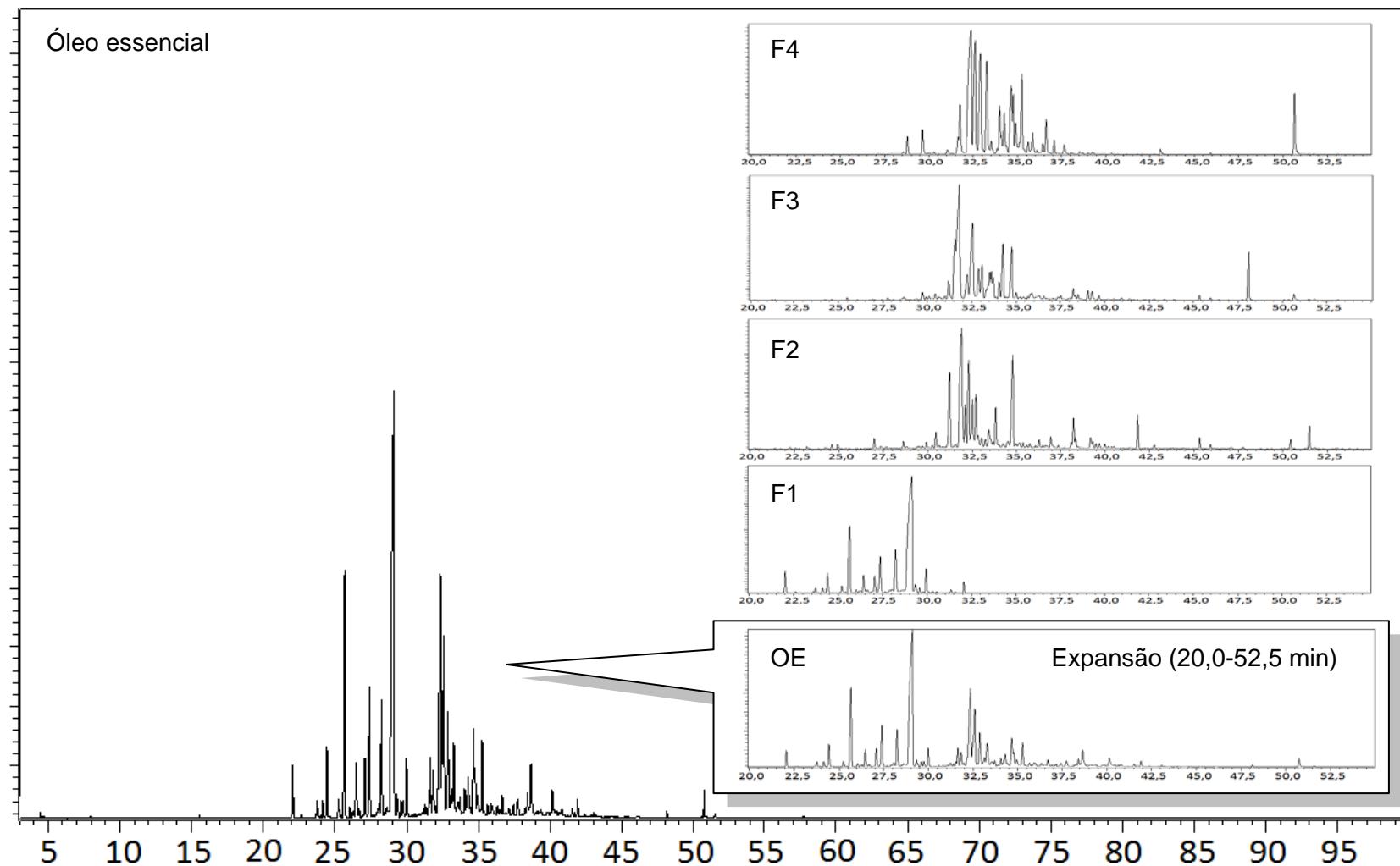
Onde: T_R é o tempo de retenção (min); C é o número de carbonos; x é o composto analisado, P_z é o alcano que apresenta T_R anterior a x ; P_{z+1} é o alcano com T_R posterior a x . No Apêndice A se encontram os tempos de retenção dos padrões de alcanos (C₈-C₃₀) utilizados nos cálculo dos IAs.

O IA calculado é, portanto, comparado ao IA de compostos isolados que se encontram tabelados por Adams (2007). Isso é possível somente porque as condições utilizadas na análise por CG-EM são idênticas às da referência.

Na terceira análise, o IA calculado foi comparado com os de outras literaturas que utilizaram a mesma metodologia do Adams (2007). Esses dados foram obtidos através da NIST-National Institute of Standard and Technology (2014).

No cromatograma do óleo essencial obtido por CG-EM, mostrado na Figura 25, é possível verificar que os componentes apresentam tempo de retenção entre 20,0 e 52,5 min. Nesta figura estão apresentados os cromatogramas expandidos das frações do óleo (F1, F2, F3 e F4) obtidas por coluna cromatográfica. Assim, é possível verificar que no cromatograma referente à F1 os compostos apresentam tempos de retenção (T_R) menores aos das frações F2, F3 e F4. É possível observar também, que os compostos presentes na F1 não se encontram nas demais frações. A Tabela 11 mostra a composição química tanto para o óleo quanto para as frações.

Figura 25 - Perfil cromatográfico óleo essencial das folhas de *E. calycina* e de suas frações.



Fonte: autora

Tabela 11 - Composição química do óleo essencial das folhas de *E. calycina* e suas frações.

(continua)

T _R (min)	Compostos	IA		Área relativa – CG-DIC (%)				Método de identificação	
		Literatura	Calculado	OE	F1	F2	F3		
22,08	δ-elemeno (1)	1339	1341	1,66	4,73	-	-	-	i, ii, iv
23,72	α-copaeno (2)	1374	1379	0,48	0,36	-	-	-	i - iii
24,11	α-bourboneno (3)	1387	1388	0,46	0,35	-	-	-	i - iii
24,46	β-elemeno (4)	1392	1396	1,79	1,88	-	-	-	i, ii, iv
25,22	α-gurjuneno (5)	1409	1414	0,36	0,65	-	-	-	i - iii
25,64	β-cariofileno (6)	1425	1424	8,57	11,42	-	-	-	i, ii, iv
26,48	aromadendreno (7)	1439	1444	1,44	0,81	-	-	-	i - iii
27,07	α-humuleno (8)	1456	1458	1,32	1,45	-	-	-	i, ii, iv
27,28	alloaromadendreno (9)	1462	1463	3,34	3,62	-	-	-	i, ii, iv
28,24	germacreno D (10)	1484	1486	0,78	5,72	-	-	-	i - iii
28,75	epicubebol (11)	1496	1498	-	-	-	-	1,09	i, ii, iv
28,87	biciclogermacreno (12)	1500	1501	19,30	65,57	-	-	-	i - iii
29,31	germacreno-A (13)	1508	1512	0,42	0,58	-	-	-	i - iii
29,59	n.i. (s.)	-	1519	0,38	0,31	-	-	-	-
29,71	cubebol (14)	1514	1522	0,33	-	-	-	1,43	i - iii
29,99	δ-cadineno (15)	1529	1529	0,77	1,88	-	-	-	i, ii, iv
30,39	n.i. (s.)	-	1539	-	-	1,95	-	-	-
31,14	n.i. (s.o.)	-	1558	-	-	11,26	1,95	-	-
31,54	epiglobulol (16)	1564	1568	0,59	-	-	9,39	-	i, ii, iv
31,62	(E)-nerolidol (17)	1569	1570	0,47	-	-	33,17	0,44	i, ii, iv
31,82	maaliol (18) ^a + palustrol (19) ^b	1566 ^a , 1567 ^b	1575	1,95 ^{a,b}	-	32,51 ^b	-	3,80 ^a	i - iii ^{a,b}
32,10	germacreno D-4-ol (20) ^a + farnesil ciano (21) ^b	1574 ^a -	1582	0,40 ^{a,b}	0,66 ^b	0,48 ^a	0,86 ^a	-	i - iii ^a , i, ii ^b

Tabela 11 - Composição química do óleo essencial das folhas de *E. calycina* e suas frações.

(continuação)

<i>T_R</i> (min)	Compostos	IA		Área relativa – CG-DIC (%)				Método de identificação
		Literatura	Calculado	OE	F1	F2	F3	
32,22	espatulenol (22) ^a + n.i. (s.o.) ^b	1585 ^a	1585	21,36 ^a	-	12,81 ^b	-	31,13 ^a i, ii, iv ^a
32,42	óxido de cariofileno (23) ^a + gleenol (24) ^b + globulol (25) ^c + n.i. (s.o.) ^d	1582 ^a , 1587 ^b , 1590 ^c	1590	7,71 ^{a,b,c}	-	4,36 ^b	15,81 ^a	13,05 ^{c,d} i - iii ^{a,b,c}
32,66	n.i. (s.o.)	-	1596	-	-	5,66	-	-
32,86	viridiflortal (26) ^a + salivial-4(14)-en-1-ona (27) ^b + cubeban-11-ol (28) ^c + n.i. (s.o.) ^d	1594 ^a , 1594 ^b , 1595 ^c	1601	3,43 ^a	-	0,64 ^b	3,57 ^{a,d}	11,51 ^{a,c} i, ii, iv ^{a,c} , i - iii ^b
33,12	n.i. (s.o.)	-	1608	1,53	-	-	3,84	-
33,16	rosifolol (29) ^a + n.i. (s.o.) ^b	1600 ^a	1609	1,75 ^{a,b}	-	-	0,93 ^b	7,50 ^a i - iii ^a
33,35	β-oplopenona (30)	1607	1614	-	-	2,71	-	-
33,47	n.i. (s.o.)	-	1617	-	-	-	-	0,77
33,50	epóxido de humuleno II (31)	1608	1618	0,65	-	-	3,48	-
33,58	n.i. (s.o.)	-	1620	-	-	-	2,54	-
33,66	n.i. (s.o.)	-	1622	0,49	-	-	1,45	-
33,77	junenol (32)	1618	1625	-	-	4,95	-	-
33,92	n.i. (s.o.)	-	1629	-	-	-	-	2,28
34,04	n.i. (s.o.)	-	1632	1,18	-	-	1,02	0,57
34,27	1-epi-cubenol (33)	1629	1638	1,30	-	-	7,11	2,69
34,57	isoespatulenol (34) ^a + cubenol (35) ^b + epi-α-cadinol (36) ^c + n.i. (s.o.) ^d	1641 ^a , 1645 ^b , 1646 ^c	1646	2,62 ^{a,d}	-	16,49 ^b	7,45 ^c	5,68 ^a i, ii, iv ^a , i - iii ^{b,c}
34,76	epi-α-muurolol (37)	1643	1651	1,08	-	-	-	3,12
34,87	α-muurolol (38) ^a + n.i. (s.o.) ^b	1651	1654	1,01 ^a	-	-	0,62 ^b	1,26 ^a i, ii, iv

Tabela 11 - Composição química do óleo essencial das folhas de *E. calycina* e suas frações.

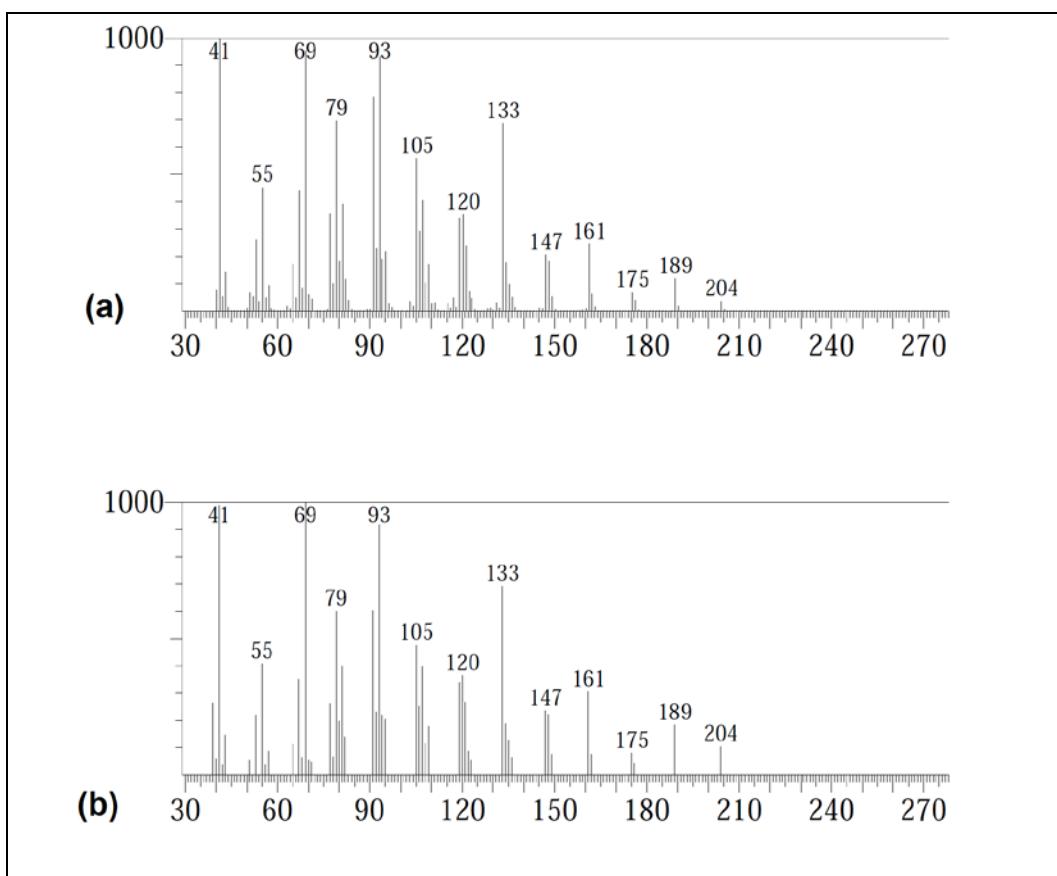
(conclusão)

T_R (min)	Compostos	IA		Área relativa – CG-DIC (%)				Método de identificação	
		Literatura	Calculado	OE	F1	F2	F3		
35,25	α -cadinol (39)	1662	1664	1,75	-	-	-	5,83	i, ii, iv
35,52	n.i. (s.o.)	-	1671	0,67	-	-	-	0,64	-
35,86	n.i. (s.o.)	-	1680	0,57	-	-	1,19	1,36	-
36,43	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol (40) ^a + n.i. (s.o.) ^b	1685 ^a	1695	0,32 ^{a,b}	-	-	-	0,60 ^{a,b}	i - iii
36,66	n.i. (s.o.)	-	1701	0,66	-	-	-	1,73	-
37,06	n.i. (s.o.)	-	1712	0,28	-	-	-	0,70	-
37,68	n.i. (s.o.)	-	1729	0,84	-	-	-	0,09	-
38,23	isobiciclogermacrenal (41)	1733	1744	0,18	-	3,12	1,02	-	i - iii
38,41	n.i. (s.o.)	-	1749	1,41	-	-	-	-	-
38,63	n.i. (s.o.)	-	1755	2,05	-	-	-	-	-
39,03	isobiciclogermacrenal isômero (42)	-	1766	-	-	-	0,58	-	i, ii
39,32	drimenol (43)	1766	1774	0,65	-	-	0,69	-	i - iii
40,12	8- α -acetoxielemol (44)	1792	1796	0,87	-	-	-	-	i - iii
41,90	hexaidrofarnesil acetona (45)	1844	1847	0,35	-	2,0	-	-	i, ii, iv
48,10	(<i>E,E</i>)-geranil linalool (46)	2026	2033	0,10	-	-	3,32	-	i - iii
50,73	fitol (47)	2115	2117	0,38	-	-	-	2,72	i, ii, iv
51,45	n.i.	-	2141	-	-	1,06	-	-	-
Compostos identificados (%)				88,69	99,69	67,25	85,56	88,44	

Nota: *Provavelmente a presença do composto 21 foi devido a alguma contaminação durante o processo de extração do óleo essencial; T_R = tempo de retenção, IA = índice aritmético, OE= óleo essencial, n.i. = não identificado, s.o. = sesquiterpeno oxigenado, s. = sesquiterpeno. Método de identificação: (i) índice de similaridade entre os espectros de massas da biblioteca (Shim, Wiley e Nist Libraries) e o obtido, (ii) comparação entre os espectros de massas da biblioteca (Shim, Wiley and Nist Libraries) e o obtido, (iii) comparação entre o IA calculado e do Adams (2007) e (iv) comparação entre o IA calculado e da NIST (2014).

Na Figura 26 está apresentado o espectro de massas do composto com tempo de retenção em 25,64 min. Pela análise foi possível constatar que se refere ao sesquiterpeno β -cariofileno ($C_{15}H_{24}$), sendo, portanto, observada a presença do pico referente ao íon molecular m/z 204.

Figura 26 - Espectro de massa do β -cariofileno: a) obtido da análise por CG-EM; b) biblioteca Wiley229.



Fonte: autora.

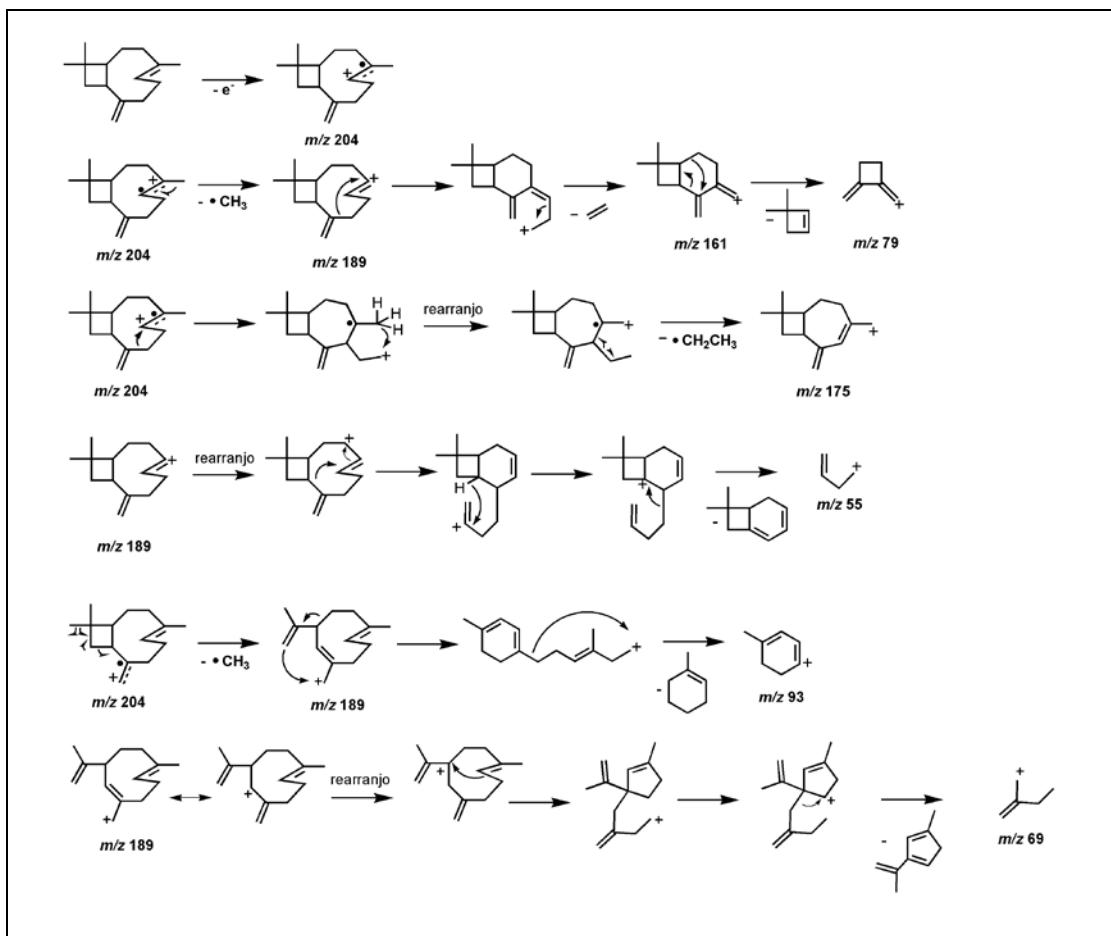
O espectro de massas do β -cariofileno apresenta picos referentes às seguintes fragmentações:

- m/z 189 [M-15] referente à perda de um radical metila pelo íon molecular m/z 204;
- m/z 175 [M-29] referente à perda de um radical etila pelo íon molecular m/z 204;
- m/z 161 [M-15-28] referente à perda de eteno pelo fragmento m/z 189;

- m/z 93 [M-15-84] referente à perda de 1-metilcicloeno pelo fragmento m/z 189;
- m/z 79 [M-15-28-83] referente à perda de 3,3-dimetilciclobuteno pelo fragmento m/z 161;
- m/z 69 [M-15-120] referente à perda de 1-metil-3-(prop-1-en-2-il)ciclopent-1,3-dieno pelo fragmento m/z 189;
- m/z 55 [M-15-134] referente à perda de 7,7-dimetilbiciclo[4.2.0]octa-1,3-dieno pelo fragmento m/z 189.

Na Figura 27 se encontram propostas de mecanismos para algumas fragmentações (m/z) observadas no espectro de massas.

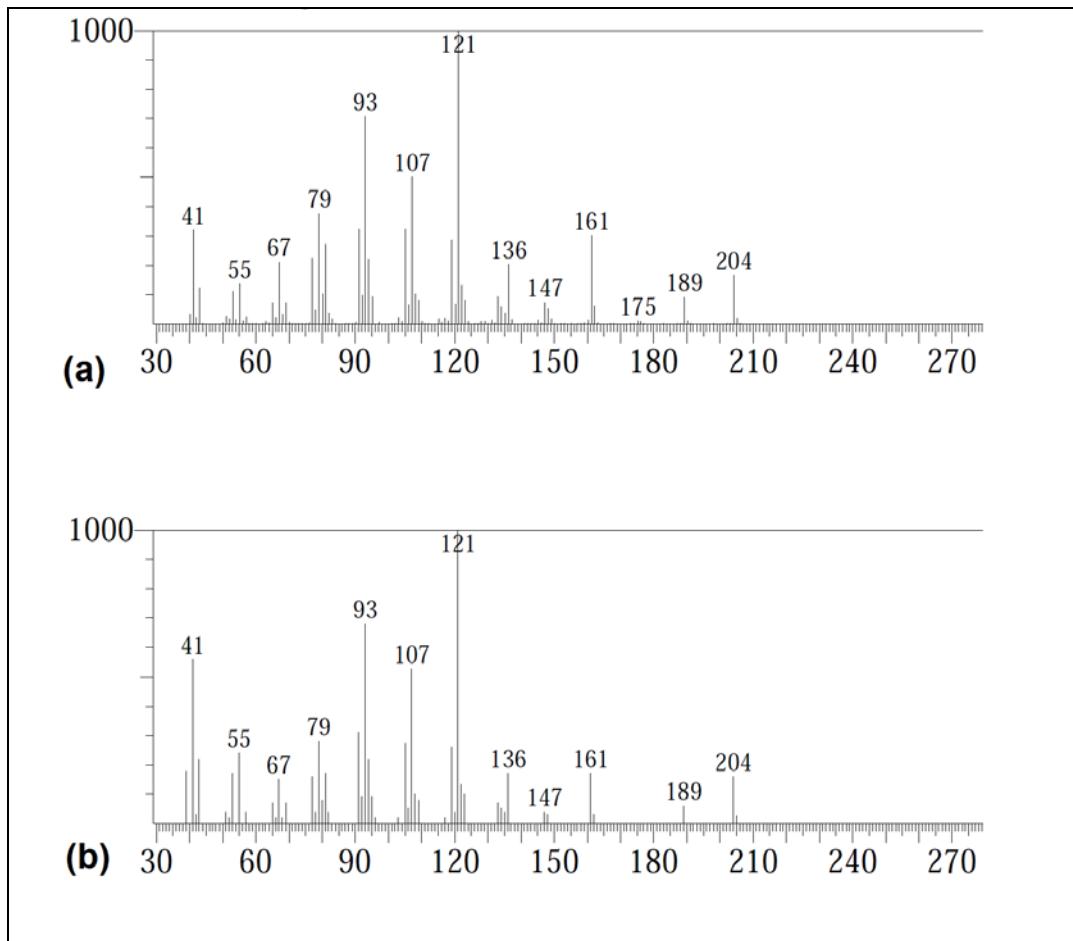
Figura 27 - Propostas de fragmentações do β -cariofileno.



Fonte: autora.

Na Figura 28 se encontra o espectro de massas do composto com tempo de retenção em 28,87 min. Pela análises foi verificado que este se refere ao sesquiterpeno biciclogermacreno ($C_{15}H_{24}$), íon molecular m/z 204.

Figura 28 - Espectro de massa do biciclogermacreno: a) obtido da análise por CG-EM; b) biblioteca Wiley229.



Fonte: autora.

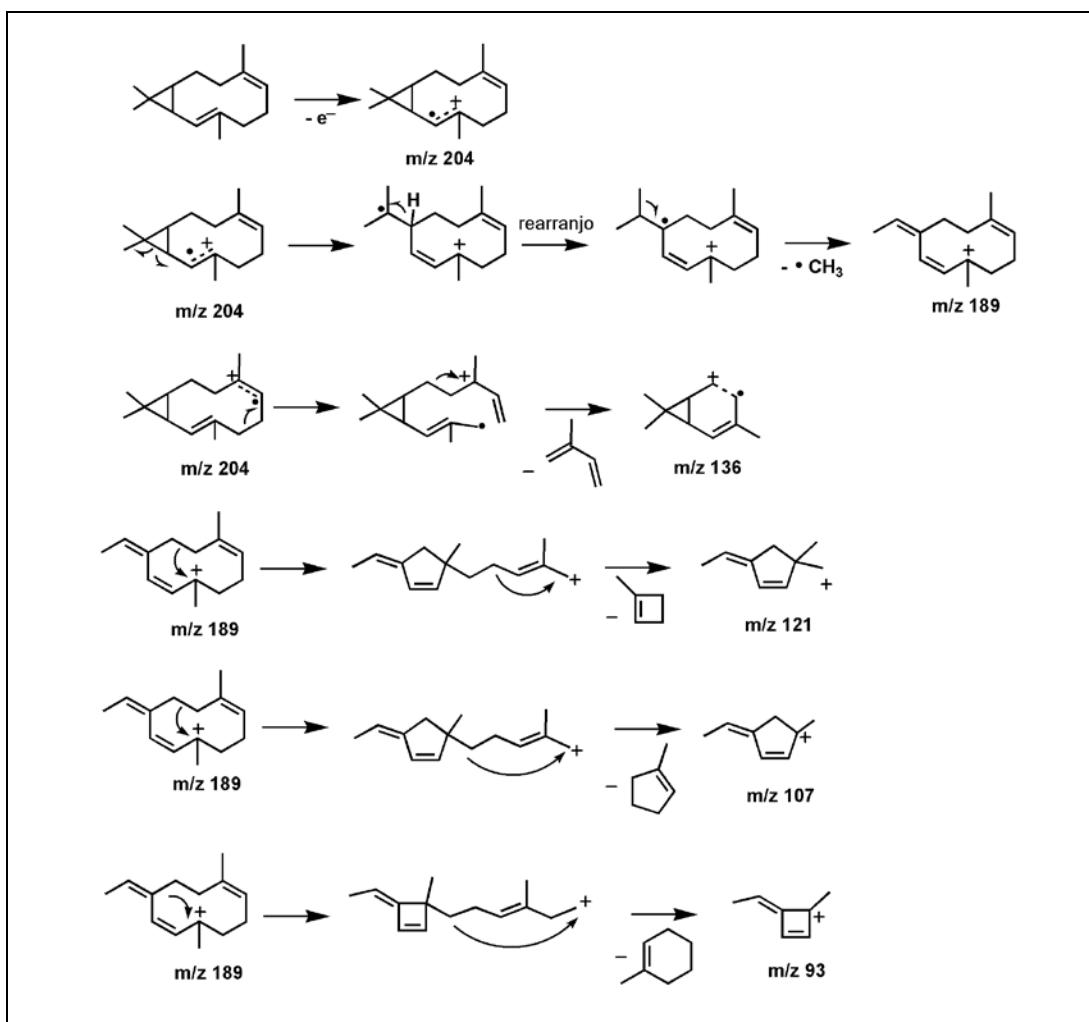
O espectro de massas do biciclogermacreno apresenta picos referentes às seguintes fragmentações:

- m/z 189 [M-15] referente à perda de um radical metila pelo íon molecular m/z 204;
- m/z 136 [M-68] referente à perda de 2-metilbuta-1,3-dieno pelo íon molecular m/z 204;

- m/z 121 [M-15-68] referente à perda de 1-metilciclobuteno pelo fragmento m/z 189;
- m/z 107 [M-15-82] referente à perda de 1-metilciclopenteno do fragmento m/z 189;
- m/z 93 [M-15-96] referente à perda do fragmento de 1-metilcicloexeno do fragmento m/z 189.

Na Figura 29 se encontram propostas de mecanismos para algumas fragmentações (m/z) observadas no espectro de massas.

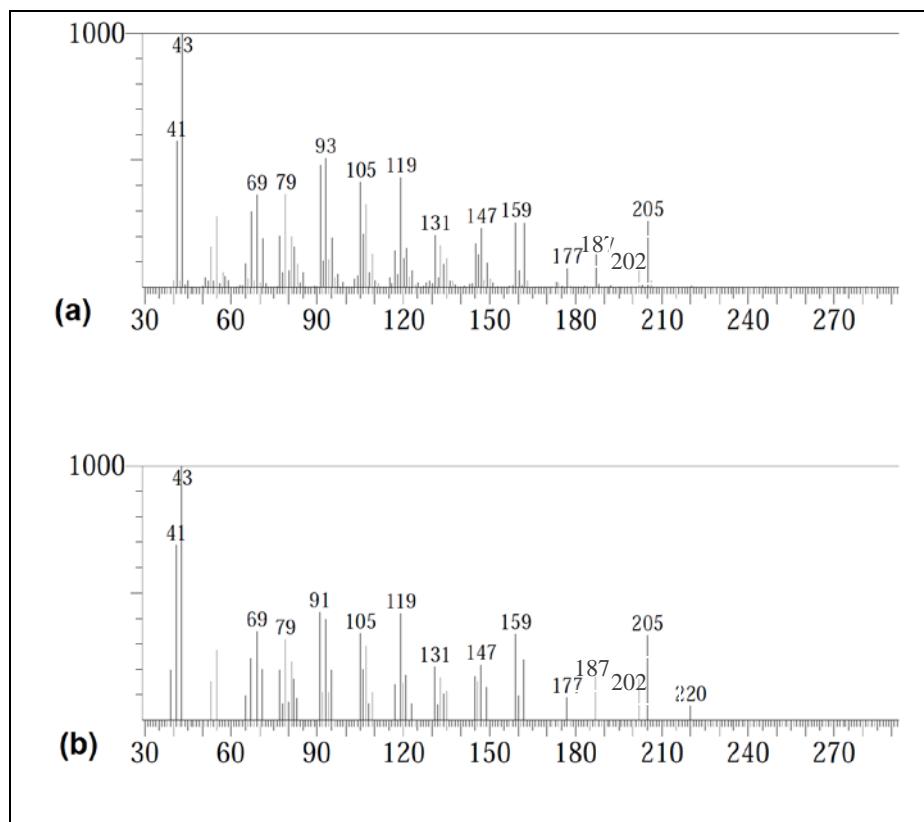
Figura 29 - Propostas de fragmentações do biciclogermacreno.



Fonte: autora.

Na Figura 30 se encontra o espectro de massas do composto com tempo de retenção em 32,22 min. Pela análises foi verificado que este se refere ao sesquiterpeno oxigenado espatulenol ($C_{15}H_{24}O$), íon molecular m/z 220.

Figura 30 - Espectro de massa do espatulenol: a) obtido da análise por CG-EM; b) biblioteca Wiley139.



Fonte: autora.

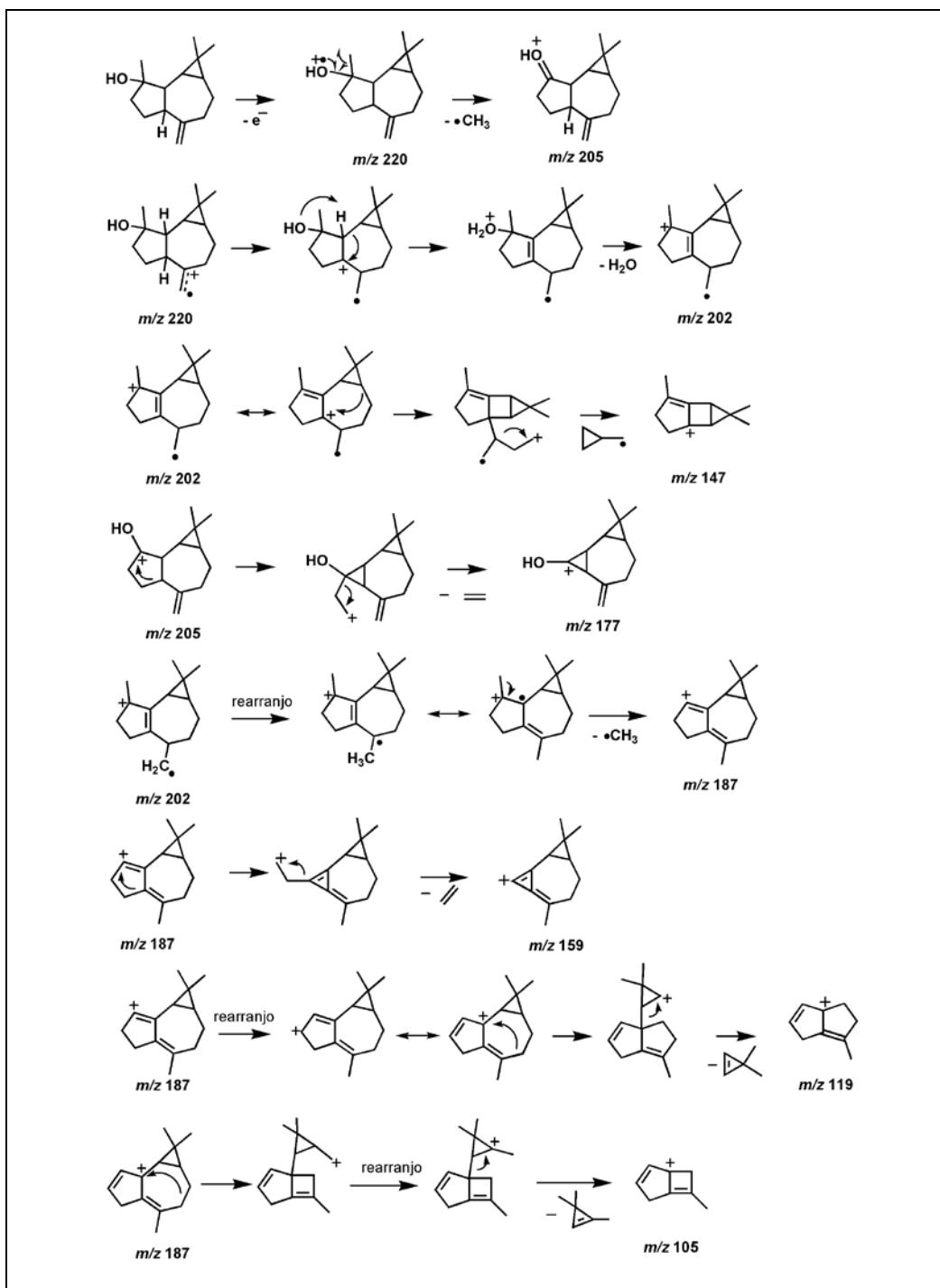
O espectro de massas do espatulenol também apresenta picos referentes às seguintes fragmentações:

- m/z 205 [M-15] referente à perda de um radical metila pelo íon molecular m/z 220;
- m/z 202 [M-18] referente à perda de água pelo íon molecular m/z 220;
- m/z 187 [M-18-15] referente à perda de um radical metila pelo fragmento m/z 202;
- m/z 177 [M-15-28] referente à perda de um eteno pelo fragmento m/z 205;
- m/z 159 [M-18-15-28] referente à perda de eteno pelo fragmento m/z 187;
- m/z 147 [M-18-55] referente à perda de radical metilciclopropila pelo fragmento m/z 202;
- m/z 119 [M-18-15-68] referente à perda de 3,3-dimetilpropeno pelo fragmento m/z 187;

- m/z 105 [M-18-15-82] referente à perda de 1,3,3-trimetilciclopropeno pelo fragmento m/z 187.

Na Figura 31 se encontram os mecanismos propostos para algumas fragmentações (m/z) observadas no espectro de massas.

Figura 31 - Propostas de fragmentações do espatulenol.



Fonte: autora.

No óleo essencial foram identificados trinta e nove compostos, o que representa 88,44% do total. Na Tabela 12 se encontra a classificação dos compostos presentes no óleo essencial e nas frações. Sesquiterpenos não oxigenados e oxigenados representam a grande maioria do óleo. Diterpenos oxigenados se encontram em menor quantidade e monoterpenos não foram observados.

Tabela 12 - Classificação dos compostos presentes no óleo essencial das folhas de *E. calycina* e suas frações.

Grupos funcionais	OE (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)
Sesquiterpenos	40,69 (13)	99,69 (14)	-	-	-
n.i. (sesquiterpenos)	0,38 (1)	0,31 (1)	1,95 (1)	-	-
sesquiterpenos oxigenados	46,93 (24)	-	67,05 (9)	82,24 (11)	85,72 (14)
n.i. (sesquiterpenos oxigenados)	11,51 (10)	-	29,73 (2)	14,44 (8)	11,56 (9)
diterpenos oxigenados	0,48 (2)	-	-	3,32 (1)	2,72 (1)
n.i.	-	-	1,06 (1)	-	-

n.i. = não identificado; o número em parênteses se refere ao número de componentes.

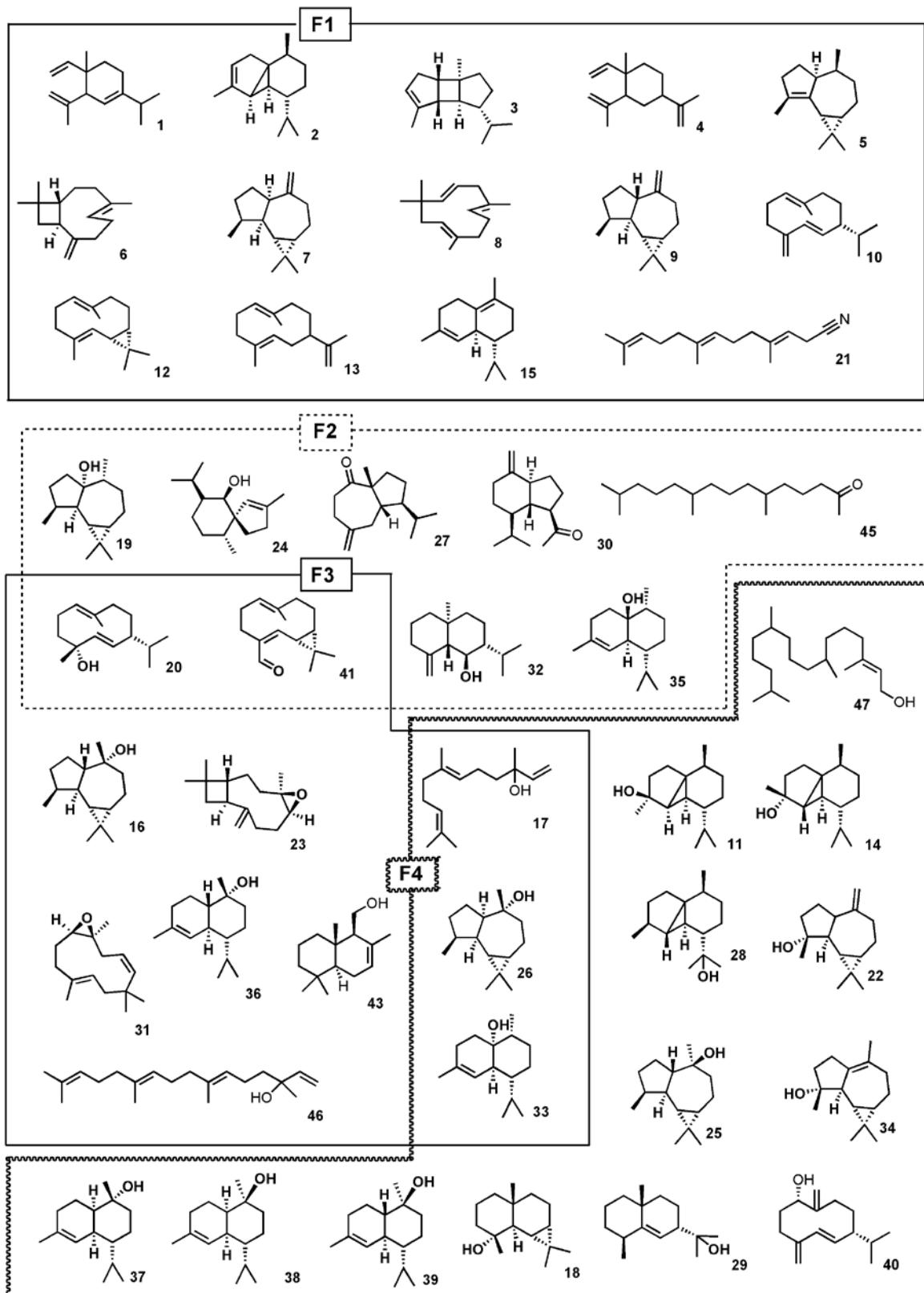
Os sesquiterpenos não oxigenados representam 41,07% do óleo essencial, e seus constituintes majoritários são biciclogermacreno (**12**) (19,30%), β -cariofileno (**6**) (8,57%), alloaromadendreno (**9**) (3,34%) e β -elemeno (**4**) (1,79%). Enquanto que os sesquiterpenos oxigenados representam 58,45% do óleo essencial, sendo que seus constituintes majoritários são espatulenol (**22**) (21,36%), viridiflorol (**26**) (3,43%) e uma mistura contendo óxido de cariofileno (**23**), gleenol (**24**) e globulol (**25**) (7,71%). O rendimento dos diterpenos oxigenados foi de apenas 0,48%, sendo identificados o (*E,E*)-geranil linalol (**46**) (0,10%) e o fitol (**47**) (0,38%).

Nas frações F1, F2, F3 e F4 foram identificados 14, 9, 12 e 15 compostos, respectivamente. A fração F1 é composta apenas de sesquiterpenos não oxigenados, sendo majoritários os seguintes compostos: biciclogermacreno (**12**) (65,57%), β -cariofileno (**6**) (11,42%), germacreno D (**10**) (5,72%), δ -elemeno (**4**) (4,73%) e alloaromadendreno (**9**) (3,62%). A fração F2 apresentou majoritariamente sesquiterpenos oxigenados como palustrol (**19**) (32,51%), cubenol (**35**) (16,49%) junenol (**32**) (4,95%), gleenol (**24**) (4,36%) e isobiciclogermacrenal (**41**) (3,12%). A fração F3 apresentou apenas

sesquiterpenos oxigenados como (*E*)-nerolidol (**17**) (33,17%), óxido de cariofileno (**23**) (15,81%), epiglobulol (**16**) (9,39%), epi- α -cadinol (**36**) (7,45%), 1-epi-cubenol (**33**) (7,11%). Da mesma maneira que a fração F3, foi identificado na fração F4 apenas sesquiterpenos oxigenados, como o espatulenol (**22**) (31,13%), rosifoliol (**29**) (7,50%), isoespatulenol (**34**) (5,68%) e α -cadinol (**39**) (5,83%). Os diterpenos oxigenados (*E,E*)-geranyl linalol (**46**) e fitol (**47**) foram encontrados em F3 e F4, respectivamente.

Observando as fórmulas estruturais dos compostos presentes no óleo essencial e nas frações (Figura 32), verifica-se que a grande maioria delas são cíclicas. De acordo com a revisão bibliográfica realizada por Stefanello, Pascoal e Salvador (2011) sobre as propriedades químicas e biológicas de óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae, os compostos presentes no óleo de espécies de *Eugenia* apresentam predominantemente sesquiterpenos cílicos, além disso os monoterpenos representam a menor fração. Portanto, a composição do óleo essencial da *E. calycina* possui boa correlação com as observação de Stefanello, Pascoal e Salvador (2011), uma vez que os compostos majoritários foram biciclogermacreno (18,30%), espatulenol (21,36%) e β -cariofileno (8,57%), que são sesquiterpenos cílicos. Estes compostos foram também encontrados em outras espécies de *Eugenia* mas em concentrações diferentes. Magina e outros (2009), por exemplo, encontrou nas espécies *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora*, respectivamente: 2,4%, 7,2% e 1,4% de biciclogermacreno; 12,6%, 4,9% e 3,1% de espatulenol e 3,6%, 8,0% e 4,3% de β -cariofileno.

Figura 32 - Fórmula estrutural dos compostos identificados no óleo essencial das folhas de *E. calycina* e suas frações.



Fonte: autora.

Na Figura 33 estão mostradas possíveis rotas biossintéticas de sesquiterpenos identificados no OE das folhas de *E. calycina*.

A formação dos sesquiterpenos tem início com a ionização do difosfato de farnesila (FPP) dando origem ao carbocáton fanesílico (**I-1**). Esse carbocáton pode ciclizar nas posições C10 e C1 dando origem ao carbocáton (*E,E*)-germacradienílico (**I-3**) ou ciclizar nas posições C11 e C1 dando origem ao carbocáton (*E,E*)-humulílico (**I-30**). Os carbocátons formados apresentam, portanto, configuração (*E*) da dupla ligação C2-C3. A isomerização do carbocáton **I-1** resulta no carbocáton nerolidílico (**I-2**). A ciclização nas posições C10 e C1 de **I-2** resulta no carbocáton (*Z,E*)-germacradienílico (**I-5**), que apresenta portanto, configuração (*Z*) da dupla ligação C2-C3 (DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHENZON, 2009).

A ciclização do carbocáton **I-5** gerando **I-6**, através do ataque de C1 em C11, seguido da saída de H⁺, resulta na formação do biciclogermacreno (**12**). A oxidação de **12** leva a formação do isobiciclogermacrenal (**41**) e ao intermediário **I-7** (epóxido), o qual gerará isoespatulenol (**34**) e espatulenol (**22**) através da adição de H⁺ ao epóxido e eliminação de H⁺ para formação dos alcenos.

A transformação do carbocáton **I-6** em **I-9**, através do ataque de C7 em C2, seguido de migração de hidreto-1,3 formando **I-10**, leva a formação do carbocáton **I-10**. A saída da H⁺ de **I-10** origina os compostos **I-11** e **I-12**, que com adição de água formam, respectivamente, maaliol (**18**) e rosifoliol (**29**).

O carbocáton **I-6** pode ainda formar os carbocátons aloaromandrenílicos diasterotópicos **I-13** e **I-14**, através do ataque de C6 em C2. A eliminação de H⁺ de **I-14** forma o aromadendreno (**7**), enquanto que a adição de água seguida da saída de H⁺ de **I-14** forma o viridiflorol (**26**). A migração de hidreto-1,3 em **I-14** forma **I-15**, com saída de H⁺ forma-se α -gurjuneno (**5**). A eliminação de H⁺ de **I-13** leva a formação do alloaromadendreno (**9**), enquanto que a adição de água seguida da saída de H⁺ de **I-13** forma epiglobulol (**16**) e globulol (**25**). A migração de hidreto-1,2 de **I-13** forma **I-16**, que com a adição de água seguida da saída de H⁺ se forma o palustrol (**19**).

A perda de H⁺ pelo carbocáton (*E,E*)-germadienílico (**I-3**) dá origem ao germacreno A (**13**) (DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHENZON, 2009), sendo que este por decomposição térmica, que pode ter ocorrido no processo de hidrodestilação ou no próprio CG-EM, ocorre um rearranjo de Cope resultando no

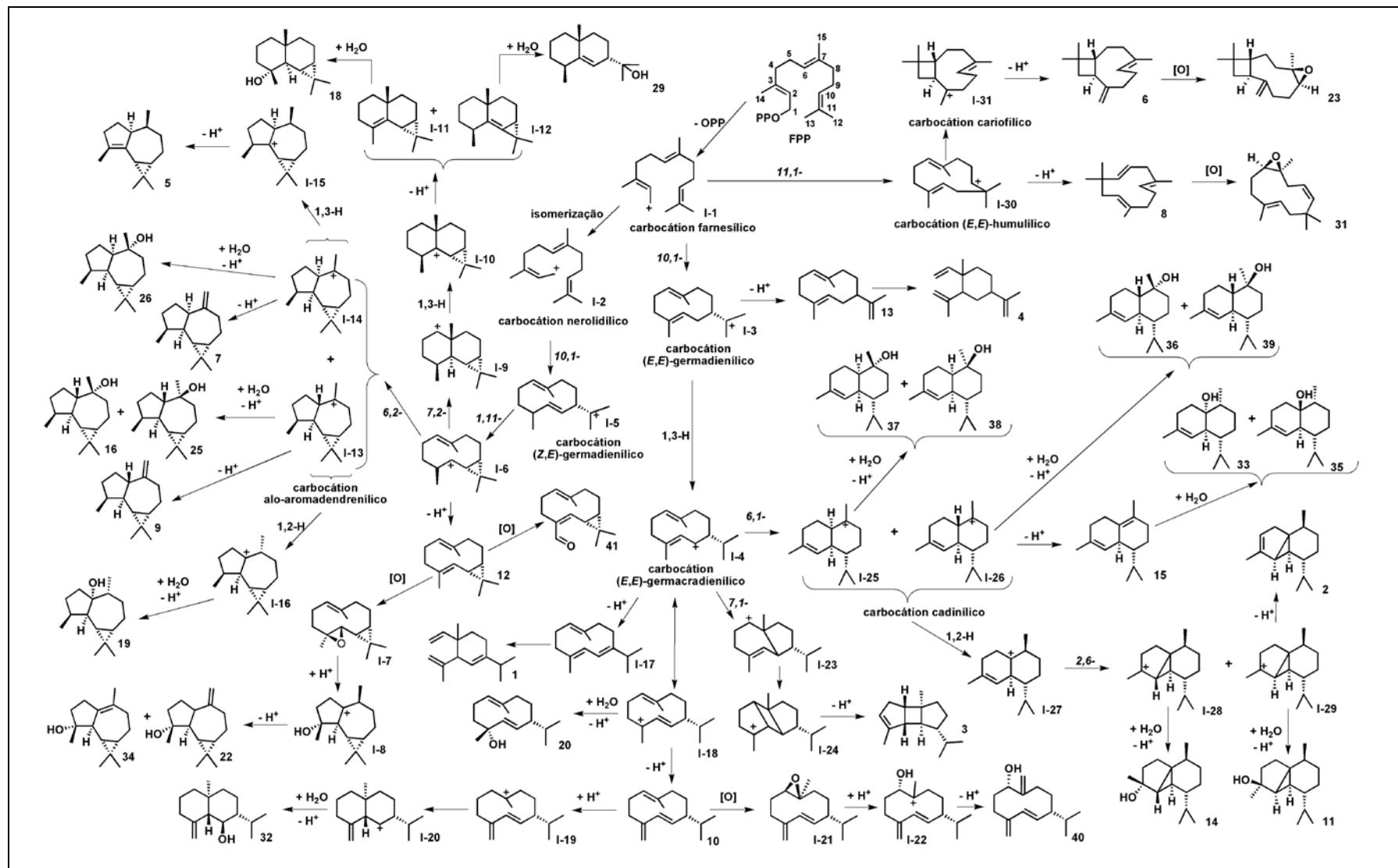
β -elemene (**4**) (BARROS et al., 2009). O mesmo se observa na formação do δ -elemene (**1**) a partir do carbocáton (*E,E*)-germacradienílico (**I-4**), oriundo da migração de hidreto-1,3 em **I-3**.

A adição de água seguida da perda de H^+ pelo híbrido de ressonância **I-18** do carbocáton (*E,E*)-germacradienílico (**I-4**) forma o germacreno-D-4-ol (**20**). Porém, se ocorrer apenas à perda de H^+ de **I-18**, observa-se a formação de germacreno D (**10**). A adição de H^+ em **10** leva a formação do carbocáton **I-19** que origina **I-20**, que com adição de água seguida da saída de H^+ resulta no junenol (**32**). A epoxidação de **10** seguida de duas perdas consecutivas de H^+ dá origem ao germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol (**40**).

O carbocáton (*E,E*)-germacradienílico (**I-4**), pode originar também o carbocáton **I-23**, através do ataque de C7 em C1. O ataque de C2 em C6 no carbocáton **I-23** resultará em **I-24**, que com a saída de H^+ origina α -bourboneno (**3**). Além disso, o carbocáton **I-4** pode ainda originar os carbocátons cadinílicos diasterotópicos **I-25** e **I-26**, através do ataque de C6 em C1. O processo de adição de água seguida da saída de H^+ para **I-25** leva a formação dos diasteroisomeros epi- α -muurolol (**37**) e α -muurolol (**38**), enquanto que para **I-26** se formam epi- α -cadinol (**36**) e α -cadinol (**39**). A perda de H^+ pelo carbocáton **I-26** forma δ -cadineno (**15**). A adição de água em **15** forma 1-epi-cubenol (**33**) e cubenol (**35**). A migração de hidreto-1,2 em **I-25** e **I-26** resulta no carbocáton **I-27**, o qual pode originar os carbocátons diasterotópicos **I-28** e **I-29**, através do ataque de C2 em C6. O processo de adição de água seguida da saída de H^+ para **I-28** leva a formação de cubebol (**14**) e para **I-29** a formação de epicubebol (**11**). A perda de apenas H^+ em **I-29** forma o α -copaeno (**2**).

O carbocáton humulílico (**I-30**), oriundo do carbocáton **I-2** através do ataque de C11 a C1, forma o α -humuleno (**8**) através da perda de H^+ , este por sua vez origina o epóxido de humuleno II (**31**) através da sua oxidação. O carbocáton cariofílico (**I-31**), oriundo do **I-30**, através do ataque de C2 em C10, forma o β -cariofileno (**6**) através da perda de H^+ , este por sua vez origina o óxido de cariofileno (**23**) através da sua oxidação.

Figura 33 - Proposta de rotas biossintéticas de sesquiterpenos no óleo essencial das folhas de *E. calycina* e suas frações.



Fonte: autora (com base em rotas biossintéticas propostas por Degenhardt, Köllner e Gershenzon (2009), Barbosa e outros (2007), Dewick (2009b), Pickel e outros (2012), Barros e outros (2009) e Colby e outros (1998)).

4.1.2 Atividade antibacteriana e citotóxica do óleo essencial

O óleo essencial e suas frações foi avaliado quanto à atividade contra bactérias da cavidade bucal, sendo o resultado dado em “Concentração Inibitória Mínima” (CIM). Foi também avaliada a citotoxicidade através da análise da viabilidade celular contra células HeLa, sendo o valor expresso em concentração citotóxica (CC₅₀). A Tabela 13 mostra os resultados obtidos.

Tabela 13 - Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra bactérias da cavidade bucal e viabilidade celular (CC₅₀, $\mu\text{g mL}^{-1}$) do óleo essencial das folhas de *E. calycina* e suas frações.

		Concentração inibitória mínima (CIM) – $\mu\text{g mL}^{-1}$						
		OE	F1	F2	F3	F4	CHD	Cisplatina
Aeróbica	<i>S. mutans</i> ¹	>400	>400	200	100	100	0,922	-
	<i>S. mitis</i> ¹	400	400	200	100	100	3,688	-
	<i>S. sanguinis</i> ¹	400	>400	>400	200	100	1,844	-
	<i>S. sobrinus</i> ¹	>400	>400	200	100	100	1,844	-
Anaeróbica	<i>P. nigrescens</i> ²	100	50	100	50	50	1,844	-
	<i>P. gingivalis</i> ²	100	50	50	50	50	3,68	-
	<i>A. naeslundii</i> ²	>400	>400	>400	>400	400	1,844	-
	<i>B. fragilis</i> ²	>400	>400	400	100	100	1,844	-
Concentração citotóxica ³ CC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		137,4±9,6	120,0±9,4	117,6±9,6	151,1±8,3	139,2±5,1	-	2,3±0,3

Nota: ¹bactéria gram-positiva; ²bactéria gram-negativa; ³células HeLa; controle positivo: CHD (dicloridrato de clorexidina) e cisplatina; OE: óleo essencial.

De acordo com Holetz e outros (2002), para valores de CIM abaixo de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a atividade antimicrobiana é considerada boa, valores entre 100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é moderada, valores entre de 500 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é fraca, valores acima de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é considerada inativa. Ríos e Recio (2005), por outro lado, considera apenas que atividades antimicrobianas com CIM abaixo de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ podem ser consideradas promissoras. Portanto, observando os resultados apresentados na Tabela 13, pode-se verificar que o óleo essencial e a fração F1, que são ricos em sesquiterpeno não oxigenados, apresentam menor atividade antimicrobiana contra bactérias aeróbias que as frações F2, F3 e F4, as quais são ricas em sesquiterpenos oxigenados. Entretanto, com relação às bactérias

anaeróbias, tanto o óleo essencial quanto as frações mostraram forte atividade antibacteriana, apresentando CIM entre 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O óleo essencial apresentou forte atividade antimicrobiana contra as bactérias anaeróbicas Gram-negativa *P. nigrescens* e *P. gingivalis* (CIM de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para as outras bactérias foi observada atividade moderada ou inativa. Com relação às frações, F1 mostrou resultados similares ao óleo essencial. Como discutido acima, F1 é composta predominantemente por sesquiterpenos não oxigenados. Provavelmente, as propriedades biológicas do óleo essencial pode ser justificada pela característica dos sesquiterpenos não oxigenados, uma vez que F1 possui atividade contra as mesmas bactérias em que o óleo é ativo, mostrando inclusive melhores CIMS. Já, as frações F3 e F4, compostas predominantemente de sesquiterpenos oxigenados, mostram elevada atividade, com valores de CIM entre 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra a maioria das bactérias testadas.

O mecanismo de ação de óleo essencial sobre os microrganismos é muito complexo e ainda não foi explicado. Alguns estudos apontam que o mecanismo de ação de terpenos envolve o rompimento da membrana plasmática (KALEMBA; KUNICKA, 2003, STEFANOVIC et al., 2012). Portanto, a ação antimicrobiana dos óleos estaria ligada ao caráter hidrofílico e lipofílico dos compostos presentes. Compostos oxigenados geralmente apresentam maior atividade que aqueles não oxigenados (KALEMBA; KUNICKA, 2003). Álcoois terpênicos, por exemplo, têm demonstrado elevada atividade contra vários microrganismos, agindo como desnaturante de proteínas. Outros compostos como as cetonas, aumentam a atividade antibacteriana de terpenos, provavelmente devido à presença da carbonila (DORMAN; DEANS, 2000). Assim, o caráter lipofílico do esqueleto de hidrocarboneto e o caráter hidrofílico dos grupos funcionais são os responsáveis pela atividade antimicrobiana de determinado composto. Pode-se propor portanto, que a ordem de atividade dos compostos presentes em óleo essencial são: fenol > aldeído > cetona > álcool > éter > hidrocarboneto (DORMAN; DEANS, 2000, KALEMBA; KUNICKA, 2003). Assim, a maior atividade das frações F3 e F4 da *E. calycina* pode ser atribuída aos sesquiterpenos oxigenados.

O óleo essencial e as frações da *E. Calycina* apresentaram atividade antibacteriana promissora, com valores de CIM iguais e até menores que outras espécies de plantas estudadas contra as mesmas bactérias da cavidade bucal já reportados na literatura, como pode ser visto na Tabela 14

Tabela 14 - Atividade antimicrobiana de outras espécies de plantas observada na literatura contra as bactérias da cavidade bucal estudadas neste trabalho.

Espécies de bactérias	Espécies de plantas (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	<i>Cassia bakeriana</i> ^a	<i>Artemisia iwayomogi</i> ^b	<i>Campomanesia pubescens</i> ^c	<i>Hyptis pectinata</i> ^d	<i>Leptospermum morrisonii</i> ^e	<i>Inga laurina</i> ^f
<i>S. mutans</i>	62,5	200	500	200	620	50
<i>S. mitis</i>	62,5	-	500	-	-	50
<i>S. sanguinis</i>	125	400	1000	-	-	50
<i>S. sobrinus</i>	-	400	-	-	-	25
<i>P. nigrescens</i>	-	-	-	-	-	100
<i>P. gingivalis</i>	125	50	-	-	-	50
<i>A. naeslundii</i>	62,5	-	-	-	-	400
<i>B. fragilis</i>	62,5	-	125	-	-	<400

Referências: a) Cunha e outros (2013); b) Cha (2007); Chang e outros (2011); d) Nascimento e outros (2008); e) Filoche, Soma e Sissons (2005); f) Furtado e outros (2014).

Alguns compostos presentes no óleo essencial da *E. Calycina* já foram avaliados individualmente quanto a atividade antimicrobiana contra bactérias que não são específicas da cavidade bucal (Tabela 15).

Tabela 15 - Atividade antimicrobiana de alguns compostos presentes no óleo essencial das folhas de *E. calycina*.

Compontos	Bactérias (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Referência
β -Cariofileno (6)	<i>Staphylococcus aureus</i> (256 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>Staphylococcus epidermidis</i> (128 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>Staphylococcus auricularis</i> , <i>Macrococcus caseolyticus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> (32 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Xiong e outros (2013)
α -Humuleno (8)	<i>Sarcina lutea</i> e <i>Bacillus subtilis</i> (3,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>Xanthomonas campestris</i> (15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>Escherichia coli</i> (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Rahman e outros (2011)
Germacreno D (10)	<i>Bacillus cereus</i> e <i>E. coli</i> (625 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>S. aureus</i> (156 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Palazzo e outros (2009)
Biciclogermacreno (12)	<i>S. aureus</i> (292 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>B. cereus</i> (167 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>Acinetobacter baumanii</i> e <i>E. coli</i> (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (417 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Santos e outros (2013)
Óxido de cariofileno (23)	<i>S. aureaus</i> e <i>S. epidermidis</i> (512 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>S. auricularis</i> e <i>M. caseolyticus</i> (128 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>Enterococcus faecium</i> e <i>E. faecalis</i> (256 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Xiong e outros (2013)
Espatulenol (22)	<i>S. lutea</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>X. campestris</i> (15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>E. coli</i> (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Rahman e outros (2011)
Drimenol (43)	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>B. Cereus</i> (667 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>A. baumanii</i> (583 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>E. coli</i> (333 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Santos e outros (2013)
Fitol (47)	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. faecium</i> e <i>E. Faecalis</i> (512 $\mu\text{g mL}^{-1}$); <i>S. auricularis</i> e <i>M. caseolyticus</i> (256 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Xiong e outros (2013)

Analisando os resultados apresentados na Tabela 15, pode-se verificar que tanto os sesquiterpenos não oxigenados quanto os oxigenados, apresentam atividade antimicrobiana, o que justifica a atividade do óleo da *E. Calycina*.

O óleo essencial e as suas frações foram avaliados quanto a sua toxicidade através do ensaio de viabilidade celular utilizando células HeLa, como mostrado na Tabela 13. Para se obter uma relação entre a concentração citotóxica (CC₅₀) e a

atividade antimicrobiana através da CIM, foi determinado o “índice de seletividade” (IS) utilizando a Equação 11.

$$IS = \log \left(\frac{CC_{50}}{CIM} \right)$$

Equação 11

Os valores positivos de IS representam seletividade para os microrganismos, enquanto que valores negativos de IS indicam toxicidade para as células HeLa (CASE et al., 2006). A Tabela 16 mostra os resultados de IS para o óleo essencial e suas frações.

Tabela 16 - Índice de seletividade do óleo essencial das folhas de *E. calycina* e suas frações.

	Bactérias	Índice de seletividade (IS)				
		EO	F1	F2	F3	F4
Aeróbica	<i>S. mutans</i>	-0,46	-0,52	-0,23	0,18	0,14
	<i>S. mitis</i>	-0,46	-0,52	-0,23	0,18	0,14
	<i>S. sanguinis</i>	-0,46	-0,52	-0,53	-0,12	0,14
	<i>S. sobrinus</i>	-0,46	-0,52	-0,23	0,18	0,14
Anaeróbica	<i>P. nigrescens</i>	0,14	0,38	0,07	0,48	0,45
	<i>P. gingivalis</i>	0,14	0,38	0,37	0,48	0,45
	<i>A. naeslundii</i>	-0,46	-0,52	-0,53	-0,42	-0,46
	<i>B. fragilis</i>	-0,46	-0,52	-0,53	0,18	0,14

O IS do óleo essencial mostrou que para as bactérias onde o CIM é igual ou menor que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 13) o óleo apresenta baixa toxicidade (IS>0). Com relação às frações, F1 apresentou o mesmo comportamento do óleo essencial. As frações F3 e F4 apresentaram valores positivos de IS para um maior número de bactérias, se mostrando portanto, mais eficiente, uma vez que para os CIMs abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi observada baixa toxicidade.

4.2 EXTRATOS DE FOLHAS, FLORES E GALHOS

4.2.1 Rendimento de extração e partição líquido-líquido

Na Tabela 17 se encontram os rendimentos das extrações por maceração de folhas, galhos e flores. Na extração das flores foi utilizada solução aquosa de acetona 80% como solvente da extração, enquanto que para folhas e galhos foi utilizado etanol 98%. A solução aquosa de acetona 80% apresenta constante dielétrica de 29,62 (em 25 °C), enquanto que para o etanol 98% a constante dielétrica é de cerca de 25,0 (em 25 °C) (AKERLOF, 1932). Portanto, acetona 80% apresenta maior polaridade em relação ao etanol 98%.

A utilização de um solvente mais polar (solução aquosa de acetona 80%) na extração das flores foi devido à menor quantidade de flores obtida na coleta. Assim, foi necessário escolher um solvente que extrairia maior quantidade de compostos com atividade antioxidante. A escolha da acetona 80% como solvente baseou-se em trabalhos prévios da *E. calycina* (CARRIJO et al., 2011), sendo verificado que acetona 80% extraí compostos com maior atividade antioxidante em relação ao etanol 70% e água. Além disso, trabalhos têm demonstrado que este solvente é melhor para a extração de compostos polifenólicos (PEKIĆ et al., 1998, VAYUPHARP; LAKSANALAMAI, 2012). No caso dos galhos e folhas, utilizou-se o etanol 98% pois este consegue extraír não somente compostos mais polares como também os menos polares, possibilitando a avaliação da atividade de compostos com polaridade menor.

Tabela 17 - Rendimento do processo de extração por maceração à temperatura ambiente de folhas, galhos e flores da *E. calycina*.

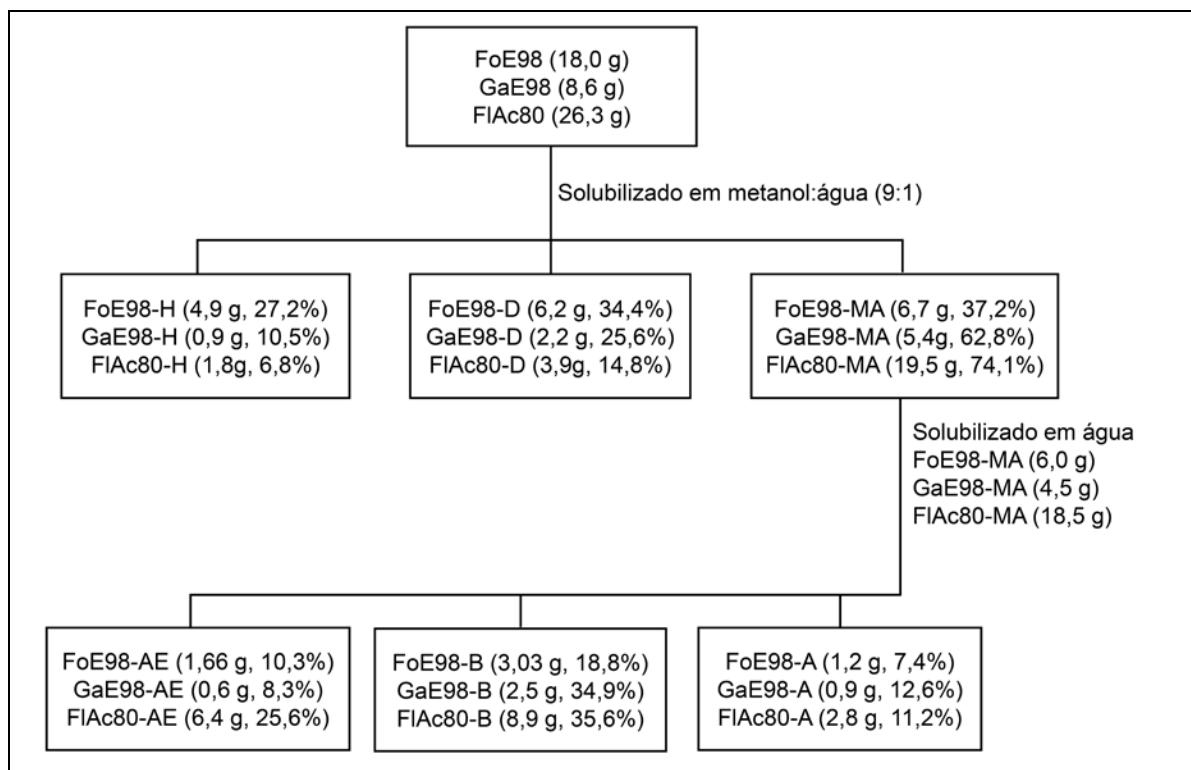
Material vegetal após secagem (g)	Umidade após secagem (%)	Extrato (g)	Rendimento (%)
Folha	314,2	9,5	17,2
Galho	377,6	7,3	4,2
Flor	109,2	6,5	28,8

Através dos resultados apresentados na Tabela 17 foi possível verificar que as flores apresentam maior rendimento seguido das folhas e dos galhos. Os galhos apresentam elevada quantidade de compostos macromoleculares (celulose, hemicelulose e lignina) que não são extraídos através de maceração com solventes

orgânicos, mas por outras técnicas específicas para cada componente macromolecular. Esses compostos compõem a parede celular e são responsáveis principalmente pela sustentação do vegetal. Em madeiras, a quantidade de celulose (40-45%) e hemiceluloses (15-25%), chamada de holocelulose, varia entre 65-70% da sua composição (ROWELL et al., 2005 apud MARTINS, 2012), enquanto que a quantidade de lignina oscila entre 18-35%. Assim, o teor de compostos com baixa massa molecular que podem ser extraídos por solventes orgânicos é menor, o que justifica o baixo rendimento obtido na extração dos galhos da *E. calycina*.

Os extratos foram solubilizados em metanol:água (9:1) e fracionados através da partição líquido-líquido de onde foram obtidas as frações hexano, diclorometano e metanol-água. Em seguida, a fração metanol:água foi fracionada em acetato de etila, *n*-butanol e água. O fluxograma mostrado na Figura 34 ilustra esse procedimento e os rendimentos obtidos para cada etapa.

Figura 34 - Rendimento da partição líquido-líquido dos extratos de folhas, galhos e flores da *E. calycina*.



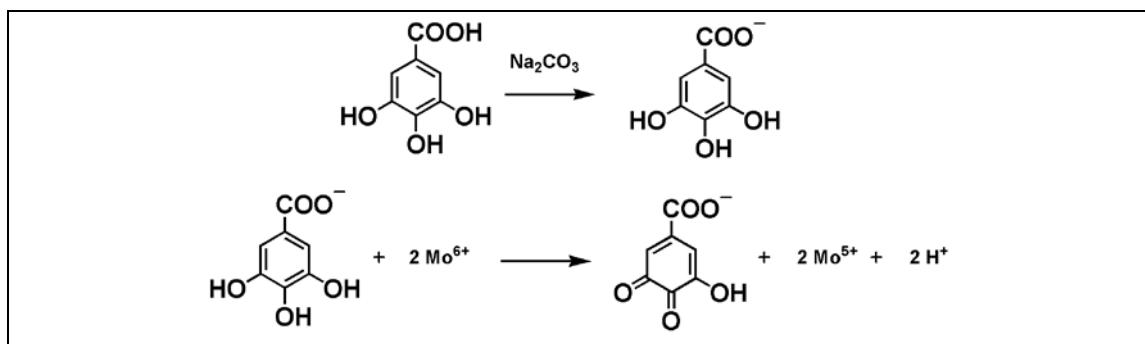
Fonte: autora. Nota: FoE98 - extrato etanol 98% de folhas; GaE98 - extrato etanol 98% de galhos; FIAc80 - extrato acetona 80% de flores; H - fração hexano; D - fração diclorometano; MA - fração metanol:água; AE - fração acetato de etila; B - fração *n*-butanol; A - fração água.

Analisando os rendimentos (Figura 34), é possível observar que para as folhas, a fração com maior rendimento foi a diclorometano seguida da fração hexano; já para os galhos, a que obteve maior rendimento foi a fração *n*-butanol seguida da diclorometano; e para as flores, a partição que obteve maior rendimento foi a *n*-butanol seguida da acetato de etila.

4.2.2 Análise do teor de fenóis totais

A quantificação do teor de fenóis totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteau no qual envolve a redução do reagente de Folin [mistura dos ácidos fosfomolíbdico $H_3P(Mo_3O_{10})_4$ e fosfotunguístico $H_3P(W_3O_{10})_4$] pelos compostos fenólicos, com formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 760 nm. O molibdênio presente no reagente de Folin apresenta coloração amarela e se encontra no estado de oxidação +6. A reação ocorre em meio básico, portanto os fenóis são desprotonados formando ânions fenolatos. Na reação, o molibdênio +6 sofre redução pelos ânions fenolatos, formando complexos de molibdênio-tungstênio, onde a média do estado de oxidação dos metais se encontra entre +5 e +6. O complexo de molibdênio-tungstênio é de cor azul, o que permite a determinação de substâncias redutoras (fenóis) através de método espectrofotométrico (OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 35 - Reação entre o ácido gálico e o íon molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteau.



Fonte: Oliveira et al. (2009).

O teor de fenóis totais foi calculado através da regressão linear da curva analítica do gráfico da absorbância da reação entre o ácido gálico e o Folin *versus* concentração de ácido gálico [$y = 0,0108x + 0,0058$; y = absorbância, x =

concentração de ácido gálico ($\mu\text{g mL}^{-1}$); $r^2 = 0,9967$]. O resultado pode ser expresso em mg de equivalente de ácido gálico por g de extrato ($\text{mg EAG g}_{\text{extrato}}^{-1}$) ou por g de material vegetal seco ($\text{mg EAG g}_{\text{vegetal}}^{-1}$), este último considera o rendimento de extração. Quanto maior este valor, maior o teor de fenóis totais. A Tabela 18 mostra os resultados obtidos para as folhas, galhos e flores.

Tabela 18 - Teor de fenóis totais dos extratos de folhas, galhos e flores.

	Fenóis totais	
	$\text{mg EAG g}_{\text{vegetal}}^{-1}$	$\text{mg EAG g}_{\text{extrato}}^{-1}$
Folhas	$32,8 \pm 1,4$	$190,0 \pm 8,0$
Galhos	$18,5 \pm 0,2$	$441,7 \pm 4,6^{\text{a}}$
Flores	$133,0 \pm 4,5$	$461,7 \pm 15,6^{\text{a}}$

Nota: as análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p < 0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

As flores apresentam quantidade de fenóis totais muito superior à de folhas e galhos, considerando o valor expresso em $\text{mg EAG g}_{\text{vegetal}}^{-1}$, fato que é esperado devido ao elevado rendimento do extrato. Comparando os resultados obtidos aos encontrados na literatura, para extrato de folhas de *Eugenia uniflora*, foi encontrado um valor de $271,27 \text{ mg EAG g}_{\text{extrato}}^{-1}$ (MORAIS et al., 2013), que se mostra superior ao encontrado para a folha da *Eugenia calycina* deste trabalho mas que é bem inferior aos galhos e flores. No estudo com a *Eugenia copacabensis* (JUNIOR et al., 2014) foi encontrado um teor de 375 e $779 \text{ mg EAG g}_{\text{extrato}}^{-1}$ para folhas e galhos, respectivamente, sendo possível verificar que, assim como a *E. calycina*, o extrato de galhos apresentou maior teor de fenóis totais em relação às folhas. O extrato das flores foi extraído com solvente de maior polaridade (solução aquosa de acetona 80%) que os das folhas e galhos (etanol 98%) e, uma vez que, de maneira geral, como os compostos fenólicos são polares, isto pode justificar maior extração de compostos fenólicos para este extrato. Além disso, compostos fenólicos, como os flavonoides, protegem os vegetais contra os raios ultravioleta, como as flores se encontram expostas à radiação UV, através deste fator se pode justificar a maior concentração destes compostos.

Com relação ao teor de fenóis totais nas frações dos extratos, pode-se verificar nos resultados mostrados a Tabela 19, que em todas as partes das plantas (folhas, galhos e flores) as frações em acetato de etila e *n*-butanol apresentam elevado teor de fenóis totais. Isto é esperado uma vez que, à medida que a polaridade do

solvente da partição se eleva, o teor de compostos polares extraído também aumenta. No caso da água, que é muito polar, praticamente irá extrair compostos muito polares como, por exemplo, açúcares.

Tabela 19 - Teor de fenóis totais das frações dos extratos de folhas, galhos e flores.

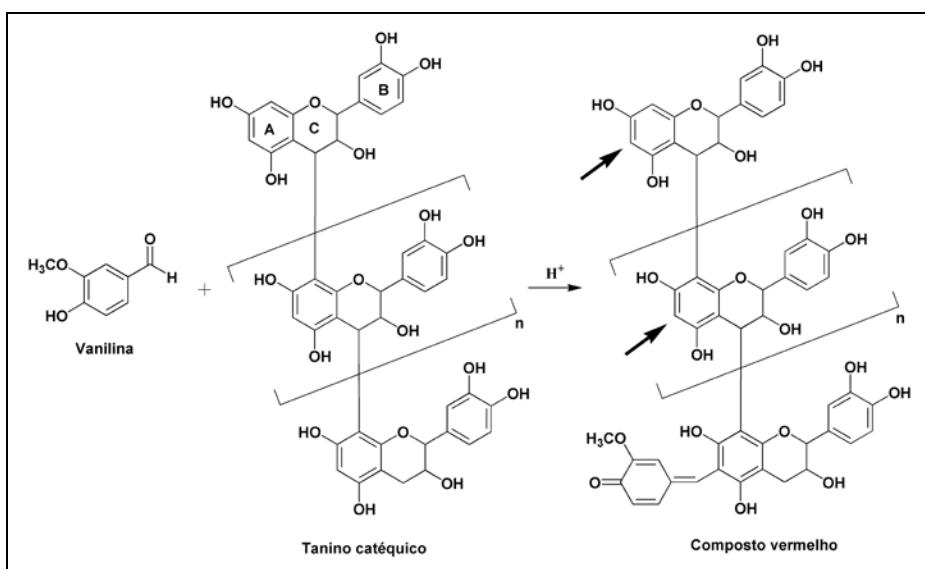
Frações	Fenóis totais (mg EAG/g _{extrato})		
	Folhas	Galhos	Flores
hexano	22,5±0,6	64,9±4,2	28,1±1,6
diclorometano	70,3±3,6	283,7±5,2	68,5±5,4
metanol:água	327,5 ±0,5	547,3±6,6	55,4±5,9
acetato de etila	350,1±0,6	735,5±2,6	732,3±4,1
<i>n</i> -butanol	311,3±1,0	592,6±3,3	515,0±3,7
água	93,8±1,5	177,5±1,6	61,5±0,1

Nota: As análises mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

4.2.3 Análise do teor de proantocianidinas (taninos condensados)

O teor de proantocianidinas dos extratos e frações foi realizado pelo método da vanilina sulfúrica, no qual é formado um composto vermelho cuja intensidade aumenta linearmente a 500 nm com a concentração (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001). A Figura 36 mostra a reação com um tanino catéquico.

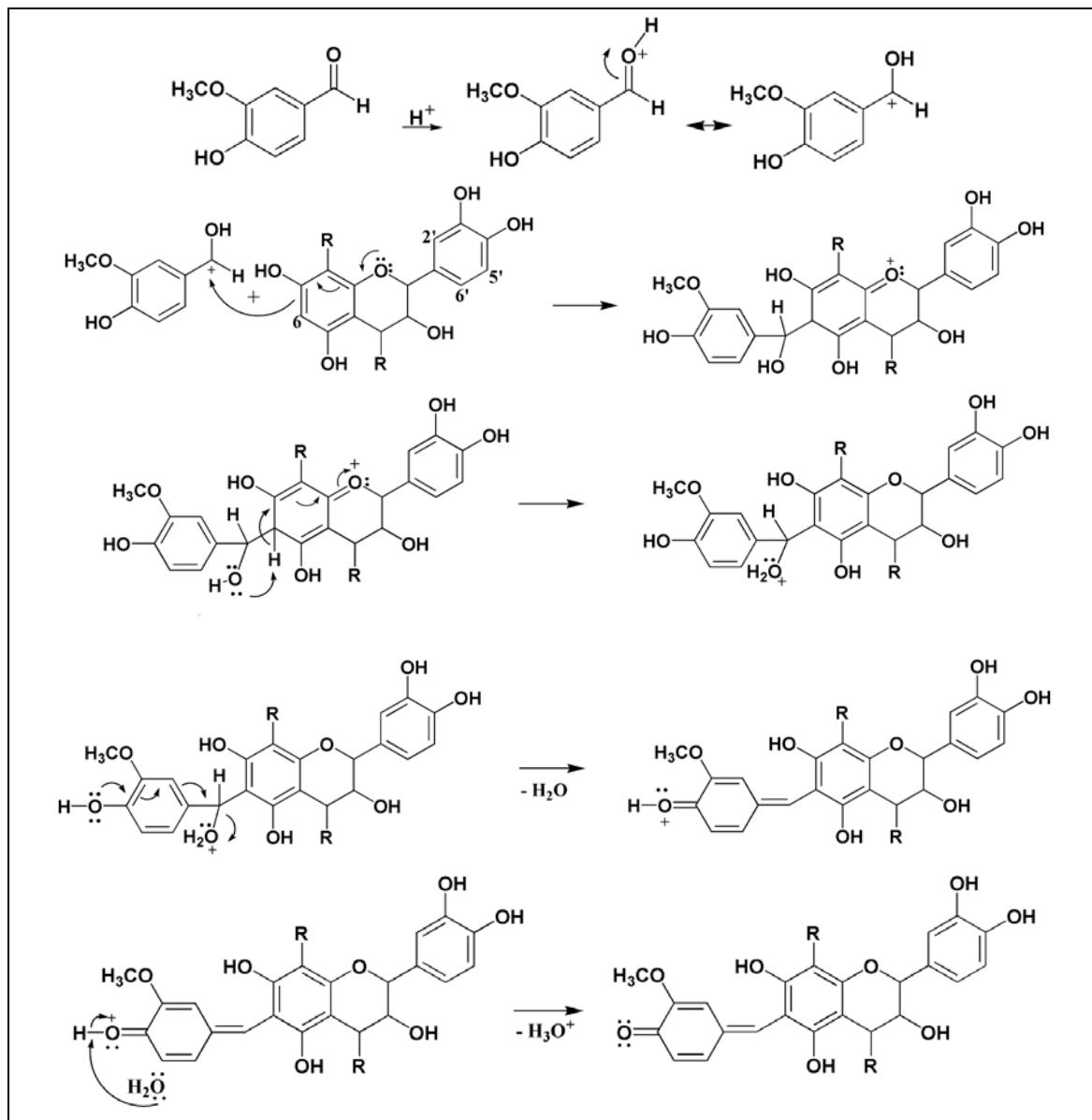
Figura 36 - Reação entre vanilina e um tanino catéquico.



Fonte: adaptado de Schofield, Mbugua e Pell (2001).

O mecanismo da reação acima que ocorre entre a vanilina e o tanino catéquico em ácido sulfúrico é do tipo substituição eletrofílica aromática no anel A do monômero de catequina, como mostrado na Figura 37.

Figura 37 - Mecanismo de reação entre a vanilina e um monômero do tanino catéquico em meio ácido.



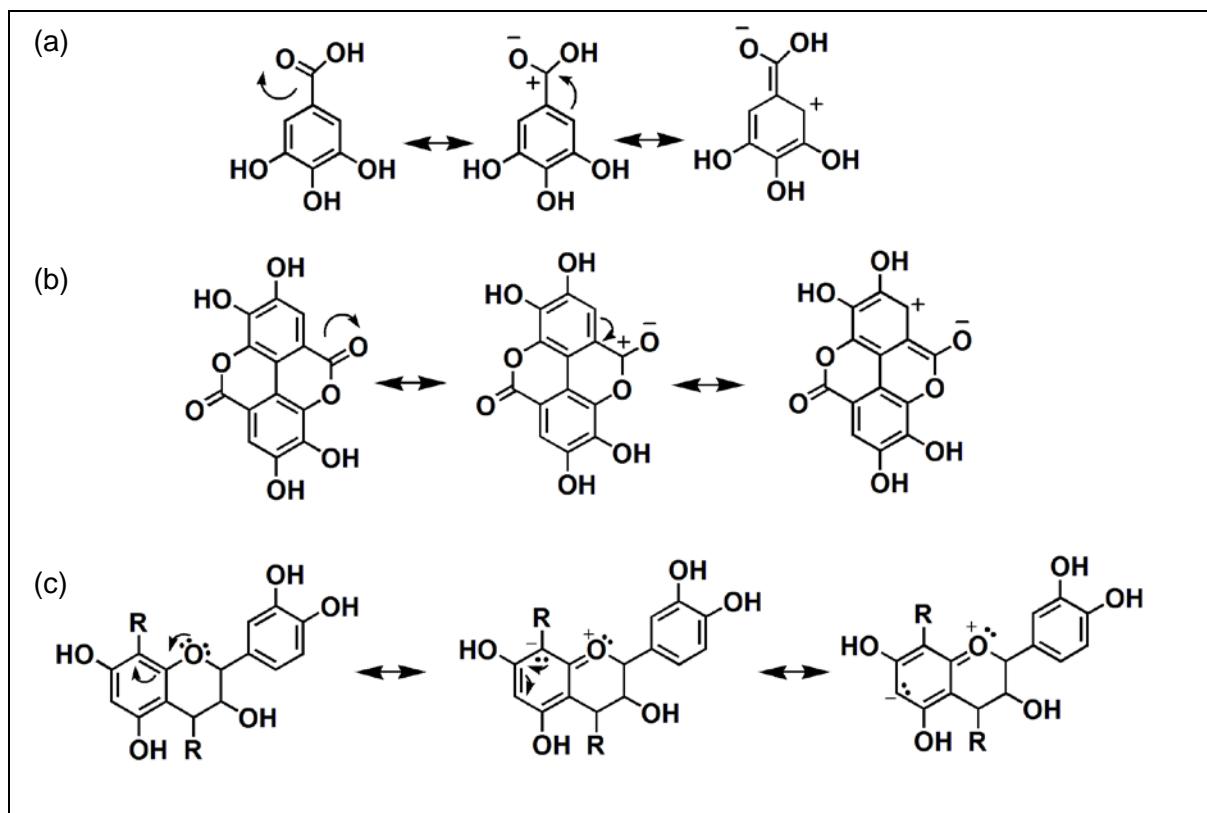
Fonte: autora.

Neste mecanismo é possível observar que quatro carbonos (C6, C2', C5' e C6') poderiam doar elétrons ao eletrófilo (vanilina acidificada). Entretanto, o carbono C6 é o único que é ativado triplamente por estar em *ortho* em relação às duas hidroxilas e em *para* ao oxigênio do anel diidropirano (anel C). Já, os carbonos C2' e

C5' apresentam ativação *ortho*, mas desativação *meta*, enquanto que o carbono C6' apresenta ativação *para* e desativação *meta*. Portanto, a substituição ocorre preferencialmente no carbono C6.

Esta metodologia não identifica os taninos hidrolisáveis (de ácido gálico e elágico) pois, conforme as estruturas de ressonância mostradas na Figura 38, os carbonos na posição *ortho* em relação à carbonila apresentam densidade de carga positiva para o ácido gálico (Figura 38a) e elágico (Figura 38b). Isto porque os substituintes carbonílicos são grupos desativantes. Este fato impede que ocorra uma substituição eletrofílica no anel aromático.

Figura 38 - Estruturas de ressonância do ácido gálico (a), elágico (b) e tanino catéquico (c).



Fonte: autora.

O teor de proantocianidinas foi calculado através da curva analítica do gráfico da absorbância da reação entre a catequina e a vanilina *versus* a concentração de catequina [$y = 0,0454x + 0,0109$; y = absorbância, x = concentração de catequina ($\mu\text{g mL}^{-1}$); $r^2 = 0,998$]. O resultado foi dado em mg de equivalente de catequina por g de extrato ($\text{mg EC g}_{\text{extrato}}^{-1}$) e por g de material vegetal seco ($\text{mg EC g}_{\text{vegetal}}^{-1}$), este último considera o rendimento de extração.

Quanto maior este valor, maior o teor de proantocianidinas. A Tabela 20 mostra os resultados obtidos para as folhas, galhos e flores.

Tabela 20 - Teor de proantocianidinas dos extratos de folhas, galhos e flores.

	Teor de proantocianidinas mg EC g _{vegetal} ⁻¹	mg EC g _{extrato} ⁻¹
Folhas	9,0±0,1	52,2±0,7
Galhos	4,2±0,1	100,0±0,5
Flores	28,2±0,2	98,0±0,7

Nota: as análises mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

Comportamento semelhante aos fenóis totais (Tabela 18, p. 100) foi observado para o teor de proantocianidinas, sendo que as flores apresentaram maior teor seguido das folhas e galhos, quando comparado em mg de EC por g de vegetal seco. No caso do teor de proantocianidinas no extrato, verifica-se que as flores e galhos se destacam em relação às folhas, assim como pode ser visto nos teores de fenóis totais. Provavelmente, isto se deve ao fato do extrato das folhas apresentar outros tipos de compostos em maior quantidade. Fato que é comprovado quando se observa o rendimento do processo de partição líquido-líquido (Figura 34, p. 98), no qual se constata um rendimento elevado para a fração hexano, o que não se observa nas folhas e galhos. Convertendo o valor de mg EC por grama de extrato em porcentagem para as folhas, galhos e flores, são obtidos os seguintes valores, respectivamente: 5,2; 10,0 e 9,8%. Estas porcentagens são promissoras, uma vez que estes valores são comparáveis ao teor de taninos do extrato presente no fitoterápico da espécie conhecida como Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), no qual seu extrato deve apresentar no mínimo uma concentração de 8% (BRASIL, 2003).

Com relação às frações (Tabela 21), verifica-se que assim como a análise do teor de fenóis totais, aquelas frações que utilizam acetato de etila e *n*-butanol como solvente da partição, também apresentam maior teor de proantocianidinas.

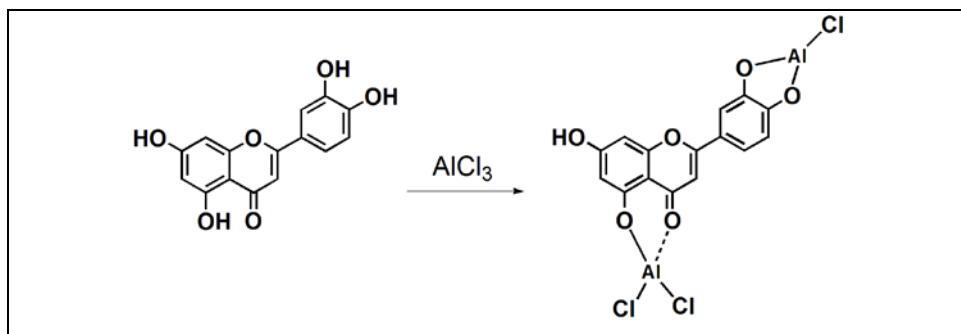
Tabela 21 - Teor de proantocianidinas das frações dos extratos de folhas, galhos e flores.

Frações	Teor de proantocianidinas (mg EC g _{extrato} ⁻¹)		
	Folhas	Galhos	Flores
hexano	6,3±0,3	31,3±2,5	22,5±0,6
diclorometano	12,4±0,6 ^a	47,7±1,4	27,3±0,6
metanol:água	74,4 ±0,5	127,8±1,9	99,3±0,2
acetato de etila	133,1±1,7	204,3±3,6	140,2±0,4
<i>n</i> -butanol	83,0±0,4	139,5±0,8	75,6±1,5
água	13,8±0,6 ^a	41,5±2,0	17,2±1,4

Nota: as análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

4.2.4 Análise do teor de flavonoides

A quantificação do teor de flavonoides foi realizada através do método com AlCl_3 (WOISKY; SALATINO, 1998). Nesta análise o cátion alumínio (Al^{3+}) forma complexos estáveis com os flavonoides, conforme está mostrado na Figura 39. O complexo formado apresenta absorção em comprimento de onda maior que o flavonoide não complexado, assim o monitoramento dessa complexação é realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425 nm.

Figura 39 - Complexação de um flavonoide com AlCl_3 .

Fonte: Markham (1982 apud MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998).

O teor de flavonoides foi calculado através da regressão linear da curva analítica do gráfico da absorbância obtida da reação entre a queracetina e o AlCl_3 versus a concentração de queracetina [$y = 0,032x + 0,0793$; y = absorbância, x = concentração de queracetina ($\mu\text{g mL}^{-1}$); $r^2 = 0,99$]. O resultado foi dado em mg de equivalente de queracetina por g de extrato (mg EC g^{-1}) e por g de material vegetal seco (mg EQ g^{-1}), este último considera o rendimento de extração.

Quanto maior este valor, maior o teor de flavonoides. A Tabela 22 mostra os resultados obtidos para as folhas, galhos e flores.

Tabela 22 - Teor de flavonoides dos extratos de folhas, galhos e flores.

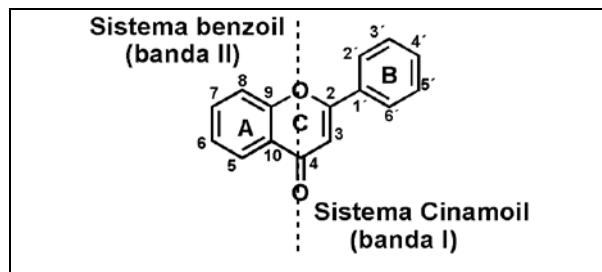
	Teor de flavonoides mg EQ g _{vegetal} ⁻¹	mg EQ g _{extrato} ⁻¹
Folhas	3,9±0,1	22,7±0,8 ^a
Galhos	0,09±0,01	2,2±0,3
Flores	6,6±0,2	22,8±0,8 ^a

Nota: as análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

Através destes resultados é possível verificar que as flores apresentaram maior teor de flavonoides seguida das folhas e galhos, considerando *mg EQ* por grama de vegetal seco. Este resultado segue a mesma tendência dos fenóis totais e proantocianidinas. Entretanto, o teor de flavonoides para os galhos se encontra extremamente baixo, inclusive quando se observa os valores de *mg EQ* por grama de extrato. As análises mostradas na Tabela 18 (p.100) e Tabela 20 (p. 104) revelaram que o extrato dos galhos apresenta elevada quantidade de fenóis totais e proantocianidinas, respectivamente, conforme já foi discutido. Portanto, provavelmente os flavonoides que estão presentes nos galhos podem apenas ser monômeros de taninos e então não complexam com o AlCl_3 ou não apresentam hidroxilas como substituintes capazes de complexar com AlCl_3 , ou o comprimento de onda do flavonoide complexado com AlCl_3 é diferente de 425 nm.

Essa técnica de determinação do teor de flavonoides pode apresentar limitação dependendo da estrutura do composto analisado, o que resulta na variação do comprimento de onda do complexo. Para melhor compreensão da problemática desta análise, na Figura 40 se encontra a estrutura de um flavonoide. Nesta estrutura se pode verificar a presença dos sistemas benzoil e cinamoil, que são responsáveis pelas duas bandas de absorção em um espectro de UV-Visível. A banda I no anel B ocorre na faixa de 350-385 nm enquanto que a banda II no anel A ocorre na faixa de 250-180 nm. Essas absorções ocorrem devido aos sistemas conjugados dos anéis aromáticos de transições do tipo $\pi\rightarrow\pi^*$ (BOHM, 1998).

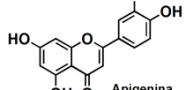
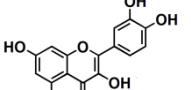
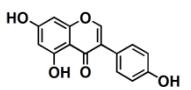
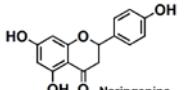
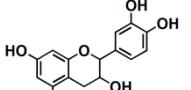
Figura 40 - Sistema de conjugação cinamoil e benzoil em flavonoides.



Fonte: autora.

No entanto, determinados flavonoides não apresentam a carbonila no carbono C4 e/ou dupla ligação entre os carbonos C2 e C3, o que pode influenciar na absorção. Na Tabela 23 se encontram as bandas de absorção de alguns flavonoides e os deslocamentos esperados quando complexados com AlCl_3 (reagente de deslocamento).

Tabela 23 - Comprimento de onda das bandas de absorção antes e após a complexação com AlCl_3 de alguns flavonoides.

Classe de flavonoide	Banda I (nm)	Banda II (nm)	Deslocamento após complexação com AlCl_3 (nm)	Exemplo
Flavonas ¹	310-350	250-280	+ 35-55 (banda I)	 Apigenina
Flavonol ¹	330-360	250-280	+ 50-60 (banda I)	 Quercetina
Isoflavonas ¹	310-330	245-275	+ 10-14 (banda I)	 Genisteina
Flavanonas ¹	300-330 (ombro)	230-270	+ 20-26 (banda I)	 Naringenina
Flavanol	-	275-285 ²	+ 27 (banda II) ³	 Catequina

Nota: ¹Marcucci, Woisky e Salatino (1998), ²José-Chagas, Filho e Pessôa (2014), ³Kumamoto e outros (2001)

Nesta tabela é possível verificar que nos quatro primeiros casos, a variação de substituintes promoveu mudança na absorção da banda I e consequentemente, no complexo também. No caso das flavanonas, exemplificado pela naringenina, a ausência de ligação entre os carbonos C2 e C3 resultaram em absorção muito fraca

do sistema cinamoil (banda I), aparecendo apenas um ombro logo após a banda II. No caso dos flavanóis, exemplificado pela catequina, observa-se a ausência da banda I, devido à ausência da carbonila no carbono C4. Isto resulta em apenas absorbâncias característica de anéis aromáticos (classificado como banda II). O deslocamento observado para a catequina é devido a complexação com AlCl_3 com os oxigênios em *ortho*. Ou seja, na ausência destes substituintes em flavanois não ocorrerá nenhuma complexação com AlCl_3 e, portanto, não se observará deslocamento (por exemplo: alfazelequina e guibourtinidol). Fato que resultará em um falso negativo em flavonoides.

Portanto, no caso do extrato dos galhos da *E. calycina*, não se pode afirmar com apenas esta técnica que não estão presentes flavonoides, até porque ele apresentou elevada quantidade de taninos. Por outro lado, está técnica sinalizou que os monômeros dos taninos podem ser da classe dos flavanóis (por exemplo, catequina).

Na Tabela 24 se encontram os teores de flavonoides para as frações das folhas, galhos e flores. Através deste resultado é possível observar que a partição em acetato de etila é a que se destaca com maior teor de flavonoides. Sendo que novamente se pode observar a quantidade extremamente baixa de flavonoides nas frações do extrato dos galhos.

Tabela 24 - Teor de flavonoides das frações dos extratos de folhas, galhos e flores.

Frações	Teor de flavonoides ($\text{mg EQ g}^{-1}_{\text{extrato}}$)		
	Folhas	Galhos	Flores
hexano	16,3 \pm 1,3	0,55 \pm 0,07 ^b	3,3 \pm 0,6 ^d
diclorometano	1,3 \pm 0,8 ^a	0,15 \pm 0,07 ^c	2,1 \pm 0,5 ^d
metanol:água	43,7 \pm 0,7	1,5 \pm 0,4	42,3 \pm 0,8
acetato de etila	51,3 \pm 1,2	3,9 \pm 0,6	85,7 \pm 0,9
<i>n</i> -butanol	35,8 \pm 1,7	0,7 \pm 0,1 ^b	63,1 \pm 1,2
água	1,9 \pm 0,2 ^a	0,12 \pm 0,06 ^c	0,7 \pm 0,1

Nota: as análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

4.2.5 Comparação entre os resultados de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides através de análise estatística

Comparando os resultados obtidos das análises do teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides, verifica-se uma correlação positiva entre as análises, ou seja, a fração que apresenta maior teor de fenóis totais, apresenta também maior teor de proantocianidinas e flavonoides (mesmo que este último seja em pouca concentração, como no caso dos galhos). A Tabela 25 mostra esses dados agrupados para melhor comparação.

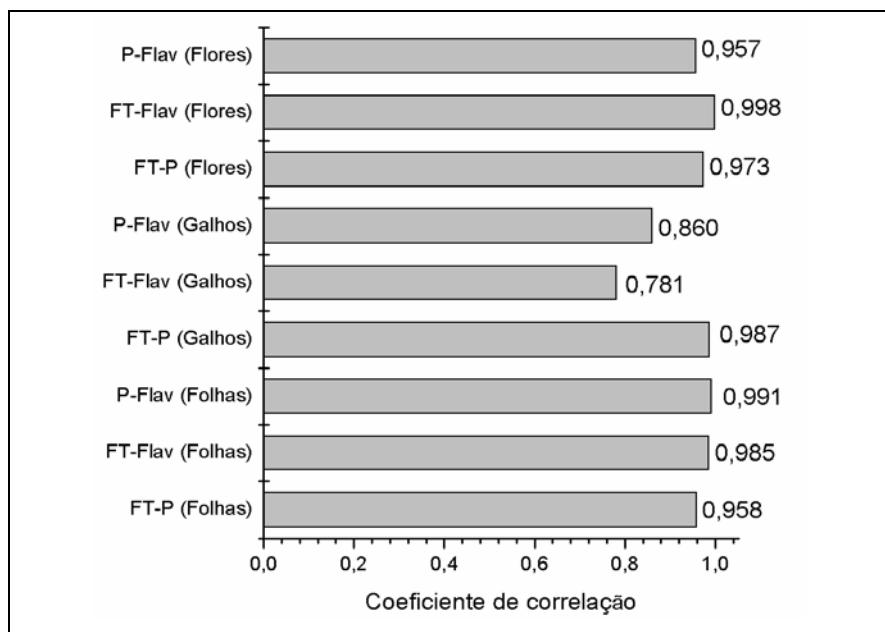
Tabela 25 - Resultados de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides agrupados.

	Folhas			Galhos			Flores		
	FT ¹	P ²	Flav ³	FT ¹	P ²	Flav ³	FT ¹	P ²	Flav ³
Extrato	190,0±8,0	52,2±0,7	22,7±0,8	441,7±4,6	100±0,5	2,2±0,3	461,7±15,6	98,0±0,7	22,8±0,8
H	22,5±0,6	6,3±0,3	16,3±1,3	64,9±4,2	31,3±2,5	0,55±0,07	28,1±1,6	22,5±0,6	3,3±0,6
D	70,3±3,6	12,4±0,6	1,3±0,8	283,7±5,2	47,7±1,4	0,15±0,07	68,5±5,4	27,3±0,6	2,1±0,5
MA	327,5 ±0,5	74,4 ±0,5	43,7±0,7	547,3±6,6	127,8±1,9	1,5±0,4	55,4±5,9	99,3±0,2	42,3±0,8
AE	350,1±0,6	133,1±1,7	51,3±1,2	735,5±2,6	204,3±3,6	3,9±0,6	732,3±4,1	140,2±0,4	85,7±0,9
B	311,3±1,0	83,0±0,4	35,8±1,7	592,6±3,3	139,5±0,8	0,7±0,1	515,0±3,7	75,6±1,5	63,1±1,2
A	93,8±1,5	13,8±0,6	16,3±1,3	177,5±1,6	41,5±2,0	0,55±0,07	61,5±0,1	17,2±1,4	3,3±0,6

Nota: ¹FT: fenóis totais (mg EAG g_{extrato}⁻¹); ²P: proantocianidinas (mg EC g_{extrato}⁻¹); ³Flav: flavonoides (mg EQ g_{extrato}⁻¹), H: hexano, D: diclorometano, MA: metanol-água, AE: acetato de etila, B: *n*-butanol, A: água.

A correlação entre as análises pode ser verificada através da análise do coeficiente de correlação pelo método de Pearson. De maneira geral, valores positivos significam correlação positiva (quanto mais próximo de 1 melhor é a correlação, sendo que uma variável aumenta quando a outra também se eleva) e valores negativos significam correlação negativa (quanto mais próximo de -1 melhor é a correlação, sendo que uma variável aumenta quando a outra se reduz). De acordo com Callegari-Jacques (2003), a intensidade do coeficiente de correlação pode ser classificada de acordo com o seu valor em módulo, assim, $|r|=0$ a correlação é nula, $|r|=0-0,3$ é fraca, $|r|=0,3-0,6$ é regular, $|r|=0,6-0,9$ é forte, $|r|=0,9-1$ é muito forte e $|r|=1$ a correlação é perfeita. Na Figura 41 estão mostrados os valores dos coeficientes de correlações entre as análises para cada parte estudada da planta.

Figura 41 - Coeficiente de correlação entre as análises de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides das folhas, galhos e flores.



Nota: a correlação foi realizada pelo método de Pearson através do Programa Sigma Plot 11.0. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações. FT: fenóis totais; P: proantocianidinas; Flav: flavonoides. Fonte: autora.

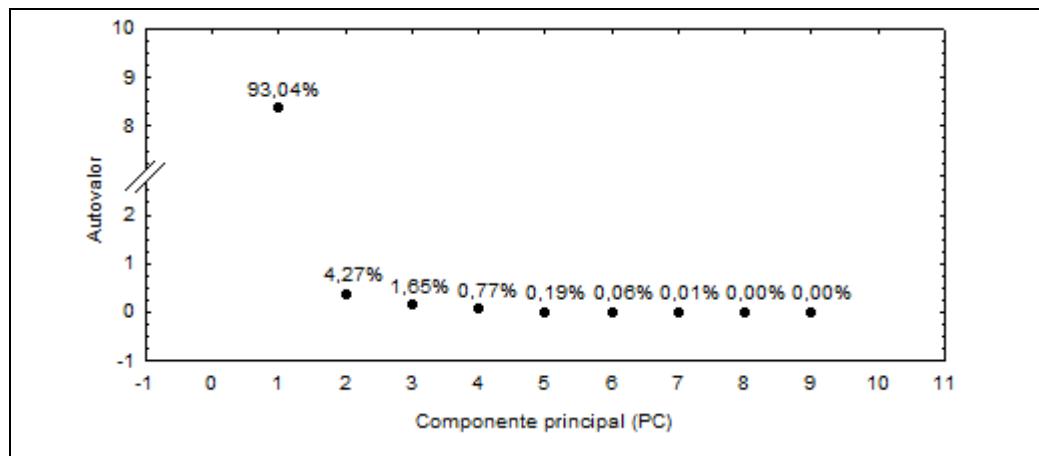
Através dos resultados mostrados na Figura 41, é possível observar estatisticamente que em todos os casos (folhas, galhos e flores) é observada uma elevada correlação positiva entre as análises.

Com a finalidade de verificar possível agrupamento das frações com propriedade semelhantes, os resultados de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides foram avaliados através da análise de componente principal (PCA-“principal component analysis”). Esta é uma técnica estatística de análise multivariada que permite avaliar um conjunto de dados com muitas variáveis. Nesta análise se podem verificar as inter-relações entre um grande número de variáveis, separando os indivíduos em grupos. Desta maneira, um grande número de informações é condensado em um conjunto menor de variáveis estatísticas com perda mínima das informações (SILVA et al., 2005, ARAÚJO, 2010).

Neste contexto, todos os valores das análises de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides, de todas as frações, foram agrupados em uma única matriz, a qual foi processada pelo programa Statistica 7.0 a fim de obter as componentes principais. No Apêndice D se encontra descrita a matriz de dados utilizada e no Apêndice E estão mostrados os valores das componentes principais.

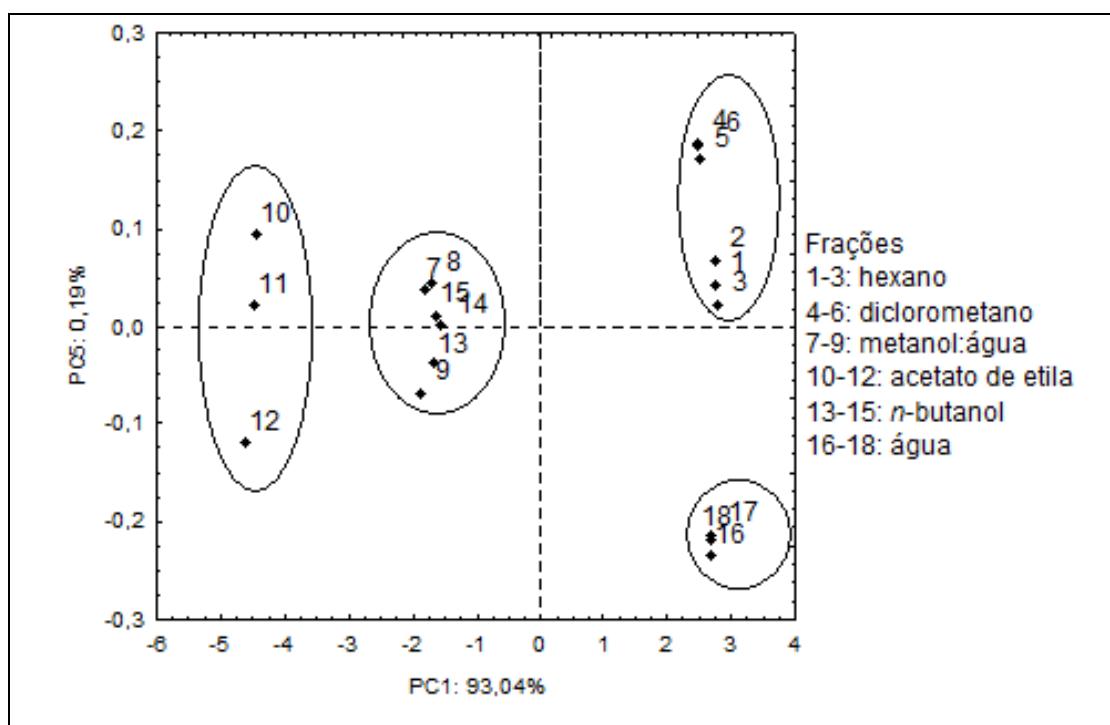
No gráfico mostrado na Figura 42 é observada a contribuição, em porcentagem, de cada componente principal. Sendo verificado que as componentes principais PC1 e PC5 da matriz de covariância explicam 93,23% do total da variância dos dados, podendo descrever os dados das análises. Assim, no gráfico de PCA mostrado na Figura 43 foram plotados os valores de PC1 versus PC5.

Figura 42 - Autovalores da matriz de covariância.



Fonte: autora.

Figura 43 - Análise da componente principal das análises do teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides das frações dos extratos das folhas, galhos e flores.



Fonte: autora.

Através do gráfico de PCA se pode verificar que os dados estudados são capazes de separar por similaridade as frações dos extratos de folhas, galhos e flores, sendo possível observar possível similaridade daquelas frações presentes na mesma região. Verifica-se, portanto: similaridade entre os componentes de folhas, galhos e flores particionados com diclorometano e hexano, uma vez que se encontram na mesma região do gráfico; similaridade entre as frações de acetato de etila; similaridade entre as frações *n*-butanol e metanol:água e, por fim, similaridade entre as frações em água.

Portanto, de maneira geral, a partição líquido-líquido foi eficiente uma vez que a análise de PCA mostrou que o fracionamento conseguiu separar compostos dos extratos de flores, folhas e galhos com características distintas de acordo com a polaridade do solvente.

Outra conclusão interessante é que a similaridade observada pelo PCA entre a fração *n*-butanol e metanol:água. Como discutido na Figura 34 (p. 98), o rendimento de obtenção das frações em *n*-butanol é superior em relação ao acetato de etila e água, tanto nas folhas, como nas flores e galhos. Portanto, as frações em metanol:água apresentaram características semelhantes às da frações em *n*-butanol.

4.2.6 Prospecção fitoquímica e análise do espectro de UV

As frações do extrato das folhas e flores apresentaram o mesmo perfil de prospecção fitoquímica, os quais estão mostrados na Tabela 26. Nesta tabela é possível verificar que não foi identificado alcaloides em nenhuma das frações. Além disso, foi verificada a presença de flavonoides nas frações com solventes de polaridade maior, exceto a água (sua polaridade muito elevada não extrai flavonoides). Portanto, os resultados da prospecção fitoquímica se encontram de acordo com os resultados mostrados na análise do teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides. Assim, as frações em acetato de etila e *n*-butanol, oriundas da fração metanol:água (fluxograma mostrado na Figura 34, p. 98), são promissoras no isolamento de compostos da classe dos flavonoides.

Tabela 26 - Prospecção fitoquímica do extrato e frações das folhas e flores de *E. calycina*.

Frações (folhas e flores)	Flavonoides		Alcaloides		Terpenos e esteroides	Terpenos, esteroides fenol e açúcar	Terpenos, taninos, flavonoides e saponinas
	NP/ PEG	AlCl ₃	Iodocloro platinado	Dragendorff			
H	-	-	-	-	+	+	+
D	-	-	-	-	+	+	+
MA	+++	+++	-	-	+	+++	+++
AE	+++	+++	-	-	+	+++	+++
B	++	++	-	-	+	++	++
A	-	-	-	-	+	+	+

Nota: H: hexano, D: diclorometano, MA: metanol-água, AE: acetato de etila, B: *n*-butanol, A: água. Intensidade: + fraca, ++ média, +++ forte, - ausente.

No caso das frações do extrato dos galhos, assim como as frações do extrato das folhas e flores, também não se observou a presença de alcaloides, conforme pode ser vista na Tabela 27. Também não foi verificada a presença de flavonoides, utilizando os reveladores NP/PEG e AlCl₃. Entretanto, quando a vanilina foi utilizada como revelador, a presença de taninos foi observada.

Os resultados apresentados pela prospecção fitoquímica para os galhos estão de acordo com as análises de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides, em que se observou a presença elevada de fenóis totais e proantocianidinas, mas um valor muito baixo de flavonoides.

Tabela 27 - Prospecção fitoquímica do extrato e frações dos galhos de *E. calycina*.

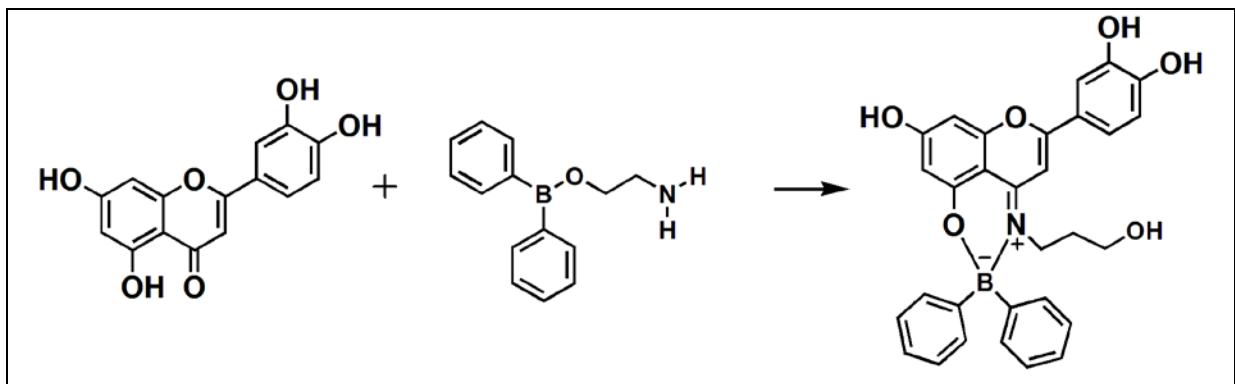
Frações (galhos)	Flavonoides		Alcaloides		Terpenos e esteroides	Terpenos e esteroides fenol e açúcar	Terpenos, taninos, flavonoides e saponinas
	NP/ PEG	AlCl ₃	Iodocloro platinado	Dragendorff			
H	-	-	-	-	+	+	+
D	-	-	-	-	+	+	+
MA	-	-	-	-	+++	++	+++
AE	-	-	-	-	+++	++	+++
B	-	-	-	-	+++	+	+++
A	-	-	-	-	++	+	+

Nota: H: hexano, D: diclorometano, MA: metanol-água, AE: acetato de etila, B: *n*-butanol, A: água. Intensidade: + fraca, ++ média, +++ forte, - ausente.

Assim como o revelador AlCl₃ utilizado na identificação de flavonoides, o difenilboriloxietilamina (NP) do revelador NP/PEG depende da existência da

carbonila no carbono C4 da estrutura do flavonoide para poder formar o composto a ser observado após a reação, como mostrado na Figura 44. Portanto, com o revelador NP/PEG também não é possível identificar flavonoides do tipo flavanol e taninos (estruturas mostradas na Tabela 23/p. 107 e na Figura 36/p. 101, respectivamente).

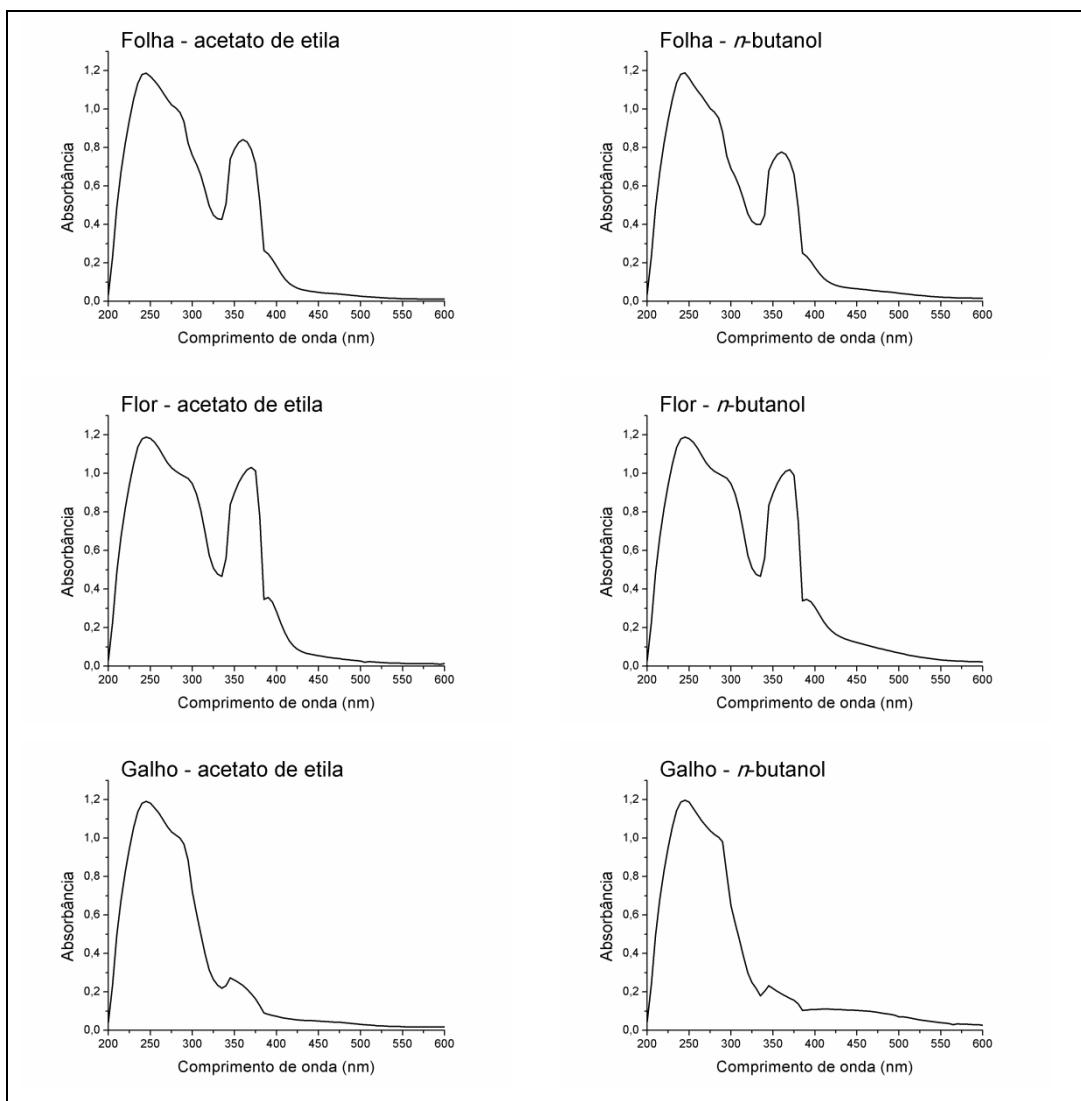
Figura 44 - Reação entre um flavonoide e o reagente difenilboriloxetilamina (NP).



Fonte: adaptado de Kartnig e Gobel (1996).

O espectro de UV-VIS na região entre 200-600 nm foi obtido das frações *n*-butanol e acetato de etila do extrato das folhas, flores e galhos (Figura 45). Através dos espectros de UV-VIS se verifica que as frações do extrato das folhas e flores exibem um perfil de compostos das classes dos flavonoides, apresentando duas bandas, uma em 330-385 nm e outra em 250-280 nm (BOHM, 1998). Entretanto, é necessário ressaltar que são flavonoides com carbonila no carbono C4. No caso dos galhos, observa-se a presença bem mais intensa da banda na região 250-280 nm e uma pouca intensa em 330-385 nm. Fato que comprova o resultado obtido de baixo teor de flavonoides (Tabela 24, p. 108). Isto não exclui a possibilidade da presença de flavonoides do tipo flavanol. Além disso, a presença da banda na região 250-280 nm caracteriza a presença de taninos condensados, confirmando o elevado teor de proantocianidinas observado na análise das frações dos galhos (Tabela 21, p. 105).

Figura 45 - Espectro de UV-VIS (200-600 nm) das frações acetato de etila e *n*-butanol do extrato das folhas, flores e galhos da *E. calycina*.

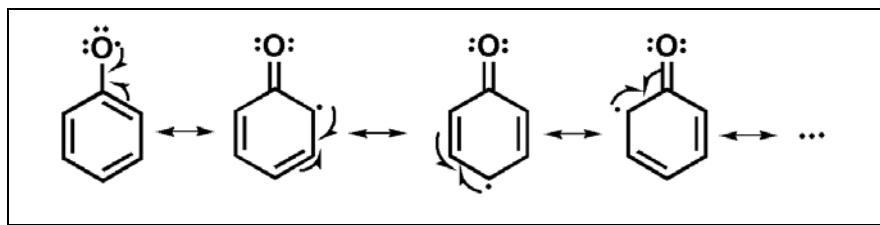


Fonte: autora.

4.2.7 Análise da atividade antioxidante: sequestro do radical DPPH, sistema β -caroteno/ ácido linoleico, potencial de oxidação

Uma vez que extratos e frações das folhas, galhos e flores apresentaram um elevado teor de compostos fenólicos, a atividade antioxidante de cada material foi analisada. Esses compostos apresentam elevada atividade antioxidante por agir como espécies sequestradoras de radical, que é estabilizado através de estruturas de ressonância no radical fenoxila formado (Figura 46).

Figura 46 - Estruturas de ressonância do radical fenoxila.



Fonte: autora.

Existe uma grande variedade de métodos para avaliar a atividade antioxidante de um extrato ou composto isolado. Dentre eles se podem destacar os métodos *in vitro* que são excelentes para identificar propriedades antioxidantes de uma amostra. Evidentemente que uma análise mais complexa *in vivo* é necessária, para que se estenda a atividade observada *in vitro* para organismos *in vivo*. Entretanto, uma amostra que apresenta baixa atividade antioxidante *in vitro* provavelmente não apresentará uma atividade melhor *in vivo* (ARUOMA, 1999 apud VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2012). Fato que mostra quão importante é a caracterização inicial do material *in vitro*.

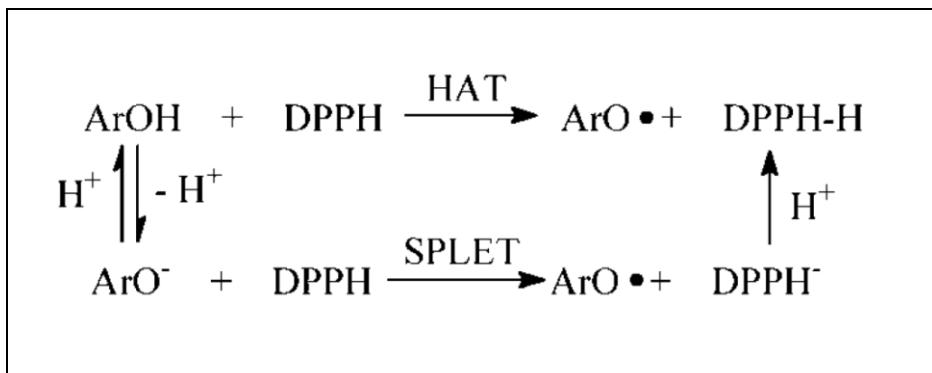
As análises da atividade antioxidante podem ser realizadas por métodos diretos e indiretos. Nos métodos diretos, como o sistema β -caroteno/ácido linoleico, a atividade antioxidante é avaliada em um sistema de degradação oxidativa. Neste método, é utilizada uma sonda oxidável que compete com antioxidantes na degradação de radicais gerados *in situ*. Nos métodos indiretos, a habilidade de um antioxidante em sequestrar radicais livres é analisada. Neste método são utilizados radicais estáveis como DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) e ABTS [ácido 2,2-azinobis(3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico)] os quais não estão associados à degradação oxidativa. Neste caso a atividade antioxidante é determinada pela atividade doadora de hidrogênio e, portanto, antiradicalar (ROGINSKY; LISSI, 2005).

A análise da atividade antioxidante dos extratos e frações da *E. calycina* foram realizadas pelo método indireto do sequestro de radical DPPH, pelo método direto do sistema β -caroteno/ácido linoleico e, além disso, verificou-se também o potencial de oxidação via voltametria por pulso diferencial (VPD).

Na análise da atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, a reação entre os compostos fenólicos e o radical DPPH pode ocorrer por dois tipos de mecanismos: transferência de hidrogênio atômico (“hydrogen atom transfer” – HAT) ou perda sequencial de próton na transferência de elétron (“sequential proton

loss electron transfer" – SPLET). Na Figura 47 se encontram descritos os dois mecanismos.

Figura 47 - Mecanismo de reação entre o radical DPPH e os compostos fenólicos.



Fonte: Liu (2010)

No mecanismo HAT é medida a capacidade de um antioxidante sequestrar radicais livres pela doação de hidrogênio para o DPPH radical (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Neste mecanismo, através da quebra homolítica da ligação O-H, o átomo de hidrogênio do grupo hidroxila do fenol é transferido para o radical DPPH, formando um radical fenoxila (ArO^\bullet) e um composto de coloração amarela H-DPPH (hidrazina correspondente).

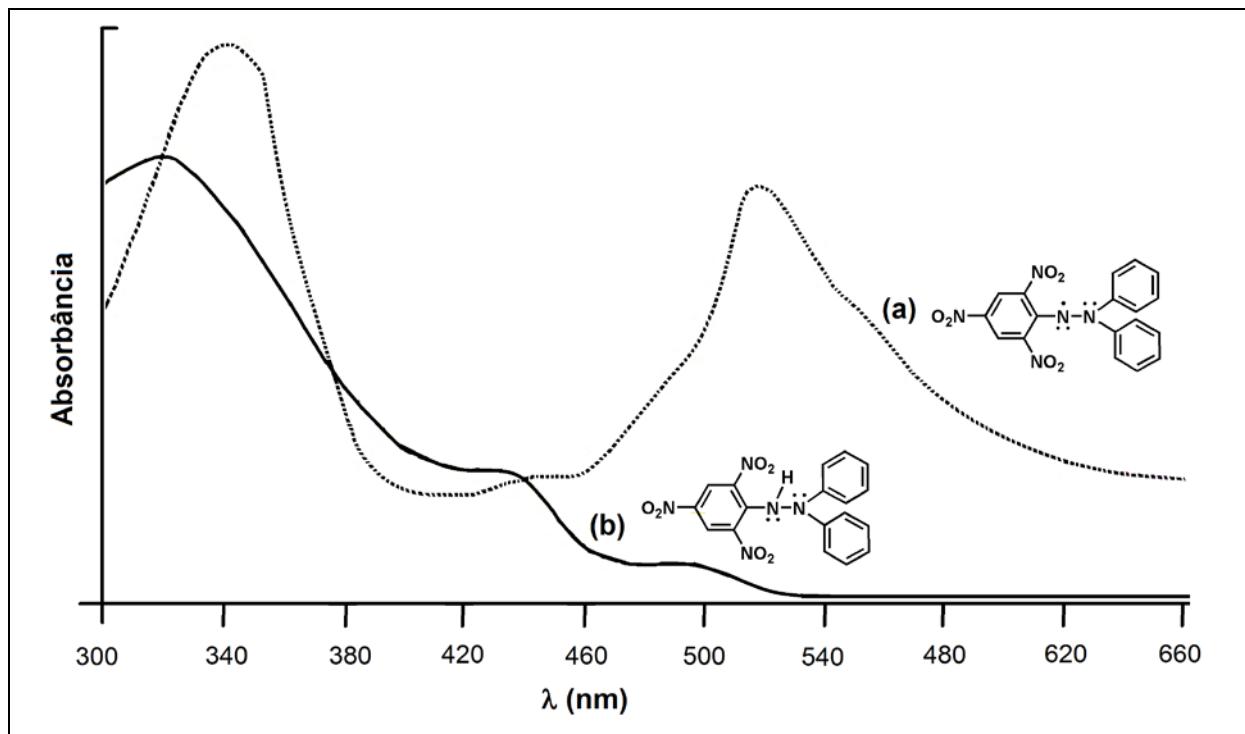
No mecanismo SPLET é medida a capacidade do ânion fenóxido (ArO^-) de transferir um elétron ao radical DPPH (FOTI; DAQUINO; GERACI, 2004, LITWINIENKO; INGOLD, 2007, LIU, 2010). Neste mecanismo, a hidroxila do grupo fenólico é inicialmente desprotonada, formando o ânion fenóxido (ArO^-). O ânion fenóxido doa um elétron ao radical DPPH, formando o radical fenoxila (ArO^\bullet) e o ânion DPPH $^-$. O ânion DPPH $^-$ doa seu par de elétrons a um H $^+$ presente no meio reacional, formando a hidrazina DPPH-H.

O mecanismo é dependente do solvente e do pH do meio reacional. Em solventes ionizantes, tais como metanol e etanol, o passo determinante para esta reação é a rápida transferência de elétrons do ânion fenóxido ao radical DPPH pelo mecanismo SPLET. Neste tipo de solvente, o sequestro do radical pelo ArOH (mecanismo HAT) é muito lento devido a fortes ligações de hidrogênio do solvente. Já em solventes não ionizantes ou na presença de ácidos, o mecanismo será preferencialmente por HAT (LITWINIENKO; INGOLD, 2004).

A análise da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH está baseada na medida do consumo do radical DPPH pelo extrato ou fração. O monitoramento é realizado através de um espectrofotômetro no qual é medido o decréscimo da absorbância do radical DPPH.

Na Figura 48 é mostrado o espectro de absorção do radical DPPH e do produto formado, correspondente hidrazina DPPH-H, após reação com antioxidantes. Nesta figura é possível observar que, o radical DPPH apresenta máximo de absorção em comprimento de onda no qual a hidrazina DPPH-H apresenta mínimo de absorção. Assim, o monitoramento da absorbância na análise da atividade antioxidante é realizado nessa região (517 nm), evitando, portanto, possível interferência da hidrazina DPPH-H na absorção do radical DPPH.

Figura 48 - Espectro de absorção do radical DPPH e da hidrazina formada.

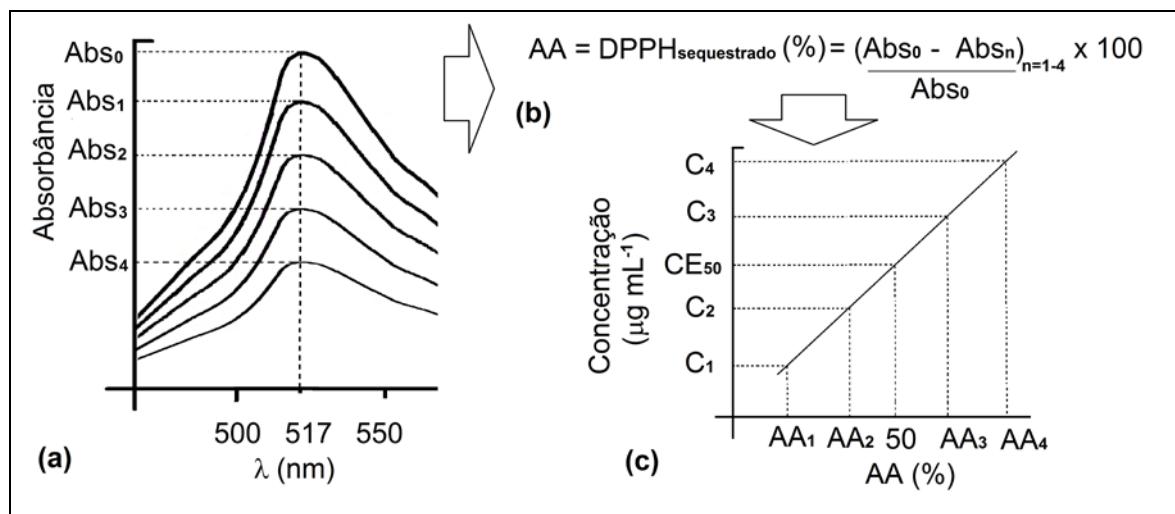


Fonte: adaptado de Pérez e Aguilar (2013)

O resultado da análise da atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH foi expresso em concentração eficiente, CE_{50} , que é a concentração de extrato ou fração necessária para reagir com 50% do radical DPPH. Portanto, quanto menor esse valor, melhor é a atividade antioxidante. O valor da porcentagem de consumo do radical DPPH (AA) é obtido pela Equação 1 do Item 3.6.7.1 (p. 62).

O CE_{50} é obtido da regressão linear da curva analítica do gráfico da concentração de amostra *versus* AA, como ilustrado na Figura 49.

Figura 49 - Esquema representativo do cálculo do CE_{50} .



Fonte: autora. Nota: a) espectro de absorção do radical DPPH (Abs_0) e da amostra mais radical DPPH após 1 hora de reação, em concentrações de amostra que variam de 1 a 4 (Abs_{1-4}); b) fórmula geral de cálculo da porcentagem de consumo do radical DPPH; c) gráfico da porcentagem de consumo do radical DPPH para cada concentração da amostra (AA_{1-4}) *versus* a respectiva concentração de amostra (C_{1-4}).

A Tabela 28 apresenta os valores de CE_{50} da análise de sequestro do radical DPPH para os extratos das folhas, galhos e flores. Nesta tabela é possível verificar que os galhos e as flores apresentam maior atividade antioxidante (menor CE_{50}) em relação ao extrato das folhas.

Tabela 28 - Valores de CE_{50} da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH dos extratos de folhas, galhos e flores da *E. calycina*.

	DPPH (CE_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$)
Folhas	$19,7 \pm 1,3$
Galhos	$7,5 \pm 0,5^a$
Flores	$7,8 \pm 1,0^a$
BHT*	$6,1 \pm 0,2^a$

Nota: as análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p < 0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

Além disso, verifica-se também que o CE_{50} obtido para os extratos de galhos e flores são bem próximos (não apresenta diferença significativa) ao CE_{50} do BHT,

que é um antioxidante sintético e utilizado como padrão positivo. Isto mostra quão promissor são os extratos das flores e galhos.

Segundo Reynertson, Basile e Nennely (2005), a intensidade da atividade antioxidante pode ser correlacionada com o valor obtido de CE_{50} conforme mostrado na Tabela 29.

Tabela 29 - Correlação entre os valores de CE_{50} e a intensidade da atividade antioxidante.

DPPH (CE_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Intensidade da atividade antioxidante
< 50	Elevada
50-100	Moderada
100-200	Baixa
> 200	Inativa

Portanto, o extrato das folhas também apresentou excelente atividade antioxidante. Assim, pode-se considerar que as folhas, flores e galhos da *E. calycina* é uma fonte promissora de compostos antioxidantes.

Outras espécies de *Eugenia* já foram avaliadas quanto à atividade antioxidante pelo método do radical DPPH e, de maneira geral, apresentam, elevada atividade, entretanto *E. calycina* apresenta melhor atividade em relação à algumas espécies. Observa-se na literatura que o extrato em metanol:água (1:1) da casca da *E. polyantha* (LELONO; TACHIBANA, 2013) por exemplo, apresenta CE_{50} de 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O extrato em acetato de etila das folhas de *E. uniflora* apresenta CE_{50} de 23,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de *E. malaccensis* 151,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (FIGUEIRO et al., 2013). O extrato das folhas de *E. jambolana* em etanol 95% apresentou CE_{50} de 25,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SANTOS et al., 2010).

Na Tabela 30 se encontram os valores de CE_{50} da análise da atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH para as frações dos extratos das folhas, galhos e flores.

Tabela 30 - Valores de CE_{50} da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH das frações dos extratos de folhas, galhos e flores da *E. calycina*.

Frações	DPPH (CE_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Folhas	Galhos	Flores
hexano	264,1 \pm 5,3	53,8 \pm 3,6	222,6 \pm 3,6
diclorometano	58,2 \pm 0,1	21,0 \pm 0,3	87,2 \pm 0,8
metanol:água	9,8 \pm 0,8	5,8 \pm 0,5 ^b	6,1 \pm 0,2 ^c
acetato de etila	6,4 \pm 0,8 ^a	4,2 \pm 0,5 ^b	5,0 \pm 0,2 ^c
<i>n</i> -butanol	8,0 \pm 0,2 ^a	5,4 \pm 0,7 ^b	6,1 \pm 0,7 ^c
água	56,6 \pm 0,1	27,0 \pm 3,0	19,2 \pm 0,3

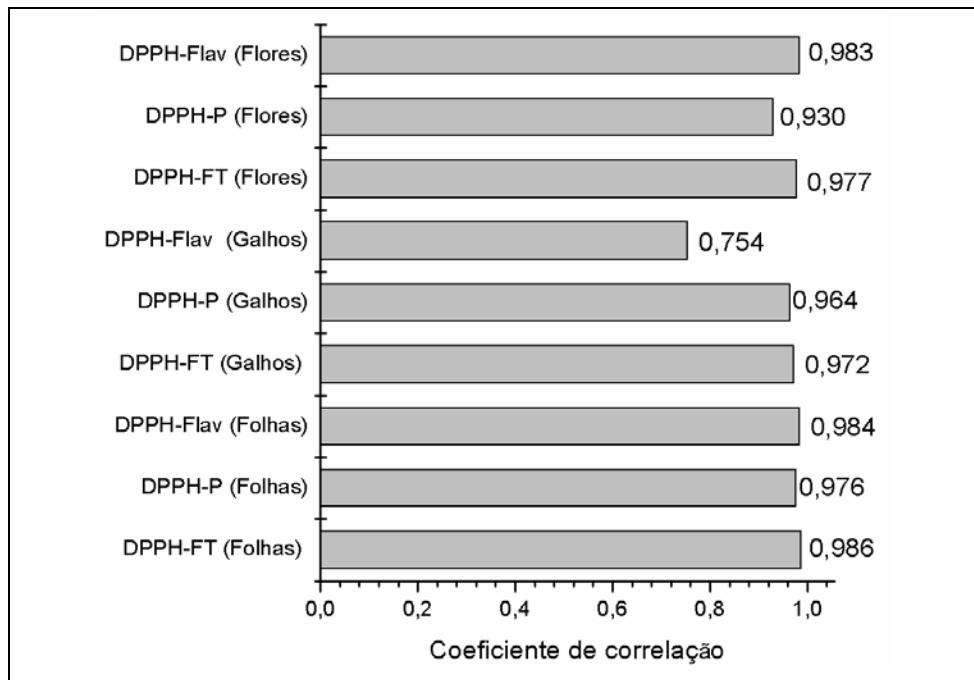
Nota: as análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

Através destes resultados é possível observar que para todas as partes da planta analisada, a fração acetato de etila e *n*-butanol apresentam os menores CE_{50} e, portanto, melhor atividade antioxidante. Sendo que o CE_{50} observado é comparável ao do BHT, apresentando, portanto excelente atividade antioxidante. Este fato mostra que essas partições são promissoras no isolamento de compostos com excelente atividade antioxidante.

Comparando a atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH com as análises de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides realizadas, verifica-se que quanto maior o teor, menor o CE_{50} , logo maior a atividade antioxidante.

Fato que sugere correlação positiva entre as análises. Isso é comprovado estatisticamente observando os excelentes coeficientes de correlação obtidos pelo método de Pearson, mostrados na Figura 50.

Figura 50 - Coeficiente de correlação entre os métodos DPPH, fenóis totais (FT), flavonoides (Flav) e proantocianidinas (P).



Nota: a correlação foi realizada pelo método de Pearson através do Programa Sigma Plot 11.0. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações. FT: fenóis totais; P: proantocianidinas; Flav: flavonoides. Fonte: autora.

Os extratos e as frações das folhas, galhos e flores foram também submetidos à análise eletroquímica por voltametria de pulso diferencial (VPD). Sabe-se que compostos fenólicos são eletroativos, ou seja, são agentes redutores (facilmente oxidados por eletrodos inertes). Assim, sabendo da presença de compostos fenólicos nas amostras (comprovada pelas análises realizadas), se torna interessante a correlação entre os dados eletroquímicos (o potencial de oxidação e a intensidade de carga) com a atividade antioxidante, realizada pelo método espectrofotométrico do sequestro do radical DPPH. Com relação ao potencial de oxidação, quanto maior é o seu valor, menor o poder doador de elétrons, portanto menor a atividade antioxidante da amostra analisada. Com relação à carga, quanto maior a sua intensidade no pico de oxidação, maior é a quantidade de compostos que oxidam neste potencial (ALVES et al., 2010).

A voltametria de pulso diferencial (VPD) consiste na aplicação de pequenos pulsos de potencial com amplitude constante (10-100 mV). Nesta técnica é medida a corrente ao longo do tempo após a aplicação de cada pulso. A corrente obtida do experimento é na verdade uma diferença entre as correntes medidas antes (I_1) e

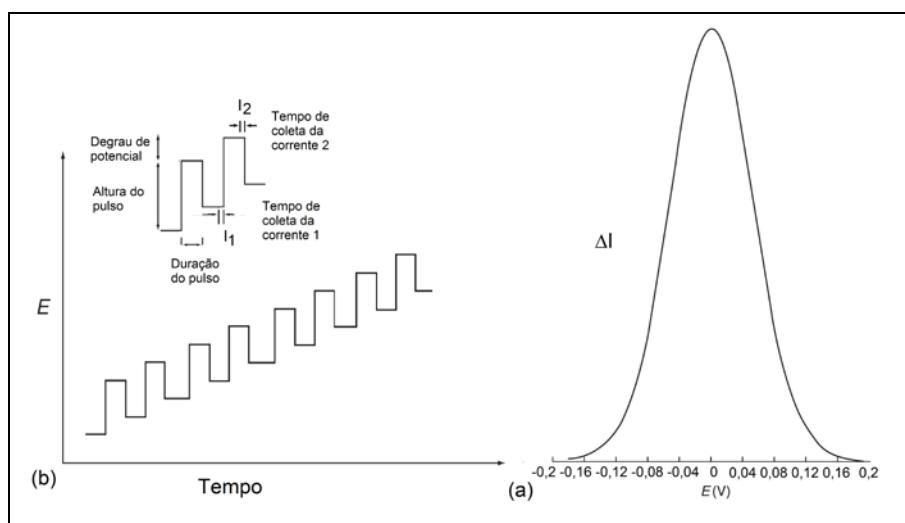
final do pulso (I_2). Uma característica especial desta técnica é justamente a separação destas correntes, que permite remover a corrente capacitiva (I_1 , oriunda da dupla camada elétrica na interface do eletrodo-eletrolito) da corrente Faradaica (resultante da reação de oxidação de interesse). Como resultado se obtém um aumento significativo da sensibilidade das análises.

Os parâmetros importantes da técnica de VPD são: “pulse amplitude” que é altura do pulso de potencial; “pulse width” (t_{puls}) que é duração do pulso, “step potential” (E_{step}) que é o degrau de potencial e o “sampling period” que é o tempo de coleta da corrente. Esses parâmetros se encontram ilustrados na Figura 51 (GULABOSKI; PEREIRA, 2008, PACHECO et al., 2013).

Os valores de potencial de oxidação, corrente do pico de oxidação e carga são dados obtidos da análise eletroquímica que podem ser utilizados na caracterização do material avaliado.

As técnicas eletroquímicas apresentam como grande vantagem o fato de não requerer utilização de compostos reativos, uma vez que os dados são obtidos do comportamento eletroquímico da amostra. Além disso, amostras turvas ou muito coloridas podem ser analisadas sem tratamento prévio. Entretanto, uma desvantagem da análise é a necessidade em se limpar frequentemente o eletrodo de trabalho para manter sua sensibilidade, já que pode ocorrer adsorção de compostos na superfície do eletrodo (MAGALHÃES et al., 2008).

Figura 51 - Voltametria por pulso diferencial: a) perfil da aplicação de potenciais em pulso, b) voltamograma.

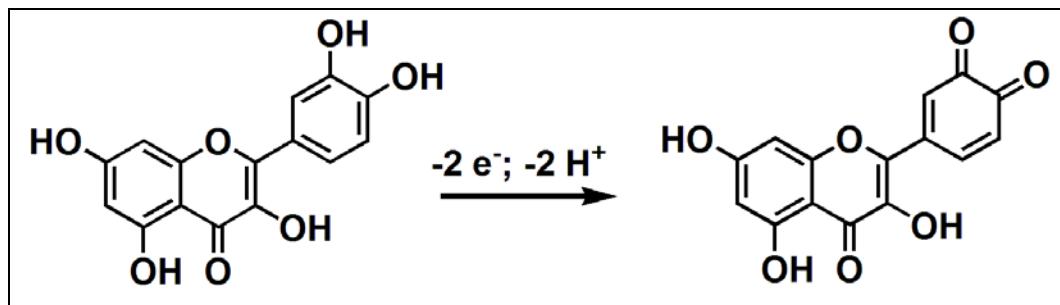


Fonte: Gulaboski e Pereira (2008).

Trabalhos têm avaliado a relação entre atividade antioxidante e o potencial e oxidação de flavonoides (YANG et al., 2001, BLASCO et al., 2007, ZHANG et al., 2011). Nestes estudos, verifica-se que a grandeza do potencial de oxidação dos flavonoides depende: da presença de grupo *o*-di-hidroxila no anel B; da dupla ligação entre os carbonos C2-C3 em conjugação com uma carbonila no carbono C4 e da presença de grupos OH nos carbonos C3 e C5 (anel A) (YANG et al., 2001). Assim, a presença desses requisitos faz com que o potencial de oxidação se torne menor, sendo, portanto, maior a atividade antioxidante do composto (TIMBOLA et al., 2006, SANTOS; MAZO; CAVALHEIRO, 2008).

Na Figura 52 se encontra a reação de oxidação da quecetina com formação da quinona correspondente.

Figura 52 - Reação de oxidação da quercetina.



Fonte: adaptado de Timbola e outros (2006).

Neste contexto, os extratos e as frações das folhas, flores e galhos foram analisados por voltametria de pulso diferencial. Na Tabela 31 se encontram os potenciais de oxidação obtidos. Verifica-se que, em ambos os tampões, o potencial de oxidação das folhas, seja do extrato ou frações, encontra-se superior ao potencial encontrado nas flores e nos galhos. Fato que confere com a atividade antioxidante, na qual o CE_{50} das folhas é superior ao das flores e galhos, apresentando, portanto, menor atividade antioxidante que as flores e os galhos.

Tabela 31 - Potencial de oxidação observado pela voltametria por pulso diferencial dos extratos e frações, analisados em tampão acetato e fosfato.

	Potencial (mV)					
	Folhas		Galhos		Flores	
	TA	TF	TA	TF	TA	TF
Extrato	408±3	254±3	333±2	162±1	352±3	174±1
H	406±7	256±2	348±1	164±1	334±7	176±3
D	408±1	258±1	336±1	162±1	394±7	174±1
MA	406±3	252±1	340±6	168±1	354±6	178±3
AE	404±3	234±1	334±4	165±3	350±3	174±1
B	410±3	256±3	354±1	162±1	384±6	172±22
A	394±3	234±3	336±2	164±3	334±3	172±20

Nota: TA: tampão acetato, TF: tampão fosfato, H: hexano, D: diclorometano, MA: metanol-água, AE: acetato de etila, B: *n*-butanol, A: água.

Na Tabela 32 se encontram as cargas obtidas pela VPD para os extratos e frações das folhas, galhos e flores.

Tabela 32 - Carga do pico de oxidação observado pela voltametria por pulso diferencial dos extratos e frações, analisados em tampão acetato e fosfato.

	Carga (μC)					
	Folhas		Galhos		Flores	
	TA	TF	TA	TF	TA	TF
Extrato	31,3±0,7	19,3±0,6	33,3±1,8 ^c	37,2±0,9 ^d	72,1±0,7	72,6±1,0 ^g
H	0,37±0,01	0,11±0,1	4,1±0,4	13,5±1,1	6,3±0,3	5,1±1,1
D	15,4±0,6	10,2±0,1	8,2±0,2	27,6±0,3 ^e	16,2±0,6	12,9±0,7
MA	41,9±0,1 ^a	38,5±2,0 ^b	35,0±2,0 ^c	40,3±1,1 ^d	141,0±0,6 ^f	77,0±0,8 ^g
AE	46,6±0,7	43,2±0,4	40,9±3,2	49,9±2,4	145,2±1,8 ^f	75,5±3,9 ^g
B	43,6±0,5 ^a	41,0±1,0 ^b	34,2±2,5 ^c	39,8±0,8 ^d	141,1±3,2 ^f	75,5±1,7 ^g
A	26,3±0,5	24,5±0,9	31,3±1,6 ^c	30,0±0,8 ^e	110,0±12,5	77,1±0,4 ^g

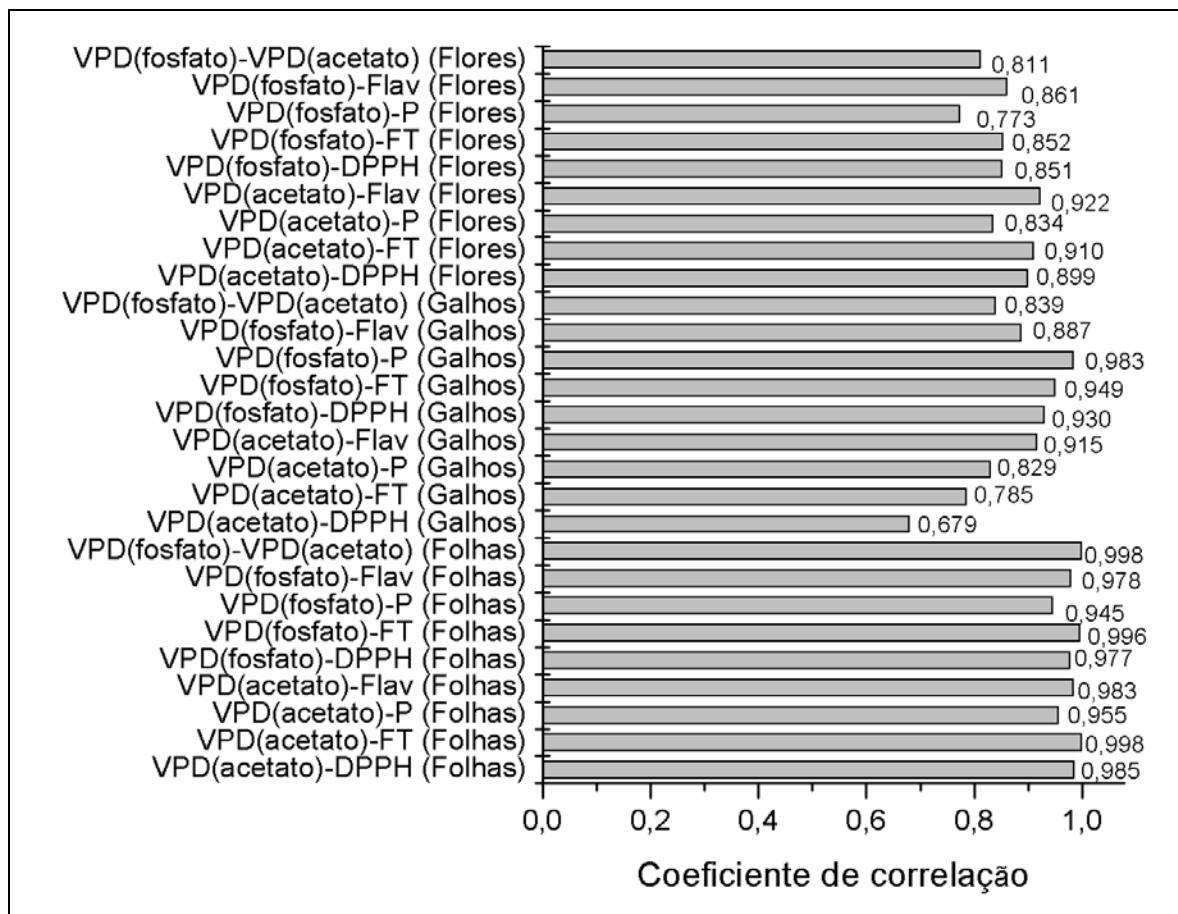
Nota: as análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes. TA: tampão acetato, TF: tampão fosfato, H: hexano, D: diclorometano, MA: metanol-água, AE: acetato de etila, B: *n*-butanol, A: água.

Na Tabela 32 se pode verificar que o extrato das flores apresenta maior intensidade da carga em relação ao extrato das folhas e dos galhos. Isto significa a

presença de um maior número de compostos que oxidam neste potencial. Observando as partições, constata-se que a de acetato de etila e *n*-butanol se destacam em relação às outras partições, mostrando que nestes solventes foram extraídas maior quantidade de compostos que oxidam neste potencial. Fato que explica, portanto, a maior atividade antioxidante observada nestas frações.

Na Figura 53 estão mostrados os coeficientes de correlação entre as análises, sendo possível verificar forte correlação ($|r| = 0,6 - 0,9$) de modo geral.

Figura 53 - Coeficiente de correlação entre os métodos de voltametria por pulso diferencial (VPD), DPPH, fenóis totais (FT), flavonoides (Flav) e proantocianidinas (P).

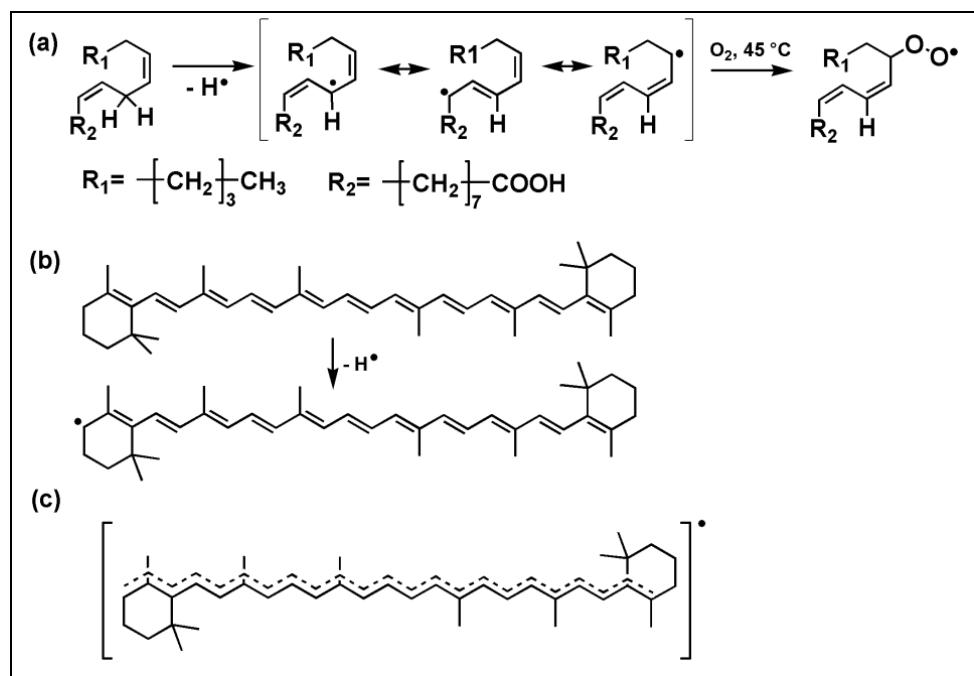


Nota: a correlação foi realizada pelo método de Pearson através do Programa Sigma Plot 11.0. Foi obtido $p < 0,01$ para todas as correlações. Fonte: autora.

Como as frações em acetato de etila, *n*-butanol e água apresentaram maior atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH e maior densidade de carga pela voltametria de pulso diferencial, a atividade antioxidante delas foi então avaliada *in vitro* pelo método direto do sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Neste método, o ácido linoleico em presença de oxigênio e uma temperatura de no máximo 50 °C forma o radical peroxila (LOUREIRO; DI MASCIO; MEDEIROS, 2002), como mostrado na Figura 54. Este radical reage com o β -caroteno resultando na estabilização do radical através de estruturas de ressonância. Isso resulta no descoramento (ou “branqueamento”) da solução, uma vez que a soluções de β -caroteno é amarela. A presença de outros compostos antioxidantes faz com que estes reajam competitivamente com o radical peroxila, reduzindo o consumo do β -caroteno.

Figura 54 - Análise da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico: a) oxidação do ácido linoleico gerando radical hidroxila; b) formação de radical na estrutura do β -caroteno; b) estruturas de ressonância estabilizadoras do radical no β -caroteno.



Fonte: autora.

Portanto, neste método o consumo de β -caroteno é monitorado através do decréscimo da absorbância da solução contendo β -caroteno e ácido linoleico. Essas medidas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de máxima absorção do β -caroteno (470 nm). Foram utilizadas diferentes concentrações de frações para calcular o CE_{50} , que é a concentração de amostra necessária para inibir 50% o consumo do β -caroteno (conforme foi explicado para o método de sequestro do radical DPPH).

A Tabela 33 mostra os resultados de CE_{50} da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico das frações em acetato de etila, *n*-butanol e água dos extratos das folhas, galhos e flores.

Tabela 33 - Valores de CE_{50} da análise da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico das frações em acetato de etila, *n*-butanol e água dos extratos das folhas, galhos e flores.

	Folhas	Galhos	Flores
acetato de etila	43,4 \pm 2,3	22,6 \pm 0,8	34,8 \pm 0,5
<i>n</i> -butanol	56,6 \pm 1,0	49,8 \pm 2,6	28,6 \pm 0,9
água	133,3 \pm 15,2	147,1 \pm 5,8	51,5 \pm 0,9

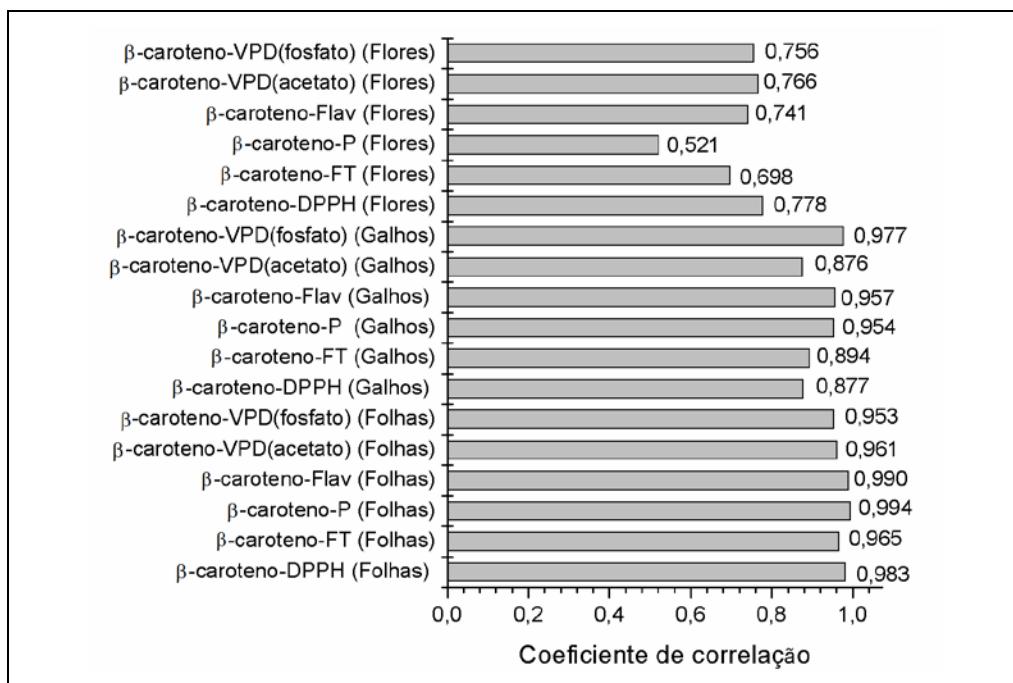
Nota: as análises mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes. Controle positivo: BHT ($CE_{50}=4,9\pm0,1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$).

Observando os resultados mostrados na Tabela 33 se pode verificar que, novamente, as flores e os galhos apresentam maior atividade em relação às folhas. Além disso, observa-se que pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, as frações em acetato de etila e em *n*-butanol também apresentaram elevada atividade antioxidante ($CE_{50}<50$). Assim, o isolamento de substâncias com atividade antioxidante se torna interessante para essas frações.

Os valores da atividade antioxidante pelo método do sistema β -caroteno/ácido linoleico foi comparado com os métodos de sequestro do radical DPPH, voltametria por pulso diferencial, teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides através do coeficiente de correlação de Pearson (Figura 55). De maneira geral, nesta análise se pode verificar excelente correlação, através de coeficientes bastante elevados. No caso das flores, entretanto, observa-se coeficientes de correlação um pouco menores entre as análises de fenóis totais e proantocianidinas com o sistema β -caroteno/ácido linoleico. Provavelmente, isso ocorre porque enquanto a fração acetato de etila apresenta elevado teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides, na análise da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico foi observado que a fração *n*-butanol apresentou melhor resultado, fato que influenciou em um coeficiente de correlação mais baixo. Ainda com relação às flores, quando os valores da análise pelo sistema β -caroteno/ácido

linoleico são comparados com o sequestro de radical DPPH e VPD, observa-se uma melhora do coeficiente de correlação. Isso se deve ao fato dos valores obtidos nas análises de DPPH e VPD não apresentarem diferença significativa entre as frações em acetato de etila e *n*-butanol, corroborando com a análise pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Figura 55 - Coeficiente de correlação entre a atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, sequestro do radical DPPH, teor de fenóis totais (FT), proantocianidinas (P) e flavonoides (Flav).



Nota: a correlação foi realizada pelo método de Pearson através do Programa Sigma Plot 11.0. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações. Fonte: autora.

4.2.8 Atividade inibidora de enzima α -amilase

Conforme foi abordado no referencial teórico, a atividade inibidora de α -amilase pode ser uma opção para o tratamento de doenças relacionadas à digestão de carboidratos, como diabetes, obesidade, hiperlipidemia e até doenças orais. Além disso, se torna também atrativa a aplicação em controle de insetos. Os compostos fenólicos como flavonoides e taninos têm mostrado atividade inibidora de α -amilase, fato que tem explicado o controle glicêmico de pacientes que fazem o uso de alimentos ricos em compostos fenólicos (SILVA; SILVA, 1999, LO PIPARO et al., 2008).

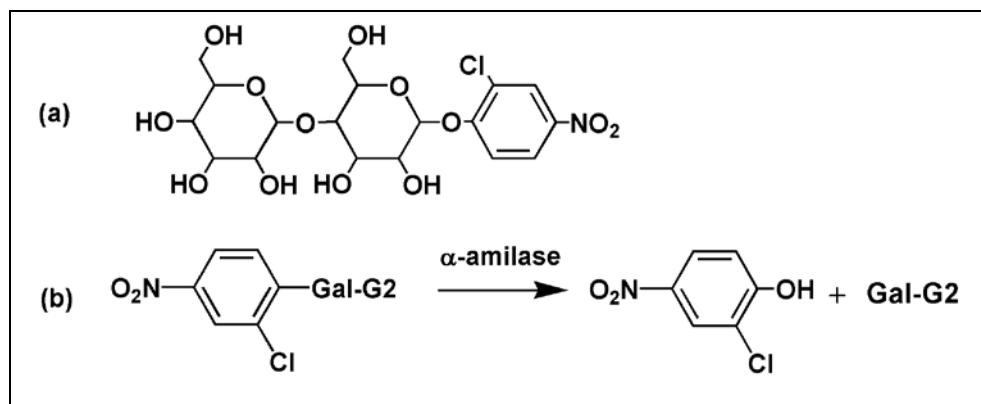
A determinação da atividade inibidora de α -amilase pode ser realizada por dois métodos cinéticos diferentes. Ambas se baseiam na incubação dos inibidores com a enzima e na identificação da inibição utilizando grupos cromóforos, que serão monitorados através da medida do comprimento de onda do cromóforo em um espectrofotômetro. Entretanto, o que distingue os dois métodos está em quem será detectado.

Uma das metodologias desta análise envolve a determinação de açúcares redutores que foram formados após a hidrólise do carboidrato. Portanto, nesta técnica são incubados os inibidores, a enzima α -amilase e o carboidrato, após determinado período, um reagente cromóforo é adicionado, o qual reagirá com o açúcar redutor gerado da hidrólise do carboidrato, resultando um produto com determinada cor. Os reagentes utilizados como cromóforos são: cobre alcalino, ferricianeto alcalino, solução de iodeto/iodo (KI/I_2) e ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (ROBYT; ACKERMAN; KENG, 1972, MARSHALL; LAUDA, 1975, KUSANO et al., 2008, SUDHA et al., 2011, ADISAKWATTANA et al., 2012, GOPINATH et al., 2013).

A outra metodologia de determinação da inibição da enzima α -amilase envolve a incubação apenas dos inibidores com a enzima. Após determinado período são adicionados substratos cromogênicos. Estes substratos são derivados de *p*-nitrofenol de oligossacarídeos, como CNP-G3 (2-cloro-4-nitrofenilmaltotriosídeo) (FOO; BAIS, 1998, AL-DABBAS et al., 2006), GalG2-CNP (2-cloro-4-nitrofenilmaltosídeo) (KANDRA et al., 2004, ZAJÁCZ et al., 2007, GOUVEIA et al., 2014) e pNPM (*p*-nitrofenilmaltopentaglicosídeo) (LEE; HAN, 2012, LEE et al., 2012). Neste método, a enzima α -amilase, que não foi inibida, catalisa a hidrólise do substrato, liberando o grupo cromóforo *p*-nitrofenol e os açúcares. Através da medida da absorbância do grupo cromóforo liberado, em comprimento de onda específico, o teor de inibição da enzima é determinado.

A determinação da atividade inibidora de α -amilase pelos extratos e frações da *E. calycina* foi realizada pelo método cinético de sua reação com o substrato GalG2-CNP. Este método se baseia na hidrólise do substrato GalG2-CNP pela enzima α -amilase, liberando o composto 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) de cor amarela e maltose (Gal-G2) (Figura 56). A velocidade de formação do CNP foi acompanhada através da medida do comprimento de onda máximo do CNP em 405 nm.

Figura 56 - Substrato GalG2-CNP: estrutura (a) e hidrólise (b).



Fonte: autora.

Na Tabela 34 estão mostradas as porcentagens de inibição de α -amilase pelos extratos, sendo observado que as folhas e as flores apresentaram maior ação inibidora em relação aos galhos. Provavelmente a presença dos compostos fenólicos nos extratos analisados são os responsáveis pela inibição observada.

Tabela 34 - Inibição de α -amilase pelos extratos das folhas, galhos e flores.

	Inibição (%)
Folhas	99,2 \pm 0,1 ^a
Galhos	95,2 \pm 0,2
Flores	98,9 \pm 0,3 ^a
Acarbose	99,6 \pm 0,2 ^a

Nota: as análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

O potencial inibidor das frações dos extratos também foi analisado (Tabela 35). Observando os resultados mostrados, verifica-se que as frações acetato de etila e *n*-butanol se destacam nos três extratos fracionados. Este fato também está de acordo com as análises anteriores, que mostram que essas partções apresentam maior teor de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante.

Tabela 35 - Inibição da α -amilase pelas frações dos extratos das folhas, galhos e flores.

Frações	Inibição (%)		
	Folhas	Galhos	Flores
hexano	13,4 \pm 2,1	16,7 \pm 2,3	4,9 \pm 0,5
diclorometano	18,8 \pm 4,0	28,5 \pm 0,4	11,2 \pm 1,2
metanol:água	92,4 \pm 1,1 ^a	94,6 \pm 0,1 ^b	91,7 \pm 0,5 ^c
acetato de etila	89,5 \pm 0,5	84,9 \pm 1,4	89,2 \pm 0,2
<i>n</i> -butanol	87,7 \pm 2,9 ^a	96,9 \pm 0,3 ^b	93,8 \pm 0,2 ^c
Água	24,8 \pm 5,1	44,5 \pm 1,3	1,5 \pm 0,8

Nota: as análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes. Controle positivo (acarbose): 99,6 \pm 0,2.

A atividade inibidora das frações acetato de etila, *n*-butanol e água, oriundas das frações metanol:água e os extratos foram analisadas em diferentes concentrações, com a finalidade de obter o CE_{50} (concentração necessária para inibir 50% da enzima). Na Tabela 36 estão mostrados os resultados obtidos de CE_{50} para as frações analisadas.

Tabela 36 - CE_{50} da atividade inibidora da α -amilase pelas frações dos extratos das folhas, galhos e flores.

	Inibição (CE_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Folhas	Galhos	Flores
Extrato	17,9 \pm 0,3 ^a	25,1 \pm 0,4	3,5 \pm 0,1 ^c
acetato de etila	8,8 \pm 0,1	16,1 \pm 0,4 ^b	2,1 \pm 0,1 ^c
<i>n</i> -butanol	11,7 \pm 0,4 ^a	12,7 \pm 0,1 ^b	1,8 \pm 0,1 ^c
Água	51,4 \pm 8,6	22,2 \pm 0,2	14,3 \pm 1,8

Nota: as análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes. Controle positivo (acarbose): 0,013 \pm 0,003 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

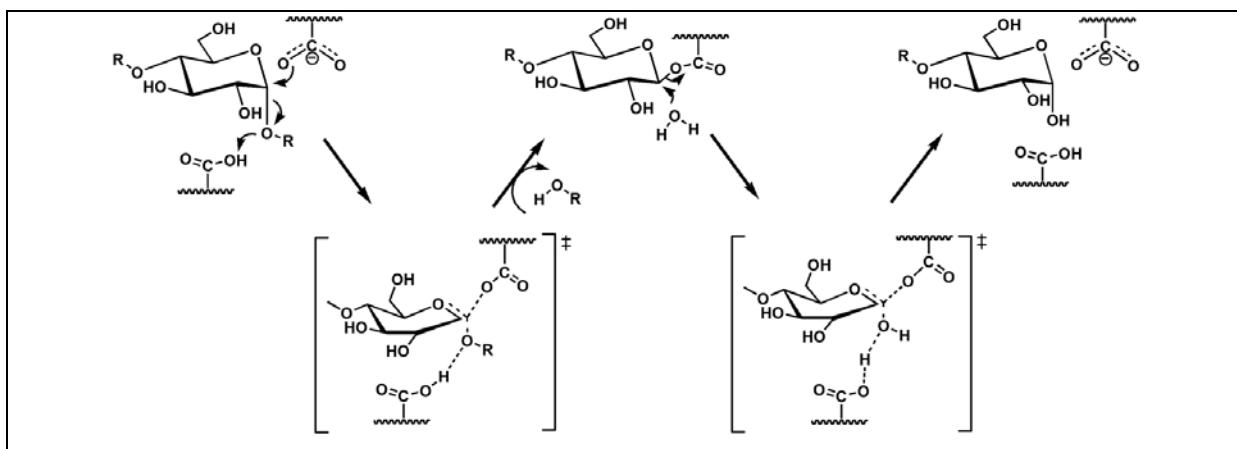
Com relação aos extratos, verifica-se que o das flores se destaca com menor CE_{50} , portanto maior sua atividade inibidora. Entretanto os galhos apresentam um pouco inferior às folhas e flores. No caso das frações, de maneira geral é observada a mesma tendência.

Outras espécies de *Eugenia* têm mostrado inibição da enzima α -amilase. O extrato das folhas de *E. Jambolana* apresenta CE_{50} de 133,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (KUMAR et al., 2013b); *E. punicifolia* com CE_{50} de 122,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (GALENO et al., 2014); *E. dysenterica* com CE_{50} de 14,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (DE SOUZA et al., 2012).

Na literatura são observados estudos sobre a influência da estrutura dos compostos fenólicos na inibição da enzima α -amilase. Para compreender essa interação é necessário antes compreender como se processa a clivagem das ligações glicosídicas pela enzima α -amilase.

O sítio ativo da enzima α -amilase envolvido na hidrólise de ligações glicosídicas apresenta grupos carboxílicos. Tem sido sugerido que o sítio nucleofílico da enzima se liga ao substrato no centro anomérico do açúcar, formando um estado de transição. Neste passo, o substrato é removido por clivagem na unidade glicosídica. Num segundo passo, uma molécula de água ataca o centro anomérico para quebrar a ligação covalente entre sítio e o substrato, resultando na entrada de um grupo OH no carbono anomérico. Assim, pode-se dizer que a reação ocorre por um mecanismo tipo S_N2 , mostrado na Figura 57 (KURIKI; IMANAKA, 1999, MURALIKRISHNA; NIRMALA, 2005, LO PIPARO et al., 2008).

Figura 57 - Mecanismo proposto de clivagem da ligação glicosídica pelo sítio ativo da enzima α -amilase.

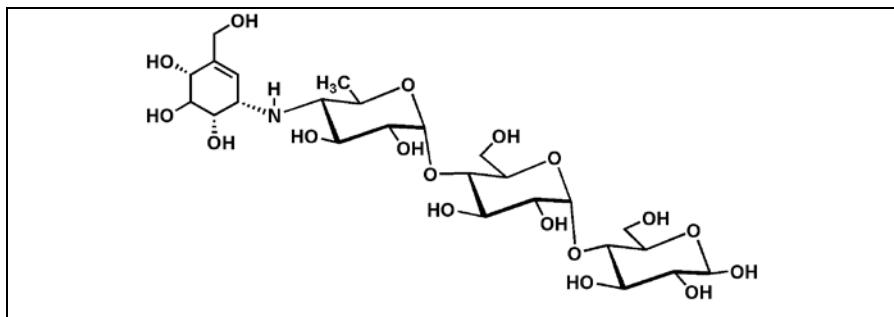


Fonte: Kuriki e Imanaka (1999).

A acarbose, utilizada como controle positivo, apresenta em sua estrutura um nitrogênio ligado ao carboidrato na posição α -1,4 (Figura 58). Ela age como inibidora da enzima devido à forte interação entre os sítios ativos da enzima α -amilase e o

anel cicloexeno insaturado e o nitrogênio da ligação *N*-glicosídica que imitam o estado de transição para a clivagem enzimática das ligações glicosídicas de carboidratos (SALES et al., 2012).

Figura 58 - Estrutura da acarbose.



Fonte: autora.

No caso dos flavonoides, pesquisas têm mostrado que ligações de hidrogênio entre os grupos OH e os sítios ativos da enzima são responsáveis pela inibição da α -amilase. Além disso, a estrutura de anel planar condensado, devido à presença de carbonila no carbono C4 e dupla ligação entre os carbonos C2 e C3, permite a formação de um sistema π altamente conjugado, o que eleva a atividade inibidora do flavonoide. Assim, a glicosilação do grupo OH, metilação ou metoxilação, e a hidrogenação da ligação dupla entre os carbonos C2 e C3, diminui a inibição da α -amilase (LO PIPARO et al., 2008, XIAO et al., 2012).

Em relação às inibições apresentadas pelos extratos da *E. calycina*, verifica-se primeiramente que o elevado teor de flavonoides contendo carbonila na posição 4, observado nas flores e folhas, explicam a elevada inibição encontrada. Com relação aos galhos, conforme discutido anteriormente, os taninos condensados (proantocianidinas) presentes não apresentam a carbonila no carbono C4 da estrutura do flavonoide e a dupla ligação entre os carbonos C2 e C3, o que poderia explicar uma menor atividade inibidora destes compostos e, portanto, um CE_{50} maior. Entretanto, está inibição não é tão menor assim, pois de acordo com os estudos de Xiao e outros (2012), as proantocianidinas apresentam inibição maior que seus monômeros. Dessa forma, como foi observado elevado teor desta classe de compostos, justifica-se a atividade inibidora do extrato e partições dos galhos.

4.2.9 Isolamento e caracterização de compostos bioativos no extrato das folhas

As análises realizadas mostraram que as frações acetato de etila e *n*-butanol do extrato das folhas apresentaram os melhores resultados, tornando-se promissoras no isolamento de compostos bioativos. Na análise estatística da componente principal (PCA) foi verificado que a fração acetato de etila se distingue da fração *n*-butanol, revelando diferenças entre as frações que podem ser quanto à composição e/ou teor de compostos fenólicos. Na análise por CCD utilizando como fase estacionária sílica gel e como eluente da fase móvel uma mistura de ácido fórmico:ácido acético:acetato de etila:água (1,1:1,1:10:2,6), foi observado que a fração mais promissora para o isolamento de compostos foi a acetato de etila (FoE98-AE).

Após o fracionamento desta fração em sephadex-LH20 (item 3.6.9, p. 68) e análise do perfil cromatográfico por CCD, as frações foram reunidas em 7 grupos: FoE98-AE1, FoE98-AE2, FoE98-AE3, FoE98-AE4, FoE98-AE5, FoE98-AE6 e FoE98-AE7. A atividade antioxidante dessas frações foi analisada pelo método de sequestro do radical DPPH. Os resultados se encontram na Tabela 37.

Tabela 37 - Valores de CE₅₀ da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH das frações da coluna cromatográfica das folhas.

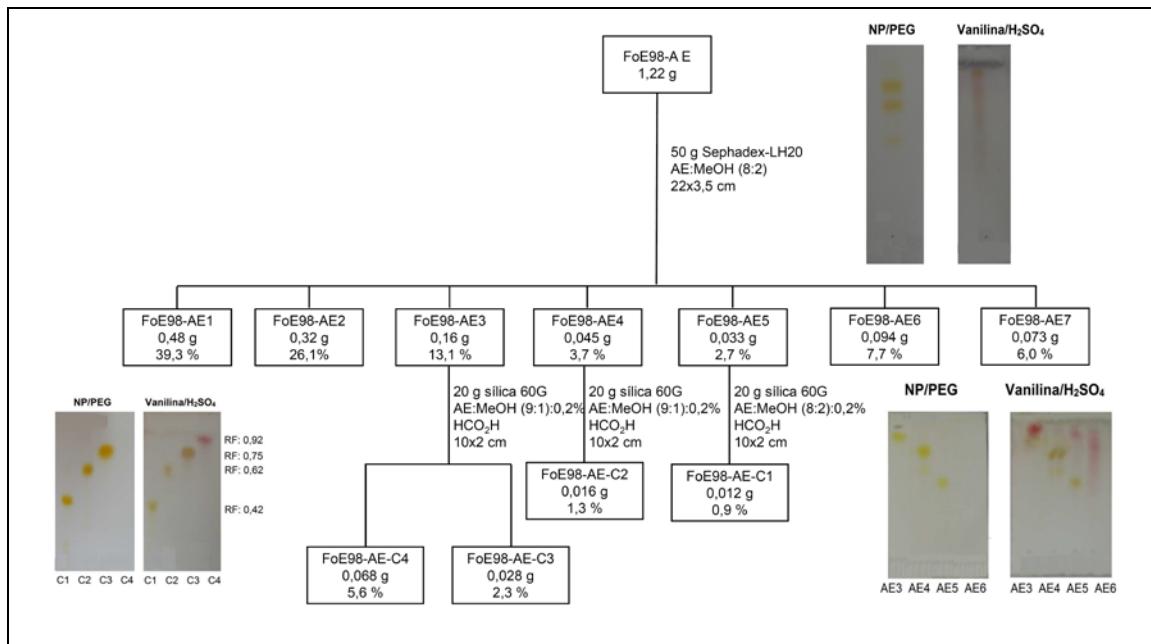
	DPPH (CE ₅₀ , $\mu\text{g mL}^{-1}$)
FoE98-AE1	106,8±0,7
FoE98-AE2	44,6±0,8
FoE98-AE3	5,8±0,1 ^a
FoE98-AE4	7,0±0,1 ^a
FoE98-AE5	6,5±0,2 ^a
FoE98-AE6	6,5±0,1 ^a
FoE98-AE7	5,7±0,1 ^a
BHT	6,1±0,2 ^a

Nota: as análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

Através destes resultados foi possível verificar que apenas as frações FoE98-AE1 e FoE98-AE2 não apresentaram bons valores de CE₅₀. As demais frações apresentaram inclusive CE₅₀ comparável ao BHT. Assim, através do perfil observado na CCD as frações FoE98-AE3, FoE98-AE4 e FoE98-AE5 foram

refracionadas, como mostrado no fluxograma da Figura 59, sendo obtido 4 compostos isolados: FoE98-AE-C1, FoE98-AE-C2; FoE98-AE-C3 e FoE98-AE-C4.

Figura 59 - Rendimentos do processo de isolamento de compostos das folhas.

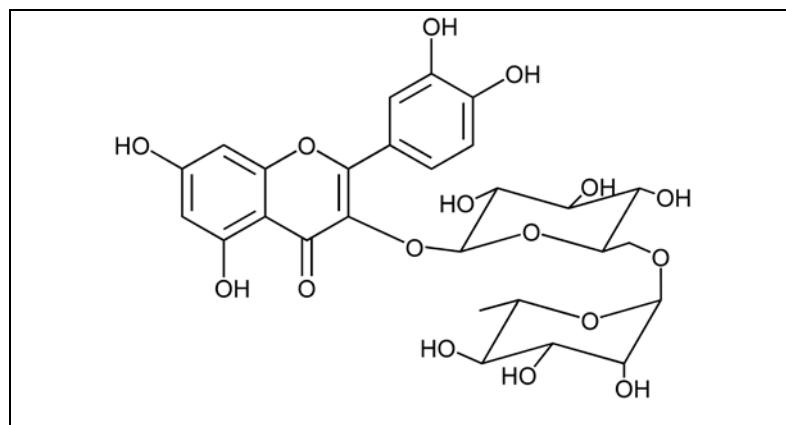


Fonte: autora. Nota: eluente da CCD: ácido fórmico:ácido acético:acetato de etila:água (1,1:1,1:10:2,6).

Os compostos isolados FoE98-AE-C1, FoE98-AE-C2; FoE98-AE-C3 revelam com NP-PEG e vanilina/H₂SO₄, enquanto o composto FoE98-AE-C4 revela apenas com vanilina/H₂SO₄. Os compostos isolados foram identificados com o auxílio da espectrometria de massas por ionização *electrospray* (ESI-EM/EM) e ressonância magnética nuclear (RMN).

4.2.9.1 Identificação do composto isolado FoE98-AE-C1 (rutina)

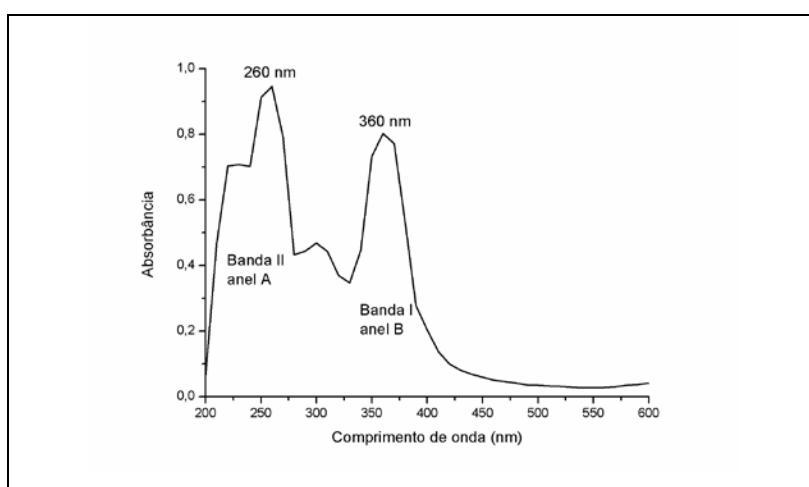
Figura 60 - Estrutura da rutina.



Nota: autora.

Pelo espectro de UV/Vis do composto isolado foi verificado que ele apresentava um perfil de flavonóide, uma vez que se observa a presença de duas bandas características: uma em 360 nm referente às transições eletrônicas no anel B e outra em 260 nm referente às transições eletrônicas no anel A, como mostrado na Figura 61.

Figura 61 - Espectro de UV-VIS (200-600 nm) do composto isolado FoE98-AE-C1.



Fonte: autora.

Conforme a classificação dos flavonóides mostrada na Tabela 23 (p. 107), o perfil do espectro de UV/Vis é de um flavonol. De acordo com Bohm (1998), flavonol 3-OH apresenta a banda I na região de 350-385 nm enquanto que, flavonol 3-O-glicosídico apresenta essa banda na região de 330-360 nm. Uma vez que essa

banda no composto isolado foi observada em 360 nm, não foi possível afirmar se o flavonol é glicosilado ou não na posição C3, sendo necessário avaliar o composto através de outro experimento que fornecesse dados conclusivos.

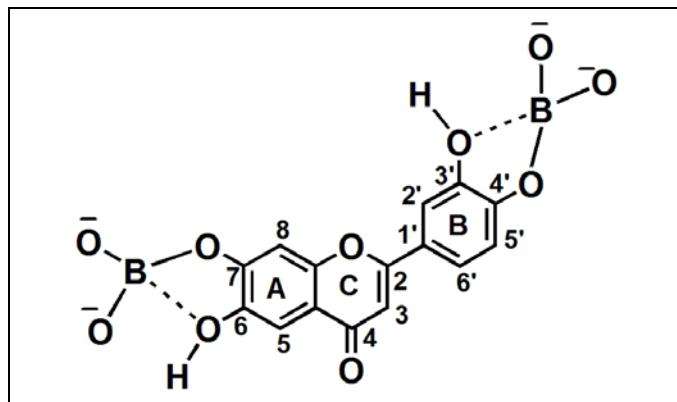
Entretanto, através do uso de reagentes de deslocamento, é possível saber quais os tipos de substituições que os anéis A e B apresentam. Foi analisado portanto, o espectro de UV/Vis utilizando os seguintes reagentes de deslocamento:

- acetato de sódio (NaOAc): por ser uma base fraca, ela desprotonará os grupos OH dos anéis fenólicos A e B com maior caráter ácido, que seriam os OH nos carbonos C7 (deslocamento batocromico na banda II), C4' e C3 (deslocamento batocrômico na banda I).

-cloreto de alumínio (AlCl_3) com e sem ácido clorídrico (HCl): como já foi explicado no item 4.2.4 (p. 105), o alumínio complexa com o sistema 5-hidróxido-4-cetona e também com grupos *ortho*-diidroxílicos (Figura 39, p. 105). Essa complexação resulta em um deslocamento batocrômico da banda I de 50-60 nm, que ao se adicionar HCl ao meio, apenas o complexo entre AlCl_3 e os grupos *ortho*-diidroxílicos se desfazem (BOHM, 1998). Na ausência de grupos *ortho*-diidroxílicos, a adição de ácido não se observa variação do deslocamento batocrômico.

-ácido bórico/ NaOAc (H_3BO_3): na amostra contendo NaOAc , o ácido bórico adicionado se desprotona, libera um OH^- e complexa com grupos *ortho*-diidroxílicos resultando em deslocamento batocrômico na banda em que o anel benzeno possuir este padrão de substituinte. A Figura 62 mostra o complexo formado por um flavonoide *ortho*-diidroxilado nos anéis A e B.

Figura 62 - Complexação de um flavonoide com H_3BO_3 .



Fonte: autora.

Na Tabela 38 se encontram os comprimentos de onda após a adição dos reagentes de deslocamento na solução do composto isolado FoE98-AE-C1 em metanol.

Tabela 38 - Comprimento de onda das bandas de absorção I e II do composto isolado FoE98-AE-C1 em metanol e após a reação com reagentes de deslocamento.

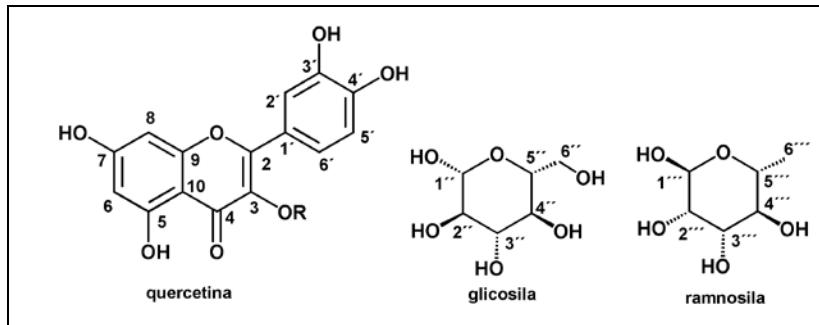
Solvente	Banda I (nm)	Banda II (nm)
Metanol	360	260
NaOAc	371	270
NaOAc /H ₃ BO ₃	370	260
AlCl ₃	447	270
AlCl ₃ /HCl	360	270

Através destes resultados é possível verificar que a adição de NaOAc indicou a presença de hidroxilas ligadas nos átomos de carbono C7 e C4', devido ao deslocamento observado nas bandas banda II e I, respectivamente. A adição de H₃BO₃ sobre a solução contendo NaOAc indicou a permanência do deslocamento na banda I, indicando a presença de grupo *ortho*-diidroxílico nos carbono C4' e C3'; entretanto, a regeneração do comprimento de onda na banda II, sugere a ausência de grupo *ortho*-diidroxil no anel A. A adição de AlCl₃ originou um deslocamento batocrômico elevado na banda I, sugerindo presença de sistemas *ortho*-diidroxílicos. O deslocamento na banda II sugere um grupo hidroxila no carbono C5 e carbonila no carbono C4 (uma vez que o ensaio com NaOAc/H₃BO₃ já demonstrou a ausência de grupos *ortho*-diidroxílicos no anel A). Após a adição de HCl, observou-se queda do deslocamento da banda I e manutenção do deslocamento da banda II, o que sugere que a adição do ácido desfez o complexo de AlCl₃ como os grupos *ortho*-diidroxílicos no anel B, mas mantendo o complexo entre o OH do carbono C5 e a carbonila do carbono C4 (BOHM, 1998). Com essa análise, portanto, foi possível definir que o composto isolado é uma flavonoide e provavelmente apresenta hidroxilas nos carbonos C3', C4', C5 e C7.

A dúvida quanto à presença de um grupo glicosílico na molécula foi confirmada pelo espectro de massas, realizado com ionização por *electrospray* (ESI-EM/EM) no modo negativo. No espectro de massas (Apêndice F) foi possível observar um pico em *m/z* 609, referente ao composto desprotonado. A presença do flavonoide, contendo hidroxilas nos carbonos C3', C4', C5 e C7 e carbonila no carbono C4, foi confirmada pela fragmentação do composto originando os

fragmentos em m/z 301 e 179. A eliminação de 308 Da que dá origem ao íon Y_0^- de m/z 301 sugere a presença de um dissacarídeo na molécula. Portanto, o flavonoide analisado é glicosilado. O dissacarídeo presente, para que tenha massa de 308 Da, pode ser composto de uma glicose e uma ramnose (Figura 63).

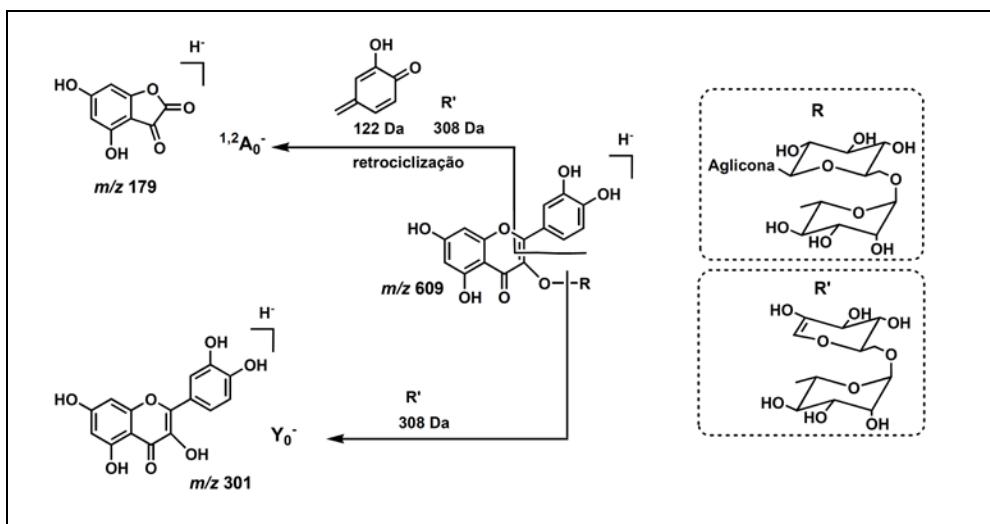
Figura 63 - Grupos presentes no composto isolado FoE98-AE-C1.



Fonte: autora.

A Figura 64 mostra as propostas de fragmentações (EM/EM) do íon m/z 609 observadas na análise de massas através da ionização por electrospray (ESI-EM/EM) no modo negativo (Apêndice F). Na análise foram observados os íons m/z 301 e m/z 179. Utilizou-se a nomenclatura proposta por Domon e Costello (1988) e Ma e outros (1997) para nomear os fragmentos propostos (no Apêndice H se encontra um esquema ilustrativo da nomenclatura utilizada).

Figura 64 - Fragmentação observada no espectro de massas (modo negativo) do composto isolado FoE98-AE-C1.

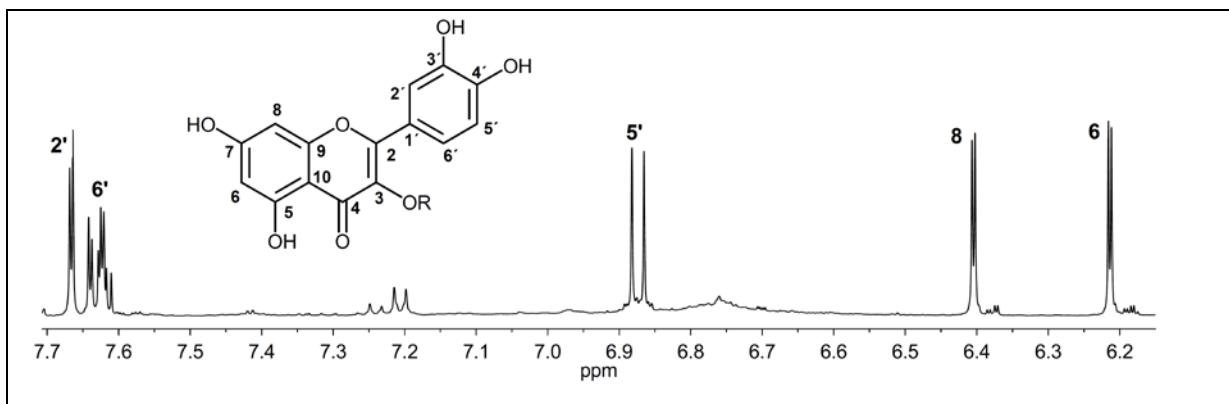


Fonte: adaptado de Dubber e outros (2005).

Através das análises de UV foi verificado que os anéis A e B apresentam substituintes hidroxílicos, logo, provavelmente o dissacarídeo se encontra ligado ao carbono C3 do flavonoide. A confirmação da provável estrutura foi realizada pela análise de RMN de ^1H e ^{13}C .

Na Figura 65 está apresentado o espectro de RMN de ^1H do composto isolado na região característica de hidrogênios aromáticos.

Figura 65- Espectro de RMN de ^1H na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C1.

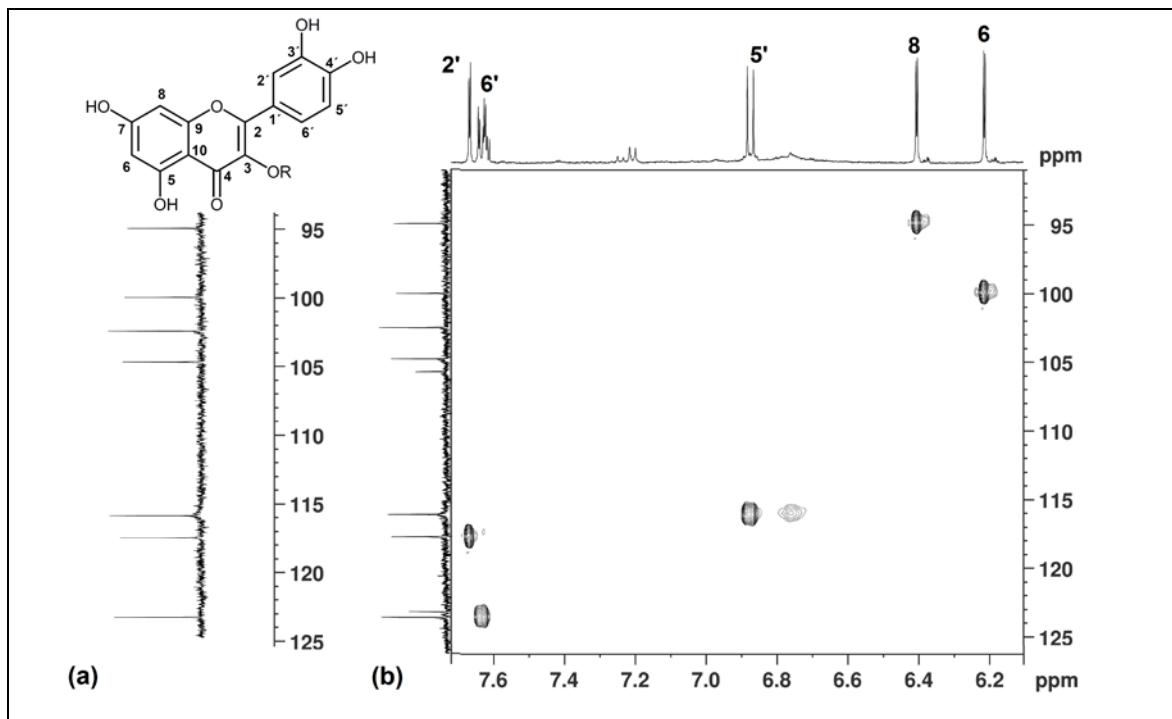


Fonte: autora.

Neste espectro se verificam os dupletos em 6,21 e 6,40 ppm, ambos com J (constante de acoplamento) = 2,5 Hz, característico de acoplamentos *meta*, referentes ao hidrogênios dos carbonos C6 e C8 (anel A). Observa-se também o duplo em 6,87 ppm com J = 8,5 Hz característico de acoplamento *ortho* que foi atribuído ao hidrogênio do carbono C5'. Na região entre 7,6 e 7,7 ppm se encontram um duplo em 7,67 ppm com J = 2,0 Hz e um duplo duplo em 7,63 ppm com J = 2,0 e 8,5 Hz. Estes sinais se referem, respectivamente, aos hidrogênios dos carbonos C2' e C6'. O hidrogênio do carbono C2' acopla em *meta* com o hidrogênio de C6' (observando um duplo), enquanto que o hidrogênio de C6' acopla em *ortho* com o hidrogênio de C5' e em *meta* com o hidrogênio de C2' (observando duplo duplo).

Através das correlações observadas no mapa de contorno de gHSQC e com o auxílio do RMN DEPT135, os carbonos referentes a esses hidrogênios foram atribuídos (Figura 66).

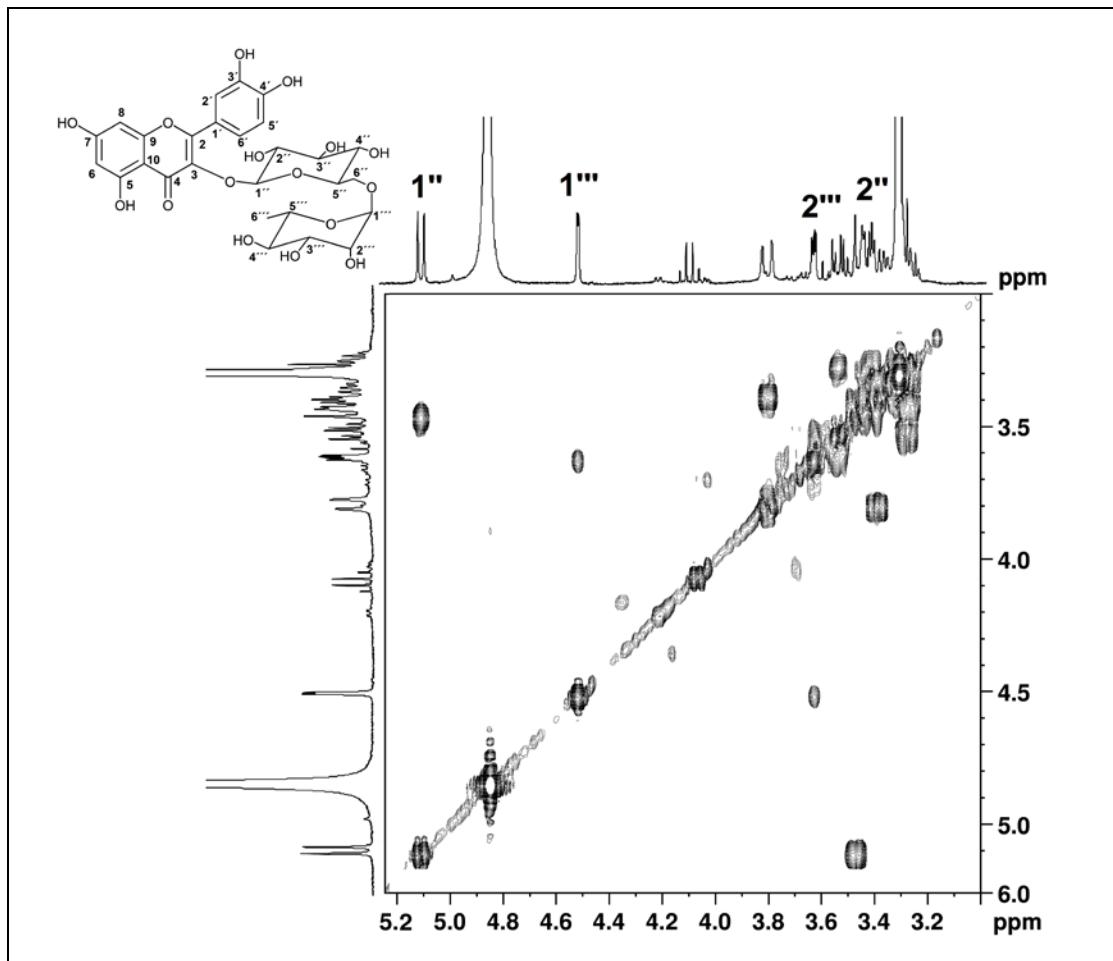
Figura 66 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de *g*HSQC (b) na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C1.



Fonte: autora.

Entretanto, faltava caracterizar o dissacarídeo ligado ao flavonoide no carbono C3. Através da análise de RMN foi possível identificar que o dissacarídeo é a rutinosida e a molécula isolada é a rutina [quercetina-3-O- α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -glucopiranosídeo]. O hidrogênio do carbono anomérico da glicose (C1'') apresenta deslocamento de 5,11 ppm e J = 7,5 Hz. Essa constante de acopamento mostra que este hidrogênio se encontra na posição axial e está acoplando com o hidrogênio de C2'' que também se encontra na axial. Já o hidrogênio de C1''' apresenta deslocamento de 4,52 ppm e J = 1,5 Hz que mostra que este hidrogênio na posição equatorial está acoplando com o hidrogênio de C2''' que também se encontra na equatorial (NIASSY et al., 2004). As correlações dos hidrogênios de C1'' e C1''' com, respectivamente, os hidrogênios de C2'' e C2''', podem ser observadas mapa de contorno de *g*COSY, mostrado na Figura 67.

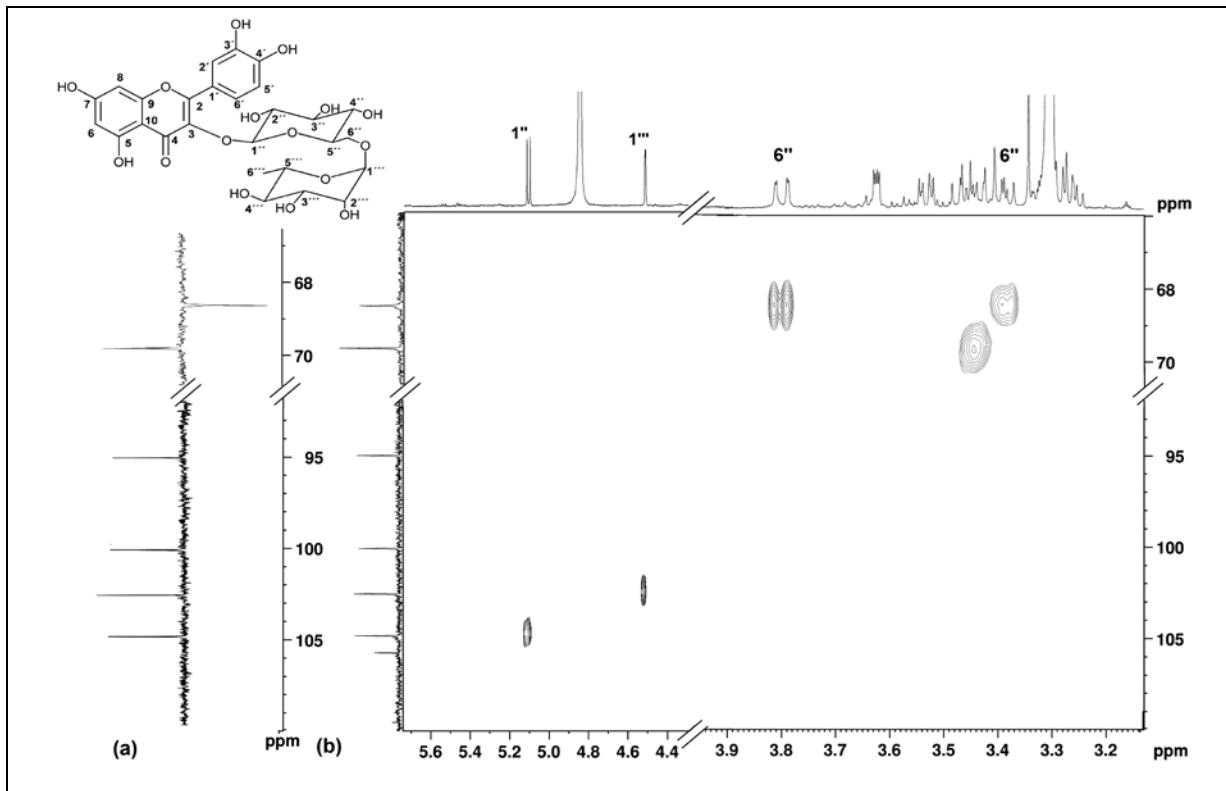
Figura 67 - Correlações H-H observadas no mapa de contorno de gCOSY para os hidrogênios glicosídicos do composto FoE98-AE-C1.



Fonte: autora.

Uma vez que os hidrogênios do carbono C6'' (glicose) são vizinhos ao carbono assimétrico C5'', o deslocamento dos hidrogênios de C6'' se apresentam desdobrados por serem diasterotópicos, apresentando, portanto, acoplamento geminal e vicinal (NIASSY et al., 2004). Na Figura 68 é possível observar no espectro de RMN DEPT135 o sinal CH₂ referente ao carbono C6'' em 68,6 ppm. Observa-se também nesta figura os hidrogênios desdobrados de C6'' e os carbonos de C1'', C1''' e C6'' no mapa de contorno gHSQC.

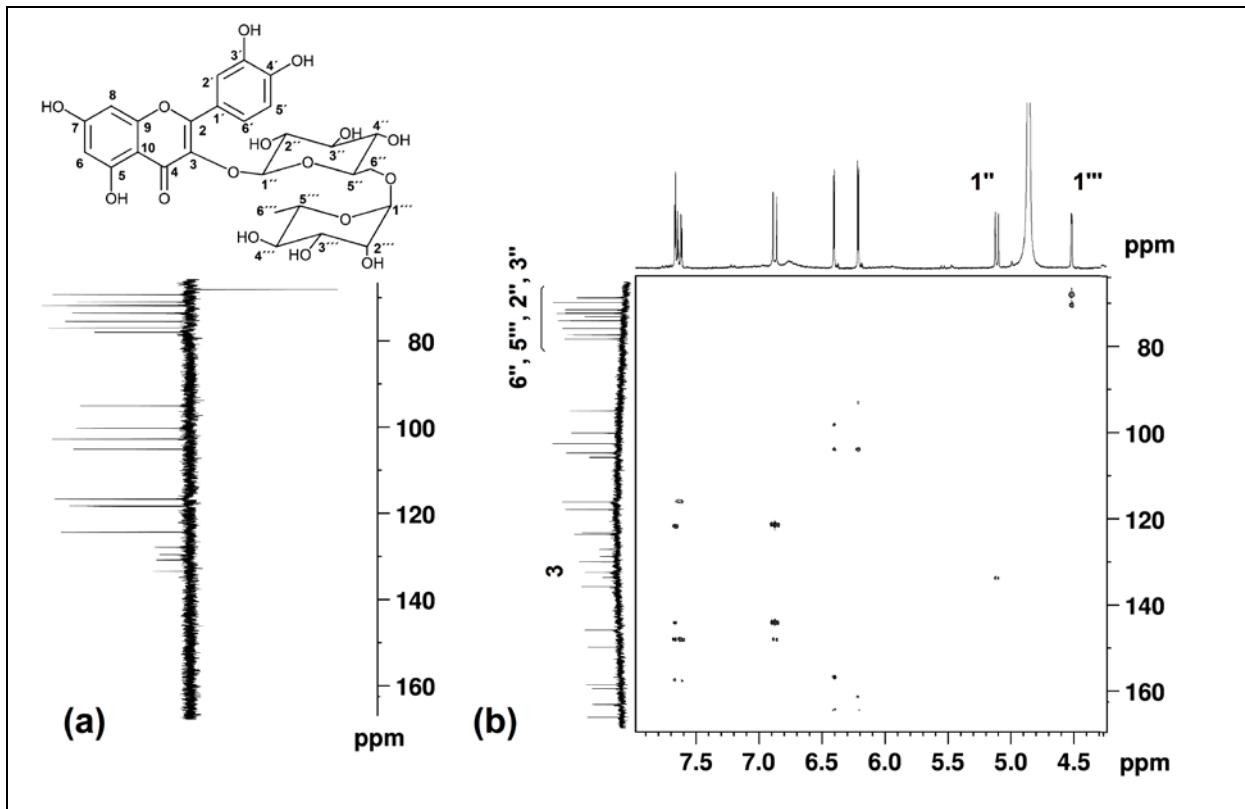
Figura 68 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de gHSQC (b) na região de hidrogênios anoméricos (C1'' e C1''') e de hidrogênio do carbono 6'' (glicose) do composto isolado FoE98-AE-C1.



Fonte: autora.

Através da análise das correlações H-C observadas no mapa de contorno de gHMBC (Figura 69), no qual se verificam as correlações entre hidrogênios e carbonos na posição α e β , foi possível observar que o carbono C3 do flavonoide se encontra em β ao hidrogênio do carbono C1''. Verificou-se também que o hidrogênio de C1''' se encontra em α ou β a 6'', 5'', 2'' e 3''.

Figura 69 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de *g*HMBC (b) na região de hidrogênios anoméricos do composto isolado FoE98-AE-C1.



Fonte: autora.

Portanto, através da análise por RMN foi possível identificar que o composto isolado FoE98-AE-C1 é a rutina. As atribuições de todos os hidrogênios se encontram descritas na Tabela 39 e dos carbonos na Tabela 40, ambos comparados com os deslocamentos químicos relatados na literatura.

Tabela 39 - Atribuição dos hidrogênios no espectro de RMN de ^1H do composto isolado FoE98-AE-C1.

Posição	Composto isolado – FoE98-AE-C1		Rutina
			(NIASSY et al., 2004)
	RMN- ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ^1 ; integral; m^2 (J^3)	$g\text{COSY}$	RMN- ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ^1 ; integral; m^2 (J^3)
6	6,21; 1H; d (2,5)	H-8	6,2; 1H; d (1,9)
8	6,40; 1H; d (2,5)	H-6	6,4; 1H; d (1,9)
2'	7,67; 1H; d (2,0)	H-6'	7,5; 1H; d (2,2)
5'	6,87; 1H; d (8,5)	H-6'	6,8; 1H; d (9,0)
6'	7,63; 1H; dd (2,0; 8,5)	H-2', H-5'	7,5; 1H; dd (2,2; 9,0)
1"	5,11; 1H; d (7,5)	H-2"	5,3; 1H; d (7,1)
2"- 5"	3,25-3,50; 4H; m	H-1' – H-6'	3,2-3,3; 4H; m
6a"	3,80; 1H; dd (11,0; 2,0)	H-5"	3,7; 1H; d (9,8)
6b"	3,38-3,39; 1H; m	H-5"	3,3; 1H; m
1'''	4,52; 1H; d (1,5)	H-2'''	4,4; 1H; d (1,1)
2'''	3,63; 1H; dd (3,5; 1,5)	H-1'''", H-3'''	3,3; 1H; d (ni)
3'''	3,53; 1H; dd (9,5; 3,5)	H-2'''", H-4'''	3,3; 1H; s
4'''	3,25-3,50; 1H; m	H-3'''", H-6'''	3,1; 1H; s
5'''	3,25-3,50; 1H; m	H-4'''", H-6'''	3,3; 1H; s
6'''	1,12; 3H; d (6,0)	H-5'''	1, 0; 3H; d (ni)

Nota: 1 deslocamento químico (δ) em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2 multiplicidade (m) (d = duplo, dd = duplo duplo, m = multipleto); 3 Constante de acoplamento (J) expresso em Hz; ni = não informado.

Tabela 40 - Atribuição dos carbonos no espectro de RMN de ^{13}C do composto isolado FoE98-AE-C1.

Posição	Composto isolado - FoE98-AE-C1				Rutina
	RMN- ^{13}C (125 MHz, CD_3OD)				(NIASSY et al., 2004)
	δ^1	δ calculado ²	DEPT135	$g\text{HSQC}^1$	RMN- ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
2	159,41	154,9	C	-	156,7
3	135,69	135,1	C	-	133,4
4	179,51	178,3	C	-	177,4
5	163,08	163,9	C	-	161,3
6	99,99	98,3	CH	6,21	98,7
7	166,09	166,4	C	-	164,1
8	94,90	98,0	CH	6,40	93,7
9	159,60	160,1	C	-	156,5
10	105,71	105,5	C	-	104,0
1'	123,19	124,4	C	-	121,3
2'	117,74	113,6	CH	7,67	116,4
3'	145,92	147,2	C	-	144,8
4'	149,87	146,5	C	-	148,4
5'	116,10	117,2	CH	6,87	115,2
6'	123,60	120,4	CH	7,67	121,7
1''	104,77	92,7	CH	5,11	102,0
2''	75,79	73,9	CH	3,25-3,50	74,9
3''	77,30	77,5	CH	3,25-3,50	76,0
4''	71,46	71,8	CH	3,25-3,50	70,5
5''	78,25	75,9	CH	3,25-3,50	77,4
6''	68,60	64,5	CH_2	3,39	69,3
1'''	102,48	104,5	CH	4,52	101,6
2'''	72,30	73,8	CH	3,63	70,7
3'''	72,17	73,1	CH	3,53	70,5
4'''	73,90	77,7	CH	3,25-3,50	71,9
5'''	69,77	70,5	CH	3,25-3,50	68,4
6'''	17,93	16,9	CH_3	1,12	17,3

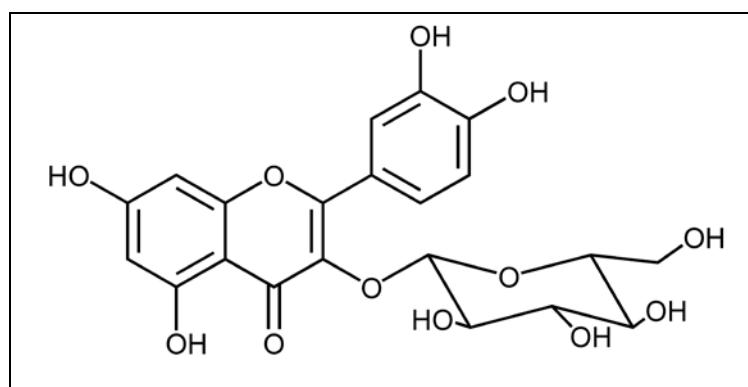
Nota: ¹deslocamento químico (δ) em ppm utilizando TMS como padrão interno; ²valores calculados pelo programa ChemDrawUltra 8.0.

O espectro de massas de alta resolução do composto isolado FoE98-AE-C1 (Apêndice G) foi realizado com ionização por *electrospray* (ESI-EM/EM), no modo positivo, obtendo-se o pico da molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 611,1618, calculado para $C_{27}H_{31}O_{16}^+$, 611,1607 ($E_{ppm}=1,8$).

A rutina já foi identificada em algumas espécies de *Eugenia*, Reynertson e outros (2008), por exemplo, determinaram por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no fruto das seguintes espécies de *Eugenia*: *E. aggregata*, *E. brasiliensis*, *E. luschnathiana* e *E. reinwardtiana*. John e outros (2014) também observaram a presença de rutina nas folhas de *E. singampattiana* por CLAE. Lelono e Tachibana (2013) isolaram e identificaram a rutina na casca da *E. polyantha*.

4.2.9.2 Identificação do composto isolado FoE98-AE-C2 (isoquercitrina)

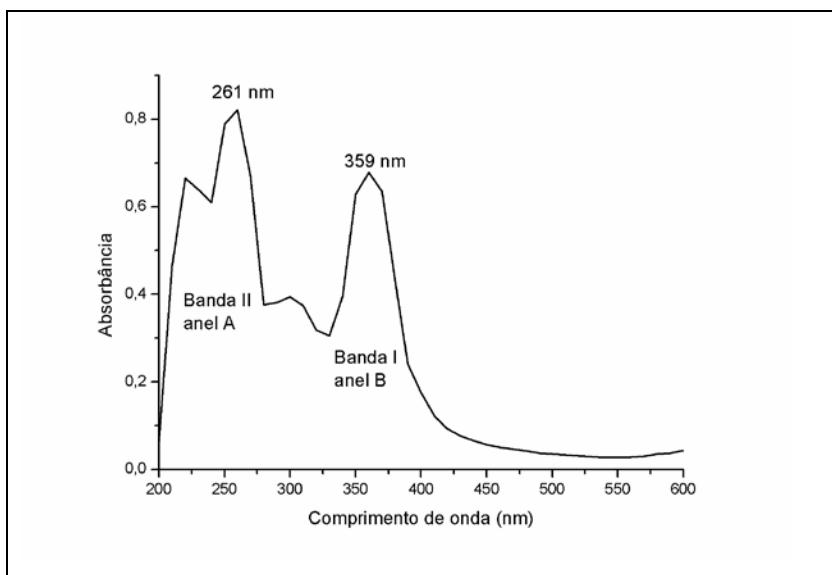
Figura 70 - Estrutura da isoquercitrina.



Fonte: autora.

O espectro de UV/Vis do composto isolado mostrou um perfil de flavonoide, uma vez que se observa a presença de duas bandas características, uma 359 nm e 261 nm, como mostrado na Figura 71.

Figura 71 - Espectro de UV-VIS (200-600 nm) do composto isolado FoE98-AE-C2.



Fonte: autora.

Foi então realizada a análise de UV/Vis com reagentes de deslocamento para verificar o padrão de substituição do anel aromático do flavonoide, mostrada na Tabela 41.

Tabela 41 - Comprimento de onda das bandas de absorção I e II do composto isolado FoE98-AE-C2 em metanol e após a reação com reagentes de deslocamento.

Solvente	Banda I (nm)	Banda II (nm)
Metanol	359	261
NaOAc	371	271
NaOAc / H ₃ BO ₃	369	261
AlCl ₃	439	269
AlCl ₃ /HCl	371	270

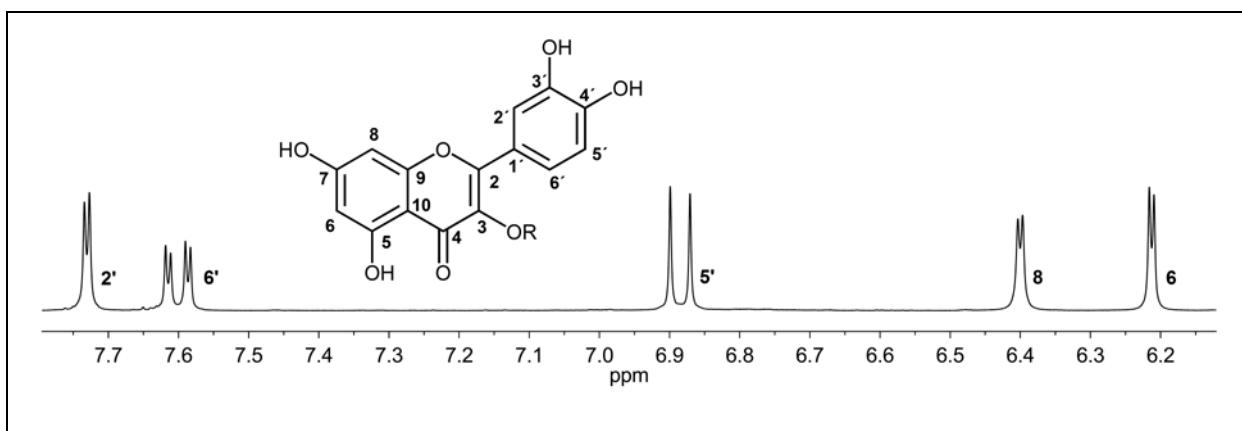
Através dos resultados apresentados é possível verificar que o composto isolado apresenta o mesmo comportamento da rutina frente aos reagentes de deslocamento. A adição de NaOAc promoveu o deslocamento das duas bandas, sugerindo a presença de OH em C7 e C4'. A adição de H₃BO₃ resultou no retorno da banda II e manutenção da banda I, sugerindo que existem grupos *ortho*-diidroxílicos apenas no anel B. O AlCl₃ deslocou as bandas I caracterizando substituição de OH em C3' e C4'. Também se observou deslocamento da banda II, sendo que a adição de HCl não desfez esse deslocamento, sugerindo a ausência de substituição *ortho*-diidroxila e presença de OH em C5 e carbonila em C4. Portanto, o composto isolado

FoE98-AE-C2 é um flavonoide da classe dos flavonóis que apresenta substituição de OH nos carbonos C5, C7, C3' e C4'.

Através da análise por espectrometria de massas de alta resolução, realizado com ionização por *electrospray* (ESI-EM/EM) no modo negativo, foi verificada a presença de grupo glicosílico no flavonoide. No espectro de massas (Apêndice I) se verifica um pico em *m/z* 463,0933 referente a molécula desprotonada. No espectro de EM/EM se observa a perda 162 Da dando origem ao íon Y_0^- de *m/z* 301,0314, sugerindo a estrutura de um flavonoide contendo o monossacarídeo glicose, uma vez que este possui 162 Da. A análise de UV/Vis havia indicado que os anéis aromáticos da estrutura do flavonoide apresentam substituintes hidroxílicos, portanto provavelmente o grupo glicosídico se encontra ligado ao carbono C3 do flavonoide. O composto isolado FoE98-AE-C2 é, portanto, a isoquericitrina (quercetina-3-O- β -glucopiranósídeo). No espectro de massas de alta resolução, o pico em *m/z* 463,0933 $[M-H]^-$ se refere a molécula desprotonada, calculado para $C_{21}H_{19}O_{12}^-$, 463,0882 ($E_{ppm}=11,01$). A confirmação da provável estrutura foi realizada pela análise de RMN de 1H e ^{13}C .

Na Figura 72 está apresentado o espectro de RMN de 1H do composto isolado na região característica de hidrogênios aromáticos.

Figura 72 - Espectro de RMN de 1H na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C2.

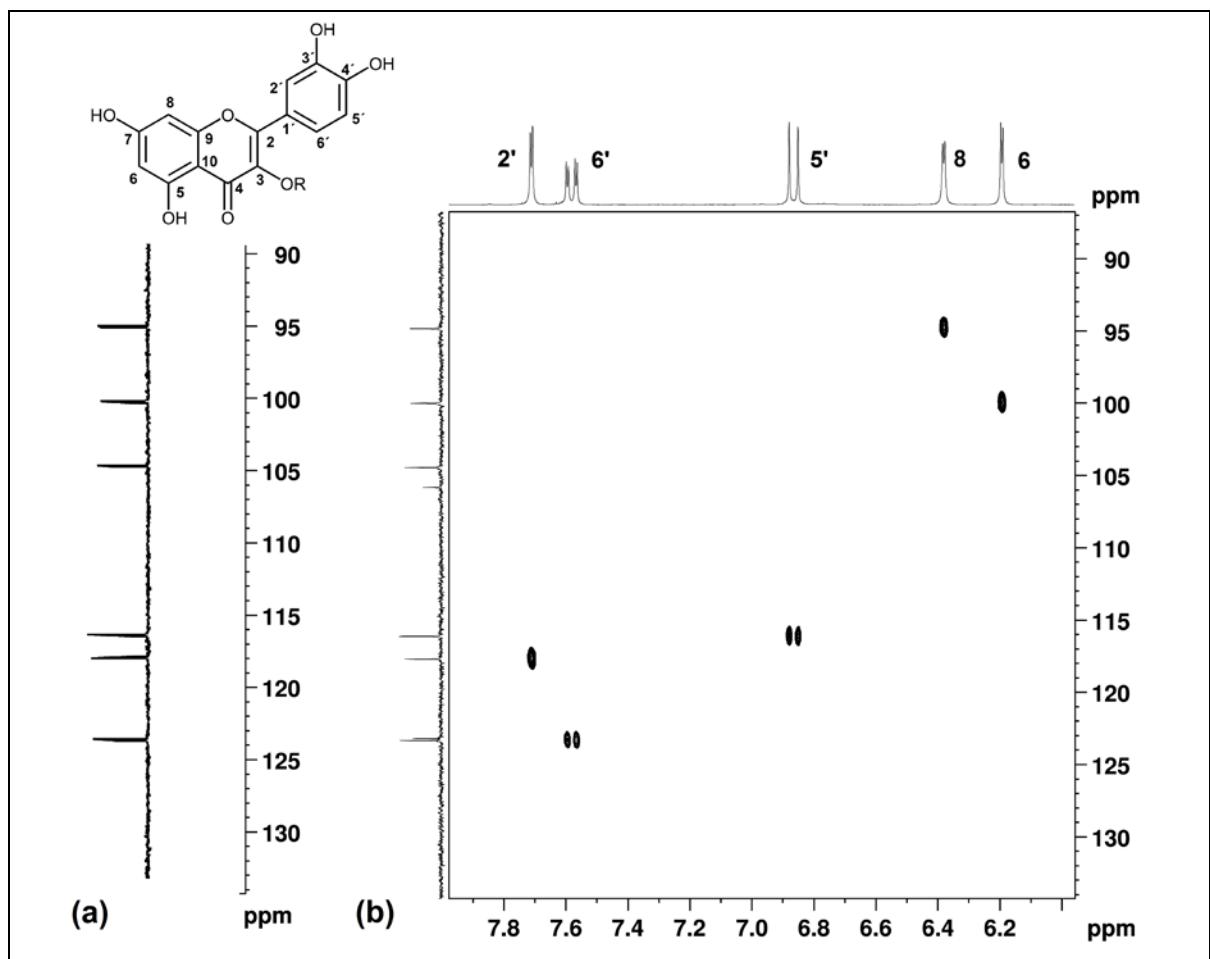


Fonte: autora.

Neste espectro se verificam os dupletos em 6,19 e 6,38 ppm, ambos com $J = 1,9$ Hz, característico de acoplamentos *meta*, referentes ao hidrogênios dos carbonos C6 e C8 (anel A). Observa-se também o dupleteto em 6,87 ppm com $J = 8,4$

Hz característico de acoplamento *orto* que foi atribuído ao hidrogênio do carbono C5'. Na região entre 7,5 e 7,8 ppm se encontram um duplo em 7,71 ppm com $J = 2,1$ Hz e um duplo duplo em 7,58 ppm com $J = 2,1$ e 8,4 Hz. Estes sinais se referem, respectivamente, aos hidrogênios dos carbonos C2' e C6'. O hidrogênio do carbono C2' acopla em *meta* com o hidrogênio de C6' (observando um duplo), enquanto que o hidrogênio de C6' acopla em *orto* com o hidrogênio de C5' e em *meta* com o hidrogênio de C2' (observando duploduplo). Através das correlações H-C do mapa de contorno de *gHSQC* e com o auxílio do RMN DEPT135, os carbonos referentes a esses hidrogênios foram atribuídos (Figura 73).

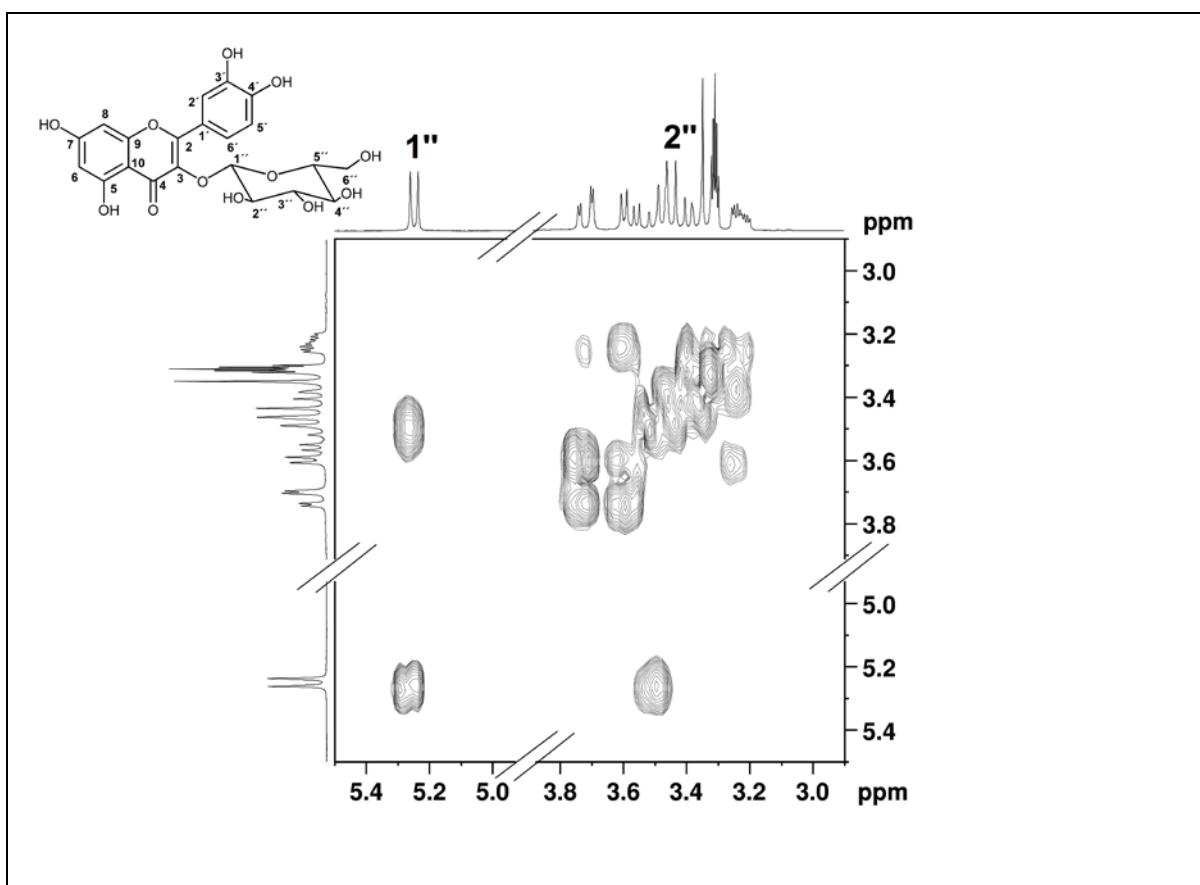
Figura 73 - Espectros de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de *gHSQC* (b) na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C2.



Fonte: autora.

Através do RMN foi possível caracterizar o grupo glicolídeo da isoquercitrina. O hidrogênio do carbono anomérico (C1'') apresenta deslocamento de 5,25 ppm e $J = 7,2$ Hz. Essa constante de acoplamento mostra que este hidrogênio está na posição axial acoplando com o hidrogênio de C2'' que também se encontra na posição axial. A correlação entre hidrogênios de C1'' e C2'' pode ser observada mapa de contorno de *g*COSY, mostrado na Figura 74.

Figura 74 - Correlações H-H observadas no mapa de contorno de *g*COSY para o hidrogênio glicosídico do composto FoE98-AE-C2.

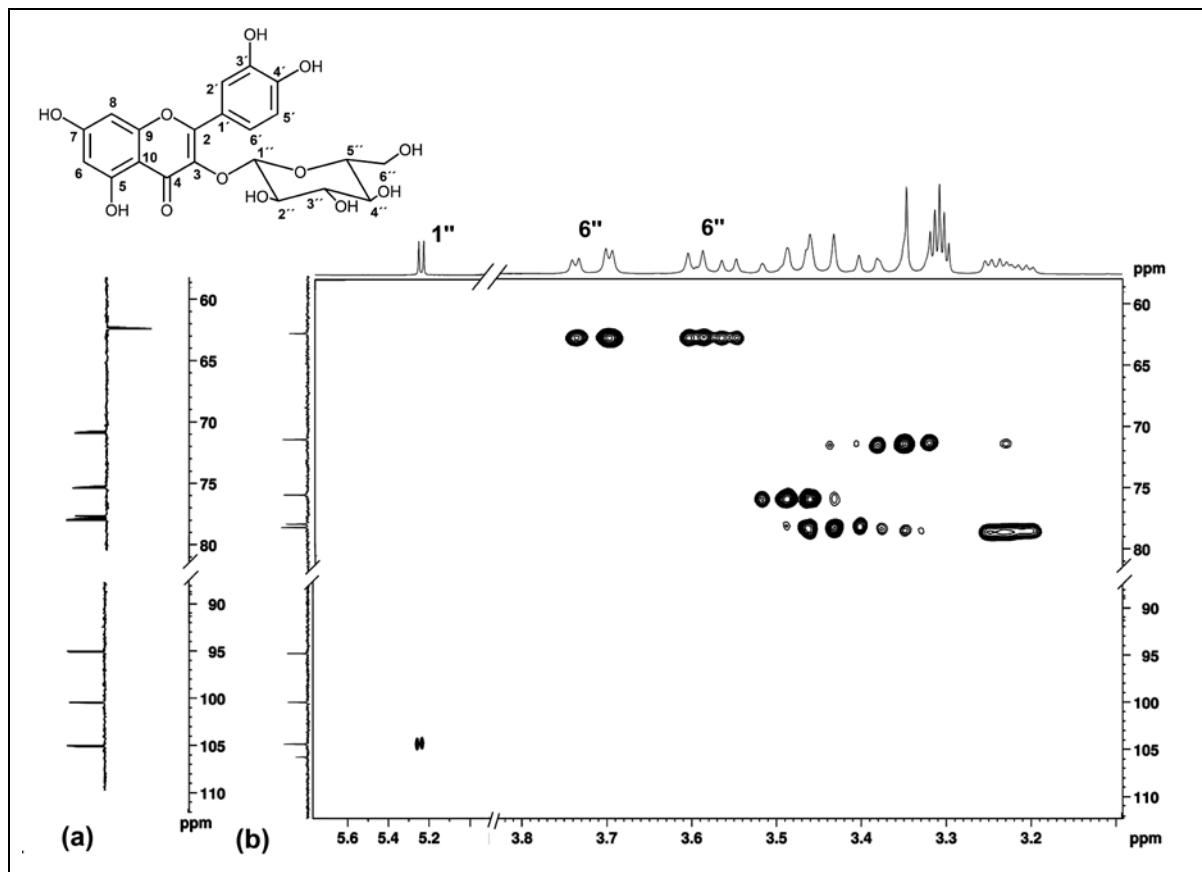


Fonte: autora.

Os hidrogênios do carbono C6'' (glicose) são vizinhos ao carbono assimétrico C5'', portanto o deslocamento dos hidrogênios de C6'' se apresentam desdobrados por serem diasterotópicos, apresentando, portanto, acoplamento geminal e vicinal. Na Figura 75 é possível observar no espectro de RMN DEPT135 o sinal CH_2 referente ao carbono C6'' em 62,68 ppm. Através das correlações H-C do mapa de contorno de *g*HSQC e com o auxílio do RMN DEPT135, os carbonos referentes a esses hidrogênios foram atribuídos, como mostrado na Figura 75.

Observa-se também nesta figura os hidrogênios desdobrados de C6'' e os carbonos de C1''' e C6''' no mapa de contorno gHSQC.

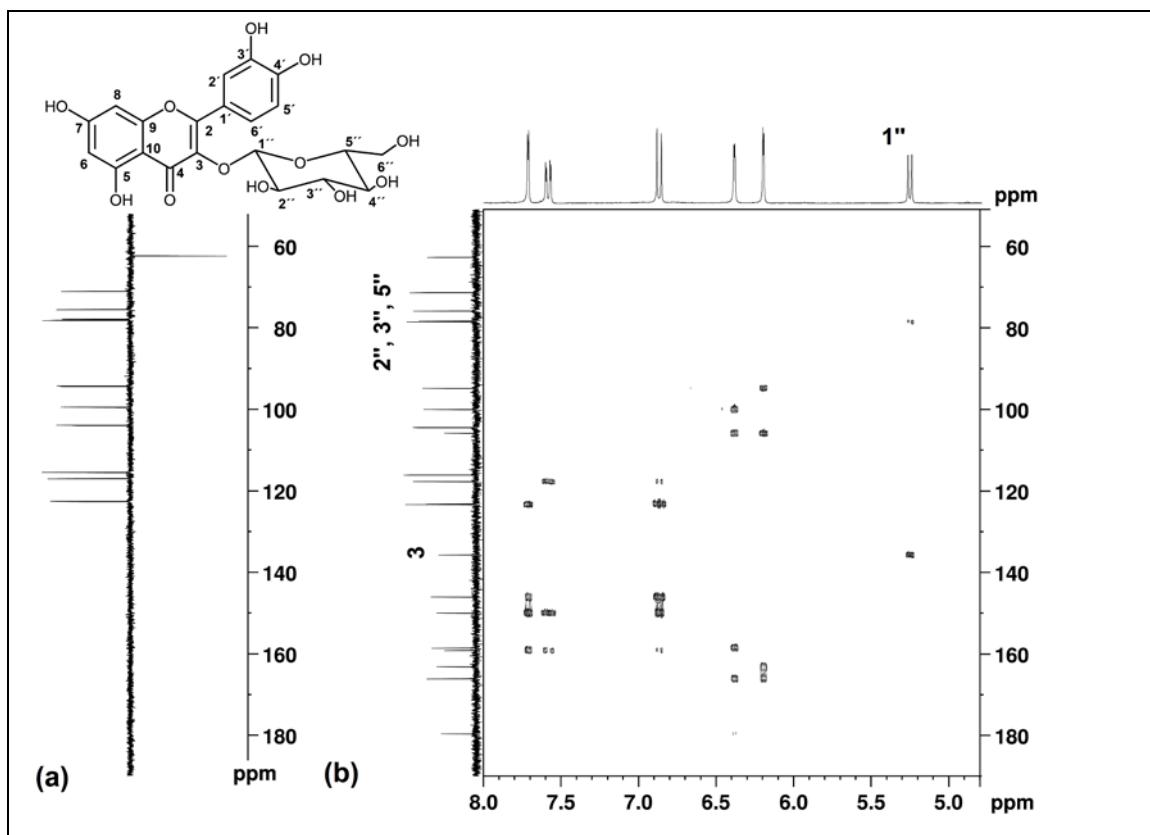
Figura 75 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de gHSQC (b) na região do hidrogênio do carbono 6'' do composto isolado FoE98-AE-C2.



Fonte: autora.

Através da análise das correlações H-C observadas no mapa de contorno de gHMBC, mostrado na Figura 76, é possível observar que os hidrogênios do C1'' se encontram em β aos carbonos C3'', C5'' e C3, e α ao carbono C2''. Com isto se pode comprovar que o monossacarídeo glicose se encontra ligado ao oxigênio do carbono C3, e que a molécula isolada é portanto a isoquercitrina.

Figura 76 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de *g*HMBC (b) na região do hidrogênio anomérico do composto isolado FoE98-AE-C2.



Fonte: autora.

As atribuições de todos os hidrogênios se encontram descritas na Tabela 42 e dos carbonos na Tabela 43, ambos comparados com os deslocamentos químicos relatados na literatura.

Tabela 42 - Atribuição dos hidrogênios no espectro de RMN de ^1H do composto isolado FoE98-AE-C2.

Posição	Composto isolado - FoE98-AE-C2		Isoquercitrina (COSTA et al., 2007)
	RMN- ^1H (300 MHz, CD_3OD)		RMN- ^1H (200 MHz, CD_3OD)
	δ^1 ; m^2 ; integral (J^3)	$g\text{COSY}$	δ^1 ; m^2 ; integral (J^3)
6	6,19; 1H; d (1,9)	H-8	6,21; 1H; d (1,8)
8	6,38; 1H; d (1,9)	H-6	6,40; 1H; d (1,8)
5'	6,87; 1H; d (8,4)	H-6'	6,86; 1H; d (8,5)
6'	7,58; 1H; dd (2,1; 8,4)	H-2', H-5'	7,58; 1H; dd (1,8; 8,5)
2'	7,71; 1H; d (2,1)	H-6'	7,71; 1H; d (1,8)
1"	5,25; 1H; d (7,2)	H-2"	5,24; 1H; d (7,9)
4"	3,20-3,26; 1H; m	H-3", H-5" H-1", H-3", H-5", H-4";	
2", 3", 5"	3,38-3,52; 3H; m	H-6"	3,29-3,80; 6H; m
6a"	3,72; 1H; dd (2,4; 12,0)	H-5"	
6b"	3,59, 1H, dd (5,4; 12,0)	H-5"	

Nota: 1 deslocamento químico (δ) em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2 multiplicidade (m) (d = duplo, dd = duplo duplo, m = multipleto); 3 Constante de acoplamento (J) expresso em Hz.

Tabela 43 - Atribuição dos carbonos no espectro de RMN de ^{13}C do composto isolado FoE98-AE-C2.

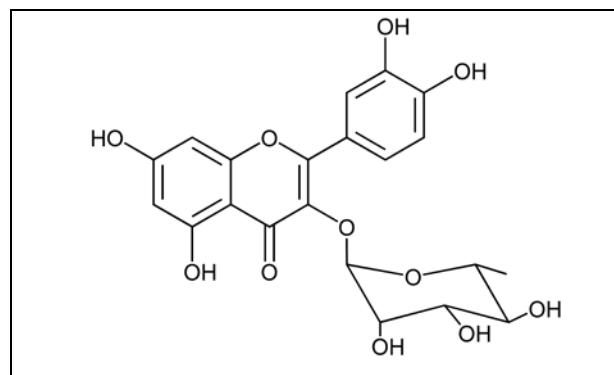
Posição	Composto isolado - FoE98-AE-C2				Isoquercitrina (REGASIN et al., 2007)
	RMN- ^{13}C (75 MHz, CD_3OD)				RMN- ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
	δ^1	δ calculado ²	DEPT135	gHSQC ¹	δ^1
2	158,58	154,9	C	-	156,2
3	135,76	135,1	C	-	133,4
4	179,62	178,3	C	-	177,4
5	163,17	163,9	C	-	161,3
6	94,85	98,3	CH	6,38	99,0
7	166,12	166,4	C	-	165,0
8	100,02	98,0	CH	6,19	93,7
9	159,15	160,1	C	-	156,5
10	105,82	105,5	C	-	n.i.
1'	123,20	124,4	C	-	121,2
2'	117,71	113,6	CH	7,71	116,2
3'	146,03	147,2	C	-	144,9
4'	149,98	146,5	C	-	148,6
5'	116,14	117,2	CH	6,87	115,3
6'	123,34	120,4	CH	7,58	121,7
1''	104,46	92,7	CH	5,25	101,1
2''	75,87	73,9	CH	3,38-3,52	74,2
3''	78,25	73,5	CH	3,38-3,52	76,6
4''	71,34	71,5	CH	3,20-3,26	70,0
5''	78,52	77,8	CH	3,38-3,52	77,5
6''	62,68	62,3	CH ₂	3,59; 3,72	61,0

Nota: ¹deslocamento químico (δ) em ppm utilizando TMS como padrão interno; ²valores calculados pelo programa ChemDrawUltra 8.0; n.i.=não informado.

A isoquercitrina já foi identificada em algumas espécies de *Eugenia*, como por exemplo nas flores de *Eugenia Jambolana* (BALIGA et al., 2011, BALIGA et al., 2013).

4.2.9.3 Identificação do composto isolado FoE98-AE-C3 (quercitrina)

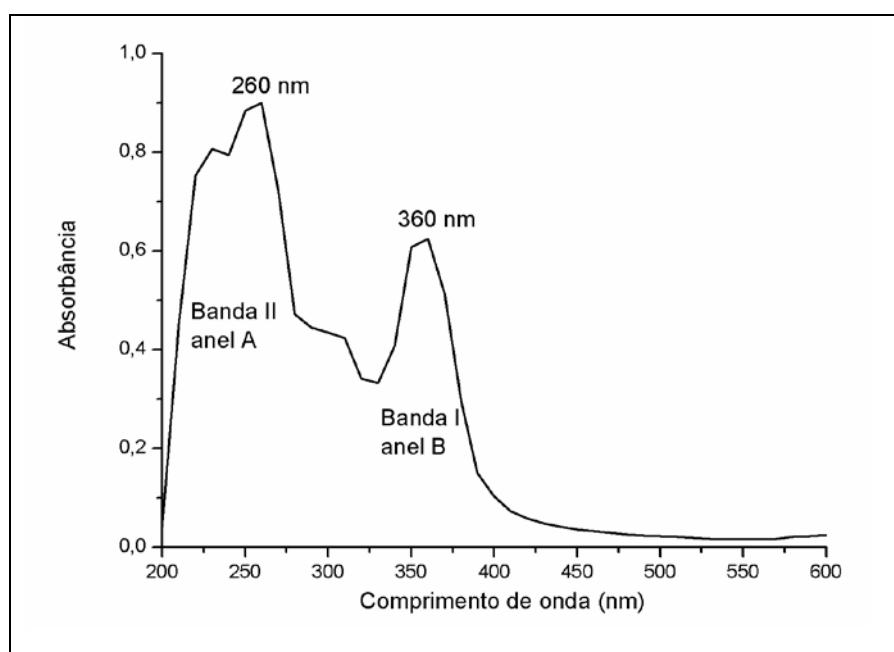
Figura 77 - Estrutura da quercitrina.



Fonte: autora.

O espectro de UV/Vis do composto isolado FoE98-AE-C3 mostrou um perfil de flavonoide, uma vez que se observa a presença duas bandas características, uma 360 nm e 260 nm (Figura 78).

Figura 78 - Espectro de UV-VIS (200-600 nm) do composto isolado FoE98-AE-C3.



Fonte: autora.

Foi realizada a análise de UV/Vis com reagentes de deslocamento para verificar o padrão de substituição do anel aromático do flavonoide, mostrada na Tabela 44.

Tabela 44 - Comprimento de onda das bandas de absorção I e II do composto isolado FoE98-AE-C3 em metanol e após a reação com reagentes de deslocamento.

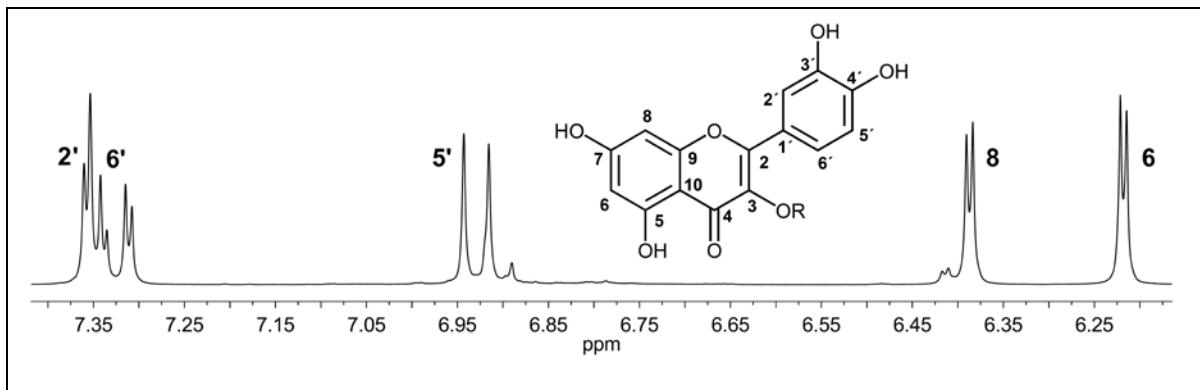
Solvente	Banda I (nm)	Banda II (nm)
Metanol	360	260
NaOAc	371	268
NaOAc /H ₃ BO ₃	370	260
AlCl ₃	438	271
AlCl ₃ /HCl	369	270

Observando os resultados obtidos para o composto isolado FoE98-AE-C3, verifica-se que este apresenta o mesmo comportamento da rutina (FoE98-AE-C1) e isoquerçitrina (FoE98-AE-C2). Portanto, o composto isolado FoE98-AE-C3 é um flavonoide da classe dos flavonóis que apresenta substituição de OH nos carbonos C5, C7, C3' e C4'.

Através da análise por espectrometria de massas de alta resolução, realizado com ionização por electrospray (ESI-EM/EM) no modo negativo, foi verificada a presença de grupo glicosílico no flavonoide. No espectro de massas (Apêndice J) é observado um pico em *m/z* 447,0988 referente ao composto desprotonado. No espectro de EM/EM se observa a perda 146 Da dando origem ao íon Y_0^- de *m/z* 301, sugerindo a estrutura de um flavonoide contendo o monossacarídeo ramnose, uma vez que este possui 146 Da. A análise de UV havia indicado que os anéis aromáticos da estrutura do flavonoide apresentam substituintes hidroxílicos, portanto provavelmente o grupo ramnose se encontra ligado ao carbono C3 do flavonoide. O composto isolado FoE98-AE-C3 é portanto a querçitrina (queracetina-3-O- α -ramnosídeo). No espectro de massas de alta resolução, o pico em *m/z* 447,0988 $[M-H]^-$ se refere à molécula desprotonada, calculado para $C_{21}H_{19}O_{11}^-$, 447,0933 ($E_{ppm}=12,30$). A confirmação da provável estrutura foi realizada pela análise de RMN de ¹H e ¹³C.

Na Figura 79 está apresentado o espectro de RMN de ¹H do composto isolado na região característica de hidrogênios aromáticos.

Figura 79 - Espectro de RMN de ^1H na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C3.

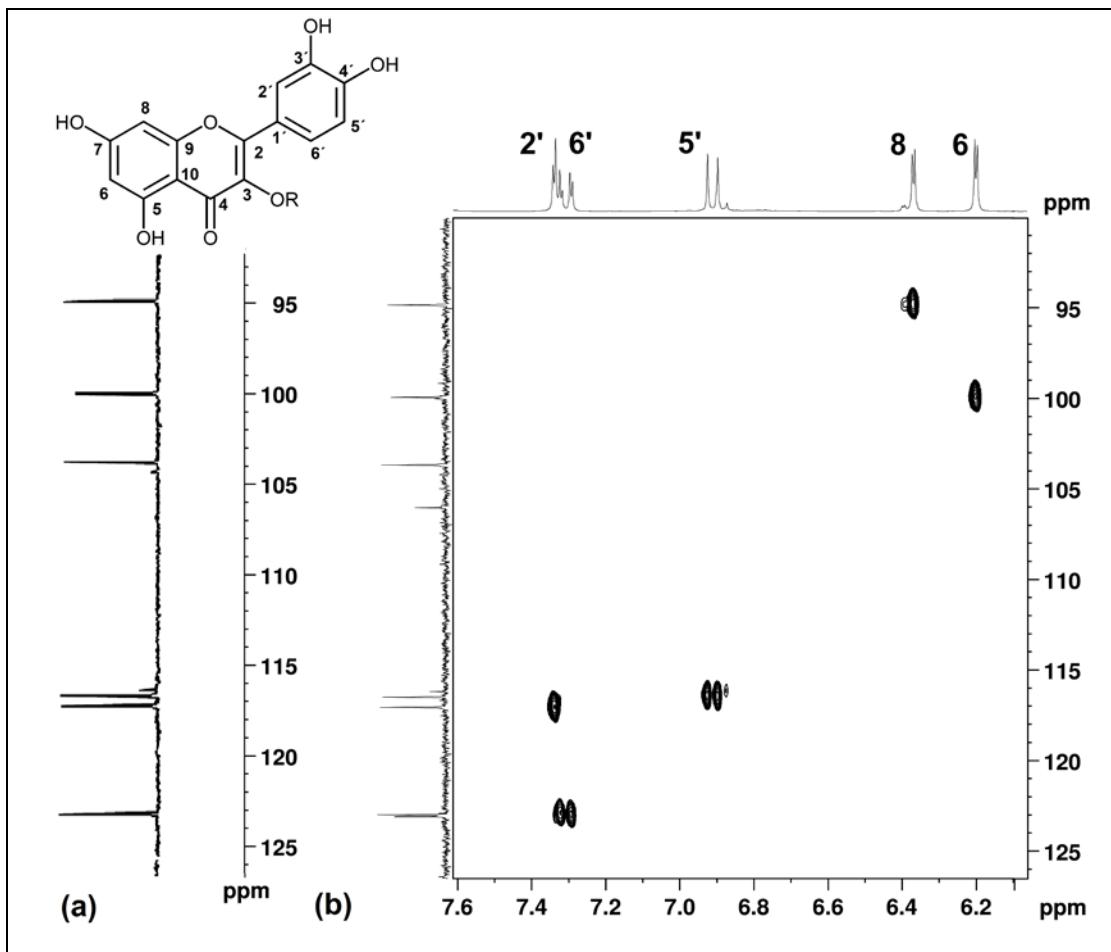


Fonte: autora.

Neste espectro se verificam os dupletos em 6,20 e 6,37 ppm, ambos com $J = 2,1$ Hz, característico de acoplamentos *meta*, referentes ao hidrogênios dos carbonos C6 e C8 (anel A). Observa-se também o dupletos em 6,91 ppm com $J = 8,2$ Hz característico de acoplamento *ortho* que foi atribuído ao hidrogênio do carbono C5'. Na região entre 7,2 e 7,4 ppm se encontram um dupletos em 7,34 ppm com $J = 2,1$ Hz e um duplo dupletos em 7,30 ppm com $J = 2,1$ e 8,2 Hz. Estes sinais se referem, respectivamente, aos hidrogênios dos carbonos C2' e C6'. O hidrogênio do carbono C2' acopla em *meta* com o hidrogênio de C6' (observando um dupletos), enquanto que o hidrogênio de C6' acopla em *ortho* com o hidrogênio de C5' e em *meta* com o hidrogênio de C2' (observando duplo-dupletos).

Através das correlações H-C do mapa de contorno de *gHSQC* e com o auxílio do RMN DEPT135, os carbonos referentes a esses hidrogênios foram atribuídos (Figura 80).

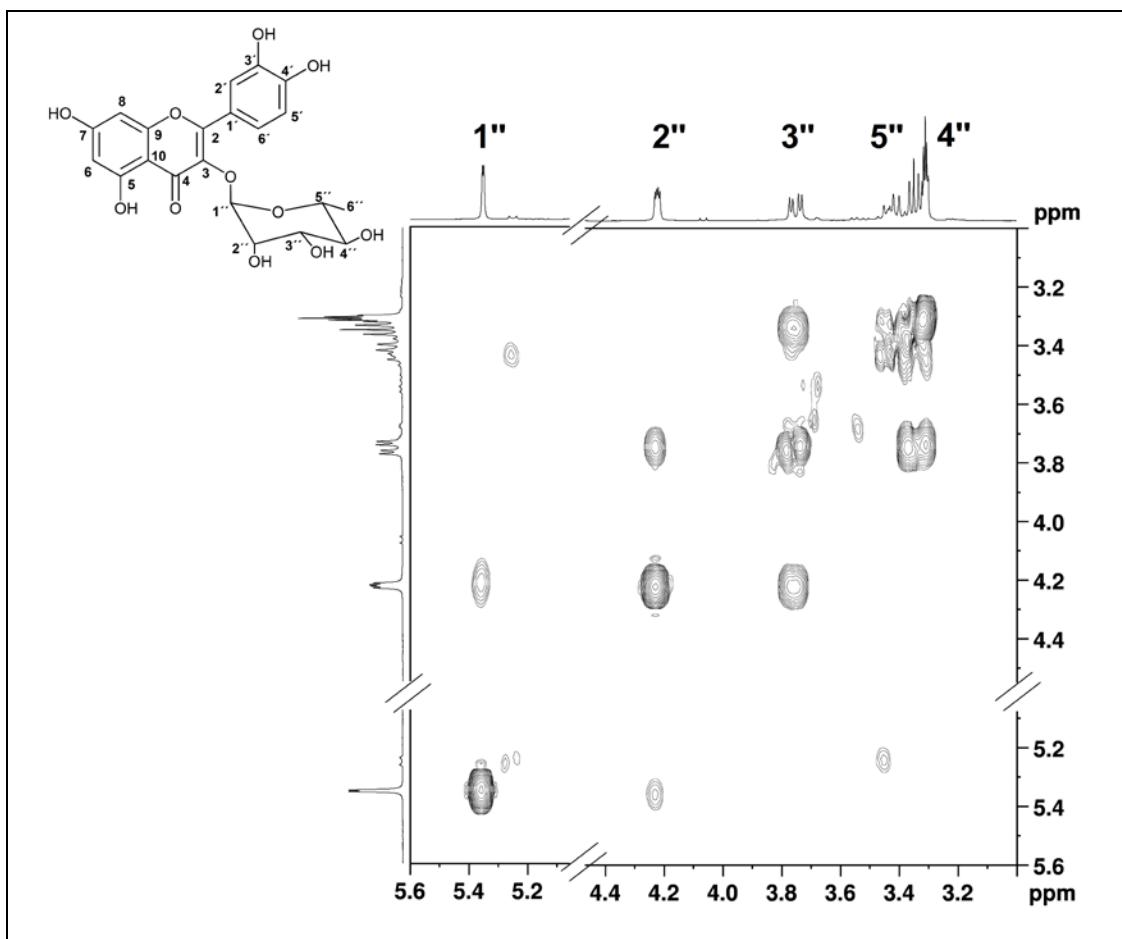
Figura 80 - Espectros de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de *g*HSQC (b) na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C3.



Fonte: autora.

Através do RMN foi possível caracterizar o grupo ramnose da quercitrina. O hidrogênio do carbono anomérico (C1") apresenta deslocamento de 5,35 ppm e $J = 1,5$ Hz, caracterizando a sua posição equatorial no anel glicosídico, apresentando portanto acoplamento geminal e vicinal. Os hidrogênios do carbono C6" (grupo ramnose) se apresentam como dupletos em 0,94 ppm e $J = 6$ Hz, uma vez que acoplam com o hidrogênio do carbono C5". O hidrogênio de C2" e de C3" se apresenta como duplo duplo com deslocamento e constante de acoplamento de 4,22 ppm ($J = 1,5; 3,3$ Hz) e 3,75 ppm ($J = 3,3; 9,2$ Hz), respectivamente. Isto ocorre porque o hidrogênio de C2" acopla com o hidrogênio de C1" e C3", enquanto que o hidrogênio de C3" acopla com o hidrogênio de C2" e C4". Isto pode ser observado através das correlações H-H do mapa de contorno de *g*COSY, mostrado na Figura 81.

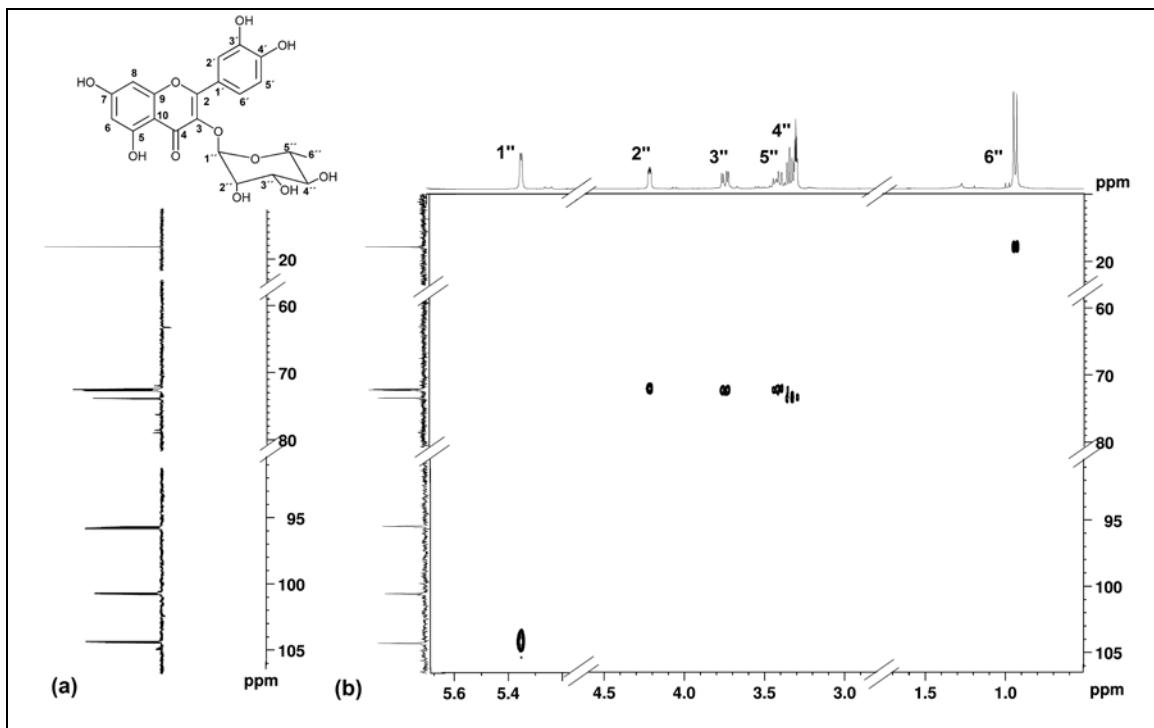
Figura 81 - Correlações H-H observadas no mapa de contorno de *g*COSY na região de hidrogênios glicosídicos do composto isolado FoE98-AE-C3.



Fonte: autora.

Através das correlações H-C do mapa de contorno de *g*HSQC e com o auxílio do RMN DEPT135, os carbonos referentes a esses hidrogênios foram atribuídos, como mostrado na Figura 82.

Figura 82 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de gHSQC (b) na região de hidrogênios glicosídicos do composto isolado FoE98-AE-C3.

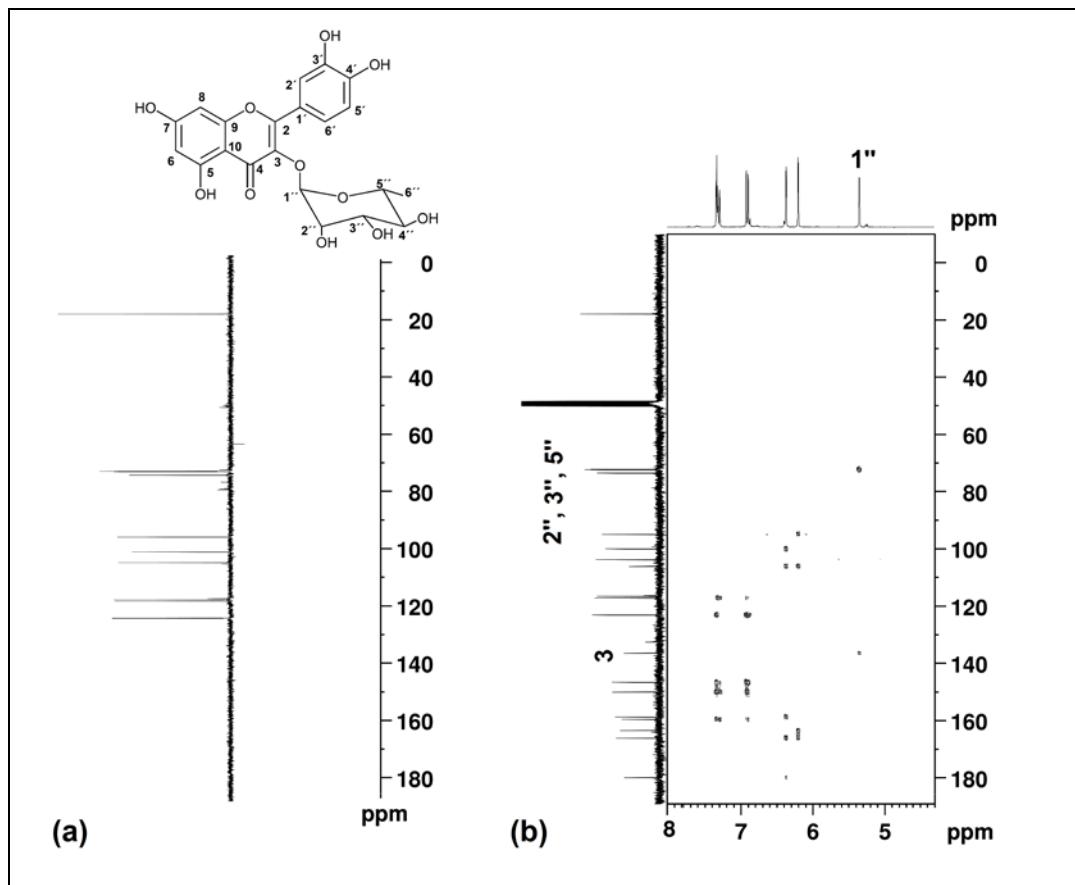


Fonte: autora.

Nesta figura é possível observar também o sinal característico de C6'' da ramnose, que é um dubbleto em 0,94 ppm que pelo DEPT135 se verifica que o carbono é do tipo CH₃ e não CH₂.

Através da análise das correlações H-C observadas no mapa de contorno de gHMBC, mostrado na Figura 83, é possível observar que os hidrogênios do C1'' se encontram em β aos carbonos C3'', C5'' e C3, e em α ao carbono C2''. Com isto se pode comprovar que o grupo ramnose se encontra ligado ao oxigênio do carbono C3, e que a molécula isolada é, portanto, a quercitrina.

Figura 83 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de gHMBC(b) na região do hidrogênio anomérico do composto isolado FoE98-AE-C3.



Fonte: autora.

As atribuições de todos os hidrogênios se encontram descritas na Tabela 45 e dos carbonos na Tabela 46, ambos comparados com os deslocamentos químicos relatados na literatura.

Tabela 45 - Atribuição dos hidrogênios no espectro de RMN de ^1H do composto isolado FoE98-AE-C3.

Posição	Composto isolado - FoE98-AE-C3		Quercitrina (SEMWAL et al., 2010)
	RMN- ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ^1 ; integral; m^2 (J^3)	$g\text{COSY}$	RMN- ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ^1 ; integral; m^2 (J^3)
6	6,20; 1H; d (2,1)	H-8	6,24; 1H; d (2,3)
8	6,37; 1H; d (2,1)	H-6	6,41; 1H; d (2,3)
2'	7,34; 1H; d (2,1)	H-6'	7,28; 1H; d (2,4)
5'	6,91; 1H; d (8,2)	H-6'	6,86; 1H; d (7,8)
6'	7,30; 1H; dd (2,1; 8,2)	H-2', H-6'	7,25; 1H; dd (2,4; 7,8)
1''	5,35; 1H; d (1,5)	H-2''	5,26; 1H; d (1,6)
2''	4,22; 1H; dd (1,5; 3,3)	H-1'', H-3''	3,98; 1H; m
3''	3,75; 1H; dd (3,3; 9,2)	H-2'', H-4''	
4''	3,35-3,40; 1H; m	H-3'', H-5''	3,10-3,53
5''	3,42-3,49; 1H; m	H-4'', H-6''	
6''	0,94; 3H; d (6,0)	H-5''	0,82; 3H; d (6,4)

Nota: 1 deslocamento químico (δ) em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2 multiplicidade (m) (d = duplo, dd = duplo duplo, m = multipleto); 3 Constante de acoplamento (J) expresso em Hz.

Tabela 46 - Atribuição dos carbonos no espectro de RMN de ^{13}C do composto isolado FoE98-AE-C3.

Posição	Composto isolado - FoE98-AE-C3				Quecetrina (SEMWAL et al., 2010)
	RMN- ^{13}C (75 MHz, CD_3OD)				RMN- ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
	δ^1	δ calculado ²	DEPT135	$g\text{HSQC}^1$	δ^1
2	158,66	154,9	C	-	158,1
3	136,38	135,1	C	-	134,4
4	179,79	178,3	C	-	180,2
5	163,36	163,9	C	-	160,8
6	99,94	98,3	CH	6,20	98,5
7	166,00	166,4	C	-	164,4
8	94,85	98,0	CH	6,37	93,4
9	159,46	160,1	C	-	157,2
10	106,04	105,5	C	-	104,5
1'	123,11	124,4	C	-	120,1
2'	116,51	113,6	CH	7,34	115,8
3'	146,56	147,2	C	-	144,9
4'	149,94	146,5	C	-	148,1
5'	117,01	117,2	CH	6,91	115,3
6'	123,01	120,4	CH	7,30	120,9
1''	103,68	92,4	CH	5,35	101,6
2''	72,25	73,9	CH	4,22	70,7
3''	72,17	73,2	CH	3,75	70,4
4''	73,39	77,7	CH	3,35-3,40	71,2
5''	72,05	70,6	CH	3,42-3,49	70,1
6''	17,80	16,9	CH_3	0,94	17,2

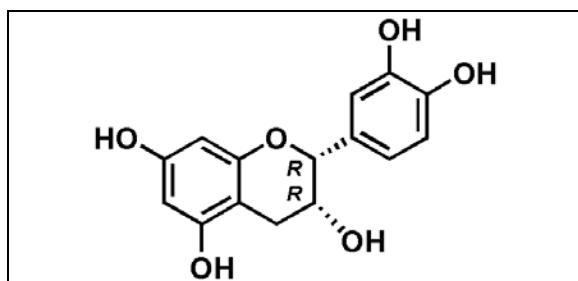
Nota: ¹deslocamento químico (δ) em ppm utilizando TMS como padrão interno; ²valores calculados pelo programa ChemDrawUltra 8.0.

A quercitrina já foi identificada em algumas espécies de *Eugenia*. Reynertson e outros (2008), por exemplo, determinaram por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no fruto das seguintes espécies de *Eugenia*: *E. aggregata*, *E. brasiliensis*, *E. luschnathiana* e *E. reinwardtiana*. Oliveira e outros (2014) também

determinaram a quercitrina por CLAE e identificaram por espectrometria de massas (ESI/EM) em sementes de *E. uniflora*.

4.2.9.4 Identificação do composto isolado FoE98-AE-C4 ((-)-epicatequina)

Figura 84 - Estrutura da (-)-epicatequina.

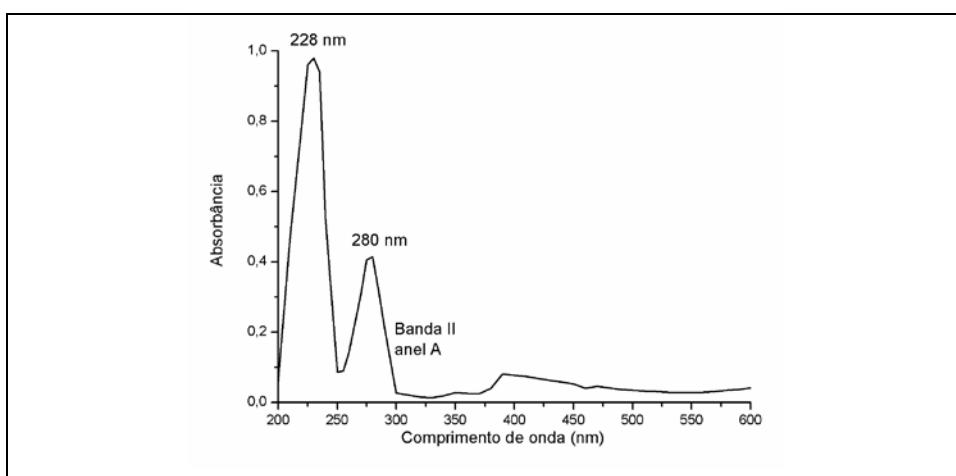


Fonte: autora.

Nota: $[\alpha]_D^{25} = -69,5$ (c 2,0; metanol)

O espectro de UV/Vis do composto isolado FoE98-AE-C4 mostrou um perfil diferentemente dos compostos FoE98-AE-C1, FoE98-AE-C2 e FoE98-AE-C3. Na Figura 85 se observa uma banda em 228 nm e outra em 280 nm, não sendo, portanto, observada a banda na região de 360 nm. Com esta análise já foi possível verificar que este composto não seria um flavonoide da classe dos flavonóis, como FoE98-AE-C1, FoE98-AE-C2 e FoE98-AE-C3. Isto sugere a ausência da dupla ligação entre C2 e C3 e da carbonila em C3, resultando em um flavan-3-ol, no qual as transições eletrônicas dos anéis A e B ocorrem na banda II em 280 nm.

Figura 85 - Espectro de UV-VIS (200-600 nm) do composto isolado FoE98-AE-C4.



Fonte: autora.

Foi realizada a análise de UV/Vis com reagentes de deslocamento para verificar o padrão de substituição do anel aromático, mostrada na Tabela 47.

Tabela 47 - Comprimento de onda das bandas de absorção I e II do composto isolado FoE98-AE-C4 em metanol e após a reação com reagentes de deslocamento.

Solvente	Banda I (nm)	Banda II (nm)
Metanol	-	280
NaOAc	-	290
NaOAc /H ₃ BO ₃	-	290
AlCl ₃	-	280
AlCl ₃ /HCl	-	280

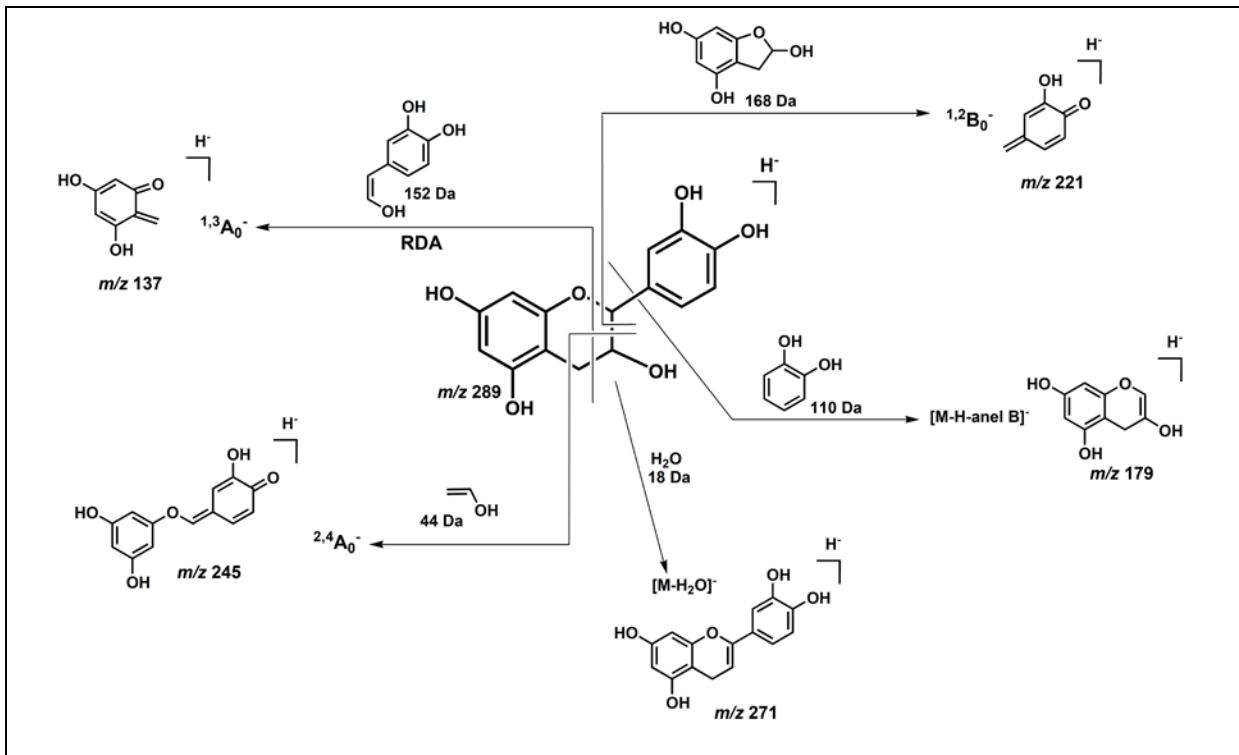
Observando os resultados obtidos para o composto FoE98-AE-C4, verifica-se um comportamento diferente em relação aos demais compostos isolados. O NaOAc promoveu o deslocamento batocrômico da banda II sugerindo a presença de OH em C7 ou C4', uma vez que as transições das bandas A e B ocorrem em 280 nm. A adição de H₃BO₃ manteve esse deslocamento, sugerindo a existência de grupos *ortho*-diidroxílicos no anel A ou B. Com a adição de AlCl₃ não foi observado deslocamento da banda II, evidenciando a ausência da carbonila em C3. Portanto, com esta análise não foi possível identificar corretamente os substituintes do anel aromático, mas foi possível ter uma idéia do padrão de substituição e estrutura do flavonoide.

A análise por espectrometria de massas de alta resolução, realizado com ionização por *electrospray* (ESI-EM/EM) no modo negativo (Apêndice K) apresentou picos em *m/z* 289,0759; 579,1540 e 869,2316. Uma suposição seria que o composto isolado fosse uma catequina ou epicatequina uma vez que ambos apresentam *m/z* 289. Assim, no espectro de massas de alta resolução, o pico em *m/z* 289,0759 [M-H]⁻ se refere à molécula desprotonada, calculado para C₁₅H₁₃O₆⁻, 289,0718 (E_{ppm}=14,18). As demais *m/z* são referentes a um íon dimérico formado por um ânion de catequina/epicatequina e uma catequina/epicatequina neutra, no caso de *m/z* 579,1540; e um íon trimérico formado por um ânion catequina/epicatequina e duas catequinas/epicatequinas neutras, no caso de *m/z* 869,2316. Os íons diméricos e triméricos (*clusters*) são formados durante o processo de análise (MARTINS et al., 2004, GAVRILAS; DUMITRU; STANESCU, 2012).

A Figura 86 mostra as propostas de fragmentações (EM/EM) do íon *m/z* 289 (Apêndice K). Nesta figura foram propostas fragmentações para a obtenção dos íons

m/z 136, 179, 221, 271 e 245 baseadas na literatura (TSIMOGLIANNIS et al., 2007, HAMED et al., 2014).

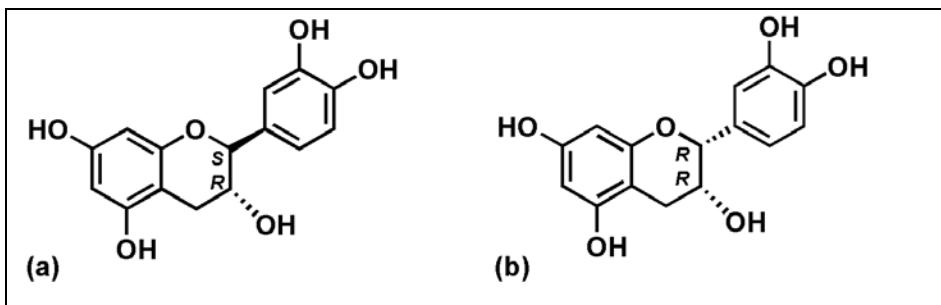
Figura 86 - Fragmentação observada no espectro de massas (modo negativo) do composto isolado FoE98-AE-C4.



Fonte: autora.

Sendo o composto FoE98-AE-C4 uma catequina ou epicatequina, ambos são quirais e, portanto, foi medida a configuração absoluta em um polarímetro digital. Foi observado na análise um desvio negativo ($\alpha = -0,139$), resultando em $[\alpha]_D^{25} = -69,5$ (c 2,0; metanol). O desvio negativo para a catequina se refere as configurações 2S, 3R para os carbonos assimétricos C2 e C3 (Figura 87); e para a epicatequina esse desvio se refere as configurações 2R,3R. Assim, esses compostos não podem ser distinguidos por espectrometria de massas. Sendo, portanto, essencial a análise por RMN.

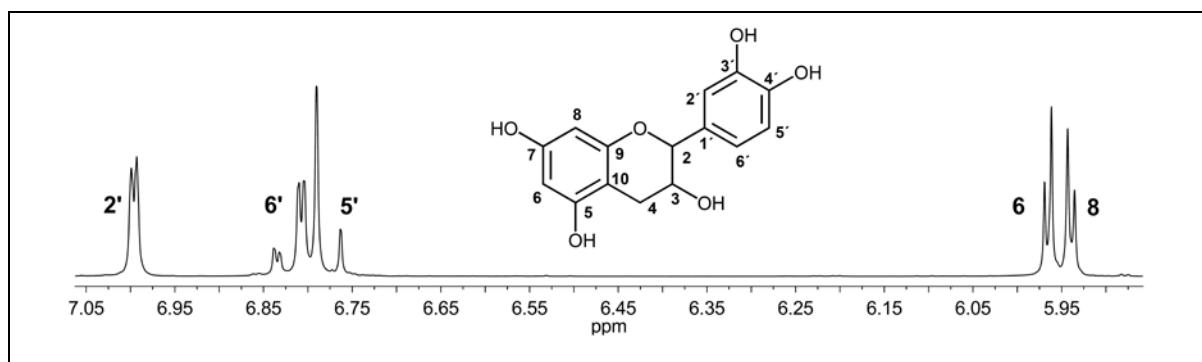
Figura 87 - Estrutura da (-)-catequina (a) e (-)-epicatequina (b).



Fonte: autora.

Na Figura 88 está apresentado o espectro de RMN de ^1H do composto isolado na região característica de hidrogênios aromáticos.

Figura 88 - Espectro de RMN de ^1H na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C4.

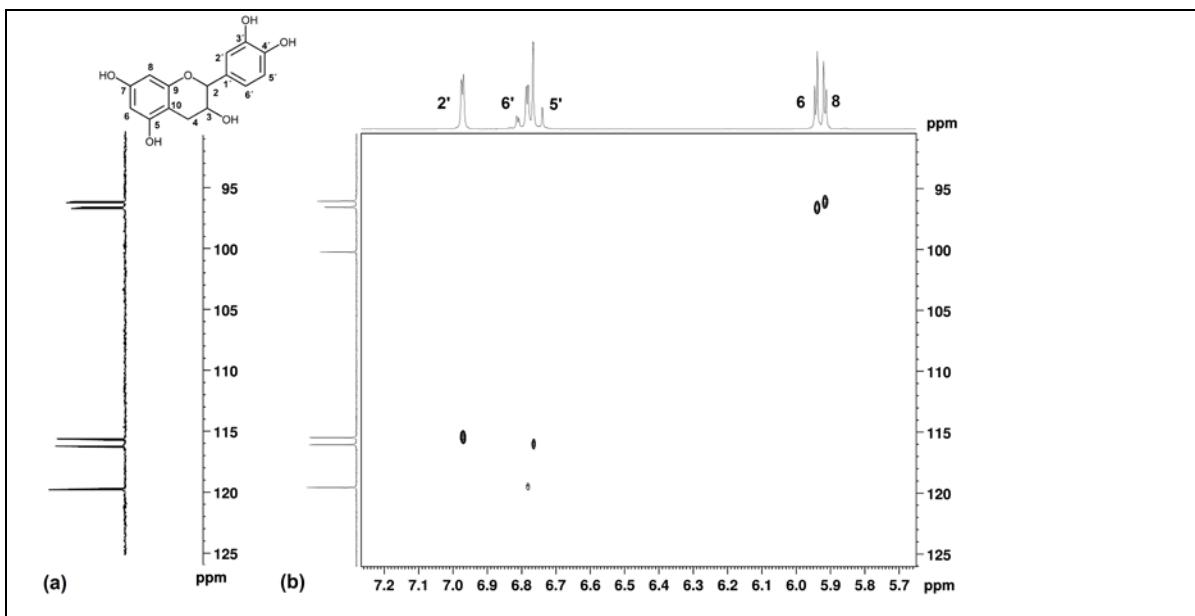


Fonte: autora.

Neste espectro se verificam os dupletos em 5,94 e 5,91 ppm, ambos com $J = 2,1$ Hz, característico de acoplamentos *meta*, referentes ao hidrogênios dos carbonos C6 e C8 (anel A). Observa-se também o dupletos em 6,97 ppm com $J = 1,7$ Hz característico de acoplamento *meta* que foi atribuído ao hidrogênio do carbono C2'. Na região entre 6,75 e 6,85 ppm se encontram um dupletos em 6,75 ppm com $J = 7,9$ Hz e um duplo dupletos em 6,79 ppm com $J = 1,7$ e 7,9 Hz. Estes sinais se referem, respectivamente, aos hidrogênios dos carbonos C5' e C6'. O hidrogênio do carbono C2' acopla em *meta* com o hidrogênio de C6' (observando um dupletos), enquanto que o hidrogênio de C6' acopla em *ortho* com o hidrogênio de C5' e em *meta* com o hidrogênio de C2' (observando duplo-dupletos).

Através das correlações H-C do mapa de contorno de *g*HSQC e com o auxílio do RMN DEPT135, os carbonos referentes a esses hidrogênios foram atribuídos (Figura 89).

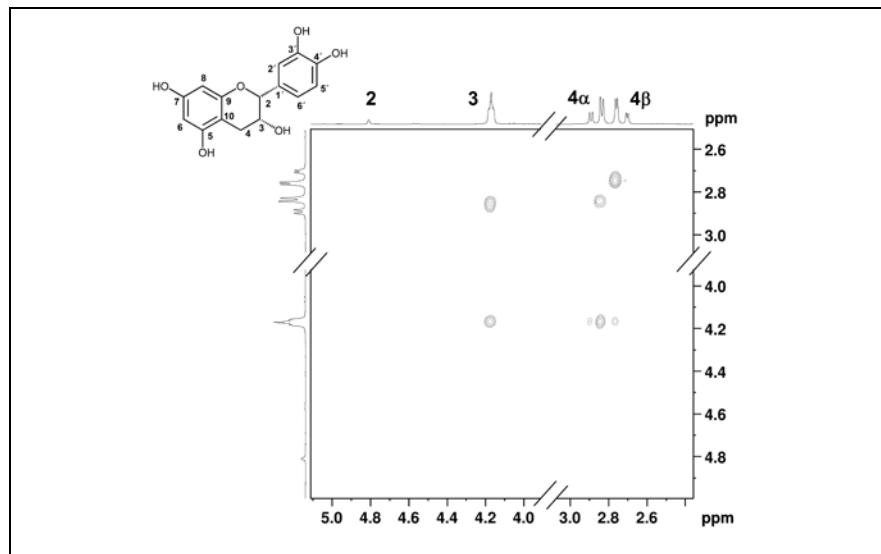
Figura 89 - Espectros de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de *g*HSQC (b) na região de hidrogênios aromáticos do composto isolado FoE98-AE-C4.



Fonte: autora.

Através do RMN-H¹ foi possível verificar que o composto isolado FoE98-AE-C4 é a (-)-epicatequina. Isto porque na (-)-epicatequina o hidrogênio de C2 acopla muito fracamente com o hidrogênio de C3, uma vez que eles se encontram em posição *cis* (ou seja, H_{axial} e H_{equatorial}), assim no espectro da molécula FoE98-AE-C4 foi verificado um simpleto para o hidrogênio do C2, pois a frequência do aparelho não permitiu observar o desdobramento do pico. Sritularak e outros (2010) identificou a catequina e para o hidrogênio de C2 foi verificado um duplet em 4,55 ppm com *J* = 7,5 Hz, típico de hidrogênios vicinais em *trans* (ou seja, H_{axial} e H_{axial}). Nas correlações H-H do mapa de contorno de *g*COSY, mostrado na Figura 90 é possível verificar que o hidrogênio de C2 não está correlacionado com o hidrogênio de C3, devido ao ângulo de acoplamento entre esses hidrogênios.

Figura 90 - Correlações H-H observadas no mapa de contorno de gCOSY na região de hidrogênios glicosídicos do composto isolado FoE98-AE-C4.

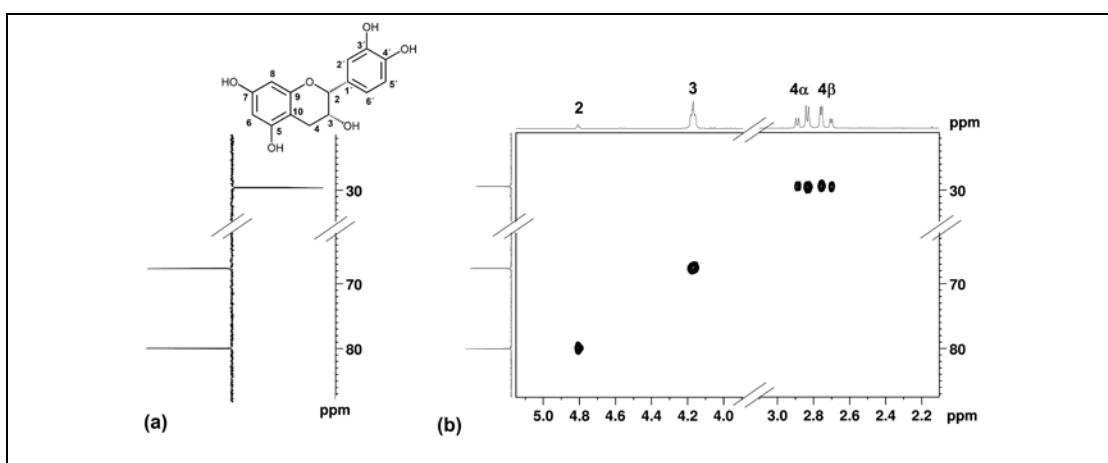


Fonte: autora.

Os hidrogênios do carbono C4 são vizinhos ao carbono assimétrico C3, portanto, o deslocamento dos hidrogênios de C4 se apresentam desdobrados por serem diasterotópicos, apresentando portanto acoplamento geminal e vicinal. Na Figura 91 é possível observar no espectro de RMN DEPT135 o sinal CH_2 referente ao carbono C4 em 29,40 ppm.

Nas correlações H-C mostradas no mapa de contorno de gHSQC desta figura é possível observar o sinal desdobrado dos hidrogênios de C4 em 2,86 ppm e 2,73 ppm.

Figura 91 - Espectro de RMN DEPT135 (a) e correlações H-C observadas no mapa de contorno de gHSQC (b) do composto isolado FoE98-AE-C4.



Fonte: autora.

Portanto, através da análise de RMN foi possível identificar que o composto isolado FoE98-AE-C4 é a (-)-epicatequina. A configuração absoluta da (-)-epicatequina obtida em um polarímetro digital $[\alpha]_D^{25} = -69,5$ (c 2,0; metanol) é comparável ao da literatura (LOPES et al., 2009) $[\alpha]_D^{20} = -42,0$ (c 0,4; metanol). As atribuições de todos os hidrogênios se encontram descritas na Tabela 48 e dos carbonos na Tabela 49, ambos comparados com os deslocamentos químicos relatados na literatura.

Tabela 48 - Atribuição dos hidrogênios no espectro de RMN de ^1H do composto isolado FoE98-AE-C4.

Posição	Composto isolado - FoE98-AE-C4		Epicatequina (SHAHAT, 2006)
	RMN- ^1H (300 MHz, CD_3OD)	$g\text{COSY}$	RMN- ^1H (400 MHz, acetona- d_6)
	δ^1 ; integral; m^2 (J^3)		δ^1 ; integral; m^2 (J^3)
2	4,83; 1H; s	H-3	4,81; 1H; s
3	4,16-4,18; 1H; m	H-2, H-4	4,17; 1H; m
4	2,86; 1H α ; dd (4,5 e 16,5) 2,73; 1H β ; dd (2,7 e 16,8)	H-3	2,85; 1H α ; dd (4,5 e 16,5) 2,73, 1H β , dd (2,5 e 16,7)
6	5,94; 1H; d (2,1)	H-8	5,94; 1H; d (2,2)
8	5,91; 1H; d (2,1)	H-6	5,91; 1H; d (2,2)
2'	6,97; 1H; d (1,7)	H-6'	6,97; 1H, d (1,7)
5'	6,75; 1H; d (7,9)	H-6'	6,74; 1H; d (7,5)
6'	6,79; 1H; dd (1,7 e 7,9)	H-2', H-5'	6,78; 1H; dd (1,7 e 7,5)

Nota: ¹deslocamento químico (δ) em ppm utilizando TMS como padrão interno; ²multiplicidade (m) (s = simpleto, d = duplo, dd = duplo duplo, m = multiplo); ³Constante de acoplamento (J) expresso em Hz.

Tabela 49 - Atribuição dos carbonos no espectro de RMN de ^{13}C do composto isolado FoE98-AE-C4.

Posição	Composto isolado - FoE98-AE-C4				Epicatequina (SHAHAT, 2006)
	RMN- ^{13}C (75 MHz, CD_3OD)				RMN- ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6)
	δ^1	δ calculado ²	DEPT135	gHSQC ¹	δ^1
2	80,00	82,1	CH	4,83	79,85
3	67,61	67,8	CH	4,16-4,18	67,74
4	29,40	26,6	CH_2	2,86; 2,73	29,22
5	158,13	157,3	C	-	157,95
6	96,52	95,3	CH	5,94	96,46
7	157,78	157,8	C	-	157,61
8	96,02	94,8	CH	5,91	95,92
9	157,50	157,4	C	-	157,34
10	100,20	103,1	C	-	100,09
1'	132,41	132,6	C	-	132,30
2'	115,45	115,2	CH	6,97	115,34
3'	146,06	147,4	C	-	145,89
4'	145,90	144,6	C	-	145,72
5'	116,03	117,4	CH	6,75	115,92
6'	119,54	122,2	CH	6,79	119,12

Nota: ¹deslocamento químico (δ) em ppm utilizando TMS como padrão interno; ²valores calculados pelo programa ChemDrawUltra 8.0.

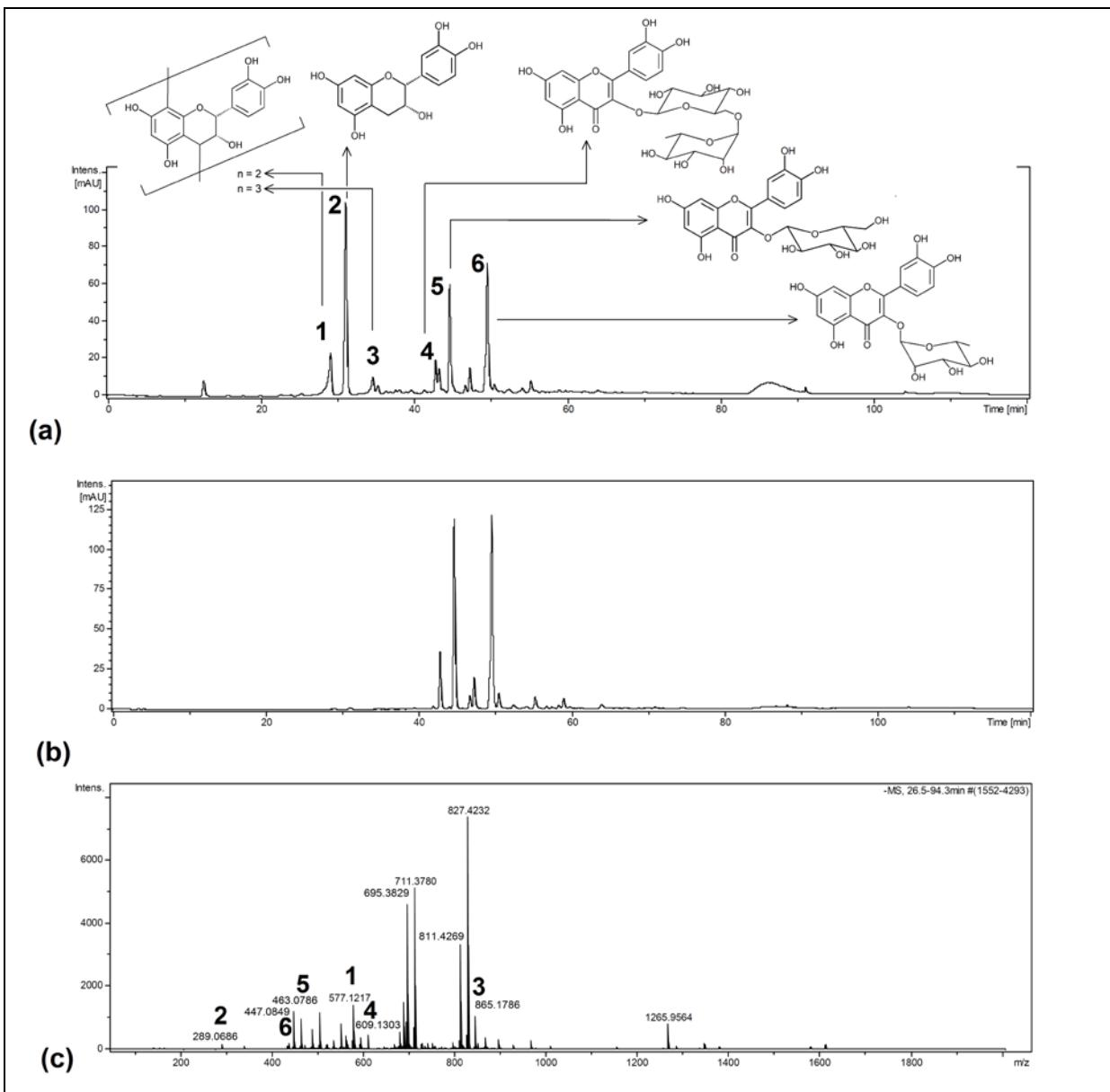
A epicatequina já foi identificada em algumas espécies de *Eugenia*. Ramful e outros (2011), por exemplo, determinaram por CLAE nas folhas de *E. pollicina*, assim como Infante (2013) na folhas de *E. involucrata* e Silva (2013) na folhas de *E. dysenterica*.

4.2.10 Desreplicação da partição em acetato de etila dos extratos de folhas, flores e galhos através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas por ionização *electrospray* (CLAE-ESI- EM/EM) e quantificação dos compostos isolados.

A fração acetato de etila dos extratos foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas por ionização

electrospray (CLAE-ESI-EM/EM). A Figura 92 mostra os cromatogramas observados em 280 nm e 360 nm para a fração acetato de etila do extrato das folhas e o espectro de massas em alta resolução.

Figura 92 - Cromatograma da análise CLAE-ESI-EM/EM em 280 nm (a) e 360 nm (b) e espectro de massas de alta resolução (c) da fração acetato de etila do extrato das folhas.

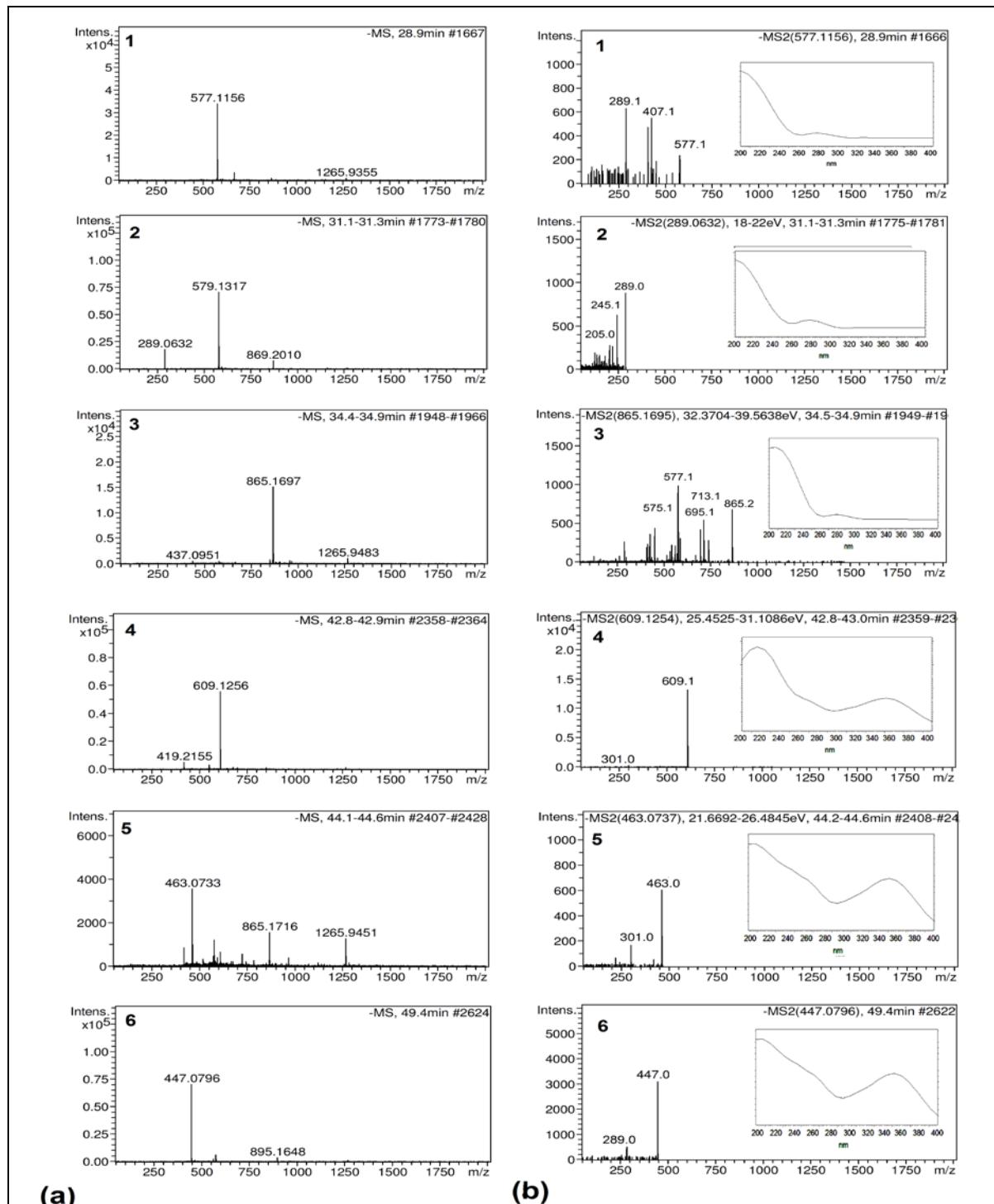


Nota: 1: procianidina B2, 2: epicatequina, 3: procianidina C1, 4: rutina, 5: isoquercitrina, 6: quercitrina. Fonte: autora.

Nesta figura é possível verificar os picos referentes a 6 compostos: quatro deles são referentes aos compostos isolados (epicatequina, rutina, isoquercitrina e quercitrina), enquanto que a procianidina B2 e procianidina C1 foram identificados

através do espectro de massas e UV/Vis. Na Figura 93 é possível observar o espectro de massas EM/EM e UV/Vis das m/z dos compostos identificados.

Figura 93 - Espectro de massas (a), espectro EM/EM e espectro de UV/Vis (b) do íon molecular dos compostos 1-6 da fração acetato de etila do extrato das folhas.



Nota: 1: procianidina B2, 2: epicatequina, 3: procianidina C1, 4: rutina, 5: isoquercitrina, 6: quercitrina. Fonte: autora.

Na Tabela 50 se encontram os dados obtidos da análise por CLAE-ESI-EM/EM para os compostos identificados. Através do perfil do espectro de UV/Vis e do padrão de fragmentação foi possível identificar os compostos que foram isolados e também mais dois novos compostos, procianidinas B2 e C1.

Tabela 50 - Dados obtidos da análise da fração acetato de etila do extrato das folhas por CLAE-ESI-EM/EM

Pico ^a	Composto	T _R (min) ^b	Fórmula [M-H] ⁻	Massa calculada para [M-H] ⁻	m/z de [M-H] ⁻	erro (ppm)	CLAE-ESI-EM/EM m/z dos fragmentos de [M-H] ⁻
1	Procianidina B2	29,3	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁ ⁻	577,1351	577,1217	23,2	289,1; 407,1; 425,1
2	Epicatequina	31,5	C ₁₅ H ₁₄ O ₅ ⁻	289,0718	289,0686	11,1	179,0; 205,0; 245,1
3	Procianidina C1	34,6	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₇ ⁻	865,1980	865,1786	23,0	575,1; 577,1; 695,1; 713,1
4	Rutina	43,1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ ⁻	609,1461	609,1303	25,9	301,0
5	Isoquerçitrina	44,9	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463,0882	463,0786	20,7	301,0
6	querçitrina	49,8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ ⁻	447,0933	447,0849	18,8	285,0

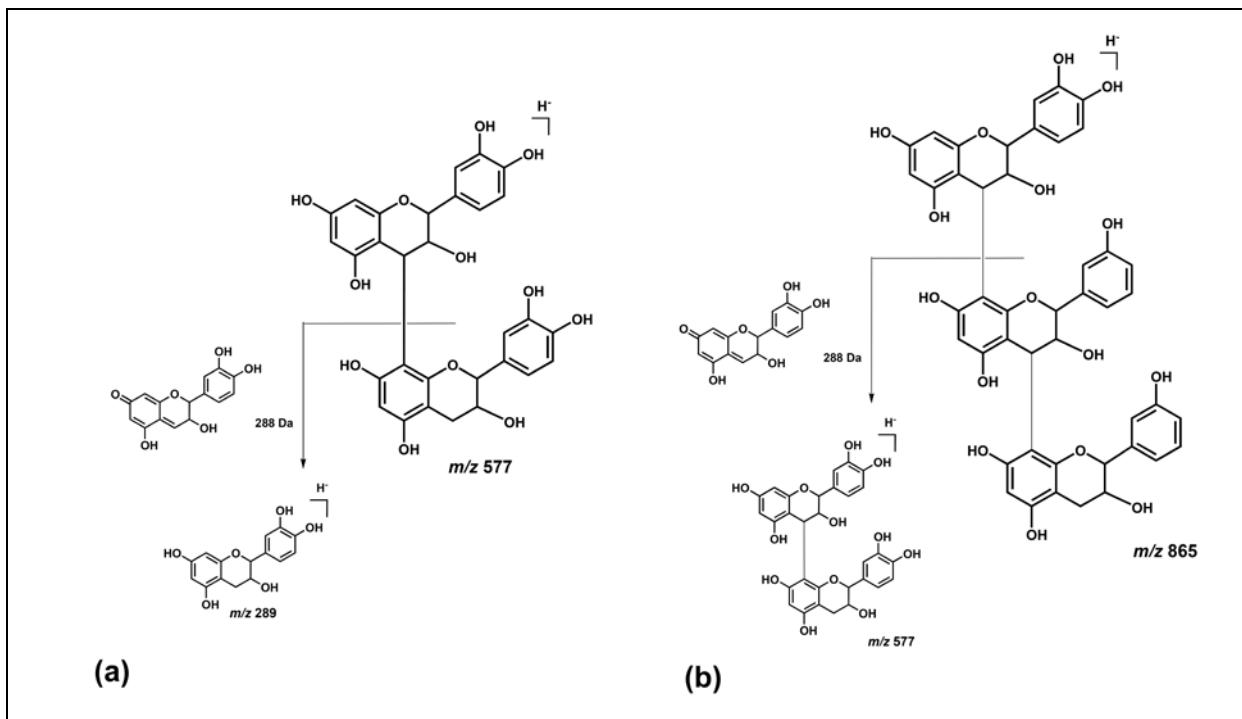
Nota: a: numeração do pico mostrado na Figura 92, b: tempo de retenção observado no CLAE.

Uma vez que os espectros dos compostos 1 e 3 apresentam uma banda de absorção máxima em 280 nm e ausência de banda em 360 nm, concluiu-se que poderia se tratar de um flavan-3-ol.

O espectro de massas desses compostos na análise por CLAE-ESI-EM/EM fornece *m/z* em 577 e 865 para a procianidina B2 e C1, respectivamente. Uma vez que a amostra contém epicatequina e o composto de *m/z* 577 fornece fragmento em *m/z* 289, e o composto de *m/z* 865 fornece fragmento em *m/z* 577, pode-se inferir que no primeiro caso o composto seja um dímero de epicatequina (procianidina B2) e no segundo caso um trímero de epicatequina (procianidina C1). Aqui cabe ressaltar que, neste caso, esses espectros de massas são referentes aos compostos procianidinas B2 e C1 e não aos clusters dimérico e trimérico, que pode ter sido formado durante a análise. Isto porque, conforme foi explicado no item 4.2.9.4 (p. 166), a formação de *cluster* dimérico resultaria em *m/z* 579 e *cluster* trimérico em *m/z* 869, portanto apresentariam valores de *m/z* superiores ao encontrado.

Na Figura 94 se encontra uma proposta de fragmentação para a procianidinas B2 e C1.

Figura 94 - Proposta de fragmentação para a procianidina B2 (a) e C1 (b).

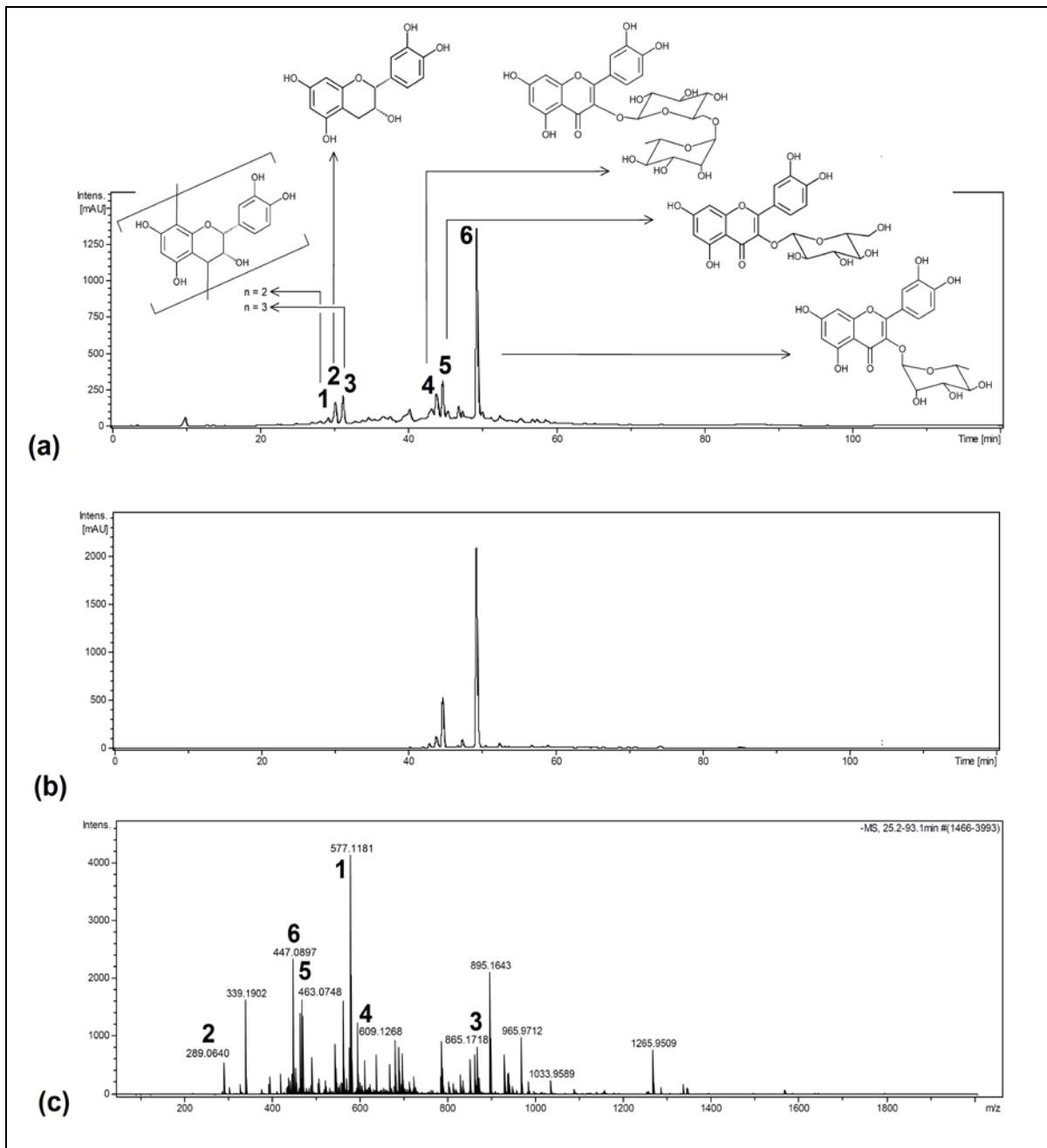


Fonte: autora.

Com isto é possível verificar que a fração acetato de etila das folhas apresenta além dos compostos isolados, proantocianidoinas que são responsáveis também pela atividade antioxidante desta fração.

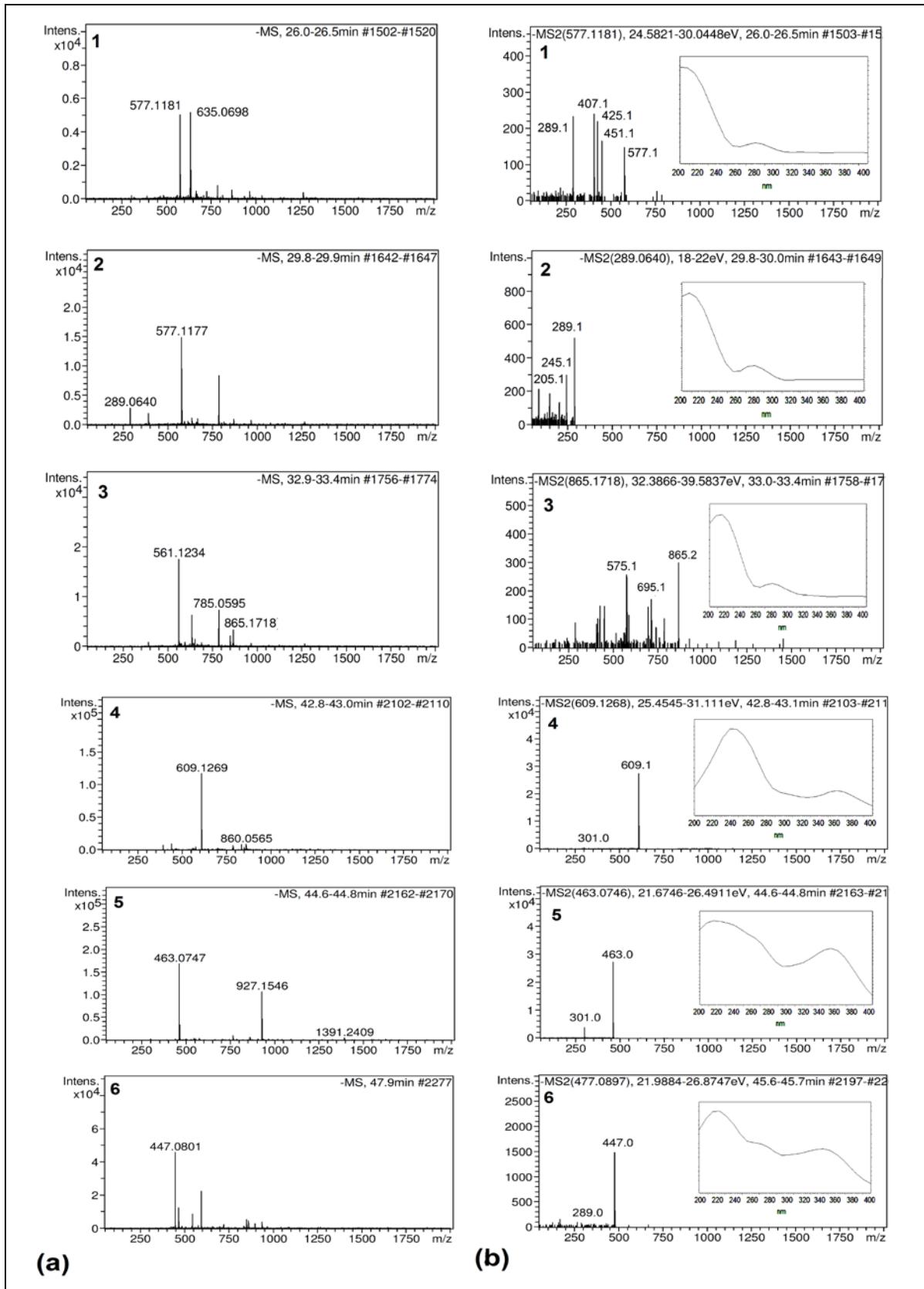
No caso da fração acetato de etila do extrato das flores, a Figura 95 mostra os cromatogramas observados em 280 nm e 360 nm e o espectro de massas em alta resolução. Nesta figura é possível observar a presença dos mesmos 6 compostos identificados na fração acetato de etila das folhas. A diferença entre elas está na concentração. Portanto, as flores apresentam flavonoides em sua composição que foram identificados como rutina, isoquercitrina e quercitrina, fato que comprova os resultados observados nas análises realizadas previamente (teor de fenóis totais, flavonoides e espectro de UV). Além disso, observou-se a presença de proantocianidinas e epicatequina, o que justifica o elevado teor de proantocianidina observado nesta amostra. Portanto a composição química desta fração justifica a elevada atividade antioxidante observada. Na Figura 96 estão mostrados os espectros de massas EM/EM e UV/Vis.

Figura 95 - Cromatograma da análise CLAE-ESI-EM/EM em 280 nm (a) e 360 nm (b) e espectro de massas de alta resolução (c) da fração acetato de etila do extrato das flores.



Nota: 1: procianidina B2, 2: epicatequina, 3: procianidina C1, 4: rutina, 5: isoquercitrina, 6: quercitrina. Fonte: autora.

Figura 96 - Espectro de massas (a), espectro EM/EM e espectro de UV/Vis (b) do íon molecular dos compostos 1-6 da fração acetato de etila do extrato das flores.



Nota: 1: procianidina B2, 2: epicatequina, 3: procianidina C1, 4: rutina, 5: isoquercitrina, 6: quercitrina. Fonte: autora.

Na Tabela 51 se encontram os dados obtidos da análise por CLAE-ESI-EM/EM que possibilitaram a identificação dos compostos.

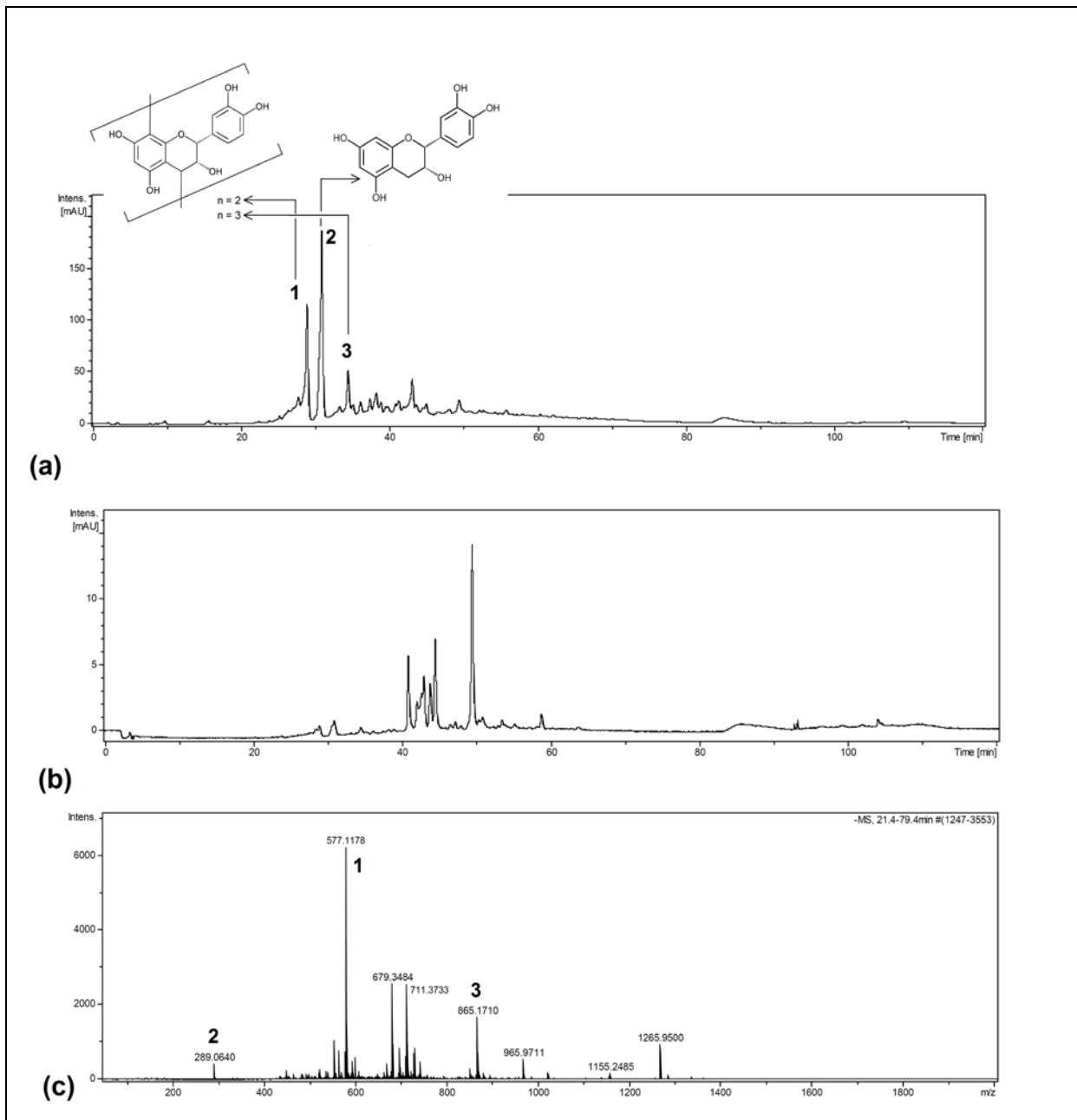
Tabela 51 - Dados obtidos da análise da fração acetato de etila do extrato das flores por CLAE-ESI-EM/EM.

Pico ^a	Composto	T _R (min) ^b	Fórmula [M-H] ⁻	Massa		CLAE-ESI-EM/EM	
				calculada para [M-H] ⁻	m/z de [M-H] ⁻	erro (ppm)	m/z dos fragmentos de [M-H] ⁻
1	Procanidina B2	26,3	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁ ⁻	577,1351	577,1177	30,1	289,1; 407,1; 425,1; 451,1
2	Epicatequina	29,8	C ₁₅ H ₁₄ O ₅ ⁻	289,0718	289,0640	26,9	205,1; 245,1
3	Procanidina C1	33,2	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₇ ⁻	865,1980	865,1717	30,9	575,1; 577,1; 695,1
4	Rutina	42,9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ ⁻	609,1461	609,1249	34,8	301,0
5	Isoquericitrina	44,7	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463,0882	463,0748	28,9	301,0
6	Quercitrina	45,6	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ ⁻	447,0933	447,0801	29,5	285,0

Nota: a: numeração do pico mostrado na Figura 95, b: tempo de retenção observado no CLAE.

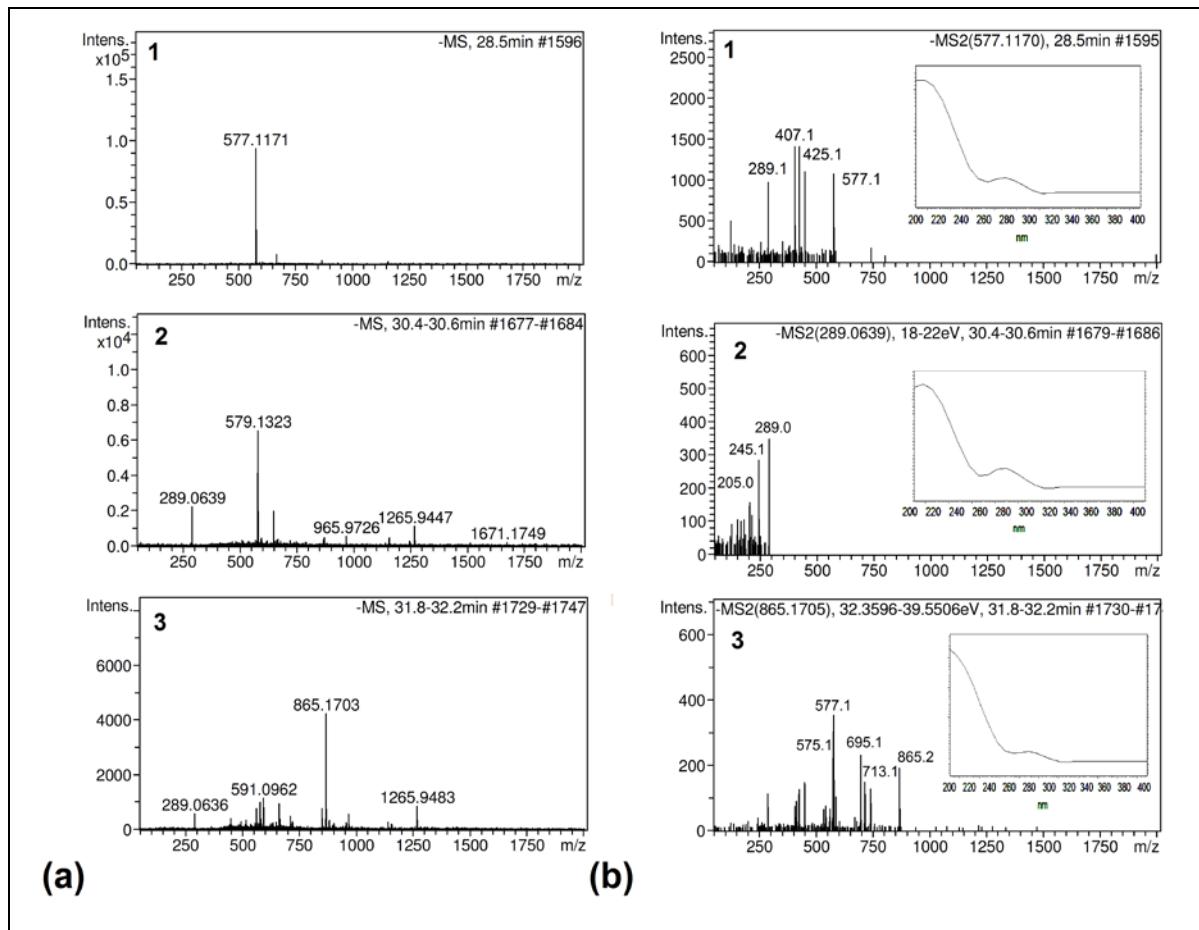
No caso da fração acetato de etila do extrato dos galhos, a Figura 97 mostra os cromatogramas observados em 280 nm e 360 nm e o espectro de massas em alta resolução. Nesta figura é possível observar apenas a presença de 3 compostos que foram identificados na fração acetato de etila do extrato das folhas e flores. Os compostos identificados foram a epicatequina, procanidina B2 e C1. Não foi observada a presença dos flavonóis rutina, isoquericitrina e quercitrina. Embora o cromatograma em 360 nm mostre alguns compostos, observa-se que estes se encontram com intensidade muito inferior em relação aos compostos observados no cromatograma em 280 nm, além disso, pelo massas e espectro de UV destes compostos foi verificado que realmente não seriam os flavonóides identificados nas folhas e flores. Isto corrobora com as análises realizadas com a fração do galho, na qual se verificou elevada presença de fenóis totais e proantocianidinas e baixíssima concentração de flavonóides, além do espectro de UV/Vis ser característico de flavan-3-ol. Portanto, a composição química desta fração justifica a elevada atividade antioxidante observada. Na Figura 98 estão mostrados os espectros de massas EM/EM e UV/Vis.

Figura 97 - Cromatograma da análise CLAE-ESI-EM/EM em 280 nm (a) e 360 nm (b) e espectro de massas de alta resolução (c) da fração acetato de etila do extrato dos galhos.



Nota: 1: procianidina B2, 2: epicatequina, 3: procianidina C1. Fonte: autora.

Figura 98 - Espectro de massas (a), espectro EM/EM e espectro de UV/Vis (b) do íon molecular dos compostos 1, 2 e 3 da fração acetato de etila do extrato dos galhos.



Nota: 1: procianidina B2, 2: epicatequina, 3: procianidina C1. Fonte: autora.

Na Tabela 52 se encontram os dados obtidos da análise por CLAE-ESI-EM/EM que possibilitaram a identificação dos compostos.

Tabela 52 - Dados obtidos da análise da fração acetato de etila do extrato dos galhos por CLAE-ESI-EM/EM.

Pico ^a	Composto	T _R (min) ^b	Fórmula	Massa calculada para [M-H] ⁻	-MS de [M-H] ⁻	erro (ppm)	CLAE-ESI-EM/EM m/z dos fragmentos de [M-H] ⁻
1	Procianidina B2	28,5	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁ ⁻	577,1351	577,1178	29,9	289,1; 407,1; 425,1; 426,1
2	Epicatequina	30,5	C ₁₅ H ₁₄ O ₅ ⁻	289,0718	289,0640	26,9	179,0; 205,0; 245,1
3	Procianidina C1	32,0	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₇ ⁻	865,1985	865,1710	31,8	575,1; 577,1; 695,1; 713,1

Nota: a: numeração do pico mostrado na Figura 97, b: tempo de retenção observado no CLAE.

Através da análise por CLAE-DAD em 245 nm, foram construídos gráficos da área (área do composto/área do padrão interno) *versus* concentração para que os compostos isolados fossem quantificados nas frações em acetato de etila e *n*-butanol dos extratos das folhas, flores e galhos. Na Tabela 53 se encontram as equações de regressão linear obtidas das curvas analítica dos gráficos, bem como o limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e o tempo de retenção dos compostos.

Tabela 53 - Parâmetros obtidos da curva analítica construída para epicatequina, rutina, isoquercitrina e quercitrina.

	Epicatequina	Rutina	Isoquercitrina	Quercitrina
Tempo de retenção (min)	29,7	39,8	41,7	46,8
Regressão linear	$y = 0,0113x - 0,047$	$y = 0,0125x - 0,0761$	$y = 0,0353x - 0,8426$	$y = 0,0228x - 0,4056$
R^2	0,9997	0,9984	0,9909	0,9959
LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10,9	4,0	6,1	12,4
LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	36,4	13,2	20,4	41,2

Através das equações mostradas na tabela acima os compostos foram quantificados nas frações dos extratos. A Tabela 54 mostra os resultados obtidos deste cálculo.

Tabela 54 - Concentração de rutina, isoquercitrina, quercitrina e epicatequina nas frações acetato de etila e *n*-butanol dos extratos das folhas, galhos e flores.

		Rutina		Isoquercitrina		Quercitrina		Epicatequina	
		$\mu\text{g mL}^{-1}$	% (m/m)	$\mu\text{g mL}^{-1}$	% (m/m)	$\mu\text{g mL}^{-1}$	% (m/m)	$\mu\text{g mL}^{-1}$	% (m/m)
Folha	AE	43,0 \pm 1,3	1,4 \pm 0,1	80,0 \pm 0,6	2,7 \pm 0,1 ^c	146,8 \pm 3,9 ^d	5,0 \pm 0,2 ^e	196,1 \pm 12,5 ^f	6,6 \pm 0,3
	B	276,5 \pm 4,1 ^a	9,0 \pm 0,2 ^b	39,0 \pm 1,8	1,3 \pm 0,1	22,9 \pm 0,6	0,7 \pm 0,1	-	-
Flor	AE	376,7 \pm 1,0	12,1 \pm 0,1	172,2 \pm 4,3	5,5 \pm 0,1	545,8 \pm 5,3	17,5 \pm 0,2	161,6 \pm 11,6 ^f	5,2 \pm 0,4
	B	264,3 \pm 8,7 ^a	8,0 \pm 0,3 ^b	97,0 \pm 3,3	2,9 \pm 0,1 ^c	137,8 \pm 2,9 ^d	4,2 \pm 0,1 ^e	-	-
Galho	AE	-	-	-	-	-	-	396,9 \pm 6,7	12,0 \pm 0,2
	B	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: AE: acetato de etila, B: *n*-butanol. As análises com mesmo símbolo não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

Observando os resultados obtidos da quantificação é possível verificar que, conforme a análise de massas, os galhos não apresentam os flavonoides rutina, isoquercitrina e quercitrina, mas possui em sua composição a epicatequina (flavan-3-ol). Além disso, este composto não se encontra presente na fração *n*-butanol do

extrato dos galhos. Nas frações *n*-butanol de folhas e flores também não é observada a presença da epicatequina. Isto ocorre provavelmente devido a menor polaridade deste composto, apresentando, portanto, maior afinidade com o acetato de etila do que com o *n*-butanol durante a partição líquido-líquido.

A fração acetato de etila das folhas apresentam maior concentração de quercitrina enquanto que a das flores apresenta rutina em maior concentração. Na fração *n*-butanol, as folhas e flores apresentam maior concentração de rutina. Os flavonoides identificados são glicosilados, portanto, apresentam polaridade elevada, fato que justifica a sua presença na fração *n*-butanol. Dentre os flavonoides, a rutina por possuir um dissacarídeo em sua composição, a sua polaridade se torna superior aos demais compostos, fato que justifica a sua presença em maior quantidade na fração *n*-butanol.

Na Figura 99 estão mostradas as possíveis rotas biossintética dos compostos identificados nas frações acetato de etila e *n*-butanol do extrato das folhas, flores e galhos flavonoides (MUIR et al., 2001, WINKEL-SHIRLEY, 2001, LUKAČIN et al., 2003).

A formação dos flavonóides e proantocianidinas tem início com a condensação seguida de ciclização intramolecular de 3 moléculas de malonil-CoA com uma *p*-coumaroil-CoA resultado na naringenina-chalcona, sendo catalizado pela chalcona sintase (E₁). Na sequência ocorre a isomerização da naringenina-chalcona em naringenina através da chalcona isomerase (E₂). Esta enzima é altamente estereosseletiva, portanto catalisa apenas a formação de (2S)-naringenina (HE et al., 2008, NGAKI et al., 2012).

Na sequência ocorre a hidroxilação do anel B da naringenina formando o eriodictol, através da enzima flavonoide3'-hidroxilase (E₃). Esta enzima é importante no padrão de hidroxilação do flavonoide gerado (WINKEL-SHIRLEY, 2001, LUKAČIN et al., 2003, TANNER et al., 2003). A enzima flavonol 3β-hidroxilase (E₄) converterá o eriodictol em taxifolin na presença de oxigênio e 2-oxoglutarato. Nesta etapa, dependendo do tipo de enzima que irá atuar, serão formados flavonoides (quercetina, isoquercetina e rutina), ou flavan-3-ol (epicatequina) e proantocianidinas (B2 e C1).

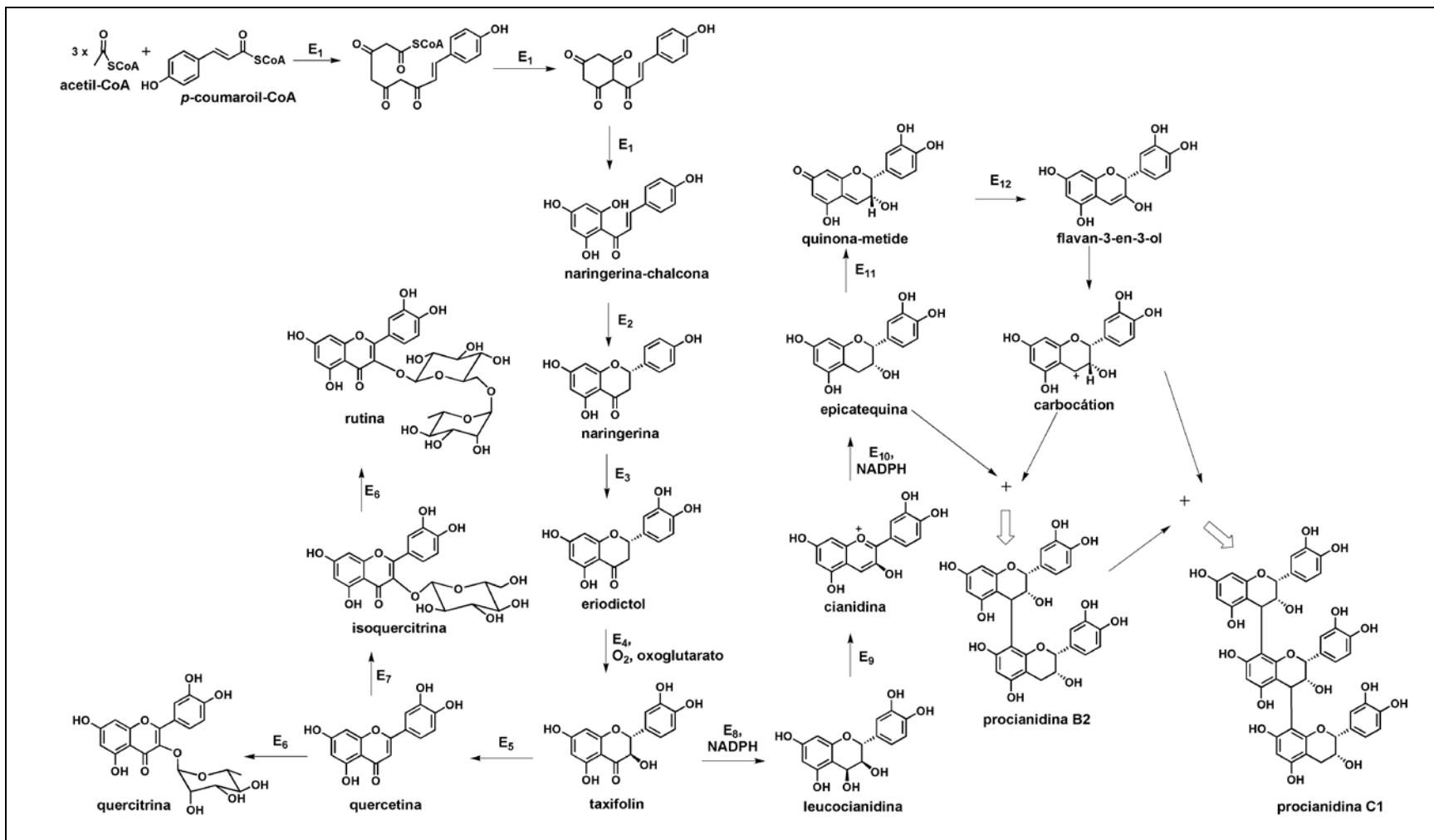
No caso da formação dos flavonoides, a enzima flavonol sintase (FLS) (E₅) é responsável pela específica oxidação de 3β-diidroflavonol (neste caso o taxifolin) em flavonol (quercetina) (MUIR et al., 2001, WINKEL-SHIRLEY, 2001, LUKAČIN et al.,

2003). Na sequencia, a quecetina é glicosilada tanto pela enzima ramnosil tranferase (E_6) originando a quercitrina, como pela glicosil tranferase (E_7) originando a isoquercitrina, que por sua vez é glicosilada pela ramnosil transferase(E_6) formando a rutina (MUIR et al., 2001)

No caso da formação dos flavan-3-ol, a enzima estereoespecífica diidroxiflavanol 4-redutase (DFR) (E_8) na presença de NADPH, formará a (2R,3S,4S)-leucocianidina, que pela ação da antocianidina sintase (ANS) (E_9) é oxidada a cianidina. Através da ação da antocianidina redutase (ASR) (E_{10}) na presença de NADPH, será formada portanto a epicatequina (HE et al., 2008). A catequina é um diasteroisômero da epicatequina e para ser formada é necessário que a enzima leucoantocianidina redutase (LAR) seja expressa para catalisar a conversão direta da leucocianidina em catequina (DIXON; XIE; SHARMA, 2005) (HE et al., 2008). Porém, o LCMS das amostras analisadas não apresentaram a catequina na composição, logo se supõe que esta enzima não seja expressada na *E. calycina*.

A formação das proantocianidinas ainda não é bem definida, mas existe uma proposta em que enzima polifenol oxidação (PPO) (E_{11}) converte a epicatequina na respectiva quinona-metide. Esta por sua vez é convertida em carbocátion via flav-3-en-ol. O ataque nucleofílico da epicatequina no carbocátion resulta na produção do dímero procianidina B2. O ataque do dímero no carbocátion resulta no trímero procianidina C1 (DIXON; XIE; SHARMA, 2005) (MARLES; RAY; GRUBER, 2003, HE et al., 2008).

Figura 99 - Proposta de rotas biosintéticas de compostos identificados nas frações acetato de etila e *n*-butanol de extratos de folhas, flores e galhos de *E. calycina*.



Nota: E₁ - naringerina chalcona sintase, E₂ - chalcona isomerase, E₃ - flavonoide 3'-hidroxilase, E₄ - flavonol 3 β -hidroxilase (FHT), E₅ - flavonol sintase (FLS), E₆ - ramosil transferase (RT), E₇ - glucosil transferase (GT), E₈ - diidroxiflavonol 4-redutase (DFR), E₉ - antocianidina sintase (ANS), E₁₀ - antocianidina redutase (ANR), E₁₁ - polifenol oxidase (PPO). Fonte: autora (baseado em Dixon, Xie e Sharma (2005), Marles, Ray e Gruber (2003), He e outros, Muir e outros (2008), Winkel e Shirley (2001), Lukacina e outros (2003))

4.2.11 Análise das atividade antioxidante e inibidora de α -amilase dos compostos isolados do extrato das folhas

Os compostos isolados foram então submetidos aos ensaios de atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, atividade inibidora de α -amilase (Tabela 55).

Tabela 55 - Análise de atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, potencial e carga por VPD, inibição de α -amilase dos compostos isolados da fração acetato de etila do extrato das folhas.

		VPD ^a	CE ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
			Carga (μC)	Potencial (mV)	DPPH
FoE98-AE-C1	Rutina	210,2 \pm 0,2 ^a	408 \pm 1 ^b	5,52 \pm 0,01	25,2 \pm 1,8
FoE98-AE-C2	Isoquercitrina	203,3 \pm 2,5 ^a	402 \pm 2 ^b	6,45 \pm 0,08 ^c	30,5 \pm 0,9 ^d
FoE98-AE-C3	Quercitrina	200,9 \pm 0,9 ^a	402 \pm 1 ^b	6,44 \pm 0,06 ^c	31,9 \pm 1,8 ^d
FoE98-AE-C4	(-)-Epicatequina	162,6 \pm 1,2	318 \pm 2	2,89 \pm 0,04	92,9 \pm 0,1
-	BHT	2,8 \pm 0,4	354 \pm 2	6,5 \pm 0,1 ^c	-
-	Acarbose	-	-	-	0,013 \pm 0,003

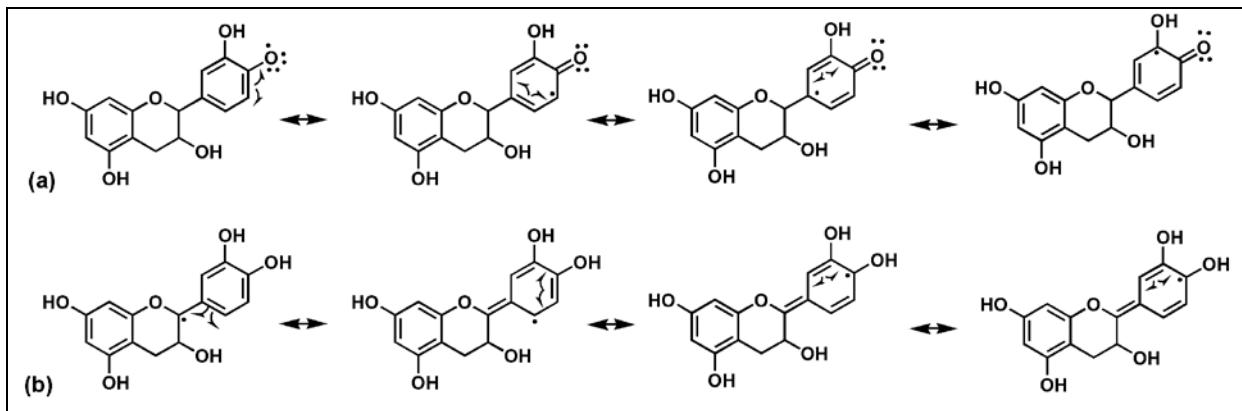
Nota: a: tampão acetato. As análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p<0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

Através destes resultados é possível observar a elevada atividade antioxidante dos compostos isolados ($\text{CE}_{50}<50 \mu\text{g mL}^{-1}$), fato que justifica os bons resultados observados para os extratos e frações das folhas, flores e galhos.

Na análise da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH, verifica-se que a (-)-epicatequina apresenta maior atividade em relação à rutina, isoquercitrina e quercitrina. Sabe-se que a presença da carbonila no carbono C4 e dupla ligação entre os carbonos C2 e C3 (como, por exemplo, o caso dos flavonoides) permite a formação de um sistema π altamente conjugado (Figura 11, p. 35), o que estabiliza os radicais formados resultando em maior atividade antioxidante. Fato que não justificaria a elevada atividade observada para a (-)-epicatequina. Entretanto, trabalhos têm demonstrado que flavonoides que apresentam glicosilação do OH no carbono C3, reduz a atividade antioxidante devido ao impedimento estérico criado pelo grupo sacarídeo (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002, LÓPEZ et al., 2003, DURAND et al., 2007, LACOPINI et al., 2008). Somado a isto, além dos hidrogênios OH responsáveis pela reação radicalar (Figura 100), flavan-3-oides, como a (-)-

epicatequina, apresenta um hidrogênio benzílico em C2 que pode ser removido com facilidade por ser estabilizado por estruturas de ressonância (Figura 100), fato que justifica a sua elevada atividade antioxidante (KONDO et al., 1999b, a).

Figura 100 - Estruturas de ressonância de radical formado em flavan-3-ol.



Fonte: autora.

Com relação à VPD, observa-se que a epicatequina apresenta menor potencial de oxidação que a rutina, isoquerçitrina e quercitrina, portanto, ela é mais facilmente oxidada, corroborando para uma melhor atividade antioxidante, fato que foi observado na análise pelo método DPPH. Com relação à densidade de carga, embora as amostras tenham sido analisadas com a mesma concentração de 1,6 mmol L⁻¹, verificou-se diferença entre elas. Isto pode ser explicado pelo coeficiente de difusão. Na equação mostrada abaixo se verifica que o coeficiente de difusão (D) é diretamente proporcional à massa molar (M) (PACHECO et al., 2013). Portanto, compostos com massas molares maiores apresentam maior coeficiente de difusão, resultando em mais compostos no eletrodo, tornando a densidade de carga maior. Por isso é observado elevada densidade de carga para a rutina.

$$D = \pi \tau_m \left[\frac{i_p}{nFAC} \left(\frac{1+\sigma}{1-\sigma} \right) \right]^2 \quad \text{Equação 12}$$

$$C = \frac{m}{Mv}$$

$$D \propto M$$

Onde i_p : corrente do pico (μA), n : número de elétrons envolvidos na reação redox, F : constante de Faraday (coulombs), A : área do eletrodo (cm^2), t_m : tempo entre a segunda e a primeira leitura de corrente (s), D : coeficiente de difusão (cm^2s^{-1}), C : concentração do analito (mmol L^{-1}), m : massa de amostra (g), M : massa molar, v : volume de amostra (mL), $\sigma = \exp(nF\Delta E / 2RT)$, ΔE = amplitude do pulso.

Na análise da inibição de α -amilase, verifica-se que os flavonoides (rutina, isoquercitrina e quercitrina) apresentam atividade superior (menor CE_{50}) que o flavan-3-ol ((-)-epicatequina). Como discutido no item 4.2.8 (p. 129), a presença da carbonila em C4 e a dupla ligação entre C2 e C3, presentes nos flavonoides, permitem estrutura de anel planar condensado com formação de um sistema π altamente conjugado, tornando a atividade inibidora de α -amilase elevada.

Portanto, a análise dos compostos isolados justifica a atividade antioxidante e inibidora da α -amilase observada no extrato e frações.

5 CONCLUSÕES

O óleo essencial das folhas da espécie *E. calycina* apresentou rendimento em níveis comparáveis com outras plantas comercialmente importantes, sendo composto predominantemente por sesquiterpenos. O fracionamento do óleo essencial permitiu a separação de sesquiterpenos oxigenados dos não oxigenados. Tanto o óleo essencial como a fração contendo apenas sesquiterpenos não oxigenados (F1), apresentaram elevada atividade antimicrobiana contra bactérias anaeróbicas gram-negativas *P. nigrescens* e *P. gingivalis*. As frações compostas basicamente por sesquiterpenos oxigenados (F3 e F4) apresentaram elevada atividade para todas as bactérias (com exceção da *A. naeslundii*). Tanto o óleo essencial como suas frações apresentaram baixa toxicidade para células HeLa, quando o crescimento dos microrganismos foi inibida a baixas concentrações.

Com relação aos extratos da espécie *E. calycina*, a análise do perfil dos espectros de UV/Vis, a prospecção fitoquímica, o elevado teor de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas indicaram que as frações acetato de etila e *n*-butanol de folhas e flores apresentaram em sua composição flavonoides do tipo flavonóis e/ou flavonas. No caso do extrato dos galhos, o baixo teor de flavonoide observado, o elevado teor de proantocianidinas e fenóis totais e a análise do perfil do espectro de UV/Vis indicaram a presença de flavan-3-óis e proantocianidinas em sua composição. O elevado teor de compostos fenólicos nos extratos das folhas, galhos e flores explicou a alta atividade antioxidante e inibidora de α -amilase. Os flavonoides tipo flavan-3-óis, que podem estar presentes nos galhos como monômeros (dando origem às proantocianidinas), podem justificar a elevada atividade inibidora da α -amilase.

A análise estatística da componente principal (PCA) diferenciou a fração acetato de etila das demais, sugerindo diferenças de composição química e quantidade de compostos entre as frações em acetato de etila e *n*-butanol, que foram as que se destacaram nas atividades analisadas.

Na fração acetato de etila das folhas foram isolados e identificados (por UV-Vis, RMN e ESI-EM/EM) os flavonoides da classe dos flavonóis rutina, isoquercitrina e quercitrina, além do flavan-3-ol (-)-epicatequina. Todos os compostos isolados

apresentaram excelente atividade antioxidante (comparável ao antioxidante sintético BHT) e excelente atividade inibidora de α -amilase ($CE_{50} < 50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Através de desreplicação utilizando CLAE-ESI-EM/EM foram identificadas as procianidinas B2 e C1 na fração acetato de etila das folhas. A composição de flavonoides de folhas e flores foi muito semelhante, variando apenas na concentração destes compostos. Na fração acetato de etila dos galhos foi identificada a epicatequina e as procianidinas B2 e C1. Isto corroborou com os resultados obtidos na prospecção fitoquímica.

Os compostos isolados foram quantificados por CLAE através de curva analítica construída com estes compostos. As folhas apresentaram elevada concentração de epicatequina e quercitrina, enquanto que as flores apresentam quercitrina e rutina em maior concentração. Somando as concentrações de compostos quantificados, verifica-se que as flores apresentaram maior concentração, o que refletiu em melhor atividade antioxidante observada nas análises. Dentre os compostos avaliados, a fração acetato de etila dos galhos apresentou apenas a epicatequina, corroborando com a análise de CLAE-ESI-EM/EM. Nas frações *n*-butanol, verificou-se a ausência de epicatequina (muito provavelmente devido a sua menor polaridade). Portanto, através da quantificação dos compostos isolados, verificou-se que para o isolamento de flavonoides a fração mais indicada é a acetato de etila das flores e folhas, enquanto que para o isolamento de flavan-3-ol seria a acetato de etila dos galhos.

Assim, o óleo essencial obtido das folhas e os extratos das folhas, flores e galhos fazem desta espécie uma fonte de produto natural promissora para o estudo de outras atividades. Aliado a isto, o elevado rendimento do óleo essencial (com elevada quantidade de sesquiterpenos) e o elevado rendimento dos extratos (com alto teor de compostos fenólicos) tornam a espécie comercialmente promissora em possíveis fármacos fitoterápicos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. ed. Carol Stream: Allured Bussiness Media, 2007. 804 p.
- ADISAKWATTANA, S.; RUENGSAMRAN, T.; KAMPA, P.; SOMPONG, W. *In vitro* inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 12, n. 110, p. 2-8, July 2012.
- AGUIAR, G. P.; CARVALHO, C. E.; DIAS, H. J.; REIS, E. B.; MARTINS, M. H. G.; WAKABAYASHI, K. A. L.; GROPP, M.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R.; CROTTI, A. E. M. Antimicrobial activity of selected essential oils against cariogenic bacteria. **Natural Product Research**, London, v. 27, n. 18, p. 1668-1672, 2013.
- AKERLOF, G. Dielectric constant of some organic solvent-water mixtures at various temperatures. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 54, n. 11, p. 4125-4139, Nov. 1932.
- AL-DABBAS, M. M.; KITAHARA, K.; SUGANUMA, T.; HASHIMOTO, F.; TADERA, K. Antioxidant and α -amylase inhibitory compounds from aerial parts of *Varthemia iphionoides* Boiss. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 70, n. 9, p. 2178-2184, Sept. 2006.
- ALICE, C. B.; VARGAS, V. M. F.; SILVA, G. A. A. B.; DE SIQUEIRA, N. C. S.; SCHAPOVAL, E. E. S.; GLEYE, J.; HENRIQUES, J. A. P.; HENRIQUES, A. T. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 35, n. 2, p. 165-171, Dec. 1991.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, out. 2010.
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, abr. 2008.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 232-240, set. 2007.
- APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIERE, J.-M. Chemical composition of the essential oils of *Eugenia hyemalis* and *Eugenia stigmatosa*. Part VI: section biflorae. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 437, Sept./ Oct. 2004.
- ARANTES, A. A.; MONTEIRO, R. A família Myrtaceae na estação ecológica do Panga. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 111-127, jul. 2002.
- ARAÚJO, R. M. M. D. Análise de componentes principais e análise de agrupamentos: aplicação em variáveis de educação e renda no Estado de Pernambuco **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 3, n. 1, p. 1-10, jan. 2010.
- ARUOMA, O. I. Free radicals, antioxidants and international nutrition. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 8, n. 1, p. 53-63, Mar. 1999.
- BALIGA, M. S.; BHAT, H. P.; BALIGA, B. R. V.; WILSON, R.; PALATTY, P. L. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): a review. **Food Research International**, Ottawa, v. 44, n. 7, p. 1776-1789, Mar. 2011.
- BALIGA, M. S.; FERNANDES, S.; THILAKCHAND, K. R.; D'SOUZA, P.; SRINATH RAO, M. Scientific validation of the antidiabetic effects of *Syzygium jambolanum* DC (black plum), a traditional medicinal

plant of India. **THE JOURNAL OF ALTERNATIVE AND COMPLEMENTARY MEDICINE**, New York, v. 19, n. 3, p. 191-197, Mar. 2013.

BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTE, A. D.; PAULA, V. F. D.; ISMAIL, F. M. D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* raddi. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, out. 2007.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, jan./ fev. 2006.

BARROS, F. M. C. D.; ZAMBARDA, E. D. O.; HEINZMANN, B. M.; MALLMANN, C. A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 861-867, mar. 2009.

BENFATTI, C. S.; CORDOVA, S. M. D.; GUEDES, A.; MAGINA, M. D. A.; CORDOVA, C. M. M. D. Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de molicutes. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Amazônia, v. 1, n. 2, p. 33-39, jun. 2010.

BLASCO, A. J.; GONZÁLEZ CREVILLÉN, A.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity *in vitro* systems. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 19, n. 22, p. 2275-2286, Nov. 2007.

BOEGER, M. R. T.; POULSON, M. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 329-338, jun./ abr. 2006.

BOHM, B. A. **Introduction to flavonoids**. 1. ed. Amsterdam: Hardwood Academic Publishers, 1998. 496 p.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 349-356, Mar. 2007.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J.; BRANDT, P. A. V. D. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 38, n. 7, p. 599-605, July 2000.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 150, de 17 de junho de 2003**. Brasília, DF, 2003. 176 p.

BULLOW, J. F. W.; CARMONA, R.; PARENTE, T. V. Armazenamento e tratamento de sementes de pitanga-vermelha-do-cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 961-970, jun. 1994.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. 1. ed. Porto Alegre: Aramed, 2003. 255 p.

CARDOSO, G. L.; LOMÔNACO, C. Variações fenotípicas e potencial plástico de *Eugenia calycina* Cambess. (Myrtaceae) em uma área de transição cerrado-vereda. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 131-140, mar. 2003.

CARRIJO, M. F.; SOUSA, R. M. F.; MORAIS, S. A. L.; GUZMAN, V. B.; NAPOLITANO, D. R.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; OLIVEIRA, A. D. Determinação da atividade antioxidante, fenóis totais e proantocianidinas de extratos de folhas e flores da *Eugenia calycina*. In: ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 25., 2011, Lavras, MG.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 1, p. 50-62, Jan. 2006.

CARVALHO, T. C.; SIMÃO, M. R.; AMBRÓSIO, S. R.; FURTADO, N. A. J. C.; VENEZIANI, R. C. S.; HELENO, V. C. G.; COSTA, F. B. D.; GOMES, B. P. F. A.; SOUZA, M. G. M.; REIS, E. B. D.; MARTINS, C. H. G. Antimicrobial activity of diterpenes from *Viguiera arenaria* against endodontic bacteria. **Molecules**, Basel, v. 16, n. 1, p. 543-551, Jan. 2011.

CASE, R. J.; FRANZBLAU, S. G.; WANG, Y.; CHO, S. H.; SOEJARTO, D. D.; PAULI, G. F. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 106, n. 1, p. 82-89, June 2006.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2. ed. Viçosa: Gráfica Suprema e Editora, 2004. 113 p.

CASTRO, R. D. D.; FREIRES, I. D. A.; FERREIRA, D. A. D. H.; JOVITO, V. D. C.; PAULO, M. D. Q. Atividade antibacteriana *in vitro* de produtos naturais sobre *Lactobacillus casei*. **International Journal of Dentistry**, Recife, v. 9, n. 2, p. 74-77, abr./ jun. 2010.

CHA, J. D. Chemical composition and antibacterial activity against oral bacteria by the essential oil of *Artemisia iwayomogi*. **Journal of Bacteriology and Virology**, Seoul, v. 37, n. 3, p. 129-136, Sept. 2007.

CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; CUNHA, L. C. S.; ROCHA, E. O.; AQUINO, F. J. T.; SOUZA, M. G. M.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of *Campomanesia pubescens* O. Berg, native of Brazilian Cerrado. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 30, n. 9, p. 1843-1848, Dec. 2011.

CHARLES, C. A.; MCGUIRE, J. A.; SHARMA, N. C.; QAQISH, J. Comparative efficacy of two daily use mouthrinses: randomized clinical trial using an experimental gingivitis model. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 25, n., p. 338-344, July/ Aug. 2011.

CLSI Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: CLSI document M11-A8. 8. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012a. 39 p.

CLSI Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: CLSI document M7-A9. 9. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012b. 63 p.

COLBY, S. M.; CROCK, J.; DOWDLE-RIZZO, B.; LEMAUX, P. G.; CROTEAU, R. Germacrene C synthase from *Lycopersicon esculentum* cv. VFNT Cherry tomato: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the multiple product sesquiterpene cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. 5, p. 2216-2221, Mar. 1998.

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S. D.; CORRÊA, M. A.; PIZZOLITTO, A. C.; BAUAB, T. M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 395-404, jul./ set. 2006.

COSTA, D. A. D.; SILVA, D. A. E.; CAVALCANTI, A. C.; MEDEIROS, M. A. A. D.; LIMA, J. T. D.; CAVALCANTE, J. M. S.; SILVA, B. A. D.; AGRA, M. D. F.; SOUZA, M. D. F. V. D. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-O-b-D-(6"-E- β -coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 901-903, July/ Aug. 2007.

CRAVEIRO, A. A.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. Essential oil of *Eugenia jambolana*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 46, n. 4, p. 591-592, July 1983.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products: secondary metabolites. In: BUCHANAN, B. et al. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 24, p. 1250-1318.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. 1. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 576 p.

CRUZ, A. V. D. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal das espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 47-52, ago./dez. 2004.

CUNHA, L. C. S.; MORAIS, S. A. L.; MARTINS, C. H. G.; MARTINS, M. M.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; OLIVEIRA, A.; MORAES, T. S.; MACHADO, F. C.; SILVA, C. V.; NASCIMENTO, E. A. Chemical composition, cytotoxic and antimicrobial activity of essential oils from *Cassia bakeriana* Craib. against aerobic and anaerobic oral pathogens. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 4, p. 4588-4598, Apr. 2013.

DA SILVA, A. L. G.; PINHEIRO, M. C. B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 235-247, jan./mar. 2007.

DATA, N. S. R. NIST Standard Reference Data. [2014]. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 17 march 2014.

DE SOUZA, P. M.; DE SALES, P. M.; SIMEONI, L. A.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; DE OLIVEIRA MAGALHÃES, P. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 78, n. 4, p. 393-399, Mar. 2012.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, London, v. 70, n. 15-16, p. 1621-1637, Oct.-Nov. 2009.

DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**, Chichester: John Wiley & Sons, LTD, 2009a. cap. 4, p. 121.

DEWICK, P. M. The mevalonate and methylerythriol phosphate pathways: terpenoids and steroids. In: DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**, Chichester: John Wiley & Sons, LTD, 2009b. cap. 6, p. 507.

DIEHL, L. Portal Endocrino. [2013]. Disponível em: <http://www.portalendocrino.com.br/diabetes_medicamentos.shtml>. Acesso em: 19 set. 2014.

DIPLOCK, A. T.; CHARLEUX, J. L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F. J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VIÑA-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxidative. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 80, n. S1, p. S77-S112, Aug. 1998.

DIXON, R. A.; XIE, D.-Y.; SHARMA, S. B. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? **New Phytologist**, Oxford, v. 165, n. 1, p. 9-28, Jan. 2005.

DOMON, B.; COSTELLO, C. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glycoconjugate Journal**, Lund, v. 5, n. 4, p. 397-409, Jan. 1988.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, Feb. 2000.

DORN, J. M.; GENCO, R. J.; GROSSI, S. G.; FALKNER, K. L.; HOVEY, K. M.; IACOVIELLO, L.; TREVISAN, M. Periodontal disease and recurrent cardiovascular events in survivors of myocardial infarction (MI): the western New York acute MI study. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 81, n. 4, p. 502-511, Apr. 2010.

DUBBER, M. J.; SEWRAM, V.; MSHICILELI, N.; SHEPHARD, G. S.; KANFER, I. The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in *Ginkgo biloba* oral dosage forms by high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 723-731, Apr. 2005.

DURAND, A.-C.; FARCE, A.; CARATO, P.; DILLY, S.; YOUS, S.; BERTHELOT, P.; CHAVATTE, P. Quantitative structure-activity relationships studies of antioxidant hexahydropyridoindoles and flavonoid derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, London, v. 22, n. 5, p. 556-562, Oct. 2007.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X.-D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, Barking, v. 84, n. 1, p. 23-28, May 2004.

EISENREICH, W.; BACHER, A.; ARIGONI, D.; ROHDICH, F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, Basel, v. 61, n. 12, p. 1401-1426, Jun. 2004.

FÁBIÁN, T. K.; FEJÉRDY, P.; CSERMELY, P.; BEGLEY, T. P. Chemical biology of disease: saliva in health and disease. In: BEGLEY, T. **Wiley Encyclopedia of Chemical Biology**, Chichester: John Wiley & Sons, Inc., 2007. cap. 3, p. 1-9.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. v.4.2.3 p.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. J. C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, New York, v. 23, n. 4, p. 213-226, July 2008.

FIGUEIRO, E. D. O.; NASCIMENTO DA SILVA, L. C.; DE MELO, C. M. L.; NEVES, J. K. D. A. L.; DA SILVA, N. H.; PEREIRA, V. R. A.; CORREIA, M. T. D. S. Evaluation of antioxidant, immunomodulatory, and cytotoxic action of fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: correlation with polyphenol and flavanoid content. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2013, n. 0, p. 1-7, Sept. 2013.

FILOCHE, S. K.; SOMA, K.; SISSONS, C. H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 20, n. 4, p. 221-225, Aug. 2005.

FOO, A. Y.; BAIS, R. Amylase measurement with 2-chloro-4-nitrophenyl maltotrioside as substrate. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 272, n. 2, p. 137-147, Apr. 1998.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH* radical in alcoholic solutions. **The Journal of Organic Chemistry**, Columbus, v. 69, n. 7, p. 2309-2314, Apr. 2004.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 269, n. 2, p. 397-412, Jan. 2002.

FRIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 893, n. 1, p. 13-18, Nov. 1999.

FURTADO, F. B.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; MARTINS, C. D. M.; MORAIS, S. A. L.; CHANG, R.; CUNHA, L. C. S.; LEANDRO, L. F.; MARTINS, C. H. G.; MARTINS, M. M.; SILVA, C. V.; MACHADO, F. C.; OLIVEIRA, A. Seasonal variation of the chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of the essential oils from *Inga laurina* (Sw.) Willd. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 4, p. 4560-4577, Apr. 2014.

GALENO, D.; CARVALHO, R.; DE ARAÚJO BOLETI, A.; LIMA, A.; DE ALMEIDA, P.; PACHECO, C.; DE SOUZA, T.; LIMA, E. Extract from *Eugenia punicifolia* is an antioxidant and inhibits enzymes

related to metabolic syndrome. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 172, n. 1, p. 311-324, Jan. 2014.

GAVRILAS, S.; DUMITRU, F.; STANESCU, M. D. Commercial laccase oxidation of phenolic compounds. **UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science**, [S.I.], v. 74, n. 4, p. 3-10, 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, out. 2007.

GOPINATH, S. M.; PRIYANKA, P.; DAYANANDA, K. S.; REDDY, J. M.; G.M, A. P.; NAIR, D. V. *In vitro* inhibitory effect of polyherbal formulation on alpha-amylase. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, v. 2, n. 9, p. 4556-4566, Sept. 2013.

GOUVEIA, N. M.; ALVES, F. V.; FURTADO, F. B.; SCHERER, D. L.; MUNDIM, A. V.; ESPINDOLA, F. S. An *in vitro* and *in vivo* study of the α -amylase activity of phaseolamin. **Journal of Medicinal Food**, New York, v. 17, n. 8, p. 915-920, Mar. 2014.

GU, J.-Q.; PARK, E. J.; LUYENGI, L.; HAWTHORNE, M. E.; MEHTA, R. G.; FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventive activity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 58, n. 1, p. 121-127, Sept. 2001.

GULBOSKI, R.; PEREIRA, C. M. Electroanalytical techniques and instrumentation in food analysis. In: VINTLE, S. **Handbook of Food Analysis Instruments**, CRC Press, 2008. cap. 17, p. 379-402.

GÜLÇİN, I.; SAT, I. G.; BEYDEMİR, S.; ELMASTAS, M.; KÜFREVOGLU, O. I. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chemistry**, Barking, v. 87, n. 3, p. 393-400, Sept. 2004.

HAFFAJEE, A. D.; YASKELL, T.; SOCRANSKY, S. S. Antimicrobial effectiveness of an herbal mouthrinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouthrinse. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 139, n. 5, p. 606-611, May 2008.

HAMED, A. I.; AL-AYED, A. S.; MOLDOCH, J.; PIACENTE, S.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Profiles analysis of proanthocyanidins in the argun nut (*Medemia argun*: an ancient Egyptian palm) by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 49, n. 4, p. 306-315, Apr. 2014.

HE, F.; PAN, Q.-H.; SHI, Y.; DUAN, C.-Q. Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. **Molecules**, Basel, v. 13, n. 10, p. 2674-2703, Oct. 2008.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 13, n. 10, p. 572-584, Oct. 2002.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, out. 2002.

HUBINGER, S. Z.; SALGADO, H. R. N.; MOREIRA, R. R. D. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 3, p. 690-696, jul./ set. 2009.

HUSSEIN, S. A. M.; HASHEM, A. N. M.; SELIEM, M. A.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M. A. M. Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. **Phytochemistry**, London, v. 64, n. 4, p. 883-889, Oct. 2003.

INFANTE, J. **Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca, semente e folha de espécies frutíferas nativas do Brasil**. 2013. 113p. f. Mestrado (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. **Food Chemistry**, Barking, v. 73, n. 3, p. 285-290, May 2001.

JOHN, K. M. M.; AYYANAR, M.; JEEVA, S.; SURESH, M.; ENKHTAIVAN, G.; KIM, D. H. Metabolic variations, antioxidant potential, and antiviral activity of different extracts of *Eugenia singampattiana* (an endangered medicinal plant used by Kani Tribals, Tamil Nadu, India) leaf. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, n. 726145, p. 1-11, July 2014.

JOSÉ-CHAGAS, F. N.; FILHO, M. D. M. V.; PESSÔA, L. M.; COSTA, S. S. Aspectos químicos e ecológicos de espécimes masculinos e femininos de *Cecropia Loefl.* (Urticaceae). **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 2, p. 432-452, mar./ abr. 2014.

JOSEPH, B.; PRIYA, R. M. *In vitro* antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf essential oil and extracts using agar well diffusion method. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, [S.I.], v. 2, n. 3, p. 28-32, Aug./ Oct. 2010.

JUNG, E. K. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Chrysanthemum indicum* against oral bacteria. **Journal of Bacteriology and Virology**, Seoul, v. 39, n. 2, p. 61-69, June 2009.

JUNIOR, A. R. D. C.; GOMES, G. A.; FERREIRA, R. O.; CARVALHO, M. G. D. Constituintes químicos e atividade de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 477-482, maio/ jun. 2014.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 10, n. 10, p. 813-829, May 2003.

KANDRA, L. α -Amylases of medical and industrial importance. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 666-667, n. 0, p. 487-498, Dec. 2003.

KANDRA, L.; GYÉMÁNT, G.; ZAJÁCZ, Á.; BATTA, G. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 319, n. 4, p. 1265-1271, July 2004.

KARTNIG, T.; GÖBEL, I. Effect of fluorescence intensifiers on the fluorodensitometric determination of flavones and flavonols after detection with diphenylboric acid 2-aminoethyl ester. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 740, n. 1, p. 99-107, July 1996.

KATO, E.; NAKAGOMI, R.; GUNAWAN-PUTERI, M. D. P. T.; KAWABATA, J. Identification of hydroxychavicol and its dimers, the lipase inhibitors contained in the Indonesian spice, *Eugenia polyantha*. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1239-1242, 2013.

KELECOM, A.; ROCHA, M. A.; MAJDALANI, E. C.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B. Novas atividades biológicas em antigos metabólitos: ácido oleanólico e eugenol de *Eugenia caryophyllata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 12, n. 1, p. 70-71, mar. 2002.

KONDO, K.; KURIHARA, M.; MIYATA, N.; SUZUKI, T.; TOYODA, M. Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 362, n. 1, p. 79-86, Feb. 1999a.

KONDO, K.; KURIHARA, M.; MIYATA, N.; SUZUKI, T.; TOYODA, M. Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxyl radicals and formation of superoxide during the inhibitory action. **Free Radical Biology and Medicine**, Tarrytown, v. 27, n. 7-8, p. 855-863, Oct. 1999b.

KUMAMOTO, M.; SONDA, T.; NAGAYAMA, K.; TABATA, M. Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, n. 1, p. 126-132, Jan. 2001.

KUMAR, P.; MEHTA, M.; SATIJA, S.; GARG, M. Enzymatic *in vitro* anti-diabetic activity of few traditional Indian medicinal plants. **Journal of Biological Sciences**, [S.I.], v. 13, n. 6, p. 540-544, 2013b.

KUMAR, P. S. Oral microbiota and systemic disease. **Anaerobe**, London, v. 24, n. 0, p. 90-93, Oct. 2013a.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2013, n. 0, p. 1-16, Dec. 2013.

KUNYANGA, C. N.; IMUNGI, J. K.; OKOTH, M. W.; BIESALSKI, H. K.; VADIVEL, V. Total phenolic content, antioxidant and antidiabetic properties of methanolic extract of raw and traditionally processed Kenyan indigenous food ingredients. **LWT - Food Science and Technology**, Zürich, v. 45, n. 2, p. 269-276, Mar. 2012.

KURIKI, T.; IMANAKA, T. The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 87, n. 5, p. 557-565, Aug. 1999.

KUSANO, R.; ANDOU, H.; FUJIEDA, M.; TANAKA, T.; MATSUO, Y.; KOUNO, I. Polymer-like polyphenols of black tea and their lipase and amylase inhibitory activities. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 56, n. 3, p. 266-272, Mar. 2008.

LACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 21, n. 8, p. 589-598, Dec. 2008.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 244-282, Sept. 2007.

LEE, C. W.; HAN, J. S. Hypoglycemic effect of *Sargassum ringgoldianum* extract in STZ-induced diabetic mice. **Preventive nutrition and food science**, Pusan, v. 17, n. 1, p. 8-13, Mar. 2012.

LEE, S.-H.; PARK, M.-H.; HAN, J.-S.; JEONG, Y.; KIM, M.; JEON, Y.-J. Bioactive compounds extracted from Gamtae (*Ecklonia cava*) by using enzymatic hydrolysis, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 21, n. 4, p. 1149-1155, Aug. 2012.

LELONO, R. A. A.; TACHIBANA, S. Bioassay-guided isolation and identification of antioxidative compounds from the bark of *Eugenia polyantha*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 16, n. 16, p. 812-818, Aug. 2013.

LIMA, A. P.; STEFANO, J. S.; MONTES, R. H. O.; CUNHA, R. R.; JUVENCIO, L. A.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. Electrochemical oxidation of chlorhexidine and its amperometric determination by flow-injection analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 448-452, Mar. 2014.

LIMA, F. O.; BEZERRA, A. S. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 111-124, set. 2012.

LIMA, I. D. O.; OLIVEIRA, R. D. A. G.; LIMA, E. D. O.; FARIA, N. M. P.; SOUZA, E. L. D. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 197-201, abr./jun. 2006.

LITWINIENKO, G.; INGOLD, K. U. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. **The Journal of Organic Chemistry**, Columbus, v. 69, n. 18, p. 5888-5896, Sept. 2004.

- LITWINIENKO, G.; INGOLD, K. U. Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 40, n. 3, p. 222-230, Mar. 2007.
- LIU, Z. Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. **Chemical Reviews**, Washington, v. 110, n. 10, p. 5675-5691, July 2010.
- LO PIPARO, E.; SCHEIB, H.; FREI, N.; WILLIAMSON, G.; GRIGOROV, M.; CHOU, C. J. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 51, n. 12, p. 3555-3561, June 2008.
- LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Bioessíntese de produtos naturais**. 1. ed. Lisboa: IST Press, 2007. 272 p.
- LOCHER, C. P.; BURCH, M. T.; MOWER, H. F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; BERGHE, D. A. V.; VLIETINCK, A. J. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 49, n. 1, p. 23-32, Nov. 1995.
- LOPES, G. C.; ROCHA, J. C. B.; ALMEIDA, G. C. D.; MELLO, J. C. P. D. Condensed Tannins from the bark of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 1103-1109, June 2009.
- LÓPEZ, M.; MARTÍNEZ, F.; DEL VALLE, C.; FERRIT, M.; LUQUE, R. Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method. **Talanta**, Amsterdam, v. 60, n. 2-3, p. 609-616, Jun. 2003.
- LOUREIRO, A. P. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 777-793, set./ out. 2002.
- LUKAČIN, R.; WELLMANN, F.; BRITSCH, L.; MARTENS, S.; MATERN, U. Flavonol synthase from *Citrus unshiu* is a bifunctional dioxygenase. **Phytochemistry**, London, v. 62, n. 3, p. 287-292, Feb. 2003.
- MA, Y. L.; LI, Q. M.; VAN DEN HEUVEL, H.; CLAEYS, M. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S.I.], v. 11, n. 12, p. 1357-1364, Dec. 1997.
- MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 613, n. 1, p. 1-19, Apr. 2008.
- MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; DALMARCO, J. B.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 1184-1188, maio 2012.
- MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. L.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 63, n. 3, p. 345-350, July 2009.
- MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 46, n. 0, p. 3-9, jul. 1998.
- MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. 1. ed. London: Academic Press, 1982. 113 p.
- MARLES, M. A. S.; RAY, H.; GRUBER, M. Y. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. **Phytochemistry**, London, v. 64, n. 2, p. 367-383, Sep. 2003.

MARSARO JÚNIOR, A. L.; LAZZARI, S. M. N.; FIGUEIRA, E. L. Z.; HIROOKA, E. Y. Inibidores de amilase em híbridos de milho como fator de resistência a *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 433-450, maio/ Jun. 2005.

MARSHALL, J. J.; LAUDA, C. M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **The Journal of the Biological Chemistry**, Baltimore, v. 250, n. 20, p. 8030-8037, Oct. 1975.

MARTINEZ-CORREA, H. A.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L.; PEIXOTO, C. A.; OLIVEIRA, A. L.; CABRAL, F. A. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, Cincinnati, v. 55, n. 3, p. 998-1006, Jan. 2011.

MARTINS, C. M. **Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (pau-santo) do Cerrado**. 2012. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MARTINS, H. F. P.; LEAL, J. P.; FERNANDEZ, M. T.; LOPES, V. H. C.; CORDEIRO, M. N. D. S. Toward the prediction of the activity of antioxidants: experimental and theoretical study of the gas-phase acidities of flavonoids. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 15, n. 6, p. 848-861, Jun. 2004.

MARY JELASTIN KALA, S.; TRESINA, P. S.; MOHAN, V. R. Antioxidant, antihyperlipidaemic and antidiabetic activity of *Eugenia singampattiana* Bedd leaves in alloxan induced diabetic rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Madhya Pradesh, v. 4, n. 3, p. 412-416, Mar. 2012.

MELO, R. M.; CORRÊA, V. F. S.; AMORIM, A. C. L.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) leaf essential oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 179-183, July 2007.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. 1. ed. Oxford: Clarendon Press, 1979. 330 p.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 316-320, out./ dez. 2005.

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, G. S.; CHANG, R.; SANTOS, N. C.; ROSA, G. M. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. S, p. 198-207, dez. 2008.

MORAIS, S. M.; LIMA, K. S. B.; SIQUEIRA, S. M. C.; CAVALCANTI, E. S. B.; SOUZA, M. S. T.; MENEZES, J. E. S. A.; TREVISAN, M. T. S. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 575-582, mar. 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983.

MUIR, S. R.; COLLINS, G. J.; ROBINSON, S.; HUGHES, S.; BOVY, A.; RIC DE VOS, C. H.; VAN TUNEN, A. J.; VERHOEYEN, M. E. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. **Nat Biotech**, New York, v. 19, n. 5, p. 470-474, May 2001.

MÜLLER DA SILVA, P. H.; BRITO, J. O.; DA SILVA JR, F. G. Potential of eleven *Eucalyptus* species for the production of essential oils. **Scientia Agricola**, Piracicaba:São Paulo, v. 63, n. 1, p. 85-89, Jan. 2006.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases: an overview. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 60, n. 2, p. 163-173, May 2005.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 6772, p. 853-858, Feb. 2000.

NASCIMENTO, P. F. C.; ALVIANO, W. S.; NASCIMENTO, A. L. C.; SANTOS, P. O.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; DE JESUS, R. A.; AZEVEDO, V. G.; ALVIANO, D. S.; BOLOGNESE, A. M.; TRINDADE, R. C. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. **Oral Diseases**, Copenhagen, v. 14, n. 6, p. 485-489, Sept. 2008.

NERI-NUMA, I. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; MORALES, J. P.; MALTA, L. G.; MURAMOTO, M. T.; FERREIRA, J. E. M.; DE CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, Ottawa, v. 50, n. 1, p. 70-76, Jan. 2013.

NETO, G. G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, [S.I.], v. 17, n. 4, p. 561-584, out./dez. 2003.

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

NGAKI, M. N.; LOUIE, G. V.; PHILIPPE, R. N.; MANNING, G.; POJER, F.; BOWMAN, M. E.; LI, L.; LARSEN, E.; WURTELE, E. S.; NOEL, J. P. Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis. **Nature**, London, v. 485, n. 7399, p. 530-533, May 2012.

NIASSY, B.; UM, B.-H.; LOBSTEIN, A.; WENIGER, B.; KONÉ, M.; ANTON, R. Flavonoïdes de *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis*. **Comptes Rendus Chimie**, Paris, v. 7, n. 10-11, p. 993-996, oct./nov. 2004.

NISHA, K.; DARSHANA, M.; MADHU, G.; BHUPENDRA, M. K. GC-MS analysis and anti-microbial activity of *Psidium guajava* (leaves) grown in Malva region of India. **International Journal of Drug Development and Research**, Ghaziabad, v. 3, n. 4, p. 237-245, Oct. 2011.

NWOSU, F.; MORRIS, J.; LUND, V. A.; STEWART, D.; ROSS, H. A.; MCDOUGALL, G. J. Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. **Food Chemistry**, Barking, v. 126, n. 3, p. 1006-1012, June 2011.

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, ago. 2009.

OLIVEIRA, A. L.; DESTANDAU, E.; FOUGÈRE, L.; LAFOSSE, M. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, Barking, v. 145, n. 0, p. 522-529, Feb. 2014.

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

OLIVEIRA, F. Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 466-476, jul./set. 2007.

OMAR, R.; LI, L.; YUAN, T.; SEERAM, N. P. α -Glucosidase inhibitory hydrolyzable tannins from *Eugenia jambolana* seeds. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 75, n. 8, p. 1505-1509, Aug. 2012.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 301-307, abr./ jun. 2008.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 4, p. 516-537, ago. 2013.

PALAZZO, M. C.; WRIGHT, H. L.; AGIUS, B. R.; WRIGHT, B. S.; MORIARITY, D. M.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical compositions and biological activities of leaf essential oils of six species of annonaceae from Monteverde, Costa Rica. **Records of Natural Products**, Turkey, v. 3, n. 3, p. 153-160, June 2009.

PEKIĆ, B.; KOVAC, V.; ALONSO, E.; REVILLA, E. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. **Food Chemistry**, Barking, v. 61, n. 1-2, p. 201-206, Jan. 1998.

PÉREZ, J. A. M.; AGUILAR, T. A. F. Chemistry of natural antioxidants and studies performed with different plants collected in Mexico. In: MORALES-GONZÁLEZ, J. A. **Oxidative stress and chronic degenerative diseases: a role for antioxidants**, Rijeka: Intech, 2013. cap. 3, p. 59-85.

PETERSEN, P. E. Challenges to improvement of oral health in the 21st century: the approach of the WHO global oral health programme. **International Dental Journal**, Chichester, v. 54, n. 6 SUPPL. 1, p. 329-343, Dec. 2004.

PETROLINI, F. V. B.; LUCARINI, R.; SOUZA, M. G. M.; PIRES, R. H.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 829-834, Dec. 2013.

PICKEL, B.; DREW, D. P.; MANCZAK, T.; WEITZEL, C.; SIMONSEN, H. T.; RO, D.-K. Identification and characterization of a kunzeaoi synthase from *Thapsia garganica*: implications for the biosynthesis of the pharmaceutical thapsigargin. **The Biochemical Journal**, London, v. 448, n. 2, p. 261-271, Dec. 2012.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, Berlin, v. 30, n. 4, p. 277-290, Apr. 1995.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, May 2005.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, Milano, v. 82, n. 4, p. 513-523, June 2011.

QUEIROZ, C. R. A. D. A.; MORAIS, S. A. L. D.; NASCIMENTO, E. A. D. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 493-497, ago. 2002.

RAHMAN, A.; SULTANA SHANTA, Z.; RASHID, M. A.; PARVIN, T.; AFRIN, S.; KHODEZA KHATUN, M.; SATTAR, M. A. *In vitro* antibacterial properties of essential oil and organic extracts of *Premna integrifolia* Linn. **Arabian Journal of Chemistry**, Riade, v. xx, n. 0, p. xx-xx, June 2011.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n., p. 755-760, dez. 2006.

- RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food oxidants to human health. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 6, n. 3, p. 75-82, Mar. 1995.
- RAMFUL, D.; AUMJAUD, B.; NEERGHEEN, V. S.; SOOBRATTEE, M. A.; GOOGOLYE, K.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract in vitro and in model emulsion systems. **Food Research International**, Ottawa, v. 44, n. 5, p. 1190-1196, June 2011.
- RAMIREZ, M. R.; SCHNORR, C. E.; FEISTAUER, L. B.; APEL, M.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. F.; ZUANAZZI, J. A. S. Evaluation of the polyphenolic content, anti-inflammatory and antioxidant activities of total extract from *Eugenia pyriformes* Cambess (uvaia) fruits. **Journal of Food Biochemistry**, Hoboken, v. 36, n. 4, p. 405-412, Aug. 2012.
- REGASIN, L. O.; LOPES, A.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C.; MARI, D. A.; BAREIO, E. J.; BOLZANI, V. S. Antiproliferative effect of *Pterogyne nitens* on melanoma cells. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, Araraquara, v. 28, n. 3, p. 335-340, 2007.
- REVILLA, J. **Plantas úteis da bacia amazônica**. ed. Rio de Janeiro: Inpa, 2002. 858 p.
- REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, Manoa, v. 3, n. 1, p. 25-35, 2005.
- REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLYA, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, Barking, v. 109, n. 4, p. 883-890, Aug. 2008.
- RILEY, C. M.; ROSANSKE, T. W. **Development and Validation of Analytical Methods**. 1. ed. Oxford: Pergamon, 1996. p.
- RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, Aug. 2005.
- ROBYT, J. F.; ACKERMAN, R. J.; KENG, J. G. Reducing value methods for maltodextrins: II. Automated methods and chain-length independence of alkaline ferricyanide. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 45, n. 2, p. 517-524, Feb. 1972.
- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, jan./ mar. 2007.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Oxford, v. 92, n. 2, p. 235-254, Feb. 2005.
- ROWELL, R. M.; PETTERSEN, R.; HAN, J. S.; TSHABALALA, M. A. Cell wall chemistry. In: ROWELL, R. M. **Handbook of wood chemistry and wood composites**, New York: Taylor & Francis Group, 2005. cap. 3, p. 33-74.
- SAHA, S.; SUBRAHMANYAM, E. V. S.; KODANGALA, C.; MANDAL, S. C.; SHASTRY, S. C. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and fractions of *Eugenia jambolana* root bark and isolation of phytoconstituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 23, n. 4, p. 651-661, Aug. 2013.
- SALES, P. M.; SOUZA, P. M.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D. α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, Edmonton, v. 15, n. 1, p. 141-183, Jan. 2012.
- SANTOS, A. K. L.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; CANSANÇÃO, I. F.; SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; COUTINHO, H. D. M. Antioxidant activity of five Brazilian plants used as traditional medicines and food in Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, Mumbai v. 6, n. 24, p. 335-338, Oct. 2010.

SANTOS, S. X. D.; MAZO, L. H.; CAVALHEIRO, É. T. G. The use of a graphite-silicone rubber composite electrode in the determination of rutin in pharmaceutical formulation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 19, n. 8, p. 1600-1606, Oct. 2008.

SANTOS, T. G.; DOGNINI, J.; BEGNINI, I. M.; REBELO, R. A.; VERDI, M.; GASPER, A. L. D.; DALMARCO, E. M. Chemical characterization of essential oils from *Drimys angustifolia* Miers (Winteraceae) and antibacterial activity of their major compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 164-170, Jan. 2013.

SASAKI, Y. F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; OHSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TANIGUCHI, K.; TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 519, n. 1-2, p. 103-119, Aug. 2002.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, May 2001.

SEMWAL, S.; SHARMA, R. K.; BAMOLA, A.; PUNDEER, G.; RAWAT, U. Anthraquinone glucosides from aerial parts of *Polygonum macrophyllum* D. Don. **Asian journal of traditional medicines**, Hong Kong, v. 5, n. 6, p. 219-225, Dec. 2010.

SEPTÍMIO, L. R. **A fitoterapia baseada em ervas medicinais do Cerrado**. 1. ed. Brasília: Secretaria de Intercâmbio e Projetos Especiais do Ministério da Cultura, 1994. 103 p.

SHAHAT, A. A. Procyanidins from *Adansonia digitata*. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 44, n. 6, p. 445-450, Jan. 2006.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. G.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, [S.I.], v. 3, n. 16, p. 38-43, set./ out. 2000.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 91, n. S3, p. 31-38, Sept. 1991.

SILVA, C. J.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; MONTANARI, R. M.; PINHEIRO, A. L.; DIAS, I.; ANDRADE, N. J. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of Myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 104-108, Nov. 2010.

SILVA, H. H. G. D.; SILVA, I. G. D.; SANTOS, R. M. G. D.; RODRIGUES FILHO, E.; ELIAS, C. N. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, n. 5, p. 396-399, set./ out. 2004.

SILVA, J. B. P. D.; MALVESTITI, I.; HALLWASS, F.; RAMOS, M. N.; LEITE, L. F. C. D. C.; BARREIRO, E. J. Aplicação de análise de componentes principais para verificação de atribuições de sinais nos espetros de RMN 1H: o caso dos 3-aryl (1,2,4)-oxadiazol-5-carboidrazida benzilidenos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 492-496, maio/ jun. 2005.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. D. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 21-32, abr. 1999.

SILVA, S. M. M. D. **Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma cerrado**. 2013. 113 f. Mestrado (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SIMIRGIOTIS, M. J.; ADACHI, S.; TO, S.; YANG, H.; REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; GIL, R. R.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). **Food Chemistry**, Barking, v. 107, n. 2, p. 813-819, Mar. 2008.

SISA, M.; BONNET, S. L.; FERREIRA, D.; WESTHUIZEN, J. H. V. D. Photochemistry of flavonoids. **Molecules and Cells**, Basel, v. 15, n. 8, p. 5196-245, Aug. 2010.

- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, jan. 2002.
- SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; M. SOUZA; MAZINE, F.; LUCAS, E. Lista de Espécies da Flora do Brasil. [2014]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10338>>. Acesso em: 10 jan. 2015.
- SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 327, n. 7, p. 649-662, July 2004.
- SOUZA, C. M. D. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. D.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. D. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, mar./ abr. 2007.
- SOUZA, P. M. D. **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado**. 2011. 90 f. (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília,
- SRITULARAK, B.; TANTITUVANONT, A.; CHANVORACHOTE, P.; MEKSAWAN, K.; MIYAMOTO, T.; KOHNO, Y.; LIKHITWITAYAWUID, K. Flavonoids with free radical scavenging activity and nitric oxide inhibitory effect from the stem bark of *Artocarpus gomezianus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, [S.I.], v. 4, n. 5, p. 387-392, Mar. 2010.
- STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry and Biodiversity**, Zurich, v. 8, n. 1, p. 73-94, Jan. 2011.
- STEFANOVIC, O.; RADOJEVIC, I.; VASIC, S.; COMIC, L. **Antibacterial activity of naturally occurring compounds from selected plants**:Antimicrobial Agents. ed. Rijeka: InTech, 2012. 1-24 p.
- STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 7-16, set. 2009.
- SUDHA, P.; ZINJARDE, S. S.; BHARGAVA, S. Y.; KUMAR, A. R. Potent alpha-amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London v. 11, n. 5, p. 1-10, Jan. 2011.
- SUFFREDINI, I. B.; SADER, H. S.; GONÇALVES, A. G.; REIS, A. O.; GALES, A. C.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 3, p. 379-384, Mar. 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, Porto alegre: Artmed, 2013. cap. 13, p. 312-323.
- TAKAO, T.; KITATANI, F.; WATANABE, N.; YAGI, A.; SAKATA, K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine-bacteria from fish and shellfish. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 58, n. 10, p. 1780-1783, Oct. 1994.
- TANNER, G. J.; FRANCKI, K. T.; ABRAHAMS, S.; WATSON, J. M.; LARKIN, P. J.; ASHTON, A. R. Proanthocyanidin biosynthesis in plants: purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 34, p. 31647-31656, Aug. 2003.
- TERRITÓRIO nacional tem cerca de 8,5 milhões de quilômetros quadrados. [2009]. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/governo/2009/11/territorio>>. Acesso em: 18 jul. 2014.

- TIMBOLA, A. K.; SOUZA, C. D. D.; GIACOMELLI, C.; SPINELLI, A. Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 139-148, Feb. 2006.
- TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; OREOPOULOU, V. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, Basel, v. 12, n. 3, p. 593-606, Mar. 2007.
- VADIVEL, V.; BIESALSKI, H. K. Contribution of phenolic compounds to the antioxidant potential and type II diabetes related enzyme inhibition properties of *Pongamia pinnata* L. Pierre seeds. **Process Biochemistry**, Vandoeuvre, v. 46, n. 10, p. 1973-1980, Oct. 2011.
- VAYUPHARP, B.; LAKSANALAMAI, V. Recovery of antioxidants from grape seeds and its application in fried food. **Food Processing & Technology**, Westlake, v. 3-4, n. 152, p. 1-6, 2012.
- VICTORIA, F. N.; DE SIQUEIRA BRAHM, A.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E. J. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 544, n. 0, p. 105-109, June 2013.
- VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; SILVA, W. P. D.; MOTTA, A. D. S. D.; NASCENTE, P. D. S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, Aug. 2012.
- VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. D. T. Atividade antioxidante de cafés torrado e solúvel: padronização e validação de métodos. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 68-75, jan./ abr. 2012.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 1996. 384 p.
- WHITCOMB, D. C.; LOWE, M. E. Human pancreatic digestive enzymes. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 52, n. 1, p. 1-17, Jan. 2007.
- WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, New York, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, May 2004.
- WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v. 251, n. 1, p. 3-19, Mar. 2005.
- WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 2, p. 485-493, Jun. 2001.
- WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, Cardiff, v. 37, n. 2, p. 99-105, June 1998.
- XIAO, J.; NI, X.; KAI, G.; CHEN, X. A Review on structure-activity relationship of dietary polyphenols inhibiting α -amylase. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 53, n. 5, p. 497-506, Feb. 2012.
- XIONG, L.; PENG, C.; ZHOU, Q. M.; WAN, F.; XIE, X. F.; GUO, L.; LI, X. H.; HE, C. J.; DAI, O. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Leonurus japonicus* Houtt. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 1, p. 963-973, Jan. 2013.
- YANG, B.; KOTANI, A.; ARAI, K.; KUSU, F. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 17, n. 5, p. 599-604, May 2001.

- YAZAKI, K. Transporters of secondary metabolites. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, n. 3, p. 301-307, June 2005.
- YAZDANI, D.; TAN, Y. H.; ABIDIN, M. A. Z.; JAGANATH, I. B. A review on bioactive compounds isolated from plants against plant pathogenic fungi. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 5, n. 30, p. 6584-6589, Dec. 2011.
- YENGOPAL, V. Essential oils for caries prevention: a viable option? **Journal of Minimum Intervention in Dentist**, Houghton, v. 2, n. 3, p. 190-204, Sept. 2009.
- ZAJÁCZ, Á.; GYÉMÁNT, G.; VITTORI, N.; KANDRA, L. Aleppo tannin: structural analysis and salivary amylase inhibition. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 342, n. 5, p. 717-723, Apr. 2007.
- ZHANG, D.; CHU, L.; LIU, Y.; WANG, A.; JI, B.; WU, W.; ZHOU, F.; WEI, Y.; CHENG, Q.; CAI, S.; XIE, L.; JIA, G. Analysis of the antioxidant capacities of flavonoids under different spectrophotometric assays using cyclic voltammetry and density functional theory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 18, p. 10277-10285, Sept. 2011.
- ZHAO, J.; DIXON, R. A. The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 72-80, Feb. 2010.
- ZHENG, M.; STORZ, G. Redox sensing by prokaryotic transcription factors. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 1-6, Jan. 2000.
- ZONG, Z.; KIRSCH, L. E. Studies on the instability of chlorhexidine, part I: kinetics and mechanisms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Hoboken, v. 101, n. 7, p. 2417-2427, Jul. 2012.

APÊNDICE A - Tempos de retenção dos padrões de alcanos (C8-C30) na análise por CG-EM

Alcano	Tempo de retenção (min)
octano (C8)	3,35
nonano (C9)	5,15
decano (C10)	7,95
undecano (C11)	11,66
dodecano (C12)	15,89
tridecano (C13)	20,30
tetradecano (C14)	24,63
pentadecano (C15)	28,83
hexadecano (C16)	32,82
heptadecano (C17)	36,62
octadecano (C18)	40,27
nonadecano (C19)	43,74
eicosano (C20)	47,06
heneicosano (C21)	50,21
docosano (C22)	53,23
tricosano (C23)	56,13
tetracosano(C24)	58,91
pentacosano (C25)	61,59
hexacosano (C26)	64,39
heptacosano (C27)	67,76
octacosano (C28)	69,55
nonacosano (C29)	71,78
triacontano (C30)	74,16

APÊNDICE B - Meios de cultura e soluções utilizadas na análise da atividade antimicrobiana

- Caldo triptona de soja - TSB (BD®)

Composição: peptona de caseína (17,0 g); peptona de soja (3,0 g); glicose (2,5 g); cloreto de sódio (5,0 g); hidrogenofosfato dipotássico (2,5 g).

Preparação (CLSI, 2012b): Foi preparada uma solução de concentração de 30,0 mg mL⁻¹ em água destilada. A solução foi homogeneizada e autoclavada por 15 minutos a 121 °C.

- Ágar triptona de soja - TSB (BD®)

Composição: infusão de músculo cardíaco (2,0 g); digestão pancreática de caseína (13,0 g); extrato de levedura (5,0 g); cloreto de sódio (5,0 g); ágar (15,0 g).

Preparação: Foi preparada uma solução de concentração de 40,0 mg mL⁻¹ em água destilada. A solução foi homogeneizada com aquecimento até a completa dissolução do pó e autoclavada por 15 minutos a 121 °C. Após o resfriamento (45 a 50 °C) foi adicionado 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Cada placa de Petri recebeu 25 mL dessa mistura.

- Caldo Schaedler (BD®)

Composição: digestão pancreática de caseína (8,10 g); digestão peptídica de tecido animal (2,50 g); digestão papaína de farelo de soja (1,00 g); dextrose (5,82 g); extrato de levedura (5,00 g); cloreto de sódio (1,70 g); fosfato dipotássico (0,82 g); hemina (0,01 g); L-cistina (0,40 g); Tris (hidroximetil) aminometano (3,00 g).

Preparação (CLSI, 2012a): Foi preparada uma solução de concentração 28,4 mg mL⁻¹ em água destilada. A solução foi homogeneizada e autoclavada por 15 minutos a 121 °C. Em seguida, foi suplementada com 1 mL de solução de hemina de concentração 5,0 mg mL⁻¹ e 1 mL de solução de menadiona de concentração 1,0 mg mL⁻¹.

- Ágar Schaedler (BD®)

Composição: digestão pancreática de caseína (8,20 g); digestão peptídica de tecido animal (2,50 g); digestão papaína de farelo de soja (1,00 g); dextrose (5,80 g); extrato de levedura (5,00 g); cloreto de sódio (1,70 g); fosfato dipotássico (0,80 g);

hemina (0,01 g); L-cistina (0,40 g); Tris (hidroximetil) aminometano (3,00 g); Agar (13,5 g).

Preparação: Foi preparada uma solução de concentração 41,9 mg mL⁻¹ em água destilada. A solução foi homogeneizada e autoclavada por 15 minutos a 121 °C. Em seguida, foi suplementada com 1 mL de solução de hemina de concentração 5,0 mg mL⁻¹ e 1 mL de solução de menadiona de concentração 1,0 mg mL⁻¹. Após o resfriamento (45 a 50 °C), foi adicionado 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Cada placa de Petri recebeu 30 mL dessa mistura.

- Inóculos

Para inóculos utilizados em bactérias aeróbicas, com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, culturas de 24 horas dos microrganismos, crescidos no meio de cultura de ágar triptona de soja, foram transferidas para tubos contendo caldo triptona soja;

Para inóculos utilizados em bactérias anaeróbicas, com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, culturas de 72 horas dos microrganismos, crescidos no meio de cultura de ágar Schaedle, foram transferidas para tubos contendo caldo Schaedle.

Através de um turbidímetro, os inóculos foram padronizados fazendo a comparação de sua turbidez com o tubo 0,5 da escala de McFarland para bactérias (corresponde a 1,5 x 10⁸ UFC mL⁻¹).

APÊNDICE C - Meio de cultura utilizado na análise da atividade citotóxica

- Roswell Park Memorial Institute “RPMI 1640”

Composição; nitrato de cálcio ($0,1\text{ mg mL}^{-1}$); sulfato de magnésio ($0,04884\text{ mg mL}^{-1}$); cloreto de potássio ($0,4\text{ mg mL}^{-1}$); bicarbonato de sódio (2 mg mL^{-1}); cloreto de sódio (6 mg mL^{-1}); monohidrogenofosfato de sódio ($0,8\text{ mg mL}^{-1}$); L-arginina ($0,2\text{ mg mL}^{-1}$); L-asparagina ($0,05\text{ mg mL}^{-1}$); ácido L-aspártico ($0,02\text{ mg mL}^{-1}$); L-cistina ($0,0652\text{ mg mL}^{-1}$); ácido L-glutâmico ($0,02\text{ mg mL}^{-1}$); glicina ($0,01\text{ mg mL}^{-1}$); L-histidina ($0,015\text{ mg mL}^{-1}$); hidroxi-L-prolina ($0,02\text{ mg mL}^{-1}$); L-isoleucina ($0,05\text{ mg mL}^{-1}$); L-leucina ($0,05\text{ mg mL}^{-1}$); L-lisina ($0,04\text{ mg mL}^{-1}$); L-metionina ($0,015\text{ mg mL}^{-1}$); L-fenilalanina ($0,015\text{ mg mL}^{-1}$); L-prolina ($0,02\text{ mg mL}^{-1}$); L-serina ($0,03\text{ mg mL}^{-1}$); L-treonina ($0,02\text{ mg mL}^{-1}$); L-triptofan ($0,005\text{ mg mL}^{-1}$); L-tirosina ($0,02184\text{ mg mL}^{-1}$); L-valina ($0,02\text{ mg mL}^{-1}$); D-biotin ($0,0002\text{ mg mL}^{-1}$); cloreto de colina ($0,003\text{ mg mL}^{-1}$); ácido fólico ($0,001\text{ mg mL}^{-1}$); mio-inositol ($0,035\text{ mg mL}^{-1}$); niacinamida ($0,001\text{ mg mL}^{-1}$); ácido *p*-aminobenzóico ($0,001\text{ mg mL}^{-1}$); ácido D-pantotenico ($0,00025\text{ mg mL}^{-1}$); piroxidina ($0,001\text{ mg mL}^{-1}$); riboflavina ($0,0002\text{ mg mL}^{-1}$); tiamina ($0,001\text{ mg mL}^{-1}$); vitamina B12 ($0,000005\text{ mg mL}^{-1}$); D-glucose (2 mg mL^{-1}); glutationa ($0,001\text{ mg mL}^{-1}$); fenol red ($0,0053\text{ mg mL}^{-1}$); L-glutamina ($0,3\text{ mg mL}^{-1}$).

Preparação: O meio de cultura Roswell Park Memorial Institute “RPMI 1640” foi suplementado com 5% (v:v⁻¹) de soro fetal bovino (FBS) e L-glutamina (2 mM) em frascos de cultura de tecidos. Estes foram incubados a 37 °C numa atmosfera umida com 5% de CO₂.

APÊNDICE D - Matriz de análise

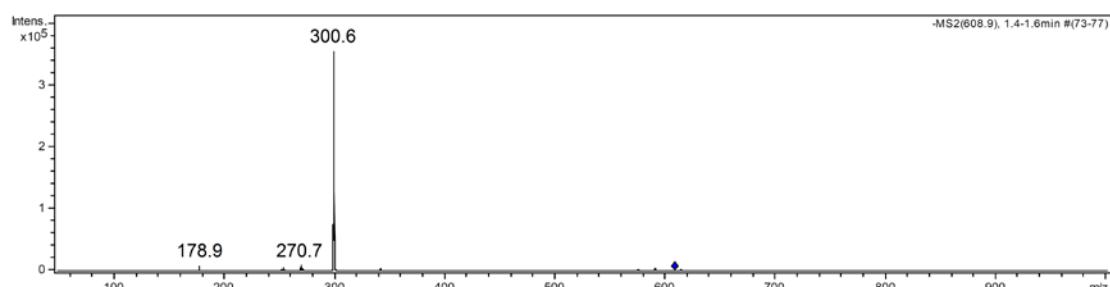
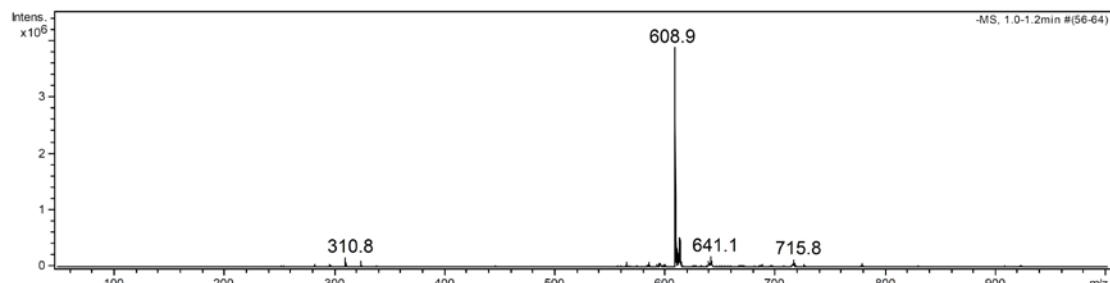
Casos	FT - F	P - F	Flv - F	FT - Ga	Variáveis				
					P - Ga	Flv - Ga	FT - Fl	P - Fl	Flv - Fl
hexano	1	23,3	6,40	16,9	69,6	28,5	0,59	27,5	21,9
	2	22,2	6,60	17,2	61,3	31,9	0,47	26,9	23,1
	3	22,2	6,00	14,8	63,8	33,5	0,59	29,9	22,5
diclorometano	4	69,1	12,6	1,39	287,9	47,6	0,19	73,5	27,5
	5	74,3	12,8	0,41	285,4	46,4	0,081	69,1	27,7
	6	67,3	11,7	2,11	277,9	49,2	0,19	62,8	26,6
metanol:água	7	326,9	74,9	43,7	554,9	129,9	1,38	548,7	99,3
	8	327,8	74,3	42,9	543,5	126,0	1,15	558,8	99,5
	9	327,8	74,3	44,5	543,5	127,5	1,86	558,8	99,1
acetato de etila	10	350,8	131,2	52,6	733,3	206,1	3,46	732,6	140,3
	11	349,8	134,3	50,7	735,0	206,5	3,70	728,1	139,8
	12	349,8	133,9	50,5	738,4	200,1	4,51	736,3	140,5
<i>n</i> -butanol	13	312,4	82,7	36,7	592,6	139,4	0,79	517,3	74,0
	14	310,8	82,9	33,9	589,3	140,4	0,56	510,9	76,9
	15	310,8	83,5	36,9	595,9	138,8	0,68	517,3	75,8
água	16	92,5	13,3	1,97	178,4	39,3	0,19	61,5	16,3
	17	95,5	13,5	1,74	175,6	42,1	0,079	61,6	18,8
	18	93,5	14,5	2,19	178,4	43,1	0,079	61,4	16,5

FT: Fenóis totais; P: proantocianidinas; Fl: flavonoides; F: folha; Ga: galho; Fl: flor

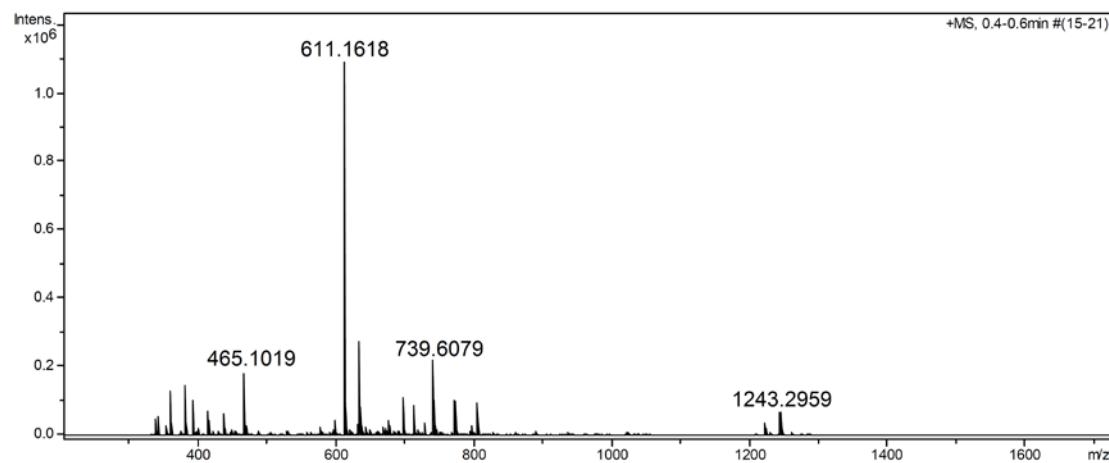
APÊNDICE E - Componentes principais

Casos	Componentes principais										
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC6	PC7	PC8	PC9	
hexano	1	2,765	0,625	0,531	0,237	0,043	0,053	-0,013	-0,027	-0,007	2,765
	2	2,764	0,563	0,550	0,292	0,069	-0,023	-0,003	-0,002	-0,009	2,764
	3	2,778	0,633	0,441	0,237	0,023	-0,014	0,008	0,031	0,018	2,778
diclorometano	4	2,469	-0,025	-0,464	-0,187	0,188	0,044	-0,004	-0,004	0,014	2,469
	5	2,514	-0,105	-0,481	-0,202	0,171	0,004	-0,028	-0,005	-0,008	2,514
	6	2,487	-0,007	-0,429	-0,144	0,186	0,037	0,033	0,011	-0,006	2,487
metanol:água	7	-1,810	-0,425	0,474	-0,365	0,038	-0,016	0,018	-0,001	-0,021	-1,810
	8	-1,708	-0,561	0,512	-0,379	0,044	-0,084	-0,046	-0,006	0,014	-1,708
	9	-1,889	-0,130	0,503	-0,456	-0,069	0,101	0,031	0,010	0,007	-1,889
acetato de etila	10	-4,449	0,545	-0,156	0,132	0,095	-0,116	0,014	0,017	0,000	-4,449
	11	-4,467	0,692	-0,267	0,071	0,022	-0,104	0,021	-0,027	0,004	-4,467
	12	-4,630	1,180	-0,329	-0,052	-0,120	0,144	-0,034	0,007	-0,004	-4,630
<i>n</i> -butanol	13	-1,680	-0,891	-0,048	0,373	-0,038	0,103	0,012	0,012	0,001	-1,680
	14	-1,576	-1,012	-0,130	0,333	0,001	-0,042	-0,025	0,024	-0,005	-1,576
	15	-1,651	-0,951	-0,023	0,332	0,012	0,048	0,008	-0,033	0,005	-1,651
água	16	2,702	0,002	-0,229	-0,083	-0,235	0,001	-0,008	-0,007	0,003	2,702
	17	2,692	-0,065	-0,226	-0,088	-0,213	-0,080	-0,006	0,015	-0,011	2,692
	18	2,688	-0,069	-0,228	-0,052	-0,218	-0,058	0,024	-0,015	0,006	2,688

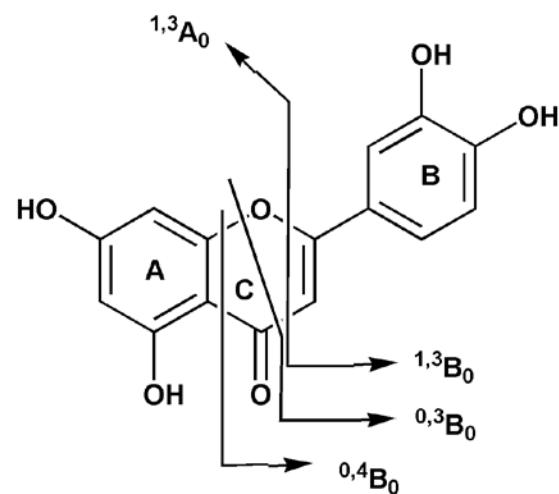
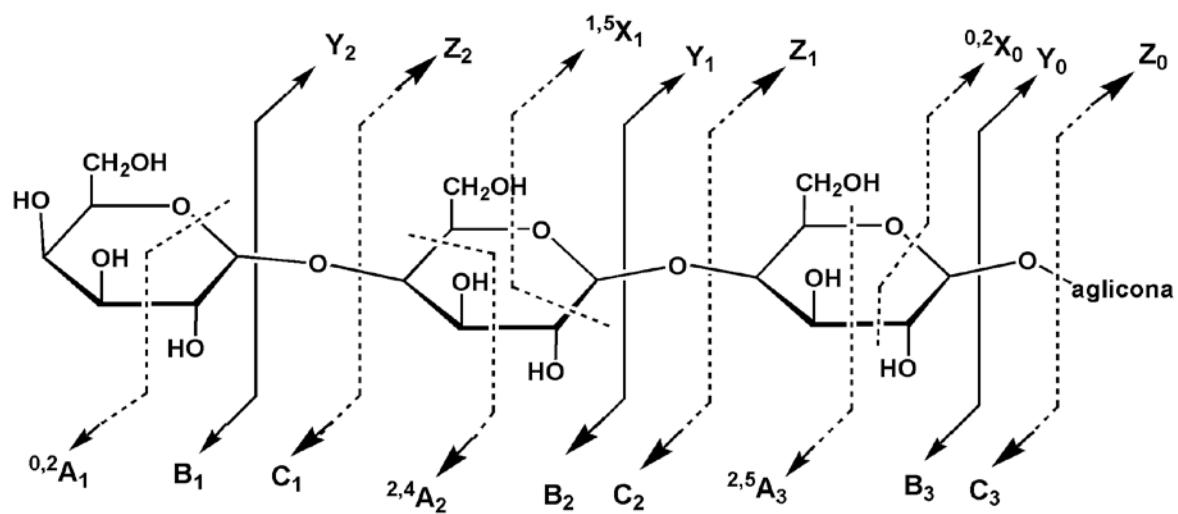
APÊNDICE F - Espectro de massas (ESI-EM/EM - modo negativo) da rutina isolada do extrato das folhas



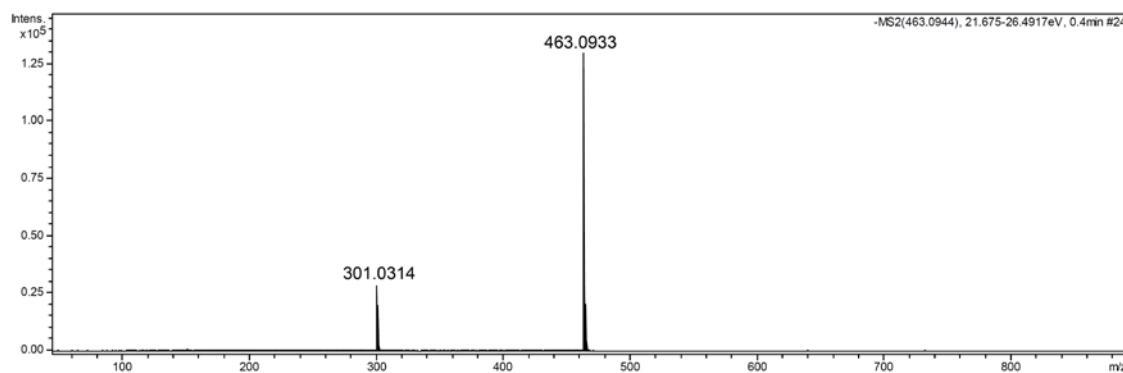
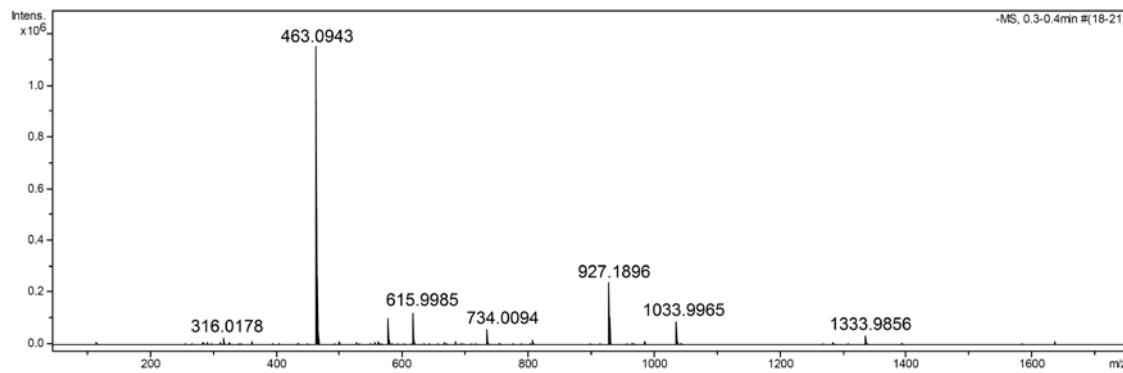
APÊNDICE G- Espectro de massas (ESI-EM - modo positivo) da rutina isolada do extrato das folhas



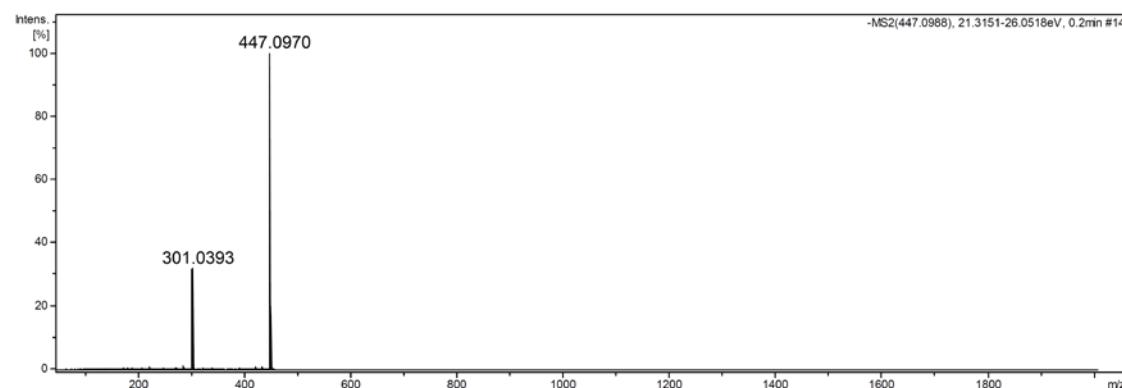
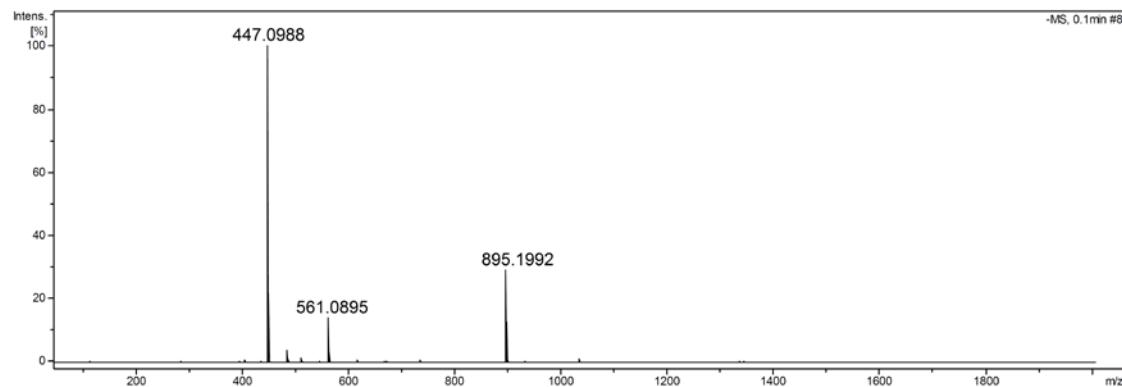
APÊNDICE H - Nomenclatura dos íons de flavonoides glicosilados gerados pela fragmentação em espectrometrômetro de massas



APÊNDICE I - Espectro de massas (ESI-EM/EM - modo negativo) da isoquercitrina isolada do extrato das folhas



APÊNDICE J - Espectro de massas (ESI-EM/EM - modo negativo) da quercitrina isolada do extrato das folhas



APÊNDICE K - Espectro de massas (ESI-EM/EM - modo negativo) da epicatequina isolada do extrato das folhas

