

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Henrique Hunger Moresco

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE QUATRO ESPÉCIES  
DA FAMÍLIA MYRTACEAE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para obtenção do Título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Ines Maria Costa Brighente

Florianópolis  
2014



Henrique Hunger Moresco

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE QUATRO ESPÉCIES  
DA FAMÍLIA MYRTACEAE**

Esta Tese de Doutorado foi julgada e aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química no Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis-SC, 17 de Março de 2014.

---

Prof. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo  
Coordenador do Programa

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Inês Maria Costa Brighente  
(Orientadora – UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Cristina Missau  
(Relatora – UNIPAMPA)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michele Debiasi Alberton  
(FURB)

---

Prof. Dr. Maique Weber Biavatti  
(UFSC)

---

Prof. Dr. Ricardo José Nunes  
(UFSC)

---

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke  
(UFSC)



Dedico este trabalho a minha mãe, meu exemplo de força,  
coragem e perseverança. Mãe, vou levar comigo sempre o seu  
lema: EU QUERO, EU POSSO, EU CONSIGO!



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me ilumina e guia todos os meus passos, pelas minhas conquistas e também pelas dificuldades que me fazem crescer e ser mais forte.

À professora Ines Brighente, pelos quase dez anos de orientação e amizade, pela oportunidade de crescimento profissional e confiança a mim depositada. Também não posso deixar de agradecer ao professor Moacir Pizzolatti pelos ensinamentos e discussões que contribuíram muito para minha formação científica.

Agradeço a todos os meus colegas do grupo de pesquisa LQPN. São tantos os que passaram por mim durante todos esses anos que é possível que eu esqueça o nome de alguns: Aline, Alechania, Ana Paula, Analice, Andressa, Aldo, Bia, Cristian, Dalila, Débora, Fabi, Fernanda, Francieli, Guilherme, Gustavo, Handriela, Heros, Hugo, Ingrid, Janine, Juliana, Kamila, Leandro, Lizandra, Luciana, Marcos, Mauro, Mayan, Michele, Munique, Rafael, Solomom, Suelen e Tiago.

Agradeço a todos os meus amigos de Florianópolis, em especial aos amigos dos grupos musicais Coral da UFSC e Nós e Vozes; aos amigos de farra e aos meus queridos *roommates* Gui e Gi (obrigado por me aturarem!). Por falar em aturar, não posso deixar de agradecer ao Leandro, sempre compreensível e paciente e disposto a me apoiar em tudo.

À minha mãe que, mesmo de longe, sempre me incentivou a lutar e a nunca desistir dos meus sonhos; e a minha irmã, sempre compreensível e conselheira. Também quero agradecer aos meus familiares e amigos de Canoas, que, apesar de nunca entenderem exatamente o que eu faço, me apoiaram e incentivaram ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Dalmarco e ao aluno de mestrado Marcus Vinicius pela colaboração nos ensaios de atividade antibacteriana e anti-inflamatória.

À professora Dr<sup>a</sup> Susana Johann e a pós-doutoranda Dr<sup>a</sup> Beatriz Borelli pelos ensaios de atividade antifúngica.

Ao Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke e a colega de doutorado Lizandra Bretanha pela colaboração nas análises de HPLC.

My dear boss Alicia Hamm Meshey in the period that I lived in the USA (2010-2011). You taught me the gift of gab "thank you"!

À Patricia Tuzimoto pelo auxílio e informações na obtenção da bolsa de doutorado sanduíche.

Lærere PhD Dan Stærk, PhD Claus Cornett og PhD Steen Honoré Hansen som en mulighed for at lære i løbet af praktikken på Københavns Universitet, Danmark.

Aos amigos que fiz na Dinamarca, Bin Li, Sileshi Gizachew Wubshet e Stephanie Sørensen Amador por me ajudarem nos momentos de maior dificuldade em Copenhagen.

A todos os funcionários da Central de Análises do departamento de Química da UFSC.

À CAPES, ao CNPQ e à UFSC pelo apoio financeiro e oportunidade de pesquisa.

Obrigado!  
Thank You!  
Tak!

## RESUMO

A família Myrtaceae destaca-se como uma das mais abundante e diversificada nos ecossistemas brasileiros, sendo uma fonte de compostos bioativos. Levando em consideração o potencial terapêutico das espécies desta família, o objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico de quatro espécies representadas pelos gêneros *Myrcia*, *Eugenia* e *Psidium*, e em adição, avaliar os efeitos biológicos dos extratos, frações e compostos isolados das mesmas. O fracionamento cromatográfico das frações - insolúvel e acetato de etila de *E. catharinae* - levou ao isolamento do composto fenólico monometil-olivetol, dos esteróis  $\beta$ - sitosterol e estigmasterol em mistura, do triterpeno ácido rotúndico e dos flavonoides miricitrina, quercetina e catequina. De *P. cattleyanum* foi isolado o flavonoide glicosilado quercitrina. Das espécies *M. splendens* e *M. palustris* obteve-se em elevado rendimento o flavonoide miricitrina nas frações acetato de etila das duas espécies. Na fração butanol de *M. palustris*, além da miricitrina, obteve-se também miricetina e quercetina em mistura. Utilizando a plataforma HPLC-SPE-*tt*NMR, acoplado a ensaios de alta resolução, foi possível identificar na espécie *M. palustris* os compostos ácido 4-hidroxicinâmico, miricitrina, quercetina, miricetina, quercitrina, todos com atividade antioxidante, sendo a miricetina e quercitrina também ativos quanto à inibição da  $\alpha$ -glicosidase. As espécies vegetais foram avaliadas por diversos testes biológicos. No teste de avaliação da letalidade frente à larvas de *A. salina*, a atividade concentrou-se nas frações hexano das espécies. Todas as espécies apresentaram atividade antioxidante considerável, com destaque para espécie *M. splendens*. Para o teste de inibição da enzima acetilcolinesterase, foi observada maior atividade nas espécies *M. splendens* e *M. palustris*, chegando a valores de porcentagem de inibição de 99,9 %. Não foi observada atividade antibacteriana significativa para nenhuma das espécies estudadas. *M. splendens* e *M. palustris* foram avaliadas quanto ao seu potencial antifúngico e anti-inflamatório. *M. splendens* se mostrou mais ativa no ensaio antifúngico, apresentando atividade elevada contra cepas de *Candida*. No ensaio de atividade anti-inflamatória através do modelo de pleurisia induzida por carragenina, as duas espécies demonstraram capacidade de inibir o processo inflamatório com valores que variam de 30 a 70 %, na maior dose testada.

Palavras-chave: Antioxidantes, *Myrcia*, *Eugenia*, *Psidium*



## ABSTRACT

The Myrtaceae family stands out as one of the most abundant and diverse in Brazilian ecosystems and therefore a rich source of bioactive compounds. Considering the therapeutic potential of this family, the aim of this work was to perform the phytochemical study of four species represented by the genera *Myrcia*, *Eugenia* and *Psidium*, and in addition, to evaluate the biological effects of extracts, fractions and compounds isolated from them. The chromatographic fractionation of the insoluble and ethyl acetate fractions from *E. catharinae* led to the isolation of the monomethyl-olivetol,  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol as a mixture, rotundic acid, myricitrin, quercetin and catechin. From *P. cattleyanum* was isolated the glycoside flavonoid quercitrin. From the ethyl acetate fractions of species *M. splendens* and *M. palustris* was obtained in high yield the myricitrin flavonoid. In butanol fraction of *M. palustris*, besides myricitrin was obtained also myricetin and quercetin as a mixture. Using the coupling HPLC-SPE-*tt*NMR with a microplate-based high-resolution assay was possible to identify, from the specie *M. palustris*, 4-hydroxycinnamic acid, myricitrin, quercetin, myricetin and quercitrin (all compounds with antioxidant activity); myricetin and quercitrin also active for inhibition of  $\alpha$ -glucosidase. The plants were assessed by different biological tests. For the toxicity assay using *A. salina*, the activity was concentrated in the hexane fractions of the species. All species showed good antioxidant activity, especially *M. splendens*. In vitro acetylcholinesterase inhibition assay, the highest activity was observed in the species *M. splendens* and *M. palustris*, reaching inhibition values of 99.9%. No significant antibacterial activity was observed for any of the studied species. *M. splendens* and *M. palustris* were evaluated in relation to antifungal and anti-inflammatory potential. *M. splendens* was more active in the antifungal assay, showing high activity against *Candida* strains. In the anti-inflammatory assay using the carrageenan-induced pleurisy model, the two species have demonstrated the ability to inhibit the inflammatory process with values ranging from 30 to 70% at the highest dose tested.

Keywords: Antioxidants, *Myrcia*, *Eugenia*, *Psidium*



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Folhas das espécies vegetais <i>Myrcia splendens</i> e <i>Myrcia palustris</i> .....	31
<b>Figura 2.</b> Folhas da espécie <i>Eugenia catharinae</i> .....	39
<b>Figura 3.</b> Compostos encontrados em espécies do gênero <i>Eugenia</i> .....	41
<b>Figura 4.</b> Frutos e folhas de <i>P. cattleyanum</i> . .....	48
<b>Figura 5.</b> Compostos encontrados em espécies do gênero <i>Psidium</i> . .....	50
<b>Figura 6.</b> Fracionamento dos extratos brutos das espécies estudadas. ....	62
<b>Figura 7.</b> Estrutura do antibiótico de referência gentamicina. ....	71
<b>Figura 8.</b> Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração acetato de etila de <i>M. splendens</i> obtido a 354 nm. ....	80
<b>Figura 9.</b> Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração butanol de <i>M. splendens</i> obtido a 354 nm. ....	80
<b>Figura 10.</b> Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração acetato de etila de <i>M. palustris</i> obtido a 354 nm. ....	81
<b>Figura 11.</b> Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração butanol de <i>M. palustris</i> obtido a 354 nm. ....	81
<b>Figura 12.</b> Perfil cromatográfico por HPLC-DAD dos flavonoides miricitrina e rutina obtidos a 354 nm. ....	82
<b>Figura 13.</b> Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração acetato de etila de <i>M. splendens</i> com co-injeção do padrão miricitrina (20%) obtido a 354 nm. ....	83
<b>Figura 14.</b> Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração butanol de <i>M. splendens</i> com co-injeção do padrão miricitrina (20%) obtido a 354 nm. ....	83
<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico da fração acetato de etila de <i>M. palustris</i> com co-injeção do padrão miricitrina (20%) obtido a 354 nm. ....	83
<b>Figura 16.</b> Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração butanol de <i>M. palustris</i> com co-injeção do padrão miricitrina (20%) a 354 nm. ....	84
<b>Figura 17.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração B8-B10 de <i>E. catharinae</i> . ....	86
<b>Figura 18.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração B8-B10 de <i>E. catharinae</i> . ....	87
<b>Figura 19.</b> Monometil-olivetol (1-hidroxi-3-metoxi-5-n-pentil benzeno) ...	88

<b>Figura 20.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração C5-C6 .....	89
<b>Figura 21.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração C5-C6 .....	90
<b>Figura 22.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração C5-C6 .....	90
<b>Figura 23.</b> Estrutura dos esteróis presentes na mistura M-1 de <i>E. catharinae</i> .....	91
<b>Figura 24.</b> Miricitrina (miricetina-3-O- $\alpha$ -ramnopiranosídeo) [14].....	93
<b>Figura 25.</b> Quercetina (3,5,7,3'-4'- pentahidroxi flavona) [17] .....	95
<b>Figura 26.</b> Ácido Rotúndico (Correlação HMBC) .....	99
<b>Figura 27.</b> (+)-Catequina.....	101
<b>Figura 28.</b> Quercitrina (quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo) [18] .....	102
<b>Figura 29.</b> Miricetina (3,5,7,3',4',5'- hexahidroxiflavona) [13] .....	104
<b>Figura 30.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da fração 2 de <i>M. splendens</i> .....	105
<b>Figura 31.</b> Esquema de separação e identificação dos constituintes ativos de espécies da família Myrtaceae utilizando a plataforma HPLC-SPE- <i>tt</i> NMR (HPLC- extração em fase sólida- RMN, em modo "tube transfer", transferência direta par tubo de RMN) .....	106
<b>Figura 32.</b> Biocromatogramas da espécie <i>E. catharinae</i> . Detecção por UV a 254 nm (azul), atividade antioxidante (rosa), atividade de inibição da $\alpha$ -glicosidase (amarelo) .....	107
<b>Figura 33.</b> Biocromatogramas da espécie <i>M. palustris</i> . Detecção por UV a 254 nm (azul), atividade antioxidante (rosa), atividade de inibição da $\alpha$ -glicosidase (amarelo) .....	107
<b>Figura 34.</b> Biocromatogramas da espécie <i>P. cattleyanum</i> . Detecção por UV a 254 nm (azul), atividade antioxidante (rosa), atividade de inibição da $\alpha$ -glicosidase (amarelo) .....	108
<b>Figura 35.</b> Cromatograma da espécie <i>M. palustris</i> a 254 nm.....	110
<b>Figura 36.</b> Estruturas dos compostos identificados na fração acetato de etila de <i>M. palustris</i> pelo método HPLC-SPE- <i>tt</i> NMR.....	110
<b>Figura 37.</b> Complexo formado entre a estrutura do flavonóide e o reagente $\text{AlCl}_3$ .....	117

<b>Figura 38.</b> Equação básica da reação do DPPH com um flavonóide.....	120
<b>Figura 39.</b> Sequência de reações para detecção de atividade anticolinesterásica de substâncias naturais pelo método de Ellman .....	123
<b>Figura 40.</b> Atividade anti-inflamatória do extrato bruto e fração acetato de etila de <i>M. splendens</i> . (S) representa o grupo de animais tratados com solução salina, (Cg) o grupo de animais tratados com carragenina e (Dex) dexametasona. Os asteriscos indicam semelhança estatística, ns: não significante, *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 .....	137
<b>Figura 41.</b> Atividade anti-inflamatória do extrato bruto e fração acetato de etila de <i>M. palustris</i> . (S) representa o grupo de animais tratados com solução salina, (Cg) o grupo de animais tratados com carragenina e (Dex) dexametasona. Os asteriscos indicam semelhança estatística, ns: não significante, *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 .....	138
<b>Figura 42.</b> Atividade anti-inflamatória do composto Miricitrina isolado da fração acetato de etila de <i>M. splendens</i> e <i>M. palustris</i> . (S) representa o grupo de animais tratados com solução salina, (Cg) o grupo de animais tratados com carragenina e (Dex) dexametasona. Os asteriscos indicam semelhança estatística, ns: não significante, *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 .....	139
<b>Figura 43.</b> Efeito dos extratos brutos, frações acetato de etila e composto isolado de <i>M. splendens</i> e <i>M. palustris</i> sobre a atividade da enzima mieloperoxidase. (S) representa o grupo de animais tratados com solução salina, (Cg) o grupo de animais tratados com carragenina e (Dex) dexametasona. Os asteriscos indicam semelhança estatística, ns: não significante, *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 .....	140



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Compostos encontrados em espécies do gênero <i>Myrcia</i> .....	32
<b>Tabela 2.</b> Atividades biológicas de extratos e compostos isolados de espécies do gênero <i>Myrcia</i> .....	36
<b>Tabela 3.</b> Atividades biológicas de extratos e compostos isolados de espécies do gênero <i>Eugenia</i> .....	44
<b>Tabela 4.</b> Atividades biológicas de extratos e compostos isolados de espécies do gênero <i>Psidium</i> .....	51
<b>Tabela 5.</b> Rendimento dos extratos brutos e frações das espécies <i>M. splendens</i> , <i>M. palustris</i> , <i>E. catharinae</i> e <i>P. cattleyanum</i> .....	78
<b>Tabela 6.</b> Dados espectrais de RMN uni e bidimensionais do Composto C-6. ....	97
<b>Tabela 7.</b> Atividade tóxica frente a larvas de <i>Artemia salina</i> aplicado aos extratos brutos e frações das espécies <i>M. splendens</i> , <i>M. palustris</i> , <i>E. catharinae</i> , <i>P. cattleyanum</i> .....	113
<b>Tabela 8.</b> Teor de Fenólicos e Flavonóides e Atividade antioxidante dos extratos e frações de <i>M. splendens</i> , <i>M. palustris</i> , <i>E. catharinae</i> e <i>P. cattleyanum</i> .....	118
<b>Tabela 9.</b> Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase para extratos e frações de Myrtaceae .....	124
<b>Tabela 10.</b> Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase para compostos isolados das espécies de Myrtaceae .....	125
<b>Tabela 11.</b> Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto, frações e compostos isolados de <i>M. splendens</i> , <i>M. palustris</i> , <i>E. catharinae</i> e <i>P. cattleyanum</i> .....	128
<b>Tabela 12.</b> Porcentagens de inibição dos extratos, frações e composto de <i>M. splendens</i> e <i>M. palustris</i> contra leveduras patogênicas .....	131
<b>Tabela 13.</b> Concentração inibitória mínima em $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos, frações e composto de <i>M. splendens</i> e <i>M. palustris</i> .....	133



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AChE** - Acetilcolinesterase  
**AcOEt** - Acetato de etila  
**ANOVA** - *Analysis of variance* (análise de variância)  
**ATCC** - *American type culture collection*  
**BuOH** - Butanol  
**CC** - Cromatografia em coluna  
**CCD** - Cromatografia em Camada Delgada  
**CE<sub>50</sub>** - Concentração efetiva 50 %  
**Cg** - Carragenina  
**CG** - Cromatografia gasosa  
**CG-MS** - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas  
**CI<sub>50</sub>** - Concentração inibitória 50%  
**CIM** - Concentração inibitória mínima  
**CLSI** - *Clinical Laboratory Standards Institute*  
**COSY** - *Correlation Spectroscopy*  
**d** - Duplete  
**D.I.** - Diâmetro interno  
**dd** - Duplo duplete  
**dex** - Dexametasona  
**DI<sub>50</sub>** - Dose inibitória 50 %  
**DMSO** - Dimetilsulfóxido  
**DNA** - Ácido desoxirribonucléico  
**DPPH** - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil  
**DTT** - DL-ditiotreitol  
**EB** - Extrato Bruto  
**EtOH** - etanol  
**FAe** - Fração acetato de etila  
**FAq** - Fração aquosa  
**FB** - Fração butanólica  
**FH** - Fração hexano  
**FIn** - Fração insolúvel  
**HEX** – hexano

**HIV** - Vírus da imunodeficiência

**HL-60** - linhagem celular de leucemia

**HMBC** - *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*

**HMQC** - *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*

**HPLC** – “High-Performance Liquid Chromatography” - cromatografia líquida de alta eficiência

**HPLC/DAD** - cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodo

**HPLC-DAD-ESI-MS** - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos e espectrometria de massas com ionização por eletrospray

**HPLC-MS** - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

**HPLC-MS/MS** - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em seqüência.

**HPLC-RMN** - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a ressonância magnética nuclear.

**HPLC-SPE-*t*RMN** - Cromatografia líquida de alta eficiência com extração em fase sólida acoplada a ressonância magnética nuclear por transferência em tubo automatizada.

**Hz** - Hertz

**i.p.** - Intraperitoneal

**i.pl.** - Intrapleural

**i.v.** - Intravenoso

**IC<sub>50</sub>** - concentração inibitória 50 %

**IV** - Infravermelho

**J** - Constante de acoplamento

**m** - Multiplete

**MeOH** - Metanol

**MHz** - Mega hertz

**MPO** - Enzima mieloperoxidase

**MRSA** - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

**p.f.** - Ponto de fusão

**PBS** - Tampão fosfato de sódio

**ppm** - Partes por milhão

**Py** - Piridina

**Rf** - Fator de retenção (cromatografia)

**RMN** - Ressonância Magnética Nuclear

**RMN de <sup>13</sup>C** - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze

**RMN de <sup>1</sup>H** - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

*s* - Simpleto

*sl* - Simpleto largo

*spp.* - espécies

*t* - Tripleto

**TMS** - Tetrametilsilano

**UFC** - Unidade formadora de colônia

**UV** - Ultravioleta

**UV-VIS** - Ultravioleta Visível



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>29</b>
2.1. <i>Família Myrtaceae</i> .....	29
2.2. <i>Gênero Myrcia</i> .....	29
2.2.1. Química do gênero <i>Myrcia</i> .....	31
2.2.2. Estudos biológicos do gênero <i>Myrcia</i> .....	35
2.3. <i>Gênero Eugenia</i> .....	38
2.3.1. Química do gênero <i>Eugenia</i> .....	39
2.3.2. Estudos biológicos do gênero <i>Eugenia</i> .....	42
2.4. <i>Gênero Psidium</i> .....	47
2.4.1. Química do gênero <i>Psidium</i> .....	48
2.4.2. Estudos biológicos do gênero <i>Psidium</i> .....	50
2.5. <i>O uso de técnicas hifenadas para análise de produtos naturais</i> .....	53
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
3.1. <i>Objetivo geral</i> .....	57
3.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	57
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
4.1. <i>Materiais e reagentes</i> .....	59
4.2. <i>Equipamentos</i> .....	59
4.3. <i>Material Vegetal</i> .....	61
4.4. <i>Fracionamento líquido-líquido dos extratos brutos</i> .....	61
4.5. <i>Análises de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)</i> .....	62
4.5.1. Perfil cromatográfico das frações de <i>M. splendens</i> e <i>M. palustris</i> por HPLC/DAD.....	63

4.5.2. Estudo das frações acetato de etila de <i>M. palustris</i> , <i>E. catharinae</i> e <i>P. cattleyanum</i> pelo método HPLC-SPE-ttNMR acoplado a ensaios de alta resolução.....	63
4.5.3. Screening de alta resolução.....	64
4.5.4. Ensaio antioxidante usando o radical livre ABTS• <sup>+</sup> .....	65
4.5.5. Ensaio de inibição da enzima $\alpha$ -glicosidase.....	65
4.6. <i>Isolamento e identificação de compostos</i> .....	66
4.7. <i>Ensaio de bancada</i> .....	66
4.7.1. Toxicidade usando larvas de <i>Artemia salina</i> (TAS).....	66
4.7.2. Determinação do teor de compostos fenólicos.....	67
4.7.3. Determinação do teor de flavonoides.....	67
4.7.4. Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH.....	68
4.7.5. Determinação do potencial redutor.....	68
4.7.6. Ação inibitória da enzima acetilcolinesterase.....	69
4.8. <i>Atividade antimicrobiana</i> .....	70
4.8.1. Atividade antibacteriana.....	70
4.8.2. Atividade antifúngica.....	71
4.9. <i>Atividade anti-inflamatória</i> .....	74
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>
5.1. <i>Obtenção e fracionamento dos extratos vegetais</i> .....	77
5.2. <i>Perfil cromatográfico em HPLC das frações polares das espécies de Myrcia</i> .....	79
5.3. <i>Fracionamento cromatográfico de Eugenia catharinae</i> .....	85
5.3.1. Fracionamento cromatográfico da fração insolúvel.....	85
5.3.2. Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila.....	93
5.4. <i>Fracionamento cromatográfico de Psidium cattleyanum</i> .....	101
5.5. <i>Fracionamento cromatográfico de Myrcia splendens e Myrcia palustris</i> 103	
5.5.1. Fracionamento cromatográfico das frações acetato de etila de <i>M. splendens</i> e <i>M. palustris</i> .....	103

5.5.2. Fracionamento cromatográfico da fração butanol de <i>M. palustris</i> ...	104
5.6. Perfis das frações acetato de etila de <i>M. palustris</i> , <i>E. catharinae</i> e <i>P. cattleyanum</i> pelo método HPLC-SPE- $^{13}\text{C}$ NMR acoplado a ensaios de alta resolução.....	105
5.7. Estudo Biológico.....	111
5.7.1. Atividade tóxica frente a larvas de <i>Artemia salina</i> Leach.....	111
5.7.2. Determinação do conteúdo de fenólicos e flavonóides e ensaios antioxidantes .....	114
5.7.3. Inibição da enzima acetilcolinesterase .....	122
5.7.4. Atividade antimicrobiana .....	126
5.7.4.1. Atividade antibacteriana .....	126
5.7.4.2. Atividade antifúngica de <i>M. splendens</i> e <i>M. palustris</i> .....	129
5.7.5. Atividade Anti-inflamatória de <i>M. splendens</i> e <i>M. palustris</i> .....	135
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>141</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>145</b>
<b>ANEXO 1. Espectro de IV (KBr) do Composto C-1.....</b>	<b>170</b>
<b>ANEXO 2. Espectro de RMN <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>) do Composto C-1 ....</b>	<b>171</b>
<b>ANEXO 3. Espectro de APT (100 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>) do Composto C-1 .....</b>	<b>172</b>
<b>ANEXO 4. Espectro de IV (KBr) da mistura de composto M-1.....</b>	<b>173</b>
<b>ANEXO 5. Espectro de RMN <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>) da mistura de compostos M-1 .....</b>	<b>174</b>
<b>ANEXO 6. Espectro de RMN <math>^{13}\text{C}</math> (100 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>) da mistura de compostos M-1 .....</b>	<b>175</b>
<b>ANEXO 7. Espectro de IV (KBr) do Composto C-4.....</b>	<b>176</b>

<b>ANEXO 8. Espectro de RMN <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) do Composto C-4..</b>	<b>177</b>
<b>ANEXO 9. Espectro de RMN <math>^{13}\text{C}</math> (100 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) do Composto C-4.</b>	<b>178</b>
<b>ANEXO 10. Espectro de IV (KBr) do Composto C-5.....</b>	<b>179</b>
<b>ANEXO 11. Espectro de RMN <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) do Composto C-5</b>	<b>180</b>
<b>ANEXO 12. Espectro de IV (KBr) do Composto C-6.....</b>	<b>181</b>
<b>ANEXO 13. Espectro de RMN <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, Py) do Composto C-6.....</b>	<b>182</b>
<b>ANEXO 14. Espectro de RMN <math>^{13}\text{C}</math> (100 MHz, Py) do Composto C-6.....</b>	<b>183</b>
<b>ANEXO 15. Espectro de DEPT135 (Py) do Composto C-6 .....</b>	<b>184</b>
<b>ANEXO 16. Espectro de alta resolução ESI-EM(-) do Composto C-6 .....</b>	<b>185</b>
<b>ANEXO 17. Espectro de IV (KBr) do Composto C-7.....</b>	<b>186</b>
<b>ANEXO 18. Espectro de RMN <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) do Composto C-7</b>	<b>187</b>
<b>ANEXO 19. Espectro de RMN <math>^{13}\text{C}</math> (100 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) do Composto C-7</b>	<b>188</b>
<b>ANEXO 20. Espectro de RMN <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) do Composto C-8</b>	<b>189</b>
<b>ANEXO 21. Espectro de RMN <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) da mistura M-2 ...</b>	<b>190</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários produzidos por plantas tiveram um papel fundamental na química orgânica sintética moderna e conseqüentemente no desenvolvimento das áreas farmacêutica e agroindustrial. Desses estudos fitoquímicos foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que até hoje ainda são muito empregados no tratamento de muitas doenças, como por exemplo, a Aspirina<sup>®</sup>, obtida de *Salix* sp., a morfina, obtida de *Papaver somniferum* e o taxol<sup>®</sup>, obtido de *Taxus brevifolia*.

A descoberta de componentes de origem vegetal, bem como seus mecanismos de ação biológica, vem sendo um dos maiores desafios para a química, bioquímica e a farmacologia. É impressionante o fato destes produtos encontrados na natureza revelarem uma imensa gama de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas; apesar do aumento de estudos nesta área, o que se observa é que apenas cerca de 20 % das espécies vegetais existentes foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (MARQUES, 2000).

Contudo, é visível o crescente interesse da indústria farmacêutica na produção de agentes terapêuticos de origem natural, inclusive o Brasil, que apresenta grande biodiversidade. Entre os países da América Latina, somente o Brasil detêm cerca de 1/5 das plantas e microrganismos do planeta. Porém, apesar de toda diversidade natural, no Brasil, 63% dos medicamentos disponíveis são consumidos por apenas 20% da população, o restante possui como única fonte terapêutica o uso de remédios caseiros à base de plantas medicinais (SACRAMENTO, 2009).

Devido à grande quantidade de espécies ainda não exploradas do ponto de vista fitoquímico, estudos quimiotaxonômicos são incentivados. Para que se consiga um grande número de informações quimiotaxonômicas dessas espécies, antes que estas entrem em extinção, é necessário o uso de técnicas de análise rápidas e eficazes. A técnica hífenada de “cromatografia de alta eficiência - extração em fase sólida - ressonância magnética nuclear” (HPLC-SPE-RMN) vem crescendo como ferramenta analítica no ramo de produtos naturais nos principais grupos de pesquisa devido à possibilidade de

uma análise direta e rápida de extratos brutos utilizando-se para isso a mínima quantidade de material vegetal.

Diante disso, a pesquisa fitoquímica realizada juntamente com o biomonitoramento de extratos vegetais se mostra viável e extremamente importante, não só para a conservação da flora local, mas também para a indústria química e farmacêutica na descoberta de novos protótipos para a síntese de compostos com atividade biológica mais potente e com menos efeitos adversos.

A família Myrtaceae destaca-se como uma das mais abundantes e diversificadas nos ecossistemas brasileiros, sendo ainda pouco estudada do ponto de vista fitoquímico e biológico. Portanto, neste trabalho, serão estudadas quatro espécies da família Myrtaceae, especificamente do gênero *Myrcia*, *Eugenia* e *Psidium*; espécies da Flora catarinense encontradas próximas às estradas de regiões litorâneas, às quais serão investigadas sob o ponto de vista fitoquímico e biológico.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Família Myrtaceae

A família Myrtaceae é uma das mais características da flora brasileira, apresentando potencial e significativo interesse econômico para o Brasil. Entre suas espécies são encontrados vegetais medicinais, ornamentais, produtores de madeiras e de frutos comestíveis como é o caso das espécies de *Eucalyptus* utilizadas para produzir pasta de celulose, usada na fabricação de papel, carvão vegetal e madeira. A família está inserida na ordem Myrtiliflorae (Myrtales) e compreende cerca de 150 gêneros com aproximadamente 5.500 espécies, sendo a segunda maior família da ordem, ficando atrás apenas da família Melastomataceae (WILSON *et al.*, 2011). Estão distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, com centros de diversidade na América Tropical e na região da Oceania e com poucas espécies ocorrendo na África (CRONQUIST, 1981; BARROSO, 1991; WILSON *et al.*, 2001).

As Myrtaceae são plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com folhas inteiras, de disposição alternada ou oposta e às vezes oposta cruzada, com estípulas muito pequenas. As folhas apresentam glândulas oleíferas. As flores são em geral brancas ou às vezes vermelhas. Produzem frutos baciformes ou capsular loculicida (JOLY, 1966).

As Myrtaceae brasileiras caracteristicamente possuem o tronco de casca lisa, separando-se todo o ano o ritidoma, que se renova com cada estação de crescimento (LIMBERGER *et al.*, 2004).

Neste trabalho serão estudadas quatro espécies da família Myrtaceae representada por três diferentes gêneros, *Myrcia*, *Eugenia* e *Psidium*.

### 2.2. Gênero *Myrcia*

O gênero *Myrcia* é um dos maiores gêneros americanos de Myrtaceae, com mais de 300 espécies distribuídas do México até o Sul do Brasil, sendo 17 dessas espécies encontradas no Sul do Brasil (MARCHIORI & SOBRAL, 1997). O gênero *Myrcia* é constituído por subarbustos, arbustos ou árvores

que apresentam inflorescências tirso, tirsóides ou panículas. Suas flores geralmente se dispõem em grupos de três em três, todas sésseis (diretamente inseridas, sem pedículo ou haste de sustentação) (BARROSO, 1991).

Espécies do gênero *Myrcia* têm sido utilizadas na medicina popular como adstringentes, diuréticos, para estancar hemorragias e no tratamento de hipertensão, úlceras e principalmente de *diabetes mellitus*, (RUSSO, et al, 1990). As espécies de *Myrcia* são conhecidas popularmente como “planta insulina” destacando-se *M. multiflora* (pedra-ume-caá), utilizada como hipoglicemiante na forma de infusão ou decocto (BRITO & LANETTI, 1996).

*Myrcia splendens* (Sw.) DC., conhecida popularmente como guamirim e folha-miúda (Figura 1), tem ampla distribuição sendo observada desde o México até o Sul do Brasil. Existe algumas sinonímias para esta espécie, como *M. acutata* DC., *M. rostrata* DC. e *M. communis* Berg, *M. fallax* (Rich.) DC. (OLIVEIRA-FILHO & FONTES 2000; MORAIS & LOMBARDI, 2006).

*Myrcia palustris* DC., conhecida popularmente como pitangueira-domato, murta-do-brejo e baga-de-sabiá (Figura 1), é uma espécie nativa encontrada principalmente no sul e Sudeste de Brasil. É comumente encontrada na literatura como sinônimos de *M. banisteriifolia* DC., *M. garopabensis* Cambess., *Gomidesia palustris* (DC.) Kausel, *G. banisteriifolia* (DC.) O.Berg, *G. gardneriana* O.Berg, *G. garopabensis* (Cambess.) D.Legrand (SOBRAL, 2010).



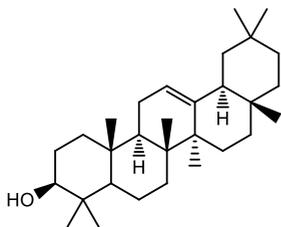
Figura 1. Folhas das espécies vegetais *Myrcia splendens* e *Myrcia palustris*

### 2.2.1. Química do gênero *Myrcia*

Há poucos relatos sobre a fitoquímica das espécies *M. splendens* e *M. palustris*. Em relação ao gênero destaca-se a presença de triterpenos, acetofenonas e principalmente os flavonoides glicosilados. Muitos são os estudos realizados com os óleos essenciais de espécies do gênero *Myrcia* apresentando um elevado conteúdo de sesquiterpenos cíclicos e quantidades variáveis de monoterpênos e compostos alifáticos (ZOGHBI *et al.*, 2003; COLE *et al.*, 2008; DE CERQUEIRA *et al.*, 2009; STEFANELLO *et al.*, 2010; TENÓRIO *et al.*, 2011).

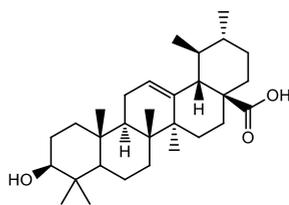
A tabela 1 apresenta os principais compostos isolados nas folhas e galhos de espécies do gênero *Myrcia*. Pode-se observar que entre os triterpenos, os principais esqueletos encontrados são, em ordem decrescente: oleaneno, lupeno e urseno. Observa-se também a presença de esteroides. Considerando os flavonoides, metabólitos advindos da rota do ácido chiquímico e acetato, estes se encontram principalmente na forma de heterosídeos, sendo que as agliconas mais frequentes são os núcleos flavonol, flavona e flavanona. Além disso, foram isoladas algumas acetofenonas.

**Tabela 1. Compostos encontrados em espécies do gênero *Myrcia***



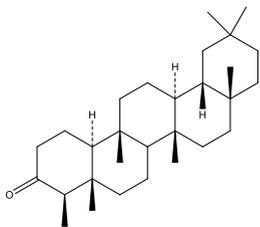
$\beta$ -amirina [1]

Espécie: *M. citrifolia* (folhas)  
Referência: GOTTLIEB *et al.*, 1972



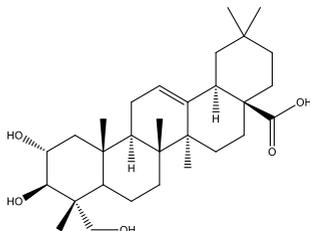
ácido ursólico [2]

Espécie: *M. variabilis* (folhas)  
Referência: CUNHA *et al.*, 2009



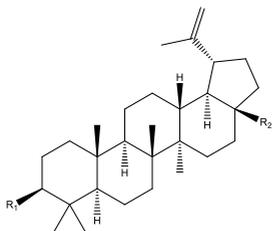
Friedelina [3]

Espécie: *M. rotundifolia* (galhos)  
Referência: DE CERQUEIRA *et al.*, 2002.



ácido arjunólico [4]

Espécie: *M. rotundifolia* (galhos)  
Referência: DE CERQUEIRA *et al.*, 2002.

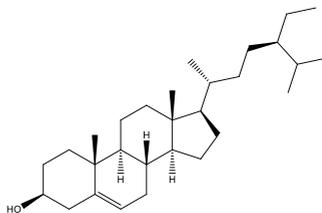


Ácido betulínico: R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = CO<sub>2</sub>H [5]

Lupeol: R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub> [6]

Lupenona: R<sub>1</sub> = =O; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub> [7]

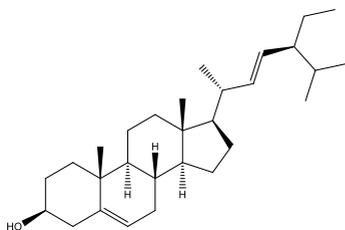
Espécie: *M. rotundifolia* (galhos)  
Referência: DE CERQUEIRA *et al.*, 2002.



$\beta$ -sitosterol [8]

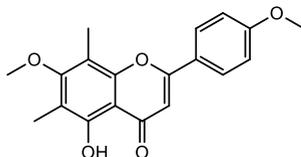
Espécie: *M. rotundifolia* (galhos)  
Referência: DE CERQUEIRA *et al.*, 2002.

**Tabela 1. Compostos encontrados em espécies do gênero *Myrcia* (continuação)**



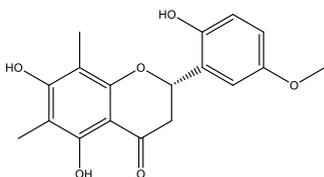
stigmasterol [9]

Espécie: *M. rotundifolia* (galhos)  
Referência: DE CERQUEIRA *et al.*, 2002.



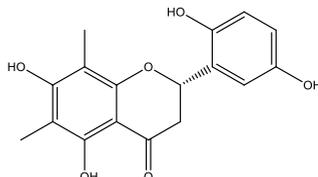
eucaliptina [10]

Espécie: *M. citrifolia* (folhas)  
Referência: GOTTLIEB *et al.*, 1972



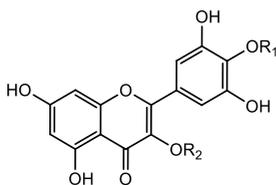
metoximatteucina [11]

Espécie: *M. multiflora* (folhas)  
Referência: YOSHIKAWA *et al.*, 1998



myriacetina [12]

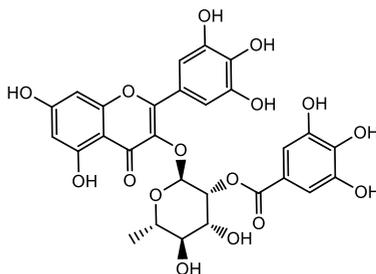
Espécie: *M. multiflora* (folhas)  
Referência: YOSHIKAWA *et al.*, 1998



O- glicosídeos de miricetina [13]: R<sub>1</sub>=H ; R<sub>2</sub>= H

miricitrina: R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>= O-Rha [14]

mearnsitrina: R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>= O-Rha [15]



1-desmantina [16]

Espécie: <sup>a</sup>*M. multiflora* (folhas) (14)

<sup>b</sup>*M. uniflora* (folhas) (14 e 15)

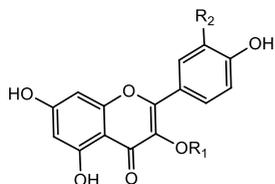
<sup>c</sup>*M. bella* (folhas) (13)

Referência: <sup>a</sup> YOSHIKAWA *et al.*, 1998;

<sup>b</sup> FERREIRA *et al.*, 2006; <sup>c</sup> SALDANHA *et al.*,  
2013

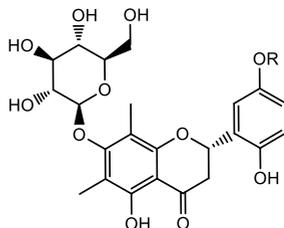
Espécie: *M. multiflora* (folhas)  
Referência: YOSHIKAWA *et al.*, 1998

**Tabela 1. Compostos encontrados em espécies do gênero *Myrcia* (continuação)**



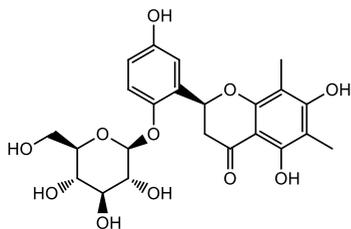
O- glicosídios de quercetina [17]: R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>= OH  
 quercitrina: R<sub>1</sub>= O-Rha; R<sub>2</sub>= OH [18]  
 guaijaverina: R<sub>1</sub>= O-Arabinose; R<sub>2</sub>= OH [19]  
 avicularina: R<sub>1</sub>= O-Arabinofuranose; R<sub>2</sub>= OH [20]  
 juglandina: R<sub>1</sub>= O-Arabinofuranose [21]

Espécie: <sup>a</sup>*M. multiflora* (folhas) (18 e 19)  
<sup>b</sup>*M. bella* (folhas) (17)  
<sup>c</sup>*M. tomentosa* (folhas) (20 e 21)  
 Referência: <sup>a</sup>YOSHIKAWA *et al.*, 1998  
<sup>b</sup>SALDANHA *et al.*, 2013  
<sup>c</sup>IMATOMI *et al.*, 2013



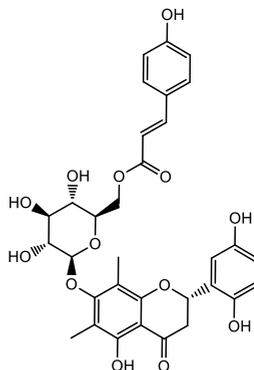
miriciacitrina I : R = H [22]  
 miriciacitrina II: R = CH<sub>3</sub> [23]

Espécie: *M. multiflora* (folhas)  
 Referência: YOSHIKAWA *et al.*, 1998



miriciacitrina III [24]

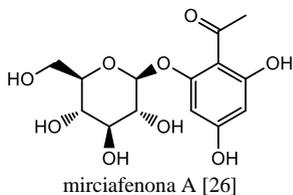
Espécie: *M. multiflora* (folhas)  
 Referência: MATSUDA *et al.*, 2002



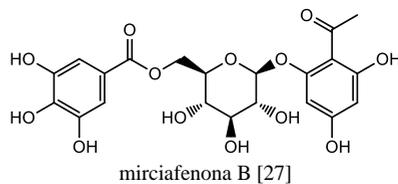
miriciacitrina IV [25]

Espécie: *M. multiflora* (folhas)  
 Referência: MATSUDA *et al.*, 2002

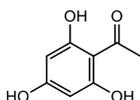
**Tabela 1. Compostos encontrados em espécies do gênero *Myrcia* (continuação)**



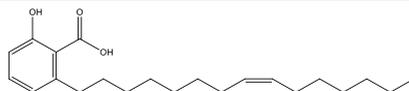
Espécie: *M. multiflora* (folhas)  
Referência: YOSHIKAWA *et al.*, 1998



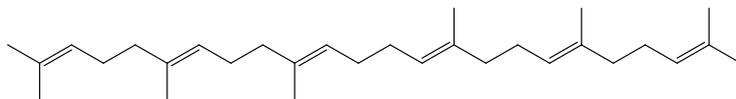
Espécie: *M. multiflora* (folhas)  
Referência: YOSHIKAWA *et al.*, 1998



Espécie: *M. multiflora* (folhas)  
Referência: FERREIRA *et al.*, 2011



Espécie: *M. multiflora* (folhas)  
Referência: YOSHIKAWA *et al.*, 1998



Espécie: *M. rotundifolia* (galhos)  
Referência: DE CERQUEIRA *et al.*, 2002.

### 2.2.2 Estudos biológicos do gênero *Myrcia*

As espécies do gênero *Myrcia* apresentam diferentes atividades biológicas relatadas na literatura. De modo geral, as atividades mais descritas são as relacionadas a diabetes o que vem a comprovar o seu uso popular. *M. salicifolia*, *M. citrifolia*, *M. uniflora*, *M. multiflora* e *M. shaerocarpa*, por exemplo, são amplamente utilizadas na medicina popular para o tratamento de diabetes e por isso são conhecidas como "planta insulina" ou "insulina vegetal". As atividades biológicas de espécies do gênero *Myrcia* estão representadas na tabela 2.

**Tabela 2. Atividades biológicas de extratos e compostos isolados de espécies do gênero *Myrcia***

<b>Espécie</b>	<b>Parte(s) do vegetal/composto(s)</b>	<b>Atividade(s)</b>	<b>Referência</b>
<i>M. uniflora</i>	quercitrina [18], 1-desmantina [16] e guaijaverina [19]	Inibitória da aldose redutase	MATSUDA et al., 2002
	mearnsitrina [15] e miricitrina [14]	Inibitória da tiroide peroxidase	FERREIRA et al., 2006
<i>M. variabilis</i>	ácido ursólico [2]	tripanocida	CUNHA et al., 2009
<i>M. myrtifolia</i>	óleo essencial das folhas	antimicrobiana e tóxica frente a <i>A. salina</i>	DE CERQUEIRA et al., 2007
<i>M. multiflora</i>	2',4', 6'- trihidroxiacetofenona[28]	Atividade antioxidante e efeito hepatoprotetor por indução de CCl <sub>4</sub> em ratos	FERREIRA et al., 2010
		hipolipemiantes e antiobesidade	FERREIRA et al., 2011
	mirciacitrina I, II, III, IV [22-25]	Inibitória da aldose redutase	MATSUDA et al., 2002
	mirciafenona B [27]	Inibitória da aldose redutase e alfa-glucosidase.	YOSHIKAWA et al., 1998

**Tabela 2. Atividades biológicas de extratos e compostos isolados de espécies do gênero *Myrcia* (continuação)**

<i>M. obtecta</i>	extrato etanólico das folhas	antioxidante usando DPPH	SALVADOR et al., 2011
<i>M. laruoiteana</i>			
<i>M. laruoiteana</i>	óleo essencial das frutas	citotóxica in vitro	STEFANELLO et al., 2010
<i>M. aff fosteri</i> <i>M. ovata</i>	óleo essencial das folhas	antibacteriana	TENÓRIO et al., 2011
<i>M. ovata</i>	óleo essencial das folhas	larvicida	FURTADO et al., 2005
<i>M. variabilis</i>	extrato etanólico dos frutos	triptanocida	CUNHA et al., 2009
<i>M. pubiflora</i>	óleo essencial das folhas	Antinociceptiva pelo modelo de contorções induzidas por ácido acético e anti-inflamatória pelo modelo de migração de leucócitos.	ANDRADE et al., 2012
<i>M. tomentosa</i>	Extrato acetato de etila das folhas e avicularina [20]e juglandina [21]	fitotóxica	IMATOMI et al., 2013

### 2.3. Gênero *Eugenia*

O gênero *Eugenia* possui aproximadamente 1000 espécies (GOVAERTS *et al.*, 2008), ocorrendo desde o México e Caribe até o Norte da Argentina e são estimadas cerca de 350 espécies para o Brasil (LANDRUM & KAVASAKI, 1997).

As plantas desse gênero são caracterizadas por árvores e arbustos verdes anualmente e por possuir o fruto esférico de até três centímetros de diâmetro (AURICCHIO *et al.* 2003). Muitas espécies do gênero *Eugenia* são apreciadas por seus frutos comestíveis como, por exemplo, a pitanga (*E. uniflora*), a jabuticaba (*E. edulis*), o jambolão (*E. jabolana*) e a grumixama (*E. brasiliensis*) (CONSOLINI *et al.*, 1999; FISCHER *et al.*, 2005).

As espécies do gênero *Eugenia* são amplamente utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades. A espécie *Eugenia uniflora*, conhecida como pitanga, foi citada pela medicina popular como anti-hipertensiva, diurética e tem sido usada para desordens gástricas (CONSOLINI, *et al.*, 1999); também como eupéptica, carminativa e digestiva (MEI-HSIEN *et al.*, 1997). Seu uso em infecções também foi relatado (DE SOUZA *et al.*, 2004). Os frutos de jambolão (*Eugenia jabolana*) são usados como adstringentes (REVILLA, 2002), estomáquicos, diuréticos e antidiabéticos (TIMBOLA *et al.*, 2002). A jabuticaba (*Eugenia edulis*) é usada na medicina tradicional em inflamações e infecções (HUSSEIN *et al.*, 2003), bronquites, coqueluche e tosses (REVILLA, 2002).

*Eugenia catharinae*, conhecida como “guamirim mole” (Figura 2), é um arbusto exclusivo da restinga litorânea, com vasta e expressiva dispersão pelo litoral do estado de Santa Catarina. Caracteriza-se como uma espécie heliófila, própria de terrenos baixos, planos e arenosos do litoral, menos secos do que as dunas, formando agrupamentos vegetais. No Brasil a espécie está limitada aos estados de Santa Catarina e Paraná e é utilizada na forma de lenha (KLEIN, 1990).



Figura 2. Folhas da espécie *Eugenia catharinae*

### 2.3.1. Química do gênero *Eugenia*

O gênero *Eugenia* é conhecido por apresentar uma grande quantidade de compostos fenólicos com capacidade antioxidante e, dentre esses, podemos citar os taninos, ácidos fenólicos, antocianinas, chalconas e flavonoides (EINBOND *et al.* 2004).

Os taninos hidrolisáveis são bem representados no gênero. Em *E. caryophyllata* (cravo-da-india) (TANAKA *et al.* 1996), *E. hyemalis* (BOKESCH *et al.*, 2008) e *E. jambos* (YANG *et al.* 2000) foram encontrados taninos hidrolisáveis, como por exemplo a casuarinina [31] (Figura 3).

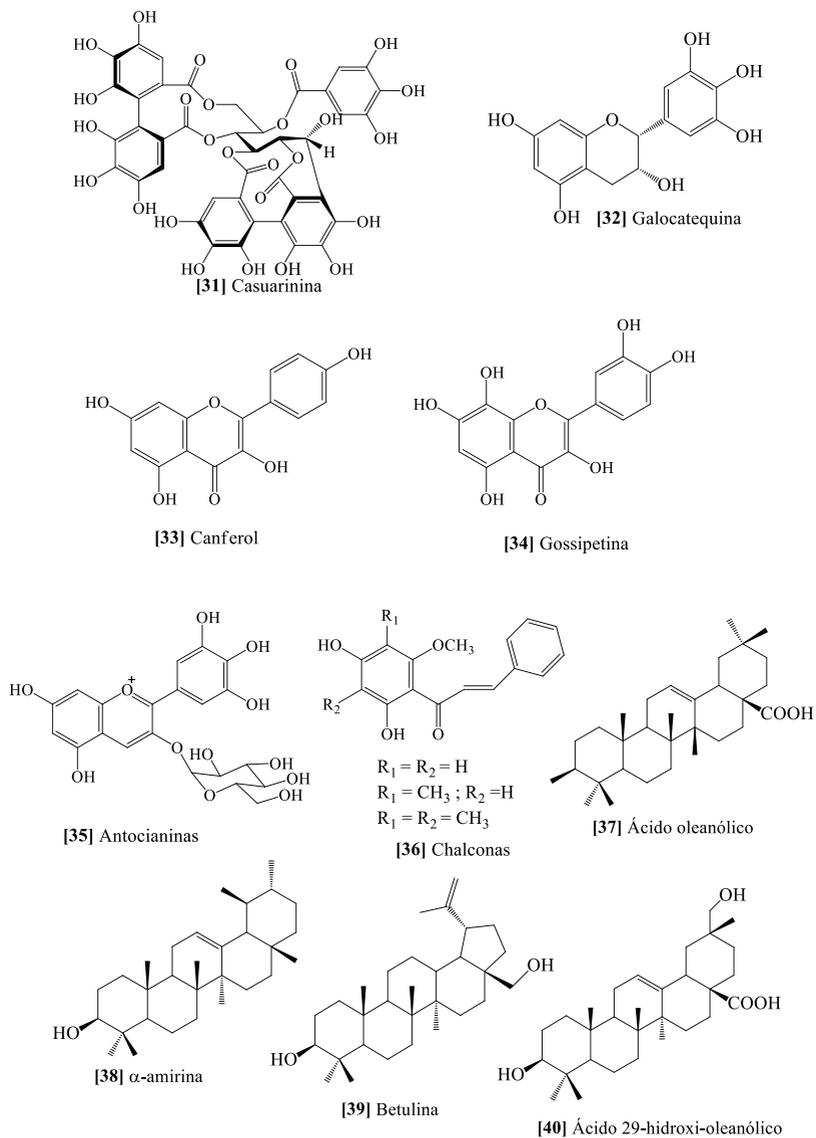
Os flavonoides são a classe de maior destaque no gênero *Eugenia*. Os flavonoides mais representativos possuem o núcleo flavonol, embora se encontrem, também, em poucas espécies o núcleo flavanol, dentre os quais foram isolados, galocatequina [32] dos frutos de *E. uniflora* (EINBOND *et al.*, 2004) e epi-galocatequina-3-O-galoil de *E. edulis* (HUSSEIN *et al.*, 2003); e flavanona pinocembrina de *E. javanica* (SIMIRGIOTIS *et al.*, 2008). Em relação aos flavonoides do tipo flavonol o núcleo mais frequente é a quercetina [17], ou 3,5,7,3',4' pentahidroxi-flavona, que ocorrem principalmente na forma glicosídica substituídos na posição 3 da aglicona. As espécies *E. brasiliensis*, *E. aggregata*, *E. luschnathiana*, *E. reinwardtiana* (REYNERTSON *et al.*, 2008), *E. edulis* (HUSSEIN *et al.*, 2003), *E. jambolana* (MAHMOUD *et al.*, 2001) e *E. javanica* apresentaram quercetina

na forma livre e glicosilada. Flavonoides com o grupo miricetina [13] ou 3,5,7,3',4',5' hexahidroxiflavona são encontrados na forma livre e glicosídica em *E. jambolana* (TIMBOLA *et al.* 2002) e *E. uniflora* (SCHMEDA-HIRSCHMAN *et al.*, 1987); e, na forma glicosídica em *E. brasiliensis*, *E. aggregata*, *E. reinwardtiana* (REYNERTSON *et al.*, 2008), *E. edulis* (HUSSEIN *et al.*, 2003), *E. javanica* (SIMIRGIOTIS *et al.*, 2008) e *E. jambos* (SLOWING *et al.*, 1994) (Figura 3).

Outros flavonoides contendo o núcleo flavonol ligado a açúcar ou não, também podem ser encontrados como o canferol ou 3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona [33], encontrado na forma livre na espécie *E. jambolana* (MAHMOUD *et al.*, 2001) e na forma glicosídica nas espécies *E. edulis* (HUSSEIN *et al.*, 2003), *E. hyemalis* (BOKESCH *et al.*, 2008) e o núcleo gossipetina ou 3,5,7,8,3',4'-hexahidroxiflavona [34] encontrada na forma livre e glicosídica na espécie *Eugenia edulis* (HUSSEIN *et al.*, 2003) (Figura 3).

Uma subclasse de flavonoides, importantes na pigmentação de flores e frutos e que apresentaram ação antioxidante, são as antocianidinas [35] e elas aparecem no gênero *Eugenia* substituídas na posição 3 da aglicona (Figura 3), nas espécies *Eugenia brasiliensis* (REYNERTSON *et al.*, 2008), *Eugenia myrtifolia* (LONGO *et al.*, 2007) e *Eugenia umbelliflora* (KUSKOSKI *et al.*, 2003).

As chalconas [36], que são intermediários na biossíntese de flavonoides, foram encontradas em *E. javanica* : 2,4-dihidroxi-3,5-dimetil-6-metoxichalcona, 2,4-dihidroxi-3-metil-6-metoxichalcona, 2,4-dihidroxi-6-metoxichalcona, (SIMIRGIOTIS *et al.* 2008) (Figura 3).



**Figura 3. Compostos encontrados em espécies do gênero *Eugenia***

Os compostos terpênicos são a outra classe mais frequente observada no gênero *Eugenia*, sendo representados principalmente por triterpenos e alguns esteroides. Os compostos triterpênicos mais comumente observados no gênero são os pentacíclicos com esqueleto oleanano (MEYRE-SILVA *et al.* 2009) lupano (LUNARDI *et al.* 2001) e, em menor proporção, os triterpenos de esqueleto ursano (FRIGHETTO *et al.* 2005). Os triterpenos pentacíclicos com o esqueleto olean-12-eno como ácido oleanólico [37], taraxerol e  $\beta$ -amirina [1] foram encontrados em *E. uniflora* (RAJASEKARAN *et al.* 1988) e *E. umbelliflora* (MEYRE-SILVA *et al.* 2009), respectivamente. Em *E. brasiliensis* (FRIGHETTO *et al.* 2005) foi encontrado o ácido ursólico [2], um triterpeno pentacíclico com esqueleto ursan-12-eno. E em *E. umbelliflora* (MEYRE-SILVA *et al.* 2009),  $\alpha$ -amirina [38]. Finalmente triterpenos pentacíclicos com o esqueleto lupan-23-eno como o ácido betulínico [5] e betulina [39], foram encontrados em *E. moraviana* (LUNARDI *et al.* 2001) e *E. florida* (BARRETO *et al.*, 2013). Recentemente, um trabalho relatando o isolamento de sete compostos da espécie *E. brasiliensis* foi publicado por nosso grupo, entre eles seis compostos já conhecidos em espécies do gênero *Eugenia* e um inédito na família Myrtaceae, o ácido 29-hidroxi-oleanólico [40] (MAGINA *et al.*, 2012) (Figura 3).

Entre os esteroides mais comumente encontrados no gênero *Eugenia* estão o  $\beta$ -sitosterol [8] encontrados em *E. moraviana* (LUNARDI *et al.* 2001) e  $\beta$ -sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo de *E. sandwicensis* (GU *et al.* 2001), Tabela 1.

### **2.3.2. Estudos biológicos do gênero *Eugenia***

As espécies do gênero *Eugenia* apresentam diversas atividades biológicas descritas na literatura. Entre elas podemos destacar a atividade antimicrobiana, antioxidante, antidiabética e anti-inflamatória, que comprovam a eficácia do uso das plantas deste gênero na medicina popular. Há cerca de 1000 espécies pertencentes ao gênero *Eugenia*, dentre as quais, menos de 10 % foram estudadas quimicamente e biologicamente. As principais atividades de espécies do gênero *Eugenia* estão representadas na

tabela 3. Foram priorizados os extratos e frações das folhas das espécies, bem como os compostos isolados, devido a grande quantidade de trabalhos publicados.

**Tabela 3. Atividades biológicas de extratos e compostos isolados de espécies do gênero *Eugenia***

<b>Espécie</b>	<b>Extrato/composto(s)</b>	<b>Atividade(s)</b>	<b>Referência</b>
<i>E. brasiliensis</i>	Extratos etanólico e compostos das folhas	Anti-inflamatória	PIETROVSKI, et al., 2008
	Extrato bruto das folhas	Antidepressiva	COLLA et al., 2012
	Frações das folhas e compostos isolados	Inibitória da acetilcolinesterase e toxica frente <i>A. salina</i>	MAGINA et al., 2012
	Extrato bruto e frações	Antioxidante	MAGINA et al., 2010
<i>E. dysenterica</i>	Extrato bruto das folhas	Inibitória da $\alpha$ -amilase e $\alpha$ -glicosidase	SOUZA et al., 2012
<i>E. hyemalis</i>	Derivados da hidroquinona	Inibição do HIV-1 RNase H in vitro	BOKESCH et al., 2008
<i>E. jambolana</i>	Extrato etanólico das folhas	Antimicrobiana	COUTINHO et al, 2009
	Extrato hidroalcolico	Antinociceptiva	AVILA-PEÑA et al., 2007.
	Extratos metanólico e diclorometano das folhas	Protetora do DNA exposto à radiação gama	JAGETIA & BALIGA 2002

**Tabela 3. Atividades biológicas de extratos e compostos isolados de espécies do gênero *Eugenia* (continuação)**

<i>E. jambos</i>	Extrato 70% acetona das folhas e taninos hidrolisáveis	Ação antitumoral em células HL-60 (leucemia) e SK-HEP-1	YANG et al., 2000
	Extrato metanólico das folhas	Anti-inflamatória	SLOWING et al., 1994
<i>E. stipitata</i>	Extrato etanólico	Antimutagênica e antígenotóxicas	NERI-NUMA et al., 2013
<i>E. umbelliflora</i>	Extrato metanólico das folhas e frutos	Antibacteriana (bactérias Gram-positivos)	MACHADO et al., 2005
	Extrato metanólico das folhas	Proteção gástrica	MEYRE-SILVA et al., 2009
<i>E. uniflora</i>	Infusão de folhas frescas	Anti-inflamatória	SCHAPOVAL et al., 1994
	Extrato aquoso das folhas	Anti-hipertensivo, efeito inotrópico negativo, ação vasodilatadora e levemente diurética	CONSOLINI et al., 1999
	Flavonoides [13], [14], [17] e [18]	Inibidora da enzima xantina oxidase, relacionada à artrite	SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987

**Tabela 3. Atividades biológicas de extratos e compostos isolados de espécies do gênero *Eugenia* (continuação)**

<i>E. uniflora</i>	Extratos n-hexano, acetato de etila, clorofórmico e metanólico das folhas.	Tripanocida	ADEWUNMI et al., 2001
	Extratos etanólico das folhas	Antihiperlipidêmica e antihipertriglicéridêmica	ARAI et al., 1999
	Extrato metanólico das partes aéreas	Antimicrobiana	DE SOUZA et al., 2004

## 2.4. Gênero *Psidium*

O gênero *Psidium* é representado por arbustos, raramente árvores, compreendendo aproximadamente 130 espécies, distribuídas por toda América tropical desde o Paraguai, estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul até as Antilhas. O maior número de espécies se encontra da Amazônia até o Sul do México, ocorrendo em Santa Catarina cerca de 9 espécies (KLEIN, 1990). De acordo com Corrêa (1984), as espécies nativas de *Psidium* da região Sul do Brasil seriam *P. cattleianum* Sab., *P. incanescens* Martins, *P. grandifolium* Martins, *P. arboreum* Vell., e *P. humile* Vell. Plantas deste gênero possuem um porte arbustivo ou arbóreo, com caule tortuoso e casca lisa, folhas persistentes e coriáceas e os frutos são do tipo baga (MIELKE *et al.*, 1990)

Espécies do gênero *Psidium* têm sido utilizadas na medicina popular sob a forma de chás para combater a diarreia, tratamento de disenterias e como cicatrizante (ALMEIDA *et al.* 1998). As folhas de goiabeira (*Psidium guajava*), principal representante do gênero, são utilizadas para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, além da propriedade hipoalérgica dos frutos (STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

*Psidium cattleianum* Sabine, conhecido como araçá (Figura 4), ocorre desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul onde aparece na depressão central, encosta inferior do Nordeste, litoral, campos de cima da serra, encosta superior do Nordeste e encosta do Sudeste (SANCHOTENE, 1989). As folhas da espécie são utilizadas na medicina popular como anti-hemorrágica, antidiarreica (BACKES & IRGANG, 2004), antiespasmódicas e antidisentéricas (ALICE *et al.*, 1995). Corrêa (1984) e Marcuzzo (1998) descrevem o uso das folhas e cascas contra problemas de fluxo intestinal e como diuréticos.



Figura 4. Frutos e folhas de *P. cattleianum*.

#### 2.4.1. Química do gênero *Psidium*

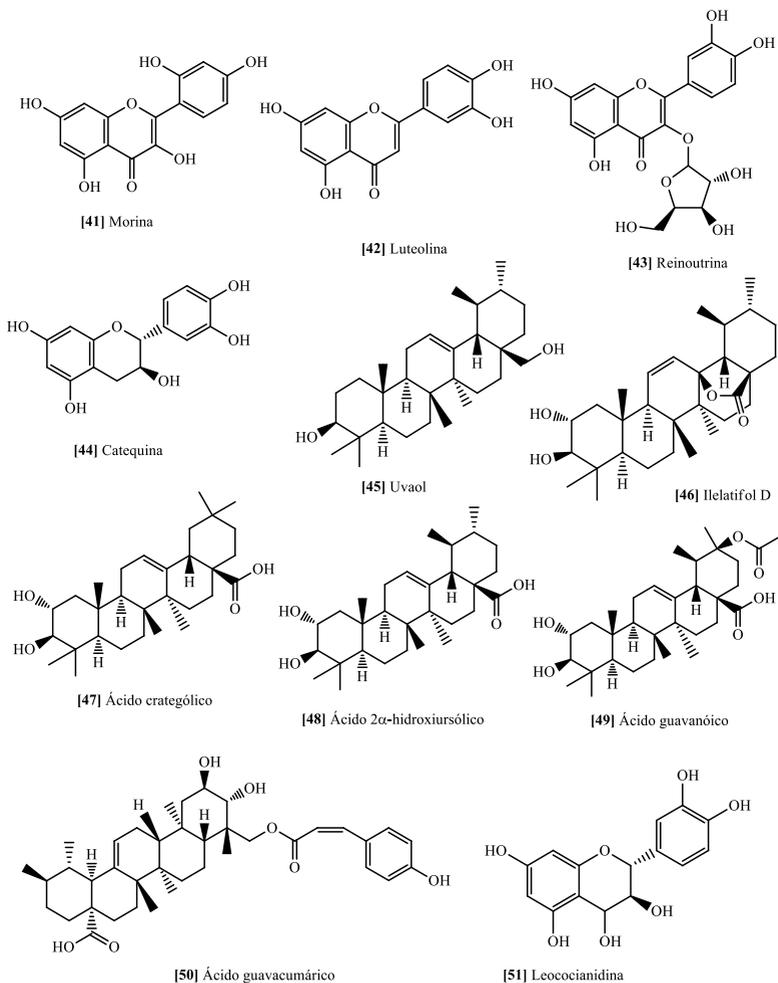
Há poucos relatos sobre os aspectos químicos e biológicos de *P. cattleianum*. Alguns trabalhos sobre estudos com óleos essenciais foram relatados (PINO *et al.* 2001; LIMBERGER *et al.*, 2001), no entanto a respeito de isolamento e identificação de compostos há apenas um trabalho publicado relatando o isolamento de sete flavonoides das folhas coletadas na Polinésia Francesa. Entre os flavonoides, encontram-se as agliconas morina [41], luteolina [42], canferol [33], miricetina [13]; e os glicosídeos guajaverina [20], reinoutrina [43] e quercitrina [18] (HO *et al.*, 2012). Também um trabalho publicado por nosso grupo, onde foi relatado o isolamento de um esteroide, o  $\beta$ -sitosterol [8] e seu glicosídeo, além dos triterpenos ácidos ursólico [2] e oleanólico [37] e o flavonoide catequina [44] (MORESCO *et al.*, 2012a) Figura 5.

Apesar de a espécie ser pouco estudada, existem vários trabalhos relatando a composição química e atividade biológica de *P. guajava*, principal representante do gênero, e esta espécie apresenta grande quantidade de compostos fenólicos, carotenoides e triterpenoides (GUTIERREZ *et al.*, 2008).

Nos últimos anos uma série de trabalhos foi publicada relatando a composição das folhas de *P. guajava* indicando um elevado teor de compostos triterpênicos, principalmente da série ursano e oleanano, tais

como: uvaol [45], Irelatifol D [46], além dos ácidos oleanólico [37], ursólico [2] e cratególico [47] (IWU, 1993; BEGUM *et al.*, 2002) 2 $\alpha$ -hidroxiursólico [48], guavanólico [49], ácido guavacumárico [50], entre outros (SHU *et al.*, 2009; SHU *et al.*, 2012; SHAO *et al.*, 2012; RAO *et al.*, 2012).

A espécie *P. guajava* apresenta, também, altas concentrações de flavonoides; entre eles, uma série de derivados glicosídicos de quercetina [17] (WU *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2012; FU *et al.*, 2009) e alguns de miricetina [13], morina (FU *et al.*, 2009) além das agliconas leucocianidina [51] (NADKARNI & NADKARNI, 1999), canferol [33] e catequina [44] (LIANG *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2010) Figura 5.



**Figura 5. Compostos encontrados em espécies do gênero *Psidium*.**

#### **2.4.2. Estudos biológicos do gênero *Psidium***

As atividades biológicas relacionadas ao gênero *Psidium* são bastante diversificadas, sendo *P. guajava* a espécie mais estudada. São encontrados estudos que comprovam a eficácia da espécie para o tratamento de diarreia,

disenteria, flatulência e cólica abdominal, comprovando o seu uso na medicina tradicional. No entanto, observa-se certa frequência de trabalhos relatando a atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa para células cancerígenas e outras atividades relacionadas ao tratamento de diabetes. As principais atividades biológicas de espécies do gênero *Psidium* estão representadas na tabela 4.

**Tabela 4. Atividades biológicas de extratos e compostos isolados de espécies do gênero *Psidium***

<b>Espécie</b>	<b>Extrato / composto(s)</b>	<b>Atividade(s)</b>	<b>Referência</b>
<i>P. guajava</i>	Extrato bruto das folhas	Antidiarreica	GUTIERREZ et al., 2008
	Extrato aquoso e alcoólico das folhas e raízes	Antibacteriana	CHAH et al., 2006
	Extrato bruto das folhas	Ação antiacne	QADAN et al., 2005
	Extrato das folhas e cascas do caule	Antiparasitária contras Entamoeba histolytica	TONA et al., 1998
	Infusão das folhas	Antitussígena	JAIARJ et al., 1999
	Extrato aquoso de folhas	Efeito hepatoprotetor	ROY et al., 2006
	Infusão das folhas secas	Antioxidante	QIAN & NIHORIMBERE, 2004; THAIPONG et al., 2005

**Tabela 4. Atividades biológicas de extratos e compostos isolados de espécies do gênero *Psidium* (continuação)**

<i>P. guajava</i>	Óleo essencial das folhas	Ação antitumoral em células DU-145 (câncer de próstata); KB (carcinoma de epiderme bucal) e P388 (leucemia).	CHEN et al. 2007; MANOSROI et al., 2006
	A fração aquosa do extrato das folhas	Antiarrítmica	CONDE et al., 2003
	Extrato das cascas do caule	Anti-hiperglicemiante; hipolipemiantes e hipoglicemiantes	MUKHTAR et al., 2004; MUKHTAR et al. 2006; WANG et al., 2012; LIN & YIN, 2012
	Extrato aquoso das folhas	Anti-inflamatória e analgésica	OJEWOLE, 2006
	Extratos hexano, acetato de etila e metanólico de folhas	Antinociceptivo	SHAHEEN et al., 2000
	Extrato metanólico de folhas	Cicatrizante	CHAH et al., 2006
	Extrato das folhas	Antiobesidade	LI et al., 2012

**Tabela 4. Atividades biológicas de extratos e compostos isolados de espécies do gênero *Psidium* (continuação)**

<i>P. cattleyanum</i>	Óleo essencial das folhas	Antibacteriana e anti-inflamatória	APEL et al., 2006
	Extrato hidroalcoólico das folhas	Analgésica in vivo	ALVARENGA et al., 2013
	Extrato hidroalcoólico das folhas e flavonoides [13], [18], [20], [41- 43]	Antioxidante	HO et al., 2012
<i>P. sartorianum</i>	Extrato metanólico da polpa do fruto	Antifúngica	CAMACHO-HERNANDEZ, et al., 2004
<i>P.friedrichsthalianum</i>	Extrato aquoso da polpa do fruto	Antioxidante e Anti-inflamatória	FLORES et al., 2013

## 2.5. O uso de técnicas hifenadas para análise de produtos naturais

O termo “técnicas hifenadas” refere-se ao acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas com o objetivo de obter uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida que as técnicas convencionais. As técnicas analíticas químicas mais empregadas na análise de produtos à base de plantas medicinais são a cromatografia e a espectroscopia.

O emprego de técnicas hifenadas para análise de produtos naturais teve início com o desenvolvimento de aparelhos de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), os quais são empregados rotineiramente, principalmente na indústria de essências. A grande limitação desta técnica é a possibilidade de analisarmos apenas substâncias que podem ser volatilizadas e, em muitos casos, o emprego do impacto eletrônico na

geração dos íons limita também o uso para substâncias instáveis (CREWS *et al.*, 1998).

O uso das primeiras técnicas acopladas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) possibilitou a análise de moléculas não voláteis e de alto peso molecular utilizando sistemas de detecção como ultravioleta (UV), infravermelho (IV), eletroquímico e de fluorescência, entre outros. O sistema de detecção de UV por arranjo de diodos (DAD), sem dúvida, estimulou o avanço da análise de produtos naturais, pois possibilitou adquirir o espectro de UV de cada substância, fornecendo informações estruturais e, além disso, o baixo preço do equipamento em relação a outras técnicas de detecção foi a principal alavanca para seu sucesso. Contudo, a necessidade de maiores informações estruturais de cada componente das matrizes analisadas levou ao desenvolvimento de técnicas hífenadas mais modernas, como o acoplamento do HPLC com espectrômetro de massas (MS) e com ressonância magnética nuclear (RMN) (PINTO *et al.*, 2002).

O emprego de técnicas HPLC-MS tem sido muito utilizado por grupos de pesquisa em produtos naturais no Brasil. Recentemente, foram identificados flavonoides glicosilados com agliconas do tipo miricetina e quercetina nos frutos de duas variedades de *Eugenia uniflora* utilizando o sistema de análise HPLC-MS/MS (CELLI *et al.*, 2011). Este sistema se baseia na fragmentação dos compostos pelo acoplamento de dois analisadores de massas (MS/MS). No primeiro analisador ocorre a seleção do íon de interesse. Este íon é então introduzido na célula de colisão onde colide com um gás inerte (argônio, nitrogênio, etc) levando à sua fragmentação. Finalmente, os fragmentos obtidos são analisados no segundo instrumento acoplado. Utilizando o mesmo sistema, HPLC-MS/MS, foi possível analisar os tipos de antocianinas presentes nas polpas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart., família Arecaceae) coletadas em Campinas/ SP (ROSSO *et al.*, 2008). Amostras de vinho tinto produzidos em Veranópolis/RS, Londrina/PR e Mauá/PR foram analisadas pela técnica HPLC-DAD-ESI-MS. Este tipo de ionização por "electrospray" (ESI) permitiu a análise de moléculas de elevada massa molecular tais como antocianinas, piranoantocianinas, flavonóis e derivados do ácido hidroxicinâmico presentes nas amostras de vinho (NIXDORF & HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010). Com essa mesma

técnica foi possível identificar uma gama de compostos tais como flavonoides C-glicosilados e derivados de xantona em amostras vegetais de *Syngonanthus nitens* (família Eriocaulaceae) conhecida como “capim dourado”, muito utilizada na fabricação de artesanato no Brasil (PACÍFICO *et al.*, 2011).

O sistema de análise HPLC-MS é, sem dúvida, o método mais sensível e o melhor para a análise e quantificação de compostos (WOLFENDER *et al.*, 1998). No entanto, há ainda limitações no que diz respeito à identificação de novas estruturas. A tecnologia capaz de fornecer informações abrangentes sobre as estruturas desconhecidas de produtos naturais é a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Isso tem alimentado os esforços para hifenizar RMN com métodos cromatográficos, com o intuito de se obter técnicas de análise diretas de HPLC-RMN (ALBERT, 2002; JAROSZEWSKI, 2005).

O acoplamento de HPLC-RMN com extração automatizada *postcolumn* em fase sólida (SPE) é uma técnica bastante nova que permitiu um aumento da quantidade de material disponível para análise de RMN a dezenas de microgramas, compensando a baixa sensibilidade da espectroscopia de RMN em comparação com outras técnicas de HPLC-RMN tais como, “fluxo contínuo” e com “fluxo parado”. Outra característica é a melhoria na resolução dos espectros de RMN, resultado da mudança de solvente não-deuterado (HPLC) para solvente deuterado (RMN). Como resultado, HPLC-SPE-RMN tem demonstrado ser capaz de fornecer determinação estrutural de novos produtos naturais diretamente de extratos brutos ou de frações ligeiramente pré-purificadas (CLARKSON *et al.*, 2005; CLARKSON *et al.*, 2007). Esta técnica permitiu a identificação, por exemplo, de quatorze lignanas presentes nas raízes de *Anthriscus sylvestris* (família Apiaceae) dentre elas duas novas 6-metoxi lignanas, contando com apenas 1 g de extrato bruto seco da planta (HENDRAWATI *et al.*, 2011). Da mesma forma, utilizando a técnica HPLC-SPE-RMN, foi possível obter espectros bidimensionais de alta resolução o que permitiu a identificação de seis alcaloides quinolínicos do extrato bruto das folhas de *Haplophyllum acutifolium* (família Rutaceae) de forma rápida e com a mínima quantidade de material vegetal (STAERK *et al.*, 2009).

O fracionamento cromatográfico guiado por bioensaios de bancada é um processo, geralmente, demorado porque são necessárias várias etapas cromatográficas até que se consiga o isolamento de um composto puro ativo. Portanto, estudos relacionados ao acoplamento de ensaios de alta resolução com técnicas hífenadas de separação (HPLC-SPE-RMN) têm sido discutidos a fim de se conseguir informações sobre compostos ativos de forma rápida e eficiente. Estudos recentes têm demonstrado a eficiência do acoplamento de HPLC a bioensaios baseados na habilidade de compostos antioxidantes em sequestrar radicais, tais como DPPH• (2,2-difenil -1- picrilhidrazil) e ABTS•<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (KOLEVA *et al.*, 2000; PUKALSKAS *et al.*, 2005; EXARCHOU *et al.*, 2006). Atualmente, esforços têm sido dedicados ao desenvolvimento de ensaios enzimáticos acoplados à HPLC-SPE- RMN . Uma nova plataforma analítica de alta resolução, baseada num ensaio de inibição da  $\alpha$ -glicosidase, foi desenvolvida, recentemente, permitindo a busca rápida e eficiente de compostos inibidores da  $\alpha$ -glicosidase (SCHMIDT *et al.*, 2012).

Plantas da família Myrtaceae caracterizam-se por possuir uma grande quantidade de compostos polares, dentre eles os flavonoides, principalmente os glicosilados (SLOWING *et al.* 1994; LAPČÍK *et al.*, 2005). Portanto, ferramentas de análise hífenadas, tais como HPLC-SPE-RMN, vêm a contribuir muito para a identificação desses compostos, principalmente os que se encontram em baixo rendimento nos extratos e frações.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho consiste no estudo fitoquímico e biológico de quatro espécies da família Myrtaceae, *Myrcia splendens*, *Myrcia palustris*, *Eugenia catharinae* e *Psidium cattleianum*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Preparar o extrato bruto das folhas das espécies de Myrtaceae;
- Particionar os extratos brutos por diferentes solventes a fim de obter as frações em quantidades expressivas para posterior estudo fitoquímico e biológico;
  - Analisar as frações polares das espécies *M. splendens* e *M. palustris* (acetato de etila e butanólica), por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando métodos convencionais (detecção UV-vis).
  - Analisar as frações acetato de etila das espécies de Myrtaceae por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando métodos hifenados (HPLC-SPE-RMN) acoplados a bioensaios.
  - Isolar, através de métodos cromatográficos, metabólitos secundários presentes nas espécies de Myrtaceae e identificar os metabólitos isolados através das técnicas de espectroscopia disponíveis.
  - Aplicar o bioensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* aos extratos brutos e frações de *M. splendens*, *M. palustris* e *E. catharinae*.
  - Avaliar a atividade antioxidante de *M. splendens*, *M. palustris*, *E. catharinae* através dos ensaios de poder redutor e da capacidade sequestrante de radicais livres correlacionando o resultado com o conteúdo de fenólicos e de flavonoides;
  - Avaliar o potencial inibitório frente à enzima acetilcolinesterase dos extratos brutos e frações das quatro espécies de Myrtaceae.
  - Avaliar o potencial antibacteriano das espécies *M. splendens*, *M. palustris* e *E. catharinae* através do ensaio de concentração inibitória mínima (CIM).

- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos e frações de *M. splendens* e *M. palustris*.
- Analisar a atividade anti-inflamatória dos extratos, frações e compostos de *M. splendens* e *M. palustris* através do modelo de inflamação induzida pela carragenina.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais e reagentes

Os solventes utilizados na partição líquido-líquido, cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada (CCD), foram todos de grau analítico PA.

Para o procedimento de isolamento e purificação dos compostos por CC, foi utilizada como fase estacionária sílica gel 0,063 - 0,2 *mesh* e sílica gel 0,04 - 0,063 *mesh* para CC flash. Para eliminação de resíduo de água nos solventes recuperados foi utilizado Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Aldrich).

As frações e compostos obtidos foram analisados através de CCD, utilizando-se placas de alumínio recobertas por sílica gel 60 GF254, de marca Merck, com 0,25 mm de espessura e partículas entre 5 a 40 µm de diâmetro. As substâncias separadas nas placas cromatográficas foram visualizadas utilizando vários reveladores: iodo, cloreto férrico 5 % em etanol e anisaldeído-sulfúrico (ácido sulfúrico conc., ácido acético glacial e anisaldeído 5:1:5 v/v/v em etanol) seguido de aquecimento a 110°C.

O Reagente de Folin-Ciocalteu, DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e padrões comerciais, utilizados nos ensaios antioxidantes, foram obtidos comercialmente (Aldrich). Os cistos de *Artemia salina* e o sal marinho foram adquiridos em lojas de aquário. Para a realização do ensaio de inibição da acetilcolinesterase foi utilizado, soro albumina bovina, iodeto de acetiltiocolina, ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico – DTNB e enzima acetilcolinesterase liofilizada (Tipo VI-S obtida de *Electroparus electricus*), todos os reagentes obtidos comercialmente pela Aldrich. Os demais solventes foram obtidos comercialmente de grau analítico sem prévia purificação.

### 4.2. Equipamentos

Para secagem da planta utilizou-se estufa com circulação de ar, marca DeLeu, e para a concentração dos extratos e das frações foi utilizado o evaporador rotatório a vácuo Fisatom, sob temperatura inferior a 60°C.

O ponto de fusão dos compostos isolados foi determinado em aparelho digital Micro Química MQA PF – 301. Os espectros das substâncias na região do infravermelho (IV) foram realizados na central de análises do departamento de química desta Universidade e, para isto, utilizou-se um espectrômetro Perkin Elmer FTIR 16 PC usando pastilhas comprimidas de KBr. As determinações de absorção na região do UV-VIS foram realizadas em espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Lambda 2S.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos utilizando-se o espectrômetro Varian AS-400, operado a 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ . As amostras foram dissolvidas em metanol, clorofórmio, dimetilsulfóxido e piridina deuterados, empregando-se tetrametilsilano (TMS) como referência. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em valores adimensionais (ppm), as constantes de acoplamento  $J$  em Hz e a multiplicidade dos sinais indicada como  $s$  = simpleto,  $d$  = duplete,  $dd$ =duplo duplete,  $t$  = tripleto e  $m$  = multiplete.

Para análise qualitativa das frações foi utilizado um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) de escala analítica marca e modelo SHIMADZU LC 10AT. O cromatógrafo é constituído de um conjunto de bombas binárias de solvente (SHIMADZU, modelo LC 10AT) para escala analítica com "loop" de 20  $\mu\text{L}$ . A aquisição dos dados foi realizado pelo software Shimadzu Class VP Software.

O sistema HPLC-SPE-*tt*NMR, utilizado nas análises hifenadas, consiste de um Agilent 1200 (bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1367C, compartimento de coluna termostatizado G1316A, detector de foto arranjo de diodos G1315C e um coletor de frações G1364C) (Santa Clara, California, USA), uma bomba Knauer K100 Wellechrom (Berlin, Germany), um dispositivo extrator de fase sólida Spark Holland Prospekt 2 (Emmen, The Netherlands) e um Gilson 215 Liquid Handler equipado com uma agulha de 1-mm para preenchimento automático de microtubos de 2,5-mm Bruker Match (Middelton, Wisconsin, USA). Os cromatogramas, os picos e a transferências dos analitos para o SPE foram controlados usando o software HyStar versão 3.2 (Bruker, Fällanden, Switzerland).

As caracterizações por espectrometria de massas foram feitas por fonte tipo electrospray, em um instrumento IT-TOF (Shimadzu Co., Japan), do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantã. As amostras foram analisadas em modo negativo, após injeção direta no instrumento sob fluxo constante de 20 µL/min em uma solução 50% acetonitrila, contendo 0,5% ácido fórmico. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi realizado pelo software LCMS Solution.

#### **4.3. Material Vegetal**

As espécies *Myrcia splendens*, *Myrcia palustris*, *Eugenia catharinae* e *Psidium cattleyanum* foram coletadas nas mediações da rodovia Pontal do Jurerê que dá acesso a praia da Daniela, município de Florianópolis, Santa Catarina, em Maio de 2010.

As espécies foram identificadas pelo Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg, por comparação com exsiccatas já depositadas no herbário desta Universidade com os seguintes códigos: *Myrcia splendens*: FLOR 16.182, *Myrcia palustris*: FLOR 17.892, *Eugenia catharinae*: FLOR 27.820, *Psidium cattleyanum*: FLOR 35.220.

O material vegetal (folhas e galhos) das espécies, após coleta e identificação, foi seco em estufa com circulação de ar a 50°C. Após a secagem, todo material foi triturado manualmente e submetido ao procedimento de maceração em etanol hidratado 96% durante quinze dias. Os extratos obtidos foram filtrados e parte do solvente eliminado em rota- evaporador (60°C), sendo estes concentrados, de forma que o solvente evaporado foi recuperado e posteriormente reutilizado para nova maceração. Este mesmo procedimento foi realizado por duas vezes a fim de se obter o maior rendimento possível dos extratos brutos. Os extratos brutos hidroalcoólicos foram concentrados sob pressão reduzida.

#### **4.4. Fracionamento líquido-líquido dos extratos brutos**

Aos extratos brutos hidroalcoólicos secos foi adicionado etanol 20% e após dissolução, estes foram armazenados em geladeira por 24h, sendo então

filtrados para a obtenção do material insolúvel. Os filtrados obtidos desta etapa foram então particionados com solventes de distintas polaridades: i) n-hexano, ii) acetato de etila e iii) butanol, conforme a figura 6.

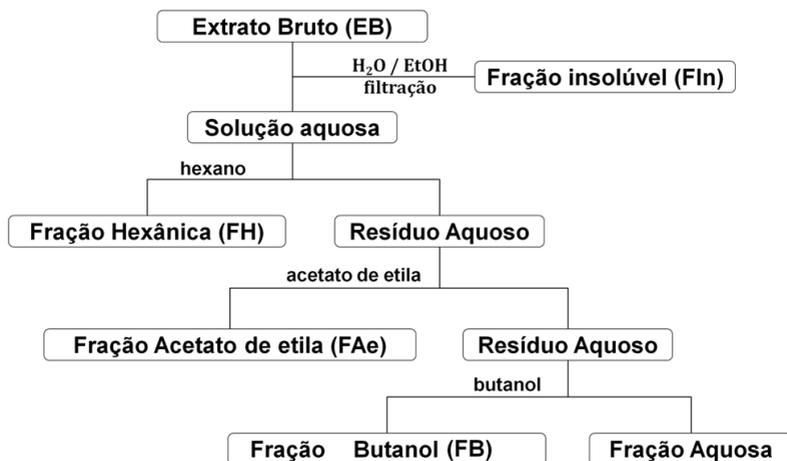


Figura 6. Fracionamento dos extratos brutos das espécies estudadas.

#### 4.5. Análises de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A análise qualitativa das frações acetato de etila e butanol de *M. splendens* e *M. palustris* foi realizada no laboratório de Eletroforese Capilar do departamento de química desta universidade sob a supervisão do professor Gustavo Amadeu Micke.

As frações acetato de etila de *M. palustris*, *E. catharinae* e *P. cattleyanum* foram analisadas pelo método HPLC-SPE-*tt*NMR. Esta parte do projeto foi realizada em período de estágio sanduiche no departamento “Drug Design and Pharmacology” da Universidade de Copenhagen sob orientação dos professores Dan Stærk, Claus Cornett e Steen Honoré Hansen.

#### **4.5.2. Perfil cromatográfico das frações de *M. splendens* e *M. palustris* por HPLC/DAD**

Para as análises qualitativas foi utilizada coluna cromatográfica Varian C18 (250 x 4.6 mm; 5 $\mu$ m) a 25 °C, e sistemas eluentes compostos de metanol (eluyente A) e água e ácido fórmico 1% (eluyente B) com a seguinte programação de tempo: Inicia-se no tempo t = 0 min com os sistemas de eluentes A (35%) e B (65%), 10 min eluyente B (55%), 25 min B (45%), 30 min B (40%), 32 min B (0 %). Fluxo de 1 mL/min, detecção na faixa de 200 a 600 nm.

As amostras vegetais (Frações acetato de etila e butanol de *M. splendens* e *M. palustris*) foram injetadas sem qualquer pré-tratamento a uma concentração de 200  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> em MeOH/H<sub>2</sub>O (2:8.) Foram utilizados padrões qualitativos de rutina e miricitrina isolados no laboratório.

#### **4.5.3. Estudo das frações acetato de etila de *M. palustris*, *E. catharinae* e *P. cattleyanum* pelo método HPLC-SPE-ttNMR acoplado a ensaios de alta resolução**

Esta parte do projeto foi realizada em período de estágio sanduiche no departamento *Drug Design and Pharmacology* da Universidade de Copenhagen sob orientação dos professores Dan Stærk, Claus Cornett e Steen Honoré Hansen.

Toda separação analítica foi realizada a 40 °C usando uma coluna Phenomenex C18 (2) (150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m, 100 Å) (Allerød, Denmark). O eluyente aquoso (A) consistiu de água/metanol (95:5, v/v) e o eluyente orgânico (B) de metanol/água (95:5, v/v); ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico. O fluxo de eluyente foi mantido a 0,8 mL/min. O cromatograma foi monitorado a 254, 280 e 360 nm, usando o método de absorvância “thresholds” para direcionar as armadilhas SPE. O eluato de HPLC foi diluído com água Milli-Q acidificada com 0,1% de ácido fórmico (1,5 mL/min, se não indicado de outra forma), antes da captura em cartuchos de 10 x 2 mm de diâmetro do tipo "Resina GP" (fase geral, 5-15  $\mu$ m, forma esférica, polivinil benzeno). Os cartuchos de SPE foram condicionados com

500 µL de metanol a 6 mL/min, e equilibrados com 500 µL de água Milli-Q acidificada com 0,1% de ácido fórmico a 1 mL/min. Os cartuchos carregados foram secos com gás de nitrogênio sob pressão, durante 60 minutos cada, e os analitos foram automaticamente eluidos em tubos de RMN de 2,5 mm utilizando o Gilson Liquid Handler controlado por software PrepGilson versão 1.2. Os experimentos de RMN foram realizados num espectrómetro Bruker Avance (<sup>1</sup>H, frequência de ressonância de 600 MHz). As medidas espectrofotométricas das microplacas de 96 poços (Sterilin Limited, Aberbargoed Caerphilly, Reino Unido) foram realizadas utilizando um leitor de microplaca Thermo Scientific Multiskan FC (Waltham, Massachusetts, EUA), utilizando o software Skanlt versão 2.5.1 para a aquisição dos dados. Para secar as microplacas foi utilizado um concentrador SPD121P Savant SpeedVac (Thermo Scientific, Waltham, MA) equipado com uma bomba de vácuo.

Para a análise, cerca de 50 mg das frações acetato de etila foram dissolvidas em 1,0 mL de metanol e submetidas a centrifugação seguido por filtração utilizando Nylon Target Syringe Filter (tamanho de poro 0,45 µm).

#### **4.5.4. Screening de alta resolução**

Para a separação foi utilizado o seguinte gradiente linear: 0 min, 10% B; 45 min, 70% B; 47 min, 100% B; 52 min, 100% B; 55 min, 10% B; 60 min, 10% B. As frações acetato de etila das quatro espécies foram diluídas em MeOH a uma concentração de 50 mg/mL, sendo que 10 µL de solução foi injetada. Para o ensaio de inibição da α-glicosidase a fração acetato de etila de *Psidium catlleyanum* foi diluída dez vezes, sendo injetado 5 µL, a fim de melhorar a resolução dos biocromatogramas. Para o ensaio antioxidante as frações foram coletadas em três microplacas de 96 poços, com "time slicing" do eluato do HPLC de 2 a 47 min divididos em frações de 9,375 s. Isso corresponde a 125 µL por fração. A atividade antioxidante de todos os poços foi medida, utilizando procedimento posteriormente descrito no item 4.5.2.2, e os valores de redução ABTS<sup>•+</sup> foram plotados abaixo dos respectivos cromatogramas. Para o ensaio de inibição da α-glicosidase um total de 180 frações foram recolhidas em duas microplacas de 96 poços, por

"time slicing" do eluato de HPLC de 2-44 min em frações de 14 s. Isto corresponde a 187  $\mu\text{L}$  por fração. Os poços foram evaporados até a secura usando um concentrador SPD121P Savant SpeedVac. O ensaio foi realizado em cada poço e a atividade de inibição  $\alpha$ -glicosidase foi representada graficamente contra o tempo de retenção cromatográfico, resultando o biocromatograma de alta resolução.

#### **4.5.5. Ensaio antioxidante usando o radical livre ABTS<sup>•+</sup>**

A atividade de captura de radicais livres das amostras vegetais foi avaliada utilizando o método descrito por Pellegrini *et al.*, 2001. A solução contendo o radical livre ABTS<sup>•+</sup> foi preparada por incubação de 2,5 mM de ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico (ABTS) com 0,875 mM de persulfato de potássio em água millipore, deixando a mistura em repouso no escuro durante 12-16 h antes da utilização. 0,1 M de um tampão de fosfato de sódio (pH 7,4) foi utilizado para neutralizar os eluentes acidificados do HPLC. A solução de ABTS<sup>•+</sup> foi então diluída cinco vezes com tampão de fosfato de sódio antes da sua utilização. 200  $\mu\text{L}$  da solução de ABTS<sup>•+</sup> foram adicionados a cada fração nas microplacas. A absorvância foi medida a 620 nm a cada minuto durante 20 minutos usando um espectrofotômetro de microplacas.

#### **4.5.6. Ensaio de inibição da enzima $\alpha$ -glicosidase**

O ensaio de inibição da  $\alpha$ -glicosidase foi determinado através do método descrito por Schmidt *et al.* 2012, com algumas modificações. O ensaio foi realizado utilizando um volume final de 200  $\mu\text{L}$ , onde foi adicionado 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,5),  $\text{NaN}_3$  a 0,02%, 5% de dimetilsulfóxido (DMSO),  $\alpha$ -glicosidase na concentração de 0,05 U / mL e p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (PNPG) 1,0 mM, a uma temperatura de 28 ° C, com um tempo de pré-incubação de 10 min. A medida de absorvância é lida a 405 nm a cada 30 s durante 35 min. Para cada microplaca um controlo positivo de acarbose 0,5 mM foi utilizado, bem como um controlo negativo

constituído da solução do teste sem o eluato de HPLC. Os testes foram realizados em triplicata.

#### **4.6. Isolamento e identificação de compostos**

Diversos métodos cromatográficos foram utilizados para separação e isolamento dos compostos das diferentes frações das espécies vegetais. O principal método utilizado foi a cromatografia em coluna normal utilizando sílica gel, onde um sistema de solvente em gradiente de polaridade foi empregado. Outros métodos cromatográficos foram utilizados tais como cromatografia em coluna flash. A cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada com o objetivo de monitorar as frações eluídas das colunas para a reunião de acordo com o perfil cromatográfico. Os reveladores utilizados foram: iodo, soluções reagentes de anisaldeído sulfúrico 5% em etanol e cloreto férrico 5% em etanol.

As estruturas dos compostos isolados foram elucidadas através de análises espectroscópicas de infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e técnicas bidimensionais (COSY, HMQC e HMBC). Quando necessária, a confirmação de estruturas foi feita por comparação com dados espectroscópicos da literatura e por co-eluição em CCD com padrões.

#### **4.7. Ensaios de bancada**

##### ***4.7.1. Toxicidade usando larvas de *Artemia salina* (TAS)***

Para os bioensaios de letalidade frente a *A. salina*, foi utilizada a metodologia descrita na literatura (MORESCO *et al.*, 2012b). Os extratos brutos e frações e compostos das espécies vegetais foram diluídos em água/etanol, a fim de obter uma concentração final de  $10.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O meio para o cultivo das larvas de *A. salina* foi água salgada (19 g de sal marinho/L de água destilada). As larvas foram utilizadas nos ensaios 48 h após a eclosão. Para o teste foram transferidas entre 7 e 10 larvas de *A. salina* para cada cavidade de uma placa de 24 poços, contendo solução marinha

com 1% de tween 80 (v/v) e os respectivos extratos em diferentes concentrações (100 a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24 h de exposição a temperatura ambiente. A dose necessária para matar 50 % das larvas ( $DL_{50}$ ) foi obtida através do gráfico da % de animais mortos em função do logaritmo da dose testada. Como controle positivo foi utilizada solução de  $K_2Cr_2O_7$  cuja  $DL_{50}$  é de 20 a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e como controle negativo foi empregado apenas o solvente utilizado para a preparação das soluções teste. Os testes foram realizados em triplicata.

#### **4.7.2. Determinação do teor de compostos fenólicos**

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu, de acordo com a metodologia descrita na literatura (MORESCO *et al.*, 2012b). A 0,5 mL de uma solução da amostra (extratos e frações na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , diluídos em metanol), foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reativo de Folin-ciocalteu. Após 3 minutos, foi adicionado 1,0 mL da solução saturada de  $Na_2CO_3$ . Após isso, agitou-se a solução deixando em repouso por 1 hora. As absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 725 nm. Como branco utilizou-se uma solução preparada conforme descrito acima, porém, sem a presença da solução teste. Um aparecimento de cor azul-escuro é indicativo da presença de fenólicos no extrato ou fração testada. Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 25 a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , diluído em metanol, para comparação. Todos os testes foram realizados em triplicata. Para o cálculo do conteúdo de fenólicos foi construída uma curva de calibração utilizando o ácido gálico, de onde se obteve a equação da reta  $y = 5,46x + 6,48$ ;  $r^2 = 0,999$ . O resultado foi expresso em equivalentes de ácido gálico, ou seja, mg de ácido gálico/g de extrato ou fração seco.

#### **4.7.3. Determinação do teor de flavonoides**

A determinação do teor de flavonoides foi realizada conforme Moresco *et al.* (2012b). A 0,5 mL de uma solução da amostra (extratos e

frações na concentração de 1000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , diluídos em metanol), foram adicionados 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de uma solução de  $\text{AlCl}_3$  2 % em etanol. Após 1 hora, as absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 415 nm. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição  $\text{AlCl}_3$ . O aparecimento de coloração verde-florescente é indicativo da presença de flavonoides. Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de quercetina nas concentrações de 1 a 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , diluída em metanol, para comparação. Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos flavonoídicos foi determinado em mg de quercetina/g de extrato ou fração seco, através de uma curva de calibração de onde se obteve a equação da reta  $y = 10,47x + 7,00$ ;  $r^2 = 0,998$ .

#### **4.7.4. Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH**

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) foi realizado segundo Moresco *et al.* (2012b). O ensaio consiste em fazer uma solução etanólica de DPPH 0,004% preparada momentos antes do uso, e de soluções com concentração de 25 a 200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  das frações ou extratos brutos. É misturada 2 mL de solução de DPPH com 1 mL da amostra vegetal. Agita-se e após 30 minutos, é feita a leitura em um espectrofotômetro a 517 nm, corrigindo cada absorvância com o seu respectivo controle, que consiste na solução do extrato vegetal (1 mL) juntamente com etanol (2 mL). Uma solução contendo 2 mL de DPPH e 1 mL de etanol é considerado como 100% de absorvância. O gráfico do percentual de decréscimo na absorvância do DPPH em função na concentração do extrato fornece  $\text{CE}_{50}$ , concentração de extrato necessária para causar 50% de atividade antioxidante.

#### **4.7.5. Determinação do potencial redutor**

O ensaio para a análise da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor foi realizado conforme Moresco *et al.* (2012b). A 100  $\mu\text{L}$  das amostras (extratos brutos e frações na concentração

de 1000  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) foram adicionados 8,5 mL de água deionizada. Adicionou-se então 1,0 mL da solução de  $\text{FeCl}_3$  0,1 M, e após 3 minutos, 1,0 mL da solução de ferricianeto de potássio 0,08 M, e misturou-se. Após 15 minutos, foi realizada a leitura da absorvância da solução em espectrofotômetro a 720 nm. O aparecimento da cor azul da Prússia é indicativo de potencial redutor. A análise foi feita em triplicata. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição da amostra. Foi realizada uma curva de calibração utilizando soluções padrões de ácido ascórbico nas concentrações de 25 a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , diluído em metanol, para comparação. O potencial redutor das amostras foi expresso em mg de ácido ascórbico / g de extrato ou fração seco, através de uma curva de calibração, de onde se obteve a equação da reta  $y = 2,43x + 1,94$ ;  $r^2 = 0,999$ .

#### **4.7.6. Ação inibitória da enzima acetilcolinesterase**

O bioensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase foi realizado conforme Magina *et al.*, (2012) com modificações. Para a realização do ensaio de inibição da acetilcolinesterase foram preparadas as seguintes soluções tampões: Tampão A – solução de Tris-HCl 50 mM pH = 8,0; Tampão B – solução de Tris-HCl 50 mM pH = 8,0 acrescido de 0,1 % de soro albumina bovina; Tampão C – solução de Tris-HCl 50 mM pH = 8,0 acrescido de NaCl 0,1 M e  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,02 M. Uma solução de 15 mM de iodeto de acetiltiocolina em água milipore deionizada foi preparada. 3 mM do reagente de Elman (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico - DTNB) foi dissolvido na solução tampão C e a enzima acetilcolinesterase liofilizada (Tipo VI-S obtida de *Electroparius electricous*) foi diluída na solução tampão B até a concentração de 0,25 U/mL.

Para este ensaio utiliza-se um volume total de 1000  $\mu\text{L}$  de solução. Em uma cubeta adiciona-se 325  $\mu\text{L}$  do Tampão A, 100  $\mu\text{L}$  da amostra vegetal (0,1  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) e 25  $\mu\text{L}$  da solução contendo a enzima acetilcolinesterase. Após 15 min, à temperatura ambiente, adiciona-se nesta cubeta 75  $\mu\text{L}$  da solução de iodeto de acetiltiocolina e 475  $\mu\text{L}$  da solução do reagente de Ellman. Após trinta minutos realiza-se a leitura em

espectrofotômetro UV-VIS a 404 nm. Como controle positivo utiliza-se a galantamina, do medicamento comercial Reminyl® , (0,01 mg.mL<sup>-1</sup>) e como controle negativo o mesmo solvente em que se dissolve a amostra vegetal, onde a atividade enzimática é considerada 100%. Na referência (ou branco) são utilizados todos os reagentes exceto a enzima.

#### **4.8. Atividade antimicrobiana**

A atividade antibacteriana de algumas das espécies foi determinada segundo o modelo de concentração inibitória mínima (CIM) utilizando diferentes bactérias de interesse clínico. Esta atividade foi realizada em colaboração com a Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco do departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina. Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela pesquisadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suzana Johann.

##### ***4.8.1. Atividade antibacteriana***

A atividade antibacteriana foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e as bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e a *Escherichia coli* (ATCC 25922).

As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), com objetivo de se produzir soluções-mãe contendo 100 mg mL<sup>-1</sup>. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas destas soluções em caldo Brain Heart Infusion (BHI), produzindo concentrações variando de 50 mg mL<sup>-1</sup> a 1,5 µg mL<sup>-1</sup>, distribuídas em volumes de 100 µL em cada orifício teste da placa de microdiluição estéril de 96 poços. Em cada orifício teste foi adicionado 5 µL do inóculo bacteriano contendo 5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL de cada microorganismo testado. Os experimentos foram realizados em duplicata e as placas incubadas em aerobiose a 36°C ± 1°C por 24 horas. Após esta incubação inicial, adicionou-se 10 µL de cloreto de 2,3,5 trifenil-tetrazólio (5% v/v) em

metanol, a cada microcavidade da placa utilizada no experimento (CLSI, 2005). Em seguida, realizou-se outra incubação em aerobiose por 30 minutos à temperatura de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , onde foi possível verificar a mudança de coloração para vermelho nos micropoços onde houve presença de bactérias viáveis, ou seja, onde os extratos, frações e compostos não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração onde não se verificou crescimento bacteriano. Como controle de inibição bacteriana foi utilizado o antibiótico de referência gentamicina (Figura 7), um antibiótico que apresenta boa atividade contra todas as cepas testadas em nosso experimento.

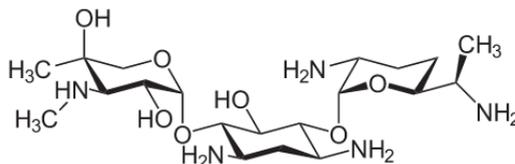


Figura 7. Estrutura do antibiótico de referência gentamicina.

#### 4.8.2. Atividade antifúngica

Para dissolver e diluir os extratos e frações das plantas estudadas utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) e a concentração final deste solvente no ensaio é de 0,002%.

O meio de Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e o meio YPD (extrato de levedura, peptona e dextrose), foram utilizados para a manutenção das culturas fúngica e o meio de RPMI 1640 (Sigma) tamponado com ácido morfolinepropano sulfônico (MOPS) (Sigma) para os testes de microdiluição.

Os fungos utilizados foram os seguintes: *Candida albicans* (ATCC 18804), *C. krusei* (ATCC 200298), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. tropicalis* (ATCC 22019). Utilizou-se também *Cryptococcus gattii* (ATCC 32608) e *C. neoformans* (ATCC) e *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) (Coleção de Cultura da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

Para as espécies de *Candida* as amostras foram repicadas em estrias, 24 horas antes da realização dos testes e para as espécies de *Cryptococcus* 48 horas, em SB e mantidas a 35°C. O inóculo foi feito de acordo com o documento M27-A2 (CLSI, 2002).

Para *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) na forma de levedura este foi repicado em tubos com meio YPD a 37°C.

Para o teste de microdiluição os fungos foram ressuspensos, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em solução fisiológica esterilizada e homogeneizada em vórtex e ajustadas à turbidez de 75-80% em espectrofotômetro a 70% em comprimento de onda de 530 nm, equivalente a  $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$  UFC/mL. A partir deste inóculo foram feitas diluições 1:50 e 1:20, correspondendo a um inóculo de  $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$  UFC/mL para as amostras de *Candida* spp. e *C. neoformans*. Para o fungo dimórfico *P. brasiliensis* as células leveduriformes em fase exponencial foram coletadas assepticamente com alça de Drigalski e suspensas em 5 mL de salina estéril (0,85%) (MANOCHA *et al.*, 1980). O inóculo foi homogeneizado em vortex e deixado em repouso para a decantação e somente após 5 minutos o sobrenadante foi coletado. A transmitância do sobrenadante foi medida em 520 nm e ajustada para 69-70% ( $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  células por mL), contando o número de células viáveis em câmara de Neubauer. As suspensões foram então diluídas em RPMI (1:10) para obtenção do inóculo final  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  cel/mL (HAHN & HANDAM, 2000).

Para o teste de triagem da atividade antifúngica todas as amostras a serem testadas foram diluídas a 500 µg/mL em RPMI. Posteriormente 100 µL de cada amostra foi adicionada em um poço de duas placas de 96 poços. Foram feitos também os controles de toxicidade do DMSO na concentração de 0,002%, crescimento fúngico, esterilidade do meio de cultura e suscetibilidade ao itraconazol (0,5 µg/mL).

Posteriormente em cada poço teste e nos poços controles, exceto o controle de esterilidade do meio, foram adicionados 100 µL do inóculo. Desta forma a concentração final das amostras nos poços ficou em 250 µg/mL.

Posteriormente as placas foram incubadas a  $\pm 37^\circ\text{C}$ . No ensaio, utilizando as leveduras do gênero *Candida*, as placas ficaram incubadas por

48h, para as espécies de *Cryptococcus* por 72 horas. Para o Pb18 as placas foram incubadas por 10 dias.

Após a incubação, em cada poço foi acrescentado 10 µL de brometo tiazolil azul tetrazólico (MTT - 5 mg/mL), o conteúdo homogeneizado e as placas foram novamente incubadas à mesma temperatura de crescimento dos respectivos inóculos por 4 horas. Nas mitocôndrias das células alvos, o MTT é metabolizado em formazan, revelando a presença de células metabolicamente ativas. Após o metabolismo do MTT pelos fungos, foram adicionados 100 µL/poço de SDS/isopropanol (5%), que rompe a membrana celular dos microrganismos alvos e disponibiliza no meio o formazan.

A leitura foi realizada por meio do método colorimétrico do MTT em um leitor de microplaca VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular Devices), a 570 nm. A absorbância dos poços testes foi comparada com a absorbância do poço controle contendo apenas o microrganismo, sendo a porcentagem de inibição calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{inibição} = \frac{\text{DO poço controle} - \text{DO poço tratado}}{\text{DO poço controle}} \times 100$$

Onde DO = Densidade Óptica

Os extratos e frações foram considerados ativos quando inibiram o crescimento fúngico em valor igual ou maior que 70%.

O teste antifúngico foi feito utilizando a metodologia do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) descrito no documento M27-A2 do CLSI (2002). O teste de CIM para o Pb 18 foi feito conforme descrito por Johann e colaboradores (2010). Primeiramente os extratos e frações foram dissolvidos em DMSO e diluídos em caldo RPMI, mantendo o volume constante de 1000 µL em cada tubo. Foram testadas 10 concentrações que variaram de 250-0,45 µg/mL. A partir de cada diluição, alíquotas de 100 µL foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição. Como controle positivo foi utilizada o itraconazol (Sigma) nas concentrações de 8-0,007 µg/mL. Após a montagem das placas, cada orifício teste e controle de

crescimento recebeu 100 µL do inóculo microbiano. O tempo e a temperatura de incubação, assim como a leitura das placas foram efetuados como descrito acima no teste de triagem. As CIMs foram consideradas como a menor concentração do produto natural, que inibiu o crescimento do microrganismo em pelo menos 90%, em relação ao controle de crescimento, após a incubação e foram expressas em µg/mL. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes.

#### **4.9. Atividade anti-inflamatória**

Atividade anti-inflamatória foi avaliada através do modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos, realizada em colaboração com a Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco do departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

O estudo utilizou camundongos albinos suíços, de um mês de idade, de ambos os sexos, pesando entre 18 e 25 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais mencionados foram acomodados em gaiolas plásticas com serragem, sob temperatura ambiente e luz natural. Estes animais receberam alimentação e água durante todos os experimentos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética na experimentação com animais (CEEA) da FURB sob protocolo N° 026/2007.

A anestesia dos animais foi induzida com pentobarbital (25 mg/kg) administrados por via intraperitoneal, a fim de possibilitar a administração da solução corante de azul de Evans (25 mg/kg, i.v.) com o objetivo de se avaliar de forma indireta a exsudação.

Os animais foram sacrificados, após o teste, com overdose de pentobarbital (120 mg/kg, i.p.), administrado por via intraperitoneal.

No dia dos experimentos, os animais receberam 0,1 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ou do agente flogístico carragenina (Cg, 1%), administrado na cavidade pleural (i.pl.) direita, através do espaço intercostal, utilizando-se de uma agulha 13 x 5 mm e cânula de poliestireno. De acordo com cada protocolo experimental, após a administração da carragenina ou da solução salina estéril, os animais foram sacrificados com overdose de pentobarbital em 4 h após a indução da inflamação. A seguir, os animais

foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30° a 45°, sendo feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Posteriormente, o apêndice xifóide foi pinçado e, através de duas incisões paralelas ao longo do esterno, a cavidade pleural foi exposta. Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada com duas alíquotas de 0,5 mL (totalizando 1 mL) de solução de tampão fosfato/salina (PBS, pH 7,6, NaCl 130 mmol.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mmol.L<sup>-1</sup> e heparina 20 UI.mL<sup>-1</sup>). Alíquotas do lavado pleural foram coletadas com auxílio de pipeta automática para a quantificação do número total de células. De acordo com o protocolo experimental, 10 minutos antes dos experimentos, alguns grupos de animais foram tratados com solução de Azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL/animal, i.v.), para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural.

Para análise da enzima mieloperoxidase, os animais não foram previamente tratados com o corante azul de Evans, uma vez que este interfere nas dosagens colorimétricas para a quantificação destes parâmetros.

No dia dos experimentos, após sacrifício dos animais e abertura das cavidades, alíquotas do lavado pleural (200 µL) foram reservadas para a contagem celular total (contagem total de leucócitos), utilizando-se líquido de Türk (1:20) e câmara de Neübauer, com auxílio de microscópio ótico comum (aumento 400 vezes). Os resultados foram expressos em número total de células (x 10<sup>6</sup>).

Ainda no dia dos experimentos, uma alíquota (200 µL) do lavado pleural foi reservada para a determinação da exsudação através da determinação da concentração de Azul de Evans em leitor de microplaca (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA), por leitura da densidade ótica, em comprimento de onda 620 nm, de acordo com a metodologia descrita (SALEH *et al.*, 1996). Para a quantificação da concentração de azul de Evans, curvas padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,01 - 50 µg/mL) tiveram suas densidades óticas determinadas. Os valores das concentrações de azul de Evans nas amostras foram interpolados com base na reta padrão e expressos em µg/mL.

Para a Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase, imediatamente após o sacrifício dos animais, uma amostra do lavado pleural

de camundongos foi coletada e imediatamente processada para a quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) segundo metodologia descrita (RAO *et al.*, 1993). Volumes de 20  $\mu\text{L}$  do lavado da cavidade pleural ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos (0,7 - 140 mUI/mL)) foram transferidos para microplacas contendo 96 poços e a reação bioquímica iniciada com a adição de 180  $\mu\text{L}$  de uma solução de 0,167 mg/mL de *o*-dianisidina 2 HCl e 0,0005% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Após 15 min. de incubação, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30  $\mu\text{L}$  de azida sódica (1%). A seguir, as placas contendo as amostras foram lidas em densidade ótica (450 nm) em leitor de microplacas (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). Curvas-padrão com atividades conhecidas da MPO (0,7 - 140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores da MPO foram expressos em mU/mL, com o auxílio da curva padrão.

Os resultados de todos os parâmetros inflamatórios estudados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão os quais foram analisados pelos testes estatísticos utilizando o programa de estatística GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 3.00 (San Diego, Califórnia, EUA). Diferenças estatísticas entre os grupos controle e os grupos tratados com as amostras foram avaliadas por meio do teste de variância ANOVA (teste paramétrico bicaudal de duas vias), complementado pelos testes *pos-hoc* de Dunnett. Quando necessário utilizou-se o teste *t* de Student (não-pareado) e o teste de correlação de Pearson. Para todas as análises estatísticas, valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha destas quatro espécies de Myrtaceae se deve ao fato de praticamente não haver relatos na literatura sobre estudos fitoquímicos e biológicos realizados com as espécies.

São poucos os estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero *Myrcia*. *M. splendens* teve apenas a composição do óleo essencial das folhas estudada (COLE *et al.*, 2008). Não há qualquer relato a respeito da espécie *M. palustris*. Portanto, um estudo fitoquímico com as duas espécies foi realizado com intuito de buscar novas moléculas bioativas assim como contribuir com a quimiotaxonomia do gênero. Foi dada prioridade às frações mais polares (acetato de etila e butanol), já que a literatura tem mostrado uma grande quantidade de compostos flavonoídicos nestas frações em outras espécies deste gênero.

Espécies do gênero *Eugenia* são bastante estudadas revelando uma grande quantidade de compostos fenólicos com capacidade antioxidante (EINBOND *et al.* 2004) como os taninos, ácidos fenólicos, antocianinas, chalconas e flavonoides. Apesar de este gênero ser bastante estudado, não há nenhum relato sobre estudos realizados com *E. catharinae*, o que incentiva um estudo fitoquímico com a espécie.

A espécie *P. catlleyanum* é bastante descrita na literatura pelo seu uso popular, no entanto, pouco foi estudada sob os aspectos químicos e biológicos. Diante disso, um estudo fitoquímico foi iniciado com a planta em meados de 2008 no qual levou ao isolamento de dois esteroides, dois triterpenos ácidos e um flavonoide (MORESCO *et al.*, 2012a). Neste trabalho foi dada continuidade a estes estudos, principalmente os biológicos.

### 5.1. Obtenção e fracionamento dos extratos vegetais

Os extratos brutos (EBH) das folhas das quatro espécies, após evaporação, foram ressuspensos em solução EtOH/H<sub>2</sub>O 30% e armazenados em geladeira por um dia. Após este procedimento, foram então filtrados para obtenção de um material insolúvel, o qual foi denominado fração insolúvel (FI<sub>n</sub>). As partes filtradas foram então particionadas com solventes de

distintas polaridades como hexano, acetato de etila, butanol, formando as frações: Hexano (FH), Acetato de etila (FAe), Butanol (FB) e fração Aquosa (FAq). O resultado dos rendimentos obtidos para os extratos e frações pode ser observado na tabela 5.

**Tabela 5. Rendimento dos extratos brutos e frações das espécies *M. splendens*, *M. palustris*, *E. catharinae* e *P. cattleyanum*.**

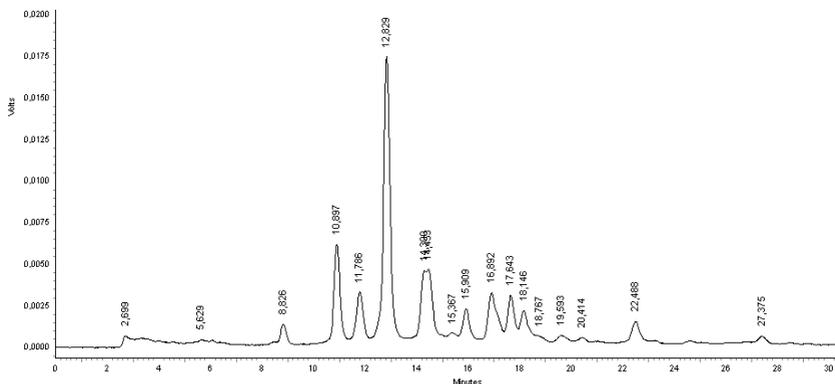
Material vegetal	<i>M. splendens</i>		<i>M. palustris</i>	
	Material seco (g)	Rendimento (%)	Material seco (g)	Rendimento (%)
Folhas	512,00	-	569,03	-
EBH	87,31 <sup>a</sup>	17,05	72,88 <sup>a</sup>	12,81
FH	0,4835 <sup>b</sup>	0,55	0,4282 <sup>b</sup>	0,59
FAe	20,49 <sup>b</sup>	23,45	3,30 <sup>b</sup>	4,53
FB	15,29 <sup>b</sup>	17,51	11,07 <sup>b</sup>	15,19
FAq	31,24 <sup>b</sup>	35,78	24,34 <sup>b</sup>	33,40
FIn	11,35 <sup>b</sup>	13,00	8,62 <sup>b</sup>	11,83
Material vegetal	<i>E. catharinae</i>		<i>P. cattleyanum</i>	
	Material seco (g)	Rendimento (%)	Material seco (g)	Rendimento (%)
Folhas	475,20	-	413,00	-
EBH	73,92 <sup>a</sup>	15,56	35,60 <sup>a</sup>	8,62
FH	9,12 <sup>b</sup>	12,32	0,0438 <sup>b</sup>	0,12
FAe	22,35 <sup>b</sup>	30,23	5,78 <sup>b</sup>	16,24
FB	7,05 <sup>b</sup>	9,54	3,13 <sup>b</sup>	8,79
FAq	8,56 <sup>b</sup>	11,58	9,58 <sup>b</sup>	26,91
FIn	26,91 <sup>b</sup>	36,40	6,42 <sup>b</sup>	18,03

a = refere-se a porcentagem em relação ao material vegetal seco; b = refere-se a porcentagem em relação ao extrato bruto.

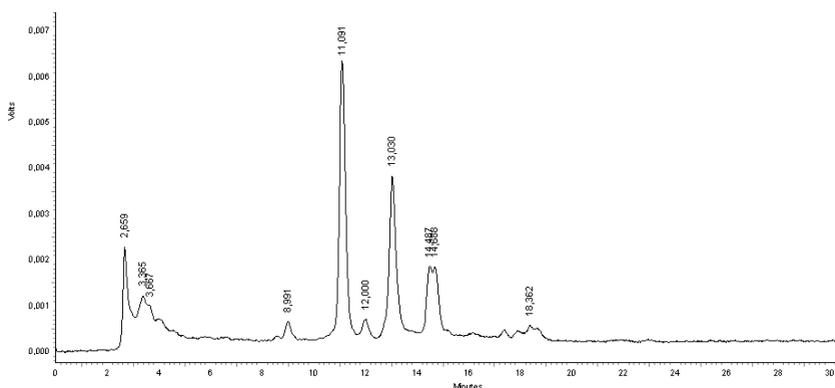
## 5.2. Perfil cromatográfico em HPLC das frações polares das espécies de *Myrcia*

A presença de flavonóides em espécies do gênero *Myrcia* já foi amplamente estudada por alguns autores (GOTTLIEB *et al.*, 1972; YOSHIKAWA *et al.*, 1998; MATSUDA *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2006) principalmente nas frações mais polares obtidas do fracionamento líquido-líquido. Diante disso, o desenvolvimento de uma metodologia de análise de flavonóides por HPLC nas frações acetato de etila e butanol das espécies *M. splendens* e *M. palustris* é incentivada.

O perfil cromatográfico das frações acetato de etila e butanol de *M. splendens* pode ser visualizado nas figuras 8 e 9. A fração acetato de etila (Figura 8) de *M. splendens* apresentou cinco picos majoritários em 10,8 min (11,3%), 11,8 min (6,4%), 12,8 min (35,7%), 14,3 min (6,9%) e 14,4 min (7,2%), que juntos representam cerca de 80% de área relativa. O cromatograma apresentou um pico mais intenso em 12,8 min e seu espectro de UV, observado no aparelho de HPLC, mostrou bandas de absorção máxima em 265 nm e 356 nm. Este espectro sugere tratar-se de um flavonóide contendo o núcleo aglicônico do tipo flavonol que apresenta duas bandas de absorção características: Banda II (250-280 nm) e Banda I (330-360 nm para flavonol 3-OH substituído ou 350-385 nm para flavonol 3-OH livre) (MARKHAM, 1982). A fração butanol apresentou um perfil um pouco distinto (Figura 9), mostrando 10 picos, sendo dois majoritários com índices de retenção de 11,1 e 13,0 min que juntos representam 60 % de área relativa.

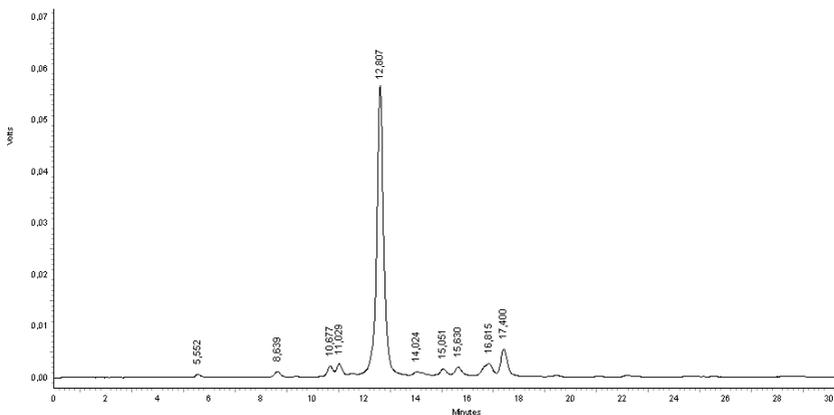


**Figura 8.** Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração acetato de etila de *M. splendens* obtido a 354 nm.

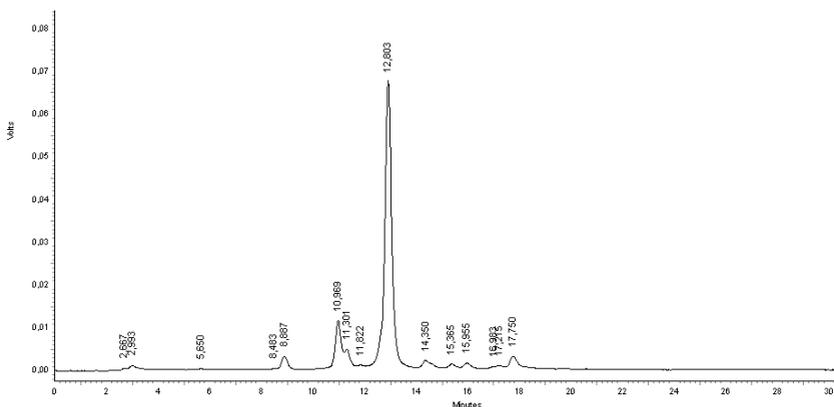


**Figura 9.** Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração butanol de *M. splendens* obtido a 354 nm.

A espécie *M. palustris* apresentou perfil cromatográfico semelhante à espécie *M. splendens* como pode ser visualizado nas figuras 10 e 11. A fração acetato de etila e butanol de *M. palustris* mostraram um pico intenso com o mesmo tempo de retenção observado na fração acetato de etila de *M. splendens* de 12,8 min, correspondendo a 77,8% e 71,7% da área relativa, respectivamente.



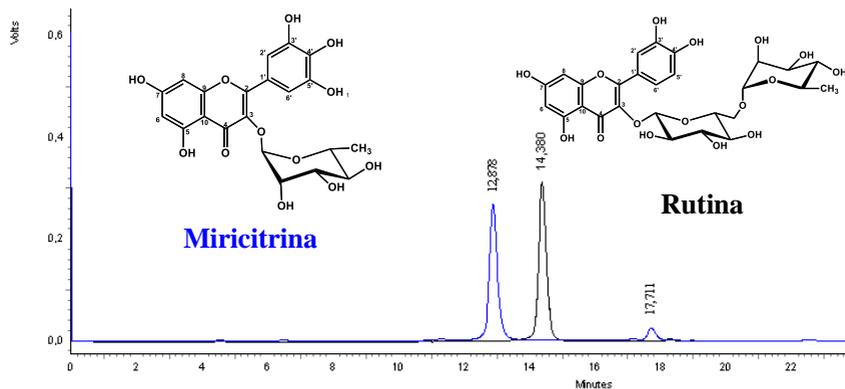
**Figura 10.** Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração acetato de etila de *M. palustris* obtido a 354 nm.



**Figura 11.** Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração butanol de *M. palustris* obtido a 354 nm.

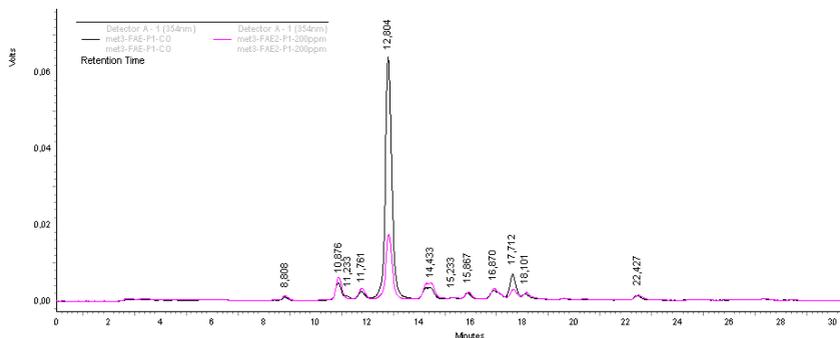
A fim de determinar os compostos majoritários observados nas frações das duas espécies, foram realizadas corridas com dois padrões de flavonóis heterosídeos disponíveis, a miricitrina e a rutina, utilizando as mesmas condições de análise das frações. O padrão a apresentar tempo de retenção próximo aos compostos majoritários encontrados foi o flavonóide miricitrina (12,8 min) como pode ser visto na figura 12. O pico em 14,3

refere-se à rutina e o pequeno sinal em 17,7 min é relativo a impureza, uma vez que o padrão de miricitrina utilizado trata-se de um composto isolado no laboratório e não de um padrão comercial.

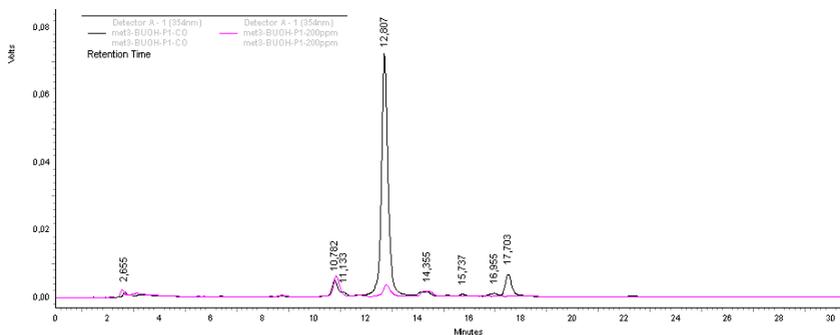


**Figura 12.** Perfil cromatográfico por HPLC-DAD dos flavonoides miricitrina e rutina obtidos a 354 nm.

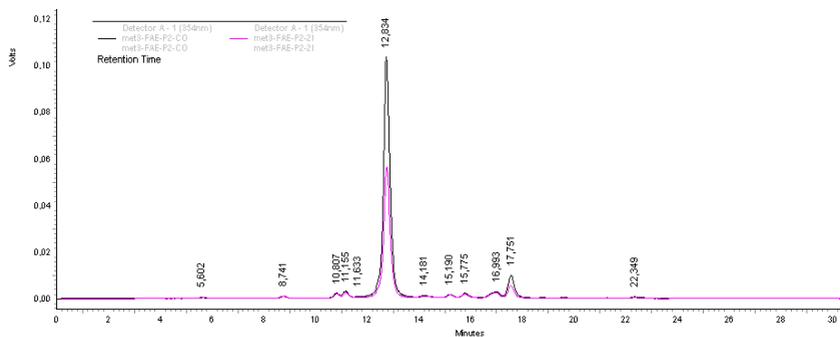
A fração acetato de etila de *M. splendens* (Figura 8) e as frações acetato de etila e butanol de *M. palustris* (Figuras 10 e 11) apresentaram um pico majoritário em 12,8 min podendo este ser o flavonóide miricitrina. A fração butanol de *M. splendens* (Figura 9) apresentou um pico em 13,0 min podendo, também, ser atribuído ao flavonóide miricitrina, uma vez que pequenas variações no tempo de retenção podem ocorrer pela reposição do solvente ou por análises realizadas em dias diferentes. Portanto, a fim de certificar se os compostos majoritários se tratavam mesmo de flavonóide miricitrina, realizou-se a co-injeção das amostras junto à substância de referência (miricitrina). Os cromatogramas podem ser visualizados nas figuras de 13-16.



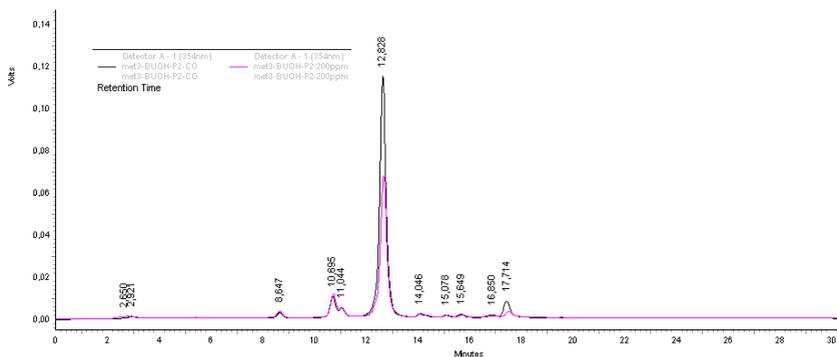
**Figura 13.** Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração acetato de etila de *M. splendens* com co-injeção do padrão miricitrina (20%) obtido a 354 nm.



**Figura 14.** Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração butanol de *M. splendens* com co-injeção do padrão miricitrina (20%) obtido a 354 nm.



**Figura 15.** Perfil cromatográfico da fração acetato de etila de *M. palustris* com co-injeção do padrão miricitrina (20%) obtido a 354 nm.



**Figura 16.** Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração butanol de *M. palustris* com co-injeção do padrão miricitrina (20%) a 354 nm.

De acordo com os cromatogramas 13-16, pode-se inferir que o flavonóide miricitrina está presente nas frações acetato de etila de *M. splendens* e acetato de etila e butanol de *M. palustris*. O perfil cromatográfico se manteve nas três frações tendo apenas o aumento da área do composto no tempo de retenção de 12,8 min. O cromatograma da fração butanol de *M. splendens* com a co-injeção de padrão (Figura 14) não apresentou um perfil que possa garantir a presença do flavonóide miricitrina na fração. A concentração do padrão ficou visivelmente elevada em relação à fração, além disso, não foi observada simetria dos sinais.

Uma observação interessante a respeito dos cromatogramas é que em todas as frações, com exceção da fração butanol de *M. splendens*, foi verificada a presença do sinal de impureza do padrão em 17,7 min. Isso indica que esta impureza pode ser outro flavonóide de polaridade inferior a miricitrina, podendo ser, inclusive, a aglicona miricetina.

Tanto o flavonóide miricitrina quanto a sua aglicona, miricetina já foram encontradas em espécies do gênero *Myrcia* (YOSHIKAWA *et al.*, 1998; FERREIRA *et al.*, 2006). No entanto, sabe-se que a confirmação da presença destes compostos só é possível através do isolamento por métodos cromatográficos tradicionais, com posterior identificação espectroscópica, ou por análises hifenadas, onde se podem obter mais informações analíticas, como espectroscopia de massa e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono. Diante disso, buscou-se o fracionamento

cromatográfico por coluna destas frações e, bem como um estudo por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando métodos hifenados (HPLC-SPE-RMN), para obter informações mais precisas de composição e atividade dos compostos. Estes procedimentos estão descritos nos itens 5.5 e 5.6.

### **5.3. Fracionamento cromatográfico de *Eugenia catharinae***

Para esta espécie, foram escolhidas, para o fracionamento cromatográfico, as frações insolúvel e acetato de etila, devido ao fato de que estas apresentaram maior rendimento no particionamento líquido-líquido, o que possibilitou um trabalho fitoquímico mais detalhado. Os procedimentos desenvolvidos estão descritos a seguir.

#### **5.3.1. Fracionamento cromatográfico da fração insolúvel**

Uma alíquota da fração insolúvel (25,00 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (CC), utilizando como eluentes hexano/acetato de etila com gradientes de polaridade. Desta cromatografia foram obtidas 69 frações (A1-A69), sendo que as mesmas foram reunidas segundo seu perfil em cromatografia em camada delgada (CCD). As frações A13-A20 foram reunidas e submetidas a um novo fracionamento cromatográfico usando eluentes hexano/acetato de etila e acetato de etila/etanol em gradiente de polaridade gerando 22 frações (B1-B22). B8-B10 apresentou-se como um óleo de coloração laranja que foi denominado de Composto **C-1** (627,8 mg).

O espectro de infravermelho em pastilha de KBr apresentou bandas em 3396,4  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao grupamento OH e outras bandas em 2930,2 e 2860,3  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a vibrações de ligações C-H, 1591,1  $\text{cm}^{-1}$  estiramento C=C de anel aromático, em 1347,2 e 1297,1  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento de ligação C-O (Anexo 1).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Anexo 2) mostra um conjunto de sinais entre 0,5 -2,5 sugerindo a presença de uma cadeia linear composta por cinco carbonos ligada a um anel aromático. O tripleto centrado em 0,89 ppm com

constante de acoplamento de  $J = 7,0$  Hz, refere-se a hidrogênios de metila vizinha a um  $\text{CH}_2$ ; um multipletto centrado em 1,31 ppm com integração para 4 hidrogênios sinaliza a presença de dois  $\text{CH}_2$  vizinhos; um outro multipletto centrado em 1,58 ppm com integração para 2 hidrogênios sugere um  $\text{CH}_2$  vizinho a outro  $\text{CH}_2$  e a uma metila terminal; finalmente, um triplete centrado em 2,50 ppm ( $J = 8,0$  Hz; 3H) refere-se ao  $\text{CH}_2$  vizinho a um anel benzênico e a outro  $\text{CH}_2$  (Figura 17). A presença de uma metoxila foi confirmada pelo sinal de singletto que aparece em 3,75 ppm com integração de 3 hidrogênios. O sinal de um singletto largo em 5,47 ppm indica, provavelmente, a presença de uma hidroxila fenólica. Entre 6,24 e 6,34 ppm observa-se 3 tripletos centrados em 6,25; 6,28 e 6,33 ppm com  $J = 2,5$  Hz, típicos a acoplamento meta de anel aromático trissubstituído (Figura 18).

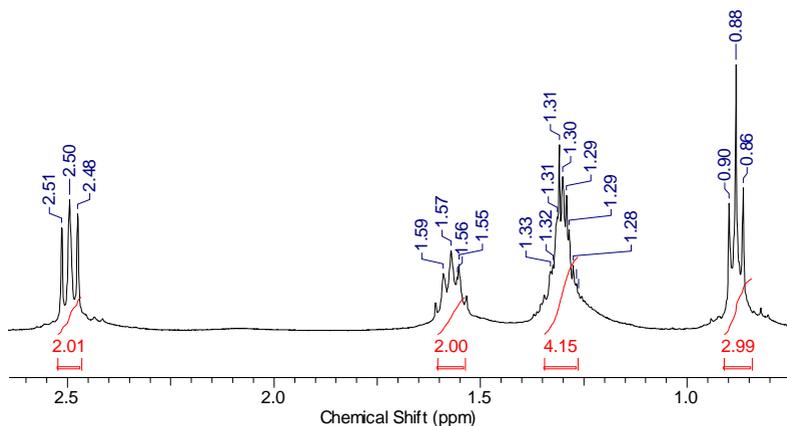


Figura 17. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração B8-B10 de *E. catharinae*.

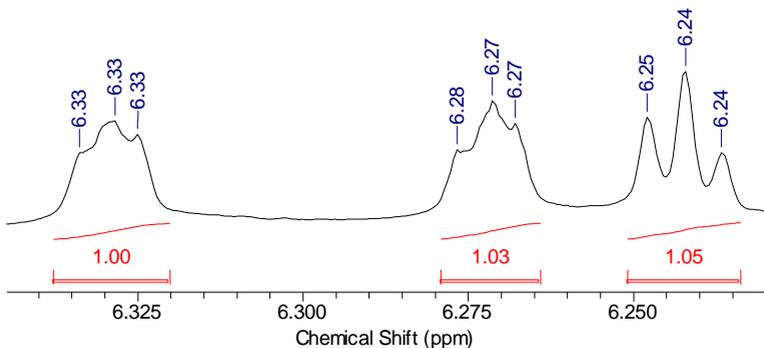


Figura 18. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração B8-B10 de *E. catharinae*.

Os sinais de carbono foram observados através da técnica de APT (*Attached Proton Test*) (Anexo 3). Neste experimento, os deslocamentos de átomos de carbonos quaternários e secundários ( $\text{CH}_2$ ) são apresentados como singlete de amplitude positiva. Por outro lado, os carbonos primários ( $\text{CH}$ ) e terciários ( $\text{CH}_3$ ) são apresentados como singlete de amplitude negativa. Na região de amplitude positiva é possível observar os quatro sinais referentes a carbonos metilênicos que aparecem entre 22,4 e 35,9 ppm e os últimos três sinais entre 145,8 e 160,4 ppm referentes aos carbonos quaternários do anel aromático. Nas regiões de amplitude negativa é possível observar um sinal em 13,9 ppm referente a uma metila e outro referente a uma metoxila em 55,1 ppm. Os três sinais entre 98,7 e 108,1 ppm referem-se a carbonos  $\text{CH}$  aromáticos.

Os sinais dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos experimentalmente foram comparados com os dados da literatura (McCLANAHAN & ROBERTSON, 1985). Através desta comparação sugeriu-se que o Composto **C-1** trata-se do 3-metóxi-5-pentifenol, conhecido como monometil-olivetol, Figura 19.

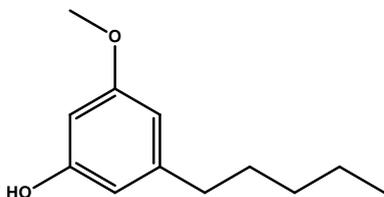


Figura 19. Monometil-olivetol (1-hidroxi-3-metoxi-5-n-pentil benzeno)

Os derivados de olivetol são frequentemente encontrados em espécies de líquens e também têm um papel fundamental nas espécies de cannabis, produzindo o ácido olivetóico que é utilizado na biossíntese do tetrahidrocanabinol (THC) (DEWICK, 2009). O monometil-olivetol, apesar de ser um composto simples, nunca foi encontrado em espécies da família Myrtaceae.

A fração A23-A30 foi recromatografada em sílica gel utilizando com eluente hexano/acetato de etila em gradiente de polaridade, obtendo-se 21 frações (C1-C21) na qual a fração C5-C6 apresentou-se como um fino sólido branco o qual foi denominado de mistura **M-1** (7,64 mg). Este sólido, após recristalização em metanol, apresentou uma faixa de ponto de fusão de 131,0 - 132,0 °C e, quando analisado em CCD, apresentou uma mancha de coloração violeta ao ser revelado com anisaldeído sulfúrico, sugerindo a presença de esteróides ou triterpenos.

O espectro de infravermelho em pastilha de KBr apresentou um perfil de absorção típico de estruturas esteroidais ou triterpênicas. Uma banda intensa e larga com máximo de absorção em 3434  $\text{cm}^{-1}$  característica do estiramento da ligação O-H; um grupo de bandas de absorção para estiramentos C-H na região de 2960-2850  $\text{cm}^{-1}$ , cuja alta intensidade indica a presença de uma grande cadeia hidrocarbonada que juntamente com a complexidade do espectro na região de deformações angulares abaixo de 1462  $\text{cm}^{-1}$  indica não se tratar de uma cadeia hidrocarbonada linear. Além disso, observou-se uma banda de menor intensidade em 1645  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a absorção de estiramento de ligação dupla C=C (Anexo 4).

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Anexo 5) permitiu a visualização uma faixa de sinais na região de campo alto entre 0,5-2,5 ppm típicas de

estruturas esteroidais ou triterpênicas. Verificou-se em aproximadamente 5,3 ppm a presença de um sinal largo referente a hidrogênios ligados a carbono  $sp^2$ . A presença do multiplete centrado em aproximadamente 3,52 ppm (Figura 20) sinaliza a presença do hidrogênio carbinólico típico da  $\beta$ -hidroxilação do C-3 do sistema ciclopentanoperidrofenantreno característica dos fitoesteróis. Observa-se que nos esteróis, este H-3 forma um multiplete pelo acoplamento com dois grupos metilenos vizinhos 2- $CH_2$  e 4- $CH_2$ . Nos triterpenos, a presença de duas metilas em C-4, faz com que o H-3 acople somente com os hidrogênios axial e equatorial do metileno C-2, resultando em um sinal com a forma de um duplo-duplete. A ampliação da região do hidrogênio ligado a carbono  $sp^2$  revela a presença de três conjuntos de picos. O primeiro sinal centrado em 5,34 ppm refere-se ao H-6 da dupla trissubstituída dos esteróides com o esqueleto **colestano** e os duplos dupletos centrados em 5,14 ppm ( $J_1=8,6$  e  $J_2=15,2$  Hz) e 5,01 ppm ( $J_1=8,6$  e  $J_2=15,2$  Hz) referem-se aos H-22 e H-23 da dupla dissubstituída de esteróides. A diferença de intensidade destes sinais em conjunto com a integração (Figura 21) sugere tratar-se de uma mistura.

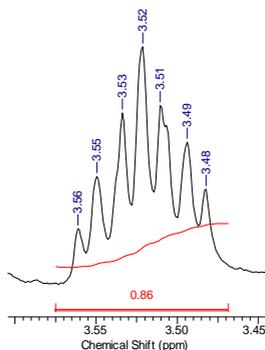
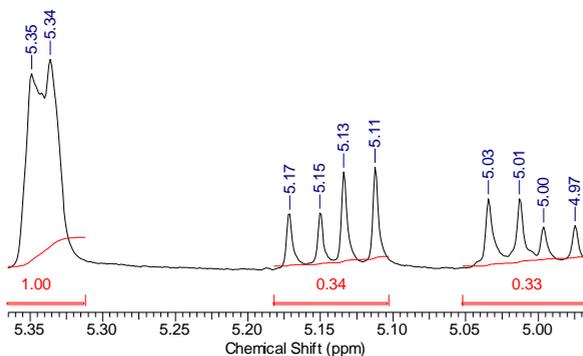
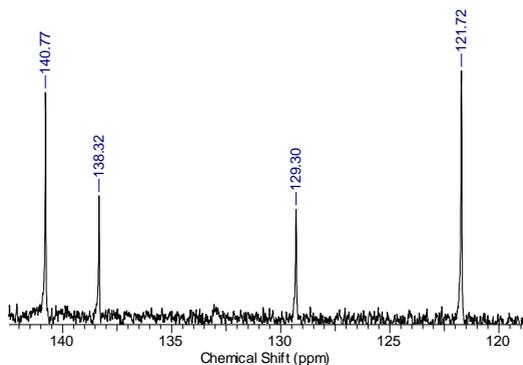


Figura 20. Ampliação do espectro de RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ ) da fração C5-C6



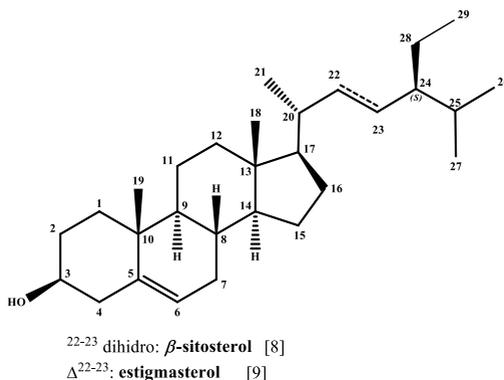
**Figura 21.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração C5-C6

Na análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Anexo 6) observou-se a presença de cerca de 38 sinais, indicando a presença de mistura, visto que os esqueletos esteroidais apresentam entre 27 e 29 carbonos. Neste espectro, aparecem quatro sinais na região desblindada a cima de 120 ppm que confirma a presença de duas ligações duplas (Figura 22). Estes sinais são característicos de esqueletos esteroidais, sendo uma das insaturações referentes a ligação dupla endocíclica localizada entre C-5 e C-6 (140,77 e 121,72 ppm) e a outra da região alifática entre C-22 e C-23 (138,3 e 129,3 ppm).



**Figura 22.** Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração C5-C6

A análise das integrações dos sinais H-3 e H-22/H-23 no espectro de RMN  $^1\text{H}$  juntamente com a comparação dos deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com os registrados na literatura (KOVGANKO *et al.*, 2000; FORGO & KÖVÉR, 2004.) foi possível identificar que os dois compostos presentes na mistura são o  $\beta$ -sitosterol (Composto **C-2**) e o estigmasterol (Composto **C-3**) (Figura 23), corroborando com os muitos relatos da literatura, em que o fitoesterol  $\beta$ -sitosterol geralmente vem acompanhado de estigmasterol em menor quantidade. De acordo com a análise de integração dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (H-22 e H-23 da dupla, estigmasterol), **M-1** apresentou uma proporção de 66%  $\beta$ -sitosterol e 34% estigmasterol. A análise de CCD da mistura com amostras autênticas confirma a presença destes dois compostos.



**Figura 23.** Estrutura dos esteróis presentes na mistura **M-1** de *E. catharinae*

A fração A64-A69 da coluna da fração insolúvel ao ser reunida, passou por um processo de recristalização utilizando etanol, gerando um precipitado amarelo denominado de Composto **C-4** (50,2 mg). Este precipitado apresentou um ponto de fusão de 196,4-197,0°C e quando analisado em CCD apresentou uma mancha de coloração verde escuro ao ser revelado com  $\text{FeCl}_3$ , indicando ser este um composto fenólico.

O espectro de infravermelho em pastilha de KBr revelou bandas em 3365,8 e 3260,4  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao grupamento OH e outra pequena

banda  $2950,7\text{ cm}^{-1}$  correspondente a vibrações de ligações C-H. Em  $1655,8\text{ cm}^{-1}$  temos os estiramentos de carbonila C=O em  $1605,6\text{ cm}^{-1}$ , estiramento C=C de anel aromático em  $1349,1$  e em  $1292,2\text{ cm}^{-1}$  os estiramentos das ligações C-O (Anexo 7). O espectro de infravermelho apresentou um perfil de absorção típico de glicosídeos de flavonóides.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo 8) é possível observar a presença de um duplete, na região mais blindada, em  $0,94\text{ ppm}$  com constante de acoplamento de  $6,3\text{ Hz}$  e integração para 3 hidrogênios, sinal este típico do grupo metílico de uma ramnose. Na região de  $3,0\text{-}4,2\text{ ppm}$  verifica-se um conjunto de sinais de multiplete referentes a hidrogênios ligados a carbono oxigenado de açúcar. O duplete centrado em  $5,30\text{ ppm}$ , com  $J_{\text{eq-eq}} = 1,6\text{ Hz}$  é característico do hidrogênio anomérico H-1" da ramnose e, devido a constante de acoplamento estar entre  $1\text{-}4\text{ Hz}$  trata-se da configuração  $\alpha$  (se fosse  $\beta$ -ramnose a constante de acoplamento seria entre  $6\text{-}8\text{ Hz}$ ). Na região de hidrogênios aromáticos, verificam-se dois dupletos em  $6,20$  e  $6,36\text{ ppm}$  meta correlacionados com constantes de acoplamento de  $2,3\text{ Hz}$  e integração para um hidrogênio cada, referente aos hidrogênios ligados aos C8 e C6, respectivamente, do anel A de um flavonoide. Em  $6,94\text{ ppm}$  observa-se um singleto com integração para dois hidrogênios, indicando ser dois hidrogênios iguais ligados a anel aromático, confirmando o anel B do flavonóide 3,4,5-trisubstituído.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Anexo 9) apresentou sinais típicos para aglicona do tipo flavonol. O sinal em  $179,7\text{ ppm}$  é característico de uma carbonila  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturada e os sinais em  $136,3$  e  $159,4\text{ ppm}$  representam os carbonos olefínicos alfa e beta ao grupo carbonila, respectivamente. A presença de dois sinais em  $165,9$  e  $163,2\text{ ppm}$  sinalizam carbonos hidroxilados do anel A de uma flavona. Os picos em  $146,8$  (intensidade para dois carbonos) e  $137,8\text{ ppm}$  foram atribuídos aos carbonos hidroxilados do anel B do flavonóide 3,4,5-trisubstituído. O sinal em  $103,6\text{ ppm}$  foi atribuído ao carbono 1" da ramnose. Os sinais em  $72,0$ ,  $73,3$ ,  $75,9$  e  $77,3\text{ ppm}$  foram atribuídos aos carbonos carbinólicos de uma ramnose e o sinal em  $17,6\text{ ppm}$  ao carbono do grupo metílico da ramnose.

As evidências experimentais e a comparação dos deslocamentos químicos dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com os dados da literatura

(CERUKS *et al.* 2007) permitiu propor a estrutura do Composto **C-4** como sendo o flavonóide glicosilado miricetina-3-O- $\alpha$ -ramnopiranosídeo, conhecido como miricitrina (Figura 24) e muito frequente em espécies da família Myrtaceae.

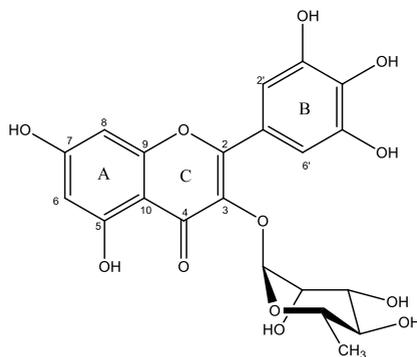


Figura 24. Miricitrina (miricetina-3-O- $\alpha$ -ramnopiranosídeo) [14]

### 5.3.2. *Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila*

Uma parte da fração acetato de etila (10,00 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (CC), utilizando como eluentes acetato de etila/etanol com gradientes de polaridade. Desta cromatografia foram obtidas 29 frações (D1-D29), sendo que as mesmas foram reunidas segundo seu perfil em cromatografia em camada delgada (CCD). A fração D8-D9 apresentou duas manchas com  $R_f$  diferentes através da análise de CCD ( $R_f = 0,85$ ;  $R_f = 0,68 - 100\%$  AcOEt). Diante disso, realizou-se cromatografia em sílica gel flash utilizando Hex/AcOEt 20% como solvente isocrático, gerando 63 frações (E1-E63).

A fração E4-E6 ao ser reunida gerou um precipitado amarelo denominado de Composto **C-5** (33,2 mg). Este precipitado apresentou um ponto de fusão  $> 300$  °C e quando analisado em CCD apresentou uma mancha de coloração castanha ao ser revelado com  $\text{FeCl}_3$  sugerindo ser este um flavonóide.

Assim como para o Composto **C-4**, O espectro de infravermelho apresentou um perfil de absorção típico de flavonóides com bandas intensas em 3383,8 e 3269,1  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao grupamento OH, pequena banda 2949,9  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a vibrações de ligações C-H; outras bandas de alta intensidade em 1656,7  $\text{cm}^{-1}$  e 1605,6  $\text{cm}^{-1}$ , indicando a presença de grupos C=O e ligações C-O, respectivamente (Anexo 10).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo 11) foi possível observar a presença de apenas cinco sinais na região de hidrogênios aromáticos, com integração para um hidrogênio cada, indicando ser este um flavonóide simples, sem a substituição de um açúcar. A presença de dois dupletos centrados em 6,17 ( $J = 2,1$  Hz) e 6,38 ppm ( $J = 2,1$  Hz) sinalizam o acoplamento meta dos dois hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente, do anel A dos flavonoides. Verifica-se ainda um duplete em 6,87 ppm ( $J = 8,7$  Hz) indicando acoplamento orto de H-5' com H-6'; outro duplete em 7,72 ppm ( $J = 2,2$ ) referente a H-2' acoplado em meta com H-6' e um duplo duplete em 7,63 ppm com constantes de acoplamento 8,7 Hz e 2,2 Hz, indicando a presença de hidrogênios orto e meta correlacionados a H-6' do anel B dos flavonoides. Os espectros de infravermelho e RMN de  $^1\text{H}$  são suficientes para a identificação do composto em questão. O Composto **C-5** foi identificado como quercetina (Figura 25) e suas constantes físicas e seus dados espectroscópicos experimentais estão de acordo com a literatura (DONIA *et al.* 2011).

Quercetina é bastante encontrada na família Myrtaceae, especialmente no gênero *Eugenia* (TIMBOLA *et al.*, 2002; HUSSEIN *et al.*, 2003; SIMIRGIOTIS *et al.*, 2008). Quercetina é um flavonoide com muitas propriedades farmacológicas descritas na literatura, tais como antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antiviral, cardiovascular, entre outras atividades (BEHLING *et al.*, 2008).

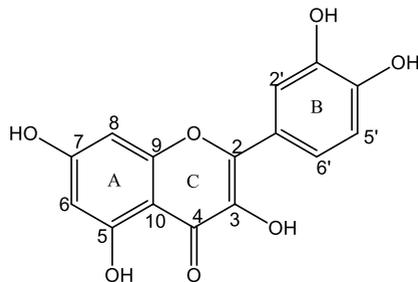


Figura 25. Quercetina (3,5,7,3'- 4'- pentahidroxi flavona) [17]

A fração E11-E48 ao ser reunida gerou um precipitado branco denominado de Composto **C-6** (8,10 mg). Este precipitado apresentou um ponto de fusão 255,2-256,2 °C e quando analisado em CCD apresentou uma mancha de coloração castanha ao ser revelado com anisaldeído sulfúrico. O espectro de infravermelho (Anexo 12) em pastilha de KBr destaca uma larga absorção na região de 3468,9  $\text{cm}^{-1}$ , referente aos estiramentos de ligação O-H, que juntamente com a banda em 1714,7  $\text{cm}^{-1}$  para a C=O de ácido, sinalizam a presença de um ácido carboxílico. Por outro lado a intensa absorção em 2900  $\text{cm}^{-1}$  para estiramentos de ligações C-H e comparando sua intensidade com a banda de C=O, mostra ser um composto contendo uma cadeia hidrocarbonada muito grande.

Os espectros de RMN apresentaram sinais característicos dos esqueletos triterpênicos da série ursano. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo 13), foi observado um singleto largo em 5,64 ppm, com integração para um hidrogênio, correspondente ao hidrogênio da ligação dupla endocíclica trissubstituída na posição C-12 do esqueleto ursano. Em 4,48 ppm observa-se um singleto largo referente ao hidrogênio carbinólico da posição C-3 confirmando a estrutura triterpênic e não esteroidal. O singleto largo em 3,07 ppm foi atribuído ao H-18 e o seu deslocamento químico para campo mais baixo pode ser justificado pelos efeitos de desproteção anisotrópica conferido pela presença de uma carbonila de ácido carboxílico em C-17 e pela ligação dupla nos carbonos C-12 e C-13. Os dois dupletos, um em 4,12 ppm e outro 3,86 ppm, ambos com constante de acoplamento de 10,8 Hz (acoplamento geminal), indicam a presença de um metileno carbinólico. Por

fim, o grupo de sinais de hidrogênios na região de campo alto sinalizam a presença de hidrogênios metílicos e metilênicos, característico de estruturas triterpênicas.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Anexo 14) mostrou a presença de 30 sinais, confirmando a estrutura triterpênica. O sinal em 181,2 ppm corresponde a carbonila de ácido. Foi observado também, os sinais 140,4 e 128,5 ppm que correspondem aos carbonos da dupla ligação endocíclica em C-12 e C-13 respectivamente, sustentando a estrutura de um esqueleto urs-12-eno de triterpenos. Observa-se ainda a presença de um sinal em 73,1 ppm referente a um carbono carbinólico terciário. Em 70,4 ppm e 66,2 ppm observam-se carbonos hidroximetínico e hidroximetilênico, respectivamente. O sinal 55,1 ppm é atribuído ao C18, um carbono terciário na posição alílica.

O espectro de DEPT135 (Anexo 15) permitiu explorar os sinais referentes a carbonos primários, secundários e terciários, ajudando a desvendar a posição das três hidroxilas presentes na estrutura. Com essas informações observa-se a presença de uma função álcool secundário (70,4 ppm) atribuído ao C-3, já conhecido, proveniente da rota biossintética de triterpenos; um álcool primário (66,2 ppm) e um álcool terciário pela ausência do sinal de carbono no DEPT, porém observado no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  na região de carbonos ligados a hidroxilas. Na tabela 6 são apresentados os dados obtidos dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , DEPT assim como os dados referentes às correlações 2D destes espectros (COSY, HMQC).

O Composto **C-6** foi sujeito à análise de espectro ESI-EM e apresentou o pico do íon *quasi* molecular  $[\text{M-H}]^-$  em  $m/z$  487 (Anexo 16), o que permitiu sugerir a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$  e uma massa molecular de 488 u.m.a. Através das análises espectrométricas uni e bi-dimensional, ponto de fusão da literatura e comparações com espectros da literatura (AMIMOTO *et al.* 1993), foi possível propor a estrutura para o Composto **C-6** como sendo ácido  $3\beta,19\alpha,23$ -trihidroxi-urs-12-en-28-oico, Ácido rotúndico (Figura 26).

Tabela 6. Dados espectrais de RMN uni e bidimensionais do Composto C-6.

C	$\delta_C^*$ ppm	$\delta_C$ ppm	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMQC- $^1J_{\text{CH}}$	DEPT135	$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY
1	39,0	38,99	1,89	CH <sub>2</sub>	
2	27,8	26,87	2,15	CH <sub>2</sub>	4,46
3	73,7	70,43	4,46	CH	2,15
4	43,0	44,41	-	C	-
5	48,4	50,64	1,96	CH	
6	18,9	19,66	1,74	CH <sub>2</sub>	1,35
7	33,4	34,36	1,35	CH <sub>2</sub>	1,74
8	40,5	41,06	-	C	-
9	47,9	48,28	2,15	CH	5,64
10	37,3	37,97	-	C	-
11	24,2	24,72	1,73	CH <sub>2</sub>	5,64
12	128,2	128,56	5,64	CH	2,15 1,73
13	140,1	140,42	-	C	-
14	42,5	42,59	-	C	-
15	29,5	29,74	2,35 (td; 4,57; 13,05; 14,27)	CH <sub>2</sub>	3,15
16	26,5	27,43	3,15 (dt; 4,15; 13,29; 14,76)	CH <sub>2</sub>	-
17	48,8	48,78	-	C	-
18	54,7	55,10	3,07	CH	
19	72,8	73,15	-	C	-
20	42,3	42,86	1,50 (d; 6,30)	CH	1,13
21	27,1	26,97	2,06	CH <sub>2</sub>	
22	37,6	34,51	2,10	CH <sub>2</sub>	2,06
23	68,1	66,16	3,86 (d; 10,80) 4,12 (d; 10,80)	CH <sub>2</sub>	3,86 4,12
24	13,2	24,12	1,65	CH <sub>3</sub>	-
25	16,1	16,45	1,01	CH <sub>3</sub>	-
26	17,4	17,63	1,15	CH <sub>3</sub>	-
27	24,8	25,07	1,68	CH <sub>3</sub>	-
28	180,8	181,19	-	C	
29	27,3	27,56	1,44	CH <sub>3</sub>	-
30	16,9	17,29	1,13 (d; 6,64)	CH <sub>3</sub>	1,50

\* AMIMOTO *et al.* 1993

De acordo com o HMQC, espectro que relaciona hidrogênio diretamente ligado a carbono ( $J^1$ ), pôde-se atribuir os hidrogênios metílicos (1,01-16,4; 1,13-17,3; 1,15-17,6; 1,65-24,1; 1,68-25,1; 1,44-27,5) ppm,

confirmando a presença de apenas 6 metilas, como foi observado no espectro de DEPT. O hidrogênio em 3,07 ppm está ligado ao C-18 (55,1 ppm). Pode-se observar a presença de hidrogênios diastereostópicos, em 3,86 e 4,12 ppm que se relacionam com o carbono primário de deslocamento 66,2 ppm, esse comportamento que diferencia hidrogênios ligados ao mesmo carbono pode ocorrer devido esses hidrogênios estarem em ambientes químicos diferentes, como por exemplo, um com proximidade a uma hidroxila. Observa-se um sinal em 4,48 ppm que se relaciona com o C-3 (70,4 ppm), um carbono terciário ligado a uma hidroxila. O C-3, por sua vez, apresenta um deslocamento em campo mais baixo do que os comumente encontrados em triterpenos, sustentando a ideia que há uma hidroxila próxima a este carbono. Esta hidroxila próxima pode estar ligada ao C-23 ou C-24, no entanto sabe-se que quando a hidroxila está ligada ao C-23, o sinal do C-3 aparece em campo mais baixo.

O espectro de COSY, que defini os acoplamentos entre os hidrogênios vizinhos ( $J^3$ ), ajudou a elucidar a estereoquímica da estrutura. Primeiramente, estabeleceram-se os hidrogênios que estavam perto de hidrogênios conhecidos ligados aos C-3, C-5, C-12, C-18, C-23. A partir destes, foi possível verificar as metilas que acoplavam na vizinhança e, em seguida, os  $\text{CH}_2$  que estavam próximos às metilas.

O espectro de HMBC que descreve os acoplamentos a longa distância com  $J^2$  ou maior, auxiliou a explicar a proximidade de carbonos e hidrogênios vizinhos. Observa-se que os sinais das metilas 17,3 ppm e 27,6 ppm e o sinal do carbono carbinólico 73,1 ppm estão próximos participando de um mesmo núcleo confirmando que estes sinais se referem, respectivamente, aos carbonos C-30, C-29 e C-19. O hidrogênio H-29 acopla com o C-18, C-19 e C-20. Outro grupo de sinais é observado nas proximidades do C-3, C-23 e C-24, onde estão duas hidroxilas. O C-3 (70,4 ppm) acopla com os hidrogênios da metila em C-24 (1,65 ppm) e apenas um dos hidrogênios (3,86 ppm) do carbono primário ligado à hidroxila em C-23. O sinal de H-18 é outro sinal importante que permitiu observar acoplamentos com C-12, C-13, C-14, C-17 e C-28. Vide Figura 26.

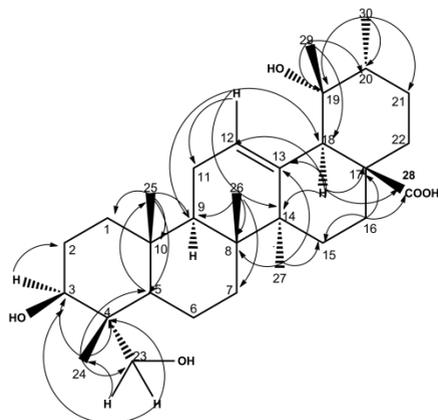


Figura 26. Ácido Rotúndico (Correlação HMBC)

O Ácido rotúndico já foi isolado em espécies de diferentes famílias como Rubiaceae (*Mussaenda pubescens*, *Guettarda platypoda* e *Nauclea officinalis*) (ZHAO *et al.*, 1997; BHATTACHARYYA & ALMEIDA, 1985), Aquifoliaceae (*Ilex rotunda*) (OYAMA *et al.*, 1968), Oleaceae (*Olea europaea*) (SAIMARU *et al.*, 2007) e Sapotaceae (*Planchonella duclitan*) (LEE *et al.*, 2005); no entanto, é a primeira vez que este composto é isolado de uma espécie da família Myrtaceae. Apesar de ter sido isolado pela primeira vez em 1968, são poucos os estudos biológicos realizados com o ácido rotúndico (OYAMA *et al.*, 1968). Até o momento há relatos sobre atividade antitumoral (LEE *et al.*, 2005), hipotensora (LIU, 2010) e de prevenção a doenças cardiovasculares (ZHAO *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2011). Portanto, um estudo biológico com este composto é importante.

A fração D12, da fração acetato de etila, ao ser recristalizada em  $\text{CCl}_3$  gerou um sólido castanho denominado de Composto C-7 (33,2 mg). Este precipitado apresentou um ponto de fusão 182,3 - 183,2 °C e, quando analisado em CCD, apresentou uma mancha de coloração laranja ao ser revelado com anisaldeído sulfúrico. O espectro na região do infravermelho IV em pastilha de KBr (Anexo 17) mostra uma banda intensa em  $3431,0 \text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento O-H, uma banda com absorção em  $1622,0 \text{ cm}^{-1}$  relativo à vibração C=C aromático e absorção de menor intensidade em

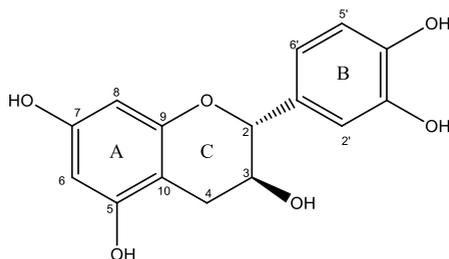
1143,0  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes a vibração das ligações C-O. O espectro é característico de estruturas flavonoídicas, no entanto a ausência de uma banda de absorção para carbonila sugere a presença de um flavan-3-ol.

Na análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Anexo 18) observam-se quatro sinais na região de hidrogênios alifáticos. É possível observar dois duplos dupletes com integração para um hidrogênio cada, centrados em 2,69 ( $J = 16$  e 8,2 Hz) e 2,41 ppm ( $J = 16$  e 5,4 Hz), característicos de um grupo metilênico situado entre um anel aromático e um carbono oximetínico. Estes sinais mostram claramente o acoplamento geminal entre os hidrogênios H-4 (pseudo equatorial e pseudo axial com constante de acoplamento de 16 Hz) e os acoplamentos vicinais com H-3 pseudo axial, com constantes de acoplamento de 8,2 Hz (para acoplamento H-4ax e H-3ax) e de 5,4 Hz (para acoplamento H-4eq e H-3ax). O H-2 é observado em 4,46 ppm na forma de um duplete ( $J = 8,0$  Hz), mostrando o acoplamento pseudo axial-pseudo axial com H-3. O hidrogênio H-3 no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da catequina é observado em 3,88 ppm na forma de um multiplete. Na região de hidrogênios aromáticos, observaram-se três sinais que caracterizam um sistema de acoplamento AMX em 6,73 ppm (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 6,68 (dd,  $J = 7,9$  e 1,8 Hz, 1H) e 6,66 ppm (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H), atribuídos aos H-2', H-5' e H-6', do anel B, respectivamente, bem como dois dupletes meta relacionados ( $J = 2,3$  Hz, 1H cada) em 5,83 e 5,75 ppm, atribuídos aos hidrogênios 6 e 8 do anel A de catequinas. A diferença entre catequina e epicatequina é sutil, reside na posição da hidroxila do C3 (epímeros). Na catequina o grupo -OH do anel C é trans em relação ao grupo fenil, fazendo com que o H-3 faça um acoplamento axial-axial com H-2 ( $J \cong 8$  Hz). Na epicatequina o grupo -OH do anel C é cis em relação ao grupo fenil, fazendo com que H-3 faça um acoplamento axial-equatorial com o H-2 ( $J \cong 5$  Hz).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostra a presença de 15 carbonos e o não aparecimento do pico de carbonila confirma a classe flavan-3-ol (Anexo 19). Os deslocamentos químicos 82,8; 68,8 e 28,4 ppm podem ser atribuídos os C2, C3 e C4, respectivamente, atentando para os sutis deslocamentos da catequina e não da epicatequina.

As evidências observadas nos espectros de IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  a comparação com a literatura (GOETZ, et al 1999) indicam que o Composto

**C-7** é o flavonóide catequina (Figura 27). Além disso, foi realizada análise de CCD com uma amostra autêntica que confirmou o mesmo perfil cromatográfico ( $R_f = 0,32$ :Hex/AcOEt - 20:80, revelador: anisaldeído sulfúrico). Catequinas são bastante encontradas na família Myrtaceae e no gênero *Eugenia* e *Psidium* e apresentam uma série de atividades biológicas, como antioxidante, quimioprotetora, antiinflamatória e anticarcinogênica (SCHMITZ *et al.*, 2005).



**Figura 27.** (+)-Catequina

#### 5.4. Fracionamento cromatográfico de *Psidium cattleyanum*

A espécie *P. cattleyanum* já havia sido estudada anteriormente fornecendo, a partir da fração insolúvel, os esteróis,  $\beta$ -sitosterol e  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo; e uma mistura de triterpenos ácidos, ácido oleanólico e ácido ursólico. Da fração acetato de etila, foi possível obter somente a (+)-catequina uma vez que se trabalhou apenas com 1 g da fração (MORESCO *et al.*, 2012b).

Um novo estudo foi iniciado com a fração acetato de etila utilizando uma quantidade maior de amostra e sistema de solventes diferentes com o objetivo de encontrar novos compostos no extrato. Portanto, 3,80 g da fração foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel utilizando o sistema de eluentes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 18 frações que foram submetidas à análise de CCD e reunidas por semelhança. 400 mg da fração 7-8 foi submetida a coluna de sílica flash utilizando o sistema de solvente isocrático AcOEt 85%/hexano 14%/HCOOH 1%).

Obteve-se 21 frações sendo que somente a fração 7-10, após recristalização em metanol, apresentou-se na forma de um precipitado de cor amarela que foi denominado de Composto **C-8** (58,0 mg). Este precipitado apresentou um ponto de fusão 312,3 - 314,5 °C e, quando analisado em CCD, apresentou uma mancha de coloração castanha ao ser revelado com FeCl<sub>3</sub>. O Composto **C-8** apresentou as mesmas evidências espectroscópicas que o Composto **C-5** isolado da espécie *E. catharinae* com a diferença da presença de uma unidade de açúcar evidenciada no espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Anexo 20). Essa unidade de açúcar foi identificada como sendo uma ramnose pelo sinal de duplete na região de campo baixo em 0,94 ppm com integração para três hidrogênios. A presença do duplete centrado em 5,35 ppm, com  $J_{\text{eq-eq}} = 1,6$  Hz indica que o hidrogênio anomérico H-1'' da ramnose está em configuração  $\alpha$ . A análise conjunta dos espectros de IV, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C deste composto permitiu identificar o Composto **C-8** como sendo quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, conhecido como quercitrina (Figura 28). Este composto foi, recentemente, encontrado juntamente com outros seis flavonoides na mesma espécie cultivada na Polinésia Francesa (HO *et al.*, 2012).

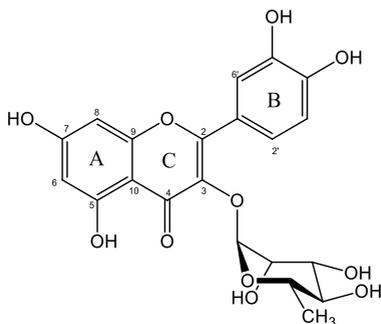


Figura 28. Quercitrina (quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo) [18]

## 5.6. Fracionamento cromatográfico de *Myrcia splendens* e *Myrcia palustris*

As frações mais polares (acetato de etila e butanol) foram escolhidas para o estudo fitoquímico por serem as frações que concentram as maiores quantidades de compostos fenólicos, afirmação essa que se confirma nos estudos de atividade antioxidante descritos no item 5.7.2.

### 5.6.1. Fracionamento cromatográfico das frações acetato de etila de *M. splendens* e *M. palustris*

O perfil cromatográfico das frações acetato de etila e butanol das duas espécies, relatado anteriormente no item 5.2, mostrou a presença de miricitrina, como composto majoritário, em todas as frações. Este composto foi obtido em todas as frações em concentrações diferentes como relatados a seguir.

Uma parte da fração acetato de etila de *M. splendens* (10,00 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (CC), utilizando como eluentes acetato de etila/etanol com gradientes de polaridade. Desta cromatografia foram obtidas 30 frações, sendo que as mesmas foram reunidas segundo seu perfil em cromatografia em camada delgada (CCD). As frações reunidas de 7-8, após sucessivas recristalizações em metanol, renderam um sólido amarelo escuro (201,6 mg). Este precipitado apresentou um ponto de fusão de 195,3-196,5 °C valor este bem próximo ao Composto **C-4** obtido da espécie *E. catharinae*. A comparação do perfil em CCD (Rf 0,69, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 70%), bem como a comparação dos espectros de IV, RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C, indicam que o composto em questão é o Composto **C-4**, miricitrina, obtido anteriormente na espécie *E. catharinae*.

O mesmo composto foi obtido da fração acetato de etila de *M. palustris*, durante o processo de partição líquido-líquido, sob a forma de um precipitado. Obteve-se 166,0 mg do Composto **C-4** de 30,3 g da fração acetato de etila, o que corresponde a cerca de 5% desta fração.

### 5.6.2. *Fracionamento cromatográfico da fração butanol de M. palustris*

O fracionamento cromatográfico da fração butanol de *M. palustris* em sílica gel (7,5 g), utilizando como eluente acetato de etila/etanol em gradiente de polaridade, rendeu 25 frações. A fração 2 (100% AcOEt) apresentou um precipitado amarelo-alaranjado (19,2 mg) que degradou-se próximo a 300°C. A fração apresentou um perfil espectroscópico bastante semelhante ao Composto **C-5** (quercetina) com a diferença de apenas um sinal evidenciado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo 21). Em 7,22 ppm aparece um sinal de silglete largo. Também é possível observar que os sinais referentes a H-2' (*d*, 7,60 ppm;  $J = 2,1$  Hz), H-5' (*d*, 6,76 ppm;  $J = 8,5$  Hz) e H-6' (*dd*, 7,50;  $J = 2,15$  e 8,5 Hz) da quercetina são menos intensos que os demais sinais. Estas observações indicam que a fração 2 é uma mistura (**M-2**) de dois flavonoides com estruturas bastante parecidas, sendo um a quercetina (Composto **C-5**) e outro a miricetina (Composto **C-9**). O sinal em 7,22 ppm é referente aos hidrogênios H-2' e H-6' do flavonóide miricetina (Figura 29).

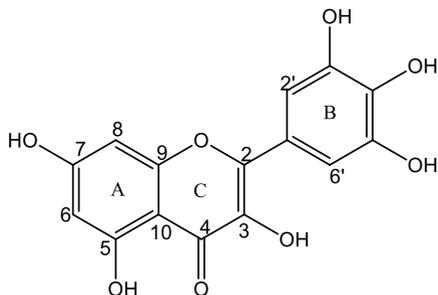


Figura 29. Miricetina (3,5,7,3',4',5'-hexahidroflavona) [13]

A análise de integração dos sinais de hidrogênio (Figura 30) H-6 e H-8 (sinal em comum) com H-5' (somente quercetina), indicam uma proporção de aproximadamente 65% miricetina e 35% quercetina.

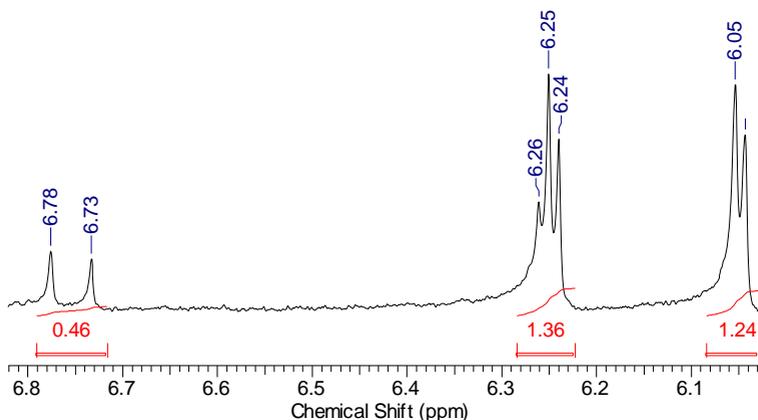


Figura 30. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da fração 2 de *M. splendens*

A fração 7 (37,3 mg) foi obtido na forma de um precipitado amarelo escuro com ponto de fusão de 197,1-197,5 °C. O sólido em questão apresentou as mesmas evidências espectroscópicas que o Composto **C-4**, miricitrina (Figura 24), isolado da fração acetato de etila. Além disso, a identidade deste flavonóide foi confirmada pela análise de CCD da amostra em comparação com padrão, onde a miricitrina apresentou um  $R_f = 0,69$  (MeOH/ $\text{CHCl}_3$  70%).

### 5.7. Perfis das frações acetato de etila de *M. palustris*, *E. catharinae* e *P. cattleyanum* pelo método HPLC-SPE-*tt*NMR acoplado a ensaios de alta resolução

A nova metodologia HPLC-SPE-*tt*NMR (Figura 31) permite o desenvolvimento de bioensaios acoplados para a identificação rápida e eficiente de compostos ativos. A família Myrtaceae é bastante diversificada, apresentando diversas atividades biológicas e potencial interesse econômico para o Brasil. Neste trabalho, utilizaram-se os ensaios para verificação de compostos antioxidantes e inibidores da  $\alpha$ -glicosidase. No início da pesquisa, pretendia-se estudar todas as espécies, no entanto, no decorrer das análises não foi possível obter um bom perfil de separação para espécie *M. splendens*.

O estudo das espécies *Myrcia palustris*, *Eugenia catharinae* e *Psidium cattleianum* é descrito a seguir.

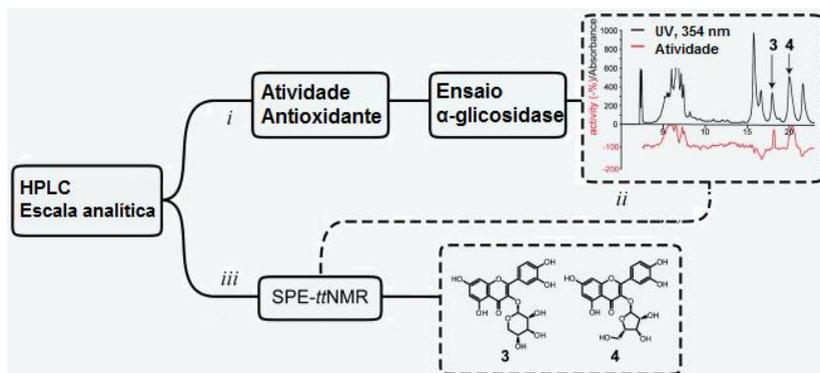


Figura 31. Esquema de separação e identificação dos constituintes ativos de espécies da família Myrtaceae utilizando a plataforma HPLC-SPE-ttNMR (HPLC- extração em fase sólida- RMN, em modo "tube transfer", transferência direta par tubo de RMN)

O acoplamento dos ensaios de microplaca ao sistema HPLC SPE-ttNMR (Figura 31) pode ser dividido em três passos: (i) desenvolvimento de uma separação cromatográfica eficiente, incluindo o tempo de fracionamento baseado em microplacas de 96 poços, (ii) avaliação dos compostos antioxidantes e inibidores da  $\alpha$ -glicosidase através da análise dos cromatogramas/biocromatogramas (iii) realização dos experimentos de HPLC-SPE-ttNMR focando principalmente nos compostos que apresentarem atividade antioxidante e de inibição da enzima da  $\alpha$ -glicosidase.

A programação de separação do HPLC foi de 60 min. No entanto, em todas as espécies, os picos concentraram-se numa faixa de aproximadamente 45 min, faixa esta selecionada para a coleta das frações em placa de 96 poços para os dois ensaios. A diminuição da faixa de coleta de 60 min para 45 min acarretou em uma melhora de resolução de todos os biocromatogramas. A utilização de 3 microplacas nos ensaios de atividade antioxidante, também, resultou em um aumento significativo na resolução dos biocromatogramas.

Os três cromatogramas das três espécies testadas foram combinados com os seus respectivos biocromatogramas conforme mostrado nas figuras

32-34. A análise foi realizada em três comprimentos de ondas ( $\lambda = 254, 280$  e  $360$  nm), no entanto, o  $\lambda = 254$  nm foi selecionado na combinação aos biocromatogramas, haja vista que este comprimento de onda detecta todos os compostos presentes na matriz.

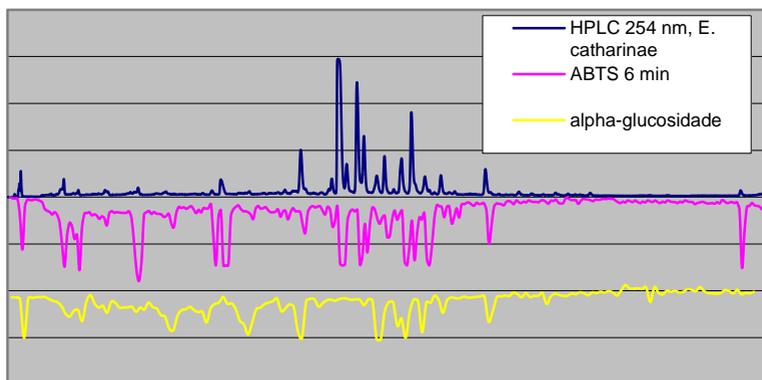


Figura 32. Biocromatogramas da espécie *E. catharinae*. Detecção por UV a 254 nm (azul), atividade antioxidante (rosa), atividade de inibição da  $\alpha$ -glicosidase (amarelo)

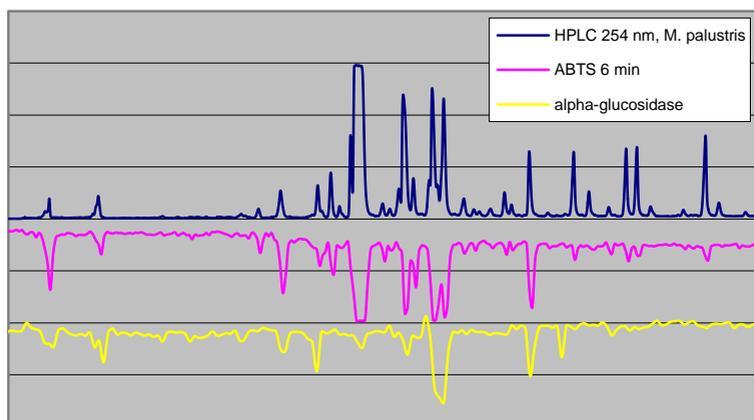
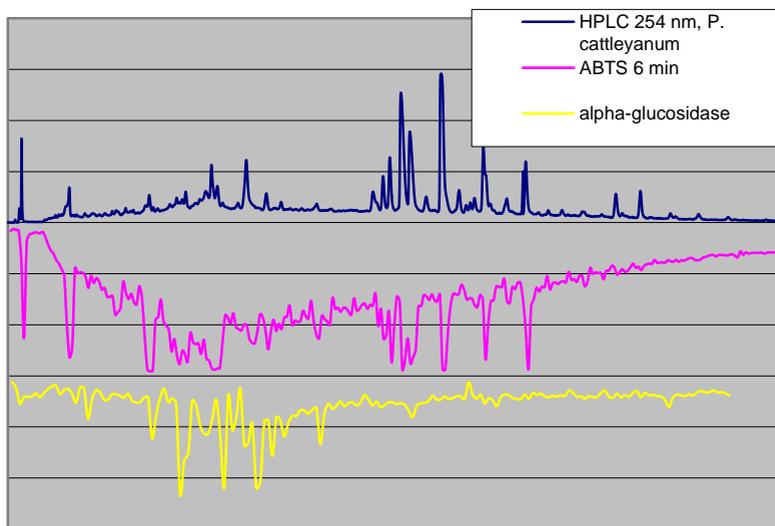


Figura 33. Biocromatogramas da espécie *M. palustris*. Detecção por UV a 254 nm (azul), atividade antioxidante (rosa), atividade de inibição da  $\alpha$ -glicosidase (amarelo)



**Figura 34. Biocromatogramas da espécie *P. cattleyanum*. Detecção por UV a 254 nm (azul), atividade antioxidante (rosa), atividade de inibição da  $\alpha$ -glicosidase (amarelo)**

A atividade enzimática de cada fração é descrita como a percentagem de atividade em comparação ao controle. Compostos com atividade inibitória da  $\alpha$ -glicosidase podem, portanto, ser correlacionados com o pico correspondente no cromatograma. O mesmo vale para atividade antioxidante utilizando o radical  $ABTS^{\bullet+}$ .

Em relação à atividade antioxidante, pode-se observar que praticamente todos os compostos de todas as espécies apresentaram alguma atividade em graus diferentes. Isso corrobora com estudos prévios realizados com os extratos de espécies do gênero *Eugenia*, *Myrcia* e *Psidium*, onde foi possível observar elevada atividade antioxidante para algumas espécies (MAGINA *et al.*, 2010; SALVADOR *et al.*, 2011; THAIPOONG *et al.*, 2005).

Em relação à atividade de inibição da  $\alpha$ -glicosidase foi possível observar resultados interessantes, como é o caso da espécie *E. catharinae* (Figura 32) que apresentou um pico em aproximadamente 17 min com atividade, sendo este em baixa concentração (observados em três  $\lambda$  diferentes, 254, 280 e 360 nm) comparado aos demais picos. Para alguns

constituintes presentes em concentração elevada (22 -25 min) não se observou qualquer atividade. Isso indica que esta espécie pode conter compostos minoritários com elevada atividade de inibição da  $\alpha$ -glicosidase. O mesmo se observa para espécie *M. palustris* (Figura 33). O composto em maior concentração não apresentou qualquer atividade; em contraste os dois picos em aproximadamente 27 min apresentaram atividade significativa, mesmo em menor concentração. No caso da espécie *P. cattleyanum*, a atividade concentrou-se numa faixa que vai de 9 – 21 min, o que também se observa na atividade antioxidante, indicando que os mesmos compostos responsáveis pela atividade antioxidante também podem ser responsáveis pela atividade de inibição da  $\alpha$ -glicosidase.

Baseadas nas informações obtidas dos biocromatogramas, foi possível iniciar os experimentos de HPLC-SPE-*tt*NMR. A primeira espécie escolhida foi a espécie *M. palustris*. O cromatograma encontra-se na Figura 35. O que se observa, em primeiro momento, é uma melhor resolução comparada ao perfil cromatográfico realizado na seção 5.2, Figura 10. O cromatograma apresentou uma melhor separação, bem como uma quantidade maior de picos. A informação obtida nos biocromatogramas foi usada para a decisão de aprisionamento dos picos, nos cartuchos de SPE, com base da diferença de absorvância de UV - método *threshold*. Foram selecionados 7 picos para o aprisionamento nos cartuchos de SPE (Figura 35). Os picos **1**, **2**, **3**, **4** e **5** foram identificados por comparação com dados de RMN da literatura como sendo: ácido 4-hidroxicinâmico, miricetrina, quercetina, miricetina, quercitrina, respectivamente (Figura 36). Os compostos **6** e **7** não tiveram suas estruturas elucidadas por apresentarem impureza. Esta impureza foi devido a mistura dos compostos durante a programação de coleta nos cartuchos de SPE. Observações nos dados de RMN  $^1\text{H}$  permitem inferir que os compostos tratam-se de dois flavonóides monoglicosilados.

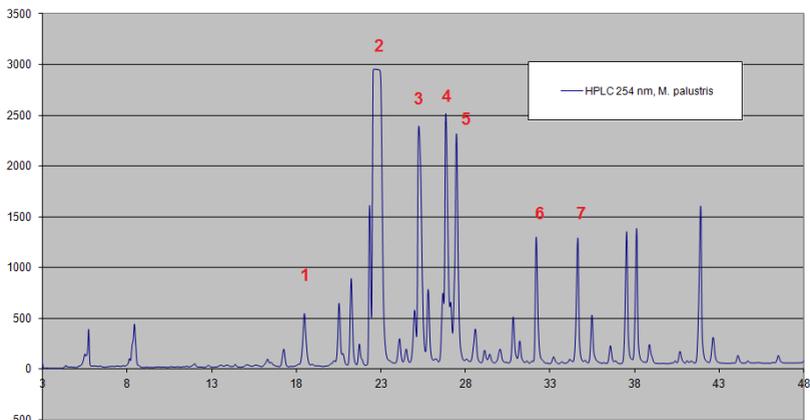


Figura 35. Cromatograma da espécie *M. palustris* a 254 nm

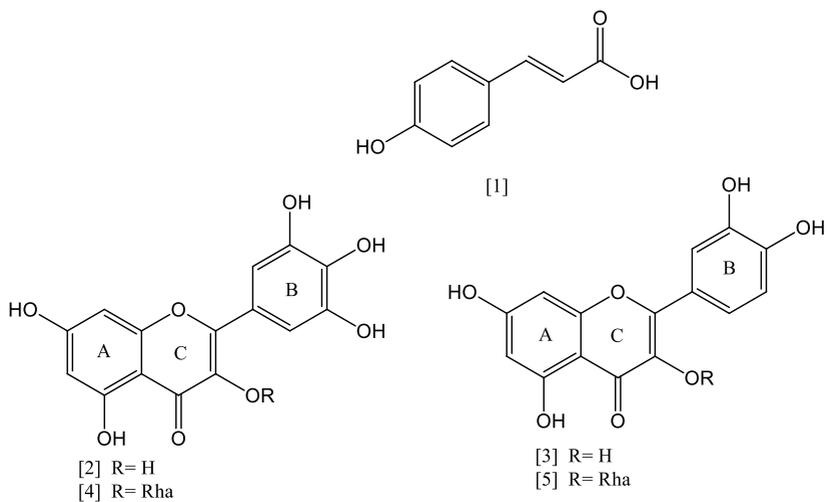


Figura 36. Estruturas dos compostos identificados na fração acetato de etila de *M. palustris* pelo método HPLC-SPE-*t*NMR

Através dos métodos tradicionais de cromatografia descritos na seção 5.5.1 foi possível identificar apenas um composto da fração acetato de etila de *M. palustris*, a miricitrina. No entanto, o método HPLC-SPE-RMN

permitiu a identificação de cinco compostos presentes na matriz. Esta nova metodologia é capaz de solucionar os principais problemas enfrentados nos laboratórios de produtos naturais, uma vez que permite analisar de forma rápida e precisa os compostos ativos nas mais complexas matrizes vegetais.

Os picos **4** e **5**, miricetina e quercitrina, são os dois principais constituintes que apresentaram atividade de inibição da  $\alpha$ -glicosidase de acordo com o biocromatograma representado na Figura 33. A atividade destes dois compostos já foi descrita em trabalhos anteriores (TADERA *et al.*, 2006; ROY *et al.*, 2013).

Problemas no aparelho de HPLC-SPE-*tt*NMR durante o estágio sanduiche impossibilitaram a finalização completa das análises de RMN das demais amostras. Este problema foi resolvido e o projeto será finalizado em colaboração com a Universidade de Copenhagen.

## **5.8. Estudo Biológico**

### **5.8.1. Atividade tóxica frente a larvas de *Artemia salina* Leach**

*Artemia salina* Leach, que é um microcrustáceo de água salgada comumente utilizado como alimento para peixes. A simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez e o baixo custo do bioensaio usando *A. salina* favorece a sua utilização rotineira em diversos estudos, além do que, tais ensaios são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral (McLAUGHLIN, 1991).

Desta forma, *A. salina* tem sido usada como um organismo alvo para detectar compostos bioativos em extratos de plantas (ALVES *et al.* 2000). Além disso, a toxicidade para este crustáceo tem demonstrado uma boa correlação com a atividade citotóxica contra tumores humanos (MCLAUGHLIN *et al.* 1991) e contra o *Trypanosoma cruzi* (ALVES *et al.* 2000; ZANI *et al.* 1995), protozoário causador da doença de Chagas. Este microrganismo também tem sido muito utilizado em testes de ecotoxicidade (NUNES *et al.*, 2006). Em geral, extratos de plantas e derivados com alta toxicidade contra *A. salina* sugerem alto potencial para atividades biológicas, sendo, portanto, muito útil a utilização deste bioensaio, no direcionamento de

estudos fitoquímicos. São considerados ativos através deste teste, os extratos ou frações de plantas que apresentam valores da DL<sub>50</sub> de até 1000 µg mL<sup>-1</sup> e para compostos isolados, DL<sub>50</sub> de até 100 µg mL<sup>-1</sup> (MEYER *et al.*, 1982).

A tabela 7 apresenta os resultados do ensaio de letalidade utilizando larvas de *A. salina* para todos os extratos e frações testadas de *Myrcia palustris*, *Myrcia splendens* e *Eugenia catharinae*. *Psidium cattleianum* foi estudada anteriormente (MORESCO, 2010) mas seus dados foram tabelados a título de comparação.

De acordo com a tabela 7, pode-se observar que todos os extratos e frações de *M. splendens* e *M. palustris* apresentaram valores de DL<sub>50</sub> menores que 1000 µg mL<sup>-1</sup>. O valor médio de DL<sub>50</sub> de 582,3 µg mL<sup>-1</sup> indica que todas as frações podem ser candidatas promissoras a estudos fitoquímicos direcionados na busca de atividades biológicas. Também pode-se concluir que as melhores atividades tóxicas concentraram-se nas frações hexano (FH) das duas espécies com valores de DL<sub>50</sub> de 279,2 µg mL<sup>-1</sup> para *M. splendens* e 346,7 µg mL<sup>-1</sup> para *M. palustris*. Frações menos polares, como a fração hexano, apresentam, normalmente, compostos da classe dos terpenos, principalmente os sesquiterpenos, triterpenos e esteróis (DE PASCUAL TERESA *et al.*, 1985; HA *et al.* 2009; CÁCERES-CASTILLO *et al.*, 2008) e estes apresentam elevada atividade tóxica frente a *A. salina* como, por exemplo, o esteróide β-sitosterol que apresenta uma DL<sub>50</sub> de 79 µg mL<sup>-1</sup> (ADOUM, 2009) e também triterpenos ácidos como o ácido oleanólico e ácido ursólico que apresentam valores de DL<sub>50</sub> de 85 µg mL<sup>-1</sup> e 27 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (MOREIRA *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2002). Estes valores são próximos até mesmo do controle positivo aqui avaliado, dicromato de potássio com DL<sub>50</sub> = 20-40 µg mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 7. Atividade tóxica frente a larvas de *Artemia salina* aplicado aos extratos brutos e frações das espécies *M. splendens*, *M. palustris*, *E. catharinae*, *P. cattleyanum*.**

<i>Extrato/Fração</i>	<b>DL<sub>50</sub>, µg mL<sup>-1</sup></b>			
	<i>M. splendens</i>	<i>M. palustris</i>	<i>E. catharinae</i>	<i>P. cattleyanum</i> *
Extrato Bruto (EBH)	597,0 (489,8-724,4)	645,6 (566,3-736,1)	575,4 (436,5-758,6)	741,3 (736,2-823,4)
Fração Insolúvel (FIn)	512,8 (407,4-645,6)	691,8 (597,6-800,9)	588,8 (454,2-763,5)	660,7 (598,3-712,5)
Fração Hexano (FH)	279,2 (220,3-354,0)	346,7 (263,9-455,4)	162,2 (126,10-208,6)	776,2 (692,4-800,2)
Fração Acetato de Etila (FAe)	554,6 (437,5-703,1)	691,8 (587,9-814,2)	>1000	794,3 (706,2-822,7)
Fração Butanol (FB)	833,7 (714,5-972,7)	676,1 (562,7-812,2)	>1000	831,8 (747,3-914,9)
<b>Fração Aquosa (FAq)</b>	653,1 (553,3-770,9)	514,9 (514,9-774,9)	>1000	>1000

\*MORESCO, 2010.

A espécie *E. catharinae* apresentou atividade tóxica apenas no extrato bruto e frações insolúvel e hexano. No entanto, a fração hexano foi a mais ativa de todas as frações testadas, apresentando um valor de DL<sub>50</sub> de 162,2 µg mL<sup>-1</sup>. Este valor é bastante relevante, se comparado ao controle positivo (dicromato de potássio, DL<sub>50</sub> = 20-40 µg mL<sup>-1</sup>), uma vez que se trata de uma fração e não um composto isolado. Algumas espécies deste gênero também apresentaram atividade tóxica contra *Artemia salina*. O extrato bruto de *E. uniflora*, por exemplo, apresentou um valor de DL<sub>50</sub> de 288,5 µg mL<sup>-1</sup> (ARCANJO *et al.*, 2012) enquanto que o extrato bruto de *E. obtusifolia* apresentou uma DL<sub>50</sub> de 47,0 µg mL<sup>-1</sup> (BUSSMANN *et al.*, 2011), valor este bem próximo ao controle positivo.

Com já relatado anteriormente (MORESCO, 2010), com exceção da fração aquosa (FAq), o extrato bruto e todas as frações de *P. cattleyanum* foram ativos contra *A. salina*, com destaque para a fração insolúvel (FIn). Essa atividade pode estar relacionada a composição desta fração, rica em compostos triterpênicos e esteróides (MORESCO *et al.*, 2012a). Comparado com as demais espécies, *P. cattleyanum* não apresentou atividade significativa.

Considerando-se que este ensaio pode apresentar correlação com várias atividades biológicas, tais como atividade citotóxica *in vitro*, atividade larvicida e inseticida (McLAUGHLIN, 1991), seria interessante a continuação do estudo das potenciais atividades destas espécies vegetais, principalmente as frações menos polares que foram mais ativas, identificando os compostos responsáveis pela atividade encontrada.

### **5.8.2. Determinação do conteúdo de Fenólicos e Flavonóides e Ensaio Antioxidantes**

A investigação do potencial antioxidante de extratos vegetais se mostra importante, uma vez que a ingestão de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas, inibem a formação de radicais livres provenientes de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio têm sido associadas à

incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (DROGE, 2002).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons não-pareados (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2010). Eles podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e, o seu alvo celular, tais como proteínas, lipídeos, carboidratos e o DNA, está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU & ANDERSON, 1997). Entre as principais formas reativas de oxigênio o radical superóxido ( $O_2^-$ ) apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas células. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996). Estas espécies reativas estão envolvidas em várias doenças crônicas não-transmissíveis associadas ao envelhecimento, como doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão, síndrome metabólica, artrite reumatóide e doenças neurodegenerativas tais como doença de Alzheimer e doença de Parkinson (FERRARI *et al.*, 2009; BOENGLER *et al.*, 2009; FERRARI, 2007; JELLINGER, 2007). O estresse oxidativo ocorre como um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor da situação pró-oxidante, promovendo um dano potencial.

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes serem enzimáticos ou não enzimáticos, tais como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonóides) (HALLIWELL, 2001).

É crescente o interesse no estudo de compostos fenólicos devido, principalmente, à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais são prejudiciais a saúde humana (DORMAN *et al.*, 2003). As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão intimamente relacionadas com a atividade antioxidante que cada um exerce sobre determinado meio. A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula

como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais).

Foram utilizados diferentes testes *in vitro* para a determinação da atividade antioxidante das espécies vegetais. A espécie *P. cattleyanum* já foi estudada anteriormente (MORESCO, 2010), tendo os resultados apresentados na tabela 8 a título de comparação com as demais espécies.

Uma vez que a atividade antioxidante está geralmente relacionada à quantidade de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, nas plantas, avaliou-se o teor destes compostos nos extratos e frações. A determinação de compostos fenólicos utiliza o reativo de Folin-Ciocalteu, que consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibdico ( $H_3Mo_{12}PO_{40}$ ) e fosfotúngstico ( $H_3W_{12}PO_{40}$ ), no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação  $6^+$  e na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (WATERMAN & MOLE, 1994).

De modo geral, os polifenóis e em particular os flavonóides possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais livres, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H. e/ou elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e finalmente, solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS et al., 2006).

Assim, para a determinação do conteúdo de flavonóides nas espécies vegetais foi escolhida a metodologia de complexação com o cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ). Este agente complexante forma um quelato com as hidroxilas fenólicas e com o grupo cetônico nos flavonóides (Figura 37), proporcionando um deslocamento batocrômico das bandas de absorvâncias do espectro de UV-VIS (WOISKY & SALATINO, 1998).

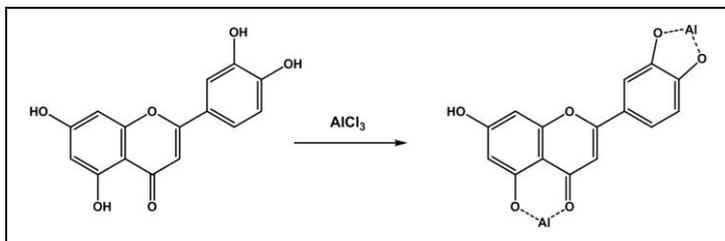


Figura 37. Complexo formado entre a estrutura do flavonóide e o reagente AlCl<sub>3</sub>

A tabela 8 apresenta os resultados obtidos na determinação do teor de compostos fenólicos totais e de flavonoides nos extratos e frações das espécies estudadas.

De acordo com a tabela 8 observa-se que, de todas as espécies estudadas, as frações mais concentradas em compostos fenólicos são as frações acetato de etila e butanol. Este resultado é esperado, uma vez que quando se realiza o fracionamento líquido-líquido utilizando solventes de polaridade crescente estes compostos se concentram nas frações mais polares. De um modo geral pode-se observar que a espécie com maior conteúdo de fenólicos foi a espécie *P. cattleyanum*. Estes resultados corroboram com os estudos de quimiotaxonomia do gênero *Psidium* que destacam compostos fenólicos como derivados de quercetina, antocianinas e chalconas (LIANG *et al.*, 2005).

É importante salientar que o resultado é expresso em equivalentes de ácido gálico, um composto fenólico simples, então essa metodologia não apresenta seletividade para subtipos de compostos fenólicos vegetais e; portanto, podem ser detectados no teste, além de compostos fenólicos simples, seus polímeros, como os taninos hidrolisáveis, além de flavonóides e catequinas, dentre outros.

**Tabela 8. Teor de Fenólicos e Flavonóides e Atividade antioxidante dos extratos e frações de *M. splendens*, *M. palustris*, *E. catharinae* e *P. cattleyanum***

Extrato/ fração	Fenólicos <sup>1</sup>	Flavonóides <sup>2</sup>	Poder Redutor <sup>3</sup>	DPPH CE <sub>50</sub> <sup>4</sup>
<i>M. splendens</i>				
EBH	77,61±2,32	16,43±0,69	315,6±8,1	10,14
FIn	60,01±0,83	12,89±0,31	114,6±0,0	70,32
FH	51,16±0,46	11,55±0,98	69,9±0,1	117,47
FAe	85,75±0,15	74,47±1,08	656,4±10,2	8,44
FB	78,87±2,32	19,33±0,24	652,2±17,8	9,35
FAq	68,05±0,83	1,41±0,16	375,3±8,7	16,99
<i>M. palustris</i>				
EBH	72,22±1,95	59,17±0,53	187,2±8,8	29,81
FIn	58,76±1,26	24,79±0,14	217,1±8,3	31,38
FH	4,51±0,41	9,18±0,24	6,8±0,7	>200
FAe	110,83±0,76	107,64±0,05	363,3±3,9	17,83
FB	185,18±1,90	137,06±1,22	595,5±14,4	15,34
FAq	63,17±0,90	1,90±0,05	186,5±2,9	34,04
<i>E. catharinae</i>				
EBH	117,96±0,69	22,54±0,54	157,44±0,29	16,8
FIn	77,02±1,56	17,19±0,95	74,10±1,16	56,4
FH	60,26±0,65	2,00±0,28	129,24±4,07	153,4
FAe	166,86±0,39	46,36±1,44	257,64±2,91	23,4
FB	92,58±0,52	4,49±0,27	91,80±2,33	32,6
FAq	32,62±1,17	-	30,68±1,46	149,8
<i>P. cattleyanum</i>				
EBH	233,7±4,2	58,49±0,62	274,3±0,22	11,16
FIn	199,1±3,1	105,8±0,57	162,6±0,68	18,13
FH	44,4±0,7	15,19±1,16	41,6±2,62	97,23
FAe	326,6±12,8	95,76±2,56	417,1±0,97	8,75
FB	304,1±1,5	75,42±0,01	322,9±0,51	7,73
FAq	131,4±0,1	9,16±0,06	141,4±1,88	20,87
Ác. ascórbico	-	-	-	9,2

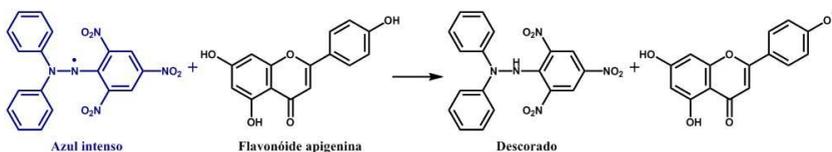
<sup>\*1</sup> mg ác galico/g extrato seco; <sup>\*2</sup> mg quercetina/g extrato seco; <sup>\*3</sup> mg ácido ascórbico/g extrato seco; <sup>\*4</sup> CE<sub>50</sub> (ppm);

A tabela 8 mostra a quantidade de flavonoides nas frações e extratos das espécies de Myrtaceae. Quanto maior o equivalente em quercetina encontrado maior a porcentagem de flavonoides encontrados por grama de extrato bruto ou fração.

Assim como no teste que determina o teor de fenólicos, novamente, pôde-se observar uma maior concentração de flavonoides nas frações acetato de etila e butanol das espécies estudadas. Para este teste, observa-se um certo destaque para a espécie *M. palustris*. A fração acetato de etila da espécie apresentou um valor de 107,64 mg de quercetina / g de fração seca. Este valor representa 97% do valor encontrado no teor de fenólicos totais, o que indica grande possibilidade de descoberta de flavonoides nesta fração.

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, tais como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI, *et al.*, 2005; BARREIROS, *et al.*, 2006).

A fim de avaliar a atividade antioxidante dos extratos e frações das espécies estudadas foi utilizado o teste que determina a habilidade que uma substância tem de seqüestrar o radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Este teste está baseado no descolorimento de uma solução composta pelo radical livre estável, de cor violeta, quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio, conforme a figura 38. (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). A abstração de um átomo de hidrogênio da estrutura do flavonóide pelo radical livre DPPH, que possui forte coloração violeta, promove uma redução no DPPH, que se descora. Este fato pode ser facilmente determinado através da espectroscopia de UV-VIS (517 nm). A modificação da coloração permite avaliar o desaparecimento do radical livre DPPH em solução devido á formação de espécies mais estáveis. A estabilização de radicais livres e formação de espécies pouco reativas inibem a propagação do processo de peroxidação lipídica, um dos eventos biológicos mais importantes relacionados aos processos oxidativos (LUGASI *et al.*, 1998).



**Figura 38. Equação básica da reação do DPPH com um flavonóide**

De acordo com a tabela 8 observa-se que as frações acetato de etila e butanol das espécies estudadas apresentaram valores de  $CE_{50}$  muito parecidos. Se comparados cada espécie separadamente, *M. splendens* foi a espécie mais ativa e a amostra que apresenta maior capacidade de seqüestro de radicais livres foi a a fração acetato de etila com  $CE_{50} = 8,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ , seguida da fração butanol com  $CE_{50} = 9,35 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os valores obtidos equiparam-se ao valor de  $CE_{50}$  do ácido ascórbico, um antioxidante usado como padrão, que apresentou  $CE_{50} = 9,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Estes resultados são de grande relevância uma vez que se tratam de extratos vegetais e não de compostos isolados.

Pode-se sugerir então, que a elevada atividade antioxidante das frações mais polares seja, provavelmente, devida à presença de substâncias com grupamentos hidroxila, disponíveis para doar um átomo hidrogênio à molécula oxidante (MENSOR, 1999).

A atividade antioxidante também pode ser avaliada através do potencial redutor que indica a presença de compostos elétron-doadores que podem reduzir os intermediários oxidativos do processo de peroxidação lipídica (YEN & CHEN, 1995). Neste ensaio, a presença destes redutores causa a redução do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ /ferrocianeto à forma ferrosa. Assim, a forma  $\text{Fe}^{2+}$  pode ser monitorada medindo a formação de um complexo azul da Prússia ( $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ) a 720 nm.

Através dos resultados obtidos (Tabela 8), pode-se observar que, de modo geral, a fração acetato de etila das espécies foi a mais ativa, com exceção da espécie *M. palustris* que apresentou maior atividade na fração butanol com um valor de 595,5 mg de ácido ascórbico/g de extrato. Neste teste, *M. splendens* apresentou maior destaque sobre as demais espécies apresentando elevada capacidade redutora sobre íons férricos, com valores de atividade equivalentes a 656,4 mg de ácido ascórbico/g de extrato, para

fração acetato de etila , e 652,2 mg de ácido ascórbico/g de extrato para a fração butanol.

Estudos de correlação entre as atividades antioxidantes testadas e o conteúdo de fenólicos e flavonoides foram realizados a fim de obter um entendimento global dos testes. Observa-se uma boa correlação entre a capacidade seqüestrante do DPPH e o conteúdo de fenólicos, apresentando coeficientes de correlação superior a 65% para os extratos e frações das folhas de *M. splendens* (89,8%), *M. palustris* (75,8%), *E. catharinae* (66,3%) e *P. cattleyanum* (81,3%), respectivamente. Essa boa correlação confirma os dados apresentados em diversos estudos, que mostram que a capacidade antioxidante está fortemente relacionada com o teor de compostos fenólicos totais presentes (MAKRIS *et al.*, 2007; THAIPONG *et al.*, 2005; ABDILLE *et al.*, 2005; KAUR & KAPOOR, 2002). No entanto, com exceção da espécie *M. palustris* que apresentou um coeficiente de correlação de 93,4%, nenhuma relação se manteve entre o teste antioxidante que avalia a capacidade seqüestrante do DPPH e a quantidade de flavonoides presentes nos extratos. Os coeficientes de regreção linear variaram de 0,0198 a 0,3452.

Da mesma maneira que a capacidade seqüestrante do radical livre DPPH, o potencial redutor dos extratos e frações aumenta conforme o aumento do conteúdo de compostos fenólicos. Uma análise por regressão linear mostra que os coeficientes de correlação ficaram entre 76,6 a 96,8 %.

No entanto, assim como descrito anteriormente para o ensaio do DPPH, esta correlação não se observa para as espécies de Myrtaceae quando se correlacionam os resultados do ensaio de potencial redutor com o seu conteúdo de flavonoides. As espécies *M. splendens* e *P. cattleyanum* apresentaram baixos coeficientes de correlação de 21,2 e 30,8%, respectivamente. Enquanto que as espécies *M. palustris* e *E. catharinae* apresentaram índices de correlação consideráveis de 72,0 e 69,6, respectivamente.

Ao observar estes resultados, conclui-se que o conteúdo de compostos fenólicos está diretamente relacionado à atividade antioxidante encontrada nestas espécies, enquanto que o teor de flavonóides contribui para a atividade antioxidante somente em alguns casos.

### 5.8.3. *Inibição da enzima acetilcolinesterase*

Estudos indicam que a doença de Alzheimer está associada com a deficiência dos diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina (BRYNE, 1998). O tratamento sintomático da doença de Alzheimer envolve primariamente a restauração da função colinérgica. Conclui-se, portanto, que uma elevação no nível da acetilcolina poderia ser útil para melhorar um dos sintomas da doença, a deficiência de aprendizagem e, por tanto, os inibidores da colinesterase tem demonstrado a maior eficiência no tratamento clínico na doença de Alzheimer (BIERER *et al.*, 1995).

A modernização dos ensaios biológicos permitiu a utilização de enzimas, receptores, DNA, entre outros alvos, para avaliação rápida de grandes quantidades de amostras. Dentre os bioensaios rápidos e sensíveis, a utilização da enzima acetilcolinesterase (AChE) é uma alternativa para a detecção e seleção de amostras com ação anticolinesterase (TREVISAN *et al.*, 2003).

Existem no mercado, atualmente, diversos inibidores da AChE conhecidos, tais como: tacrina (Cognex<sup>®</sup>), donepezil (Aricept), riastigmina (Exelon<sup>®</sup>) e, por último, a galantamina (Reminyl<sup>®</sup>), um produto natural. Estes fármacos, apesar de apresentarem efeito biológico satisfatório, são muito caros e alguns podem apresentar efeitos colaterais (VIEGAS JUNIOR *et al.*, 2004).

Em 1961, Ellman e colaboradores descreveram um método fotométrico para a determinação da atividade anticolinesterásica. O método se baseia na medição da taxa de produção de tiocolina à medida que a acetiltiocolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase. Isto ocorre pela continuação da reação da tiocolina (1) com reagente de Ellman (2) Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), produzindo o ânion amarelo (3) como mostrado na figura 39. A taxa da produção do composto colorido 3 é observada em espectrofotômetro UV/VIS em 405 nm.

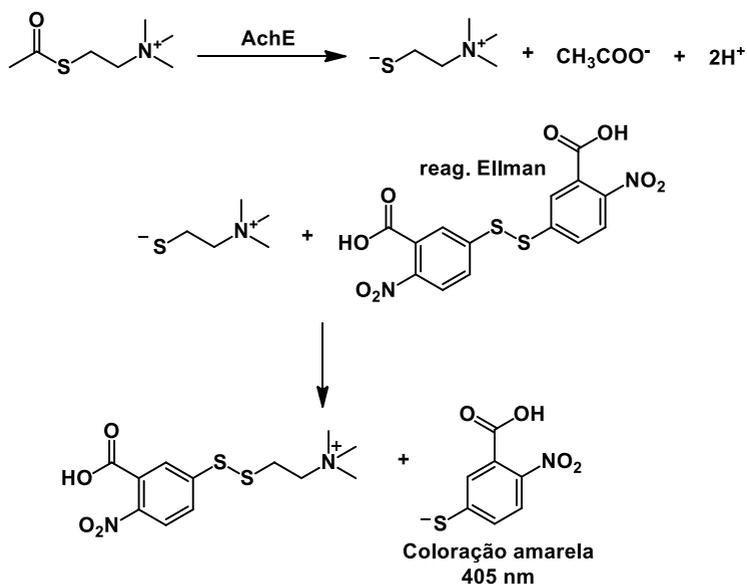


Figura 39. Sequência de reações para detecção de atividade anticolinesterásica de substâncias naturais pelo método de Ellman

Sabe-se que os produtos naturais, geralmente, apresentam estruturas complexas e de difícil reprodução pela química sintética. Sendo assim, um estudo biológico direcionado a busca de compostos naturais com ação antiacetilcolinesterásica é incentivado.

Portanto, os extratos e frações das espécies foram avaliadas em relação ao potencial inibidor frente à AChE segundo a metodologia proposta por Mata *et al.* (2007). Inicialmente avalia-se a porcentagem de inibição dos extratos e frações na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que aqueles que apresentarem porcentagem de inibição acima de 50%, serão considerados candidatos a busca de compostos com ação anticolinesterásica. A tabela 9 apresenta os resultados obtidos para as amostras testadas.

De acordo com os resultados obtidos para a espécie *M. splendens* podemos observar que estes foram bastante promissores, uma vez que todas as frações apresentaram atividade acima de 50%, com exceção a fração aquosa (FAq) que apresentou 37,1% de inibição. A Fração FAe apresentou

um valor de inibição de 99,8%, valor este acima da atividade do controle positivo galantamina, um produto natural que é utilizado como fármaco, que apresentou 99,3 % de inibição da enzima acetilcolinesterase.

**Tabela 9. Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase para extratos e frações de Myrtaceae**

Extrato/Fração	% inibição (100 ppm)			
	<i>M. splendens</i>	<i>M. palustris</i>	<i>E. catharinae</i>	<i>P. cattleyanum</i>
Extrato Bruto (EBH)	70,1±1,8	99,9±1,6	60,6±1,2	47,4±1,8
Fração Insolúvel (FIn)	97,3±3,7	72,0±4,1	92,0±0,8	45,0±1,4
Fração Hexano (FH)	65,3±1,9	67,4±1,3	54,3±0,8	61,3±2,3
Fração Acetato de Etila (FAe)	99,8±2,4	99,9±3,9	60,5±1,9	49,3±1,7
Fração Butanol (FB)	74,8±1,2	41,9±1,1	24,5±0,8	48,7±1,3
Fração Aquosa (FAq)	37,1±3,6	29,2±2,5	n.d*	42,8±1,8

\*Atividade não detectada pelo método utilizado.

Para a espécie *M. palustris* também foi observada atividade relevante em todas as frações, com exceção das frações butanol e aquosa com porcentagem de inibição de 41,9% e 29, 2%, respectivamente. O Extrato bruto e fração FAe apresentaram valores superiores ao controle positivo galantamina. A espécie *E. catharinae* também apresentou atividade em quase todas as frações com destaque para a fração FIn com porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase de 92%. Estes resultados corroboram com a atividade apresentada no teste de toxicidade frente a *Artemia salina* indicando que as frações são promissoras para um estudo mais aprofundado da atividade antiacetilcolinesterásica.

No entanto, *P. cattleyanum* foi a espécie menos ativa, mostrando resultados abaixo de 50% de inibição, com exceção da fração hexano que apresentou 61,3% de inibição.

Ainda, os compostos isolados também foram avaliados quanto à sua ação inibitória frente à acetilcolinesterase. Aqueles que apresentaram porcentagem de inibição acima de 50% foram submetidas à determinação da  $CI_{50}$ , que é a concentração necessária para causar 50% da atividade. A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos para os compostos.

De acordo com a tabela 10, observa-se que para os compostos isolados, apenas os flavonoides quercetina (5), catequina (7) e quercitrina (8) apresentaram porcentagem de inibição maior que 50%, com  $CI_{50}$  de 98,3; 90,8; e 60,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente. Estes resultados são baixos, se comparados com o controle positivo Reminyl. A atividade fraca dos flavonoides quercetina e quercitrina já foi relatada em trabalhos recentes (DING *et al.*, 2013; JUNG & PARK, 2007) utilizando modelos de teste similares. No entanto, trabalhos relatando a atividade de frações ricas em flavonoides, tais como as frações FAe das espécies de *Myrcia* apresentadas neste trabalho, têm sido publicados nos últimos anos, mostrando resultados mais potentes (CAO *et al.*, 2013; FALE *et al.*, 2012).

**Tabela 10. Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase para compostos isolados das espécies de Myrtaceae**

<i>Compostos</i>	<i>% inibição (100 ppm)</i>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
Monometil-olivetol (C-1)	49,3±1,9	-
Miricitrina (C-4)	35,4±0,6	-
Quercitina (C-5)	50,2±2,1	98,3
Ác. Rotúndico (C-6)	47,9±0,9	-
Catequina (C-7)	52,2±1,3	90,8
Quercitrina (C-8)	69,6±3,3	60,6
<b>Reminyl®</b>	99,3	9,2

\*Comprimido do fármaco Reminyl contendo 8mg do princípio ativo galantamina. \*\*Amostras que apresentaram porcentagem de inibição acima de 50% foram submetidas à determinação da  $CI_{50}$ .

Estes resultados revelam um possível efeito sinérgico dos componentes de cada fração, sendo este um fator importante para inibição da enzima acetilcolinesterase. Isso explica, por exemplo, o fato das frações FAe de *Myrcia* apresentarem um valor de quase 100% de inibição, no teste

de triagem a 100 ppm, e o flavonoide miricitrina (**C-4**) - principal constituinte das frações - não apresentar atividade (35,4% de inibição a 100 ppm).

#### **5.8.4. Atividade antimicrobiana**

A resistência aos antimicrobianos tem se apresentado como um problema complexo provocado por diversos fatores, entre os quais se destaca o uso de fármacos de forma indevida. A resistência não é um fenômeno novo e já é bastante reconhecida pela comunidade científica. Já em 1940, Ernest Chain e E.P. Abraham descobriram uma substância originária da *Escherichia coli* capaz de inativar a penicilina, sendo reconhecido o primeiro mecanismo de resistência a um agente antibacteriano (ROSSI & ANDREAZZI, 2005). Os microorganismos estão se mostrando cada vez mais resistentes aos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda a procura por antibióticos de ocorrência natural.

Nos últimos anos, infecções fúngicas têm emergido como uma das principais causas de doenças e mortalidade principalmente devido ao crescimento da população de imunocomprometidos tais como pacientes com HIV, recebendo quimioterapia, tratados com fármacos imunossupressores, submetidos a tratamento prolongado com corticosteróides e ainda devido ao uso indiscriminado de antibióticos (NAM *et al.*, 2004).

Em vista do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, tem ganho importância nas empresas farmacêuticas. Estes microorganismos multiresistentes são frequentemente causa de várias infecções, e apresentam um sério risco para a saúde pública, principalmente quando se tratam de infecções hospitalares (DE SOUZA *et al.*, 2004).

##### **5.8.4.1. Atividade antibacteriana**

O método utilizado para a determinação da atividade antibacteriana foi a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração de substrato capaz de inibir o crescimento bacteriano.

O experimento foi realizado utilizando as bactérias *Staphylococcus aureus*, um coco gram-positivo e as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que esta última está bastante relacionada aos casos de infecção hospitalar.

Para a classificação da atividade antibacteriana, foi utilizado o critério proposto por Machado e colaboradores (2005). Extratos e frações que apresentaram valores de CIM menores que 10 µg/mL foram considerados antibacterianos excelentes; valores entre 10 e 100 µg/mL foram considerados bons; valores entre 100 e 500 µg/mL foram considerados de atividade moderada; valores entre 500 e 1000 µg/mL de atividade fraca, e para valores de CIM que foram acima de 1000 µg/mL, os extratos e frações foram considerados inativos. Os extratos e frações testados para as quatro espécies apresentaram atividade antibacteriana em diversos níveis. Tabela 11.

De acordo com a tabela 11, para *M. splendens*, observou-se que o extrato bruto e frações, com exceção da fração hexano, demonstraram atividade apenas para a bactéria gram-positiva, *S. aureus*, (CIM = 150 - 625 µg/mL), sendo inativo para as outras bactérias testadas, gram-negativa. Já a espécie *M. palustris* apresentou atividades moderadas apenas na fração butanol para a bactéria *S. aureus* e na fração hexano para *E. coli*. Estes resultados mostram que, de uma maneira geral, as frações mais polares de *M. splendens* apresentaram melhor atividade para a bactéria gram-positiva, talvez por esta apresentar menor barreira do que as bactérias gram-negativas que possuem uma membrana externa que funciona como barreira para diversas substâncias, inclusive os antibióticos. Além disso, seu espaço periplasmático contém diversas enzimas capazes de quebrar moléculas estranhas ao metabolismo bacteriano (ROSSI e ANDREAZZI, 2005) tornando mais difícil a ação de substâncias estranhas contra estas cepas.

**Tabela 11. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto, frações e compostos isolados de *M. splendens*, *M. palustris*, *E. catharinae* e *P. cattleyanum***

Extrato/Fração	<i>S. aureus</i> <sup>a</sup>	<i>P. aeruginosa</i> <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> <sup>b</sup>
	(µg mL <sup>-1</sup> )		
<i>M. splendens</i>			
Extrato Bruto (EBH)	150	1200	1200
Fração Insolúvel (FIn)	625	1250	1250
Fração Hexano (FH)	1525	1250	1250
Fração Acetato de Etila (FAe)	168	2700	1350
Fração Butanol (FB)	234	1875	1875
Fração Aquosa (FAq)	190	1525	1525
<i>M. palustris</i>			
Extrato Bruto (EBH)	1800	1800	1800
Fração Insolúvel (FIn)	1575	1575	1575
Fração Hexano (FH)	1375	1375	343
Fração Acetato de Etila (FAe)	1125	1125	1125
Fração Butanol (FB)	450	1800	1800
Fração Aquosa (FAq)	1300	1300	1300
<i>E. catharinae</i>			
Extrato Bruto (EBH)	1610	1610	1610
Fração Insolúvel (FIn)	1520	1520	1520
Fração Hexano (FH)	170	1560	1560
Fração Acetato de Etila (FAe)	2800	1430	1430
Fração Butanol (FB)	1700	1700	1700
Fração Aquosa (FAq)	3120	1560	1560
<i>P. cattleyanum</i> *			
Extrato Bruto (EBH)	2500	1300	1300
Fração Insolúvel (FIn)	190	6250	6250
Fração Hexano (FH)	6100	380	760
Fração Acetato de Etila (FAe)	1950	1950	1950
Fração Butanol (FB)	2800	1400	1400
Fração Aquosa (FAq)	1080	8500	2120
Antibacteriano padrão			
<b>Gentamicina</b>	1	0,39	0,78

a= gram-positiva; b= gram-negativa; \*MORESCO, 2010.

Para a espécie *E. catharinae*, observa-se que, de modo geral, todos os resultados de CIM ficaram acima de 1000 µg/mL, podendo ser consideradas inativos frente a bactérias testadas. Uma exceção é a fração hexano que apresentou CIM = 170 µg/mL frente a *S. aureus*, considerada atividade moderada. Este resultado para atividade antibacteriana corrobora com o teste de toxicidade frente a *Artemia salina* que também apresentou sua maior atividade na fração hexano.

O extrato bruto e frações de *P. cattleyanum*, já haviam sido testados anteriormente (MORESCO, 2010), não apresentando atividades relevantes e, a título de comparação, observa-se que a fração hexano desta planta foi a única das espécies estudadas a apresentar alguma atividade para ambas bactérias gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*). Este fato é interessante, uma vez que bactérias gram-negativas, como a *P. aeruginosa*, são intrinsecamente resistentes a vários antimicrobianos, devido à baixa permeabilidade da membrana externa que possuem, pela expressão de bombas de efluxo e pela produção de enzimas que inativam os antimicrobianos (MESAROS, 2007).

A atividade antibacteriana já foi relatada anteriormente para diversas plantas da família Myrtaceae. Observa-se certa frequência de trabalhos relatando atividade antibacteriana nos óleos essenciais de espécies do gênero *Myrcia*, *Eugenia* e *Psidium*, no entanto há alguns trabalhos relatando a atividade em extratos polares, principalmente do gênero *Eugenia* (TENÓRIO *et al.*, 2011; DE SOUZA *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005; APEL *et al.*, 2006).

#### **5.8.4.2. Atividade antifúngica de *M. splendens* e *M. palustris***

Os extratos e frações das espécies *M. splendens* e *M. palustris* e o seu principal constituinte, a miricitrina (**C-4**), foram avaliados quanto ao seu potencial antifúngico diante dos microrganismos *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18). Os extratos e frações foram considerados ativos quando inibiram o crescimento fúngico em valor igual ou maior que 70%.

Primeiramente foi realizado o teste de triagem à 250 µg/mL a fim de verificar as amostras mais ativas. A tabela 12 apresenta os resultados obtidos para as frações testadas. Deste estudo prévio pode se observar certo destaque para a espécie *M. splendens*, apresentando atividade para quase todas as frações, principalmente contra as cepas de *Candida*, com valores de porcentagem de inibição que variam de 69,7 – 88,7%. Estes valores são muito bons se comparados ao controle positivo Itraconazol, uma vez que se tratam de frações e não de compostos isolados.

Tabela 12. Porcentagens de inibição dos extratos, frações e composto de *M. splendens* e *M. palustris* contra leveduras patogênicas

* <i>Extração / Fração</i>	<i>C. parap</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Cr. gattii</i>	<i>Cr. neoformans</i>	Pb 18
<i>M. splendens</i>							
EBH	43,5	28	39,8	78,9	80	0	31
FIn	79,5	72,3	75,5	59,9	0	0	26,6
FH	74,8	70,0	88,0	81,7	53,6	0	68,4
FAe	65,7	65,9	60,1	84,6	0	0	0
FB	76,6	76	70,2	88,7	0	0	0
FAq	69,7	76	68,3	87,7	13,8	0	0
<i>M. palustris</i>							
EBH	75,5	-15,6	67,4	54,2	0	0	9,6
FIn	-18,7	19,7	32,8	38,2	0	0	0
FH	8,4	33	23,3	66	100	100	100
FAe	7,2	-4,6	15	48,3	0	0	0
FB	63,6	63,2	70,4	84,6	0	0	0
FAq	94,4	81,8	94,2	62,6	98,1	0	0
Miricitrina (C-4)	79,8	0	65	15,6	0	0	0
Atifúngico padrão							
<b>Itraconazol**</b>	70,0	65,1	68,1	80,0	72,0	89,2	94,2

\*As amostras foram testadas na concentração de 250µg mL<sup>-1</sup>.

\*\*Fármaco de referência, utilizado na concentração de 0,5 µg mL<sup>-1</sup>.

A espécie *M. palustris* se mostrou menos ativa, porém apresentando valores de porcentagem de inibição elevados se comparados a *M. splendens* e, até mesmo, ao controle positivo Itraconazol. A fração aquosa (FAQ) da espécie apresentou valores de atividade que variam de 62,6 - 98,1% de inibição. Já a fração hexano (FH) apresentou inibição de 100% contra as duas espécies de *Cryptococcus* e a espécie *Paracoccidioides brasiliensis*; espécies essas, que foram praticamente inativas para *M. splendens*. Bons resultados contra cepas de *Cryptococcus* são estimulantes devido à frequência crescente dos casos de criptococose, a toxicidade dos principais antifúngicos disponíveis e a existência de isolados de *Cryptococcus* spp. resistentes, o que demonstram a dificuldade da terapia contra esta doença (LIN & HEITMAN, 2006).

Para as amostras mais ativas na triagem à 250 µg/mL (porcentagem de inibição  $\geq 68,3\%$ ) foi realizado o ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) a fim de encontrar a menor concentração ativa e avaliar o efeito da concentração dos extratos, frações e composto isolado na atividade antifúngica. Tabela 13.

Tabela 13. Concentração inibitória mínima em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos extratos, frações e composto de *M. splendens* e *M. palustris*

*Extrato / Fração / Composto	<i>C. parap</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Cr. gattii</i>	<i>Cr. neoformans</i>	Pb 18
<i>M. splendens</i>							
EBH	-	-	-	31,2	15,6	-	-
FIn	31,2	125	62,5	-	-	-	-
FH	62,5	62,5	62,5	125	-	-	-
FAe	-	-	-	15,6	-	-	-
FB	3,2	3,2	7,8	15,6	-	-	-
FAq	7,8	7,8	7,8	31,2	-	-	-
<i>M. palustris</i>							
EBH	62,5	-	31,2	-	-	-	-
FIn	-	-	-	-	-	-	-
FH	-	-	-	-	>250	>250	62,5
FAe	-	-	-	-	-	-	-
FB	-	-	7,8	31,2	-	-	-
FAq	31,2	125	62,5	-	62,5	-	-
Miricitrina (C-4)	125	-	31,2	-	-	-	-
Atifúngico padrão							
<b>Itraconazol</b>				0,125			0,031

Segundo o critério proposto por Rios e Recio (2005) que diz que extratos e frações vegetais cujo valor da CIM encontra-se abaixo de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  são considerados ativos, e abaixo de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  são considerados muito potentes; podem-se considerar ativas todas as amostras avaliadas pelo método CIM.

De acordo com a tabela 13, observa-se que praticamente todas as frações testadas de *M. splendens* apresentaram atividade elevada contra cepas de *Candida*, com exceção da fração acetato de etila (FAe) que foi ativa apenas contra *C. tropicalis* com um valor de CIM = 15,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Dentre as amostras testadas, destaca-se a fração butanol (FB), ativa contra todas as cepas de *Candida*, com valores de CIM entre 3,2 e 15,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; e, da mesma forma, a fração aquosa (FAq) com valores de CIM entre 7,8 e 31,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A *Candida albicans* é a espécie mais prevalente e de maior patogenicidade entre as cepas envolvidas com o desenvolvimento da candidíase bucal (AKPAN & MORGAN, 2002). As cepas *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* também fazem parte do curso da doença e, junto a *C. albicans*, chegam a representar mais de 80% dos isolados clínicos (CORRÊA & ANDRADE, 2005). Portanto, a busca por novos antifúngicos ativos contra espécies de *Candida* é incentivada.

A espécie *M. palustris* apresentou valores menos significativos contra os fungos testados em comparação com a espécie *M. splendens*. O fungo mais sensível ao extrato bruto e frações de *M. palustris* foi *C. krusei*, concentrando a atividade nas frações mais polares, fração butanólica (FB) e fração aquosa (FAq) com valores de CIM de 7,8 e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. De todas as frações testadas, a fração aquosa (FAq) foi a mais sensível ao teste, apresentando atividade contra quatro dos sete fungos testados. Estes resultados sugerem que os compostos mais ativos das frações sejam de maior polaridade.

O flavonóide miricitrina (**C-4**), presente nas frações acetado de etila e butanol de ambas as espécies, apresentou atividade apenas contras as cepas *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, com valores de CIM de 125 e 31,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Estes valores são considerados baixos se tratando de um composto isolado, e não uma fração vegetal. Ao comparar estes valores, com os resultados encontrados nas frações butanol de ambas as

espécies, observa-se que os valores de CIM são maiores, sugerindo que a ação destas frações seja sinérgica, ou seja, a soma de vários compostos encontrados nestas amostras.

Este é o primeiro relato de atividade antifúngica para extratos vegetais de espécies do gênero *Myrcia*. Há apenas um trabalho relatando a atividade antifúngica do óleo essencial da espécie *Myrcia myrtifolia* contra as cepas *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (DE CERQUEIRA *et al.*, 2007). A espécie se mostrou ativa apenas contra *C. albicans*.

#### **5.8.5. Atividade Anti-inflamatória de *M. splendens* e *M. palustris***

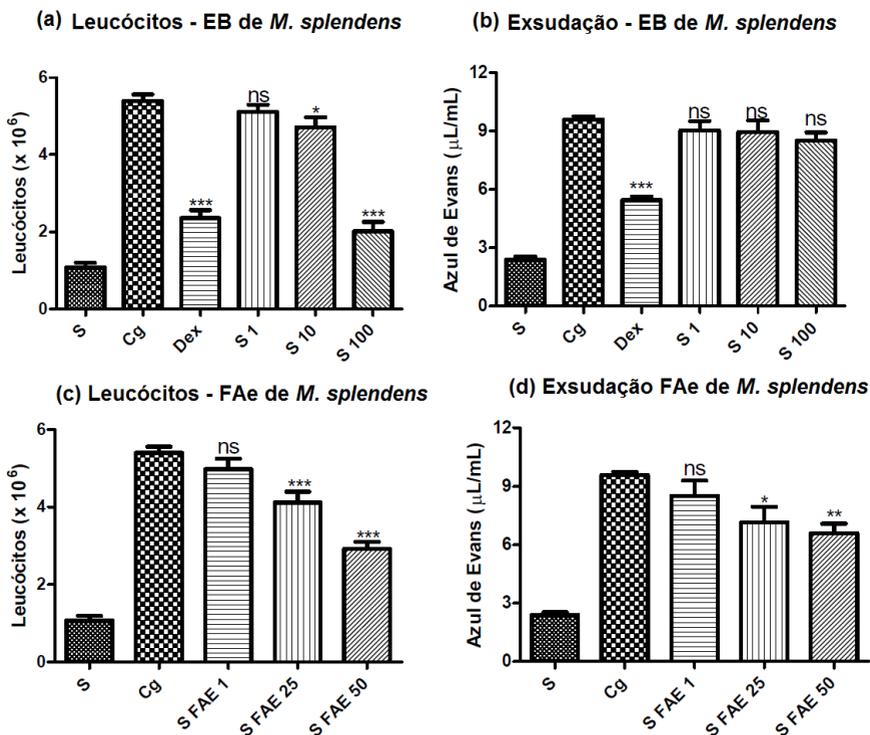
A inflamação é uma resposta do organismo a uma série de estímulos nocivos tais como lesões tecidulares causadas por infecção ou agressão física. Quando não reprimida pode causar severa descompensação fisiológica, disfunção orgânica e até a morte. Alguns sinais clássicos da inflamação são vasodilatação e edema, com presença de área eritematosa, calor no local do dano tecidual, dor e possível perda de função do local afetado (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004; KANTARCI *et al.*, 2006).

A resposta inflamatória pode ser dividida em dois tipos, aguda e crônica, divisão essa baseada na duração e características patológicas da reação inflamatória. A inflamação aguda tem, típica ou relativamente, curta duração (horas a dias) e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de fluido ou exsudato rico em proteínas (de fase aguda) com formação de edema, migração de leucócitos (primariamente neutrófilos) para o sítio lesado e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os extratos e frações acetato de etila das espécies *M. splendens* e *M. palustris* e o seu principal constituinte, a miricitrina (**C-4**), foram avaliados quanto ao seu potencial anti-inflamatório. Para isto, foram medidos alguns parâmetros como a quantidade total de leucócitos (i), determinação da exsudação (ii), esta medida indiretamente através da concentração de azul de Evans, e a determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (iii), medida indiretamente através da reação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Cl<sup>-</sup>.

A figura 40 mostra os resultados obtidos para a atividade anti-inflamatória do extrato bruto (EB) e fração acetato de etila (FAe) de *M. splendens* utilizando os parâmetros i e ii. A primeira barra dos gráficos representa a medida do parâmetro em questão para o grupo de animais tratados com solução salina (S), a segunda barra representa a medida para o grupo ao qual foi administrado o agente inflamatório carragenina (Cg), as demais barras representam cada concentração de amostra administrada juntamente com a carragenina. Como controle positivo foi utilizado o fármaco de referência, dexametasona (Dex) na concentração de 0,5 mg/kg, i.p., juntamente com a carragenina. A semelhança ou diferença estatística entre a atividade da amostra em uma dada concentração e o fármaco de referência é indicada no gráfico por asteriscos em cima da barra. O desvio padrão de cada medida é mostrado na própria barra.

Em relação ao modelo de inflamação de quantidade total de leucócitos, foi observado que o extrato bruto de *M. splendens*, na dose de 100 mg/kg, demonstrou sua capacidade em inibir o processo de inflamação em cerca de 70 % não apresentando diferença significativa ao fármaco de referência, a dexametasona (Figura 40a). No entanto, quando avaliado pelo segundo parâmetro (determinação de exsudação) não foi observado qualquer atividade (Figura 40b). Para a fração acetato de etila (FAe) observa-se que atividade se mantém nas maiores doses testadas (50 mg/kg e 100 mg/kg ) com inibição do processo de inflamação em cerca de 60%, para o parâmetro de contagem de leucócitos, e 42% para o parâmetro de determinação de exsudação (Figura 40 c e d). Estes valores são considerados altos se tratando de extratos vegetais e não de compostos isolados.



**Figura 40.** Atividade anti-inflamatória do extrato bruto e fração acetato de etila de *M. splendens*. (S) representa o grupo de animais tratados com solução salina, (Cg) o grupo de animais tratados com carragenina e (Dex) dexametasona. Os asteriscos indicam semelhança estatística, ns: não significante, \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$

A figura 41 mostra os resultados obtidos para a atividade anti-inflamatória do extrato bruto (EB) e fração acetato de etila (FAe) de *M. palustris* utilizando os parâmetros i e ii. Em relação ao extrato bruto da espécie, observa-se que, segundo o modelo de contagem de leucócitos, o extrato foi capaz de inibir o processo de inflamação em cerca de 44% na dose de 100 mg/kg; valor este inferior ao observado para o extrato bruto de *M. splendens* (70%). No entanto, para o segundo parâmetro (exsudação), foi possível observar a redução em cerca de 30% para todas as doses testadas (1 – 100 mg/kg) (Figura 41b). A fração acetato de etila apresentou atividade

similar a espécie *M. splendens*, na concentração de 50 mg/kg no teste de contagem de leucócitos, com cerca de 65% de inibição do processo inflamatório, mas no teste de exsudação não apresentou atividade significativa para nenhuma das doses testadas.

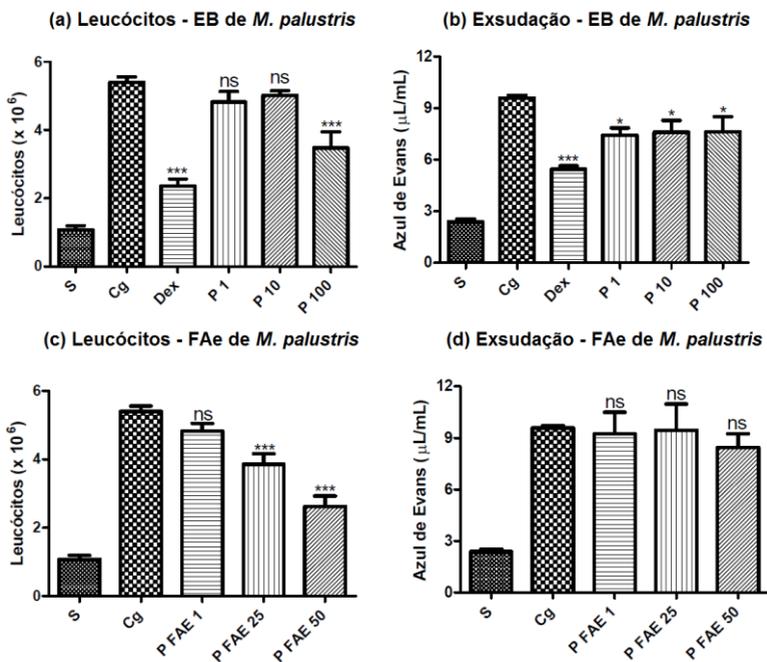


Figura 41. Atividade anti-inflamatória do extrato bruto e fração acetato de etila de *M. palustris*. (S) representa o grupo de animais tratados com solução salina, (Cg) o grupo de animais tratados com carragenina e (Dex) dexametasona. Os asteriscos indicam semelhança estatística, ns: não significante, \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$

Tendo o extrato bruto e as frações das espécies demonstrado atividade relevante, foi também avaliado o potencial do composto majoritário, miricitrina (C-4) em inibir o processo inflamatório onde, através da contagem de leucócitos e da determinação da exsudação, foi observada sua capacidade em inibir em cerca de 50 % e 30 %, respectivamente, na dose de 10 mg/kg (Figura 42a e b). Estes valores são baixos se comparados aos

extratos e frações testadas, sugerindo que este composto pode contribuir para a atividade anti-inflamatória através de um efeito sinérgico com outros compostos presentes nos extratos brutos e frações acetato de etila das espécies.

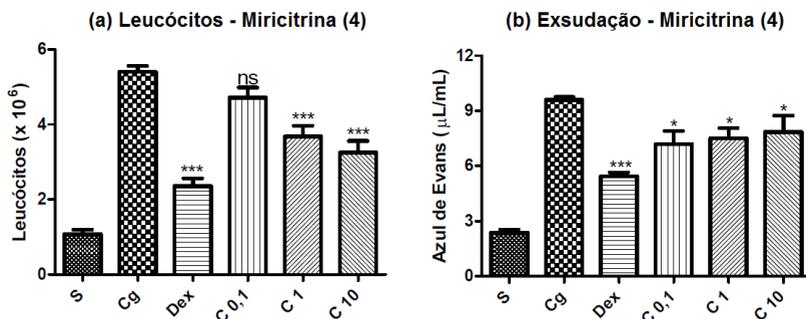
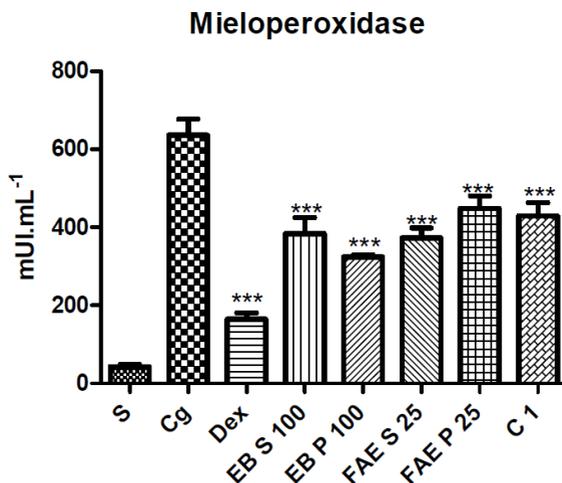


Figura 42. Atividade anti-inflamatória do composto Miricitrina isolado da fração acetato de etila de *M. splendens* e *M. palustris*. (S) representa o grupo de animais tratados com solução salina, (Cg) o grupo de animais tratados com carragenina e (Dex) dexametasona. Os asteriscos indicam semelhança estatística, ns: não significante, \*P<0,05; \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001

A enzima mieloperoxidase (MPO) é uma enzima produzida por células de defesa, principalmente em neutrófilos, estando presente também em monócitos. Nos neutrófilos, é armazenada em grânulos, e liberada durante a fagocitose. Esta enzima é um marcador indireto da presença de neutrófilos, resultado da infiltração destas células no tecido inflamado (LAU & BALDUS, 2006). Portanto, a diminuição dos níveis de MPO indica a diminuição da atividade inflamatória. Este parâmetro também foi avaliado para o extrato bruto (100 mg/kg) e fração acetato de etila (10 mg/kg) das espécies, bem como para o composto miricitrina (1 mg/kg). Figura 43.

Como pode ser observado no gráfico da figura 43, os extratos brutos e frações das duas espécies, bem como o composto, apresentaram uma inibição média de 42% da atividade enzimática da MPO, enquanto a dexametasona, usado como controle positivo, inibiu em 78% a atividade enzimática. Os resultados para os extratos, frações e composto isolado, não apresentaram diferenças significativas do fármaco de referência, dexametasona. Estes resultados confirmam a atividade anti-inflamatória exibida nos extratos

brutos, frações acetato de etila e composto isolado das duas espécies, e sugere que estes diminuem a migração de células de defesa, como os neutrófilos, por exemplo, para o tecido inflamado. Esta ação é interessante devido ao fato de que a acumulação de neutrófilos é um dos estágios críticos de doenças inflamatórias, como a dermatite e a asma (SCHAERLI *et al.*, 2004; OTUKI *et al.*, 2006).



**Figura 43.** Efeito dos extratos brutos, frações acetato de etila e composto isolado de *M. splendens* e *M. palustris* sobre a atividade da enzima mieloperoxidase. (S) representa o grupo de animais tratados com solução salina, (Cg) o grupo de animais tratados com carragenina e (Dex) dexametasona. Os asteriscos indicam semelhança estatística, ns: não significativa, \*P<0,05; \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001

É a primeira vez que se relata a atividade anti-inflamatória para extratos vegetais de espécies do gênero *Myrcia*. Há apenas um trabalho recente que aborda as propriedades anti-inflamatórias do óleo essencial da espécie *Myrcia pubiflora* através do modelo de migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (ANDRADE *et al.*, 2012). Já o flavonóide miricitrina tem sido muito estudado por diversos modelos anti-inflamatórios (MEOTTI *et al.*, 2006; MEOTTI *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2013).

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho realizou-se o estudo fitoquímico de quatro espécies da família Myrtaceae e a avaliação das atividades biológicas dos extratos, frações e compostos isolados. As principais conclusões foram:

### ➤ Em relação ao estudo fitoquímico

- A análise preliminar por HPLC-DAD das frações polares das espécies *M. splendens* e *M. palustris* mostrou perfis com absorções típicas de glicosídeos de flavonóis, tendo como flavonoide majoritário a miricitrina.

- O estudo fitoquímico da espécie *E. catharinae* levou ao isolamento, na fração insolúvel, do monometil-olivetol, uma mistura de esteróis  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol e o flavonoide miricitrina. Da fração acetato de etila foram isolados dois flavonoides, quercitina e catequina e o triterpeno ácido rotúndico. Todos os compostos isolados são inéditos na espécie, sendo o monometil-olivetol e ácido rotúndico inédidos, também, na família Myrtaceae.

- O novo estudo fitoquímico da fração acetato de etila de *P. cattleyanum* levou ao isolamento do flavanoide glicosilado quercitrina.

- O estudo fitoquímico das espécies de *Myrcia* levou ao isolamento do flavonoide miricitrina nas frações acetato de etila das duas espécies, com rendimentos de 0,5% (*M. splendens*) e 2,0% (*M. palustris*) em relação as frações. Na fração butanol de *M. palustris* também foi isolado a miricitrina e miricetina e quercetina na forma de mistura.

- Os perfis das frações acetato de etila de *M. palustris*, *E. catharinae* e *P. cattleyanum* pelo método HPLC-SPE-*tt*NMR, acoplado a ensaios de alta resolução, foram determinados. Foi possível observar atividade antioxidante para quase todos os picos, em graus diferentes, e, atividade de inibição da  $\alpha$ -glicosidase, apenas para alguns constituintes das amostras. Foi possível identificar cinco compostos da espécie *M. palustris*: ácido 4-hidroxicinâmico, miricetrina, quercetina, miricetina, quercitrina, todos com atividade antioxidante, sendo a miricetina e quercitrina também ativos no teste de inibição da  $\alpha$ -glicosidase.

## ➤ Em relação ao estudo das atividades biológicas

- Os extratos brutos das espécies, bem como suas frações, obtidas através de fracionamento líquido-líquido foram avaliados em alguns modelos de atividade biológica. Um dos testes realizados foi a avaliação da letalidade em larvas de *A. salina*, onde todas as espécies apresentaram atividade, com exceção da fração aquosa de *P. catleyanum* e as frações polares de *E. catharinae*. De um modo geral a atividade concentrou-se nas frações hexano das espécies.

- A atividade antioxidante dos extratos e frações das quatro espécies foi avaliada, juntamente com o seu conteúdo de fenóis e flavonoides. Nos testes de avaliação da captação do radical livre DPPH e de avaliação do potencial redutor, foi observada tendência no aumento da atividade diretamente relacionada ao aumento do conteúdo de fenóis nos extratos e frações. A espécie a apresentar atividade mais significativa nos testes antioxidantes foi *M. splendens*.

- Para o teste de inibição da enzima acetilcolinesterase foi observada maior atividade nas frações das espécies *M. splendens* e *M. palustris*, chegando a valores de porcentagem de inibição de 99,9% no teste de triagem a 100 µg/mL. De um modo geral, verifica-se que as frações são mais ativas que os compostos isolados sugerindo um efeito sinérgico dos constituintes das frações, sendo este determinante na atividade.

- A atividade antibacteriana dos extratos e frações das espécies de Myrtaceae foi avaliada contra as bactérias *S. aureus* (Gram +), *E. coli* e *P. aeruginosa* (Gram -). Os extratos e frações das espécies não apresentaram atividades relevantes. *M. splendens* apresentou atividade moderada para todas as frações polares frente à bactéria gram positiva, *S aureus*.

- A atividade antifúngica dos extratos e frações das espécies de Myrcia foi avaliada contra as leveduras *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis*. A espécie *M. splendens* se mostrou mais ativa, apresentando atividade elevada contra todas as cepas de *Candida*, com exceção da fração acetato de etila.

- A atividade anti-inflamatória das espécies *M. splendens* e *M. palustris* foi avaliada através do modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos. Os parâmetros da atividade, contagem de leucócitos, atividade da enzima mieloperoxidase e exsudação medidos para os extrato brutos (100 mg/kg) e fração acetato de etila (50 mg/kg) demonstraram capacidade de inibir o processo inflamatório com valores que variam de 30 a 70 % aproximadamente. O composto isolado destas frações, a miricitrina, na maior dose testada, também apresentou valores que ficam dentro desta faixa, não apresentando, portanto, atividade significativa.

Os resultados encontrados neste trabalho permitem concluir que as espécies da família Myrtaceae são ricas, sobretudo, em compostos fenólicos e apresentam potenciais biológicos diversificados, com destaque para atividade antioxidante. Uma das perspectivas seria a obtenção de maiores quantidades das frações hexano das espécies, haja vista que algumas destas frações apresentaram atividades interessantes nos testes de toxicidade frente à *A. salina*, antibacteriano e antifúngico.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdille, M. H., Singh, R. P., Jayaprakasha, G. K., & Jena, B. S. (2005, 5//). Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. *Food Chemistry*, 90, 891-896.
- Adewunmi, C. O., Agbedahunsi, J. M., Adebajo, A. C., Aladesanmi, A. J., Murphy, N., & Wando, J. (2001). Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. *J Ethnopharmacol*, 77(1), 19-24.
- Adoum, O. A. (2009). Absolute configuration of components isolated from the root of *Ximenia americana* Linn. *International Journal of Chemistry*, 19(2), 67-72.
- Albert, K. (2002). *On-line LC-NMR and Related Techniques*: Wiley.
- Alice, C. B., Siqueira, N. C. S., Mentz, L. A., Brasil e Silva, G. A. de A. & José, K. F. D. (1995). *Plantas medicinais de uso popular : atlas farmacognóstico*. Canoas: Editora da ULBRA.
- Almeida, S. P. De., Proença, C. E. B., Sano, S. M., Ribeiro, J. F (1998). *Cerrado : espécies vegetais úteis*. Planaltina, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, Ministério da Agricultura e do Abastecimento.
- Alvarenga, F. Q., Mota, B. C., Leite, M. N., Fonseca, J. M., Oliveira, D. A., Royo Vde, A., Laurentiz, R. S. (2013). In vivo analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the hydroalcoholic extract from the leaves of *Psidium cattleianum* Sabine. *J Ethnopharmacol*, 150(1), 280-284.
- Alves, T. M. d. A., Silva, A. F., Brandão, M., Grandi, T. S. M., Smânia, E. d. F. A., Smânia Júnior, A., & Zani, C. L. (2000). Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 367-373.
- Amimoto, K., Yoshikawa, K., & Arihara, S. (1993). Triterpenes and triterpene glycosides from the leaves of *Ilex rotunda*. *Phytochemistry*, 33(6), 1475-1480.
- Anderson, D. (1996). Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res*, 350(1), 103-108.

- Andrade, G. S., Guimarães, A. G., Santana, M. T., Siqueira, R. S., Passos, L. O., Machado, S. M. F., Quintans-Júnior, L. J. (2012). Phytochemical screening, antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Myrcia pubiflora* in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 181-188.
- Apel, M. A., Lima, M. E. L., Souza, A., Cordeiro, I., Young, M. C. M., Sobral, M. E. G., . . . Moreno, P. R. H. (2006). Screening of the biological activity from essential oils of native species from the Atlantic rain forest *Pharmacologyonline*, 3, 376-383.
- Arai, I., Amagaya, S., Komatsu, Y., Okada, M., Hayashi, T., Kasai, M., . . . Momose, Y. (1999). Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *J Ethnopharmacol*, 68(1-3), 307-314.
- Arcanjo, D. D., Albuquerque, A. C., Melo-Neto, B., Santana, L. C., Medeiros, M. G., & Cito, A. (2012). Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Braz J Biol*, 72(3), 505-509.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89(1), 27-36.
- Auricchio, M.T.; Bacchi, E.M. (2203) Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. *Revista do Instituto Adolfo Lutz, Sao Paulo*, v.62, n.1, p.55-61.
- Avila-Pena, D., Pena, N., Quintero, L., & Suarez-Roca, H. (2007). Antinociceptive activity of *Syzygium jambos* leaves extract on rats. *J Ethnopharmacol*, 112(2), 380-385.
- Backes, P. & Irgang, B. (2004). *Árvores cultivadas no sul do Brasil : guia de identificação e interesse paisagístico das principais espécies exóticas*. Porto Alegre, Brasil: Paisagem do Sul.
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., & David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29, 113-123.
- Barreto, A. S., Feliciano, G. D., Cláudia Cristina Hastenreiter da Costa, N., Carolina, S. L., Bruno da Motta, L., Carine, F. d. S., . . . Antônio, C. S.

- (2013). Analysis of the Presence of the Betulinic Acid in the Leaves of *Eugenia florida* by Using the Technique GC/MS, GC/FID and HPLC/DAD: A Seasonal and Quantitative Study.
- Barroso, G. M. (1991). *Sistemática de angiospermas do Brasil*: UFV.
- Begum, S., Hassan, S. I., Siddiqui, B. S., Shaheen, F., Ghayur, M. N., & Gilani, A. H. (2002). Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. *Phytochemistry*, *61*(4), 399-403.
- Behling, E. V., Sendão, M. C., Francescato, H. D. C., Antunes, L. M. G., & Bianchi, M. L. P. (2008). *Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas*.
- Bhattacharyya, J., & de Almeida, M. Z. (1985). Isolation of the Constituents of the Root-Bark of *Guettarda platypoda*. *J Nat Prod*, *48*(1), 148-149.
- Bierer, L. M., Haroutunian, V., Gabriel, S., Knott, P. J., Carlin, L. S., Purohit, D. P., . . . Davis, K. L. (1995). Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem*, *64*(2), 749-760.
- Boengler, K., Schulz, R., & Heusch, G. (2009). Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovasc Res*, *83*(2), 247-261.
- Bokesch, H. R., Wamiru, A., Le Grice, S. F., Beutler, J. A., McKee, T. C., & McMahon, J. B. (2008). HIV-1 ribonuclease H inhibitory phenolic glycosides from *Eugenia hyemalis*. *J Nat Prod*, *71*(9), 1634-1636.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25-30.
- Brito, N. R., & Lanetti, R. A. (1996). *A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro*. Rio de Janeiro: Ed. Ouro.
- Bryne, G. J. A. (1998). Treatment of cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Australian Journal Hospital Pharmacy*, *28*, 261-266.
- Bussmann, R. W., Malca, G., Glenn, A., Sharon, D., Nilsen, B., Parris, B., . . . Townesmith, A. (2011). Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *J Ethnopharmacol*, *137*(1), 121-140.

- Cáceres-Castillo, D., Mena-Rejón, G. J., Cedillo-Rivera, R., & Quijano, L. (2008). 21 $\beta$ -Hydroxy-oleanane-type triterpenes from *Hippocratea excelsa*. *Phytochemistry*, 69(4), 1057-1064.
- Camacho-Hernandez, I. L., Cisneros-Rodriguez, C., Uribe-Beltran, M. J., Rios-Morgan, A., & Delgado-Vargas, F. (2004). Antifungal activity of fruit pulp extract from *Psidium sartorianum*. *Fitoterapia*, 75(3-4), 401-404.
- Cao, J., Xia, X., Chen, X., Xiao, J., & Wang, Q. (2013). Characterization of flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities. *Food Chem Toxicol*, 51, 242-250.
- Celli, G. B., Pereira-Netto, A. B., & Beta, T. (2011). Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. *Food Research International*, 44(8), 2442-2451.
- Ceruks, M., Romoff, P., Fávero, O. A., & Lago, J. H. G. (2007). Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Química Nova*, 30, 597-599.
- Chah, K. F., Eze, C. A., Emuelosi, C. E., & Esimone, C. O. (2006). Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 104(1-2), 164-167.
- Chen, K. C., Hsieh, C. L., Peng, C. C., Hsieh-Li, H. M., Chiang, H. S., Huang, K. D., & Peng, R. Y. (2007). Brain derived metastatic prostate cancer DU-145 cells are effectively inhibited in vitro by guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts. *Nutr Cancer*, 58(1), 93-106.
- Clarkson, C., Madikane, E. V., Hansen, S. H., Smith, P. J., & Jaroszewski, J. W. (2007). HPLC-SPE-NMR characterization of sesquiterpenes in an antimycobacterial fraction from *Warburgia salutaris*. *Planta Med*, 73(6), 578-584.
- Clarkson, C., Staerk, D., Hansen, S. H., & Jaroszewski, J. W. (2005). Hyphenation of solid-phase extraction with liquid chromatography and nuclear magnetic resonance: application of HPLC-DAD-SPE-

- NMR to identification of constituents of *Kanahia laniflora*. *Anal Chem*, 77(11), 3547-3553.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15<sup>o</sup>. Suplemento informativo. Wayne: CLSI, 2005. 177 p. (M. 100/ v.25, n.1).
- CLSI - NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved Standard. Second edition, document M27- A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, Pa, USA, 2002.
- Cole, R. A., Haber, W. A., & Setzer, W. N. (2008). The Leaf Oil Composition of *Myrcia splendens* from Monteverde, Costa Rica. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(1), 41-44.
- Colla, A. R., Machado, D. G., Bettio, L. E., Colla, G., Magina, M. D., Brighente, I. M., & Rodrigues, A. L. (2012). Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. *J Ethnopharmacol*, 143(2), 720-731.
- Conde, G. E. A., Nascimento, V. T., & Santiago Santos, A. B. (2003). Inotropic effects of extracts of *Psidium guajava* L. (guava) leaves on the guinea pig atrium. *Braz J Med Biol Res*, 36(5), 661-668.
- Consolini, A. E., Baldini, O. A., & Amat, A. G. (1999). Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *J Ethnopharmacol*, 66(1), 33-39.
- Corrêa, E. M. C. & Andrade, E. D.(2005) Tratamento odontológico em pacientes HIV/AIDS. *Revista Odonto Ciência*, 20(49), 281-289.
- Corrêa, M. P. P. L. d. A. (1984). *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal.
- Coutinho, H. D., Costa, J. G., Lima, E. O., & Siqueira-Junior, J. P. (2009). In vitro phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. *J Photochem Photobiol B*, 96(1), 63-65.
- Crews, P., Rodríguez, J., & Jaspars, M. (1998). *Organic Structure Analysis*: Oxford University Press.

- Cronquist, A. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*: Columbia University Press.
- Cunha, W. R., dos Santos, F. M., Peixoto, J. d. A., Veneziani, R. C. S., Crotti, A. E. M., Silva, M. L. A., Bastos, J. K. (2009). Screening of plant extracts from the Brazilian Cerrado for their in vitro trypanocidal activity. *Pharmaceutical Biology*, 47(8), 744-749.
- de Cerqueira, M. D. (2002). *Estudo fitoquímico de Myrcia rotundifolia (Berg.) Legrand (Myrtaceae)*. (Master), UFBA, Salvador.
- de Cerqueira, M. D., Marques, E. d. J., Martins, D., Roque, N. F., Cruz, F. G., & Guedes, M. L. d. S. (2009). Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). *Química Nova*, 32, 1544-1548.
- de Cerqueira, M. D., Souza-Neta, L. C., Passos, M. d. G. V. M., Lima, E. d. O., Roque, N. F., Martins, D., Cruz, F. G. (2007). Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, 998-1003.
- de Pascual Teresa, J., Bellido, I. S., González, M. S., & Vicente, S. (1985). Tetracyclic triterpenes and nerolidol derivatives from *Santolina oblongifolia*. *Phytochemistry*, 25(1), 185-190.
- de Souza, G. C., Haas, A. P., von Poser, G. L., Schapoval, E. E., & Elisabetsky, E. (2004). Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol*, 90(1), 135-143.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*: Wiley.
- Ding, X., Ouyang, M.-A., Liu, X., & Wang, R.-Z. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Flavonoids from the Leaves of *Ginkgo biloba* against Brown Planthopper. *Journal of Chemistry*, 2013, 4.
- Donia, E. R. M. A., Alqasoumi, S. I., Awaad, A. S., & Cracker, L. (2011). Antioxidant activity of *Convolvulus hystrix* Vahl and its chemical constituents. *Pak J Pharm Sci*, 24(2), 143-147.
- Dorman, H. J., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., & Hiltunen, R. (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from

- Mentha species, hybrids, varieties, and cultivars. *J Agric Food Chem*, 51(16), 4563-4569.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1), 47-95.
- Einbond, L. S., Reynertson, K. A., Luo, X.-D., Basile, M. J., & Kennelly, E. J. (2004). Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, 84(1), 23-28.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Exarchou, V., Fiamegos, Y. C., van Beek, T. A., Nanos, C., & Vervoort, J. (2006). Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. *J Chromatogr A*, 1112(1-2), 293-302.
- Fale, P. L., Amaral, F., Amorim Madeira, P. J., Sousa Silva, M., Florencio, M. H., Frazao, F. N., & Serralheiro, M. L. (2012). Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of Peumus boldus water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines. *Food Chem Toxicol*, 50(8), 2656-2662.
- Ferrari, C. K. B. (2007). *Diet, herbs, and nutritional protection against oxidative stress in neurological diseases*. Amsterdam: Elsevier.
- Ferrari, C. K. B., França, E. L., Honorio-França, A. C., & . (2009). Nitric oxide, health and disease. *J Appl Biomed*, 7, 163-173.
- Ferreira, A. C., Neto, J. C., da Silva, A. C., Kuster, R. M., & Carvalho, D. P. (2006). Inhibition of thyroid peroxidase by Myrcia uniflora flavonoids. *Chem Res Toxicol*, 19(3), 351-355.
- Ferreira, E. A., Gris, E. F., Felipe, K. B., Correia, J. F. G., Cargnin-Ferreira, E., Filho, D. W., & Pedrosa, R. C. (2010). Potent hepatoprotective effect in CCl4-induced hepatic injury in mice of phloroacetophenone from Myrcia multiflora. *Libyan Journal of Medicine*.
- Ferreira, E. A., Gris, E. F., Rebello, J. M., Correia, J. F., de Oliveira, L. F., Filho, D. W., & Pedrosa, R. C. (2011). The 2',4',6'-trihydroxyacetophenone isolated from Myrcia multiflora has

- antiobesity and mixed hypolipidemic effects with the reduction of lipid intestinal absorption. *Planta Med*, 77(14), 1569-1574.
- Ferreira, L. C., Grabe-Guimaraes, A., de Paula, C. A., Michel, M. C., Guimaraes, R. G., Rezende, S. A., Saude-Guimaraes, D. A. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *J Ethnopharmacol*, 145(1), 100-108.
- Fischer, D. C. H., Limberger, R. P., Henriques, A. T., & Moreno, P. R. H. (2005). Essential Oils from Leaves of Two *Eugenia brasiliensis* Specimens from Southeastern Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 17(5), 499-500.
- Flores, G., Dastmalchi, K., Wu, S. B., Whalen, K., Dabo, A. J., Reynertson, K. A., . . . Kennelly, E. J. (2013). Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. *Food Chem*, 141(2), 889-895.
- Forgo, P., & Kover, K. E. (2004). Gradient enhanced selective experiments in the 1H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmaterol, a phytosterol derivative. *Steroids*, 69(1), 43-50.
- Frighetto, N., Welendorf, R. M., Silva, A. M. P., Nakamura, M. J., & Siani, A. C. (2005). Aplicação de cromatografia centrífuga de contracorrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15, 338-343.
- Fu, H., Luo, Y., & Zhang, D. (2009). [Studies on chemical constituents of leaves of *Psidium guajava*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 34(5), 577-579.
- Furtado, R. F., Lima, M. G. A. d., Andrade Neto, M., Bezerra, J. N. S., & Silva, M. G. d. V. (2005). Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, 34, 843-847.
- Goetz, G., Fkyerat, A., Métails, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R., & Pont, V. (1999). Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry*, 52(5), 759-767.

- Gottlieb, O. R., da Silva, M. L., & Maia, J. G. S. (1972). Eucalyptin from Eugenia and Myrcia species. *Phytochemistry*, 11(3), 1185.
- Govaerts, R. (2008). *World checklist of Myrtaceae*. Richmond: Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew.
- Gu, J. Q., Park, E. J., Luyengi, L., Hawthorne, M. E., Mehta, R. G., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D. (2001). Constituents of Eugenia sandwicensis with potential cancer chemopreventive activity. *Phytochemistry*, 58(1), 121-127.
- Gutierrez, R. M., Mitchell, S., & Solis, R. V. (2008). Psidium guajava: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*, 117(1), 1-27.
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 561-564.
- Ha do, T., Tuan, D. T., Thu, N. B., Nhiem, N. X., Ngoc, T. M., Yim, N., & Bae, K. (2009). Palbinone and triterpenes from Moutan Cortex (*Paeonia suffruticosa*, Paeoniaceae) stimulate glucose uptake and glycogen synthesis via activation of AMPK in insulin-resistant human HepG2 Cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 19(19), 5556-5559.
- Hahn, R. C., & Hamdan, J. S. (2000). Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipids of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(7), 1997-2000.
- Halliwell, B. (2001). *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease eLS*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Hendrawati, O., Woerdenbag, H. J., Michiels, P. J., Aantjes, H. G., van Dam, A., & Kayser, O. (2011). Identification of lignans and related compounds in *Anthriscus sylvestris* by LC-ESI-MS/MS and LC-SPE-NMR. *Phytochemistry*, 72(17), 2172-2179.
- Ho, R., Violette, A., Cressend, D., Raharivelomanana, P., Carrupt, P. A., & Hostettmann, K. (2012). Antioxidant potential and radical-scavenging effects of flavonoids from the leaves of *Psidium cattleianum* grown in French Polynesia. *Nat Prod Res*, 26(3), 274-277.

- Hussein, S. A., Hashem, A. N., Seliem, M. A., Lindequist, U., & Nawwar, M. A. (2003). Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. *Phytochemistry*, 64(4), 883-889.
- Imatomi, M., Novaes, P., Matos, A. P., Gualtieri, S. C. J., Molinillo, J. M. G., Lacret, R., Macías, F. A. (2013). Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, 46(0), 29-35.
- Iwu, M. M. (1993). *Handbook of African medicinal plants*. Boca Raton: CRC Press.
- Jagetia, G. C., & Baliga, M. S. (2002). Syzygium cumini (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study. *Toxicol Lett*, 132(1), 19-25.
- Jaiarj, P., Khoohaswan, P., Wongkrajang, Y., Peungvicha, P., Suriyawong, P., Saraya, M. L., & Ruangsomboon, O. (1999). Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *J Ethnopharmacol*, 67(2), 203-212.
- Jaroszewski, J. W. (2005). Hyphenated NMR methods in natural products research, part 1: direct hyphenation. *Planta Med*, 71(8), 691-700.
- Jellinger, K. A., Qureshi, G. A., & Parvez, S. H. (2007). *Advances in our understanding of neurodegeneration. Oxidative stress and neurodegenerative disorders*. Amsterdam: Elsevier.
- Johann, S., Cisalpino, P. S., Watanabe, G. A., Cota, B. B., de Siqueira, E. P., Pizzolatti, M. G., de Resende, M. A. (2010). Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Pharm Biol*, 48(4), 388-396.
- Joly, A. B. (1966). *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*: Companhia Editora Nacional.
- Jung, M., & Park, M. (2007). Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules*, 12(9), 2130-2139.
- Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. E. (2006). Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 40, 144-163.

- Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(2), 153-161.
- Klein, R.M. (1990). Espécies raras ou ameaçadas de extinção. Volume 1 – Mirtáceas e Bromeliáceas. Ministério da Economia, Fazenda e Planejamento, IBGE, Diretoria de Geociências, Rio de Janeiro, 128-131.
- Koleva, I. I., Niederländer, H. A. G., & van Beek, T. A. (2000). An On-Line HPLC Method for Detection of Radical Scavenging Compounds in Complex Mixtures. *Anal Chem*, 72(10), 2323-2328.
- Kovganko, N. V., Kashkan, Z. N., & Borisov, E. V. (2000). 13 NMR Spectra of Functionally Substituted 3 $\beta$ -Chloroderivatives of Cholesterol and  $\beta$ -Sitosterol. *Chemistry of Natural Compounds*, 36(6), 595-598.
- Kuskoski, E. M., Vega, J. M., Rios, J. J., Fett, R., Troncoso, A. M., & Asuero, A. G. (2003). Characterization of anthocyanins from the fruits of baguacu (*Eugenia umbelliflora* Berg). *J Agric Food Chem*, 51(18), 5450-5454.
- Landrum, L., & Kawasaki, M. (1997). The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, 49(4), 508-536.
- Lapčík, O., Klejdus, B., Kokoška, L., Davidová, M., Afandi, K., Kubáň, V., & Hampl, R. (2005). Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(10), 983-992.
- Lau, D., & Baldus, S. (2006). Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther*, 111(1), 16-26.
- Lee, S., Min, B., & Kho, Y. (2002). Brine shrimp lethality of the compounds from *Phryma leptostachya* L. *Arch Pharm Res*, 25(5), 652-654.
- Lee, T.-H., Juang, S.-H., Hsu, F.-L., & Wu, C.-Y. (2005). Triterpene Acids from the Leaves of *Planchonella Duclitan* (Blanco) Bakhuijan. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 52(6), 1275-1280.
- Li, X., Yang, L., Wang, J.-f., Li, X.-f., & Cai, G.-p. (2012). Effect of extracts from *Psidium guajava* leaves on anti-obesity and lipid lowering

- activity in high-fat diet induced obese mice. *Xiandai Shengwuyixue Jinzhan*, 12(31), 6001-6005.
- Liang, Q., Qian, H., & Yao, W. (2005). Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*, 11(1), 93-101.
- Limberger, R. P., Farias, F. M., Sobral, M., Zuanazzi, J. A., & Henriques, A. T. (2001). Chemical composition of the volatile oil from *Psidium cattleianum*, *P. guaiava*, *P. incanum* and *P. luridum* (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmácia*, 82((1/2)), 53-55.
- Limberger, R. P., Sobral, M., Henriques, A. T., Menut, C., & Bessièrre, J.-M. (2004). Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, 27, 916-919.
- Lin, C. Y., & Yin, M. C. (2012). Renal protective effects of extracts from guava fruit (*Psidium guajava* L.) in diabetic mice. *Plant Foods Hum Nutr*, 67(3), 303-308.
- Lin, X., & Heitman, J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol*, 60, 69-105.
- Liu, G. Q. CHN 200810198190.7, 2010 (Patente).
- Longo, L., Scardino, A., Vasapollo, G., & Blando, F. (2007). Anthocyanins from *Eugenia myrtifolia* Sims. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3), 329-332.
- Lugasi, A., Dworschák, E., Blázovics, A., & Kéry, Á. (1998). Antioxidant and free radical scavenging properties of squeezed juice from black radish (*Raphanus sativus* l. var *niger*) root. *Phytotherapy Research*, 12(7), 502-506.
- Lunardi, I., Peixoto, J. L. B., Silva, C. C. d., Shuquel, I. T. A., Basso, E. A., & Vidotti, G. J. (2001). Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12, 180-183.
- Machado, K. E., Filho, V. C., Tessarolo, M. L., Mallmann, R., Meyre-Silva, C., & Bella Cruz, A. (2005). Potent Antibacterial Activity of *Eugenia umbelliflora*. *Pharmaceutical Biology*, 43(7), 636-639.

- Magina, M. A., Gilioli, A., Moresco, H. H., Colla, G., Pizzolatti, M. G., & Brighente, I. M. C. (2010). Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, 29 (3), 376-382
- Magina, M. D. A., Dalmarco, E. M., Dalmarco, J. B., Colla, G., Pizzolatti, M. G., & Brighente, I. M. C. (2012). Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. *Química Nova*, 35, 1184-1188.
- Mahmoud, II, Marzouk, M. S., Moharram, F. A., El-Gindi, M. R., & Hassan, A. M. (2001). Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry*, 58(8), 1239-1244.
- Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 125-132.
- Manocha, M. S., San-Blas, G., & Centeno, S. (1980). Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. *J Gen Microbiol*, 117(1), 147-154.
- Manosroi, J., Dhumtanom, P., & Manosroi, A. (2006). Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett*, 235(1), 114-120.
- Marchiori, J. N. C. & Sobral, M. (1997). *Dendrologia das angiospermas : Myrtales*. Santa Maria: Ed. UFSM.
- Marcuzzo, S. F. (1998). *30 árvores estratégicas da Mata Atlântica : por um verde mais vivo*. Osório: Prefeitura.
- Markham, K. R. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. London; New York: Academic Press.
- Marques, M. B. (2000). Patentes farmacêuticas e acessibilidade aos medicamentos no Brasil. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 7, 07-21.
- Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F., & Araújo, M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103(3), 778-786.

- Matsuda, H., Nishida, N., & Yoshikawa, M. (2002). Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of myrciacitrins III, IV, and V. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, *50*(3), 429-431.
- Mc Laughlin, J. L. (1991). *Methods in plant biochemistry*. (Vol. 6). Londres: Academic Press.
- McClanahan, R. H., & Robertson, L. W. (1985). Microbial Transformation of Olivetol by *Fusarium roseum*. *J Nat Prod*, *48*(4), 660-663.
- Mei-Hsien, L., Nishimoto, S., Ling-Ling, Y., Kun-Ying, Y., Hatano, T., Yoshida, T., & Okuda, T. (1997). Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. *Phytochemistry*, *44*(7), 1343-1349.
- Mensor, L. L. (1999). *Avaliação da atividade antioxidante em plantas brasileiras*. (master's Tese de Mestrado), UFRJ, Rio de Janeiro.
- Meotti, F. C., Missau, F. C., Ferreira, J., Pizzolatti, M. G., Mizuzaki, C., Nogueira, C. W., & Santos, A. R. (2006). Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. *Biochem Pharmacol*, *72*(12), 1707-1713.
- Meotti, F. C., Senthilmohan, R., Harwood, D. T., Missau, F. C., Pizzolatti, M. G., & Kettle, A. J. (2008). Myricitrin as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: implications for the pharmacological effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, *44*(1), 109-120.
- Mesaros, N., Nordmann, P., Plesiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Glupczynski, Y., Van Bambeke, F. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect*, *13*(6), 560-578.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*, *45*(5), 31-34.
- Meyre-Silva, C., Petry, C. M., Berte, T. E., Becker, R. G., Zanatta, F., Delle-Monache, F., . . . Andrade, S. F. (2009). Phytochemical analyses and gastroprotective effects of *Eugenia umbelliflora* (Myrtaceae) on experimental gastric ulcers. *Nat Prod Commun*, *4*(7), 911-916.

- Mielke, M.S.; Fachinello, J.C.; Raseira, A. (1990). Fruteiras nativas - características de 5 Mirtáceas com potencial para utilização comercial. Pelotas: Hortisul, 36p.
- Morais, P. O., & Lombardi, J. A. (2006). A família Myrtaceae na reserva particular do patrimônio natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. In Lundiana (Ed.), (Vol. 7, pp. 3-32). Belo Horizonte.
- Moreira, F. d. P. M., Coutinho, V., Montanher, A. B. P., Caro, M. S. B., Brighente, I. M. C., Pizzolatti, M. G., & Monache, F. D. (2003). Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia*: bioatividade sobre *Artemia salina*. *Química Nova*, 26, 309-311.
- Moresco, H. H. (2010). *Investigação Fitoquímica E Biológica De Averrhoa Carambola E Psidium Cattleyanum*. (PhD), UFSC, Florianópolis.
- Moresco, H. H., Pizzolatti, M. G., & Brighente, I. M. C. (2012a). Constituents of *Psidium cattleyanum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(6), 1028-1029.
- Moresco, H. H., Queiroz, G. S., Pizzolatti, M. G., & Brighente, I. (2012b). Chemical constituents and evaluation of the toxic and antioxidant activities of *Averrhoa carambola* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2), 319-324.
- Mukhtar, H. M., Ansari, S. H., Ali, M., Naved, T., & Bhat, Z. A. (2004). Effect of water extract of *Psidium guajava* leaves on alloxan-induced diabetic rats. *Pharmazie*, 59(9), 734-735.
- Mukhtar, H. M., Ansari, S. H., Bhat, Z. A., Naved, T., & Singh, P. (2006). Antidiabetic activity of an ethanol extract obtained from the stem bark of *Psidium guajava* (Myrtaceae). *Pharmazie*, 61(8), 725-727.
- Nadkarni, K. M., & Nadkarni, A. K. (1999). Dr. K. M. Nadkarni's Indian materia medica: with Ayurvedic, Unani-tibbi, Siddha, allopathic, homeopathic, naturopathic & home remedies, appendices & indexes: Popular Prakashan.
- Nam, N. H., Sardari, S., Selecky, M., & Parang, K. (2004). Carboxylic acid and phosphate ester derivatives of fluconazole: synthesis and antifungal activities. *Bioorg Med Chem*, 12(23), 6255-6269.

- Neri-Numa, I. A., Carvalho-Silva, L. B., Morales, J. P., Malta, L. G., Muramoto, M. T., Ferreira, J. E. M., Pastore, G. M. (2013). 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*, 50(1), 70-76.
- Nixdorf, S. L., & Hermosin-Gutierrez, I. (2010). Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: phenolic composition and antioxidant capacity. *Anal Chim Acta*, 659(1-2), 208-215.
- Nunes, B. S., Carvalho, F. D., Guilhermino, L. M., & Van Stappen, G. (2006). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ Pollut*, 144(2), 453-462.
- Ojewole, J. A. (2006). Antiinflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rats and mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 28(7), 441-446.
- Oliveira-Filho, A. T., & Fontes, M. A. L. (2000). Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. *Biotropica*, 32(4b), 793-810.
- Otuki, M. F., Pietrovski, E. F., & Cabrini, D. A. (2006). Topical simvastatin: preclinical evidence for a treatment of skin inflammatory conditions. *J Dermatol Sci*, 44(1), 45-47.
- Oyama, T., Aoyama, H., Yamada, K., Mitsuhashi, T., & Sugiyama, N. (1968). Isolation of a new triterpene, rotundic acid, from *ilex rotunda*. *Tetrahedron Letters*, 9(44), 4639-4641.
- Pacifico, M., Napolitano, A., Masullo, M., Hilario, F., Vilegas, W., Piacente, S., & Santos, L. C. d. (2011). Metabolite fingerprint of “capim dourado” (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handcrafts. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 488-496.
- Park, B.-J., Matsuta, T., Kanazawa, T., Park, C.-H., Chang, K.-J., & Onjo, M. (2012). Phenolic compounds from the leaves of *Psidium guajava* II. Quercetin and its glycosides. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(3), 477-479.
- Pellegrini, N., Visioli, F., Buratti, S., & Brighenti, F. (2001). Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. *J Agric Food Chem*, 49(5), 2532-2538.

- Petrovski, E. F., Magina, M. D., Gomig, F., Petrovski, C. F., Mücke, G. A., Barcellos, M., . . . Otuki, M. F. (2008). Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. *J Pharm Pharmacol*, 60(4), 479-487.
- Pino, J. A., Agüero, J., Marbot, R., & Fuentes, V. (2001). Leaf Oil of *Psidium guajava* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 13(1), 61-62.
- Pinto, A. C., Silva, D. H. S., Bolzani, V. d. S., Lopes, N. P., & Epifanio, R. d. A. (2002). Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, 25, 45-61.
- Pukalskas, A., van Beek, T. A., & de Waard, P. (2005). Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection-DAD-SPE-NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts. *J Chromatogr A*, 1074(1-2), 81-88.
- Qadan, F., Thewaini, A. J., Ali, D. A., Afifi, R., Elkhawad, A., & Matalka, K. Z. (2005). The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms. *Am J Chin Med*, 33(2), 197-204.
- Qian, H., & Nihorimberé, V. (2004). Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *J Zhejiang Univ Sci*, 5(6), 676-683.
- Rajasekaran, M., Bapna, J. S., Lakshmanan, S., Ramachandran Nair, A. G., Veliath, A. J., & Panchanadam, M. (1988). Antifertility effect in male rats of oleanolic acid, a triterpene from *Eugenia jambolana* flowers. *J Ethnopharmacol*, 24(1), 115-121.
- Rao, G. V., Sahoo, M. R., Rajesh, G. D., & Mukhopadhyay, T. (2012). Chemical constituents and biological studies on the leaves of *Psidium guajava* Linn. *Journal of Pharmacy Research*, 5(4), 1946-1978.
- Rao, T. S., Currie, J. L., Shaffer, A. F., & Isakson, P. C. (1993). Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation*, 17(6), 723-741.
- Revilla, J. (2002). *Plantas úteis da Bacia Amazônica*. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia : SEBRAE.

- Reynertson, K. A., Yang, H., Jiang, B., Basile, M. J., & Kennelly, E. J. (2008). Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chem*, 109(4), 883-890.
- Rios, J. L., & Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*, 100(1-2), 80-84.
- Rossi, F., & Andreazzi, D. B. (2005). *Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma*: Atheneu.
- Rosso, V. V. d., Hillebrand, S., Cuevas Montilla, E., Bobbio, F. O., Winterhalter, P., & Mercadante, A. Z. (2008). Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(4), 291-299.
- Roy, C. K., Kamath, J. V., & Asad, M. (2006). Hepatoprotective activity of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *Indian J Exp Biol*, 44(4), 305-311.
- Roy, D., Kumar, V., Acharya, K. K., & Thirumurugan, K. (2013). Probing the Binding of *Syzygium*-Derived alpha-Glucosidase Inhibitors with N- and C-Terminal Human Maltase Glucoamylase by Docking and Molecular Dynamics Simulation. *Appl Biochem Biotechnol*.
- Russo, E. M., Reichelt, A. A., De-Sa, J. R., Furlanetto, R. P., Moises, R. C., Kasamatsu, T. S., & Chacra, A. R. (1990). Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. *Braz J Med Biol Res*, 23(1), 11-20.
- Saimaru, H., Orihara, Y., Tansakul, P., Kang, Y. H., Shibuya, M., & Ebizuka, Y. (2007). Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 55(5), 784-788.
- Sacramento, H.T. Perspectivas da fitoterapia latino americana no novo milênio. Disponível em: <<http://paginas.unisul.br/acpm/bol002.htm>>. Acesso em: 16 mar. 2009.
- Saldanha, L., Vilegas, W., & Dokkedal, A. (2013). Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. *Molecules*, 18(7), 8402-8416.

- Saleh, T. S., Calixto, J. B., & Medeiros, Y. S. (1996). Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Br J Pharmacol*, *118*(3), 811-819.
- Salvador, M. J., de Lourenco, C. C., Andrezza, N. L., Pascoal, A. C., & Stefanello, M. E. (2011). Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae plants of the south of Brazil. *Nat Prod Commun*, *6*(7), 977-982.
- Sanhotene, M. d. C. C. (1989). *Frutíferas nativas uteis a fauna na arborização urbana*. Porto Alegre (RS): Sagra.
- Schaerli, P., Britschgi, M., Keller, M., Steiner, U. C., Steinmann, L. S., Moser, B., & Pichler, W. J. (2004). Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation. *J Immunol*, *173*(3), 2151-2158.
- Schapoval, E. E., Silveira, S. M., Miranda, M. L., Alice, C. B., & Henriques, A. T. (1994). Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *J Ethnopharmacol*, *44*(3), 137-142.
- Schmeda-Hirschmann, G., Theoduloz, C., Franco, L., Ferro, E., & de Arias, A. R. (1987). Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol*, *21*(2), 183-186.
- Schmidt, J. S., Lauridsen, M. B., Dragsted, L. O., Nielsen, J., & Staerk, D. (2012). Development of a bioassay-coupled HPLC-SPE-ttNMR platform for identification of alpha-glucosidase inhibitors in apple peel (*Malus domestica* Borkh.). *Food Chem*, *135*(3), 1692-1699.
- Schmitz, W., Saito, Y. A., Estevão, D., & Saridakis, O. H. (2005). Gren tea as a chemoprotector. *Semina cienc. biol. saude*, *26*(2), 119-130.
- Shaheen, H. M., Ali, B. H., Alqarawi, A. A., & Bashir, A. K. (2000). Effect of *Psidium guajava* leaves on some aspects of the central nervous system in mice. *Phytother Res*, *14*(2), 107-111.
- Shao, M., Wang, Y., Huang, X. J., Fan, C. L., Zhang, Q. W., Zhang, X. Q., & Ye, W. C. (2012). Four new triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. *J Asian Nat Prod Res*, *14*(4), 348-354.

- Sherwood, E. R., & Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 18(3), 385-405.
- Shu, J. C., Liu, J. Q., Chou, G. X., & Wang, Z. T. (2012). Two new triterpenoids from *Psidium guajava*. *Chinese Chemical Letters*, 23(7), 827-830.
- Shu, J., Chou, G., & Wang, Z. (2009). [Triterpenoid constituents in fruits of *Psidium guajava*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 34(23), 3047-3050.
- Simirgiotis, M. J., Adachi, S., To, S., Yang, H., Reynertson, K. A., Basile, M. J., . . . Kennelly, E. J. (2008). Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of a *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). *Food Chem*, 107(2), 813-819.
- Slowing, K., Carretero, E., & Villar, A. (1994). Anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Eugenia jambos* in rats. *J Ethnopharmacol*, 43(1), 9-11.
- Slowing, K., Sollhuber, M., Carretero, E., & Villar, A. (1994). Flavonoid glycosides from *Eugenia jambos*. *Phytochemistry*, 37(1), 255-258.
- Sobral, M., Proença, C., Souza, M., Mazine, F., & Lucas, E. (2010). Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2014, from <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB010737>
- Souza, P. M., Sales, P. M., Simeoni, L. A., Silva, E. C., Silveira, D., & Magalhaes Pde, O. (2012). Inhibitory activity of alpha-amylase and alpha-glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. *Planta Med*, 78(4), 393-399.
- Staerk, D., Kesting, J. R., Sairafianpour, M., Witt, M., Asili, J., Emami, S. A., & Jaroszewski, J. W. (2009). Accelerated dereplication of crude extracts using HPLC-PDA-MS-SPE-NMR: quinolinone alkaloids of *Haplophyllum acutifolium*. *Phytochemistry*, 70(8), 1055-1061.
- Stasi, L. C. D. & Hiruma-Lima, C. A. (2002). *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo, SP: Editora UNESP.
- Stefanello, M. É. A., Cervi, A. C., Wisniewski Jr, A., & Simionatto, E. L. (2010). Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtecta*, Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 82-86.

- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuoka, T. (2006). Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 52(2), 149-153.
- Tanaka, T., Orii, Y., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., & Kouno, I. (1996). Syzyginins A and B, two ellagitannins from *Syzygium aromaticum*. *Phytochemistry*, 43(6), 1345-1348.
- Tenorio, A. I. S., Vargas, D., Espinosa, A., Díaz, A., & Gupta, M. P. (2011). Chemical Composition of Leaf Essential Oils of *Calypttranthes microphylla* B. Holts & M.L., *Myrcia aff fosteri* Croat and *Eugenia octopleura* Krug & Urb from Panama. *Journal of Essential Oil Research*, 23(5), 29-33.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2005). Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 36 Suppl 4, 254-257.
- Timbola, A. K., Szpoganicz, B., Branco, A., Monache, F. D., & Pizzolatti, M. G. (2002). A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. *Fitoterapia*, 73(2), 174-176.
- Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K., & Vlietinck, A. J. (1998). Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 61(1), 57-65.
- Trevisan, M. T. S., Macedo, F. V. V., Meent, M. v. d., Rhee, I. K., & Verpoorte, R. (2003). Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*, 26, 301-304.
- Viegas Junior, C., Bolzani, V. d. S., Furlan, M., Fraga, C. A. M., & Barreiro, E. J. (2004). Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. *Química Nova*, 27, 655-660.
- Wang Jing-ru, Z. J.-j., YE Chun-ling, YE Kai-he, Zhang Xiao-qi, Wang Ying, YE Wen-cai. (2012). Hypolipemic and hypoglycemic effects of total triterpenoids from *Psidium guajava* leaves on type 2 diabetic rats. *Chin J Pathophysiol*, 28(6), 1109-1113.
- Waterman, P. G & Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford; Boston: Blackwell Scientific.

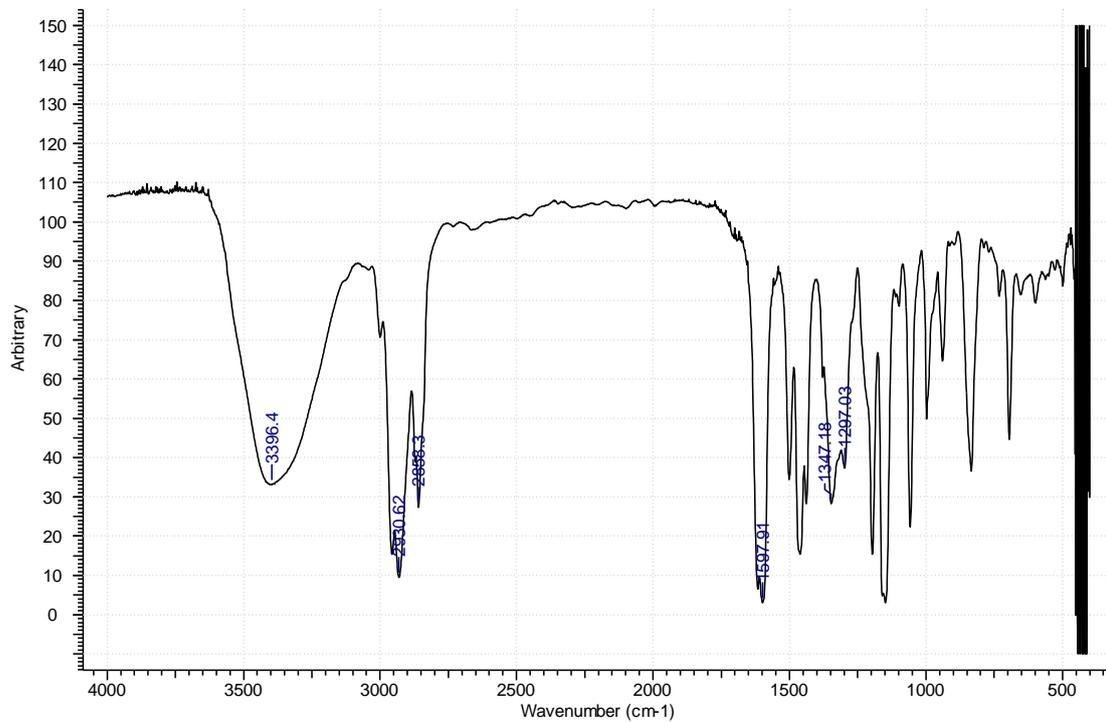
- Wilson, C. A. (2011). Subgeneric classification in *Iris* re-examined using chloroplast sequence data. *Taxon*, 60(1), 27-35.
- Wilson, P. G., O'Brien, M. M., Gadek, P. A., & Quinn, C. J. (2001). Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. *Am J Bot*, 88(11), 2013-2025.
- Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99-105.
- Wolfender, J. L., Rodriguez, S., & Hostettmann, K. (1998). Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. *Journal of Chromatography A*, 794(1-2), 299-316.
- Wu, H., Li, X., Li, R., Li, L., & Wang, N. (2010). Study on anti-oxidative components from leaves of *Psidium guajava*. *Zhongcaoyao*, 41(10), 1593-1597.
- Yang, L. L., Lee, C. Y., & Yen, K. Y. (2000). Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer Lett*, 157(1), 65-75.
- Yen, G.-C., & Chen, H.-Y. (1995). Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *J Agric Food Chem*, 43(1), 27-32.
- Yoshikawa, M., Shimada, H., Nishida, N., Li, Y., Toguchida, I., Yamahara, J., & Matsuda, H. (1998). Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 46(1), 113-119.
- Yu, T. W., & Anderson, D. (1997). Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutat Res*, 379(2), 201-210.
- Zani, C. L., Chaves, P. P. G., Queiroz, R., De Oliveira, A. B., Cardoso, J. E., Anjos, A. M. G., & Grandi, T. S. M. (1995). Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomedicine*, 2(1), 47-50.

- Zhao, Q. C.; He, Y. F.; Nan, M. L.; Chen, S. W.; Zhao, Y. W.; Wang, L. P. CHN 20110030007.4, 2011(Patente).
- Zhao, Q. C.; Nan, M. L.; He, Y. F.; Chen, S. W. CHN ZL201010204596.9, 2010 (Patente).
- Zhao, W. M., Wolfender, J. L., Hostettmann, K., Cheng, K. F., Xu, R. S., & Qin, G. W. (1997). Triterpenes and triterpenoid saponins from *Mussaenda pubescens*. *Phytochemistry*, 45(5), 1073-1078.
- Zoghbi, M. d. G. B., Andrade, E. H. A., da Silva, M. H. L., Carreira, L. M. M., & Maia, J. G. S. (2003). Essential oils from three *Myrcia* species. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(5), 421-424.

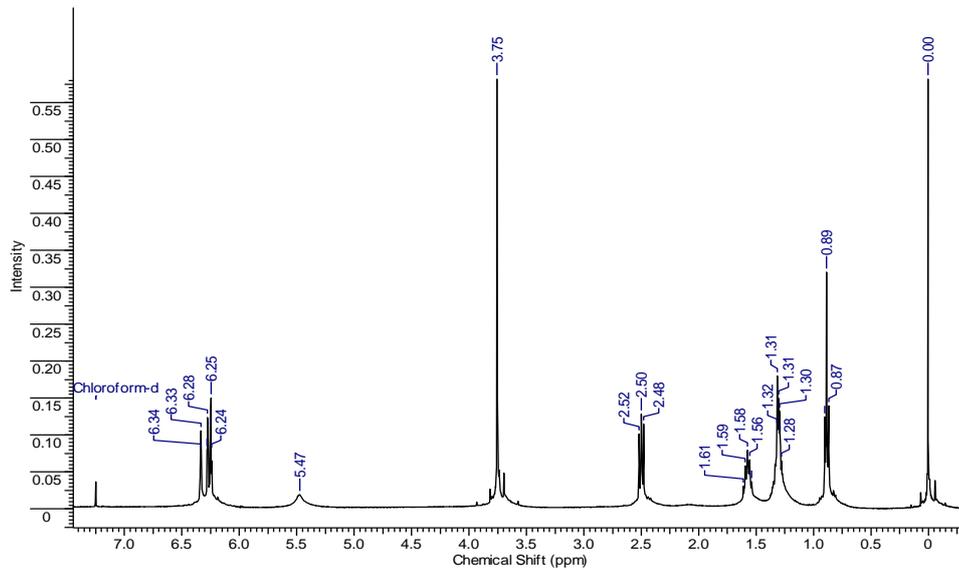


# Anexos

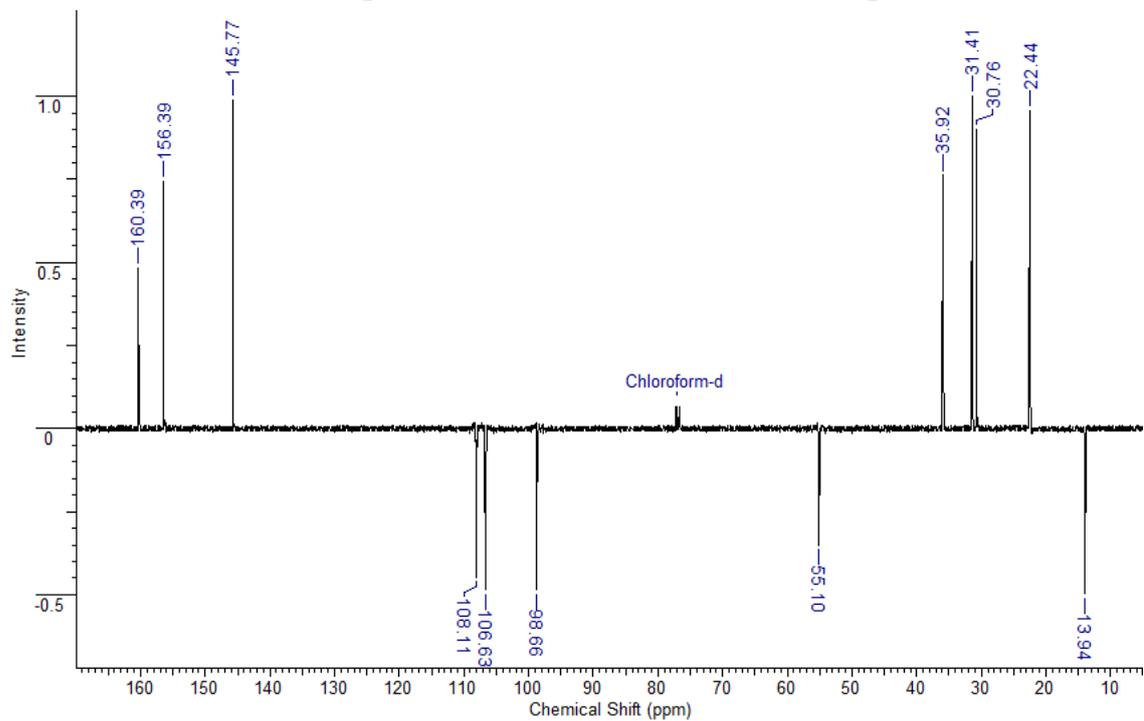
### ANEXO 1. Espectro de IV (KBr) do Composto C-1



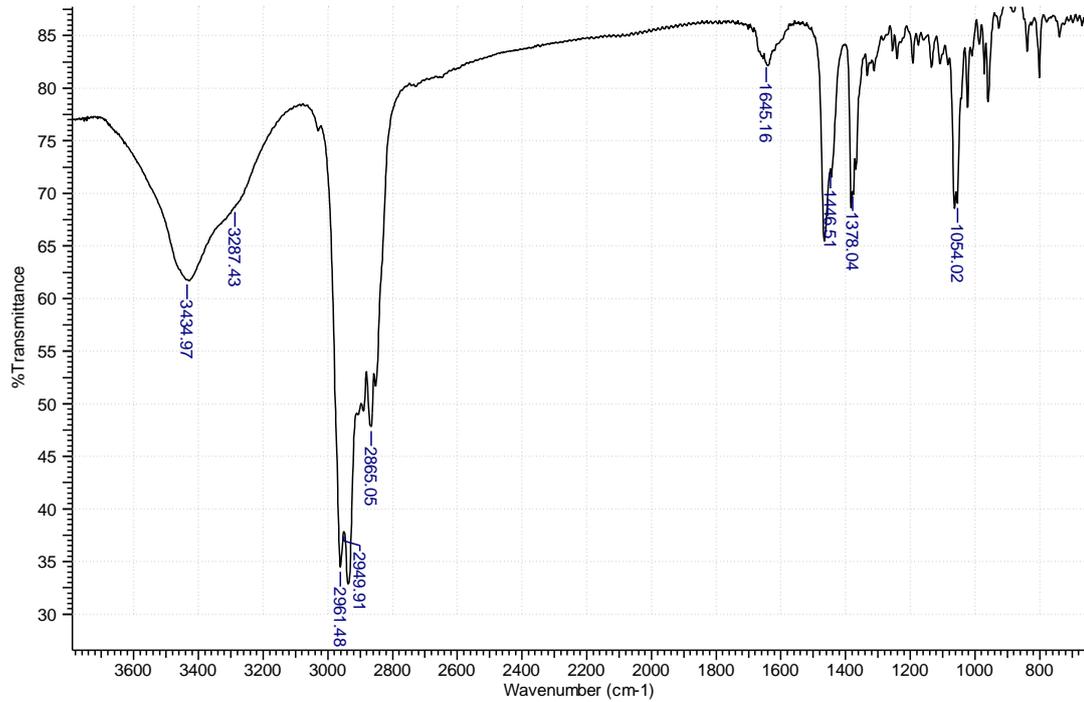
## ANEXO 2. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do Composto C-1



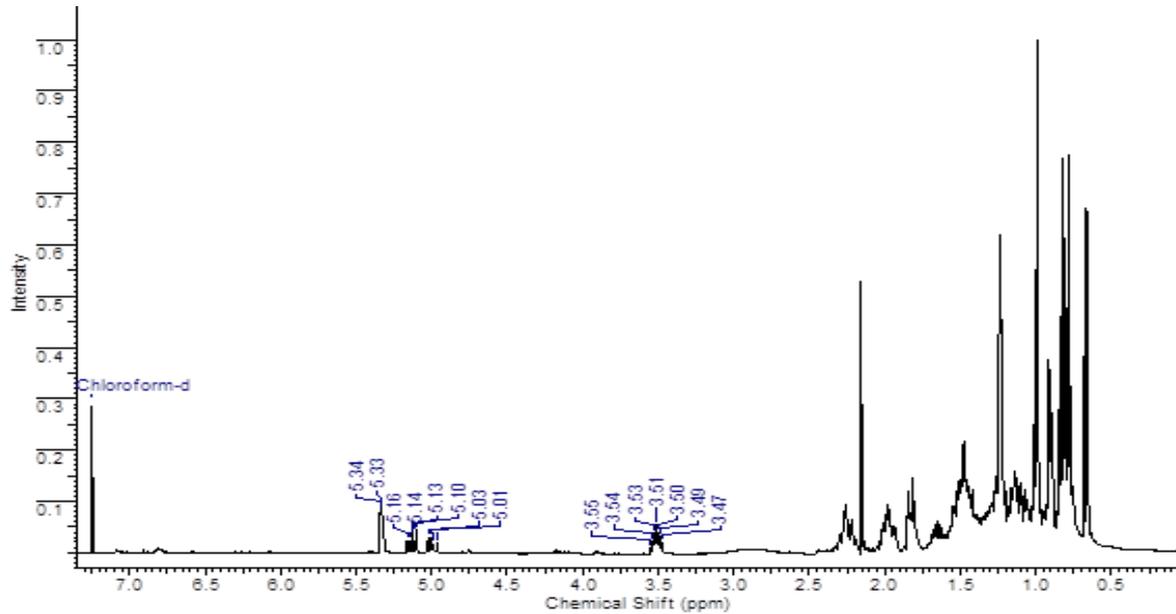
### ANEXO 3. Espectro de APT (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do Composto C-1



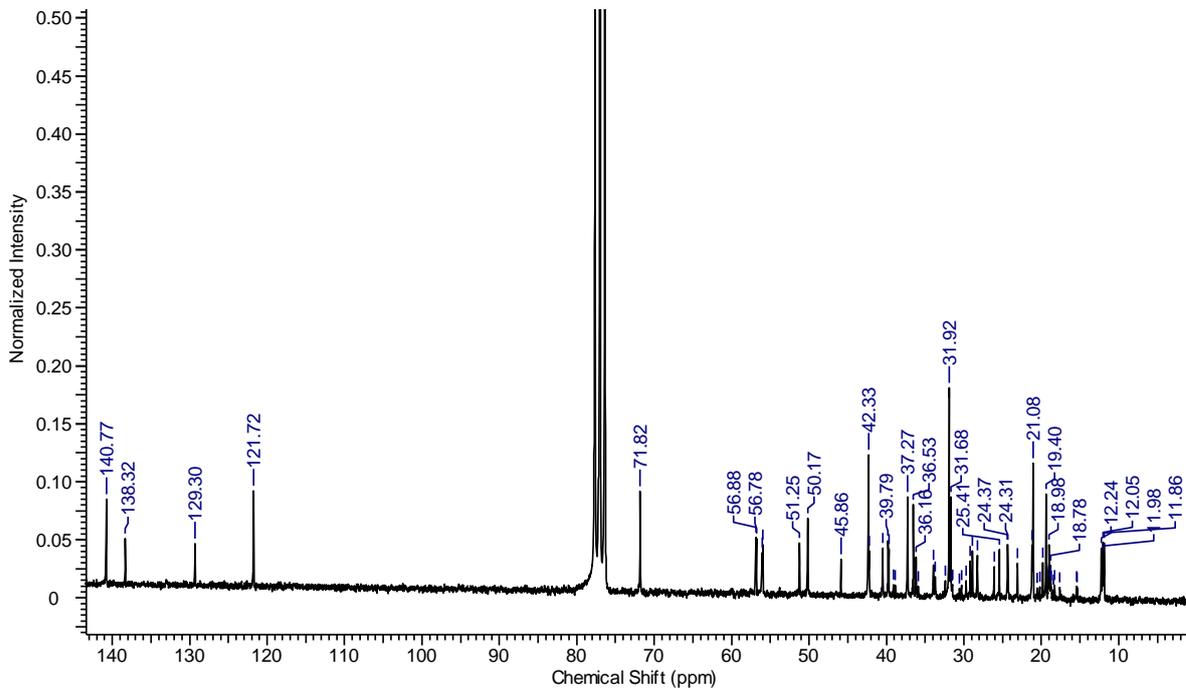
#### ANEXO 4. Espectro de IV (KBr) da mistura de composto M-1



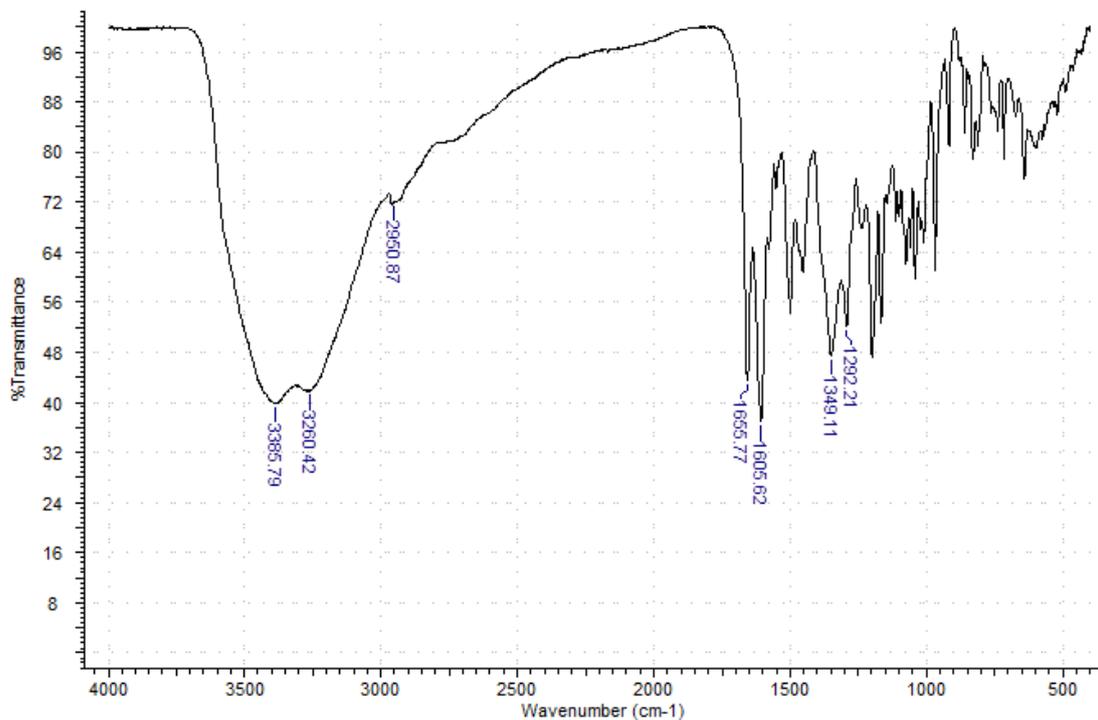
**ANEXO 5. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de compostos M-1**



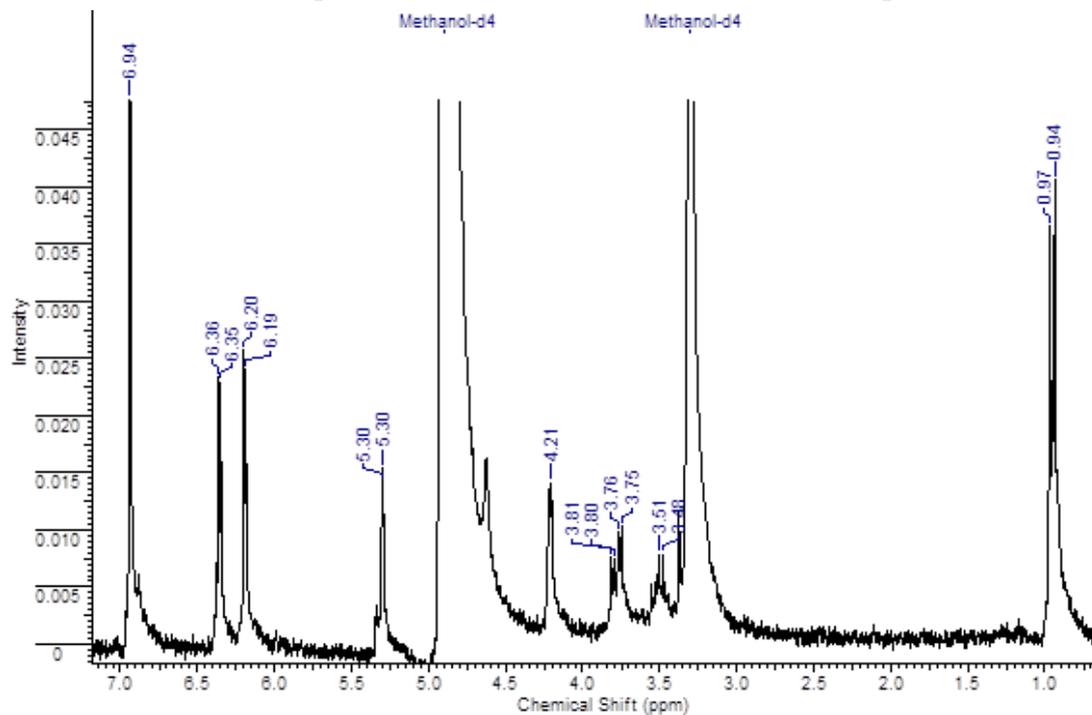
**ANEXO 6. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de compostos M-1**



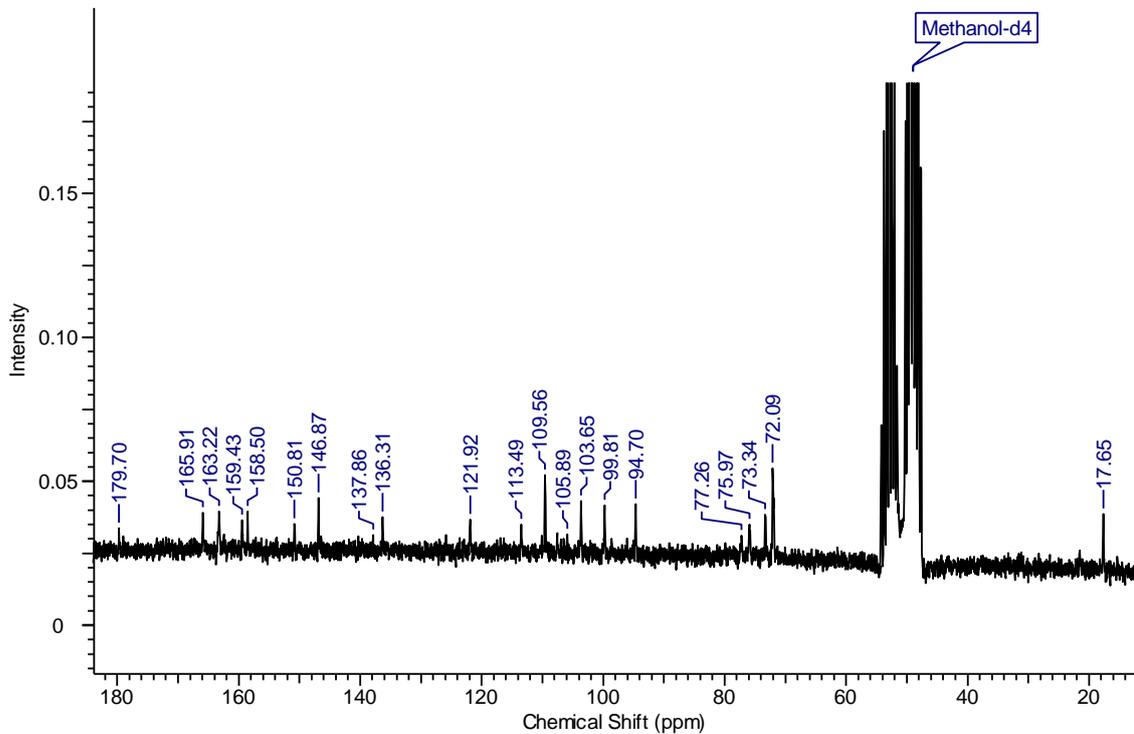
### ANEXO 7. Espectro de IV (KBr) do Composto C-4



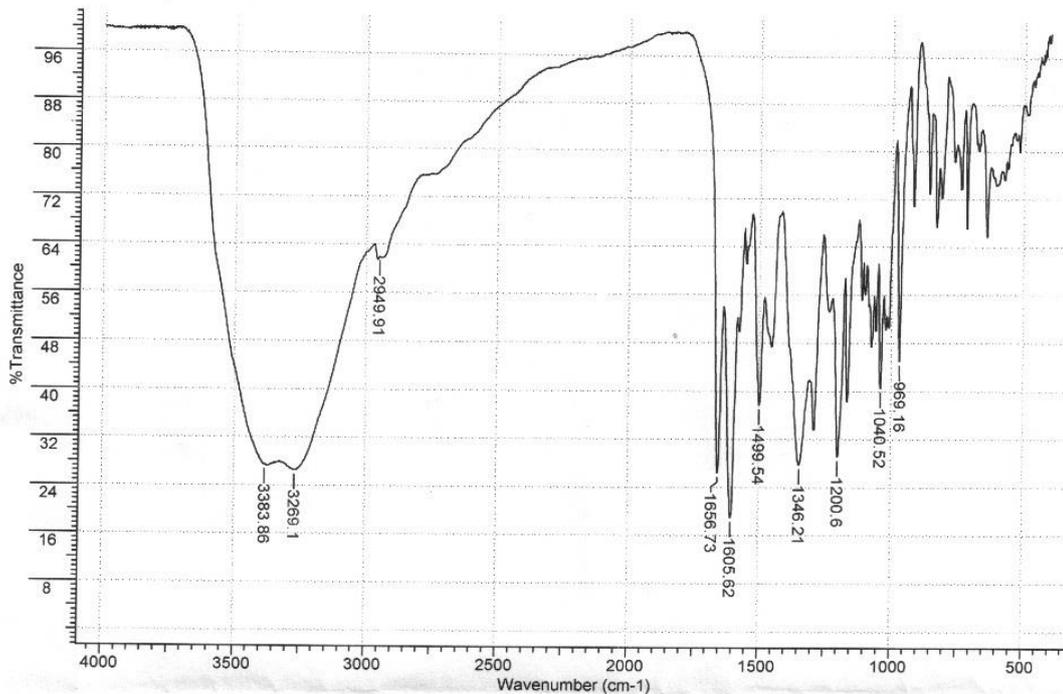
ANEXO 8. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do Composto C-4



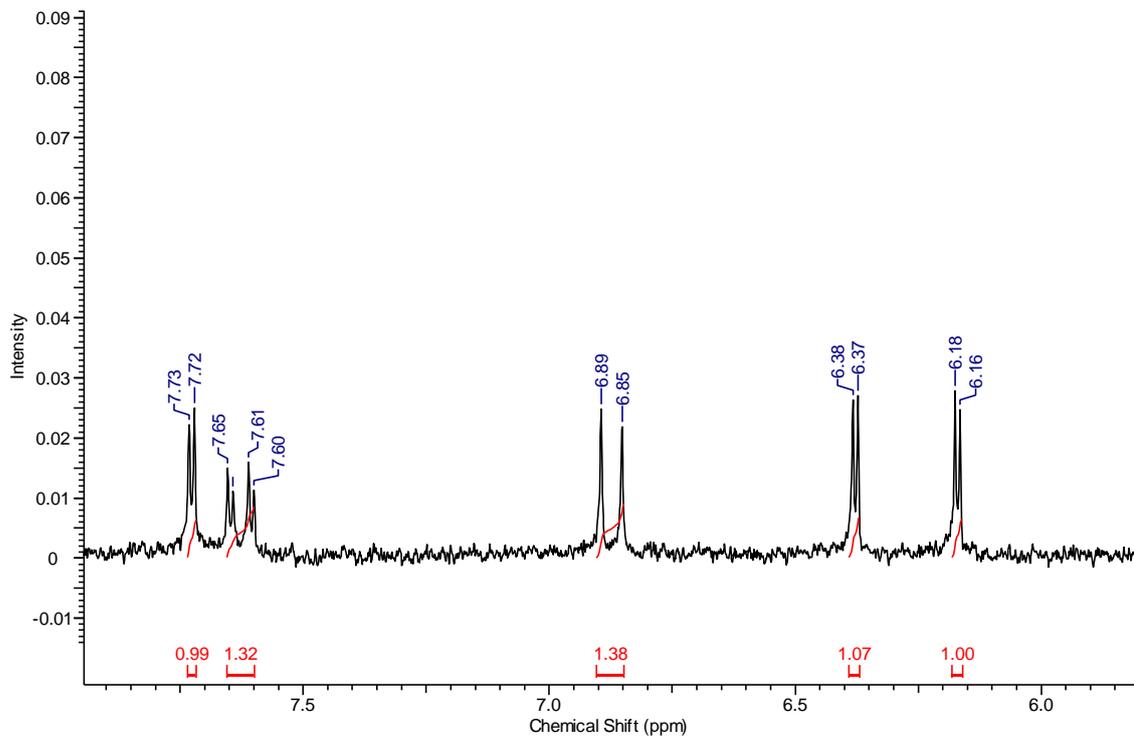
ANEXO 9. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do Composto C-4



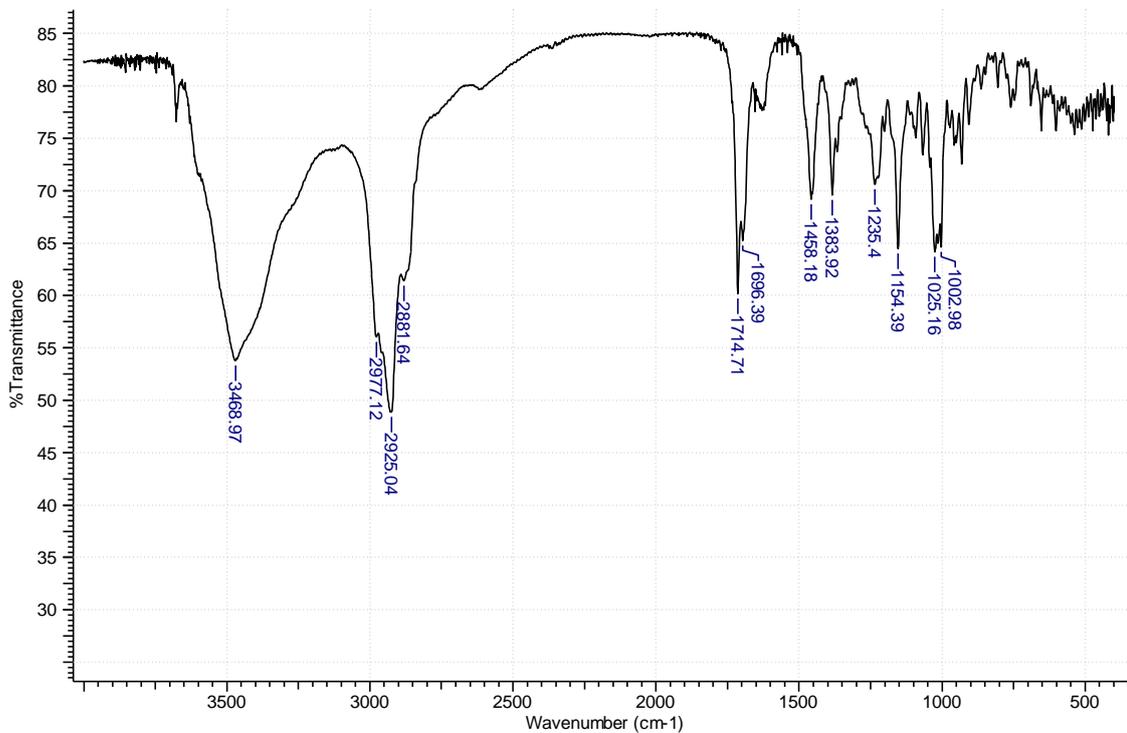
### ANEXO 10. Espectro de IV (KBr) do Composto C-5



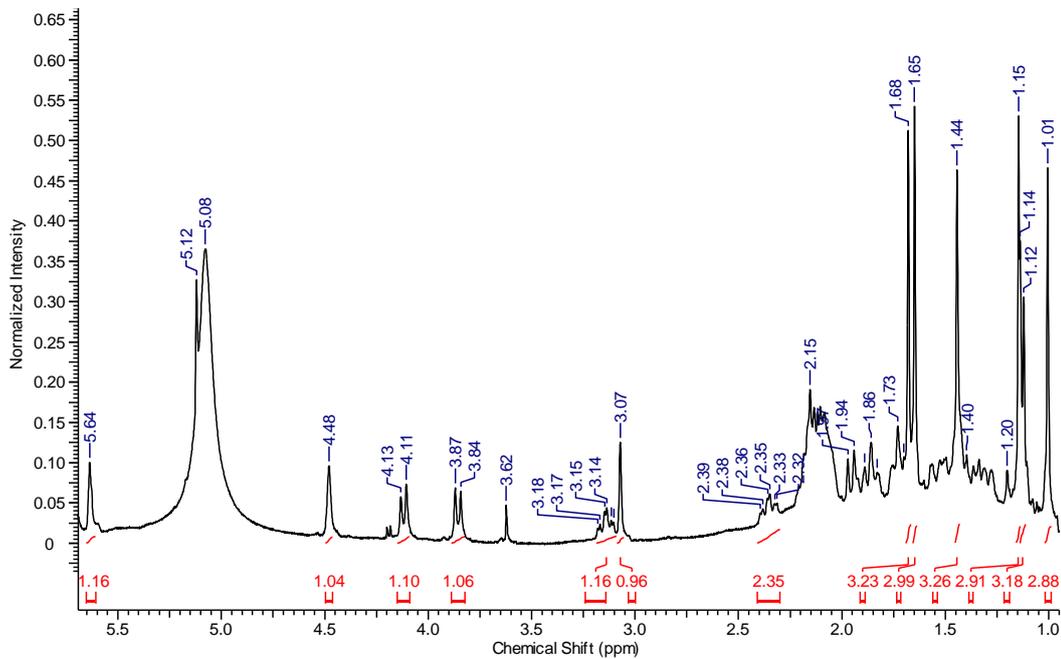
**ANEXO 11. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do Composto C-5**



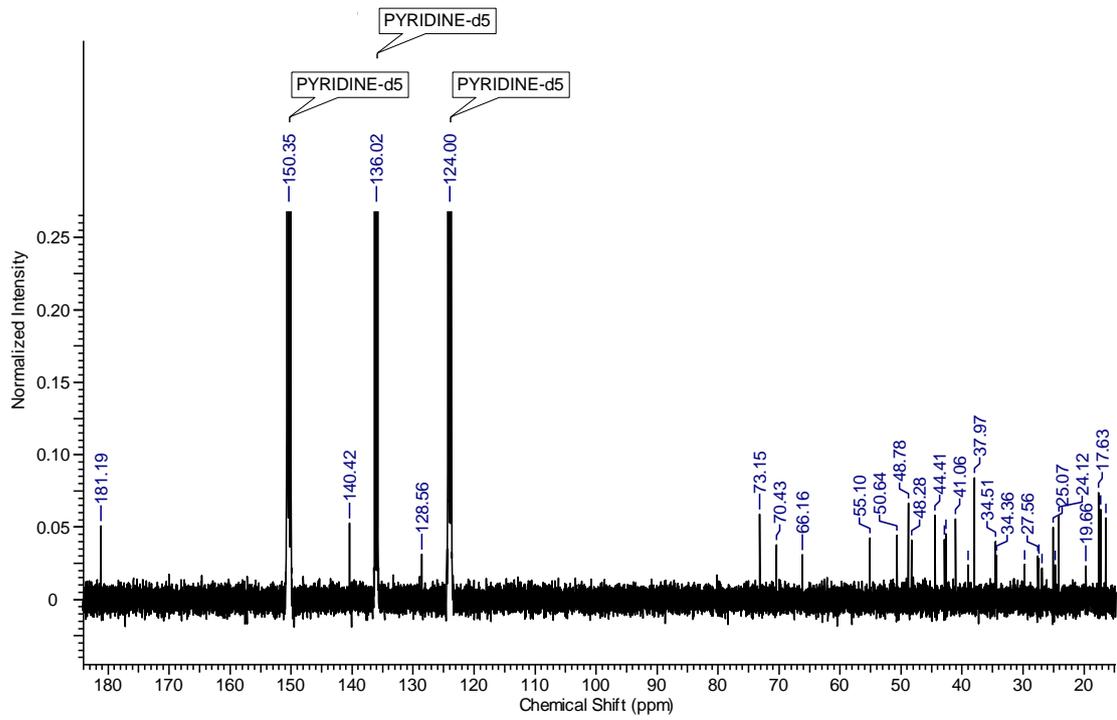
### ANEXO 12. Espectro de IV (KBr) do Composto C-6



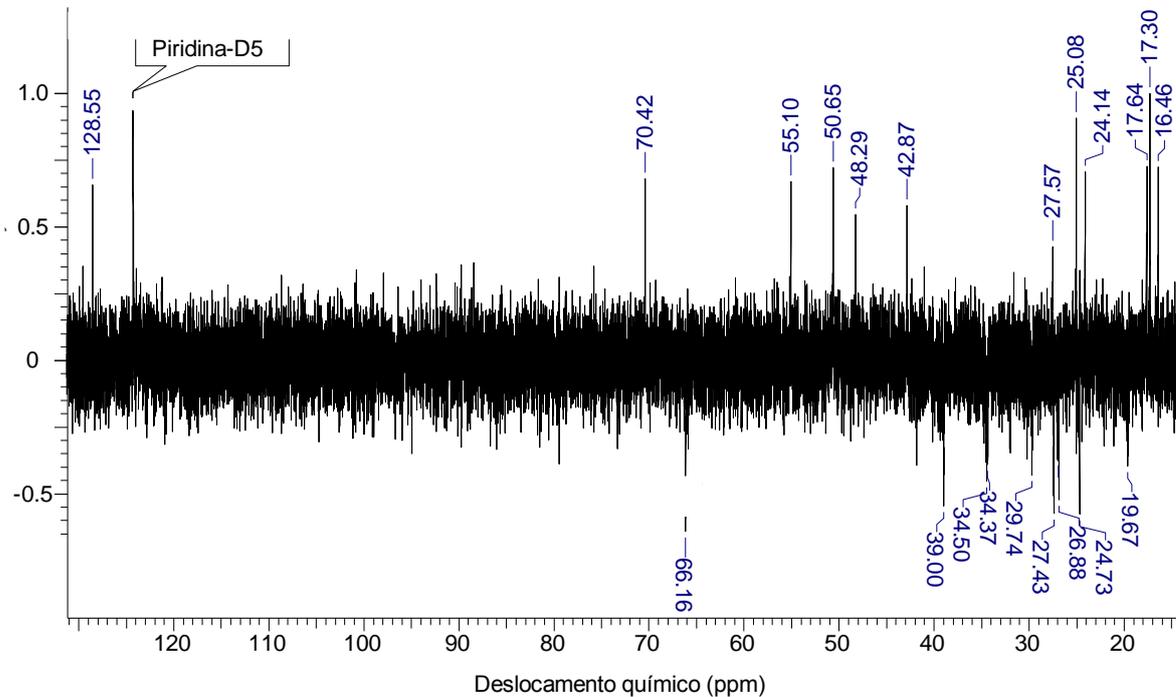
### ANEXO 13. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, Py) do Composto C-6



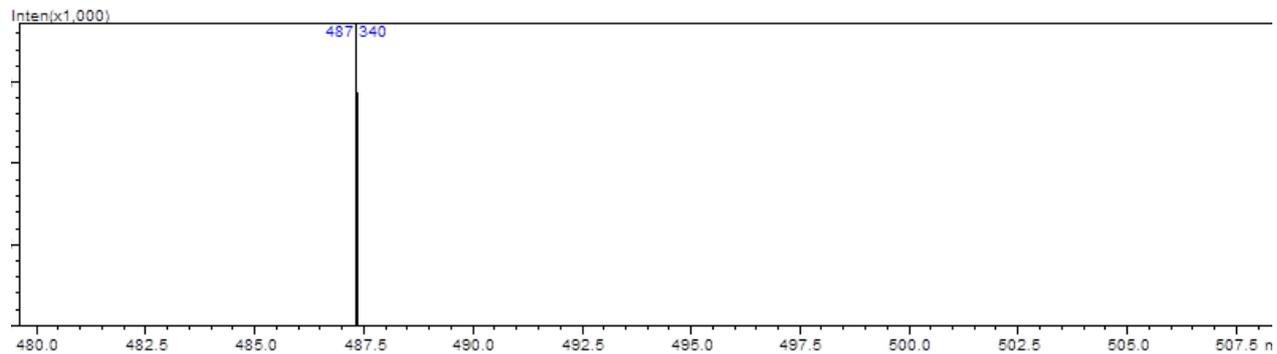
# ANEXO 14. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, Py) do Composto C-6



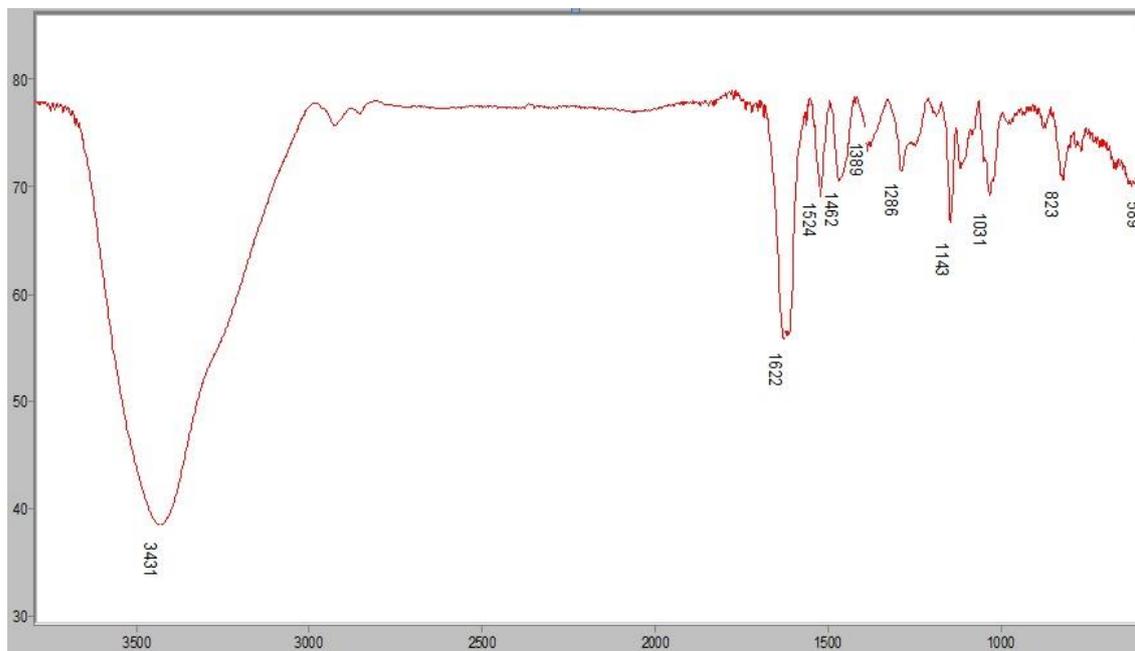
### ANEXO 15. Espectro de DEPT135 (Py) do Composto C-6



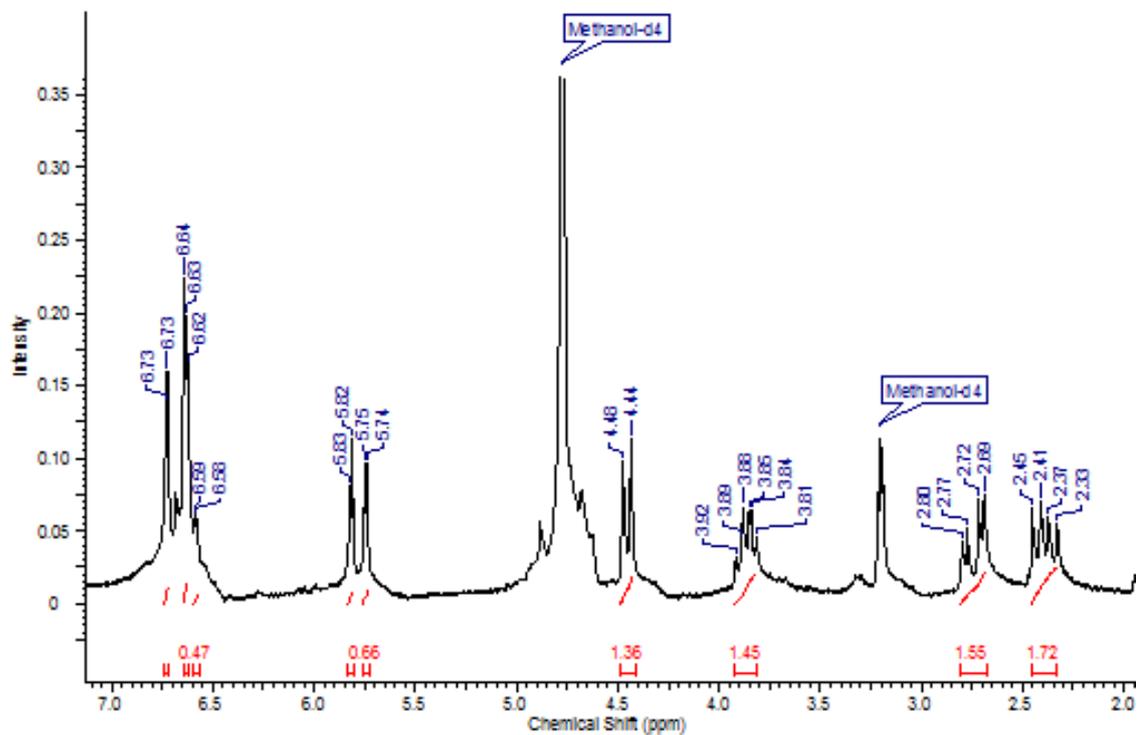
## ANEXO 16. Espectro de alta resolução ESI-EM(-) do Composto C-6



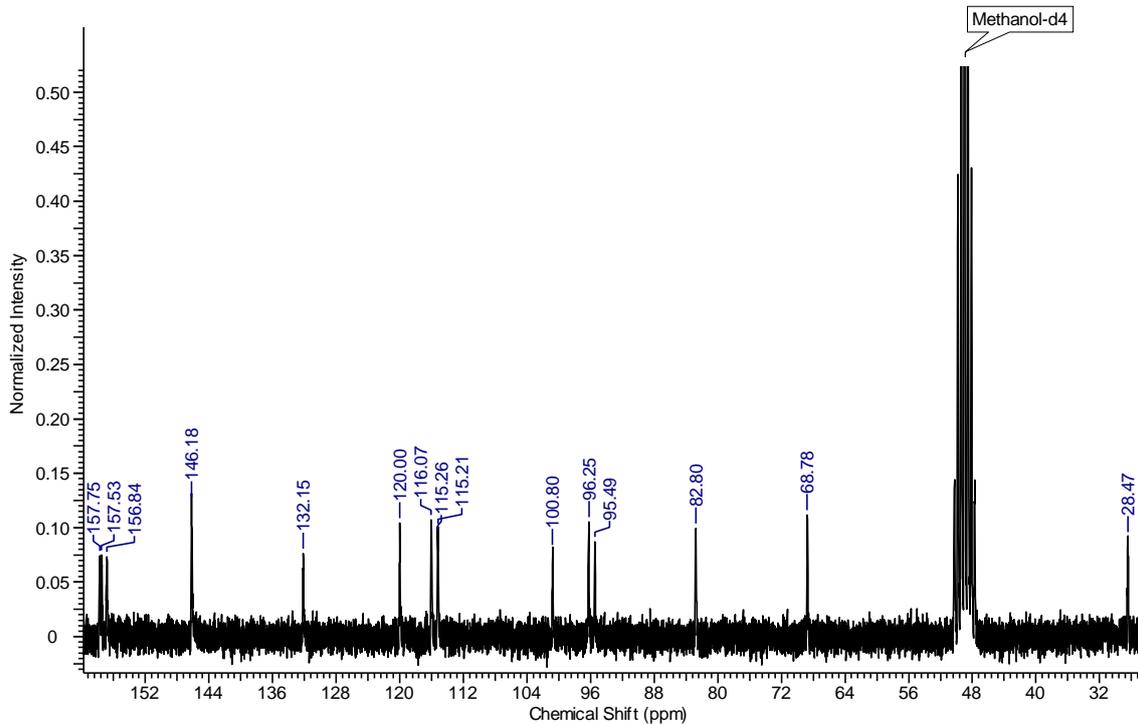
### ANEXO 17. Espectro de IV (KBr) do Composto C-7



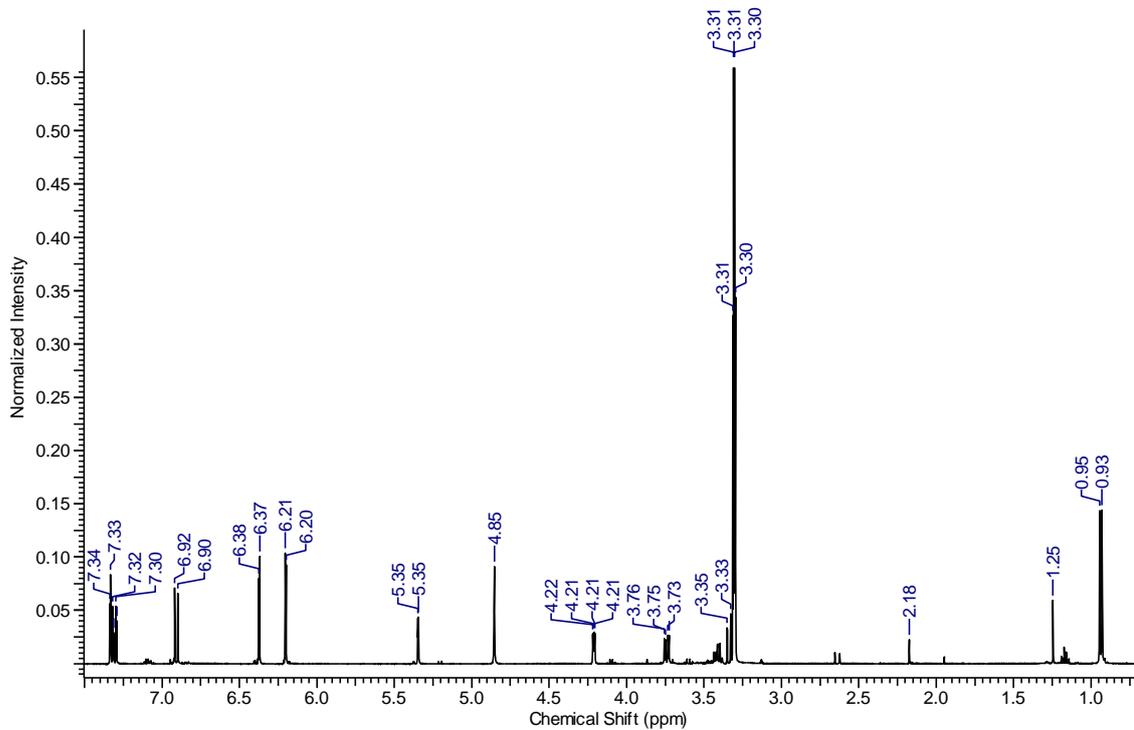
ANEXO 18. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do Composto C-7



ANEXO 19. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do Composto C-7



ANEXO 20. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do Composto C-8



ANEXO 21. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da mistura M-2

