

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE *Eugenia  
hiemalis* Cambessèdes (MYRTACEAE)**

Gabriele Andressa Zatelli

Florianópolis  
2015



Gabriele Andressa Zatelli

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE *Eugenia  
hiemalis* Cambessèdes (MYRTACEAE)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Miriam de Barcellos Falkenberg.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michele Debiasi Alberton.

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zatelli, Gabriele Andressa

Investigação fitoquímica e biológica de *Eugenia hiemalis* Cambessèdes (Myrtaceae) / Gabriele Andressa Zatelli ; orientador, Miriam de Barcellos Falkenberg ; coorientador, Michele Debiasi Alberton. - Florianópolis, SC, 2015.  
217 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Eugenia hiemalis*. 3. Quinonas. 4. Óleos essenciais. 5. Atividade antibacteriana, anticolinesterásica e antioxidante. I. Falkenberg, Miriam de Barcellos. II. Alberton, Michele Debiasi . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

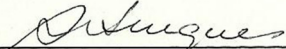
**“Investigação fitoquímica e biológica de Eugenia  
hiemalis Cambessèdes (Myrtaceae)”**

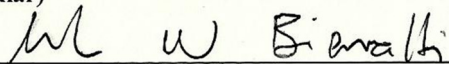
**POR**


**Gabriele Andressa Zatelli**

**Dissertação julgada e aprovada em  
sua forma final pelo(a)  
Orientador(a) e membros da  
Banca Examinadora, composta  
pelos Professores Doutores:**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Amelia Teresinha Henriques (UFRGS – Membro  
Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Maique Weber Biavatti (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Thaís Cristine Marques Sincero (UFSC - Membro  
Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Miriam de Barcellios Falkenberg (UFSC –  
Orientador(a))

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC

**Florianópolis, 19 de março de 2015.**



Dedico este trabalho à minha família e amigos.





## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho:

- A Deus, pelo seu imenso amor e graça;
- À minha família, por todo o suporte e incentivo;
- À minha orientadora, Miriam de Barcellos Falkenberg, por toda a atenção, conhecimento repassado, críticas construtivas, e apoio durante toda esta jornada;
- À minha coorientadora, Michele Debiasi Alberton, por todo o apoio e incentivo desde minha inserção na área de pesquisa durante a graduação até o mestrado;
- Aos professores e técnicos que contribuíram para a realização de análises: Caio Maurício Mendes de Cordova, Edésio Luiz Simionatto, Dilamara Riva Scharf (FURB), Vassilios Roussis, Efstathia Iaammou (Universidade de Atenas), Rosângela de Almeida Epifânio (*in memoriam*) e Alessandra Leda Valverde (UFF);
- Aos professores Dr. Daniel Falkenberg e Dr. Marcos Eduardo Guerra Sobral, pelas informações botânicas e identificação da espécie avaliada neste trabalho;
- Aos professores do laboratório de Química Farmacêutica e do GEPRONAS;
- Aos participantes dos grupos de pesquisa da FURB e da UFSC que colaboraram diretamente neste trabalho: Priscila Zimath, Lucas Felipe Oliveira Vieira, Rafael Mafetoni, Adrielli Tenfen, Ana Cláudia Philippus e Tauana Wanke;
- Aos demais colegas de laboratório, pelos momentos compartilhados e troca de experiências: Ana Luísa, Ana Vieira, Diogo, Fabiana, Lara, Larissa, Layzon, Luise, Luiz, Maria Isabel, Narjara, Rafaela, Tamires, Simone, Solomon, Tatiana, Teca e Vanessa.
- À coordenação, professores e servidor do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC, por todo o suporte oferecido em minha formação;
- A CAPES, pelo apoio financeiro.



*A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada.*

**Albert Einstein**



## RESUMO

Produtos naturais são de grande interesse científico, especialmente farmacêutico. Espécies do gênero *Eugenia* apresentam importantes atividades biológicas, mas para *E. hiemalis* há poucos estudos na literatura. A busca de novos fármacos para doenças neurodegenerativas e outras decorrentes do estresse oxidativo, e a resistência a antibióticos constituem desafios contemporâneos. Neste trabalho foram investigadas partes aéreas de *E. hiemalis* (Itapuã, RS) num estudo bioguiado pelas atividades anticolinesterásica, antibacteriana (molicutes) e antioxidante, e analisou-se a composição química e atividade biológica do óleo essencial das folhas (Blumenau, SC). Extratos e frações foram fracionados em colunas monitoradas por cromatografia em camada delgada. Substâncias isoladas foram analisadas por métodos espectroscópicos. Os óleos das folhas foram extraídos em aparelho de Clevenger nas quatro estações do ano e analisados por cromatografia gasosa. As atividades biológicas foram avaliadas por grupos parceiros. Os extratos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> apresentaram os melhores resultados de atividade anticolinesterásica e antibacteriana. Do extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> das folhas foram isolados GE1 (acetato de miconidina), GE2 (primina), GE6, GE8 (benzoquinonas inéditas na literatura), GE1, GE2, GE9 (metil-oliveto) e outro composto foram isoladas do extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dos botões florais. GE1 e GE2 apresentaram atividade antibacteriana e GE2 apresentou também atividade anticolinesterásica. Do extrato MeOH das folhas (melhor atividade antioxidante) foram isolados 11 compostos, um deles identificado como quercitrina (GE14). Nos óleos essenciais foram identificados 42 componentes, sendo majoritários espatulenol, biclogermacreno, δ-cadineno e β-cariofileno. O teor de compostos não funcionalizados aumentou nas estações mais quentes. Os óleos apresentaram baixa atividade nos modelos testados. Quinonas não foram encontradas em outras espécies de Myrtaceae, configurando um perfil químico diferenciado para *E. hiemalis*. Os resultados obtidos, principalmente com relação às atividades antibacteriana e anticolinesterásica, indicam interessante potencial para o seguimento das investigações com esta espécie, inclusive em outros modelos, e para estudos *in silico* com primina e acetato de miconidina.

**Palavras-chave:** *Eugenia hiemalis*. Quinonas. Óleos essenciais. Antioxidante. Anticolinesterásica. Molicutes.



## ABSTRACT

ZATELLI, G. A. **Phytochemical and biological investigation of *Eugenia hiemalis* Cambessèdes (Myrtaceae)**. 2015. 218p. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

Natural products are a very important subject for scientific research area. *Eugenia* species have interesting biological activities, but there are few studies for *E. hiemalis*. Neurodegenerative diseases, as well as other diseases resulting from oxidative stress and antibiotic resistance are challenges in the search for new drugs. This study aimed to investigate the aerial parts of *E. hiemalis* (Itapuã, RS) in a bioguided study by anticholinesterase, antibacterial (mollicutes) and antioxidant activities, as well as to analyze chemical composition and biological activity of its essential oil (Blumenau, SC). Chromatographic fractionation was performed in columns monitored by thin layer chromatography. Isolated compounds were analyzed by spectroscopic methods. The four season's oils were extracted in Clevenger apparatus and analyzed by gas chromatography. Biological activities were evaluated by partner groups. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extracts showed the best results for anticholinesterase and antibacterial activity. GE1 (miconidin acetate), GE2 (primin), GE6 and GE8 (unpublished benzoquinones in the literature) were isolated from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> leaves extract. GE1, GE2 and GE9 (methylolivetol) were isolated from the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> flower buds extract, along with other compound. GE1 and GE2 showed antibacterial activity and GE2 presented also anticholinesterase activity. From the MeOH leaves extract (better antioxidant activity) 11 compounds were isolated and one of them identified as quercitrin (GE14). From the essential oils 42 components were identified; the major compounds were spathulenol, bicyclogermacrene, δ-cadinene and β-caryophyllene. The content of non-functionalized compounds increased in the warmer seasons. The oils showed low activity in the tested models. Quinones were not reported for other Myrtaceae species, so these date set a different chemical profile for *E. hiemalis*. The results, particularly with respect to antibacterial and acetylcholinesterase activities, indicate good potential for follow-up investigations with this species, including other models, and *in silico* studies with primin and acetate miconidin.

**Keywords:** *Eugenia hiemalis*. Quinones. Essential oils. Antioxidant. Anticholinesterase. Mollicutes.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de formação dos compostos terpênicos pela via do mevalonato-acetato (A) e via independente de mevalonato (B).....	33
Figura 2. Estruturas de algumas das substâncias previamente isoladas de extratos e frações do gênero <i>Eugenia</i> (Quadro 1). .....	42
Figura 3. Aspecto das folhas (A e B), frutos (C), flores e botões florais (D) de <i>E. hiemalis</i> .....	59
Figura 4. Substâncias previamente isoladas de extratos de <i>E. hiemalis</i> .....	61
Figura 5. Atividade catalítica da enzima acetilcolinesterase (AChE). ..	63
Figura 6. Fármacos aprovados e em fase de testes para o tratamento da doença de Alzheimer. ....	64
Figura 7. Locais das coletas de <i>E. hiemalis</i> para os procedimentos de avaliação bioguiada (1) e obtenção do óleo essencial (2). .....	72
Figura 8. Procedimentos adotados na obtenção dos extratos brutos e fracionamento bioguiado das partes aéreas de <i>E. hiemalis</i> . .....	75
Figura 9. Reação do reagente de Ellman (DTNB <sup>2-</sup> na forma iônica) com a tiocolina. ....	84
Figura 10. Procedimentos adotados no fracionamento do extrato bruto diclorometânico das folhas de <i>E. hiemalis</i> (EDF – alíquota 1). .....	86
Figura 11. Procedimentos adotados no fracionamento do extrato bruto diclorometânico dos botões florais de <i>E. hiemalis</i> (EDB).....	87
Figura 12. Estruturas de quinonas e hidroquinonas com atividade anticolinesterásica. ....	90
Figura 13. Complexo formado entre o flavonoide quercetina e o reagente AlCl <sub>3</sub> . ....	97
Figura 14. Equação básica da reação do radical livre DPPH com um substrato (RH). ....	99
Figura 15. Perfil de inibição contra a peroxidação lipídica dos extratos brutos das partes aéreas de <i>E. hiemalis</i> . .....	103
Figura 16. Procedimentos adotados no fracionamento da fração D-9 do extrato EMF de <i>E. hiemalis</i> .....	106

Figura 17. Procedimentos adotados no fracionamento da fração D-12 do extrato EMF de <i>E. hiemalis</i> .....	108
Figura 18. Procedimentos adotados no fracionamento da fração D-4 do extrato EMF de <i>E. hiemalis</i> .....	109
Figura 19. Reação da <i>p</i> -benzoquinona com o cianoacetato de etila.....	111
Figura 20. Procedimentos adotados no fracionamento do extrato bruto diclorometânico das folhas de <i>E. hiemalis</i> (EDF – alíquota 2) guiado pela utilização do reagente de Craven.....	112
Figura 21. Procedimentos adotados no fracionamento do extrato bruto diclorometânico das folhas de <i>E. hiemalis</i> (EDF – alíquota 1 e 2) independente dos testes biológicos. ....	113
Figura 22. Procedimentos adotados no fracionamento do extrato bruto metanólico das folhas de <i>E. hiemalis</i> (EMF) independente dos testes biológicos.....	114
Figura 23. Correlações verificadas no mapa COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H entre os sinais de hidrogênios pertencentes à cadeia lateral. ....	116
Figura 24. Estrutura da substância GE1 (acetato de miconidina). ....	117
Figura 25. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de GE1.....	118
Figura 26. Espectro ampliado de RMN <sup>1</sup> H (região 2,45 a 0,8 ppm) de GE1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	118
Figura 27. Estrutura da substância GE2 (primina).....	121
Figura 28. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de GE2.....	122
Figura 29. Espectro ampliado de RMN <sup>1</sup> H (região 2,45 a 0,8 ppm) de GE2 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	122
Figura 30. Estrutura proposta para a substância GE6 (5-acetóxi-primina).....	126
Figura 31. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de GE6.....	127
Figura 32. Espectro ampliado de RMN <sup>1</sup> H (região 2,5 a 0,8 ppm) de GE6 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	127
Figura 33. Estrutura proposta para a substância GE8 (hiemaloquinona). ....	129
Figura 34. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de GE8.....	130

Figura 35. Espectro ampliado de RMN <sup>1</sup> H de GE8 (região 2,5 a 0,8 ppm) (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	130
Figura 36. Estrutura proposta para a substância GE9 (metil-olivetol). 132	
Figura 37. Estruturas parciais da substância GE14 propostas com base nos dados obtidos nos testes com os reagentes de deslocamento para flavonas e flavonóis.....	135
Figura 38. Estrutura proposta para a substância GE14 (quercitrina)...	136
Figura 39. Espectros de UV-Vis da substância GE14 no teste com os reativos de deslocamento. ....	136
Figura 40. Estruturas de compostos presentes nos óleos essenciais das folhas de <i>E. hiemalis</i> . ....	145
Figura 41. Fluxograma geral dos fracionamentos cromatográficos realizados com os extratos de <i>E. hiemalis</i> . ....	216



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Substâncias previamente isoladas de espécies do gênero <i>Eugenia</i> . .....	36
Quadro 2. Atividades biológicas testadas para extratos/frações de espécies do gênero <i>Eugenia</i> . .....	45
Quadro 3. Atividades biológicas testadas para óleos essenciais de espécies do gênero <i>Eugenia</i> . .....	53



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimentos dos extratos brutos de <i>E. hiemalis</i> . .....	83
Tabela 2. Resultados* da avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos, frações e compostos isolados de <i>E. hiemalis</i> . .....	85
Tabela 3. Resultados* da avaliação da atividade antibacteriana dos extratos, frações e compostos isolados de <i>E. hiemalis</i> . .....	92
Tabela 4. Resultados* da avaliação da atividade antioxidante dos extratos, frações e compostos isolados de <i>E. hiemalis</i> . .....	102
Tabela 5. Compostos isolados dos extratos de <i>E. hiemalis</i> . .....	115
Tabela 6. Dados espectrais de RMN da substância GE1 obtidos no presente trabalho e em comparação com a literatura para acetato de miconidina. ....	119
Tabela 7. Dados espectrais de RMN <sup>1</sup> H da substância GE2 obtidos neste trabalho e em comparação com a literatura para primina. ....	123
Tabela 8. Dados espectrais de RMN <sup>1</sup> H da substância GE6 obtidos neste trabalho e em comparação com a literatura para 5-acetóxi-primina....	128
Tabela 9. Dados espectrais de RMN <sup>1</sup> H da substância GE8 obtidos neste trabalho e em comparação com a literatura para a hiemaloquinona....	131
Tabela 10. Dados espectrais de RMN <sup>1</sup> H da substância GE9 obtidos neste trabalho e em comparação com a literatura para metil-olivetol. ....	133
Tabela 11. Comparação dos $\lambda_{\text{máx}}$ nos espectros de UV/Vis com reagentes de deslocamento: GE14 e quercitrina (QR) <sup>1</sup> . ....	137
Tabela 12. Compostos identificados (%) nos óleos essenciais de <i>E. hiemalis</i> coletados nas quatro estações do ano. ....	139
Tabela 13. Condições climáticas em Blumenau registradas nos períodos das coletas. ....	141
Tabela 14. Resultados* da avaliação da atividade antioxidante e anticolinesterásica dos óleos essenciais das folhas de <i>E. hiemalis</i> . ....	147
Tabela 15. Resultados* da avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas de <i>E. hiemalis</i> . ....	149





## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS, UNIDADES E FÓRMULAS

$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\delta_{\text{C}}$	Deslocamento químico em ppm no espectro de RMN $^{13}\text{C}$
$\delta_{\text{H}}$	Deslocamento químico em ppm no espectro de RMN $^1\text{H}$
$\lambda_{\text{máx.}}$	Comprimento de onda de absorção máxima
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu\text{M}$	Micromolar
<b>5-LOX</b>	5-lipoxigenase
<b>AA</b>	Ácido ascórbico
<b>AA %</b>	Atividade antioxidante em porcentagem
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>AcOEt</b>	Acetato de etila
<b>AG</b>	Ácido gálico
<b>AIDS</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida ( <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> )
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	Cloreto de alumínio
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATP</b>	Trifostato de adenosina ( <i>Adenosine triphosphate</i> )
<b>BHT</b>	Butil-hidroxi-tolueno
<b>BuChE</b>	Butirilcolinesterase
<b>CC<sub>50</sub></b>	Concentração citotóxica 50 %
<b>CCA</b>	Cromatografia em coluna aberta
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio deuterado
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentração efetiva 50 %
<b>CG-DIC</b>	Cromatografia gasosa – Detector de ionização em chama
<b>CG-EM</b>	Cromatografia gasosa - Espectrometria de massas
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória 50 %
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentração letal 50 %
<b>CLMP</b>	Cromatografia líquida de média pressão
<b>CLV</b>	Cromatografia líquida a vácuo
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico
<b>COSY</b>	Espectro de correlação ( <i>Correlated spectroscopy</i> )

<b>COX-1</b>	Cicloxygenase-1
<b>COX-2</b>	Cicloxygenase-2
<b>d</b>	Duplete
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>dd</b>	Duplo duplete
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-picril-hidrazila
<b>DST</b>	Doenças sexualmente transmissíveis
<b>dt</b>	Duplo tripete
<b>DTNB</b>	Ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico
<b>EDB</b>	Extrato diclorometânico dos botões florais
<b>EDF</b>	Extrato diclorometânico das folhas
<b>EDG</b>	Extrato diclorometânico dos galhos
<b>EDTA</b>	Ácido etileno-diamino-tetra-acético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>EMB</b>	Extrato metanólico dos botões florais
<b>EMF</b>	Extrato metanólico das folhas
<b>EMG</b>	Extrato metanólico dos galhos
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>eV</b>	Elétron-volt
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Cloreto férrico
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>HMBC</b>	Correlação heteronuclear através de múltiplas ligações ( <i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> )
<b>HSQC</b>	Correlação heteronuclear de quantum-simples ( <i>Heteronuclear single quantum correlation</i> )
<b>Hx</b>	Hexano
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>IR</b>	Índice de retenção
<b>J</b>	Constante de acoplamento
<b>KBr</b>	Brometo de potássio
<b>KG-1a</b>	Linhagem celular de leucemia mieloide aguda
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade ( <i>Low-density lipoprotein</i> )
<b>M</b>	Mol
<b>m</b>	Multipete

<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MHz</b>	Mega-Hertz
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Mult.</b>	Multiplicidade
<b>NaOAc</b>	Acetato de sódio
<b>NaOMe</b>	Metóxido de sódio
<b>NCTC</b>	<i>National Collection of Type Cultures</i>
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NMDA</b>	Receptor de N-metil-D-Aspartato
<b>NOE</b>	Efeito nuclear de Overhauser ( <i>Nuclear Overhauser effect</i> )
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>QUE</b>	Quercetina
<b>Rf</b>	Fator de retenção ( <i>Retardation factor</i> )
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>RNase H</b>	Ribonuclease H
<b>s</b>	Simpleto
<b>sh</b>	Ombro ( <i>Shoulder</i> )
<b>sl</b>	Simpleto largo
<b>t</b>	Tripleto
<b>tr</b>	Traços
<b>td</b>	Triplo duplete
<b>U</b>	Unidades
<b>UV/Vis</b>	Ultravioleta-visível



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>29</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	29
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
<b>1.2.1 Produtos naturais e o metabolismo vegetal.....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.2 Óleos essenciais.....</b>	<b>32</b>
<b>1.2.3 A família Myrtaceae e o gênero <i>Eugenia</i>.....</b>	<b>34</b>
1.2.3.1 A espécie <i>Eugenia hiemalis</i> Cambessèdes .....	58
<b>1.2.4 Doença de Alzheimer e atividade anticolinesterásica.....</b>	<b>62</b>
<b>1.2.5 Molicutes .....</b>	<b>64</b>
<b>1.2.6 Radicais livres e atividade antioxidante .....</b>	<b>66</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>69</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	69
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	69
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>
3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	71
<b>3.1.1 Material vegetal.....</b>	<b>71</b>
<b>3.1.2 Solventes, adsorventes e reagentes.....</b>	<b>72</b>
<b>3.1.3 Equipamentos .....</b>	<b>73</b>
3.2 MÉTODOS .....	73
<b>3.2.1 Obtenção dos extratos e seleção de frações para avaliação de atividades biológicas.....</b>	<b>73</b>
<b>3.2.2 Procedimentos de fracionamento.....</b>	<b>74</b>
<b>3.2.3 Análise espectroscópicas no UV/Vis com reagentes de deslocamento.....</b>	<b>75</b>
<b>3.2.4 Análise colorimétrica em CCD com reagente de Craven.....</b>	<b>76</b>
<b>3.2.4 Avaliação das atividades biológicas .....</b>	<b>76</b>
3.2.4.1 Avaliação da atividade anticolinesterásica.....	76
3.2.4.2 Avaliação da atividade antibacteriana.....	77
3.2.4.3 Ensaios de avaliação da atividade antioxidante.....	78
3.2.4.3.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais.....	78
3.2.4.3.2 Determinação do conteúdo de flavonoides.....	79
3.2.4.3.3 Determinação do potencial redutor .....	79
3.2.4.3.4 Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH .	80
3.2.4.3.5 Determinação do potencial inibidor da peroxidação lipídica .	80
<b>3.2.5 Análise sazonal dos óleos essenciais .....</b>	<b>81</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
4.1 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS .....	83
4.2 ESTUDO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA .....	83

<b>4.2.1 Fracionamento do extrato EDF</b> .....	<b>85</b>
<b>4.2.2 Fracionamento do extrato EDB</b> .....	<b>87</b>
<b>4.2.3 Considerações sobre o fracionamento bioguiado pela atividade anticolinesterásica</b> .....	<b>88</b>
<b>4.3 ESTUDO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA</b> .....	<b>91</b>
<b>4.3.1 Fracionamento do extrato EDF</b> .....	<b>92</b>
<b>4.3.2 Fracionamento do extrato EDB</b> .....	<b>93</b>
<b>4.3.3 Considerações sobre o fracionamento bioguiado pela atividade antibacteriana</b> .....	<b>93</b>
<b>4.4 ESTUDO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b>	<b>94</b>
<b>4.3.5 Fracionamento do extrato EMF</b> .....	<b>103</b>
4.3.5.1 Fracionamento de D-9.....	105
4.3.5.2 Fracionamento de D-12.....	107
4.3.5.3 Fracionamento de D-4.....	108
<b>4.3.6 Considerações sobre o fracionamento bioaguido pela atividade antioxidante</b> .....	<b>109</b>
<b>4.5 FRACIONAMENTO GUIADO PELO REAGENTE DE CRAVEN</b> .....	<b>110</b>
<b>4.6 OUTROS FRACIONAMENTOS CROMATOGRÁFICOS</b> .....	<b>112</b>
<b>4.7 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS</b> .....	<b>114</b>
<b>4.7.1 Substância GE1</b> .....	<b>115</b>
<b>4.7.2 Substância GE2</b> .....	<b>120</b>
<b>4.7.3 Substância GE6</b> .....	<b>125</b>
<b>4.7.3 Substância GE8</b> .....	<b>128</b>
<b>4.7.4 Substância GE9</b> .....	<b>132</b>
<b>4.5.4 Substância GE14</b> .....	<b>134</b>
<b>4.6 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS</b> .....	<b>137</b>
<b>4.6.1 Análise da composição química e sazonalidade</b> .....	<b>137</b>
<b>4.6.2 Análises das atividades biológicas</b> .....	<b>145</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>151</b>
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	<b>155</b>
<b>5 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>157</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>159</b>
<b>APÊNDICE A – PROCEDIMENTOS CROMATOGRÁFICOS ADOTADOS NO ESTUDO BIOGUIADO</b> .....	<b>207</b>

# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 INTRODUÇÃO

As plantas sempre desempenharam um papel importante na vida do homem, sob diversas maneiras: na alimentação, como condimento, objetos de adorno ou de uso doméstico, como remédios e em práticas mágico-religiosas (GURIB-FAKIM, 2006). Dessa forma, a utilização das plantas medicinais como fonte de medicamentos para o tratamento de enfermidades que acometem a espécie humana remonta à idade antiga (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Atualmente, as plantas ainda são muito usadas por várias populações de diferentes continentes, principalmente na forma de chás, tornando-se alvo de interesse para as pesquisas científicas (CRAGG; GROTHAU; NEWMAN, 2009; LEITE, 2009). Inúmeras substâncias presentes nos extratos vegetais foram identificadas como sendo ativas no organismo humano, e muitos dos fármacos atuais são originários ou derivados das mesmas (BALUNAS; KINGHORN, 2005; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Entretanto, devido às suas estruturas únicas e complexas, processos de síntese química podem se tornar difíceis e, muitas vezes, inviáveis (INGKANINAN et al., 2003), tornando a exploração da matéria-prima natural uma fonte alternativa.

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, e as plantas medicinais e os fitoterápicos dela obtidos são muito utilizados no tratamento das doenças prevalentes. No entanto, nem todos estes produtos foram estudados de acordo com os protocolos científicos modernos, tornando-se essencial a sua validação científica para que possam ser usados como medicamentos (LUNA et al., 2005).

Nas últimas décadas, houve aumento no interesse por antioxidantes, particularmente em relação à prevenção de efeitos deletérios dos radicais livres no corpo humano (ZHELEVA-DIMITROVA; ZHELEV; DIMITROVA-DYULGEROVA, 2011). Os radicais livres podem conduzir a diversas formas de dano celular, e sua cronicidade pode estar envolvida na etiogênese ou no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e do câncer (SASIKUMAR et al., 2012). Porém, as lesões causadas pelos radicais livres nas células podem ser prevenidas ou reduzidas por meio de antioxidantes, como, por exemplo, os compostos fenólicos encontrados em muitos vegetais (SHAMI; MOREIRA, 2004; ZHANG et al., 2013).

A Doença de Alzheimer (DA) é uma das principais doenças neurodegenerativas, sendo considerada a principal causa de demência

em idosos. Observam-se sintomas relacionados ao declínio cognitivo e mental, causados pela perda de neurônios em diferentes regiões do cérebro (MATA et al., 2007), podendo possuir como causa, entre outras, os processos oxidativos (CHRISTEN, 2000). Com o aumento da expectativa de vida, tem-se observado um incremento no número de casos de DA nos últimos anos. Porém, este processo não está sendo acompanhado por um avanço na descoberta de novos medicamentos, que existem em número reduzido e possuem diversos efeitos colaterais (WEINER et al., 2010).

A necessidade de novos tratamentos para infecções bacterianas também é um dos grandes desafios da medicina atual, devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos. Os mollicutes (classe *Mollicutes*), por vezes denominados genericamente como micoplasmas, são um grande grupo de bactérias peculiares, responsáveis por várias doenças nos animais, plantas e no homem, como algumas doenças sexualmente transmissíveis (DST) (BENFATTI et al., 2010). Diferentemente de outras bactérias, possuem genoma reduzido e ausência de parede celular (RAZIN; HAYFLICK, 2010), o que os torna naturalmente resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e a outros fármacos que atuam sobre a parede celular (SIRAND-PUGNET et al., 2007). Vários estudos já comprovaram a atividade antibacteriana de plantas medicinais, no entanto, poucos avaliaram a atividade destas contra mollicutes.

A família Myrtaceae é bastante interessante do ponto de vista químico e farmacológico, e muitas espécies desta família são utilizadas como alimento, fornecendo também importantes produtos, como óleos essenciais e temperos, e, além disso, muitas são utilizadas na medicina tradicional (GOVAERTS et al., 2008). Entre os gêneros mais representativos destacam-se *Eugenia*, *Myrcia*, *Myrtus*, *Psidium*, *Pimenta*, *Syzygium*, *Eucalyptus*, e *Melaleuca* (JUDD, 2009; LAGO et al., 2011).

A espécie *Eugenia hiemalis* Cambessèdes, conhecida popularmente como “guamirim” (REITZ; LEGRAND; KLEIN, 1967-1971), apresenta poucos estudos na literatura, tanto em relação à sua composição química como atividades biológicas. A partir do extrato das folhas foram isoladas algumas quinonas e derivados (FALKENBERG, 1996), sendo que uma delas (primina) demonstrou atividade contra células leucêmicas KG-1a (Linhagem celular de leucemia mieloide aguda) (EFFERTH et al., 1996). Foram isoladas também três novas galo-arbutinas (denominadas hiemalosídeos), que apresentaram atividade contra RNase H de HIV, e outros compostos fenólicos, como



flavonoides (BOKESCH et al., 2008). A constituição química do óleo essencial das folhas desta espécie, coletada no Rio Grande do Sul, também foi analisada, observando-se o predomínio de sesquiterpenos cíclicos (APEL et al., 2004).

Considerando o disposto, o presente trabalho teve como objetivo a investigação bioguiada das partes aéreas da espécie *E. hiemalis*, por meio da avaliação das atividades anticolinesterásica, antibacteriana e antioxidante, identificando-se as substâncias bioativas. Adicionalmente, objetivou-se a análise da variação sazonal da composição química dos óleos essenciais das suas folhas, bem como avaliação da atividade biológica dos óleos nos mesmos modelos.

A seguir, será apresentada uma breve revisão a respeito de produtos naturais, metabolismo vegetal, incluindo óleos essenciais, bem como sobre a família Myrtaceae, gênero *Eugenia*, e a espécie *E. hiemalis*. Alguns tópicos com relação às atividades biológicas avaliadas neste estudo também serão abordados.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 Produtos naturais e o metabolismo vegetal

O metabolismo vegetal consiste em um conjunto de reações que ocorrem em cada célula (rota metabólica), e que visam à produção de energia através de ATP e biossíntese de substâncias indispensáveis à sua sobrevivência (CAPASSO; PASQUALE; GRANDOLINI, 2011). Os compostos químicos obtidos são chamados de metabólitos, que podem ser classificados como primários ou secundários (PATRA et al., 2013).

Os metabólitos primários são essenciais ao crescimento e à vida, como os aminoácidos, lipídeos, monossacarídeos, entre outros. Os metabólitos secundários estão relacionados aos processos adaptativos de defesa das plantas (PATRA et al., 2013), e incluem os alcaloides, esteroides, taninos, saponinas, flavonoides, entre outros; são estes metabólitos que geralmente conferem propriedades terapêuticas às espécies (ANARAT-CAPPILLINO; SATTELY, 2014).

Os produtos naturais vêm desempenhando um importante papel no processo de descoberta de novos fármacos (MCCHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007; MONTANARI; BOLZANI, 2001), alguns até hoje amplamente utilizados na clínica, como a morfina (isolada inicialmente de *Papaver somniferum*), vincristina (presente em *Catharanthus roseus*), taxol (isolado de plantas do gênero *Taxus*),

artemisinina (presente em *Artemisia annua*), entre outros (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, no ano de 2008, 80% da população de diversos países do mundo dependiam da medicina tradicional (incluindo o uso de plantas medicinais) para a atenção primária à saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Há poucos anos, os produtos naturais e seus derivados representavam aproximadamente 50% dos fármacos em uso clínico (GURIB-FAKIM, 2006). Assim, a pesquisa de produtos naturais bioativos tem despertado muita atenção tanto na academia, quanto na indústria (REN et al., 2013).

Apesar de inúmeros compostos originários de plantas já terem sido determinados, as possibilidades de se encontrar novas moléculas a partir do metabolismo secundário das plantas, com atividade de importância para a química medicinal, seriam inesgotáveis segundo alguns autores (HARTMANN, 2007). Além disso, embora o Brasil possua a maior diversidade vegetal do mundo, menos de 10% da mesma foi avaliada quanto às suas características biológicas, e menos de 5% teria sido objeto de estudos fitoquímicos (LUNA et al., 2005).

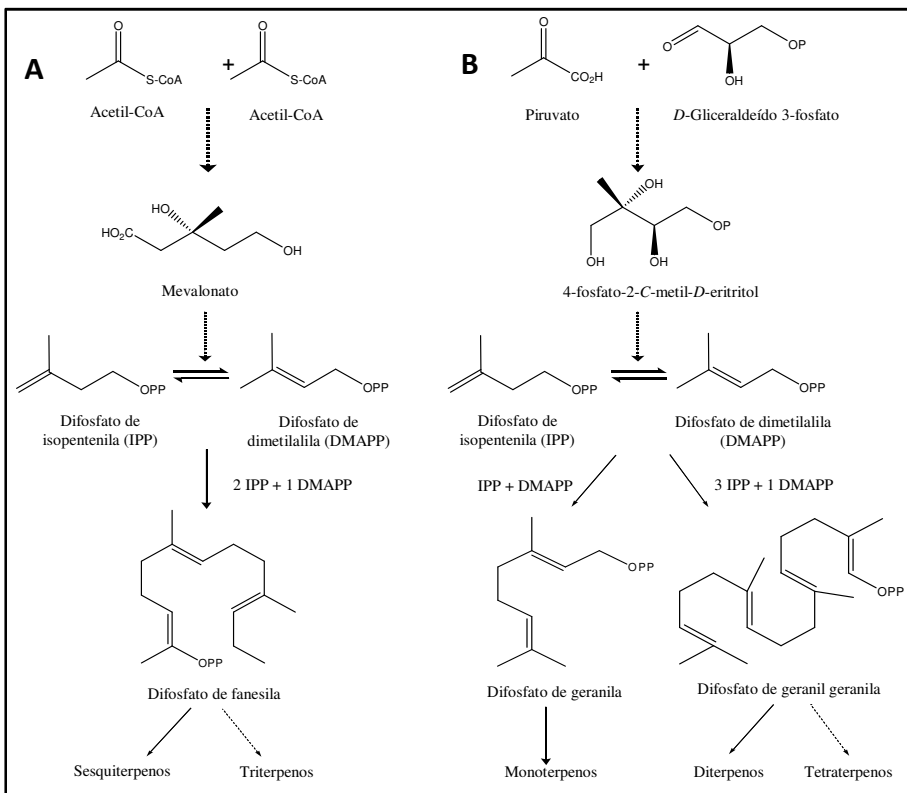
### 1.2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são uma complexa mistura de compostos voláteis de baixo peso molecular, produzidos em estruturas glandulares das plantas como metabólitos secundários. São constituídos predominantemente por terpenos (mono-, sesqui- e diterpenos) que são obtidos, principalmente, como hidrocarbonetos (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012). Uma grande variedade de fenóis, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas também podem estar presentes, determinando o aroma e odor característicos das plantas (BATISH et al., 2008).

A formação dos terpenos ocorre por duas vias, a do mevalonato-acetato (Figura 1 - A) e a via independente de mevalonato (que ocorre pela junção de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato) (Figura 1 - B). A primeira ocorre no citosol e dá origem aos sesquiterpenos e triterpenos, e a segunda ocorre nos plastídeos, e origina monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos. De maneira geral, os terpenos derivam de um precursor universal, o difosfato de isopentenila (IPP), o qual isomeriza juntamente com o difosfato de dimetilalila (DMAPP). Na sequência, ocorre um alongamento por preniltransferases, originando o difosfato de geranila, difosfato de farnesila e difosfato de geranyl-geranila, os quais sofrem a ação de terpenóides sintases, também chamadas de ciclases,

originando os diversos compostos terpênicos (DAVIS; CROTEAU, 2000).

Figura 1. Vias de formação dos compostos terpênicos pela via do mevalonato-acetato (A) e via independente de mevalonato (B).



Fonte: Davis; Croteau, 2000.

Os óleos essenciais exercem importantes atividades biológicas nas plantas, podendo atuar na sua proteção contra bactérias, vírus, fungos, etc. Além disso, o seu aroma atrai alguns insetos que atuam como polinizadores e dispersores de sementes, ao mesmo tempo em que repele insetos indesejáveis e permite interações entre as plantas (BAKKALI et al., 2008; BATISH et al., 2008).

Devido às suas propriedades medicinais e antissépticas (bactericidas, virucidas e fungicidas), bem como à fragrância, os óleos essenciais são utilizados como analgésicos, anti-inflamatórios,

sedativos, antiespasmódicos, e anestésicos locais, bem como conservantes de alimentos e componentes de perfumes (BAKKALI et al., 2008).

As propriedades biológicas e medicinais dos óleos essenciais estão diretamente relacionadas à composição química, a qual pode ser afetada por fatores ambientais e geográficos, bem como variações sazonais e circadianas (CERQUEIRA et al., 2009). Além disso, o estado de desenvolvimento da planta e o genótipo são fatores importantes, podendo-se observar variações entre espécies e variedades de plantas aromáticas, bem como para amostras de uma mesma variedade provenientes de diferentes áreas geográficas (ZYGADLO; JULIANI, 2003 apud NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010). Dessa forma, os estudos das variações na composição dos óleos essenciais são importantes tanto do ponto de vista industrial (indústrias de alimentos, medicamentos, pesticidas etc.), quanto ecológico (KESZEI et al., 2010).

As espécies da família Myrtaceae, particularmente as do gênero *Eugenia*, são ricas em óleos essenciais (CERQUEIRA et al., 2009; ZOGHBI et al., 2011). Destacam-se as folhas, em que há predominância de compostos terpênicos, apresentando grande variação qualitativa e quantitativa em níveis taxonômicos, populacionais e individuais (ANDRASKESEI; BRUBAKER; FOLEY, 2008 apud KESZEI et al., 2010). Muitos gêneros contêm numerosas espécies estreitamente relacionadas e com grande variedade de perfis de óleo das folhas (KESZEI et al., 2010).

### 1.2.3 A família Myrtaceae e o gênero *Eugenia*

A família Myrtaceae possui distribuição predominantemente pantropical e subtropical, concentrando-se na América do Sul, Sudeste Asiático e Austrália (REYNERTSON et al., 2008). Inclui cerca de 130 gêneros e 4000 espécies, sendo que no Brasil ela representa uma das maiores famílias, com 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008). Destacam-se alguns gêneros do ponto de vista etnobotânico, como: *Psidium*, *Eugenia*, *Syzygium*, *Eucalyptus*, *Melaleuca* (JUDD, 2009; LAGO et al., 2011), entre outros.

As várias espécies da família Myrtaceae fornecem importantes produtos, como óleos essenciais, temperos, alimentos e, além disso, muitas são utilizadas na medicina tradicional (STASI; HIRUMA-LIMA, 2002), como o decocto de folhas com finalidade antirreumática, anti-inflamatória, antidiabética, antifebril, hipoglicemiante, diurética e reguladora do aparelho digestivo (LAGO et al., 2011).

Em relação à constituição química das várias espécies desta família, destaca-se a presença de taninos, flavonoides, ácidos elágico e ursólico, leucoantocianinas, triterpenos, sesquiterpenos e saponinas, sendo rara a presença de glicosídeos cianogênicos e alcalóides (CHIRINOS et al., 2010; STASI; LAGO et al., 2011; HIRUMA-LIMA, 2002).

O gênero *Eugenia* é o maior gênero da família Myrtaceae da América tropical (GOVAERTS et al., 2008). Ocorre desde o México e Caribe até o norte da Argentina, estando presente em todas as regiões do Brasil, onde se estima a existência de cerca de 350 espécies (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

Entre as espécies mais conhecidas, destacam-se *E. uniflora* (“pitanga”) (LORENZI, 2006), *E. jambolana* (“jambolão”) (REITZ; LEGRAND; KLEIN, 1971-1978), *E. brasiliensis* (“grumixama”) (REITZ; LEGRAND; KLEIN, 1967-1971) e *E. caryophyllata* (“cravoda-índia”) (CHAIEB et al., 2007a), sendo muitas delas cultivadas devido aos seus frutos comestíveis (FLORES et al., 2012). Muitas espécies também são ricas em óleos essenciais, e são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades, como artrite, reumatismo, diabetes, entre outras (COLE; HABER; SETZER, 2007).

Inúmeros estudos na literatura analisaram a composição química e atividades biológicas de extratos e frações de espécies deste gênero. Com relação à composição química, observa-se a presença de compostos fenólicos, principalmente flavonoides, antocianinas e taninos, bem como triterpenos, esteroides e carotenoides. O Quadro 1 e a Figura 2 apresentam algumas substâncias isoladas dos extratos vegetais de espécies do gênero *Eugenia*.

Devido à grande quantidade de compostos fenólicos, espécies do gênero *Eugenia* apresentam marcante atividade antioxidante, além de atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antidiabética, anticolinesterásica, entre outras. O Quadro 2 apresenta um panorama geral das atividades biológicas descritas para espécies do gênero.

Uma vez que diversos artigos referiam-se a um mesmo binômio atribuindo autorias diferentes para o mesmo, optou-se, nas presentes tabelas por suprimir as referências dos autores do binômio.

Quadro 1. Substâncias previamente isoladas de espécies do gênero *Eugenia*.

Farmacógeno	Compostos isolados	Referência
<i>E. brasiliensis</i>		
Folhas	<u>Flavonoides</u> quercetina [1] <u>Flavan-3-óis</u> catequina [28], galocatequina [29] <u>Terpenos</u> $\alpha$ -amirina [42], $\beta$ -amirina [40], betulina [47], ácido 29-hidróxi-oleanólico, ácido ursólico [43]	FRIGHETTO et al., 2005 MAGINA et al., 2012 PIETROVSK I et al., 2008
<i>E. caryophyllata</i>		
Botões florais	<u>Taninos</u> 2- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -galoil)- $\beta$ - <i>D</i> -glico-piranosil-benzoato de metila <u>Cromonas</u> isobiflorina [36], biflorina [37]	CHUN et al., 2010 ZHANG; CHEN, 1997
Folhas	<u>Taninos</u> sizigininas A e B, eugeniina	TANAKA et al., 1996
<i>E. copacabanensis</i>		
Folhas	<u>Flavonoides</u> quercetina [1], quercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ - <i>L</i> -arabinosídeo, canferol-3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -ramnosídeo [16] <u>Terpenos</u> $\alpha$ -amirina [42], $\beta$ -amirina [40], betulina [47], ácido ursólico [43], ácido 30-hidróxi-ursólico [44], clovandiol, globulol e viridiflorol (mistura) <u>Esteroides</u> $\beta$ -sitosterol, $\beta$ -sitosterol glicosídeo [53]	CARVALHO JUNIOR et al., 2014
Galhos	<u>Terpenos</u> friedelina, friedelan-3,4-lactona [46], taraxerol	CARVALHO JUNIOR et al., 2014

Quadro 1. (Continuação) Substâncias previamente isoladas de espécies do gênero *Eugenia*.

Farmacógeno	Compostos isolados	Referência
<i>E. edulis</i>		
Folhas	<p><u>Flavonoides</u>            quercetina [1], miricitrina [10],            quercetina-3-<i>O</i>-<math>\beta</math>-galactosídeo [3],            quercetina-3-<i>O</i>-<math>\beta</math>-(6''-galoilglicosídeo) [4],            quercetina-3-<i>O</i>-<math>\alpha</math>-arabinofuranosídeo,            canferol-3-<i>O</i>-<math>\alpha</math>-arabinofuranosídeo [15],            gossipetina-3,8-dimetil-éter-5-<i>O</i>-<math>\beta</math>-glicosídeo [21],            gossipetina-3,5-dimetil-éter [20],            miricetina-3,5,3'-trimetil-éter [13]</p> <p><u>Taninos</u>            ácido gálico [30]</p> <p><u>Flavan-3-óis</u>            epi-galocatequina-3-<i>O</i>-galato</p> <p><u>Ácidos fenólicos</u>            ácido protocatecuico [31]</p>	HUSSEIN et al., 2003
<i>E. jambolana</i>		
Folhas	<p><u>Flavonoides</u>            canferol [14], miricetina [9], miricitrina [10],            miricitrina 4''-<i>O</i>-acetato [11] e seu derivado            2''-<i>O</i>-galato,            miricetina 4'-metil-éter-3-<i>O</i>-<math>\alpha</math>-<i>L</i>-            ramnopiranosídeo,            miricetina 3-<i>O</i>-(4''-acetil-<math>\alpha</math>-<i>L</i>-            ramnopiranosídeo,            quercetrina 4''-<i>O</i>-acetato,            quercetina 3-<i>O</i>-<math>\alpha</math>-<i>L</i>-ramnopiranosídeo,            canferol 3-<i>O</i>-<math>\beta</math>-<i>D</i>-glicoronopiranosídeo,            miricetina 3-<i>O</i>-<math>\beta</math>-<i>D</i>-glicoronopiranosídeo,            mearnsetina 3-<i>O</i>-(4''-<i>O</i>-acetil)-<math>\alpha</math>-<i>L</i>-            ramnopiranosídeo [19]</p> <p><u>Taninos</u>            ácido gálico [30], galato de metila,            ácido elágico [32], ácido 3-<i>O</i>-metil-elágico,            nilocitina</p>	MAHMOUD et al., 2001 TIMBOLA et al., 2002

Quadro 1. (Continuação) Substâncias previamente isoladas de espécies do gênero *Eugenia*.

Farmacógeno	Compostos isolados	Referência
<i>E. jambolana</i>		
Folhas	<u>Ácidos fenólicos</u> ácido clorogênico  <u>Terpenos</u> ácido oleanólico [38], ácido betulínico [48], ácido cratagólico (maslínico) [41]  <u>Esteroides</u> β-sitosterol [52]	GUPTA; SHARMA, 1974  MAHMOUD et al., 2001  RAJASEKA RAN et al., 1988
Raiz	<u>Terpenos</u> lupeol  <u>Esteroides</u> β-sitosterol [52], estigmasterol	SAHA et al., 2013
Sementes	<u>Taninos</u> ácido elágico [32], ácido gálico [30], corilagina, hexa-hidróxi-difenoil-glicose, 1-galoil-glicose, ácido hexa-hidróxi-difênico	BHATIA; BAJAJ; GHANGAS, 1971
<i>E. jambos</i>		
Folhas	<u>Flavonoides</u> quercetina 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -xilopiranosídeo, miricetina 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -xilopiranosídeo [12]  <u>Taninos</u> 1- <i>O</i> -galoil-castalagina, casuarinina	SLOWING et al., 1994  YANG; LEE; YEN, 2000
<i>E. javanica</i>		
Folhas	<u>Flavonoides</u> mearnsitrina [18] 2'- <i>C</i> -metil-5'- <i>O</i> -galoil-miricetina-3- <i>O</i> -α- <i>L</i> - ramnopiranosídeo	NAIR et al., 1999
Frutos	<u>Flavonoides</u> reinoutrina [5], hiperina [6], miricitrina [10], quercitrina [2], quercetina [1], guaijaverina [7], ( <i>S</i> )-pinocembrina	SIMIRGIOTI S et al., 2008



Quadro 1. (Continuação) Substâncias previamente isoladas de espécies do gênero *Eugenia*.

Farmacógeno	Compostos isolados	Referência
Frutos	<u>Chalconas</u> 2,4-dihidróxi-3,5-dimetil-6-metóxi-chalcona [33], 2,4-dihidróxi-3-metil-6-metóxi-chalcona [34], 2,4-dihidróxi-6-metóxi-chalcona [35] <u>Taninos</u> ácido gálico [30], ácido elágico [32]	SIMIRGIOTI S et al., 2008
Partes aéreas	<u>Terpenos</u> ácido ursólico [43], ácido jacumárico, ácido arjunólico, 3-epi-betulinato de metila <u>Chalconas</u> 4',6'-dihidróxi-2'-metóxi-3',5'-dimetil-chalcona	SRIVASTA V; SHAW; KULSHRES HTH, 1995
<i>E. kurzii</i>		
Partes aéreas	<u>Flavonoides</u> 3-C-metil-apigenina-5-O-ramnosídeo, 3-C-metil-luteolina-5-O-ramnosídeo [8]	PAINULY; TANDON, 1983
<i>E. malaccensis</i>		
Caules	<u>Terpenos</u> ácido 3-acetil-ursólico [45]	OLIVEIRA et al., 2006
Folhas	<u>Flavonoides</u> miricetina [9], mearnsetina [17] <u>Taninos</u> ácido gálico [30]	OLIVEIRA et al., 2006
<i>E. moraviana</i>		
Folhas e caules	<u>Terpenos</u> ácido betulínico [48], 6 $\alpha$ -hidróxi-betulínico [49], e platânico [50] <u>Esteroides</u> $\beta$ -sitosterol [52]	LUNARDI et al., 2001
<i>E. myrtifolia</i>		
Frutos	<u>Antocianinas</u> malvidina 3,5-O-diglicosídeo	LONGO et al., 2007

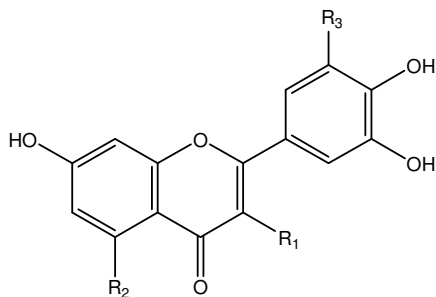
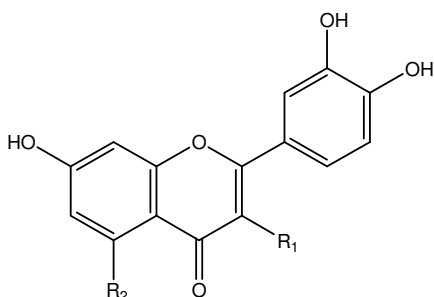
Quadro 1. (Continuação) Substâncias previamente isoladas de espécies do gênero *Eugenia*.

Farmacógeno	Compostos isolados	Referência
<i>E. polyantha</i>		
Folhas	<u>Fenilpropanoides</u> hidróxi-chavicol e dois dímeros	KATO et al., 2013
<i>E. sandwicensis</i>		
Caules	<u>Taninos</u> ácido gálico [30] <u>Terpenos</u> ácido alfitólico [51], ácido arjunólico [39], ácido betulínico [48], hederagenina, ácido maslínico, ácido 3 $\beta$ -cis- <i>p</i> -cumaroiloxi-2 $\alpha$ ,23-dihidróxi- olean-12-en-28-oico e isômero trans, ácido 23-trans- <i>p</i> -cumaroiloxi-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihidróxi- olean-12-en-28-oico, ácido 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihidróxi-lup-20(29)-en-28-oico, ácido 3 $\beta$ ,23-dihidróxi-lup-20(29)-en-28-oico <u>Esteroides</u> $\beta$ -sitosterol 3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glicopiranosídeo <u>Aldeídos fenólicos</u> siringaldeído	GU et al., 2001
<i>E. umbelliflora</i>		
Folhas	<u>Terpenos</u> taraxerol, $\alpha$ -amirina [42], $\beta$ -amirina [40], betulina [47], ácido betulínico [48]	MEYRE- SILVA et al., 2009
Frutos	<u>Antocianinas</u> cianidina-3- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosídeo [22], delfinidina-3- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosídeo [23], petunidina-3- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosídeo [24], pelargonidina-3- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosídeo [25], peonidina-3- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosídeo [26], malvidina-3- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosídeo [27] <u>Taninos</u> ácido trimetóxi-elágico	KUSKOSKI et al., 2003 MEYRE- SILVA et al., 2009

Quadro 1. (Continuação) Substâncias previamente isoladas de espécies do gênero *Eugenia*.

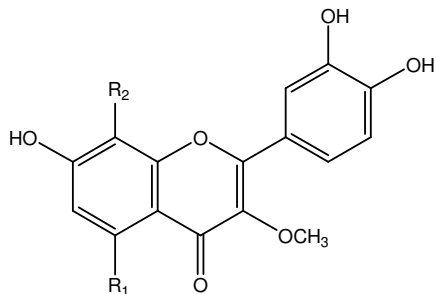
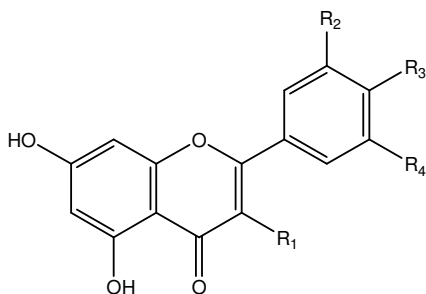
Farmacógeno	Compostos isolados	Referência
<i>E. uniflora</i>		
Folhas	<u>Taninos</u> 1,2,4,6-tetra- <i>O</i> -galoil- $\beta$ - <i>D</i> -glicose, eugeniflorinas D1 e D2, oenoteína <u>Flavonoides</u> quercetina [1], quercitrina [2], miricetina [9], miricitrina [10] <u>Flavan-3-óis</u> galocatequina [29]	LEE et al., 1997 SCHMEDA- HIRSCHMANN et al., 1987
Frutos	<u>Antocianinas</u> cianidina-3- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosídeo [22], delphinidina-3- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosídeo [23]	EINBOND et al., 2004
Sementes	<u>Flavonoides</u> quercitrina [2], canferol pentosídeo <u>Taninos</u> ácido elágico pentosídeo e deóxi-hexose	OLIVEIRA et al., 2014

Figura 2. Estruturas de algumas das substâncias previamente isoladas de extratos e frações do gênero *Eugenia* (Quadro 1).



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
[1]	OH	OH
[2]	<i>O</i> -ramnose	OH
[3]	<i>O</i> -β-galactose	OH
[4]	<i>O</i> -β-(6''-galoil-glicose)	OH
[5]	<i>O</i> -β- <i>L</i> -xilopiranoose	OH
[6]	<i>O</i> -β- <i>D</i> -galactopiranoose	OH
[7]	<i>O</i> -α- <i>L</i> -arabinopiranoose	OH
[8]	CH <sub>3</sub>	<i>O</i> -ramnose

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
[9]	OH	OH	OH
[10]	<i>O</i> -α-ramnose	OH	OH
[11]	<i>O</i> -α-ramnose (4''- <i>O</i> -acetil)	OH	OH
[12]	<i>O</i> -β- <i>D</i> -xilopiranoose	OH	OH
[13]	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
[14]	OH	H	OH	H
[15]	<i>O</i> -α-arabinofuranose	H	OH	H
[16]	<i>O</i> -β- <i>D</i> -ramnose	H	OH	H
[17]	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	OH
[18]	<i>O</i> -ramnose	OH	OCH <sub>3</sub>	OH
[19]	<i>O</i> -α- <i>L</i> -ramnopiranoose (4''- <i>O</i> -acetil)	OH	OCH <sub>3</sub>	OH

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
[20]	OCH <sub>3</sub>	OH
[21]	<i>O</i> -glicose	OCH <sub>3</sub>

Figura 2. (Continuação) Estruturas de algumas das substâncias previamente isoladas de extratos e frações do gênero *Eugenia* (Quadro 1).

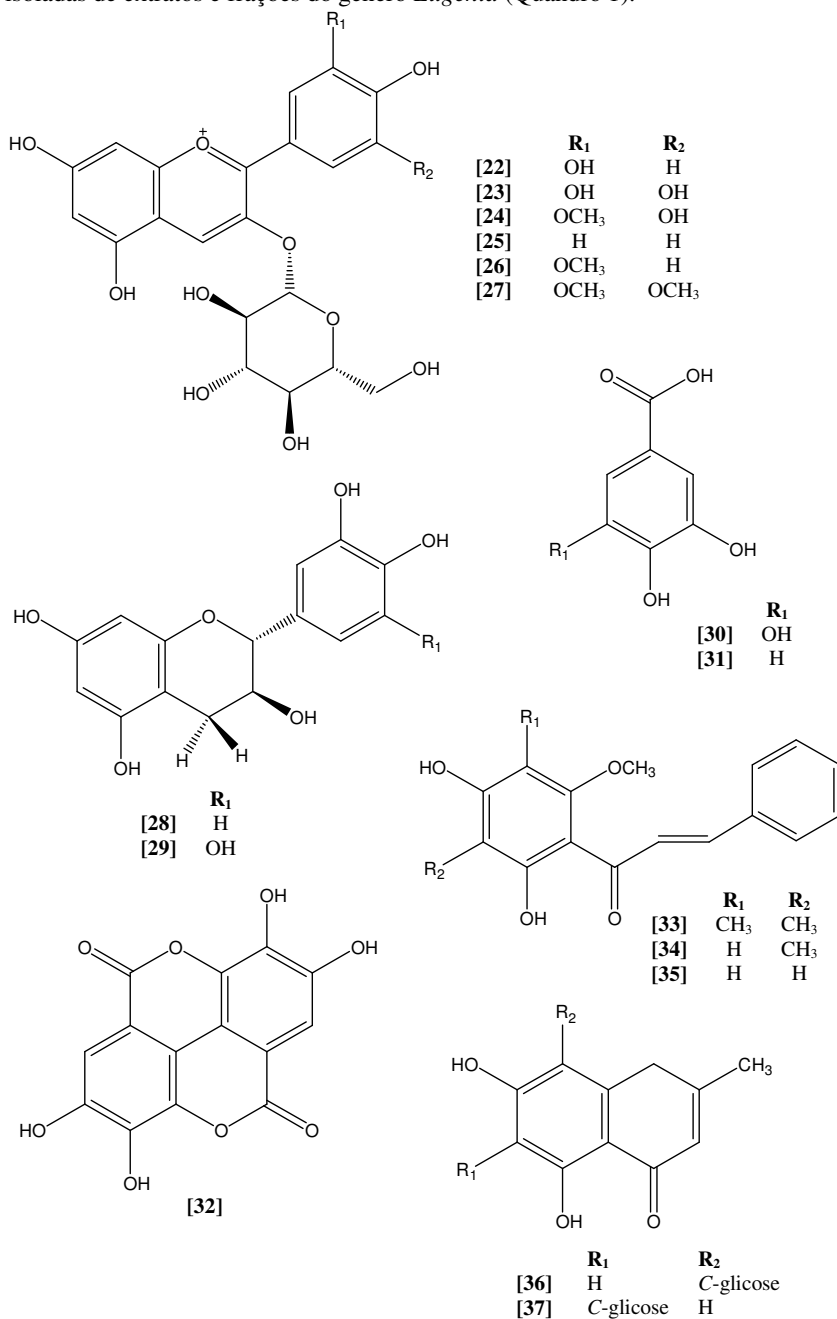
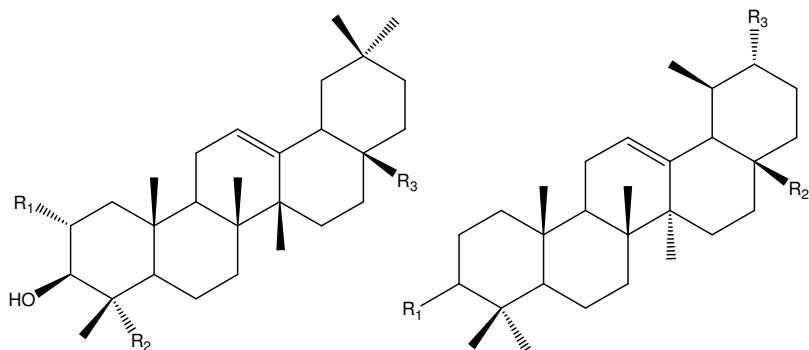
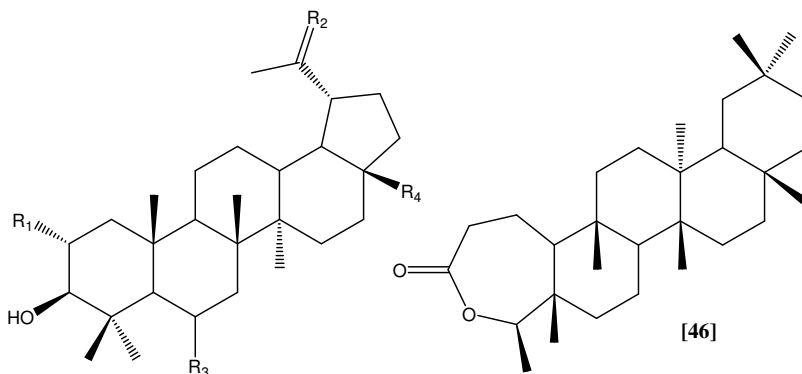


Figura 2. (Continuação) Estruturas de algumas das substâncias previamente isoladas de extratos e frações do gênero *Eugenia* (Quadro 1).

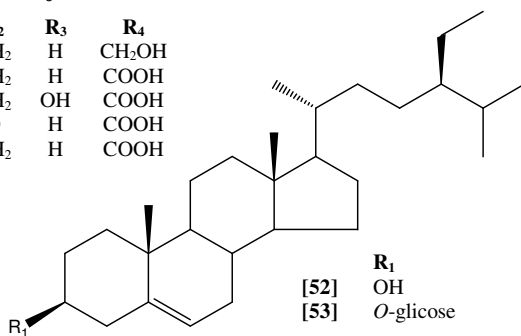


	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
[38]	H	CH <sub>3</sub>	COOH
[39]	OH	CH <sub>2</sub> OH	COOH
[40]	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
[41]	OH	CH <sub>3</sub>	COOH

	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
[42]	βOH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
[43]	βOH	COOH	CH <sub>3</sub>
[44]	βOH	COOH	CH <sub>2</sub> OH
[45]	<i>O</i> -acetil	COOH	CH <sub>3</sub>



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
[47]	H	CH <sub>2</sub>	H	CH <sub>2</sub> OH
[48]	H	CH <sub>2</sub>	H	COOH
[49]	H	CH <sub>2</sub>	OH	COOH
[50]	H	O	H	COOH
[51]	OH	CH <sub>2</sub>	H	COOH



	<b>R<sub>1</sub></b>
[52]	OH
[53]	<i>O</i> -glicose

Quadro 2. Atividades biológicas testadas para extratos/frações de espécies do gênero *Eugenia*.

<b>Espécie</b>	<b>Farmacógeno</b>	<b>Atividades</b>
<i>E. aggregata</i>	Frutos	Antioxidante (REYNERTSON et al., 2008)
<i>E. beaurepaireana</i>	Folhas	Antibacteriana (BENFATTI et al., 2010) Anti-inflamatória (MAGINA et al., 2009b)
<i>E. bracteata</i>	Folhas	Antioxidante (HEMALATHA; SATYANARAYANA; ALEKHYANJALI, 2008)
<i>E. brasiliensis</i>	Folhas	Antibacteriana (BENFATTI et al., 2010; MAGINA et al., 2012); Anticolinesterásica (MAGINA et al., 2012) Antidepressiva (COLLA et al., 2012) <u>Toxicidade</u> <i>Artemia salina</i> (CL <sub>50</sub> = 907,2 µg/mL) (MAGINA et al., 2012)
	Frutos	Antioxidante (FLORES et al., 2012; REYNERTSON et al., 2008) Inibição de interleucina-8 (IL-8) (FLORES et al., 2012)
<i>E. calycina</i>	Cascas	Antibacteriana (FERREIRA et al., 2014) Antifúngica (FERREIRA et al., 2014)
	Folhas	Antibacteriana (FERREIRA et al., 2014) Antifúngica (FERREIRA et al., 2014)
<i>E. caryophyllata</i>	Botões florais	Acaricida (KIM et al., 2007) Ansiolítica (TIWARI et al., 2014) Antibacteriana (IVANOVIC et al., 2013; KRISHNAN et al., 2014; RATH; PADHY, 2014; ZAIDI et al., 2009) Antifúngica (AL-SOHAIBANI et al., 2011; SUKORINI; SANGCHOTE; KHEWKHOM, 2013) Anti-inflamatória (MUELLER; HOBIGER; JUNGBAUER, 2010)

Quadro 2. (Continuação) Atividades biológicas testadas para extratos/frações de espécies do gênero *Eugenia*.

<b>Espécie</b>	<b>Farmacógeno</b>	<b>Atividades</b>
<i>E. caryophyllata</i>	Botões florais	Antioxidante (ADEFEGHA; OBOH, 2012; GÜLÇİN et al., 2004; IVANOVIC et al., 2013; KRISHNAN et al., 2014) Antiúlceras (MAGAJI et al., 2007) Antiviral (KUOKAWA et al., 1995) Fumigante (KIM et al., 2007) Inibição da hiperensibilidade imediata (KIM et al., 1998) Inseticida (HAN; KIM; AHN, 2006) Molusquicida (KUMAR; SINGH, 2006) Relacionadas à antidiabética (ADEFEGHA; OBOH, 2012) Repelente (insetos) (HANIFAH et al., 2012) <u>Toxicidade</u> Citotóxica (células tumorais) (CC <sub>50</sub> = 18,7 – 31 µg/mL) (ABD EL AZIM et al., 2014)
	Casca	Anti-inflamatória (KIM et al., 2003) Antitumoral (KIM et al., 2003)
	Caule	Inibição de COX-2 e óxido nítrico sintase (iNOS) (HONG et al., 2002)
	Flores	Antibacteriana (LI et al., 2005) Antifúngica (LIU et al., 2012) Relacionadas à antidiabética (LI et al., 2014)
	Folhas	Antifúngica (GIRÓN et al., 1988) <u>Toxicidade</u> Citotóxica (células tumorais) (CC <sub>50</sub> = 69 µg/mL) (AISHA et al., 2011)
	Frutos	Antibacteriana (ROSAS-PIÑÓN et al., 2012) Antioxidante (WOJDYŁO; OSZMIANSKI; CZEMERYS, 2007)
	Sementes	Anticariogênica (UJU; OBIOMA, 2011)
<i>E. catharinae</i>	Folhas	Antidepressiva (COLLA et al., 2012)



Quadro 2. (Continuação) Atividades biológicas testadas para extratos/frações de espécies do gênero *Eugenia*.

<b>Espécie</b>	<b>Farmacógeno</b>	<b>Atividades</b>
<i>E. copacabanensis</i>	Galhos	Antioxidante (CARVALHO JUNIOR et al., 2014)
	Folhas	Antioxidante (CARVALHO JUNIOR et al., 2014)
<i>E. dysenterica</i>	Folhas	Antiviral (CESÍLIO et al., 2012) Gastroprotetora (PRADO et al., 2014)
	Frutos	Laxativa (LIMA et al., 2010)
<i>E. jambolana</i>	Cascas	Anticolinesterásica (MAZZANTI et al., 2004) Antidiarreica (MUKHERJEE et al., 1998) Anti-inflamatória (MURUGANANDAN et al., 2001) Antioxidante (SULTANA; ANWAR; PRZYBYLSKI, 2007) Relacionadas à antidiabética (TONG et al., 2014; VILLASEÑOR; LAMADRID, 2006)
	Flores	Antifertilidade (RAJASEKARAN et al., 1988)
	Folhas	Alelopática (SOBRAL-SOUZA et al., 2014) Antibacteriana (MISHRA; PADHY, 2013; PANDA, 2014; SAHU et al., 2015) Anticolinesterásica (BONA et al., 2011) Antifúngica (BRAGA et al., 2007) Antiparasitária (PIZZOLATTI et al., 2002; RIBEIRO et al., 2014) Citoprotetora (SOBRAL-SOUZA et al., 2014) Fototoxicidade sobre bactérias (COUTINHO et al., 2009) Inseticida (SOBRAL-SOUZA et al., 2014) Relacionadas à antidiabética (OLIVEIRA et al., 2005)

Quadro 2. (Continuação) Atividades biológicas testadas para extratos/frações de espécies do gênero *Eugenia*.

Espécie	Farmacógeno	Atividades
<i>E. jambolana</i>	Folhas	<p><u>Toxicidade</u>            Antigenotóxica (BARTOLOME et al., 2006; JAGETIA; BALIGA, 2002)            Citotóxica (células normais) (CC<sub>50</sub> = 132,4 µg/mL) (RIBEIRO et al., 2014)</p>
	Frutos	<p>Acaricida (AFIFY et al., 2011b)            Antioxidante (AFIFY et al., 2011a; BANDYOPADHYAY et al., 2012; BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005; FARIA; MARQUES; MERCADANTE, 2011; HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2009; KUBOLA; SIRIAMORNPUN; MEESE, 2011; VEIGAS et al., 2007)            Hepatoprotetora (VEIGAS; SHRIVASTHAVA; NEELWARNE, 2008)            Inibição da quinase Rho 2 (ROCK-II) (disfunção erétil) (GOSWAMI et al., 2012)            Relacionada à antidiabética (SHARMA et al., 2006)  <u>Toxicidade</u>            Citotóxica (células tumorais) (CC<sub>50</sub> = 81 µg/mL) (AFIFY et al., 2011a)</p>
	Sementes	<p>Antiamnésica (ALIKATTE et al., 2012)            Antibacteriana (BAG et al., 2012; CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004)            Antifúngica (DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011)            Anti-inflamatória (KUMAR; LLAVARASAN, 2008; MODI et al., 2010)            Antioxidante (ARUN et al., 2011; CHATTERJEE et al., 2012; PEIXOTO; FREITAS, 2013; RAVI; RAMACHANDRAN; SUBRAMANIAN, 2004; SURVESWARAN et al., 2007)</p>

Quadro 2. (Continuação) Atividades biológicas testadas para extratos/frações de espécies do gênero *Eugenia*.

Espécie	Farmacógeno	Atividades
<i>E. jambolana</i>	Sementes	<p>Hepatoprotetora (SHARMA et al., 2013)</p> <p>Hipolipemiante (SHARMA; BALOMAJUMDER; ROY, 2008; MIDDHA et al., 2012)</p> <p>Neuroproteção (Doença de Alzheimer) (KOSARAJU et al., 2014)</p> <p>Proteção contra danos no DNA (BENHERLAL; ARUMUGHAN, 2008)</p> <p>Relacionadas à antidiabética (CHATTERJEE et al., 2012; GROVER; VATS; RATHI, 2000; KAR; CHOUDHARY; BANDYOPADHYAY, 2003; PEIXOTO et al., 2013; PRINCE; KAMALAKKANNAN; MENON, 2003; SHINDE et al., 2008; SHARMA et al., 2003; SHARMA; BALOMAJUMDER; ROY, 2008; PRINCE et al., 2003; GROVER et al., 2001)</p> <p><u>Toxicidade</u></p> <p>Toxicidade em camundongos (ausência de efeitos tóxicos) (SANKHARI et al., 2010)</p>
	Raiz	<p>Antibacteriana (LIMA et al., 2006)</p> <p>Anti-inflamatória (SAHA et al., 2013)</p> <p>Antinociceptiva (SAHA et al., 2013)</p>
<i>E. jambos</i>	Cascas	<p>Antibacteriana (DJIPA; DELMÉE; QUETIN-LECLERCQ, 2000)</p> <p>Antiviral (GONÇALVES et al., 2005)</p>
	Partes aéreas	<p>Antinociceptiva (ÁVILA-PEÑA et al., 2007)</p>
	Folhas	<p>Antibacteriana (PANDA, 2014)</p> <p>Anti-inflamatória (SLOWING; CARRETERO; VILLAR, 1994)</p> <p>Antiviral (GONÇALVES et al., 2005)</p>

Quadro 2. (Continuação) Atividades biológicas testadas para extratos/frações de espécies do gênero *Eugenia*.

<b>Espécie</b>	<b>Farmacógeno</b>	<b>Atividades</b>
<i>E. jambos</i>	Folhas	<u>Toxicidade</u> Citotóxica (células tumorais) (CC <sub>50</sub> = 7,0 - 10,2 µg/mL) (YANG; LEE; YEN, 2000)
<i>E. luschnathiana</i>	Frutos	Antioxidante (REYNERTSON et al., 2008)
<i>E. malaccensis</i>	Cascas	Molusquicida (OLIVEIRA et al., 2006) Larvicida (OLIVEIRA et al., 2006)
	Folhas	Molusquicida (OLIVEIRA et al., 2006) Larvicida (OLIVEIRA et al., 2006)
<i>E. polyantha</i>	Folhas	Antibacteriana (GROSVENOR; SUPRIONO; GRAY, 1995) Antifúngica (GROSVENOR; SUPRIONO; GRAY, 1995) Antioxidante (WONG; LEONG; KOH, 2006) Inibição da lipase pancreática (KATO et al., 2013)
	Galhos	Antibacteriana (GROSVENOR et al., 1995) Antifúngica (GROSVENOR et al., 1995)
<i>E. puniceifolia</i>	Folhas	Inibição de antagonistas nicotínicos sobre a contração induzida em diafragma (GRANGEIRO et al., 2006) Inibição de xantina oxidase (THEODULOZ et al., 1988) Relacionada à antidiabética (BRUNETTI et al., 2006)
	Sementes	Inibição de xantina oxidase (THEODULOZ et al., 1988)
<i>E. pyriformis</i>	Folhas	Inibição de xantina oxidase (THEODULOZ et al., 1988)
	Frutos	Antioxidante (RUFINO et al., 2010; RUFINO et al., 2009)

Quadro 2. (Continuação) Atividades biológicas testadas para extratos/frações de espécies do gênero *Eugenia*.

<b>Espécie</b>	<b>Farmacógeno</b>	<b>Atividades</b>
<i>E. reinwardtiana</i>	Frutos	Antioxidante (REYNERTSON et al., 2008)
<i>E. stipitata</i>	Frutos	Antioxidante (GARZÓN et al., 2012; NERI-NUMA et al., 2013) <u>Toxicidade</u> Citotóxica (células tumorais) (atividade citostática > 250 mg/L) (NERI-NUMA et al., 2013) Antimutagênica e antigenotóxica (NERI-NUMA et al., 2013)
<i>E. umbelliflora</i>	Folhas	Antibacteriana (BENFATTI et al., 2010) Antidepressiva (COLLA et al., 2012)
	Frutos	Antibacteriana (MACHADO et al., 2005)
<i>E. uniflora</i>	Folhas	Antifúngica (BRAGA et al., 2007) Anti-hipertensiva (CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999) Anti-inflamatória (PIETROVSKI et al., 2008; SCHAPOVAL et al., 1994) Antioxidante (GARMUS et al., 2014; KADE et al., 2008; MARTINEZ-CORREA et al., 2011) Antiparasitária (ADEWUNMI et al., 2001; SANTOS et al., 2012) Antiviral (LEE et al., 2000; CECÍLIO et al., 2012) Aumento do tempo de sono induzido por pentobarbital (SCHAPOVAL et al., 1994) Aumento do trânsito intestinal (SCHAPOVAL et al., 1994) Hipotensiva (MORIOKA et al., 2000) Inibição de xantina oxidase (THEODULOZ et al., 1988; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987) Larvicida (LUNA et al., 2005)

Quadro 2. (Continuação) Atividades biológicas testadas para extratos/frações de espécies do gênero *Eugenia*.

Espécie	Farmacógeno	Atividades
<i>E. uniflora</i>	Folhas	<u>Toxicidade</u> <i>Artemia salina</i> (45% de mortalidade em 1 mg/mL) (LUNA et al., 2005) Citotóxica (células normais) (CC <sub>50</sub> = 149,36 µg/mL; 0 % de morte celular em 10 µg/mL) (ADEWUNMI et al., 2001; SANTOS et al., 2012) Toxicidade aguda (sem efeitos) (SCHAPOVAL et al., 1994)
	Frutos	Anti-inflamatória (SOARES et al., 2014) Antioxidante (CELLI; PEREIRA-NETTO; BETA, 2011; EINBOND et al., 2004)
	Partes aéreas	Anticolinesterásica (MORAIS et al., 2013)
	Sementes	Antioxidante (SANTOS et al., <i>in press</i> )
<i>E. uvalha</i>	Frutos	<u>Toxicidade</u> Intoxicação em ovinos (EMMERICH et al., 2014)

Os óleos essenciais das espécies de *Eugenia* também foram amplamente estudados, verificando-se a prevalência de sesquiterpenos, principalmente os cíclicos, como os de esqueleto cadinano, cariofilano, humulano e germacrano, sendo o  $\beta$ -cariofileno o componente mais prevalente. Em menor escala destacam-se os monoterpenos, como os de esqueleto pinano, sendo o  $\alpha$ -pineno o mais frequente. Adicionalmente, algumas espécies produzem alguns compostos alifáticos e aromáticos (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

A grande diversidade química apresentada para os óleos essenciais deste gênero confere a eles muitas propriedades biológicas, sendo que muitos óleos já foram avaliados em modelos *in vivo* e *in vitro*, conforme apresentado no Quadro 3.

Quadro 3. Atividades biológicas testadas para óleos essenciais de espécies do gênero *Eugenia*.

<b>Espécie</b>	<b>Farmacógeno</b>	<b>Atividades</b>
<i>E. austin-smithii</i>	Folhas	Antibacteriana (WERKA; BOEHME; SETZER, 2007) <u>Toxicidade</u> Citotóxica (células tumorais) (9,5 - 100% de morte celular em 100 µg/mL) (WERKA; BOEHME; SETZER, 2007) <i>Artemia salina</i> (CL <sub>50</sub> = 32,8 µg/mL) (WERKA; BOEHME; SETZER, 2007)
<i>E. axillaris</i>	Folhas	Antibacteriana (SCHMIDT et al., 2006) Antifúngica (SCHMIDT et al., 2006) <u>Toxicidade</u> Citotóxica (células tumorais) (8,77 - 16,45 % de morte celular em 100 µg/mL) (SCHMIDT et al., 2006)
<i>E. beaurepaireana</i>	Folhas	Antibacteriana (MAGINA et al., 2009a)
<i>E. bracteata</i>	Não especificado	Antibacteriana (RAO; NIGAM, 1970)
<i>E. brasiliensis</i>	Folhas	Antibacteriana (MAGINA et al., 2009a; SIEBERT et al., 2014) Anticolinesterásica (SIEBERT et al., 2014) Anti-inflamatória (inativa) (RAMOS et al., 2006) Antioxidante (SIEBERT et al., 2014)
<i>E. calycina</i>	Folhas	Antibacteriana (SOUSA et al., 2015) <u>Toxicidade</u> Citotóxica (células tumorais) (CC <sub>50</sub> = 117,6 - 151,1 µg/mL) (SOUSA et al., 2015)
<i>E. candolleana</i>	Folhas	Anti-inflamatória (GUIMARÃES et al., 2009) Antinociceptiva (GUIMARÃES et al., 2009)

Quadro 3. (Continuação) Atividades biológicas testadas para óleos essenciais de espécies do gênero *Eugenia*.

Espécie	Farmacógeno	Atividades
<i>E. cartagensis</i>	Folhas	<p><u>Toxicidade</u> Citotóxica (células tumorais) (0 - 100% de morte celular em 100 µg/mL) (MORIARITY et al., 2007)</p>
<i>E. caryophyllata</i>	Botões florais	<p>Acaricida (KIM et al., 2004; KIM; KIM; AHN, 2003)</p> <p>Analgésica (HALDER et al., 2012)</p> <p>Anestésica em peixes (GRUSH; NOAKES; MOCCIA, 2004)</p> <p>Antibacteriana (BURT; REINDERS, 2003; DOBRE; GAGIU; PETRU, 2011; DUSAN et al., 2006; LIS-BALCHIN et al., 1997; SCOPEL et al., 2014; TAREK et al., 2014)</p> <p>Anticonvulsivante (POURGHOLAMI et al., 1999)</p> <p>Antifúngica (BLUMA; AMAIDEN; ETCHEVERRY, 2008; KHAN; AHMAD, 2012; KHAN; AHMAD, 2011; TAREK et al., 2014)</p> <p>Antioxidante (CHAIEB et al., 2007b; ÖZCAN; ARSLAN, 2011)</p> <p>Antiparasitária (SANGWAN et al., 1990; SANTORO et al., 2007; TALBERT; WALL, 2012)</p> <p>Fumigante (KIM et al., 2004; ZHAO et al., 2012)</p> <p>Inseticida (CHOI et al., 2006; ISMAN; JUMBO et al., 2014; WAN; PASSREITER, 2001)</p> <p>Larvicida (FAYEMIWO et al., 2014; PAVELA, 2005)</p> <p>Repelente (insetos) (PHASOMKUSOLSIL; SOONWERA, 2011)</p>



Quadro 3. (Continuação) Atividades biológicas testadas para óleos essenciais de espécies do gênero *Eugenia*.

<b>Espécie</b>	<b>Farmacógeno</b>	<b>Atividades</b>
<i>E. caryophyllata</i>	Botões florais	Reversão do efeito da escopolamina sobre a memória (HALDER et al., 2012) <u>Toxicidade</u> Citotóxica (células normais) (baixa toxicidade - IC <sub>50</sub> não determinada) (DUSAN et al., 2006)
	Flores	Repelente (insetos) (SRITABUTRA; SOONWERA, 2013)
	Folhas	Acaricida (KIM et al., 2004; KIM; KIM; AHN, 2003) Antibacteriana (LIS-BALCHIN; DEANS, 1997) Antioxidante (BENTAYEV et al., 2014) Larvicida (RANA; RANA, et al., 2012; SRITABUTRA et al., 2011)
	Frutos	Antioxidante (VIUDA-MARTOS et al., 2010)
	Partes aéreas	Antioxidante (GÜLÇİN; ELMASTAS; ABOUL-ENEIN, 2012)
<i>E. chlorophylla</i>	Folhas	Antibacteriana (STEFANELLO et al., 2008) Antifúngica (STEFANELLO et al., 2008)
<i>E. cuprea</i>	Folhas	Antibacteriana (SOUZA, 2009) Antifúngica (SOUZA, 2009)
<i>E. dysenterica</i>	Folhas	Antifúngica (COSTA et al., 2000)
<i>E. haberi</i>	Folhas	Antibacteriana (WERKA; BOEHME; SETZER, 2007)

Quadro 3. (Continuação) Atividades biológicas testadas para óleos essenciais de espécies do gênero *Eugenia*.

<b>Espécie</b>	<b>Farmacógeno</b>	<b>Atividades</b>
<i>E. haberi</i>	Folhas	<u>Toxicidade</u> Citotóxica (células tumorais) (0 - 52,3 % de morte celular em 100 µg/mL) (WERKA; BOEHME; SETZER, 2007) <i>Artemia salina</i> (CL <sub>50</sub> = 31,6 µg/mL) (WERKA; BOEHME; SETZER, 2007)
<i>E. haitiensis</i>	Folhas	Inseticida (JACOBSON; HALLER, 1947)
<i>E. involucrata</i>	Frutos	Antioxidante (MARIN et al., 2008)
<i>E. jambolana</i>	Folhas	Antibacteriana (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014; SHAFI et al., 2002) Antifúngica (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014; KUMAR et al., 2010) Anti-inflamatória (MACHADO et al., 2013; RAMOS et al., 2006) Inseticida (SOBRAL-SOUZA et al., 2014)
<i>E. pyriformis</i>	Folhas	Fumigante (ASSIS et al., 2011)
	Frutos	Antibacteriana (STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009) Antioxidante (STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009)
<i>E. riedeliana</i>	Folhas	Anticolinesterásica (SOUZA, 2009)
<i>E. rotteriana</i>	Folhas	Antibacteriana (RAJ et al., 2007)
<i>E. sp. nov. "San Bosco"</i>	Folhas	Inibição de cruzaína (protease de cisteína de <i>T. cruzi</i> ) (STOKES et al., 2007)
<i>E. sulcata</i>	Folhas	Anticolinesterásica (LIMA et al., 2012) Anti-hipertensiva (SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2013)

Quadro 3. (Continuação) Atividades biológicas testadas para óleos essenciais de espécies do gênero *Eugenia*.

<b>Espécie</b>	<b>Farmacógeno</b>	<b>Atividades</b>
<i>E. umbelliflora</i>	Folhas	Antibacteriana (MAGINA et al., 2009a)
<i>E. uniflora</i>	Folhas	Antibacteriana (LAGO et al., 2011; OGUNWANDE et al., 2005; VICTORIA et al., 2012) Antidepressiva (VICTORIA et al., 2013b) Antifúngica (COSTA et al., 2010; LAGO et al., 2011; LIMA et al., 1993; VICTORIA et al., 2012) Antinociceptiva (AMORIM et al., 2009)
	Folhas	Antioxidante (VICTORIA et al., 2013b; VICTORIA et al., 2012) Fumigante (ASSIS et al., 2011) Hepatoprotetora (VICTORIA et al., 2013a) Hipotérmica (AMORIM et al., 2009) Nefroprotetora (VICTORIA et al., 2013a) <u>Toxicidade</u> Citotóxica (células tumorais) (99,55 % de morte celular em 100 µg/mL) (OGUNWANDE et al., 2005) Toxicidade (sem efeitos tóxicos em camundongos) (VICTORIA et al., 2012)
	Frutos	Antibacteriana (OGUNWANDE et al., 2005) Antioxidante (MARIN et al., 2008) <u>Toxicidade</u> Citotóxica (células tumorais) (99,36 % de morte celular em 100 µg/mL) (OGUNWANDE et al., 2005)
<i>E. zuchowskiae</i>	Folhas	<u>Toxicidade</u> Citotóxica (células tumorais) (100 % de morte celular em 100 µg/mL) (COLE et al., 2007)

### 1.2.3.1 A espécie *Eugenia hiemalis* Cambessèdes

A espécie *Eugenia hiemalis* Cambessèdes (Figura 3) é conhecida popularmente como “guamirim”, “guamirim-de-folha-miúda” (REITZ; LEGRAND; KLEIN, 1967-1971), “guamirim-vermelho” (SCHAAF et al., 2006) e “guamirim-burro” (APEL et al., 2004). Possui como sinóníma científica: *Eugenia hyemalis* Cambess., *Eugenia cycliantha* D. Legrand, *Eugenia lindbergiana* O. Berg, *Eugenia multiflora* Cambess., *Eugenia montigena* Barb. Rodr., *Eugenia polycarpa* O. Berg, *Eugenia polycarpa* var. *bimarginata* O. Berg, *Luma multiflora* (Cambess.) Herter e *Myrciaria itacurubiensis* Barbosa Rodrigues ex Chodat et Hassler (SOBRAL et al., 2013; SOBRAL, 1993; TROPICOS, 2013).

De acordo com Souza e Lorenzi (2008) e Sobral (2003), a espécie possui a seguinte classificação taxonômica:

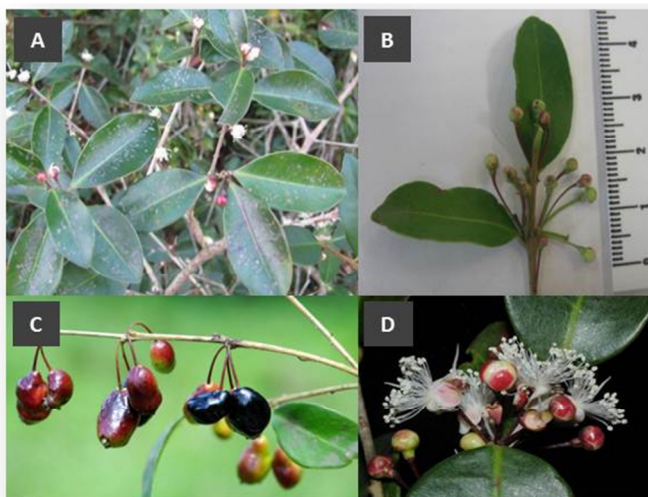
REINO: Plantae  
 DIVISÃO: Magnoliófitas  
 CLASSE: Magnoliopsida  
 ORDEM: Myrtales  
 FAMÍLIA: Myrtaceae  
 GÊNERO: *Eugenia*

Esta espécie ocorre nas matas ciliares da Serra do Cipó, no Estado de Minas Gerais, distribuindo-se até o Estado do Rio Grande do Sul, Argentina, Uruguai e Paraguai (KAWASAKI, 1989; REITZ; LEGRAND; KLEIN, 1967-1971). A descrição botânica da espécie, segundo Sobral (2003, p. 61), é:

Arbusto 1-3 m. Plantas glabras. Córtex rugoso. Folhas elípticas, elíptico-obovadas ou elíptico-ovadas, raro lanceoladas ou arredondadas, 35-70 x 18-35 mm, discolores na natureza e em material herborizado; ápice obtuso ou agudo; base obtusa ou cuneada, nervura secundária 6-12 pares, pouco evidentes na face adaxial e visíveis, eventualmente salientes, na abaxial; nervura marginal 1,5-2 mm da borda, esta com um espessamento amarelado na natureza e acastanhado em material herborizado de 0,2-0,3 mm; pecíolos 2-3 x 0,8-1 mm. Inflorescências fascículos ramifloros ou eventualmente axilares,

2-6 flores, com eixo até 1 x 1 mm; pedicelos 5-10 x 0,2-0,3 mm; bractéolas ovadas ou arredondadas, 0,7-0,9 x 0,6-0,7 mm, persistentes na antese; botões florais globosos, estritados junto ao ovário e com o globo das pétalas visível sobre os lobos do cálice, estes ovados ou arredondados, desiguais, os externos 0,7-1 x 1-1,5 mm, os internos 1,3-2 x 1,8-2 mm. Frutos oblongos, 10-15 x 5-8 mm, azul-escuros ou negros quando maduros.

Figura 3. Aspecto das folhas (A e B), frutos (C), flores e botões florais (D) de *E. hiemalis*.



Fonte: Imagens A, C e D (GIEHL, 2015); imagem B (foto da autora).

Do ponto de vista fitoquímico, poucos trabalhos foram encontrados na literatura. O interesse pela investigação da espécie surgiu durante um projeto de triagem de peróxidos em plantas (SCHENKEL et al., 2002). As substâncias isoladas dos extratos de *E. hiemalis* encontram-se na Figura 4. Do extrato diclorometano das folhas, foram isolados primina [1], acetato de miconidina [2], outra benzoquinona com cadeia lateral n-pentila [3] e metil-olivetol [4] (FALKENBERG, 1996), sendo que primina apresentou atividade contra células leucêmicas KG-1a (EFFERTH et al., 1996) e seria também a responsável pela

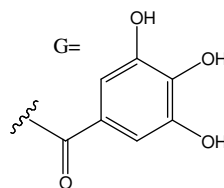
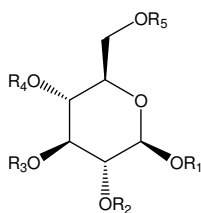
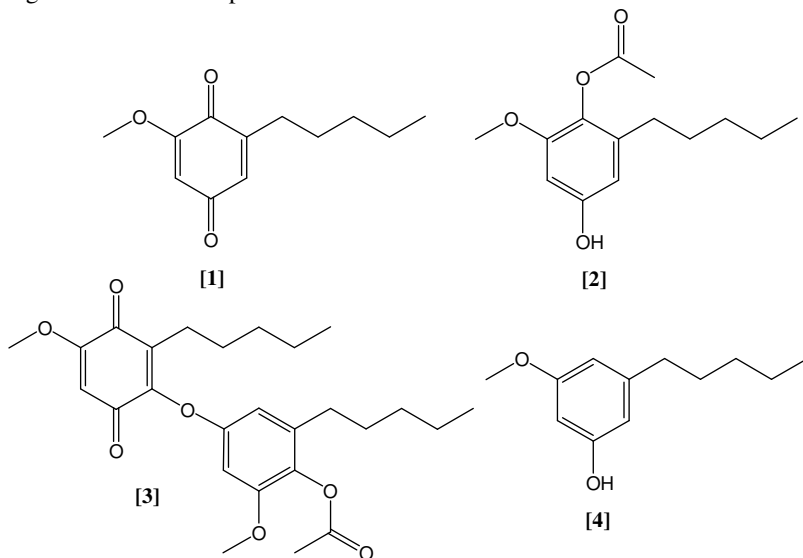
positividade para peróxidos, pelo elevado potencial de oxirredução (SCHENKEL et al., 2002).

No âmbito de outro trabalho, com extratos orgânicos de *E. hiemalis* (planta inteira, com exceção das raízes) coletada no Paraguai, foram isoladas três novas galo-arbutinas (denominadas hiemalosídeos A [5], B [6] e C [7]), e mais nove compostos conhecidos: 2-*O*-galoil-arbutina [8], 4-*O*-galoil-arbutina [9], 2,6-di-*O*-galoil-arbutina [10], 2,4,6-tri-*O*-galoil-arbutina [11], 1,2,6-tri-*O*-galoil- $\beta$ -*D*-glicose [12], canferol-3-*O*-(6-*O*-galoil- $\beta$ -*D*-glicopiranosídeo) [13], afzelina-3''-*O*-galato [14], afzelina-2''-*O*-galato [15] e quercitrina [16]. Esses compostos foram testados contra as enzimas RNase H de humanos, *Escherichia coli*, HIV-1 e HIV-2. Nenhum dos compostos inibiu a enzima RNase H de *E. coli* até a concentração de 10  $\mu$ g/mL, porém todos foram ativos contra a enzima RNase H de HIV-2, com exceção de 2-*O*-galoil-arbutina e 4-*O*-galoil-arbutina (BOKESCH et al., 2008).

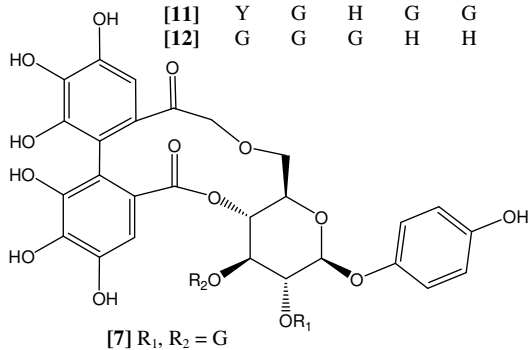
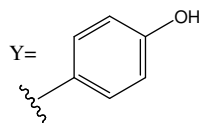
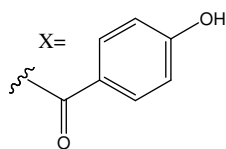
Além disso, Apel e colaboradores (2004) analisaram a composição química do óleo essencial das folhas de *E. hiemalis* coletada no Rio Grande do Sul, identificando 21 compostos, com predominância de sesquiterpenos cíclicos não-funcionalizados e tendo como componente majoritário biciclogermacreno, seguido de  $\beta$ -cariofileno e germacreno D.

Monks e colaboradores (2002) avaliaram a atividade antitumoral de várias espécies vegetais, entre elas *E. hiemalis*. Os extratos aquoso e orgânico (etanólico) das sementes da espécie foram avaliados contra as linhagens HT29 (adenocarcinoma de cólon humano) e NCI-H460 (carcinoma de pulmão humano de células não-pequenas), porém não se mostraram ativos nas concentrações testadas.

Figura 4. Substâncias previamente isoladas de extratos de *E. hiemalis*.

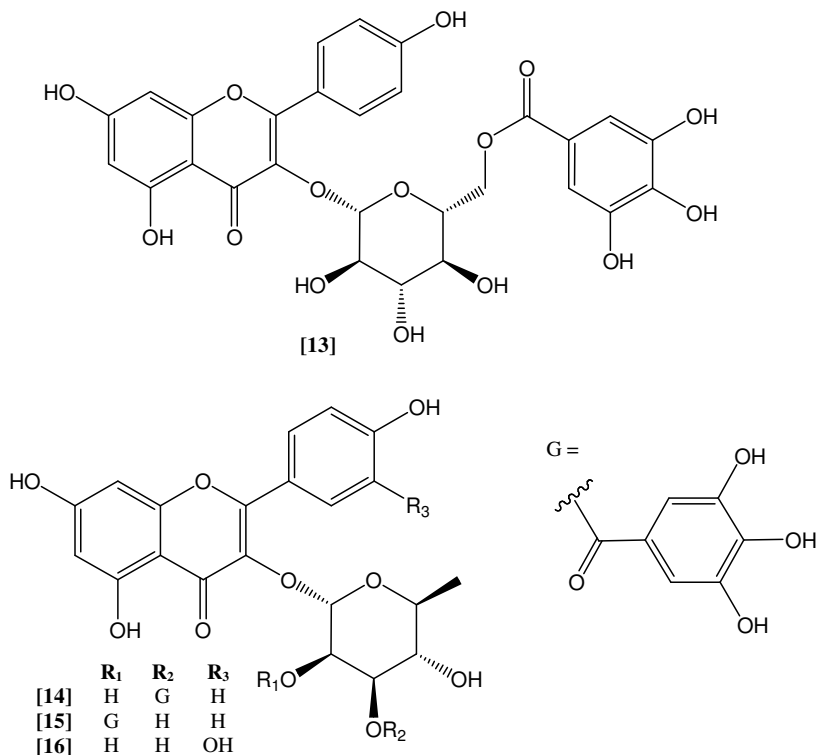


	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$
[5]	Y	G	G	H	G
[6]	Y	G	H	H	X
[8]	Y	G	H	H	H
[9]	Y	H	H	G	H
[10]	Y	G	H	H	G
[11]	Y	G	H	H	G
[12]	G	G	G	H	H



[7]  $R_1, R_2 = G$

Figura 4. (Continuação) Substâncias previamente isoladas de extratos de *E. hiemalis*.



#### 1.2.4 Doença de Alzheimer e atividade anticolinesterásica

A Doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência em idosos, observando-se sintomas relacionados ao declínio cognitivo e mental, devido à perda de neurônios em diferentes regiões do cérebro (MATA et al., 2007). Estima-se que cerca de trinta e cinco milhões de pessoas no mundo possuem demência, sendo que a maior parte deve-se à DA (WEINER et al., 2010).

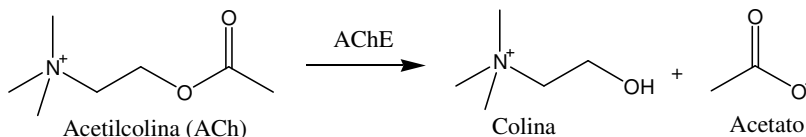
A DA não é mais considerada uma doença com causa totalmente desconhecida (LLORET; GIRALDO; VIÑA, 2011), existindo diversos trabalhos relacionando fatores que levam ao processo neurodegenerativo (CHRISTEN, 2000). Uma das teorias existentes faz



referência à acumulação de proteína  $\beta$ -amiloide no tecido cerebral, com consequente formação das chamadas placas senis (AXELSEN; KOMATSU; MURRAY, 2011), nas quais há também a deposição de filamentos de proteína Tau (WEINER et al., 2010). O dano oxidativo também tem sido relacionado com a perda de neurônios, sendo os processos oxidativos sobre o DNA mitocondrial e nuclear superiores em portadores de DA quando comparados à pacientes idosos sem esta condição (CHRISTEN, 2000; LLORET; GIRALDO; VIÑA, 2011).

Atualmente, não há nenhum medicamento disponível que retarde ou bloqueie o processo neurodegenerativo na DA, porém, alguns medicamentos que melhoram a sintomatologia foram aprovados. Seu mecanismo de ação está baseado no aumento de neurotransmissores do cérebro, como a acetilcolina, que se encontra em baixas concentrações na região do hipocampo e córtex em portadores de DA (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2013; NADRI et al., 2010). Após ser liberada na região de sinapse, a acetilcolina (ACh) é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetato (MATA et al., 2007) (Figura 5), e, portanto, a inibição da enzima acetilcolinesterase é uma das formas encontradas para aumentar os níveis deste neurotransmissor no cérebro.

Figura 5. Atividade catalítica da enzima acetilcolinesterase (AChE).



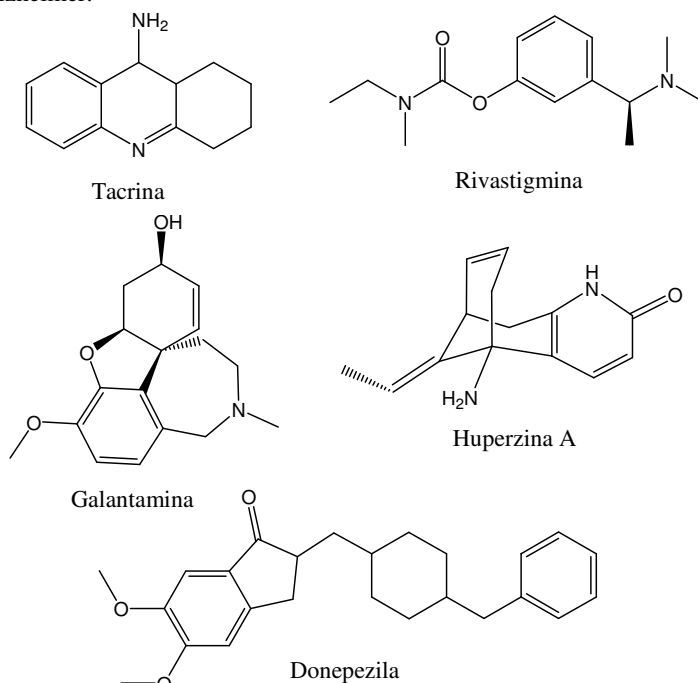
Fonte: Silva et al. (2014) (modificado).

Tacrina, rivastigmina, galantamina (alcaloide isolado de *Galanthus nirvalis*) e donepezila (Figura 6) são inibidores da enzima acetilcolinesterase que, juntamente com a memantina (antagonista dos receptores NMDA), são os únicos fármacos atualmente aprovados pelo FDA para o tratamento da DA (SILVA et al., 2014). No entanto, muitos fármacos têm causado diversos efeitos adversos, como toxicidade hepática e distúrbios gastrointestinais; além disso, estão disponíveis no mercado a preços relativamente elevados.

Assim, novas substâncias mais seguras e ativas, oriundas de produtos naturais, têm recebido atenção nos últimos anos (AKTUMSEK et al., 2013; TREVISAN et al., 2006). Huperzina-A (Figura 6), um alcaloide com atividade anticolinesterásica isolado de *Huperzia serrata*

(Thumb.) (Lycopodiaceae), está em fase de ensaios clínicos e tem se mostrado promissor para o tratamento paliativo de DA, sendo já utilizado para este fim na China (MEHTA; ADEM; SABBAGH, 2012; SILVA et al., 2014).

Figura 6. Fármacos aprovados e em fase de testes para o tratamento da doença de Alzheimer.



Fonte: Silva et al. (2014).

### 1.2.5 Molicutes

Os molicutes são um grande grupo de microrganismos peculiares, pertencentes à classe *Mollicutes* (do latim *mollis* = mole e *cutis* = pele) e responsáveis por várias doenças nos animais, nas plantas e no homem. São considerados os menores microrganismos capazes de autorreplicação, e são distintos das demais bactérias devido à ausência de parede celular e genoma reduzido (RAZIN; HAYFLICK, 2010; RAZIN, 1985).

Os gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, espécies de maior interesse clínico, podem ser classificadas em fermentadores e não-

fermentadores (RAZIN, 2006). Os fermentadores produzem ácidos por meio da metabolização da glicose diminuindo o pH do meio de cultivo, como por exemplo *M. pneumoniae* (WAITES; TALKINGTON, 2004). Os não-fermentadores, como *M. hominis*, possuem a via da arginina desidrolase como modo de obter ATP, a qual resulta também na produção de amônia, aumentando o pH do meio (BENFATTI et al., 2010; RAZIN; HAYFLICK, 2010). Além disso, alguns micoplasmas são capazes de utilizar ambas as vias, como *M. fermentans* (OLSON et al. 1993, apud RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Outros ainda não utilizam nenhuma das vias, como é o caso de *Ureaplasma* sp., que necessita de uréia (único entre os organismos vivos) para produzir ATP, hidrolisando este composto e produzindo amônia (BENFATTI et al., 2010; RAZIN; HAYFLICK, 2010).

Quanto aos mecanismos de patogenicidade, muitos mollicutes aderem ao tecido epitelial do trato respiratório ou urogenital, e raramente invadem os tecidos. Contudo, com o aumento da incidência de pacientes imunocomprometidos (devido a AIDS, transplantes de órgãos, etc.), alguns mollicutes têm se localizado no interior das células (RAZIN, 2006).

Cerca de 17 espécies de mollicutes já foram descritas em seres humanos (WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005), sendo que ao menos cinco são consideradas patogênicas: *M. pneumoniae* no trato respiratório, causando principalmente pneumonia atípica primária (RAZIN, 2006), *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* e *U. parvum* no trato urogenital, onde são associadas a casos de DST (BENFATTI et al., 2010; JOHANSSON; PETTERSSON, 2002), bem como infertilidade (CORDOVA et al., 2010). Além disso, estas espécies podem se localizar nos olhos, glândulas mamárias e articulações (RAZIN, 2006).

Infecções por micoplasmas também são uma grande preocupação na medicina veterinária, uma vez que estão associadas ao prejuízo econômico, pois podem ocorrer em animais de produção, incluindo bovinos, caprinos, suínos e frangos (ARJOON; SAYLOR; MAY, 2012; NICHOLAS, 1998), como é o caso de *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc) e *M. capricolum*, principais patógenos de cabras (SZEREDI; TENK; DÁN 2003).

Uma vez que estes microorganismos são desprovidos de parede celular (SIRAND-PUGNET et al., 2007), antibióticos que atuam sobre a mesma, como penicilinas, cefalosporinas e outros, não são eficazes. Na clínica apenas algumas classes de agentes antimicrobianos são úteis para o tratamento de infecções causadas por estes patógenos em seres

humanos, como o grupo macrolídeo-lincosamina-estreptogramina (MLS), tetraciclina e algumas quinolonas (BÉBÉAR; BÉBÉAR, 2002; RAZIN, 2006; SAMRA; ROSENBERG; SOFFER, 2002), bem como cetolídeos (nova classe de antibióticos derivada da eritromicina) (BÉBÉAR; BÉBÉAR, 2002). Fluoroquinolonas e cloranfenicol também são ativos, sendo este último utilizado apenas em casos especiais. Ainda, aminoglicosídeos podem ser utilizados para eliminar contaminações por micoplasmas em culturas celulares (DREXLER; UPHOFF, apud BÉBÉAR; BÉBÉAR, 2002).

Somando-se à baixa disponibilidade de antibióticos terapêuticamente úteis, mecanismos de resistência têm sido observados. Estes se desenvolvem por meio de mutações genéticas, pela aquisição dos genes de resistência, ou por efluxo do agente antimicrobiano (RAZIN, 2006), bem como a internalização celular, que oferece proteção contra o sistema imune do hospedeiro, bem como contra agentes antimicrobianos (ROTTEM, 2003).

Assim, torna-se importante a busca de novos fármacos para o tratamento de infecções causadas por mollicutes, e os produtos naturais têm se mostrado promissores neste sentido. Algumas espécies, como *Hydrastis canadensis*, *Astragalus membranaceus*, *Sambucus nigra*, *Origanum vulgare* (ARJOON; SAYLOR; MAY, 2012) e *Anoigeissus leiocarpus* (MURAINA; PICARD; ELOFF, 2009) apresentaram bons resultados para os extratos, porém nenhum composto puro foi testado.

### **1.2.6 Radicais livres e atividade antioxidante**

Nas últimas décadas foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas (como Doença de Alzheimer e Parkinson), diabetes, etc., bem como no envelhecimento (AMIR et al., 2011; RAJENDRAN et al., 2014). Moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos contendo um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (RAO et al., 2011).

Os processos fisiológicos originam continuamente radicais livres, sendo estes importantes fisiologicamente, participando de diversas funções no organismo, como a fagocitose, apoptose, processos de sinalização e diferenciação celular e estão envolvidos na síntese e regulação de certas proteínas (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, apud RAJENDRAN et al., 2014). No entanto, quando presentes em concentração acima daquelas consideradas

normais, podem provocar danos celulares, atacando estruturas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos, causando alterações funcionais e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos (CHEN; HU; WANG, 2012).

Quando estas moléculas provêm do metabolismo do nitrogênio, denominam-se “espécies reativas de nitrogênio”, como por exemplo, óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO<sup>•</sup>) e nitrila (ON<sup>•</sup>) (POON et al., 2004). Contudo, como em sua maioria são derivadas do metabolismo do oxigênio, designam-se estas de “espécies reativas de oxigênio” (ERO) (RAO et al., 2011). Entre as ERO de maior importância no organismo, destacam-se o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e os radicais hidroxila (OH<sup>•</sup>), alcóxila (RO<sup>•</sup>) e peróxila (ROO<sup>•</sup>) (CHEN; HU; WANG, 2012). O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), apesar de não serem radicais livres, podem induzir reações radicalares no organismo e por isso são considerados também como espécies reativas (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Sob condições de estresse, os seres vivos produzem mais ERO do que substâncias antioxidantes capazes de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas. Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparadas à do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (NIKI, 2010). O antioxidante atua de tal forma que, ao colidir com o radical livre, cede um elétron, oxidando-se por sua vez e transformando-se em um radical livre fraco não tóxico (VILLANUEVA-TIBURCIO; CONDEZO-HOYOS; ASQUIERI, 2010).

O delicado balanço entre as substâncias antioxidantes e os radicais livres é um aspecto muito importante para a manutenção da vida, e este mecanismo é chamado de “regulação redox”. Este processo protege os organismos vivos contra o estresse oxidativo e mantém a chamada “homeostasia redox” (VALKO et al., 2007).

Nos seres vivos, os sistemas antioxidantes podem ter origem endógena, constituindo-se de um conjunto de enzimas, como superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, catalase, entre outras (RAO et al., 2011), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Neste caso, podem-se citar os polifenóis, entre eles ácidos fenólicos, estilbenos, taninos, ligninas e flavonoides (antocianinas, flavonas, flavonóis, flavan-3-óis e etc.), que são antioxidantes naturais obtidos a partir da dieta com frutas e verduras (BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013; SOUSA et al., 2007).

O potencial antioxidante destas moléculas é devido, principalmente, as suas propriedades redutoras, possibilitando a

neutralização dos radicais livres (ZHENG; WANG, 2001). Entre os fatores que podem influenciar na atividade antioxidante apresentada pelos compostos fenólicos, o número e a posição de hidroxilas presentes na molécula têm se mostrado bastante relevantes (SKERGET et al., 2005).

De maneira geral, compostos antioxidantes podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos e também na medicina, sendo que muitas vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (SINDHI et al., 2013). Vários antioxidantes sintéticos, como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) estão comercialmente disponíveis, porém o uso dos mesmos atualmente está restrito devido aos seus efeitos carcinogênicos (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Estes achados têm estimulado o desenvolvimento de pesquisas para a obtenção de novos antioxidantes, como aqueles de origem natural.

Substâncias como o ácido ascórbico e o  $\alpha$ -tocoferol já são amplamente utilizadas com finalidades diversas (antioxidantes, estabilizadores de formulações, mas também visando efeitos terapêuticos). Seu caráter “vitamínico” e a facilidade de obtenção de fontes diversas contribuem para o seu sucesso (SINDHI et al., 2013). Outras, de descoberta mais recente, como o resveratrol, composto fenólico da classe dos estilbenos, também vem sendo amplamente estudadas (CARRIZZO et al., 2013).

Assim como estes exemplos de “fármacos multifuncionais”, é possível que outras substâncias de origem natural venham a ser caracterizadas e possam ser incorporadas ao “arsenal terapêutico” no tratamento de patologias diversas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar do ponto de vista químico e biológico metabólitos secundários presentes nas partes aéreas de *Eugenia hiemalis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a avaliação de atividades biológicas (antioxidante, anticolinesterásica e antibacteriana contra espécies de mollicutes) de diferentes extratos brutos das folhas, galhos e botões florais de *E. hiemalis*;
- Realizar o fracionamento bioguiado dos extratos com melhores perfis de atividade;
- Isolar metabólitos secundários presentes nas frações mais ativas e avaliar a sua atividade;
- Identificar ou elucidar a estrutura dos metabólitos isolados, através de métodos espectroscópicos;
- Analisar a variação sazonal da composição química dos óleos e avaliar a atividade biológica.





### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A investigação fitoquímica foi desenvolvida no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais do CIF/CCS/UFSC, incluindo os experimentos de extração, fracionamento, isolamento e purificação de compostos. Os espectros de UV/Vis e IV foram obtidos nos laboratórios de Química Farmacêutica e Farmacognosia do CIF/CCS/UFSC. Os espectros de RMN foram obtidos através de parceria com o professor Dr. Vassilios Roussis (Divisão de Farmacognosia e Química de Produtos Naturais) da Universidade de Atenas e com a Prof<sup>ª</sup>. Rosângela de Almeida Epifânio e a Prof<sup>ª</sup>. Alessandra Leda Valverde (Instituto de Química) da Universidade Federal Fluminense.

A avaliação das atividades biológicas e análise química dos óleos essenciais por CG-EM e CG-DIC foram realizadas na Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB) através de parceria com a prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Michele Debiasi Alberton (Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais), Prof. Dr. Caio Maurício de Cordova (Laboratório de Pesquisa em Bioanálises) e o prof. Dr. Edésio Luiz Simionatto (Laboratório de Cromatografia).

#### 3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

##### 3.1.1 Material vegetal

As partes aéreas de *Eugenia hiemalis* utilizadas para os procedimentos de avaliação biológica foram coletadas em abril de 2013 no município de Porto Alegre, próximo a Itapuã (Rio Grande do Sul, Brasil) (Figura 7). A identificação foi realizada pelo Prof. Dr. João André Jarenkow (Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS). Uma exsicata (ICN 127910) foi depositada no Herbário Instituto de Ciências Naturais da UFRGS.

As folhas de *E. hiemalis* utilizadas para fins de obtenção do óleo essencial foram coletadas em cada uma das estações do ano, entre 2013 e 2014, no município de Blumenau (Santa Catarina, Brasil) (Figura 7). A identificação foi realizada pelo botânico Morilo José Rigon Junior (Herbário Dr. Roberto Miguel Klein, Fundação Universidade Regional de Blumenau - FURB). Uma exsicata (FURB 41952) foi depositada no Herbário Dr. Roberto Miguel Klein da FURB.

Figura 7. Locais das coletas de *E. hiemalis* para os procedimentos de avaliação bioguiada (1) e obtenção do óleo essencial (2).



Fonte: Google Earth™

### 3.1.2 Solventes, adsorventes e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados para a extração, análise por cromatografia em camada delgada (CCD) e para fracionamento cromatográfico foram de grau analítico, de procedência Synth® e Vetec®.

Para cromatografia líquida a vácuo (CLV), cromatografia em coluna aberta (CCA) e cromatografia líquida de média pressão (CLMP), foi utilizado gel de sílica 60 de procedência Vetec®, com tamanho de partículas na faixa de 0,04–0,063 mm. Para CCDs foram utilizadas cromatoplasacas de alumínio de gel de sílica 60 F-254, da marca Macherey-Nagel®. Purificação por cromatografia de gel-exclusão foi realizada com resina de Sephadex® LH-20.

Os reagentes utilizados para revelação cromatográfica em CCD foram: anisaldeído-sulfúrico, vapor de amônia e Craven (CRAVEN, 1931), preparados a partir de reagentes de grau analítico. Os solventes utilizados para a obtenção dos espectros de UV-Vis foram de grau analítico; para obtenção dos espectros de RMN foi utilizado clorofórmio deuterado.

### 3.1.3 Equipamentos

Os extratos e as frações obtidas nos procedimentos cromatográficos foram concentrados em rotaevaporador da marca Büchi®. Para fracionamento, utilizou-se sistema de cromatografia líquida de média pressão (CLMP) tipo Sepacore/Syncore®. As placas de CCD foram reveladas sob luz ultravioleta (254 nm e 366 nm) em câmara de revelação modelo Prodicil® VA 50. O ponto de fusão dos compostos isolados foi determinado em aparelho Microquímica® MQAPF-301.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em equipamento Bruker modelo DRX 400. Os espectros foram calibrados através do pico do solvente utilizado para a análise.

Os espectros na região de infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro modelo Prestige-21 Shimadzu®, utilizando pastilhas de KBr. Os espectros na região de ultravioleta-visível (UV-Vis) foram obtidos em espectrofotômetro PerkinElmer® Lambda 10. Para a avaliação das atividades biológicas, foi utilizado espectrofotômetro modelo Micronal® B582 e capela de fluxo laminar Valiclean® Bioprotector 211.

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em cromatógrafo gasoso Shimadzu® GCMS-QP2010 Plus, acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu® GC-FID2010.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Obtenção dos extratos e seleção de frações para avaliação de atividades biológicas

As folhas, galhos e botões florais foram rasurados e submetidos ao procedimento de maceração com diclorometano, separadamente. Após sete dias, os extratos obtidos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, à temperatura inferior a 40 °C, originando os extratos diclorometânicos de cada farmacógeno (EDF, EDG e EDB, para as folhas, galhos e botões florais, respectivamente). Os resíduos da primeira maceração foram re-extraídos duas vezes com metanol, originando os extratos metanólicos (EMF, EMG e EMB, para as folhas, galhos e botões florais, respectivamente).

Todos os extratos brutos obtidos foram avaliados nos modelos de atividade anticolinesterásica, antibacteriana e antioxidante, conforme descrito nos itens subsequentes, sendo os mais ativos submetidos ao fracionamento cromatográfico, e suas frações reavaliadas. A Figura 8

apresenta o esquema geral dos procedimentos adotados neste trabalho com relação à preparação dos extratos brutos e fracionamentos bioguiados dos mesmos.

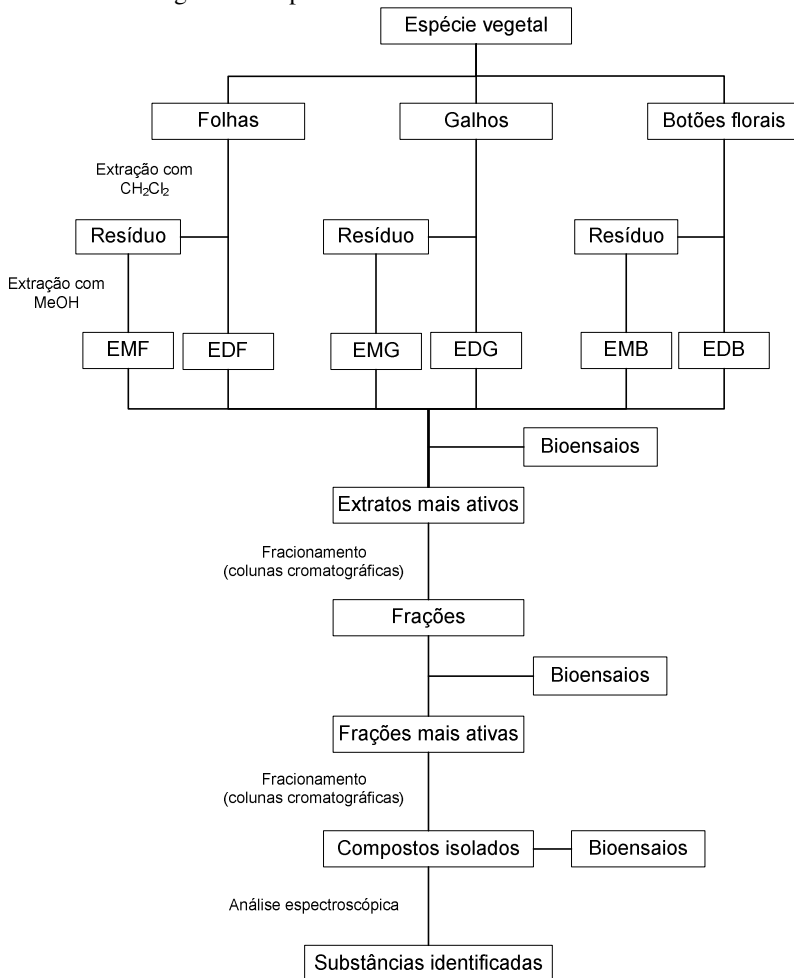
Após o fracionamento cromatográfico dos extratos brutos, a frações cujos rendimentos eram considerados viáveis para continuidade do trabalho foram priorizadas na avaliação de atividades biológicas. Devido à retirada de alíquotas para tal avaliação, as quantidades de fração efetivamente utilizadas na sequência do fracionamento sempre foram inferiores às quantidades obtidas.

### **3.2.2 Procedimentos de fracionamento**

Os extratos brutos e as frações foram submetidos a procedimentos de separação cromatográfica por adsorção em cromatografia líquida a vácuo (CLV), cromatografia líquida de média pressão (CLMP) e cromatografia em coluna aberta (CCA), utilizando-se gel de sílica 60. Para algumas frações a separação cromatográfica foi realizada por exclusão, utilizando-se a resina Sephadex<sup>®</sup> LH-20 em cromatografia em coluna aberta (CCA). Todas as frações obtidas foram nomeadas Xy-z, onde X corresponde ao nome da coluna, e “y” e “x” aos limites do intervalo de frações reunidas. As análises em CCD foram realizadas sob luz ultravioleta, em 254 e 366 nm, foi utilizado como revelador anisaldeído-sulfúrico, mas em alguns casos, reagente de Craven (CRAVEN, 1931) e vapor de amônia foram empregados.

Para melhor compreensão da sequência adotada no esquema bioguiado, este será descrito juntamente com os resultados dos testes biológicos. Informações referentes aos procedimentos cromatográficos adotados em cada uma das colunas estão descritos no Apêndice A.

Figura 8. Procedimentos adotados na obtenção dos extratos brutos e fracionamento bioguiado das partes aéreas de *E. hiemalis*.



### 3.2.3 Análise espectroscópicas no UV/Vis com reagentes de deslocamento

As análises espectroscópicas no UV/Vis com reativos de deslocamento foram realizados conforme procedimentos descritos por Mabry, Markham e Thomas (1970). Estes ensaios visam auxiliar na identificação da estrutura de flavonoides, com base no comportamento

dos mesmos sob a radiação ultravioleta após a adição de alguns reagentes. Para isso, foram preparadas soluções das amostras em 0,01 mg/mL de metanol, e obtido o espectro original em espectrofotômetro UV/Vis, observando-se os  $\lambda_{\text{máx}}$ . Esta solução original foi dividida em três alíquotas de 2 mL, adicionando-se os reativos de deslocamento, conforme detalhado abaixo:

a) A 2 mL da solução original foram adicionadas 3 gotas da solução de NaOMe (2,5 g de NaOMe em 100 mL de metanol) obtendo-se os espectros imediatamente e após 5 min, observando se houve decomposição;

b) Foram adicionadas 6 gotas de solução de  $\text{AlCl}_3$  (5,0 g de  $\text{AlCl}_3$  em 100 mL de metanol) a 2 mL da solução original da amostra, obtendo-se vários espectros até que os  $\lambda_{\text{máx}}$  estivessem estáveis. Após isto, foram adicionadas 3 gotas de solução de HCl ( $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$ , 1:2) e obteve-se um novo espectro;

c) Foi adicionado acetato de sódio R a 2 mL da solução original, formando uma camada no fundo da cubeta. Obtiveram-se os espectros imediatamente e após 5 min, e, não havendo deslocamento, foi adicionado à esta solução ácido bórico R, realizando-se novamente a leitura.

Os resultados foram analisados segundo os critérios descritos por Mabry, Markham e Thomas (1970).

### **3.2.4 Análise colorimétrica em CCD com reagente de Craven**

O teste com reagente de Craven (cianoacetato de etila) (CRAVEN, 1931) foi realizado pela a adição de 2-3 gotas de cianoacetato de etila em uma solução alcoólica de hidróxido de amônia (1:1), e esta borrifada sobre o composto a ser testado em placa de CCD. A alteração de cor para tons de azul indica positividade para o teste.

### **3.2.4 Avaliação das atividades biológicas**

#### **3.2.4.1 Avaliação da atividade anticolinesterásica**

A inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase foi determinada utilizando-se o método descrito por Mata e colaboradores (2007). Para isso, foram incubadas, inicialmente, 100  $\mu\text{L}$  de diferentes concentrações das amostras com 325  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl (pH 8) e 25  $\mu\text{L}$  de uma solução de enzima contendo 0,28 U/mL, durante 15 minutos. Subsequentemente, 75  $\mu\text{L}$  de uma solução de AChI 0,023

mg/mL e 475 µL de reagente de Ellman 3mM (ou DTNB, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) foram adicionados. A mistura final foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente. A absorbância da mistura foi medida a 405 nm. Foi preparado um controle negativo com o solvente utilizado para dissolver as amostras (metanol) e um controle positivo com galantamina. A inibição foi calculada através da fórmula abaixo:

$$I (\%) = 100 - (A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}}) \times 100$$

Onde:

$A_{\text{amostra}}$  é a absorbância da amostra e  $A_{\text{controle}}$  é a absorbância do controle negativo. Todos os testes foram realizados em triplicata. A concentração da amostra responsável por inibir 50% da função enzimática ( $CI_{50}$ ) foi obtida plotando-se a percentagem de inibição contra a concentração das amostras avaliadas. A determinação da  $CI_{50}$  foi realizada com auxílio do programa Microcal Origin<sup>®</sup> 5.0.

#### 3.2.4.2 Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada por meio da técnica de microdilução em caldo, em placas de 96 micropoços, seguindo-se as recomendações específicas para micoplasmas e ureaplasmas (CLSI, 2011; BÉBÉAR; ROBERTSON, 1996). Foram utilizadas cepas padrão de *Mycoplasma hominis* (ATCC 23114), *M. mycoides* subsp. *capri* (NCTC 10137), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (ATCC 27343), *M. genitalium* (ATCC 33530), *M. pneumoniae* FH (ATCC 13883) e *Ureaplasma urealyticum* (ATCC 27618), mantidas sob refrigeração a -20 °C. As cepas de *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. mycoides* subsp. *capri* e *M. capricolum* subsp. *capricolum* foram cultivadas em meio de cultura SP-4 (TULLY, 1995), *M. hominis* em meio MLA (VELLECA; BIRD; FORRESTER, 1979) e *U. urealyticum* em meio U10 (SHEPARD, 1974). Todos os inóculos foram incubados a 37 °C ± 1 °C por 48-72 horas em microaerofilia (2-3 % de CO<sub>2</sub>), com exceção de *M. pneumoniae*, em que o tempo de inubação varia de 5-7 dias.

Os extratos brutos, frações, compostos isolados, bem como os óleos essenciais, foram testados a partir da concentração inicial de 1 mg/mL. Inicialmente, todas as amostras foram submetidas à diluição seriada no meio de cultivo específico para cada espécie bacteriana, por meio da adição em cada micropoço de 190 µL de meio e 10 µL das soluções das amostras nos primeiros micropoços (na concentração 4

mg/10 µL DMSO 100%). Em seguida, 100 µL foram transferidos para os poços adjacentes, com o objetivo de se obter diluição seriada de ordem dois. Logo após, foram adicionados 100 µL do inóculo bacteriano (em fase *log* de crescimento, contendo  $10^3$  microrganismos/mL). Adicionalmente, foi realizado um controle de esterilidade do meio (somente o meio de cultura), controle de crescimento bacteriano (meio de cultivo acrescido de inóculo bacteriano nas mesmas condições realizadas para as amostras), e controle positivo utilizando o antibiótico levofloxacino.

Ao final, 2 a 3 gotas de vaselina líquida foram adicionadas em todos os micropoços para criar um ambiente de microaerofilia. As placas foram incubadas da mesma forma descrita anteriormente para os inóculos. O crescimento bacteriano foi observado a partir da mudança de coloração do meio de cultura, devido à presença do indicador vermelho de fenol. Neste caso, *M. pneumoniae*, *M. genitalium* e *M. mycoides* subsp. *capri* e *M. capricolum* subsp. *capricolum* fermentam a glicose, acidificando o meio e fazendo com que haja uma mudança de coloração de rosa para amarelo (WAITES; TALKINGTON, 2004; TULLY et al., 1983). Já a espécie *M. hominis* promove a alcalinização do meio em seu crescimento por deaminação da arginina em amônia, alterando a cor de amarelo para rosa. Por fim, *U. urealyticum* degrada uréia em amônia e alcaliniza o pH do meio, fazendo com que haja uma mudança de cor do amarelo para o vermelho, indicando o crescimento (BENFATTI et al., 2010; RAZIN; HAYFLICK, 2010). A CIM (Concentração inibitória mínima) foi determinada como a menor concentração da amostra que inibe o crescimento bacteriano. Todas as amostras foram testadas em triplicata e todos os procedimentos foram realizados de maneira estéril em capela de fluxo laminar.

#### 3.2.4.3 Ensaios de avaliação da atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante foi preparada uma solução de cada amostra (soluções amostra), através da diluição das mesmas em metanol (1 mg/mL), sendo estas soluções utilizadas em todos os testes realizados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

##### 3.2.4.3.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método



descrito por Anagnostopoulou e colaboradores (2006). A 0,5 mL de uma solução da amostra, foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, foi adicionado 1,0 mL da solução saturada de carbonato de sódio, agitando-se e deixando a solução em repouso por 1 hora. Como branco foi utilizada uma solução preparada conforme descrito acima, porém, a solução amostra foi substituída por metanol. As absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 725 nm. Uma curva de calibração foi construída com solução de ácido gálico diluído em metanol, obtendo-se a equação da reta:  $y = 0,0074x - 0,0844$ ,  $r^2 = 0,9939$ . O teor de compostos fenólicos totais foi determinado em mg de ácido gálico/g de extrato seco (mg AG/g de extrato).

#### 3.2.4.3.2 Determinação do conteúdo de flavonoides

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada conforme método descrito por Woisky e Salatino (1998). A 0,5 mL da solução amostra foram adicionados 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de solução de  $AlCl_3$  2 %. Após 1 hora, as absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 415 nm. Utilizou-se como branco etanol e como controle negativo uma solução preparada a partir de 0,5 mL da solução da amostra, 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de água destilada. Uma curva de calibração foi construída com solução de quercetina diluída em metanol, obtendo-se a equação da reta:  $y = 0,0074x - 0,0347$ ,  $r^2 = 0,9967$ . O teor de flavonoides foi determinado em mg de quercetina/g de extrato (mg QUE/g de extrato).

#### 3.2.4.3.3 Determinação do potencial redutor

Este ensaio foi baseado no método de Price e Butler, proposto por Waterman e Mole (1994). A 100  $\mu$ L da amostra foram adicionados 8,5 mL de água destilada e 1,0 mL da solução de  $FeCl_3$  0,1 M, e, após 3 minutos, 1,0 mL da solução de ferricianeto de potássio 0,08 M. Após 15 minutos, foi realizada a leitura da absorvância da solução em espectrofotômetro a 720 nm. Utilizou-se como branco uma solução preparada conforme o procedimento acima, porém substituindo-se a amostra por 100  $\mu$ L de metanol. Uma curva de calibração foi feita utilizando-se solução de ácido ascórbico diluído em metanol, obtendo-se a seguinte equação da reta:  $y = 0,0019x + 0,0698$ ,  $r^2 = 0,9967$ . O potencial redutor das amostras foi expresso em mg de ácido ascórbico/g de amostra (mg de AA/g de extrato).

#### 3.2.4.3.4 Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazila) foi baseado no método descrito por Cavin e colaboradores (1998). Foram realizadas diluições seriadas das amostras e uma alíquota de 2 mL de uma solução de DPPH 0,004% foi adicionada às soluções preparadas (1 mL). Após 30 minutos, foi medida a absorbância das mesmas em espectrofotômetro UV-Vis (517 nm). Utilizou-se como branco metanol e foram realizados controles negativo (metanol + solução de DPPH 0,004 %) e positivo (ácido gálico). Os valores obtidos foram avaliados na forma de % de decréscimo da absorbância de DPPH em função da concentração da amostra teste, onde foi determinada a concentração da amostra necessária para reduzir 50 % do radical livre DPPH presente nas soluções testadas ( $CE_{50}$ ). A determinação da  $CE_{50}$  foi realizada com auxílio do programa Microcal Origin<sup>®</sup> 5.0.

#### 3.2.4.3.5 Determinação do potencial inibidor da peroxidação lipídica

A inibição da peroxidação lipídica foi avaliada através do modelo  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico descrito por Mokbel e Hashinaga (2006). Uma emulsão foi preparada com 3,0 mg de  $\beta$ -caroteno, 1,0 mL de  $CHCl_3$ , 45 mg de ácido linoleico e 215 mg de tween-80. O clorofórmio foi removido em evaporador rotatório, durante 4 minutos a 45 °C. À mistura resultante foram adicionados 6,0 mL de água destilada, sob agitação, para fazer a emulsão. A emulsão foi diluída para 100 mL com peróxido de hidrogênio 0,01 M. Alíquotas desta emulsão (4,0 mL) foram adicionadas a tubos contendo 0,2 mL das amostras. Como controle positivo foi utilizada uma solução de BHT na concentração de 1 mg/mL. Um controle negativo, contendo 0,2 mL de metanol e 4,0 mL da emulsão acima, também foi preparado. Todos os tubos foram colocados em banho-maria, a 50 °C, e as absorbâncias das soluções foram determinadas no tempo zero, e a cada 30 minutos, em espectrofotômetro a 470 nm, até a descoloração do tubo contendo o controle negativo (180 minutos). Como branco foi utilizada uma emulsão preparada como descrito acima, porém sem a presença de  $\beta$ -caroteno.

Os resultados dos ensaios foram expressos através de gráficos, onde foram cruzados os valores de absorbância das soluções em função do tempo de ensaio. A atividade antioxidante (potencial inibidor da

peroxidação lipídica, em porcentagem) (AA%) foi calculada através da seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 [1 - (A_0 - A_f) / (A_{n0} - A_{nf})]$$

Onde:  $A_0$  e  $A_f$  são as absorvâncias da amostra no tempo zero e após 180 minutos, respectivamente, e  $A_{n0}$  e  $A_{nf}$  são as absorvâncias do controle negativo no tempo zero e após 180 minutos, respectivamente.

### 3.2.5 Análise sazonal dos óleos essenciais

A análise sazonal da composição dos óleos essenciais das folhas de *E. hiemalis* foi realizada a partir de coletas realizadas nas quatro estações do ano, entre os anos de 2013 e 2014, na cidade de Blumenau (SC). Os óleos essenciais foram extraídos por arraste de vapor, em aparelho de Clevenger. Em um balão de fundo redondo, as folhas frescas foram aquecidas juntamente com água, até a ebulição, e mantendo-se a mesma por 4 horas (BRASIL, 2010). Depois de condensado, o vapor contendo o óleo foi recolhido em reservatório preenchido com água. O óleo obtido foi armazenado sob refrigeração até a análise química e biológica.

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do IPTB – FURB, em Blumenau, pela Dr<sup>a</sup>. Dilamara Riva Scharf, sob a supervisão do Prof. Dr. Edésio L. Simionatto. A análise do óleo essencial foi realizada em equipamento Shimadzu<sup>®</sup> com detector GCMS-QP2010 PLUS, coluna capilar apolar RTX<sup>®</sup>-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m). Como gás de arraste foi usado hélio, com fluxo constante de 1 mL/minuto. Usou-se temperatura programada de 60 °C (5 min), seguida do aumento de 3 °C/min até 240 °C (5 min); temperatura do injetor de 250 °C; 70 eV. A quantificação dos componentes foi realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC), utilizando um equipamento Shimadzu<sup>®</sup> GC-FID2010, coluna capilar apolar OV<sup>®</sup>-5 (30 m x 0,25 mm id x 0,25 mm), nas mesmas condições analíticas descritas anteriormente.

A identificação dos componentes foi baseada na biblioteca NIST 2008 (National Institute for Standards and Technology) e no cálculo dos índices de retenção (IR) para os compostos, juntamente com a comparação dos seus espectros de massa com a literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram obtidos pela co-injeção com uma

série de hidrocarbonetos lineares ( $C_{10} - C_{25}$ ) e calculados para cada composto a partir da fórmula:

$$IR = 100.Z + 100 (RX - RZ)/(RZ_{+1} - RZ)$$

Z = número de carbonos do hidrocarboneto com tempo de retenção inferior;

RX = tempo de retenção do composto a ser calculado;

RZ = tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente inferior ao tempo de retenção do composto a ser calculado;

$RZ_{+1}$  = tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente superior ao tempo de retenção do composto a ser calculado.

A variação quantitativa dos constituintes dos óleos nas diferentes estações foi analisada utilizando-se o coeficiente de variação. Os constituintes que não puderam ser quantificados foram considerados como traços e, para fins de cálculo de concentração, considerados iguais a 0 %. O coeficiente de variação foi calculado para os compostos presentes em pelo menos duas amostras.

Os dados referentes às condições climáticas da região onde foram realizadas as coletas foram obtidos junto ao Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (CIRAM/EPAGRI - Florianópolis-SC), e utilizados para fins de correlação com a análise fitoquímica dos óleos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS

Os resultados dos rendimentos obtidos para os extratos diclorometânicos e metanólicos das folhas, galhos e botões florais variaram entre 0,23 e 11,35 %, conforme pode ser observado na Tabela 1. O extrato das folhas apresentou o melhor rendimento absoluto e também percentual.

Tabela 1. Rendimentos dos extratos brutos de *E. hiemalis*.

<b>Farmacógeno</b>	<b>Massa do farmacógeno (g)</b>	<b>Extratos diclorometânicos g (%)*</b>	<b>Extratos metanólicos g (%)*</b>
<b>Folhas</b>	355,9	9,10 (2,56)	40,38 (11,35)
<b>Galhos</b>	109,9	0,25 (0,23)	5,58 (5,08)
<b>Botões florais</b>	27,8	0,49 (1,76)	1,94 (6,98)

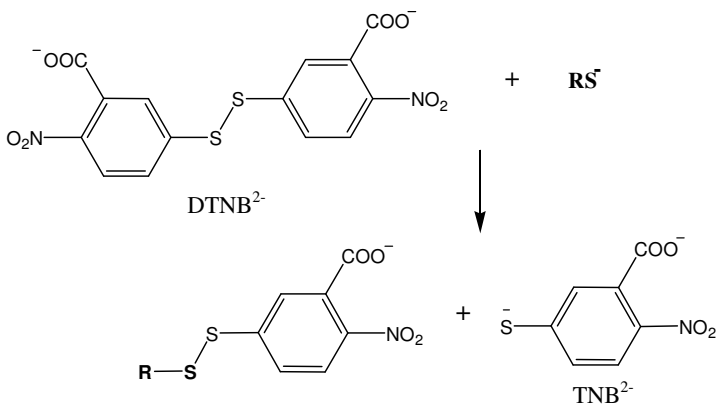
\* Calculados em g/100 g de farmacógeno utilizado na extração.

Na sequência serão apresentados os resultados do fracionamento bioguiado pelas atividades anticolinesterásica, antibacteriana e antioxidante. Para melhor compreensão do trabalho, cada seção apresenta um fluxograma próprio e a Figura 41 (Apêndice A) contém um fluxograma resumindo todos os procedimentos cromatográficos realizados, com os respectivos compostos isolados.

### 4.2 ESTUDO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

O ensaio para avaliação da atividade anticolinesterásica foi realizado por meio da utilização do reagente de Ellman, usado na quantificação de grupos sulfidríla. A reação baseia-se na medida da produção da tiocolina através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina, originando acetato e tiocolina. Esta reage com o reagente de Ellman (DTNB), rompendo a ligação dissulfeto, e originando 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB<sup>-</sup>), o qual se ioniza em TNB<sup>2-</sup> (diânion) em pH alcalino, produzindo uma cor amarela, com máximo de absorção em 405 nm. A Figura 9 apresenta um esquema geral da reação do reagente de Ellman com um substrato (RS<sup>-</sup>) (KOMERSOVÁ; KOMERS; CEGAN, 2007; RIDDLES; BLAKELEY; ZERNER, 1979).

Figura 9. Reação do reagente de Ellman (DTNB<sup>2-</sup> na forma iônica) com a tiocolina.



Fonte: Riddles; Blakeley; Zerner (1979).

Os resultados obtidos neste ensaio estão demonstrados na Tabela 2, sendo expressos na forma de  $CI_{50}$ , ou seja, a concentração da amostra necessária para inibir 50 % da atividade enzimática. Como referência, foi utilizado um controle positivo, o fármaco galantamina.

Pode-se observar que os melhores resultados foram encontrados para os extratos diclorometânicos: inicialmente o extrato dos botões florais EDB ( $CI_{50} = 199,09 \pm 2,25 \mu\text{g/mL}$ ), seguido pelo extrato dos galhos EDG ( $CI_{50} = 395,23 \pm 3,23 \mu\text{g/mL}$ ) e EDF ( $CI_{50} = 506,63 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$ ). Verifica-se também que nenhum dos extratos metanólicos foi ativo ( $CI_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ ).

Devido ao baixo rendimento do extrato EDG (ver Tabela 1), foram selecionadas para a continuidade dos estudos apenas os extratos EDF e EDB.

Tabela 2. Resultados\* da avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos, frações e compostos isolados de *E. hiemalis*.

	<b>CI<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
<b>Extratos</b>	
<b>EDF</b>	506,63 ± 0,48
<b>EMF</b>	> 1000
<b>EDG</b>	395,23 ± 3,23
<b>EMG</b>	> 1000
<b>EDB</b>	199,09 ± 2,25
<b>EMB</b>	> 1000
<b>Frações EDF**</b>	
<b>A-3</b>	> 1000
<b>A-5</b>	11,12 ± 0,06
<b>A-6</b>	> 1000
<b>A-7</b>	618,36 ± 2,10
<b>A-8</b>	> 1000
<b>A-13</b>	> 1000
<b>A-14</b>	> 1000
<b>Compostos isolados</b>	
<b>de A-8: GE1</b>	> 1000
<b>de A-5 e A-7: GE2</b>	9,05 ± 0,09 (43,45 µM)
<b>Galantamina</b>	2,17 ± 0,04 (7,55 µM)

\* Os resultados são expressos como média ± desvio padrão da média (n = 3).

\*\* As frações 1, 2, 10, 11, 12 e 15 do extrato EDF não foram avaliadas devido aos baixos rendimentos. As frações 4 e 9 não foram avaliadas por apresentarem perfis semelhantes as frações 3 e 8, respectivamente.

#### 4.2.1 Fracionamento do extrato EDF

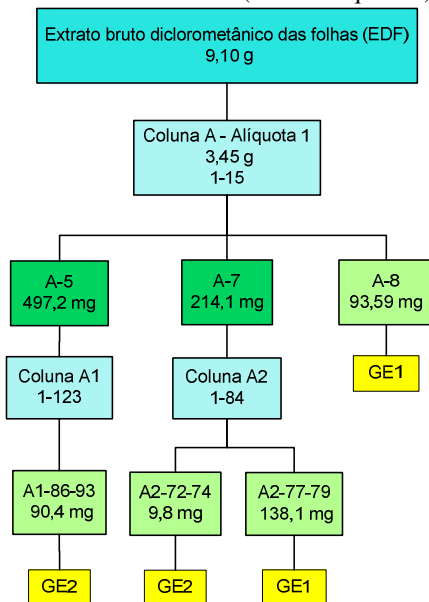
O extrato EDF foi submetido ao fracionamento cromatográfico (Coluna A – Alíquota 1) originando 15 frações (Figura 10). Destas, algumas foram selecionados para avaliação da atividade biológica, conforme rendimentos de peso e perfil em CCD. Este procedimento cromatográfico levou ao isolamento da substância majoritária GE1 (correspondente à fração A-8), porém, inativa neste ensaio (CI<sub>50</sub> > 1000 µg/mL) (Tabela 2).

As frações que obtiveram os melhores resultados foram A-5 (CI<sub>50</sub> = 11,12 ± 0,06 µg/mL) e A-7 (CI<sub>50</sub> = 618,36 ± 2,10 µg/mL), sendo ambas submetidas ao fracionamento cromatográfico (Colunas A1 e A2, respectivamente).

Da fração A-5 foi isolada a substância GE2 na fração A1-86-93, que apresentou reação positiva com o reagente de Craven (CRAVEN, 1931). Esta substância é majoritária na fração A-5 e estava presente com menor grau de pureza em outras frações da coluna A1, justificando o fato dos valores de  $CI_{50}$  da fração A-5 e de GE2 serem tão próximos. GE2 apresentou atividade anticolinesterásica ( $CI_{50} = 9,05 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$  ou  $43,45 \mu\text{M}$ ) relativamente próxima ao valor apresentado pela galantamina ( $CI_{50} = 2,17 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$  ou  $7,55 \mu\text{M}$ ) (Tabela 2).

Da fração A-7 foi isolada a substância GE1 na fração A2-77-79, e GE2 na fração A2-72-74, como componente minoritário. Dessa forma, a baixa concentração de GE2 na fração A7 justifica a maior atividade apresentada pela fração A-5, que possui como composto majoritário a substância GE2, com atividade anticolinesterásica.

Figura 10. Procedimentos adotados no fracionamento do extrato bruto diclorometânico das folhas de *E. hiemalis* (EDF – alíquota 1).



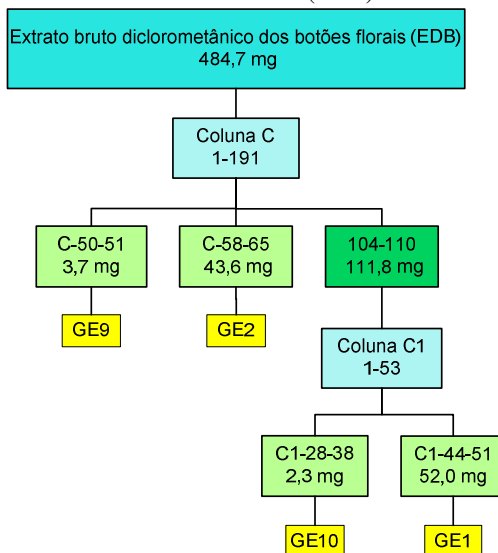


#### 4.2.2 Fracionamento do extrato EDB

O extrato EDB também foi submetido à separação cromatográfica (Coluna C) (Figura 11), resultando no isolamento do composto GE2 na fração C-58-65, bem como do composto GE9 da fração C-50-51, este último sendo identificada como metil-olivetol. Na fração C-104-110 foi observada a presença de uma substância com reação positiva para o reagente de Craven, que foi purificada cromatograficamente (Coluna C1) resultando em um sólido de cor amarela na fração C1-28-38, denominado de composto GE10, o qual está em processo de identificação. Adicionalmente, o composto GE1 foi isolado na fração C1-44-51.

Devido ao baixo rendimento dos compostos GE9 e GE10, eles não foram submetidos à avaliação da atividade biológica.

Figura 11. Procedimentos adotados no fracionamento do extrato bruto diclorometânico dos botões florais de *E. hiemalis* (EDB).



### 4.2.3 Considerações sobre o fracionamento bioguiado pela atividade anticolinesterásica

A identificação das substâncias GE1 (acetato de miconidina), GE2 (primina) e GE9 (metil-olivetol) isoladas por meio do fracionamento bioguiado pela atividade anticolinesterásica, foi realizada por meio de técnicas espectroscópicas, melhor descritas na seção 4.5 (“Substâncias isoladas”), contendo também uma breve revisão sobre suas propriedades biológicas. Ressalta-se aqui que é o primeiro relato da atividade anticolinesterásica para a primina.

Com relação ao gênero *Eugenia*, foi verificada atividade anticolinesterásica para algumas espécies. Para a espécie *E. brasiliensis* foram avaliados o extrato bruto das folhas e algumas frações, sendo que a fração insolúvel foi a que apresentou o melhor resultado (63,0 % de inibição na concentração de 1 mg/mL) (MAGINA et al., 2012). O extrato das partes aéreas *E. uniflora* apresentou halos de inibição da enzima AChE em placas de CCD (MORAIS et al., 2013).

Alguns trabalhos têm revelado um potencial anticolinesterásico interessante para a *E. jambolana*. O extrato das sementes apresentou atividade anticolinesterásica no cérebro de ratos, semelhante ao controle positivo (ALIKATTE et al., 2012), bem como o extrato das cascas, com atividade no cerebelo e córtex de ratos (MAZZANTI et al., 2004).

Como as metodologias utilizadas nestes trabalhos são diversas, a comparação com os dados obtidos neste estudo se torna difícil. Porém, nota-se que as espécies do gênero *Eugenia* analisadas até o presente momento, apresentaram bons resultados sobre a inibição da enzima AChE, mas, nos trabalhos citados, os compostos responsáveis pela atividade ainda não foram investigados.

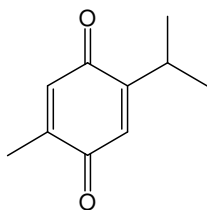
No entanto, várias substâncias isoladas de produtos naturais, bem como alguns derivados, já foram avaliadas quanto às suas propriedades de inibição da enzima acetilcolinesterase. Grande parte das substâncias ativas pertence ao grupo dos alcaloides, que possuem atividade em baixas concentrações. Vários trabalhos têm relatado atividade para outras classes também, principalmente flavonoides, sendo as flavonas e isoflavonas as mais ativas, estilbenos, terpenos (entres estes os monoterpênicos são os mais ativos) e xantonas (PINHO et al., 2013; SILVA et al., 2014).

A classe das quinonas, à qual pertence a substância GE2 isolada neste trabalho, não possui muitos trabalhos relacionados à atividade anticolinesterásica (PINHO et al., 2013). Entre as quinonas com atividade, destacam-se as benzoquinonas e suas formas reduzidas

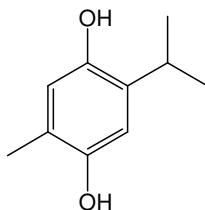
(hidroquinona), como é o caso da timoquinona e da timo-hidroquinona (Figura 12) (JUKIC et al., 2007). O ácido sargaquinoico (Figura 12), uma benzoquinona natural extraída da alga parda *Sargassum sagamianum* (CHOI, 2007) também apresentou resultados moderados na inibição da enzima AChE, sendo mais seletiva para a enzima BuChE. Já a memoquina (Figura 12) tem recebido bastante atenção como um novo candidato a fármaco para o tratamento da doença de Alzheimer. Sintetizada através da incorporação de 1,4-benzoquinona em um esqueleto de poliamina, previamente reportado de uma série de derivados colinérgicos (CAVALLI et al., 2007), é 10 vezes mais potente que a donepezila (BOLOGNESI; CAVALLI; MELCHIORRE, 2009).

As naftoquinonas C, G, E e H (mansononas) (Figura 12), isoladas da planta *Thespesia populnea* (Malvaceae) apresentaram também atividade inibitória sobre a enzima AChE, sendo as mansononas E e H as mais ativas (CHANDWONG et al., 2012). A biruloquinona (Figura 12), pertencente à classe rara de compostos de estrutura orto-fenantraquinona, foi isolada do fungo *Cladonia macilenta* (HENG et al., 2013), e apresentou atividade anticolinesterásica, bem como outros derivados de antraquinonas, como aloe-emodina e reína (Figura 12) (ORHAN; TOSUN; SENER., 2008).

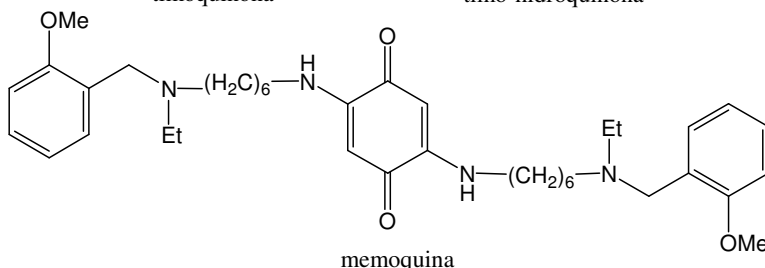
Figura 12. Estruturas de quinonas e hidroquinonas com atividade anticolinesterásica.



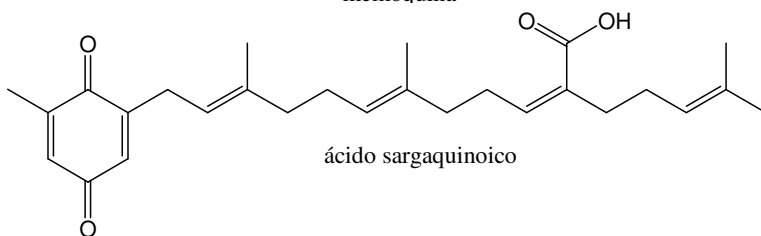
timoquinona



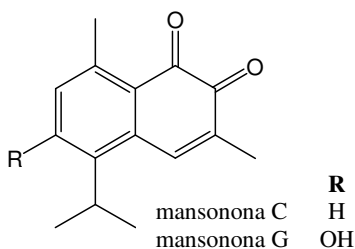
timo-hidroquinona



memoquina

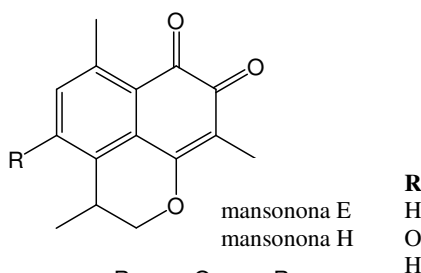


ácido sargaquinoico



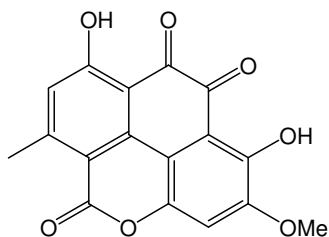
mansonona C  
mansonona G

**R**  
H  
OH

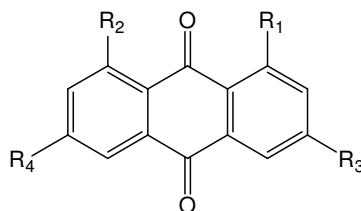


mansonona E  
mansonona H

**R**  
H  
H  
H



biruloquinona



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
reína	H	H	H	COOH
aloe-emodina	OH	OH	CH <sub>2</sub> OH	H

### 4.3 ESTUDO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Estudos de avaliação da atividade antibacteriana de produtos naturais contra espécies de mollicutes são bastante escassos na literatura. Alguns motivos podem explicar, em parte, esta realidade, como a dificuldade nos cultivos destes microorganismos, uma vez que são fastidiosos e requerem meios específicos para cada espécie avaliada. Além disto, tempo de incubação por vezes longo e a facilidade de contaminação das culturas (CORDOVA et al., 2010).

No âmbito do presente trabalho, inclusive, problemas de contaminação nas culturas de *M. mycoides* subsp. *capri* e *U. urealyticum* fizeram com que não pudéssemos dispor dos resultados para várias amostras em teste. Por este motivo, optou-se por não apresentar os resultados parciais disponíveis (apesar de bastante promissores).

Os resultados de atividade antibacteriana contra espécies de micoplasma encontrados neste trabalho para extratos, frações e compostos isolados de *E. hiemalis* estão na Tabela 3. Como ainda não há um consenso em relação à interpretação dos resultados (ou seja, considerar ativo/inativo), muitos autores optam em apenas reportar a CIM ou utilizar as regras de interpretação para outras bactérias (BÉBÉAR; BÉBÉAR, 2002).

Neste trabalho foi utilizado o critério proposto por Cos et al. (2006), em que misturas (incluindo-se extratos e frações) com valores de CIM < 100 µg/mL e compostos puros com CIM < 25 µg/mL podem ser considerados ativos. Adicionalmente, segundo Waites e colaboradores (2001 apud BÉBÉAR; BÉBÉAR, 2002), um valor de CIM ≤ 1 µg/mL pode ser considerado preditivo de efetividade no tratamento.

Os extratos apresentaram valores de CIM variando de 0,32 µg/mL até 1000 µg/mL. De maneira geral, a cepa *M. hominis* foi a mais sensível perante os extratos (CIM = 0,32 a 208,33 µg/mL), com exceção do extrato EMB, que apresentou maior atividade contra a cepa de *M. mycoides* subsp. *capri* (dados não apresentados) e *M. capricolum* subsp. *capricolum*.

Considerando-se o critério adotado, os extratos EDF (CIM = 6,51 a 83,33 µg/mL) e EDB (CIM = 0,32 a 31,25 µg/mL) apresentaram-se ativos contra todas as cepas de mollicutes avaliadas. Esses extratos também apresentaram atividade anticolinesterásica e foram submetidos ao fracionamento descrito anteriormente no item 4.2.

Tabela 3. Resultados\* da avaliação da atividade antibacteriana dos extratos, frações e compostos isolados de *E. hiemalis*.

	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	<i>M.</i> <i>genitalium</i>	<i>M.</i> <i>hominis</i>	<i>M.</i> <i>pneumoniae</i> FH
<b>Extratos</b>				
EDF	26,04	26,04	6,51	31,25
EMF	333,33	500	104,16	250
EDG	166,67	416,67	26,04	104,16
EMG	500	416,67	208,33	416,67
EDB	31,25	7,81	0,32	26,04
EMB	83,33	500	104,16	416,67
<b>Frações EDF**</b>				
A-5	46,87	125	4,55	125
A-7	3,46	6,94	0,40	7,80
A-8	3,46	6,94	0,48	7,80
<b>Compostos isolados</b>				
De A-7: GE1	3,46	6,94	0,48	7,80
De A-5 e A-7: GE2	NA	6,94	2,60	3,47
Levofloxacino	1,56	0,78	25	1,56

\* Os resultados são expressos como média ( $n = 3$ ).

\*\* As frações A-1, 2, 10, 11, 12 e 15 do extrato EDF não foram avaliadas devido aos baixos rendimentos. As frações A-3, 6, 13 e 14 foram testadas apenas contras as cepas *M. mycoides* subsp. *capri* e *U. urealyticum*. As frações 4 e 9 não foram avaliadas por apresentarem perfis semelhantes às frações 3 e 8, respectivamente.

### 4.3.1 Fracionamento do extrato EDF

O fracionamento cromatográfico do extrato EDF (Figura 11) levou ao isolamento da substância majoritária GE1 (acetato de miconidina) (correspondente à fração A-8), que apresentou atividade contra todas as cepas analisadas (CIM = 0,12 a 7,80  $\mu\text{g/mL}$ ), com exceção de *U. urealyticum*.

A fração A-7, que também continha GE2, apresentou atividade similar à A-8. A fração A-5 apresentou atividade destacada frente a *M. hominis* e *U. urealyticum* (dados não apresentados).

Dessa forma, as frações A-5 e A-7, que apresentaram melhor perfil de atividade também na avaliação da atividade anticolinesterásica, foram selecionadas para a realização do fracionamento cromatográfico (colunas A1 e A2, respectivamente), onde, conforme descrito anteriormente, as substâncias GE1 e GE2 foram isoladas. A substância

GE2 (primina, isolada de A-5 e A-7) apresentou atividade contra as cepas analisadas (CIM = 1,95 a 6,94 µg/mL).

As frações A-3, A-6, A-13 e A-14 foram testadas apenas contra as cepas *M. mycoides* subsp. *capri* e *U. urealyticum*, e em geral foram inativas (com exceção de A-6, que apresentou atividade contra *M. mycoides* subsp. *capri*). No entanto, esta fração não foi submetida ao fracionamento cromatográfico, pois, além de possuir um baixo rendimento em peso, possui um perfil semelhante à fração A-5, verificando-se também a presença da substância GE2. Dessa forma, a atividade observada foi correlacionada à presença desta substância.

#### **4.3.2 Fracionamento do extrato EDB**

Como o extrato EDB apresentou promissora atividade antibacteriana, o mesmo também foi submetido ao processo de fracionamento, conforme descrito anteriormente no item 4.2 (Figura 12). O fracionamento levou ao isolamento das substâncias GE1, GE2, e GE9, bem como outra quinona, GE10, a qual está em processo de identificação (Figura 12). A substância GE9 não foi avaliada com relação a atividade antibacteriana devido ao baixo rendimento.

#### **4.3.3 Considerações sobre o fracionamento bioguiado pela atividade antibacteriana**

O fracionamento bioguiado por meio da atividade antibacteriana conduziu ao isolamento de duas substâncias ativas, GE1 (acetato de miconidina) e GE2 (primina). Com relação à atividade apresentada por estes compostos, esta pode ser considerada promissora, já que alguns valores ficam abaixo ou muito próximos de 1 µg/mL (Waites et al., 2001 apud BÉBÉAR; BÉBÉAR, 2002)

A atividade antibacteriana de miconidina já foi demonstrada contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Brucella abortus*, *Gibberella fujikuroi* e *Mycobacterium* sp. (LIMA et al., 1970 apud GUNATILAKA et al., 2001). No entanto, este é o primeiro relato da atividade antimicrobiana para acetato de miconidina (GE1).

A substância GE2 (primina) possui relatos da atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e MRSA SK1 (*S. aureus* resistente à meticilina) (PONGCHAROEN et al., 2007). Além disso, em outros estudos, Brondani e colaboradores (2003) demonstraram a atividade de primina e derivados 5 e 6 alquil-substituídos frente a cepas de bactérias

Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *B. anthracis*, *S. aureus*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus citreus* e *Streptococcus faecalis*), Gram-negativas (*Brucella abortus*, *B. suis*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhosa*) e fungos (*Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *C. krusei* e *Penicillium lilacinum*).

Várias espécies do gênero *Eugenia* têm apresentado atividade antibacteriana, conforme apresentado anteriormente no Quadro 2. Algumas espécies, como *E. beaurepaireana*, *E. brasiliensis* e *E. umbelliflora* foram avaliadas frente a mollicutes (BENFATTI et al., 2010), porém os resultados não se mostraram tão promissores como os apresentados neste trabalho.

De maneira geral, os resultados encontrados neste trabalho para os extratos, frações e principalmente as substâncias isoladas na avaliação da atividade antibacteriana contra espécies de mollicutes são bastante promissores. Vale lembrar que os relatos de resistência destes patógenos são cada vez mais comuns (WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005), o que aumenta a necessidade de novos fármacos.

#### 4.4 ESTUDO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Apesar do organismo humano possuir alguns sistemas de defesa antioxidante, como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, vários micronutrientes da dieta também podem contribuir para este sistema de proteção (RAO et al, 2011), entre eles, flavonoides, ácidos fenólicos e carotenoides, que são comumente encontrados em plantas (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Um dos objetivos deste trabalho foi verificar a atividade antioxidante dos diferentes extratos e frações das partes aéreas de *E. hiemalis*, identificando-se os compostos biativos. Os resultados podem ser verificados na Tabela 4.

Diante do grande número de variações metodológicas na realização dos testes de avaliação da atividade antioxidante, bem como no modo de expressar os resultados obtidos, a comparação com os dados do presente trabalho se torna difícil. Dessa forma, em cada teste serão citadas apenas as espécies do gênero *Eugenia* que apresentaram bons resultados segundo os critérios dos autores dos respectivos trabalhos.



### 4.3.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

Neste estudo optou-se em se determinar o teor de compostos fenólicos totais através do reativo de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método descrito por Anagnostopoulou e colaboradores (2006). A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos. Para o cálculo do teor de compostos fenólicos nos extratos e frações foi construída uma curva de calibração com o padrão ácido gálico. Quanto maior a quantidade de ácido gálico em equivalente por g de extrato ou fração, maior a porcentagem de compostos fenólicos presentes.

Segundo a Tabela 4, os maiores conteúdos compostos fenólicos são encontrados no extrato EDB ( $137,08 \pm 3,18$  mg AG/g), seguido do extrato EMF ( $122,80 \pm 6,82$  mg AG/g), EDF ( $105,19 \pm 2,70$  mg AG/g) e EMB ( $95,91 \pm 1,33$  mg AG/g). Os extratos dos galhos apresentam menores conteúdos de compostos fenólicos quando comparados aos demais.

Maiores conteúdos de compostos fenólicos são esperados nos extratos preparados com metanol, etanol, acetona, acetato de etila, entre outros, já que estes compostos possuem característica polar e tendem a ser extraídos mais facilmente com estes solventes (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009). No entanto, neste estudo observaram-se valores elevados para os extratos diclorometânicos das folhas e botões florais. Este fato pode ser explicado pela presença do composto GE1 (acetato de miconidina), que é majoritário nestes extratos e possui estrutura derivada da hidroquinona, a qual possui grande potencial redutor, sendo capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu (BOX, 1983; DECAPRIO, 1999).

O conteúdo de fenóis totais também foi avaliado em outras espécies do gênero *Eugenia*, por metodologias diversas, observando-se altos conteúdos de compostos fenólicos na maioria dos extratos analisados. Entre eles, destacam-se os extratos de *E. uniflora* (CELLI; PEREIRA-NETTO; BETA, 2011; GARMUS et al., 2014; KADE et al., 2008; MARTINEZ-CORREA et al., 2011), *E. jambolana* (ARUN et al., 2011; BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005; BARTOLOME et al., 2006; FARIA; MARQUES; MERCADANTE, 2011; KUBOLA et al., 2011; SURVESWARAN et al., 2007), *E. caryophyllata* (ADEFEGHA; OBOH, 2012; GÜLÇİN et al., 2004; IVANOVIC et al., 2013; KRISHNAN et al., 2014), *E. pyriformis* (RUFINO et al., 2010), *E. stipitata* (GARZÓN et al., 2012), *E. copacabanensis* (CARVALHO JUNIOR et al., 2014), *E. polyantha* (WONG; LEONG; KOH, 2006), *E. dysenterica*, *E. klostzchiana*, *E. puniceifolia*, *E. calcyna* (ROCHA et al.,

2011), *E. aggregata*, *E. brasiliensis*, *E. luschnathiana* e *E. reinwardtiana* (REYNERTSON et al., 2008).

#### 4.3.2 Determinação do conteúdo de flavonoides

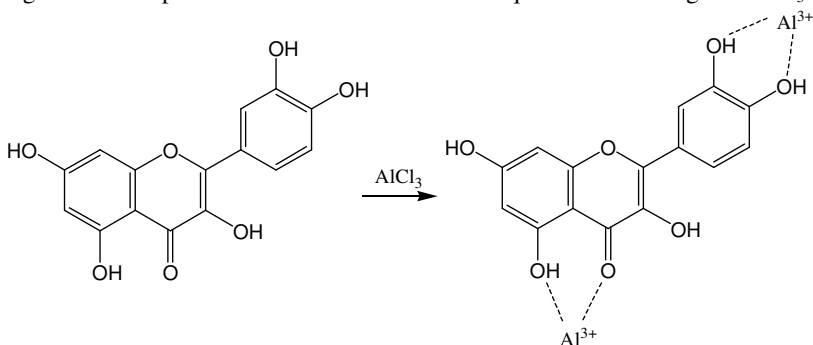
A determinação do teor de flavonoides no extrato e frações foi realizada através de método de complexação com o reagente cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) (WOISKY; SALATINO, 1998). Este reagente forma um quelato com as hidroxilas fenólicas em posição orto e com o grupo carbonila dos flavonoides (Figura 13), proporcionando um deslocamento batocrômico das bandas de absorvância do espectro de UV-Vis para uma região característica (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Deve-se levar em conta, porém, que a presença de glicosidação nas posições 3, 5, 3' ou 4' na estrutura do flavonoide prejudica a complexação com o alumínio, bem como a metoxilação (DENNI; MAMMEN, 2012).

A Tabela 4 apresenta os resultados da avaliação do conteúdo de flavonoides nos extratos brutos. Para o cálculo do teor de flavonoides foi construída uma curva de calibração utilizando o flavonoide quercetina, sendo os resultados expressos como mg de quercetina/g de extrato ou fração. Dessa forma, quanto maior o teor de quercetina nos extratos testados, maior a porcentagem de flavonoides por grama de extrato ou fração.

O extrato com maior conteúdo de flavonoides foi o EMF ( $48,97 \pm 8,23$  mg QUE/g), seguido do EMB ( $29,37 \pm 5,00$  mg QUE/g) e EMG ( $13,29 \pm 3,15$  mg QUE/g), enquanto que os extratos diclorometânicos não apresentaram flavonóides. Da mesma forma como citado anteriormente, a utilização de solventes com característica mais polar facilita a extração de compostos fenólicos, entre eles os flavonoides (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009).

A presença de flavonoides em espécies do gênero *Eugenia* é bastante comum, uma vez que vários destes compostos já foram identificados, como pode-se observar no Quadro 1. A quantificação destes compstos em algumas espécies do gênero *Eugenia* também já foi realizada, obtendo-se bons resultados, como nos extratos de *E. uniflora* (GARMUS et al. 2014; MARTINEZ-CORREA et al., 2011), *E. jambolana* (ARUN et al., 2011; KUBOLA; SIRIAMORNPUN; MEESE, 2011), *E. caryophyllata* (ADEFEGHA; OBOH, 2012; KRISHNAN et al., 2014), *E. copacabanensis* (CARVALHO JUNIOR et al., 2014) e *E. pyriformis* (RUFINO et al., 2010).

Figura 13. Complexo formado entre o flavonoide quercetina e o reagente  $\text{AlCl}_3$ .



Fonte: Mabry; Markham; Thomas (1970).

### 4.3.3 Determinação do potencial redutor

A determinação do potencial redutor neste trabalho seguiu o método de Price e Butler, proposto por Waterman e Mole (1994). Hidroxilas fenólicas presentes nos compostos e extratos vegetais são oxidadas a íons fenolato, e os íons férricos, adicionados à solução na forma de  $\text{FeCl}_3$ , são reduzidos para íons ferrosos, e detectados a partir da formação de um complexo azul ( $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ) com o reagente ferricianeto de potássio (WATERMAN; MOLE, 1994).

Para determinação do potencial redutor, empregou-se uma curva de calibração com diversas concentrações de ácido ascórbico, um composto com potencial redutor já conhecido. Dessa forma, valores mais elevados significam maior capacidade redutora, quando comparados ao ácido ascórbico. Os resultados deste ensaio encontram-se na Tabela 4.

O extrato EMF apresentou o maior potencial redutor ( $405,27 \pm 10,27$  mg AA/g), seguido pelos extratos EDB ( $350,36 \pm 9,74$  mg AA/g), EMB ( $301,06 \pm 22,68$  mg AA/g), EDF ( $266,68 \pm 11,26$  mg AA/g) e EMG ( $190,71 \pm 16,61$  mg AA/g). O extrato EDG apresentou fraca atividade quando comparado aos demais.

De forma semelhante ao observado no ensaio de determinação do teor de compostos fenólicos totais, o qual se baseia também na capacidade redutora da amostra, o presente ensaio apresentou resultados elevados de potencial redutor para os extratos diclorometânicos das folhas e botões florais.

Como já mencionado anteriormente, o composto GE1 é um derivado de hidroquinona, e esta possui potencial redutor já reconhecido

(BOX, 1983; DECAPRIO, 1999). O potencial redutor do composto GE1, majoritário nos extratos diclorometânicos, foi avaliado e apresentou um valor elevado ( $412,12 \pm 27,75$  mg AA/g), superior ao encontrado para os extratos. Assim sendo, pode-se atribuir, pelo menos em parte, a atividade observada nos extratos a GE1, uma vez que este é majoritário.

Algumas espécies do gênero *Eugenia* já foram avaliadas também com relação ao seu potencial redutor, utilizando-se metodologias diversas e obtendo-se bons resultados. Destacam-se os extratos de *E. jambolana* (SULTANA; ANWAR; PRZYBYLSKI, 2007; SURVESWARAN et al., 2007; VEIGAS et al., 2007), *E. caryphyllata* (ADEFEGHA; OBOH, 2012; GÜLÇİN et al., 2004; IVANOVIC et al., 2013; WOJDYLO; OSZMIANSKI; CZEMERYS, 2007), *E. pyriformis* (RUFINO et al., 2010), *E. stipitata* (GARZÓN et al., 2012) e *E. polyantha* (WONG; LEONG; KOH, 2006).

#### 4.3.4 Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH

O ensaio de avaliação da captação do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é um dos mais comumente utilizados, pois, de maneira geral, é simples, eficiente e barato, quando comparado aos demais (CARMONA et al., 2014). O radical livre DPPH também é dos poucos radicais livres de nitrogênio estáveis e comercialmente disponíveis (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

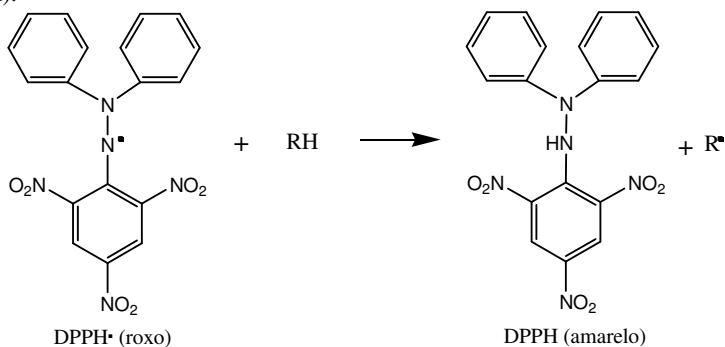
A ação sequestrante de radicais livres neste ensaio deve-se à reação entre o DPPH e compostos presentes nos extratos, através da abstração de um radical hidrogênio (Figura 14). O DPPH possui cor roxa devido à deslocalização do elétron desemparelhado na molécula e ao reagir com o flavonoide é reduzido, formando espécies mais estáveis (hidrazina) e diminuindo a intensidade de sua coloração, o que pode ser facilmente determinado espectrofotômetro (517 nm) (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

Para fins de interpretação do ensaio, considera-se que a diminuição da absorbância em 517 nm e o aumento da cor amarela da solução são proporcionais ao potencial antioxidante da solução teste. Os resultados obtidos são expressos em  $CE_{50}$ , ou seja, a concentração da amostra necessária para reduzir 50 % do radical livre DPPH presente nas soluções testadas. Este valor pode ser obtido através do gráfico de concentração do DPPH em solução *versus* a concentração da solução amostra analisada.

A Tabela 4 apresenta os resultados do ensaio da atividade sequestrante do radical livre DPPH. Observa-se que os extratos metanólicos EMF, EMB e EMG obtiveram os melhores resultados, com  $CE_{50}$  de  $39,11 \pm 0,74$ ,  $68,69 \pm 4,35$  e  $101,09 \pm 10,62$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

A capacidade de captação do radical livre DPPH já foi demonstrada para algumas espécies de *Eugenia*, como para os extratos *E. uniflora* (CELLI; PEREIRA-NETTO; BETA, 2011; CHATTERJEE et al., 2012; EINBOND et al., 2004; GARMUS et al. 2014; MARTINEZ-CORREA et al., 2011; SANTOS et al., *in press*; VELÁZQUEZ et al. 2003), *E. jambolana* (ARUN et al., 2011; BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005; BARTOLOME et al., 2006; KUBOLA; SIRIAMORNUN; MEESE, 2011; PEIXOTO; FREITAS, 2013; SULTANA; ANWAR; PRZYBYLSKI, 2007; SURVESWARAN et al., 2007; VEIGAS et al., 2007), *E. caryophyllata* (GÜLÇİN et al., 2004; KRISHNAN et al., 2014; IVANOVIC et al., 2013; WOJDYLO; OSZMIANSKI; CZEMERYYS, 2007), *E. dysenterica* (PRADO et al., 2014), *E. pyriformis* (RUFINO et al., 2010), *E. polyantha* (WONG; LEONG; KOH, 2006), *E. stipitata* (NERI-NUMA et al., 2013; GARZÓN et al., 2012), *E. copacabanensis* (CARVALHO JUNIOR et al., 2014), *E. bracteata* (HEMALATHA; SATYANARAYANA; ALEKHYANJALI, 2008), *E. aggregata*, *E. brasiliensis*, *E. luschnathiana* e *E. reinwardtiana* (REYNERTSON et al., 2008).

Figura 14. Equação básica da reação do radical livre DPPH com um substrato (RH).



Fonte: Alves et al, 2010 (modificado).

### 4.3.5 Determinação do potencial inibidor da peroxidação lipídica

Os lipídeos são componentes essenciais das membranas e estruturas celulares, porém, podem sofrer degradação pela ação de radicais livres em presença de oxigênio. Este processo é denominado peroxidação lipídica, e se inicia quando as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados da membrana são atacadas por espécies radicais derivadas do oxigênio, particularmente por OH. Esta reação origina peróxidos, que são instáveis e reativos, iniciando uma cadeia de reações de autocatálise chamada de propagação, causando grandes danos nas membranas, organelas e na integridade celular (RAO et al., 2011).

O presente ensaio é baseado em reações de oxi-redução, onde o ácido linoleico, um ácido graxo insaturado, é oxidado por espécies reativas de oxigênio, neste caso o peróxido de hidrogênio. Os produtos formados desta reação provocam a oxidação do  $\beta$ -caroteno, o que leva à sua descoloração, que pode ser medida em espectrofotômetro em 470 nm. Substâncias com propriedades antioxidantes reduzem ou impedem a ocorrência destas reações, evitando a descoloração do  $\beta$ -caroteno (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Este método tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais e de substâncias isoladas (ALVES et al., 2010).

Soluções com a presença de antioxidantes, como o BHT (controle positivo) e ausência de antioxidantes (controle negativo), bem como soluções contendo as amostras a serem testadas são incubadas e suas absorbâncias são determinadas a cada 30 minutos, até 180 minutos, onde é avaliado o desaparecimento ou não da coloração do  $\beta$ -caroteno, em relação ao controle negativo.

Os resultados obtidos neste ensaio podem ser visualizados na Tabela 4, e estão expressos em porcentagem de inibição da peroxidação lipídica em relação à solução sem a presença de antioxidantes, calculados a partir dos dados de absorbância no tempo de 180 minutos.

Adicionalmente, na Figura 15 podem-se observar os perfis de inibição da peroxidação lipídica pelos extratos em função do tempo, verificados através da descoloração do  $\beta$ -caroteno nas soluções. Neste gráfico, observa-se que as soluções do controle negativo (que não possuem antioxidantes) apresentam clara descoloração, devido ao decaimento das absorbâncias. Já as soluções contendo BHT como agente antioxidante (controle positivo) mantêm a coloração e seus valores de absorbância permanecem mais estáveis.

Pode-se observar que os extratos metanólicos, em geral, apresentaram maior capacidade de inibição do processo de peroxidação

lipídica ( $52,10 \pm 0,23 \%$ ,  $47,85 \pm 0,31 \%$  e  $53,27 \pm 1,79 \%$ , para os extratos EMF, EMG e EMB). No entanto, os valores apresentados por estes extratos são inferiores aos obtidos para o controle positivo BHT ( $97,47 \pm 0,97 \%$ ). Este fato pode ser visualizado também na Figura 16, onde os extratos metanólicos apresentam um decaimento em relação ao controle positivo logo após as primeiras medições.

O potencial inibidor do processo de peroxidação lipídica, também foi avaliado para outras espécies do gênero *Eugenia*, obtendo-se bons resultados, como para os extratos de *E. uniflora* (MARTINEZ-CORREA et al., 2011; VELÁZQUEZ et al., 2003), *E. jambolana* (ARUN et al., 2011; BANERJEE; DASGUPTA, 2005; HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2009; SULTANA; ANWAR; PRZYBYLSKI, 2007; VEIGAS et al., 2007), *E. caryphyllata* (ADEFEGHA; OBOH, 2012), *E. bracteata* (HEMALATHA; SATYANARAYANA; ALEKHYANJALI, 2008), e *E. pyriformis* (RUFINO et al., 2010).

Tabela 4. Resultados\* da avaliação da atividade antioxidante dos extratos, frações e compostos isolados de *E. hiemalis*.

	<b>FLT</b> (mg QUE/g) <sup>1</sup>	<b>FT</b> (mg AG/g) <sup>2</sup>	<b>PR</b> (mg AA/g) <sup>3</sup>	<b>DPPH</b> (CE <sub>50</sub> - µg/mL) <sup>4</sup>	<b>AA %</b> <sup>5</sup>
<b>Extratos</b>					
<b>EDF</b>	0,00 ± 0,00	105,19 ± 2,70	266,68 ± 11,26	535,62 ± 37,51	16,51 ± 0,32
<b>EMF</b>	48,97 ± 8,23	122,80 ± 6,82	405,27 ± 10,27	39,11 ± 0,74	52,10 ± 0,23
<b>EDG</b>	0,00 ± 0,00	43,75 ± 0,90	1,85 ± 2,86	> 1000	16,56 ± 2,47
<b>EMG</b>	13,29 ± 3,15	69,20 ± 1,99	190,71 ± 16,61	101,09 ± 10,62	47,85 ± 0,31
<b>EDB</b>	0,00 ± 0,00	137,08 ± 3,18	50,36 ± 9,74	210,52 ± 14,99	29,29 ± 1,36
<b>EMB</b>	29,37 ± 5,00	95,91 ± 1,33	301,06 ± 22,68	68,69 ± 4,35	53,27 ± 1,79
<b>Frações EMF</b>					
<b>D-3</b>	6,311 ± 0,23	19,96 ± 0,21	43,17 ± 0,00	> 1000	- 27,66 ± 0,98
<b>D-4</b>	7,48 ± 0,15	53,70 ± 0,14	79,48 ± 1,82	81,45 ± 1,52	47,46 ± 0,68
<b>D-5</b>	5,85 ± 0,07	58,21 ± 0,39	85,63 ± 0,30	ND	ND
<b>D-6</b>	29,734 ± 0,21	87,62 ± 0,00	170,89 ± 3,04	220,08 ± 2,84	12,89 ± 0,09
<b>D-7</b>	62,30 ± 0,21	165,64 ± 0,43	391,41 ± 1,10	41,55 ± 0,60	42,40 ± 0,45
<b>D-8</b>	29,01 ± 0,23	139,69 ± 0,16	339,84 ± 1,22	116,40 ± 0,83	26,56 ± 1,71
<b>D-9</b>	63,16 ± 0,16	244,20 ± 0,39	544,57 ± 0,80	18,18 ± 0,08	28,93 ± 0,51
<b>D-11</b>	42,89 ± 0,87	161,00 ± 0,36	382,47 ± 1,52	24,00 ± 0,10	25,26 ± 0,39
<b>D-12</b>	63,29 ± 3,00	241,05 ± 0,08	534,40 ± 3,04	21,89 ± 0,15	33,22 ± 0,44
<b>D-13</b>	17,75 ± 0,39	148,52 ± 0,08	310,54 ± 1,05	38,04 ± 0,23	35,35 ± 0,30
<b>D-17</b>	5,91 ± 0,14	106,54 ± 0,62	654,221 ± 0,00	61,87 ± 3,00	8,45 ± 0,96
<b>Compostos</b>					
<b>GE1</b>	ND	ND	412,12 ± 27,75	> 1000	22,92 ± 0,37
<b>Ácido gálico</b>	ND	ND	ND	3,80 ± 0,04	ND
<b>BHT</b>	ND	ND	ND	ND	97,47 ± 0,97

\* Os resultados são expressos como média ± desvio padrão da média (n = 3). ND = Não Determinado.

<sup>1</sup> FLT= Flavonoides totais (mg de quercetina/ g de amostra).

<sup>2</sup> FT = Fenóis totais (mg de ácido gálico/g de amostra).

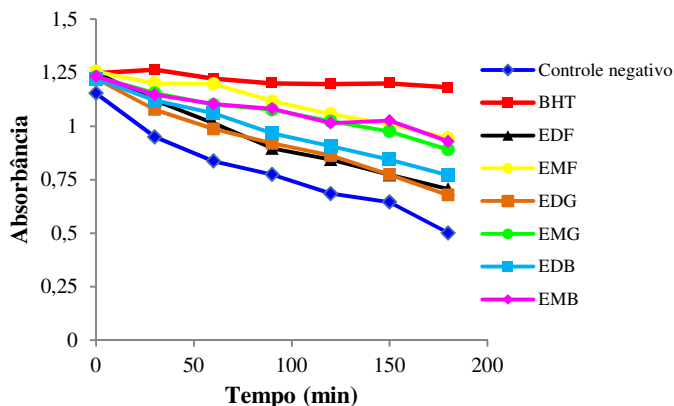
<sup>3</sup> PR = Potencial redutor (mg de ácido ascórbico/g de amostra).

<sup>4</sup> CE<sub>50</sub> = Concentração efetiva 50 %. Concentração da amostra, em µg/mL, necessária para reduzir 50 % do radical livre DPPH presente na solução.

<sup>5</sup> AA% = Atividade antioxidante em porcentagem. Porcentagem de inibição da descoloração do β-caroteno em relação à solução sem a presença de um antioxidante.



Figura 15. Perfil de inibição contra a peroxidação lipídica dos extratos brutos das partes aéreas de *E. hiemalis*.



De maneira geral, os extratos metanólicos obtiveram os melhores resultados nos testes de avaliação da atividade antioxidante, destacando-se o extrato metanólico das folhas. Este apresentou os maiores teores de flavonoides e fenóis (neste segundo, quando comparado aos demais extratos metanólicos), bem como o maior potencial redutor e maior capacidade de captação do radical livre DPPH. Os valores de inibição da peroxidação lipídica foram bastante similares para todos os extratos metanólicos.

Levando-se em conta o conjunto de resultados obtidos nos testes de avaliação da atividade antioxidante, o extrato EMF foi selecionado para a continuidade dos estudos através da realização do seu fracionamento cromatográfico, bem como análise das frações obtidas por meio dos testes da atividade antioxidante.

#### 4.3.5 Fracionamento do extrato EMF

A coluna D com o extrato EMF foi realizada em três etapas (colunas Da, Db e Dc) devido a quantidade de amostra. As frações obtidas nos três processos foram reunidas em função de sua semelhança cromatográfica, obtendo-se ao fim 18 frações (D1 a D18) (Figura 17), sendo 11 destas selecionadas para os testes de avaliação da atividade antioxidante, conforme perfis cromatográficos e rendimento obtido. Os resultados dos testes estão apresentados também na Tabela 4.

Na avaliação do conteúdo de flavonoides, as frações que obtiveram os melhores resultados foram D-12 ( $63,29 \pm 3,00$  mg QUE/g),

D-9 ( $63,16 \pm 0,16$  mg QUE/g), D-7 ( $62,30 \pm 0,21$  mg QUE/g) e D-11 ( $42,89 \pm 0,87$  mg QUE/g).

Da mesma forma, na avaliação do conteúdo fenóis totais, as frações D-9 ( $244,20 \pm 0,39$  mg AG/g), D-12 ( $241,05 \pm 0,08$  mg AG/g), D-7 ( $165,64 \pm 0,43$  mg AG/g) e D-11 ( $161,00 \pm 0,36$  mg AG/g) apresentaram os maiores teores.

Já na avaliação do potencial redutor, a fração que apresentou o melhor resultado foi D-17 ( $654,221 \pm 0,00$  mg AA/g), seguida por D-9 ( $544,57 \pm 0,80$  mg AA/g) e D-12 ( $534,40 \pm 3,04$  mg AA-g). Supõe-se que este valor elevado encontrado para a fração D-17 seja devido à presença de açúcares redutores na fração, já que a mesma é bastante polar.

As frações com maior sequestro do radical livre DPPH foram D-9 ( $CE_{50} = 18,18 \pm 0,0$   $\mu$ g/mL), D-12 ( $CE_{50} = 21,89 \pm 0,15$   $\mu$ g/mL) e D-11 ( $CE_{50} = 24,00 \pm 0,10$   $\mu$ g/mL).

Na avaliação da peroxidação lipídica, os resultados para as frações foram inferiores aos apresentados pelo extrato bruto EMF, indicando possível sinergismo entre os compostos neste extrato. O perfil de frações com melhor atividade observado nos testes anteriores não foi o mesmo, uma vez que a fração que obteve o melhor resultado neste ensaio foi a D-4 ( $47,46 \pm 0,68$  %), que não apresentou resultados promissores nos demais testes, seguida da D-7 ( $42,40 \pm 0,45$  %).

Devido às limitações de tempo, nem todas as frações que apresentaram boa atividade antioxidante puderam ser estudadas, sendo as frações D-9 e D-12, além de D-4 (pelo valor de AA%) selecionadas para a continuidade dos estudos através da realização dos seus fracionamentos cromatográficos. As frações D-7 e D-11 apresentaram perfis cromatográficos semelhantes às frações D-9 e D-12, respectivamente, e por isso não foram selecionadas para o fracionamento.

A partir deste ponto do trabalho, devido à limitação da quantidade de amostra de cada fração disponível para análises, estas não foram submetidas a testes de avaliação de atividade biológica. A seleção das amostras para continuidade dos estudos passou a ser feita de acordo com o perfil cromatográfico apresentado pelas mesmas.

#### 4.3.5.1 Fracionamento de D-9

O fracionamento de D-9 (coluna D1) (Figura 17) levou à obtenção de 15 frações (frações D1-1 a D1-15). As frações D1-6, 7, 9, 10 e 11 foram selecionadas para os procedimentos de fracionamento.

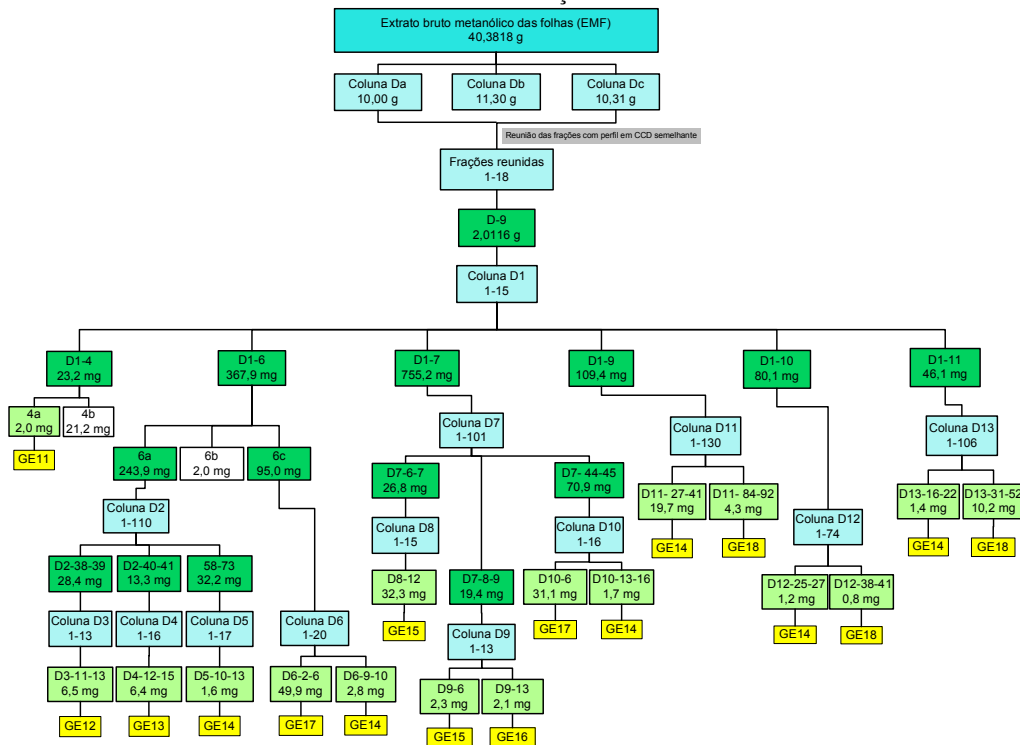
A fração D1-6 apresentava precipitados de cor amarela, e a mesma foi lavada várias vezes com metanol com o objetivo de purificá-los. Obtiveram-se assim 3 frações (D1-6a até D1-6c), sendo da fração D1-6c purificados os compostos GE14 e GE17 (coluna D6). O composto GE14 foi identificado como o flavonoide quercitrina (descrito no item 4.5.4) e GE17 ainda está em processos de identificação. A fração D1-6a também foi submetida à coluna cromatográfica (coluna D2), sendo as frações D2-38-39, 40-41 e 58-73 purificadas novamente (colunas D3, D4 e D5, respectivamente). Da coluna D3 obteve-se GE12 e da coluna D4, GE13. Ambos os compostos estão em processos de identificação. Ainda, da fração D2-58-73, após purificação, foi isolado novamente o composto GE14.

Na sequência, a fração D1-7 foi submetida ao fracionamento cromatográfico (Coluna D7), sendo as frações D7-6-7, 8-9 e 44-45 purificadas (Colunas D8, D9 e D10, respectivamente). Da coluna D8 e D9 foi obtido GE15, bem como outro composto com perfil semelhante em D9 e D10, denominado de GE17. Ambos os compostos estão em processo de identificação.

Por fim, as frações D1-9, 10 e 11 também foram submetidas ao processo de purificação (colunas D11, D12 e D13, respectivamente), obtendo-se GE14 e outro composto com perfil semelhante, denominado de GE18, que está em processos de identificação, e que parece tratar-se de mais um flavonoide.

A fração D1-4 não foi submetida à separação cromatográfica dos seus constituintes, porém, durante o procedimento de secagem da mesma, verificou-se a separação de duas fases de colorações distintas. Dessa forma, ambas foram separadas e secas, sendo o composto GE11 obtido na fração D1-6a.

Figura 16. Procedimentos adotados no fracionamento da fração D-9 do extrato EMF de *E. hiemalis*.

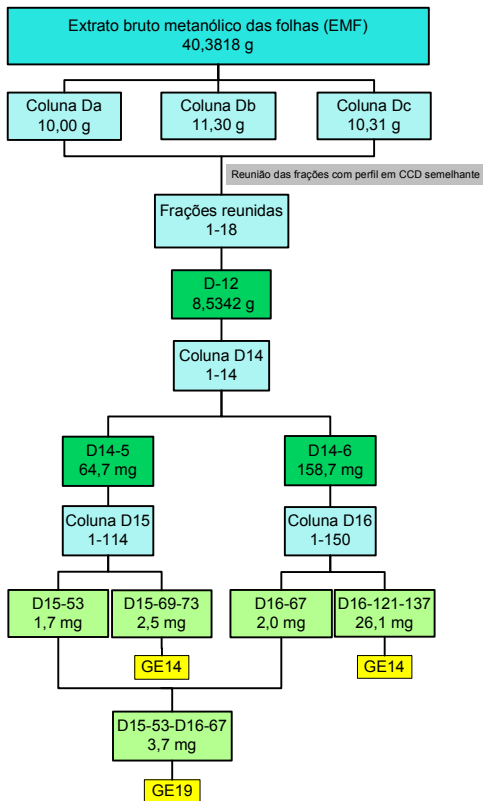


#### 4.3.5.2 Fracionamento de D-12

Outra fração que apresentou resultados promissores na avaliação da atividade antioxidante foi a D-12, a qual apresentou também bons rendimentos de peso (8,5342 g). Dessa forma, procedeu-se a um fracionamento por CLV desta fração (Coluna D14) (Figura 17), originando 14 frações. Apesar do alto rendimento das frações D14-7 a 14, as mesmas apresentaram perfil cromatográfico indicando a presença de compostos de alta polaridade, impossibilitando as análises por falta de material adequado naquele momento.

As frações D14-5 e 6 foram selecionadas para a continuidade dos estudos (colunas D15 e D16, respectivamente), onde foi possível isolar de ambas as colunas o composto denominado de GE19, o qual está em processos de identificação. Adicionalmente, o composto GE14 foi novamente purificado na coluna D15.

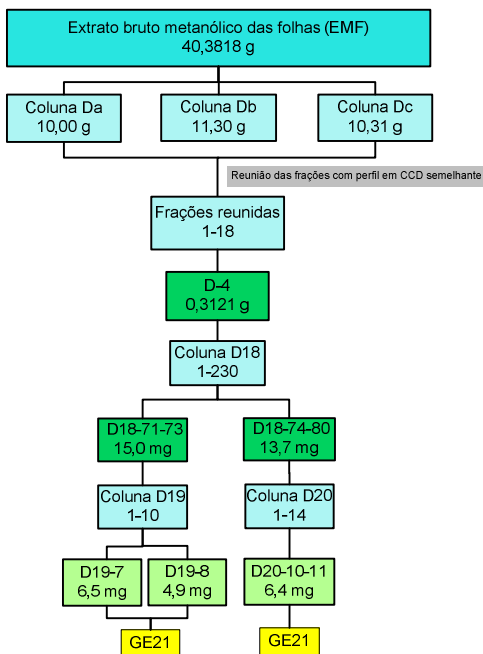
Figura 17. Procedimentos adotados no fracionamento da fração D-12 do extrato EMF de *E. hiemalis*.



#### 4.3.5.3 Fracionamento de D-4

Como a fração D-4 obteve um resultado interessante na avaliação do potencial de inibição da peroxidação lipídica em relação às demais amostras, esta foi selecionada para a continuação dos estudos. Foi realizada uma coluna cromatográfica (coluna D18) (Figura 18), e algumas frações obtidas deste procedimento foram repurificadas (colunas D19 e D20), resultando no isolamento de GE21, o qual está em processos de identificação.

Figura 18. Procedimentos adotados no fracionamento da fração D-4 do extrato EMF de *E. hiemalis*.



#### 4.3.6 Considerações sobre o fracionamento bio guiado pela atividade antioxidante

O fracionamento bio guiado pela atividade antioxidante conduziu ao isolamento de 10 substâncias. No entanto, nenhuma das substâncias isoladas foi submetida à avaliação da atividade antioxidante, já que grande parte deles está ainda em processos de identificação. A substância GE14, isolada das frações ativas D-9 e D-12, foi identificada como sendo o flavonoide quercitrina, que já teve seu potencial antioxidante descrito, e, por isso não foi avaliada.

O potencial antioxidante dos flavonoides já é bastante conhecido, bem como suas propriedades quelantes. Dessa forma, inúmeros estudos já demonstraram a capacidade de alguns destes compostos de inibir a oxidação da LDL, apresentando um efeito cardioprotetor (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Entre os flavonoides mais ativos, destacam-se os flavonóis, principalmente

aqueles com o grupo OH livre na posição C-3, como quercetina, canferol, galangina, entre outros (BURDA; OLESZEK, 2001).

Quercitrina, um derivado 3-*O*-glicosilado da quercetina, foi extensivamente estudada em relação às suas propriedades antioxidantes, exibindo bons resultados nos modelos avaliados. Apresentou forte capacidade de captação do radical livre DPPH, sendo que a  $CE_{50}$  apresentada em alguns trabalhos variou de  $1,3 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$  até  $7,01 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$  (HERNANDEZ et al., 2010; MADALOSSO et al., 2012; RAINHA et al., 2013; RIVIÈRE et al., 2009).

O potencial redutor de íons férrico também foi observado para a quercitrina (HONG et al., 2013; RAINHA et al., 2013), bem como a capacidade de inibir a peroxidação lipídica, ambos comparáveis ao  $\alpha$ -tocoferol (YAMAZAKI et al., 2007). Apresentou inibição da peroxidação lipídica induzida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  em células V79-4 (linhagem celular de fibroblastos de pulmão de hamster chinês) na concentração de  $100 \mu\text{M}$  (HAM et al., 2012) e inibição da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em cérebro de rato (WAGNER et al., 2006).

Neste sentido, pode-se correlacionar a atividade antioxidante apresentada pelo extrato EMF e suas frações, pelo menos em parte, à presença de quercitrina nas amostras (GE14). Também foi isolado outro flavonoide (GE18) de maior polaridade neste extrato. A completa identificação desta substância e dos demais compostos isolados, bem como avaliação das suas atividades antioxidantes, permitirá entender melhor a atividade apresentada pelos extratos e frações.

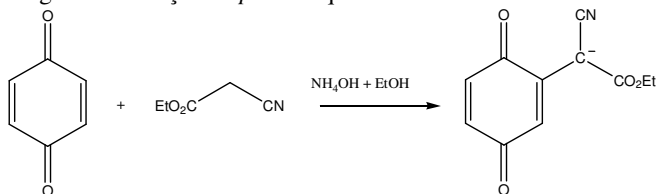
#### 4.5 FRACIONAMENTO GUIADO PELO REAGENTE DE CRAVEN

Análises do extrato EDF com o reagente de Craven demonstraram a presença de algumas substâncias com reação positiva para o mesmo. Este fato despertou interesse para o isolamento destes compostos.

O teste com o reagente de Craven consiste na reação entre o cianoacetato de etila com certas quinonas, como *p*-benzoquinonas (Figura 19), *o*-toluquinona, 1,4-naftoquinona, timoquinona. Apenas quinonas com átomos de hidrogênio ou halogênio livres adjacentes ao grupo  $-\text{C}=\text{O}$  apresentam esta reação, assim, 1,2-naftoquinonas, antraquinonas, e fenantraquinonas não reagem (ASHWORTH, 1971). A cor violeta azulada inicial muda rapidamente para azul, verde ou azul-avermelhado. A cor verificada é devido à formação do ânion (Figura 19) (KING; NEWALL, 1965).



Figura 19. Reação da *p*-benzoquinona com o cianoacetato de etila.



Fonte: King; Newall, 1965.

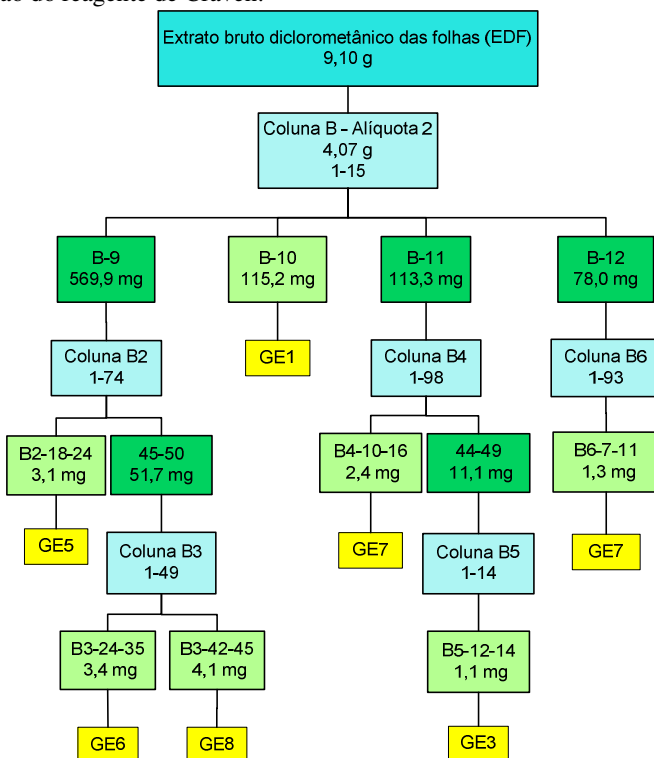
Uma nova CLV foi realizada com outra alíquota do extrato EDF (Coluna B – Alíquota 2) (Figura 20). Foi utilizado o mesmo sistema cromatográfico da Coluna A, obtendo-se ao final 15 frações. Neste caso, nenhuma das frações foi submetida a análises de atividade biológica.

Após revelação com o reagente de Craven, foram observadas duas manchas de coloração azul na fração B-9, uma mancha na fração B-11 e B-12 e uma na fração B-6 (correspondente à primina).

A fração B-9 foi submetida ao fracionamento cromatográfico (Coluna B2), resultando no isolamento de GE5, que está em processo de identificação, porém não apresentou reação positiva com o reagente de Craven. A revelação com reagente de Craven indicou duas manchas na fração B2-45-50, sendo estas purificadas cromatograficamente (Coluna B3). Uma delas foi obtida na fração B3-24-35 e denominada de GE6 e a outra na fração B3-42-45, denominada de GE8. Ambas são quinonas e foram identificadas, sendo suas estruturas descritas no item 4.5.

As frações B-11 e B-12 também foram cromatografadas (colunas B4 e B6, respectivamente) e resultaram no isolamento do composto GE7, uma quinona que ainda está em processo de identificação. GE3 também foi isolado da fração B-11 (coluna B5), porém não apresentou reação positiva com o reagente de Craven. Este composto está ainda em processo de identificação.

Figura 20. Procedimentos adotados no fracionamento do extrato bruto diclorometânico das folhas de *E. hiemalis* (EDF – alíquota 2) guiado pela utilização do reagente de Craven.



#### 4.6 OUTROS FRACIONAMENTOS CROMATOGRÁFICOS

Algumas frações apresentaram perfis cromatográficos interessantes, e seus fracionamentos foram realizados independentemente das atividades biológicas.

A fração A-13 foi submetida ao fracionamento cromatográfico (coluna A5) (Figura 21), sendo isolado o composto GE3. Objetivando aumentar o rendimento de GE3 para análises de identificação e testes biológicos, as frações A-9 e A-10 foram submetidas ao fracionamento cromatográfico (colunas A3 e A4, respectivamente) (Figura 21), visto que análises por CCD teriam indicado a presença desta substância. Dessa forma, GE3 foi isolado em ambas as frações, bem como GE1.

A fração B-8 também foi submetida ao fracionamento cromatográfico (Coluna B1) (Figura 21), resultando no isolamento de uma substância na fração B1-1-2, denominada de GE4, a qual está em processos de identificação.

Por fim, a fração D-3 do extrato metanólico das folhas foi submetida à separação cromatográfica (coluna D17) (Figura 22). Este procedimento resultou no isolamento de GE20, o qual está também em processo de identificação.

Figura 21. Procedimentos adotados no fracionamento do extrato bruto diclorometânico das folhas de *E. hiemalis* (EDF – alíquota 1 e 2) independente dos testes biológicos.

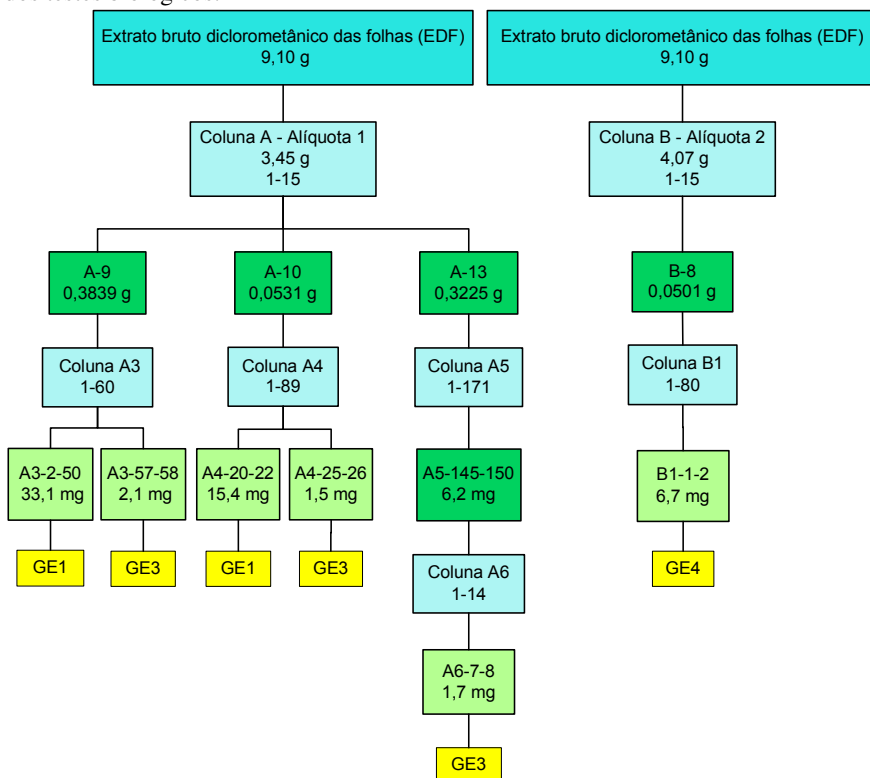
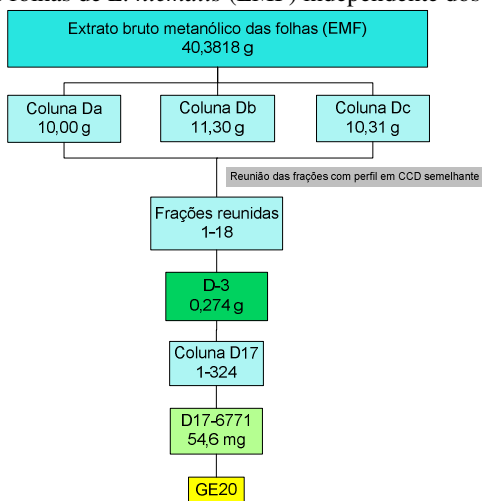


Figura 22. Procedimentos adotados no fracionamento do extrato bruto metanólico das folhas de *E. hiemalis* (EMF) independente dos testes biológicos.



#### 4.7 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

A partir do fracionamento dos extratos EDF, EDB e EMF de *E. hiemalis* foram isoladas 21 substâncias, denominadas de GE1 a GE21 (Tabela 5). Dos extratos diclorometânicos das folhas (EDF) e botões florais (EDB) foram isolados oito e quatro compostos, respectivamente. Destes, GE1 e GE2 são majoritárias em ambos os extratos, sendo identificados como acetato de miconidina e primina, respectivamente. Os compostos GE6 e GE8 também foram identificados como derivados de primina e estão descritos nos itens subsequentes. GE9 foi identificada como metil-olivetol.

Do extrato metanólico das folhas (EMF) foram isoladas 11 substâncias, cujos espectros estão sendo obtidos, sendo que GE14 foi identificada como quercitrina.

Tabela 5. Compostos isolados dos extratos de *E. hiemalis*.

Substância	Extrato	Identificação	Quantidade (mg)
GE1	EDF e EDB	Acetato de miconidina	447,39
GE2	EDF e EDB	Primina	143,8
GE3	EDF	N.I.	6,4
GE4	EDF	N.I.	6,7
GE5	EDF	N.I.	3,1
GE6	EDF	5-acetóxi-primina	3,4
GE7	EDF	Quinona N.I.	3,7
GE8	EDF	Hiemaloquinona	4,1
GE9	EDB	Metil olivetol	3,7
GE10	EDB	Quinona N.I.	2,3
GE11	EMF	N.I.	2,0
GE12	EMF	N.I.	6,5
GE13	EMF	N.I.	6,4
GE14	EMF	Quercitrina	57,0
GE15	EMF	N.I.	34,6
GE16	EMF	N.I.	2,1
GE17	EMF	N.I.	81,0
GE18	EMF	Flavonoide N.I.	5,1
GE19	EMF	N.I.	3,7
GE20	EMF	N.I.	54,6
GE21	EMF	N.I.	17,8

N.I. = Não identificado.

#### 4.7.1 Substância GE1

GE1 foi obtido como um óleo de coloração amarelada das frações A-8 (Coluna A), A2-77-79 (Coluna A2), A3-2-50 (Coluna A3), A4-20-22 (Coluna A4), B-10 (Coluna B) e C1-44-51 (Coluna C1), com rendimento total de 447,39 mg, conforme os esquemas apresentados nas Figuras 10, 11, 20 e 21.

Apresenta-se na CCD em  $\text{CHCl}_2/\text{AcOEt}$  (98:2) como uma mancha em  $R_f$  0,3; após revelação com anisaldeído sulfúrico, adquire coloração marrom-escura, que após esmaecer passa a amarela. A substância apresenta extinção de fluorescência em 254 nm e apresenta fluorescência *deep purple* em 366 nm.

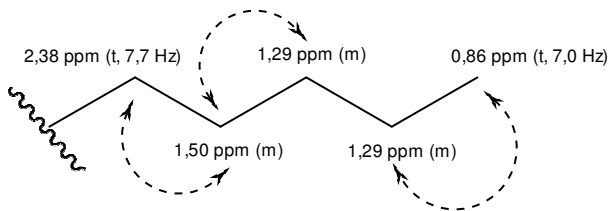
O espectro na região do infravermelho apresenta bandas características de grupamento O-H (estiramento entre  $3650\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$ ), C=O de éster (estiramento em  $1759\text{ cm}^{-1}$ ), duas bandas intensas de C-O (estiramento em  $1236$  e  $1186\text{ cm}^{-1}$ ), e bandas referentes aos grupos C-H de carbonos  $\text{sp}^3$  (estiramento em  $2955$  e  $2932\text{ cm}^{-1}$ ), C-H de carbonos

sp<sup>2</sup> (3015 cm<sup>-1</sup>), e C=C aromático (estiramento em 1597 cm<sup>-1</sup> e 1470 cm<sup>-1</sup>) (RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS, 2001).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figuras 25 e 26 e dados descritos na Tabela 6) apresenta sinais característicos de hidrogênios de anel aromático em 6,26 e 6,20 ppm, ambos integrando para 1H, dupletos com valor de  $J = 2,9$  Hz, indicando acoplamento em posição meta; um simpleto largo em 4,95 ppm, caracterizando grupamento hidroxila; um simpleto em 3,73 ppm, integrando para 3H, típico de grupamento metoxila; um simpleto em 2,29 ppm, integrando para 3H, correspondente a hidrogênios metílicos de grupo éster; e um tripleto em 2,38 ppm, integrando para 2H, correspondente a hidrogênios de grupo metileno diretamente ligado a anel aromático, com  $J = 7,7$  Hz, característico de H vicinais de cadeia alifática. Em campo mais alto, verificam-se três sinais, correspondentes a hidrogênios alifáticos: em 1,50 ppm, um multipletto com integração para 2H, em 1,29 ppm, outro multipletto com integração de 4H, e em 0,86 ppm, um tripleto com integração para 3H, com valor de  $J = 7,0$  Hz (ampliação na Figura 23). Neste caso, o mapa de correlação HSQC (Tabela 6) indicou que a presença de dois carbonos ligados aos hidrogênios em 1,29 ppm, tratando-se, portanto, de dois grupos metílicos. Dessa forma, estes sinais em campo mais alto, bem como o tripleto em 2,37 ppm, correspondem a uma cadeia lateral alifática de cinco carbonos ligada ao anel aromático.

O mapa de correlação COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H auxiliou na atribuição dos sinais na cadeia lateral. Observou-se correlação entre o sinal dos hidrogênios em 1,50 ppm e os hidrogênios em 2,38 e 1,29 ppm, e deste último com o sinal dos hidrogênio com deslocamento de 0,86 ppm, conforme apresentado na Figura 23.

Figura 23. Correlações verificadas no mapa COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H entre os sinais de hidrogênios pertencentes à cadeia lateral.



Os dados obtidos indicam tratar-se da substância acetato de miconidina (2-metóxi-1-acetóxi-6-*n*-pentilfenol), um derivado de

hidroquinona, já reportado para as folhas desta espécie (FALKENBERG, 1996) e para as folhas e caules de *Primula obconica* (HORPER; MANER, 1995). Dessa forma, através da comparação dos dados espectrais obtidos neste trabalho com aqueles da literatura, conforme demonstrado na Tabela 6, confirmou-se esta estrutura (Figura 24).

O mapa de HSQC indicou os deslocamentos dos carbonos aos quais os hidrogênios estão ligados diretamente (Tabela 6), sendo que a atribuição do valor dos carbonos ligados aos hidrogênios em 1,29 ppm foi realizada de acordo com os dados da literatura.

Figura 24. Estrutura da substância GE1 (acetato de miconidina).

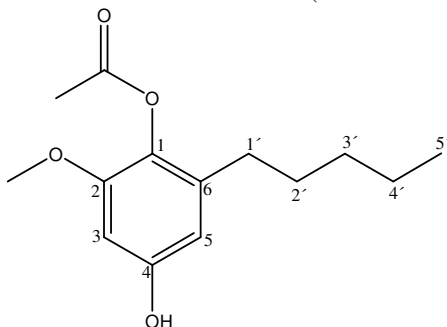


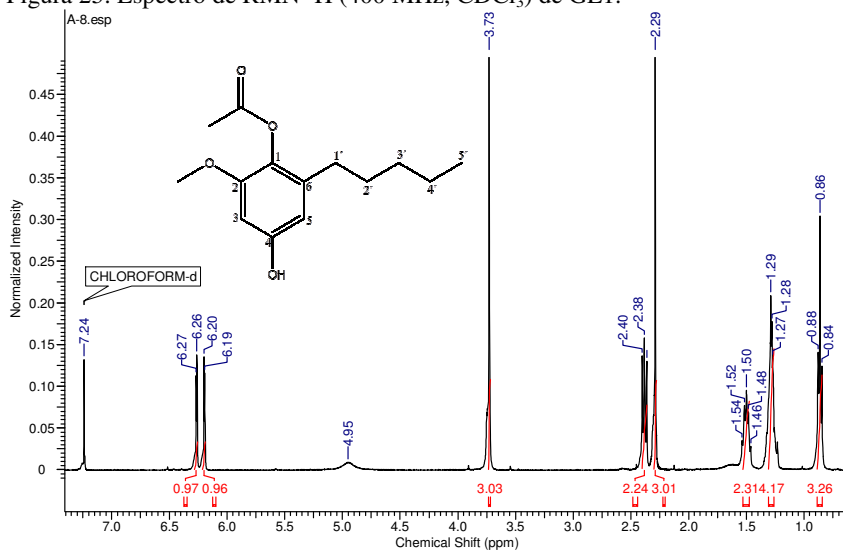
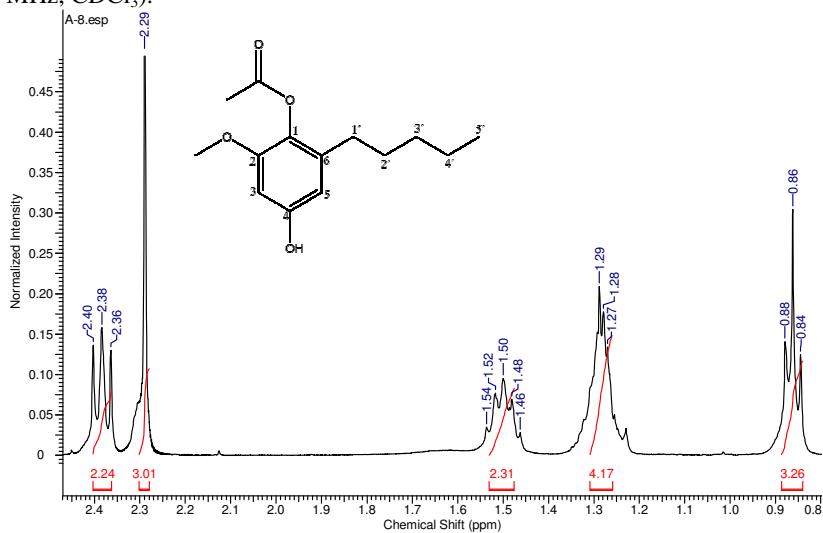
Figura 25. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de GE1.Figura 26. Espectro ampliado de RMN  $^1\text{H}$  (região 2,45 a 0,8 ppm) de GE1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Tabela 6. Dados espectrais de RMN da substância GE1 obtidos no presente trabalho e em comparação com a literatura para acetato de miconidina.

Posição	GE1 (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )				Falkenberg (1996) (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) <sup>1</sup>	Horper e Maner (1995) (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) <sup>2</sup>	Falkenberg (1996) (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) <sup>1</sup>
	δ <sub>H</sub> (mult., J Hz)	δ <sub>C</sub>	HMBC (δ <sub>C</sub> )	COSY (δ <sub>H</sub> )	δ <sub>H</sub> (mult., J Hz)	δ <sub>H</sub> (mult., J Hz)	δ <sub>C</sub>
1	-	132,6	-	-	-	-	131,2
2	-	152,2	-	-	-	-	151,3
3	6,26 (1H, d, 2,9)	98,6	107,8;132,6;154,5	3,73	6,22 (1H, d, 3,0)	6,3 (1H, d, 2,63)	98,2
4	-	154,5	-	-	-	-	154,0
5	6,20 (1H, d, 2,9)	107,8	30,5;98,3;154,5	-	6,17 (1H, d, 3,0)	6,18 (1H, d, 2,63)	107,6
6	-	137,2	-	-	-	-	136,1
1'	2,38 (2H, t, 7,7)	30,5	30,5; 107,8; 132,6; 137,2	1,50	2,40 (2H, t)	2,5 (2H, t, 6,6)	30,1
2'	1,50 (2H, m)	29,8	23,8; 30,5	1,29; 2,38	1,5 (2H, m)	1,7-1,2 (6H, m)	29,5
3' e 4'	1,29 (4H, m)	30,9; 23,8	0,86; 23,7	0,86; 1,50	1,29 (4H, m)		31,6; 22,5
5'	0,86 (3H, t, 7,0)	14,4	14,4; 23,8	1,29	0,87 (3H, t)	0,9 (3H, t, 5,8)	14,0
OCH <sub>3</sub>	3,72 (3H, s)	56,2	56,2; 152,2	6,26	3,70 (3H, s)	3,68 (3H, s)	55,8
OCOCH <sub>3</sub>	2,29 (3H, s)	20,6	20,6; 171,9	-	2,31 (3H, s)	2,2 (3H, s)	20,6
OCOCH <sub>3</sub>	-	171,9	-	-	-	-	170,1
OH	4,95 (sl)	-	-	-	-	-	-

Conforme mencionado, esta substância já foi isolada das folhas de *E. hiemalis* (FALKENBERG, 1996), porém, no presente trabalho seu isolamento se deu também a partir dos botões florais. Não há relatos do seu isolamento em outras espécies, sendo que Horper e Maner (1995) obtiveram originalmente este composto por síntese a partir da primina, mas estimaram que o acetato de miconidina estivesse presente na concentração de 1-5 % do extrato de *Primula obconica*.

A hidroquinona correspondente, miconidina, foi isolada de *Miconia* sp. (Melastomaceae) (MARINI-BETTOLO et al., 1971) e, posteriormente, acreditando-se que outros compostos, além da primina, provocariam as reações alérgicas causadas por *Primula obconica* (DOOMS-GOOSSENS et al., 1989; HAUSEN, 1978), estudos conduziram ao isolamento de miconidina também naquela espécie (HORPER; MARNER, 1995; KREBS; CHRISTENSEN, 1995).

O único estudo de atividade biológica reportado para o acetato de miconidina indicou que, apesar deste constituir forma de reserva para a primina (e que sua fácil hidrólise *in vivo* seria esperada), foi bem menos ativo que esta em relação às células leucêmicas da linhagem KG-1a (EFFERTH et al., 1996).

Em estudos clínicos, a hidroquinona miconidina apresentou atividade alergênica e, este efeito foi justificado pela sua conversão em primina, por processos de oxidação (PAULSEN; CHRISTENSEN; ANDERSEN, 2006). Outras atividades biológicas também foram observadas, como anti-alimentar (BERNAYS et al., 1984), anti-*Trypanosoma cruzi* (GOIJMAN et al., 1984) e contra cepas não patogênicas, como *T. mega* e *Crithidia fasciculada* (PAHN; PORTELA; STOPPANI, 1988). Além disso, foi observada atividade antimicrobiana e antineoplásica (sarcoma 180 e sarcoma Yoshida) (LIMA et al., 1970 apud GUNATILAKA et al., 2001).

#### 4.7.2 Substância GE2

GE2 foi obtido como um sólido cristalino de cor amarela nas frações A1-86-93 (Coluna A1), A2-72-74 (Coluna A2), e C-56-65 (Coluna C), com rendimento total de 143,8 mg, conforme os esquemas apresentados nas Figuras 10 e 11.

Apresenta-se na CCD em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  (8:2) como uma mancha em Rf 0,45; após revelação com anisaldeído sulfúrico, adquire coloração marrom-esverdeada e após revelação com reagente de Craven, cor azul, indicando tratar-se de uma quinona com pelo menos um carbono livre adjacente à carbonila (CRAVEN, 1936). A substância

apresenta extinção de fluorescência em 254 nm e fluorescência *deep purple* em 366 nm.

O espectro na região do infravermelho apresenta bandas características de grupamento *p*-benzoquinona (estiramento em 1680 e 1651  $\text{cm}^{-1}$ ), uma banda intensa típica do estiramento de  $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$  de éter insaturado (1240  $\text{cm}^{-1}$ ), além de estiramentos de C-H de carbono  $\text{sp}^3$  (2962 e 2920  $\text{cm}^{-1}$ ), carbono  $\text{sp}^2$  (3072  $\text{cm}^{-1}$ ), e  $\text{C}=\text{C}$  olefínico (1629 e 1601  $\text{cm}^{-1}$ ) (RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS, 2001).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 28 e 29 e os dados descritos na Tabela 7) apresenta dois sinais em campo mais baixo: um em 6,48 ppm (1H, dt,  $J = 2,3, 1,7$  Hz) e um em 5,87 ppm (1H, d,  $J = 2,3$  Hz), indicando tratarem-se de hidrogênios do anel da quinona, com acoplamento em posição meta; um simpleto em 3,82 ppm, integrando para 3H, típico de grupamento metoxila; os sinais em campo mais alto são bastante semelhantes aos apresentados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  de GE1 para a cadeia lateral *n*-pentila, verificando-se um sinal em 2,43 ppm (2H, td,  $J = 7,6, 1,7$  Hz), correspondente a hidrogênios de grupo metileno diretamente ligado ao um anel, acoplando com um hidrogênio do anel em 6,48 ppm e com átomos de hidrogênio vicinais em 1,51 ppm (2H, quint.,  $J = 7,6$  Hz); um multiplete em 1,33 ppm, integrando para 4H, um tripleto em 0,89 ppm ( $J = 6,7$  Hz) integrando para 3H.

O comportamento cromatográfico e os dados espectroscópicos indicavam uma estrutura de quinona semelhante ao derivado de hidroquinona GE1 reportado anteriormente. A comparação com os dados de RMN  $^1\text{H}$  de primina na literatura (2-metóxi-6-*n*-pentil-1,4-benzoquinona) (Tabela 7), substância já isolada das folhas da espécie *E. hiemalis* (FALKENBERG, 1996), confirmou tratar-se da mesma (Figura 27). A substância GE2 apresentou faixa de fusão entre 62-63  $^{\circ}\text{C}$ , o que está de acordo com a literatura para a primina (FALKENBERG, 1996; TASDEMIR et al., 2006).

Figura 27. Estrutura da substância GE2 (primina).

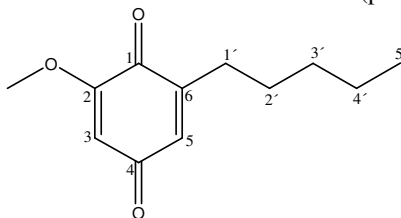


Figura 28. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de GE2.

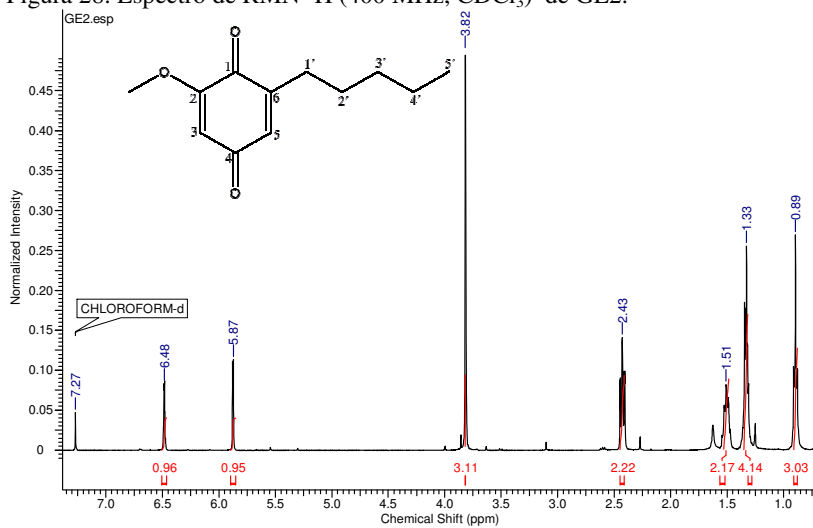


Figura 29. Espectro ampliado de RMN  $^1\text{H}$  (região 2,45 a 0,8 ppm) de GE2 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

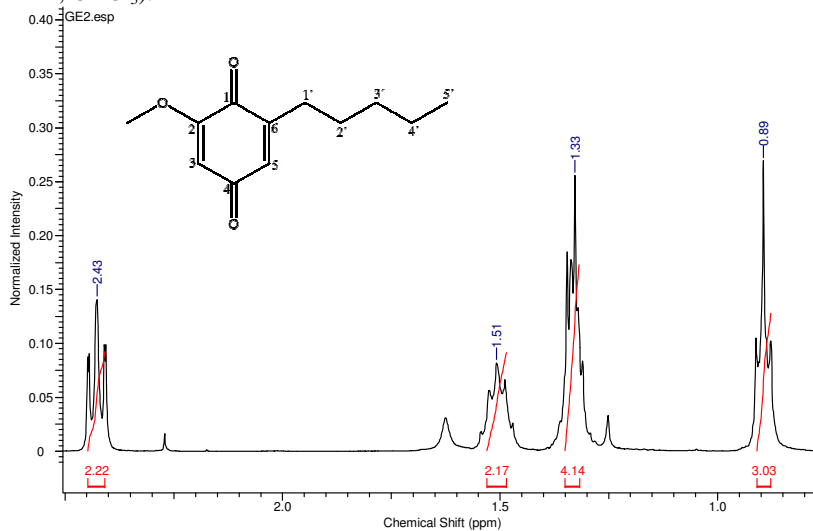


Tabela 7. Dados espectrais de RMN <sup>1</sup>H da substância GE2 obtidos neste trabalho e em comparação com a literatura para primina.

Posição	$\delta_H$ (mult., J Hz)				
	GE2 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	Falkenberg (1996) (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	Krebs e Christensen (1995) (250 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	Paulsen et al. (2006) (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	Tasdesmir et al. (2006) (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	5,87 (1H, d, 2,3)	5,86 (1H, d, 2,5)	5,87 (1H, d, 2,3)	5,88 (1H, d, 2,4)	5,87 (1H, d, 2,3)
4	-	-	-	-	-
5	6,48 (1H, dt, 2,34, 1,7)	6,47 (1H, dt, 2,5, 1,5)	6,48 (1H, dt, 2,3, 1,4)	6,49 (1H, dt, 2,4, 1,5)	6,48 (1H, dt, 2,3, 1,3)
6	-	-	-	-	-
1'	2,43 (2H, td, 7,6, 1,7)	2,42 (2H, td, 7,5, 1,5)	2,42 (2H, dt, 7,5, 1,4)	2,43 (2H, dt, 7,5, 1,5)	2,42 (2H, dt, 7,5, 1,3)
2'	1,51 (2H, quint., 7,6)	1,5 (2H, quint.)	1,50 (2H, m)	1,51 (2H, m)	1,50 (2H, quint., 7,5)
3' e 4'	1,33 (4H, m)	1,32 (4H, m)	1,15-1,45 (4H, m)	1,28-1,38 (4H, m)	1,30-1,34 (4H, m)
5'	0,89 (3H, t, 6,7)	0,87 (3H, t)	0,89 (3H, t, 6,8)	0,90 (3H, t, 6,8)	0,87 (3H, t, 6,8)
OCH <sub>3</sub>	3,82 (3H, s)	3,80 (3H, s)	3,81 (3H, s)	3,82 (3H, s)	3,81 (3H, s)

A primina foi isolada de *Primula obconica* (Primulaceae) (BLOCH; KARRER, 1927 apud HAUSEN, 1978; NESTLER, 1904 apud HAUSEN, 1978; SCHILDKNECHT; BAYER; SCHMIDT, 1967 apud HAUSEN, 1978), sendo considerada a responsável pelo efeito alergizante (dermatite) observado em quem manipulava esta planta (ROZAS-MUÑOZ et al., 2012). Primina foi encontrada posteriormente em outras espécies do gênero, como *P. elatior* (HAUSEN, 1978), bem como em *Miconia* sp. (Melastomaceae) (BETTOLO et al, 1971), *M. eriodonta* (LIMA et al, 1970 apud GUNATILAKA et al., 2001) e *M. lepidota* (GUNATILAKA et al., 2001).

No entanto, primina não foi encontrada somente no reino vegetal, mas também foi isolada dos espinhos de uma espécie de ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus* Lam.) comumente encontrado nos fundos rochosos do mar Mediterrâneo (HAUSEN; FAASCH; KÖNIG, 1987). Mais recentemente, primina foi isolada do fungo endofítico *Botryosphaeria mamane* PSU-M76, isolado das folhas de *Garcinia mangostana* (PONGCHAROEN et al., 2007).

A avaliação de atividades antimicrobiana e antineoplásica, inclusive testes clínicos realizados com a primina (LIMA et al., 1970 apud GUNATILAKA et al., 2001; MARINI-BETTOLO et al., 1971), permitiram a sua comercialização e utilização para o tratamento de câncer de pele humana. Posteriormente, a primina foi retirada do mercado devido à baixa procura e ao efeito alergênico bem pronunciado (BRONDANI et al., 2003).

Após este ocorrido, primina continuou sendo estudada, e alguns trabalhos foram realizados a partir de modificações estruturais neste composto. Neste caso, primina e derivados com modificações na cadeia lateral apresentaram atividade frente a cepas leveduriformes, bem como citotoxicidade contra linhagens celulares tumorais M109 (linhagem celular de tumor de Madison 109 de células de pulmão) e A2780 (linhagem celular de carcinoma de ovário humano) (GUNATILAKA et al., 2001). Brondani e colaboradores (2005) demonstraram a atividade citotóxica da primina e análogos sintéticos 3 e 6 alquil-substituídos frente a células de câncer nasofaríngeo (células da linha contínua KB) e toxicidade aguda em camundongos, sendo os derivados menos tóxicos que a primina. Além disso, a dose tóxica apresentada no modelo de toxicidade aguda é relativamente distante da dose que inibe 50% das células da linha contínua KB, o que levou a um terceiro estudo pré-clínico mais aprofundado.

Neste estudo, realizado também por Brondani e colaboradores (2007), os intermediários da formação das séries 3-, 5- e 6-alkil

substituídas, assim como a primina, foram avaliados *in vivo* frente a células de sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich, além de toxicidade em ratos. Os compostos intermediários bem como a primina apresentaram forte atividade antitumoral, sendo que os derivados apresentaram baixa toxicidade. Ainda, com relação à atividade citotóxica, primina demonstrou atividade contra células leucêmicas KG-1a (EFFERTH et al., 1996) e frente à linhagem celular de fibroblastos de ratos Balb/c 3T3 (LANDA et al., 2012).

Estudo realizado por Tasdemir e colaboradores (2006) mostrou potente atividade antiprotozoária da primina frente a *Trypanosoma b. rhodesiense* e *Leishmania donovani*, e moderada frente a *T. cruzi* e *Plasmodium falciparum*, bem como *Mycobacterium tuberculosis*. Os resultados levaram à análise *in vivo*, porém não apresentando boa efetividade. Foi verificada atividade antiparasitária da primina também frente a *Crithidia fasciculata*, e *T. mega* (PAHN; PORTELA; STOPPANI, 1988), além da atividade molusquicida (SCHILDKNECHT; LUBOSCH, 1987 apud TASDEMIR, 2006) e antialimentar (BERNAYS et al., 1984).

Primina também foi testada em modelos de inflamação, sendo que Landa e colaboradores (2012) verificaram forte atividade inibitória seletiva contra COX-2 em relação a COX-1. Em outro trabalho do mesmo grupo, verificou-se também inibição de 5-LOX, sendo este resultado superior ao composto de referência zileutona (LANDA et al., 2011). Análises *in silico* por docking demonstraram que a estrutura molecular da primina foi essencial para a atividade de inibição de 5-LOX (LANDA et al., 2013).

#### 4.7.3 Substância GE6

GE6 foi obtido como um sólido de cor laranja das frações B3-24-35, com rendimento total de 3,4 mg (Figura 20). Apresenta-se na CCD em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% como uma mancha em R<sub>f</sub> 0,6; após revelação com anisaldeído sulfúrico, adquire cor-bege claro e após revelação com reagente de Craven, coloração azul-esverdeada, indicando tratar-se de uma quinona com um carbono livre adjacente à carbonila (CRAVEN, 1936). A substância apresenta extinção de fluorescência em 254 nm e fluorescência *deep purple* em 366 nm.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 31 e 32 e dados descritos na Tabela 8) apresenta um sinal em campo mais baixo 5,70 ppm (1H, s), indicando tratar-se de um hidrogênio do anel da quinona; um simpleto em 3,83 ppm, integrando para 3H, típico de grupamento metoxila. Os

sinais em campo mais alto são bastante semelhantes àqueles do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de GE2 e GE1, sugerindo a presença de cadeia lateral *n*-pentila também para este composto. Verifica-se um sinal em 2,33 ppm (2H, t,  $J = 7,6$  Hz), correspondente a hidrogênios de grupo metileno diretamente ligado ao anel quinônico, acoplando com os hidrogênios vicinais em 1,39 ppm (2H, m); um multiplete em 1,27 ppm, integrando para 4H, um tripleto em 0,86 ppm ( $J = 6,9$  Hz) integrando para 3H. Além disso, o espectro apresenta um simpleto em 2,31 ppm, integrando para 3H, sugerindo tratar-se de hidrogênios metílicos de um grupo acetila.

Estes dados indicam uma estrutura de quinona semelhante a GE2 reportado anteriormente, porém com apenas uma posição livre no anel quinônico. A outra posição seria substituída por um grupamento éster. O conjunto de dados de RMN  $^1\text{H}$  foram comparados com os dados de uma quinona obtida a partir de síntese do álcool 3,5-dimetoxibenzílico (BARBOSA et al., 2001), conforme apresentando na Tabela 8. Os valores se mostraram muito semelhantes, indicando tratar-se da substância apresentada na Figura 30 (5-acetóxi-2-metóxi-6-pentil-1,4-benzoquinona ou 5-acetóxi-primina). Destaca-se que o valor de 1,69 ppm atribuído aos H do grupo metila do éster por Barbosa e colaboradores (2001) não corresponde a um deslocamento típico deste grupamento (tipicamente próximo a 2,40 ppm) (RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS, 2001). Em contato com um dos autores do artigo, o mesmo afirmou tratar-se de erro de digitação no trabalho publicado (Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa - informação pessoal).

Espectros adicionais estão sendo obtidos para confirmação da estrutura proposta. Destaca-se que este é o primeiro relato do isolamento desta substância como produto natural.

Figura 30. Estrutura proposta para a substância GE6 (5-acetóxi-primina).

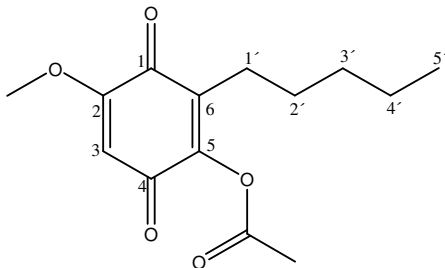




Figura 31. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de GE6.

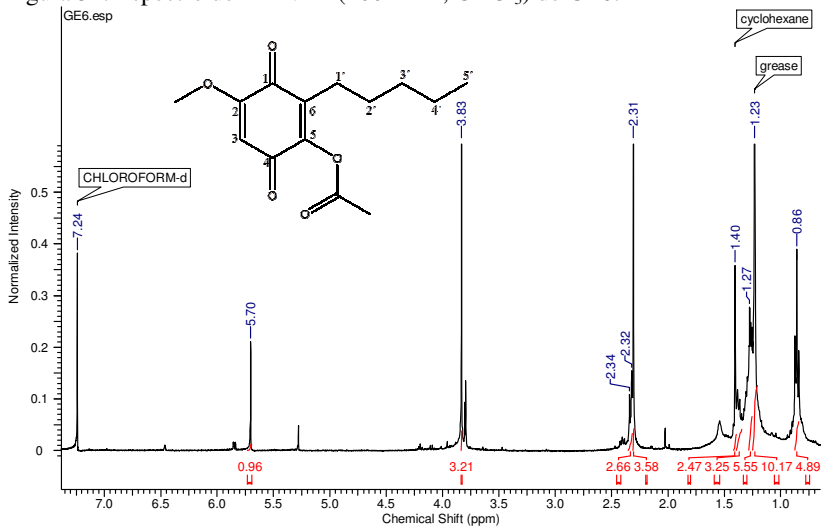


Figura 32. Espectro ampliado de RMN  $^1\text{H}$  (região 2,5 a 0,8 ppm) de GE6 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

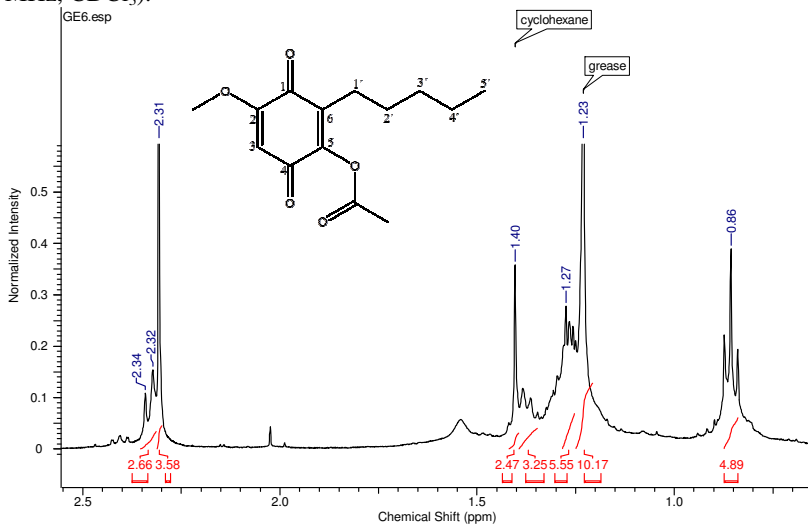


Tabela 8. Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  da substância GE6 obtidos neste trabalho e em comparação com a literatura para 5-acetóxi-primina.

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J Hz)	
	GE6 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Barbosa et al. (2001) (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
1	-	-
2	-	-
3	5,70 (1H, s)	5,72 (1H, s)
4	-	-
5	-	-
6	-	-
1'	2,33 (2H, t, 7,6)	2,34 (2H, dd, 7,5)
2'	1,39 (2H, m)	
3' e 4'	1,27 (4H, m)	1,25-1,52 (6H, m)
5'	0,86 (3H, t, 6,9)	0,87 (3H, t, 6,6)
$\text{OCH}_3$	3,83 (3H, s)	3,85 (3H, s)
$\text{OCOCH}_3$	2,31 (3H, s)	1,69 (3H, s)*

\* Valor publicado erroneamente segundo o autor (Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa - informação pessoal). Valor correto: próximo a 2,40 ppm) (RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS, 2001).

### 4.7.3 Substância GE8

GE8 foi obtido como um sólido de cor laranja da fração B3-42-45 (Coluna B3), com rendimento de 4,1 mg (Figura 20). Apresenta-se na CCD em  $\text{CHCl}_3$ /Acetona (98:2) como uma mancha em Rf 0,45; após revelação com anisaldeído sulfúrico, adquire cor bege-claro e após revelação com reagente de Craven, cor azul, sugerindo tratar-se de outra quinona com pelo menos um carbono livre adjacente a carbonila (CRAVEN, 1936). Esta substância apresenta extinção de fluorescência em 254 nm e fluorescência *deep purple* em 366 nm.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 34 e 35 e dados descritos na Tabela 9) apresenta três sinais em campo mais baixo: um em 6,44 ppm (1H, d,  $J = 2,6$ ), outro em 6,23 ppm (1H, d,  $J = 2,6$  Hz), e um terceiro em 5,70 ppm (1H, s). Adicionalmente, sinais em 3,78 ppm (3H, s) e 3,69 ppm (3H, s) indicam a presença de duas metoxilas. A presença do grupo éster pode ser verificada pelo sinal em 2,30 ppm (3H, s). Estes sinais são bastante semelhantes aos encontrados para as substâncias GE1 e GE2, sugerindo tratar-se de um composto formado pela ligação de ambas. Os sinais de ambas as cadeias laterais se sobrepõem no espectro, sendo o sinal em 2,39 ppm (4H, m) correspondente aos hidrogênios em posição

$\alpha$  ao anel, o sinal em 1,48 ppm (4H, m) correspondente aos hidrogênios em posição  $\beta$ , o sinal em 1,25 ppm (8H, m) correspondente aos hidrogênios em posição  $\gamma$  e  $\delta$ , e o sinal em 0,83 ppm (6H, t,  $J = 6,75$  Hz) correspondente aos hidrogênios metílicos.

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e HSQC foram comparados com aqueles da substância EH3b (FALKENBERG, 1996), um “dímero” formado a partir de primina e acetato de miconidina, conforme Tabela 9, indicando tratar-se da estrutura proposta (5-metóxi-2-(3'-metóxi-4'-acetóxi-5-pentil)-fenóxi-3-pentil-1,4-benzoquinona) (Figura 33). Esta substância já havia sido isolada das folhas da espécie *E. hiemalis* (FALKENBERG, 1996), sendo proposto o nome hiemaloquinona. Não há relatos do seu isolamento em outras espécies.

Espectros adicionais estão sendo obtidos para confirmação da estrutura proposta.

Figura 33. Estrutura proposta para a substância GE8 (hiemaloquinona).

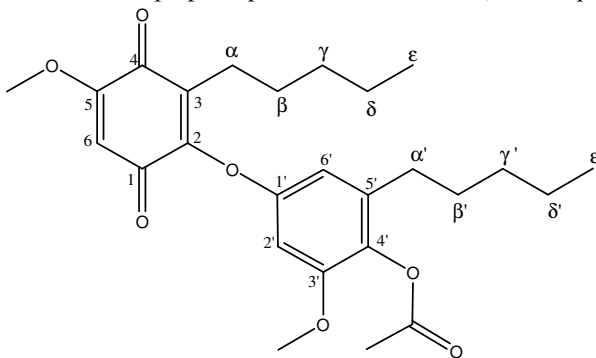


Figura 34. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de GE8.

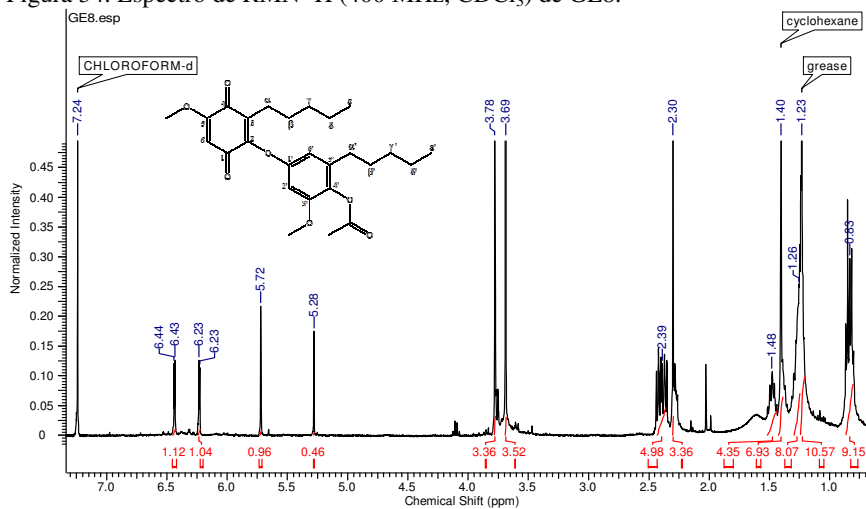


Figura 35. Espectro ampliado de RMN  $^1\text{H}$  de GE8 (região 2,5 a 0,8 ppm) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

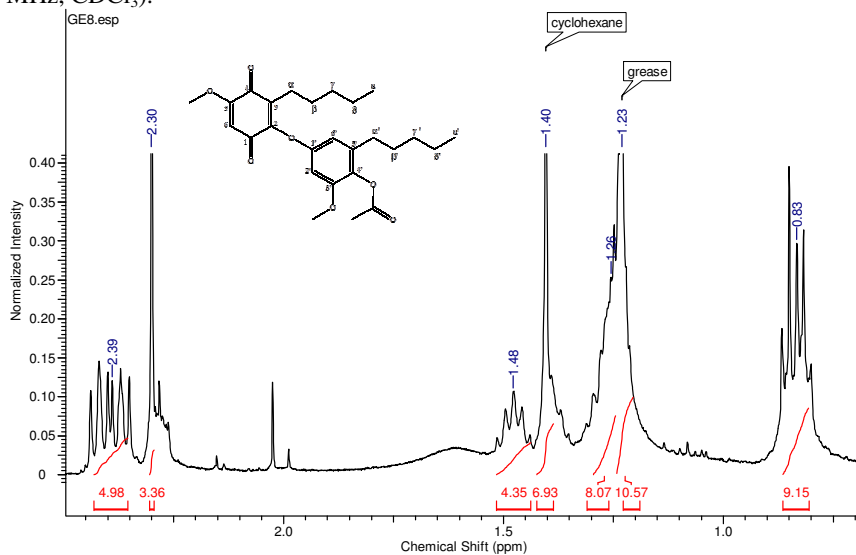


Tabela 9. Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  da substância GE8 obtidos neste trabalho e em comparação com a literatura para a hiemaloquinona.

Posição	GE8 (400/100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )		Falkenberg (1996) (400/100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	
	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (HSQC)	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	-	-	178,3
2	-	-	-	153,4
3	-	-	-	133,1
4	-	-	-	180,1
5	-	-	-	165,5
6	5,72 (1H, s)	101,5	5,75 (1H, s)	101,5
1'	-	-	-	154,7
2'	6,23 (1H, d, 2,6)	106,8	6,2 (1H, d, 3)	106,7
3'	-	-	-	152
4'	-	-	-	133,7
5'	-	-	-	136,7
6'	6,44 (1H, d, 2,6)	98,3	6,4 (1H, d, 3)	98,3
$\alpha$ e $\alpha'$	2,39 (4H, m)	23,7 ( $\alpha$ ); 30,2 ( $\alpha'$ )	2,41 (4H, m)	23,7 ( $\alpha$ ); 30,3 ( $\alpha'$ )
$\beta$ e $\beta'$	1,48 (4H, m)	28,1 ( $\beta$ ); 29,5 ( $\beta'$ )	1,5 (4H, m)	28,2 ( $\beta$ ); 29,6 ( $\beta'$ )
$\gamma$ , $\gamma'$ e $\delta$ , $\delta'$	1,25 (8H, m)	31,4 ( $\gamma$ ); 31,7 ( $\gamma'$ ); 22,4 ( $\delta$ ; $\delta'$ )	1,2 (8H, m)	31,4 ( $\gamma$ ); 31,8 ( $\gamma'$ ); 22,4 ( $\delta$ ; $\delta'$ )
$\epsilon$ e $\epsilon'$	0,83 (6H, t, 6,75)	13,9 ( $\epsilon$ ; $\epsilon'$ )	0,8 (6H, t)	14,0 ( $\epsilon$ ; $\epsilon'$ )
2-OCH <sub>3</sub>	3,69 (3H, s)	56,8	3,7 (3H, s)	56,8
2'-OCH <sub>3</sub>	3,78 (3H, s)	56,1	3,8 (3H, s)	56,1
OCOCH <sub>3</sub>	2,30 (3H, s)	20,5	2,3 (3H, s)	20,5
OCOCH <sub>3</sub>	-	-	-	168,8

#### 4.7.4 Substância GE9

GE9 foi isolado como um óleo amarelo-claro da fração C-50-51, com rendimento de 3,7 mg. Apresenta-se em CCD em Hx/AcOEt (9:1) como uma mancha em Rf 0,3; após revelação com anisaldeído sulfúrico adquire cor vermelha intensa. A substância apresenta extinção de fluorescência em 254 nm e fluorescência *deep purple* em 366 nm.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 10) apresentou sinais semelhantes aos de GE1, mas com um H aromático adicional e ausência de metila correspondente ao grupo acetóxi. Os dados foram comparados com a literatura (Tabela 10), sugerindo tratar-se de metil-olivetol (1-metóxi-5-*n*-pentil-fenol) (Figura 36), substância já isolada das folhas de *E. hiemalis* (FALKENBERG, 1996), bem como de *Ardisia virens* (Myrsinaceae) (CHANG et al., 2009), *A. cornudentata* (CHANG et al., 2011), *Embelia ribes* (Myrsinaceae) (LIN et al., 2006), do fungo endofítico *Annulohyphoxylon* sp. (CHENG et al., 2013) e dos líquens da espécie *Cladina macaronesica* (GONZÁLEZ; BARRERA; PÉREZ, 1991).

Foi encontrado como produto da metabolização de olivetol pelo fungo *Fusarium roseum* (MCCLANAHAN et al., 1985), como artefato nos líquens da espécie *Hypotrachyna partita* (CULBERSON; CULBERSON; JOHNSON, 1977) e produto de síntese química (AYER; BROWNE; LOVELL, 1983).

Metil-olivetol apresetou atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermis*, e antifúngica contra *Candida albicans* (AYER; BROWNE; LOVELL, 1983) e fraca atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (CHANG et al., 2011). Não apresentou citotoxicidade sobre algumas linhagens de células tumorais e foi inativo sobre a inibição da trombina e proteína tirosina fosfatase 1B (LIN et al., 2006).

Figura 36. Estrutura proposta para a substância GE9 (metil-olivetol).

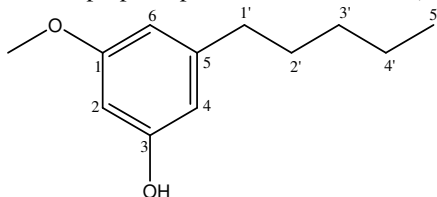


Tabela 10. Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  da substância GE9 obtidos neste trabalho e em comparação com a literatura para metil-olivetol.

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ Hz)			
	GE9 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	González; Barrera; Pérez (1991) (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Horper; Marner (1995) (80 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	McClanahan; Robertson (1985) (80 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
1	-	-	-	-
2,4,6	6,34 (1H, dd, 1,7; 2,35) 6,27 (1H, dd, 1,7; 2,35) 6,24 (1H, t, 2,35)	6,34 (1H, d, 1,2) 6,29 (1H, d, 1,3) 6,26 (1H, d, 1,3)	6,18-6,38 (3H, m)	6,25-6,32 (3H, m)
3	-	-	-	-
5	-	-	-	-
1'	2,52 (2H, t, 7,6)	2,51 (2H, t, 7,5)	2,5 (2H, t, 6,6)	2,51 (2H, t, 7)
2'	1,60 (2H, m)	1,58 (2H, m)		
3' e 4'	1,32 (4H, m)	1,32 (4H, m)	1,8-1,1 (6H, m)	1,25-1,65 (6H, m)
5'	0,86 (3H, t, 6,3)	0,89 (3H, t, 6,3)	0,9 (3H, t, 5,8)	0,88 (3H, t, 6)
$\text{OCH}_3$	3,78 (3H, s)	3,76 (3H, s)	3,75 (3H, s)	3,75 (3H, s)

#### 4.5.4 Substância GE14

GE14 foi obtido como um pó de cor amarela das frações D5-10-13, D6-9-10, D10-13-16, D11-27-41, D12-25-27, D13-16-22, D15-69-73 e D16-121-137, com rendimento total de 57,0 mg (Figuras 16 e 17).

Apresenta-se na CCD em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (8:2) como uma mancha amarela-clara em  $R_f$  0,65; após revelação com anisaldeído sulfúrico, adquire cor amarela mais intensa. A substância apresenta extinção de fluorescência em 254 nm e fluorescência *deep purple* em 366 nm. A revelação com vapor de amônia provoca também intensificação da cor amarela no visível e alteração de fluorescência para amarelo-esverdeado em 366 nm. O conjunto dos dados sugeriu que a substância trata-se de um flavonoide, sendo provavelmente do tipo flavona ou flavonol. Para confirmação, foram realizados os testes com os reagentes de deslocamento, conforme descrito na metodologia.

O espectro na região do ultravioleta de flavonas e flavonóis em solução metanólica apresenta dois picos mais intensos de absorção, comumente denominados de banda I (entre 300-380 nm, associada à absorção do sistema cinamoila do anel B) e banda II (entre 240-280 nm, associada à absorção do sistema benzoila do anel A). De maneira geral, quanto maior a oxigenação do anel, maior a intensidade da banda correspondente ao mesmo (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Da mesma forma, o  $\lambda_{\text{máx}}$  correspondente à banda I pode ser utilizado para distinguir flavonas ( $\lambda_{\text{máx}}$  entre 304-350 nm) de flavonóis com 3-OH livre ( $\lambda_{\text{máx}}$  entre 352-385 nm). Flavonóis 3-OH substituídos apresentam  $\lambda_{\text{máx}}$  parcialmente sobreposto ao observado para flavonas ( $\lambda_{\text{máx}}$  entre 328-357).

O espectro UV/Vis em MeOH de GE14, bem como os demais espectros obtidos com os reagentes de deslocamento estão apresentados na Figura 39 e os dados espectrais descritos na Tabela 11. A substância GE14 apresentou  $\lambda_{\text{máx}}$  em 351 nm (banda I) e 256 e 265sh nm (banda II) (MeOH). O valor correspondente à banda I sugere que se trata de um flavonol 3-OH substituído. O desvio batocrômico de 59 nm observado na banda I após a adição de NaOMe, indica a presença de oxigenação da posição C-4'.

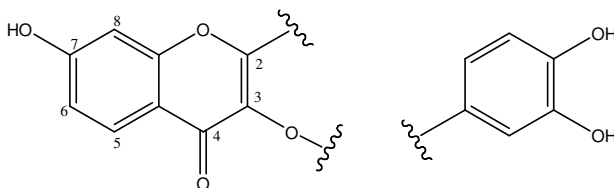
O desvio hipsocrômico de 23 nm da banda Ia do espectro de  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  em relação à banda I do espectro com  $\text{AlCl}_3$  indica a presença de grupo orto-dihidroxila, o qual foi decomposto pela adição do ácido. Após a adição de HCl foi observado ainda um desvio batocrômico de 47 nm da banda Ia em relação à banda I do espectro original em MeOH, sugerindo substituição na posição C-3.



Com a adição de NaOAc, foi observado um desvio batocrômico de 9 nm na banda II, sugerindo a presença de hidroxila livre na posição C-7. Após a adição de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> verificou-se um desvio batocrômico de 20 nm na banda I em relação à mesma banda no espectro original em MeOH, reforçando a evidência de grupo orto-dihidroxila, principalmente no anel B.

O conjunto de dados sugere tratar-se de um flavonol substituído na posição C-3, com hidroxila livre em C-7, bem como grupo orto-dihidroxila na posição C-4', conforme estrutura parcial apresentada na Figura 37.

Figura 37. Estruturas parciais da substância GE14 propostas com base nos dados obtidos nos testes com os reagentes de deslocamento para flavonas e flavonóis.



Os dados obtidos foram comparados com a literatura (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970), observando-se que os valores de GE14 são praticamente idênticos aos de quercitrina (Figura 38) (Tabela 10). Em CCD comparativa (sistema composto por CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 8:2) com um padrão desta substância, verificou-se sobreposição das manchas. Dessa forma, os dados obtidos indicam que GE14 corresponde a quercitrina. Dados espectrais de RMN estão sendo obtidos para confirmação da proposta.

Figura 38. Estrutura proposta para a substância GE14 (quercitrina).

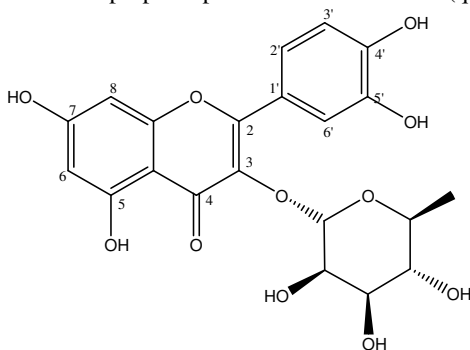


Figura 39. Espectros de UV-Vis da substância GE14 no teste com os reativos de deslocamento.

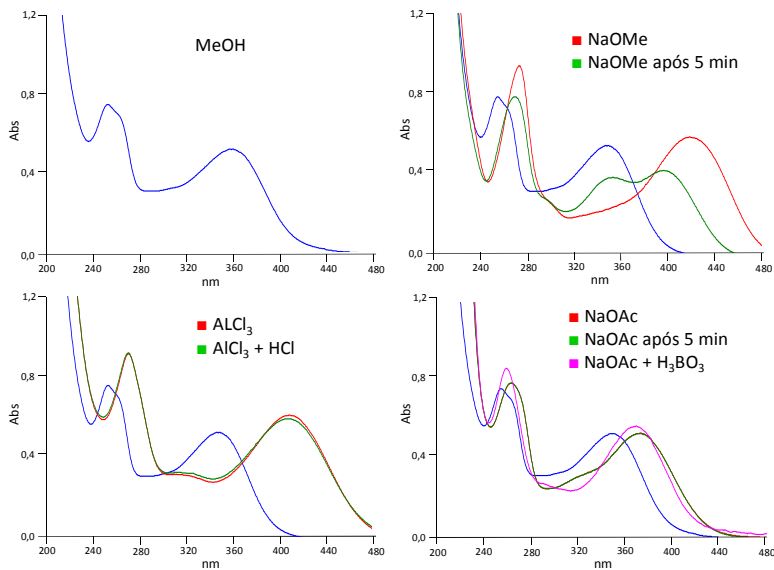


Tabela 11. Comparação dos  $\lambda_{\text{máx}}$  nos espectros de UV/Vis com reagentes de deslocamento: GE14 e quercitrina (QR)<sup>1</sup>.

Solução + reativos	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)							
	Banda II		Banda IIa		Banda I		Banda Ia	
	GE14	QR	GE14	QR	GE14	QR	GE14	QR
Metanol	256; 265 sh	256; 265 sh			351	350		
NaOMe	274	270			410	393		
AlCl <sub>3</sub>	275	276	302 sh	304 sh	421	430		
AlCl <sub>3</sub> + HCl	271	272	302 sh	303 sh	355	353	398	401
NaOAc	265	272			374	322 e 372		
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	261	260			371	367		

<sup>1</sup> Mabry; Markham; Thomas (1970).

Entre os flavonoides, quercetina, uma aglicona da classe do tipo flavonol, é o mais comum, estando presente geralmente em forma glicosilada, como rutina ou quercitrina (COMALADA et al., 2005). Esta última corresponde a 3-*O*-ramnosil-quercetina, e já foi identificada e isolada de espécies do gênero *Eugenia*, inclusive de *E. hiemalis* (BOKESCH et al., 2008). Foi identificada e quantificada em extratos de *E. aggregata*, *E. brasiliensis*, *E. luschnathiana*, *E. reinwardtiana* (REYNERTSON et al., 2008) e isolada de *E. uniflora* (OLIVEIRA et al., 2014; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987) e *E. malaccensis* (NOREEN et al., 1998). Adicionalmente, foi isolada de vários outros gêneros e famílias botânicas.

Com relação às atividades biológicas de quercitrina, destaca-se a atividade antioxidante, já descrita anteriormente, em que esta substância apresenta bons resultados, bem como atividade antiprotozoária (MUZITANO et al., 2006), antiviral (CHEN et al., 2011), porém com fraca atividade antibacteriana (GEHRKE et al., 2013). Foi verificada também atividade anticolinesterásica (HERNANDEZ et al., 2010), inibição da enzima aldose redutase (MOK; LEE, 2013), atividade fotoprotetora (YIN et al., 2013), anti-inflamatória (XIA et al., 2012), diurética (FUKUDA et al., 1996), entre outras.

## 4.6 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

### 4.6.1 Análise da composição química e sazonalidade

O gênero *Eugenia* possui muitas espécies ricas em óleos essenciais, sendo algumas muito apreciadas e utilizadas na medicina popular bem como na indústria, como *E. caryophyllata* (cravo-da-índia) (CHAIIB et al., 2007a) e *E. uniflora* (pitanga) (GUZMAN et al., 2014).

De maneira geral, os óleos essenciais deste gênero são caracterizados pela diversidade química, incluindo mais de 300 compostos já identificados (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

No entanto, apesar de muitas espécies possuírem seus óleos essenciais caracterizados, é importante destacar que grande parte destes estudos não consideram as variações sazonais ou intraespecíficas (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). Ressalta-se a importância deste conhecimento, uma vez que possíveis variações na composição química dos óleos essenciais levam a alterações nas suas propriedades biológicas (CERQUEIRA et al., 2009).

No presente trabalho analisou-se a variação da composição química dos óleos essenciais das folhas e *E. hiemalis* coletadas ao longo das quatro estações do ano no município de Blumenau (Tabela 12). Como os parâmetros meteorológicos, entre eles, temperatura atmosférica e precipitação, podem influenciar no teor dos óleos e na composição química dos mesmos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), estes dados também foram obtidos junto a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) (Tabela 13).

Todos os óleos foram obtidos através da técnica de extração por arraste de vapor, em aparelho de Clevenger, e os constituintes analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC). Os rendimentos (v/p) foram calculados levando-se em conta o volume do óleo obtido em relação ao peso total das folhas frescas utilizadas no procedimento.

Tabela 12. Compostos identificados (%) nos óleos essenciais de *E. hiemalis* coletados nas quatro estações do ano.

	Compostos	Tr <sup>a</sup>	Concentração relativa (%)				IR <sup>b</sup>		CV <sup>e</sup>
			Inverno	Primavera	Verão	Outono	L <sup>c</sup>	E <sup>d</sup>	
1	1-octen-3-ol	9,05	5,19 ± 0,33	4,92 ± 0,05	5,56 ± 0,19	tr	974	979	67
2	α-cubebeno	26,21	0,40 ± 0,04	0,58 ± 0,01	0,75 ± 0,01	0,24 ± 0,03	1345	1348	45
3	α-ylangeno	27,16	0,24 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,24 ± 0,11	1373	1370	20
4	α-copaeno	27,36	3,53 ± 0,08	5,28 ± 0,02	5,64 ± 0,04	2,22 ± 0,03	1374	1374	38
5	β-bourboneno	27,74	0,58 ± 0,03	0,78 ± 0,04	0,48 ± 0,01	0,26 ± 0,04	1387	1383	41
6	α-gurjuneno	28,82	0,32 ± 0,02	0,63 ± 0,02	0,90 ± 0,01	0,30 ± 0,01	1409	1408	53
7	β-cariofileno	29,24	6,19 ± 0,01	9,43 ± 0,03	9,18 ± 0,02	4,80 ± 0,09	1417	1418	31
8	β-copaeno	29,63	1,57 ± 0,04	1,86 ± 0,05	2,21 ± 0,01	1,42 ± 0,01	1430	1427	20
9	Aromadendreno	30,04	3,43 ± 0,15	4,10 ± 0,05	4,69 ± 0,02	2,91 ± 0,16	1439	1437	21
10	α-guaieno	30,23	0,30 ± 0,01	0,35 ± 0,05	0,34 ± 0,01	0,28 ± 0,07	1437	1442	10
11	α-humuleno	30,65	1,59 ± 0,03	2,10 ± 0,01	2,23 ± 0,02	1,70 ± 0,06	1452	1451	16
12	Allo-aromadendreno	30,96	0,41 ± 0,09	0,50 ± 0,03	1,15 ± 0,01	0,44 ± 0,02	1458	1459	56
13	Trans-cadina-1(6),4-dieno	31,50	0,28 ± 0,02	0,39 ± 0,03	0,48 ± 0,01	0,44 ± 0,00	1475	1472	22
14	γ-muuroleno	31,67	4,39 ± 0,07	4,80 ± 0,04	4,78 ± 0,07	5,27 ± 0,04	1478	1475	7
15	Germacreno D	31,79	1,15 ± 0,02	4,61 ± 0,03	4,02 ± 0,07	1,87 ± 0,03	1484	1479	57
16	β-selineno	32,01	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,25 ± 0,02	1489	1484	8
17	Trans-muurolo-4(14),5-dieno	32,23	0,27 ± 0,00	0,31 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,01	1493	1489	9
18	Biciclogermacreno	32,42	5,70 ± 0,08	12,75 ± 0,09	14,24 ± 0,04	9,37 ± 0,02	1500	1494	36
19	α-muuroleno	32,60	1,30 ± 0,11	1,44 ± 0,06	1,64 ± 0,02	1,72 ± 0,05	1500	1499	13
20	Trans-β-guaieno	32,88	0,26 ± 0,01	0,37 ± 0,03	0,50 ± 0,01	0,37 ± 0,02	1502	1503	26
21	γ-cadineno	33,14	2,69 ± 0,04	3,52 ± 0,03	3,20 ± 0,02	3,86 ± 0,12	1513	1511	15
22	δ-cadineno	33,54	10,74 ± 0,07	7,50 ± 0,04	13,06 ± 0,07	15,93 ± 0,12	1522	1521	30
23	Trans-cadina-1,4-dieno	33,87	0,38 ± 0,00	0,39 ± 0,03	0,62 ± 0,02	0,65 ± 0,04	1533	1530	28
24	α-cadineno	34,07	0,41 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,46 ± 0,00	0,56 ± 0,03	1537	1535	15
25	α-calacoreno	34,29	0,82 ± 0,03	0,74 ± 0,03	0,53 ± 0,01	0,91 ± 0,06	1544	1541	22
26	Germacreno B	34,91	0,33 ± 0,05	0,50 ± 0,03	0,42 ± 0,01	0,75 ± 0,02	1559	1557	36

Tabela 11. (Cont.) Compostos identificados (%) nos óleos essenciais de *E. hiemalis* coletados nas quatro estações do ano.

Compostos		Tr <sup>a</sup>	Concentração relativa (%)				IR <sup>b</sup>		CV <sup>e</sup>
			Inverno	Primavera	Verão	Outono	L <sup>c</sup>	E <sup>d</sup>	
27	Maaliol	35,24	0,86 ± 0,04	0,76 ± 0,03	0,67 ± 0,01	0,96 ± 0,02	1566	1565	15
28	Espatulol	35,67	16,06 ± 0,31	9,43 ± 0,02	5,36 ± 0,03	12,47 ± 0,14	1577	1577	42
29	Globulol	35,90	3,87 ± 0,60	3,62 ± 0,04	3,27 ± 0,05	5,26 ± 0,10	1590	1583	22
30	Viridiflorol	36,20	1,41 ± 0,04	1,20 ± 0,02	1,03 ± 0,02	1,51 ± 0,05	1592	1590	17
31	Cubeban-11-ol	36,28	0,27 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,00	0,38 ± 0,04	1595	1593	26
32	Rosifoliol	36,60	1,48 ± 0,02	1,10 ± 0,03	0,97 ± 0,01	1,58 ± 0,10	1600	1600	23
33	Epóxido de humuleno II	36,90	0,57 ± 0,02	0,26 ± 0,01	-	-	1608	1607	68
34	1,10-di-epi-cubenol	37,09	0,55 ± 0,24	0,24 ± 0,01	0,14 ± 0,0	0,38 ± 0,02	1618	1614	54
35	Junenol	37,20	tr	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00	1618	1618	81
36	1-epi-cubenol	37,59	3,02 ± 0,07	2,13 ± 0,02	1,20 ± 0,01	2,37 ± 0,03	1627	1627	35
37	Epi- $\alpha$ -muurolol	38,11	3,61 ± 0,11	2,87 ± 0,02	2,33 ± 0,03	4,13 ± 0,08	1640	1641	25
38	$\alpha$ -muurolol (Torreiol)	38,28	1,34 ± 0,02	0,88 ± 0,04	0,74 ± 0,02	1,35 ± 0,11	1644	1645	29
39	$\alpha$ -cadinol	38,58	3,98 ± 0,73	2,55 ± 0,08	2,17 ± 0,02	3,99 ± 0,05	1652	1654	30
40	Cadalenol	39,33	0,44 ± 0,02	0,38 ± 0,02	tr	-	1675	1673	87
41	Khusinol	39,74	1,03 ± 0,06	0,64 ± 0,03	0,35 ± 0,05	-	1679	1684	51
42	n-heptadecano	40,41	0,68 ± 0,10	-	-	-	1700	1696	-
<b>Total de monoterpenos</b>			0,00	0,00	0,00	0,00			0
Hidrocarbonetos			0,00	0,00	0,00	0,00			0
Oxigenados			0,00	0,00	0,00	0,00			0
<b>Total de sesquiterpenos</b>			86,01	90,27	90,91	91,48			3
Hidrocarbonetos			47,96	64,31	72,41	57,08			17
Oxigenados			38,05	25,96	18,5	34,40			30
<b>Outros</b>			5,87	4,92	5,56	0,00			67
<b>Total identificado</b>			91,88	95,19	96,47	91,48			3

<sup>a</sup> Tr = tempo de retenção (min); <sup>b</sup> IR = índices de retenção; <sup>c</sup> L = dados literatura (ADAMS, 2007); <sup>d</sup> E = dados experimentais; <sup>e</sup> CV = coeficiente de variação (em %); tr = traços (não quantificado).

Tabela 13. Condições climáticas em Blumenau registradas nos períodos das coletas.

	Inverno	Primavera	Verão	Outono
<b>Precipitação (mm)</b>	521	345	679	485
<b>Número de dias de chuva</b>	33	46	47	38
<b>Temperatura absoluta máxima (°C)</b>	36,0	40,9	40,9	32,8
<b>Temperatura absoluta mínima (°C)</b>	1,4	11,9	16,9	7,8
<b>Temperatura média (°C)</b>	19	26	29	22
<b>Umidade relativa do ar média (%)</b>	77	72	71	80

Fonte: CIRAN/EPAGRI

O maior rendimento de óleo essencial foi obtido no verão (0,1209 % v/p), seguido do outono (0,0983 % v/p), inverno (0,0695 % v/p) e primavera (0,0491 % v/p). Dessa forma, o maior conteúdo de óleo foi observado no período com temperaturas mais elevadas e maior precipitação. A espécie difere de outras mirtáceas em relação ao período em que ocorre a floração (março até maio) (SOBRAL, 2003). O menor conteúdo foi observado no inverno e primavera, estações em que tipicamente ocorre a frutificação nesta espécie (julho a dezembro) (SOBRAL, 2003).

As condições climáticas podem afetar a biossíntese de um constituinte por uma espécie vegetal ou mesmo o rendimento de um óleo essencial, através do favorecimento da atividade enzimática. Neste contexto, a temperatura é um fator importante para a atividade enzimática, sendo que algumas enzimas aumentam sua atividade em períodos com temperaturas mais elevadas, como no verão (BARROS et al., 2009), onde foi observado maior conteúdo de óleo essencial neste trabalho.

Foram identificados 42 componentes nos óleos essenciais, com predominância de compostos terpênicos nas quatro estações, destacando-se o grupo dos sesquiterpenos cíclicos e ausência de monoterpenos. Nota-se também que há uma variação entre os compostos funcionalizados e não funcionalizados, com um aumento destes últimos nas estações mais quentes. Este fato diverge daquele observado no comportamento da maioria dos óleos essenciais. Em alguns trabalhos com espécies do gênero *Eugenia* verificou-se um aumento dos compostos funcionalizados nas estações mais quentes, e uma maior predominância de monoterpenos e sesquiterpenos não funcionalizados em estações mais frias (SIEBERT et al., 2012; LIMA et al., 2008).

Ainda, com relação à variação no teor relativo dos constituintes, os coeficientes de variação calculados foram de 6 a 57 %, sendo que a

maior parte dos compostos apresentou valor abaixo de 50 %. Os componentes majoritários foram espatulenol (5,36 - 16,06 %),  $\delta$ -cadineno (7,50 - 15,93 %), biciclogermacreno (5,70 - 14,24 %), e  $\beta$ -cariofileno (4,80 - 9,43 %). Espatulenol e delta-cadineno foram os compostos majoritários no inverno e outono, e delta-cadineno apresentou altos teores também no verão, juntamente com biciclogermacreno e  $\beta$ -cariofileno. Estes dois últimos foram majoritários também na primavera. As estruturas destes compostos, bem como de outros presentes em maiores teores, estão representadas na Figura 40.

Observa-se que os esqueletos cadinano, copaano, aromadendrano e cariofilano são predominantes nas amostras analisadas. Dessa forma, supõe-se que a principal rota de biogênese ocorre a partir do cátion germacrenila, o qual origina também vários outros compostos minoritários presentes (DAVIS; CROTEAU, 2000; KESZEI et al., 2010).

Comparando-se os dados de composição química do óleo essencial obtido neste trabalho com estudo anterior realizado por Apel e colaboradores (2004) sobre o óleo essencial das folhas de *E. hiemalis* coletada no Rio Grande do Sul (apenas uma amostra, época de coleta não informada), podem-se observar algumas diferenças. No trabalho citado foram identificados 21 compostos, com predominância de sesquiterpenos, destacando-se os não-funcionalizados (71,8 %), tal como no presente trabalho (47,97 a 72,41 %). Biciclogermacreno (37,7 %) foi identificado como o componente majoritário, sendo também um dos majoritários no presente trabalho, mas em menor concentração relativa (5,70 - 14,24 %). Germacreno D (7,0 %) e globulol (5,8 %) também foram majoritários no óleo analisado por Apel e colaboradores (2004), mas  $\alpha$ -copaeno (2,3 %),  $\gamma$ -cadineno (1,0 %),  $\delta$ -cadineno (4,5 %) e espatulenol (3,0 %) apresentaram concentrações inferiores àquelas encontradas no presente trabalho.

Vários componentes do óleo analisado no presente trabalho não foram identificados por aqueles autores, bem como alguns identificados por Apel e colaboradores (2004) não foram encontrados no presente estudo. Apenas um composto monoterpênico foi identificado por aqueles autores ( $\alpha$ -pineno), além de (E)-2-hexenal, não identificados no presente trabalho.

Levando-se em conta que o conceito de quimiotipo se refere ao componente majoritário (PADOVAN et al., 2014), a possibilidade do óleo de *E. hiemalis* coletado em Blumenau ser um quimiotipo para a espécie pode ser levada em consideração, já que os dois componentes majoritários encontrados no presente óleo (espatulenol e  $\delta$ -cadineno)



não são majoritários no óleo analisado por Apel e colaboradores (2004), o qual é marcado pela presença de biciclogermacreno. Estudos adicionais, com maior número de amostras são necessários para caracterizar a presença de um quimiotipo, já que muitas vezes as diferenças nos métodos de extração e análises podem interferir no perfil apresentado pelos óleos (PADOVAN et al., 2014).

A presença de quimiotipos é relativamente comum na família Myrtaceae, e o gênero *Eugenia* possui algumas espécies com quimiotipos caracterizados, como *E. brasiliensis*, *E. puniceifolia*, *E. pyriformis* e *E. uniflora* (PADOVAN et al., 2014).

Em estudo recente realizado por Mazine e colaboradores (2014), foi proposta uma hipótese filogenética para espécies de *Eugenia* neotropicais baseada no sequenciamento do DNA nuclear e plastídeo. Nove clados foram identificados, e a espécie *E. hiemalis* foi alocada no clado 9, juntamente com outras 25 espécies. De acordo com os autores, diferentemente dos demais clados, o de número 9 é formado por espécies que apresentam entre si variações morfológicas, sendo que este agrupamento das espécies neste clado foi considerada pelos autores como não possuindo muito suporte.

No clado 9 a espécie *E. pluriflora* pertence à mesma ramificação que *E. hiemalis*, e seu óleo essencial também já foi analisado por Apel e colaboradores (2002b), destacando-se altos teores de compostos monoterpênicos, os quais constituem a fração majoritária, principalmente  $\alpha$ -pineno (24,0 %) e 1,8-cineol (12,7 %), bem como o sesquiterpeno (E)-nerolidol (24,6 %).

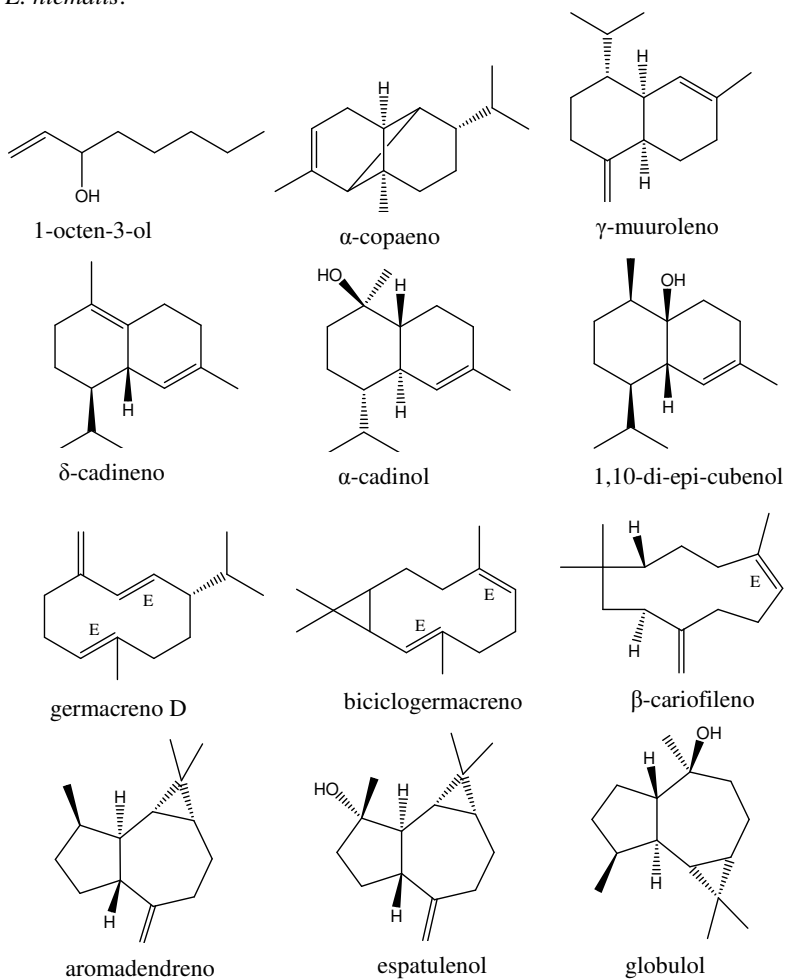
Uma vez que este trabalho e o de Apel e colaboradores (2004) apontam que o óleo de *E. hiemalis* se caracteriza por predomínio de sesquiterpenos (especialmente os não-funcionalizados), e que *E. pluriflora* possui principalmente monoterpênicos e (E)-nerolidol como componentes majoritários, acredita-se que a via de biogênese de óleos essenciais destas espécies seja diferente. Este fato sugere a realização de estudos mais aprofundados em conjunto com as análises de filogenética.

Outras espécies do clado 9 foram analisadas quanto a composição do óleo essencial, como *E. bacopari* (APEL et al., 2002a), *E. axillaris* (PINO et al., 2003; SCHMIDT et al., 2006; SETZER et al., 2006) e *E. puniceifolia* (MAIA; ZOGHBI; LUZ, 1997; OLIVEIRA; DIAS; CÂMARA, 2005; PEREIRA; ZOGHBI; BASTOS, 2010; RAMOS et al., 2010). Entre estas, *E. bacopari* apresentou um perfil bastante semelhante ao de *E. hiemalis* encontrado neste trabalho, com predomínio de sesquiterpenos não funcionalizados (78,5 %) e ausência de monoterpênicos. Os compostos majoritários foram  $\delta$ -cadineno,

aromadendreno (12,2 %), viridifloreno (7,9 %),  $\gamma$ -cadineno (7,2 %), globulol (6,8 %) e germacreno D (6,6 %) (APEL et al., 2002a).

Apesar da família Myrtaceae ser caracterizada pela predominância de monoterpenos, as espécies do gênero *Eugenia* possuem baixos conteúdos destes compostos, sendo predominantes os sesquiterpenos cíclicos, entre eles, o  $\beta$ -cariofileno é o mais comum (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). Algumas espécies distinguem-se, particularmente *E. jambolana* e *E. caryophyllata*, as quais possuem predominantemente compostos monoterpênicos e derivados de fenilpropanoides (como eugenol), respectivamente (SOBRAL-SOUZA et al., 2014; CHAIEB et al., 2007b). Adicionalmente, duas espécies destacam-se pela produção de compostos incomuns para o gênero: *E. stigmatica*, que contém apenas compostos alifáticos em seu óleo essencial (90,5% de ácido fisetérico) (APEL et al., 2004), e *E. confusa*, rica em compostos aromáticos (SETZER; NOLETT; VICENT, 2006).

Figura 40. Estruturas de compostos presentes nos óleos essenciais das folhas de *E. hiemalis*.



#### 4.6.2 Análises das atividades biológicas

A grande diversidade química dos constituintes dos óleos essenciais, contribui para que muitos óleos apresentem um amplo leque de atividades biológicas. Como resultado, muitos produtos farmacêuticos comercializados atualmente possuem em sua formulação óleos essenciais (VICTORIA et al., 2012).

O presente trabalho analisou também o potencial biológico dos óleos essenciais das folhas *E. hiemalis* obtidos nas diversas épocas do ano em modelos de atividade antioxidante, anticolinesterásica e antibacteriana (contra espécies de mollicutes) (Tabelas 14 e 15).

De maneira geral, observou-se fraca atividade antioxidante (Tabela 14), a qual pode ser explicada pelo fato de que a maioria dos constituintes não possui atividade antioxidante (ou ainda não foi caracterizada). Há trabalhos sobre componentes de esqueleto cadinano (KUNDU et al., 2013), bem como  $\beta$ -cariofileno (CALLEJA et al., 2013) indicando seu potencial antioxidante. Porém, quantidades maiores podem ser necessárias para produzir efeito, bem como a interação entre os demais componentes pode levar a diminuição da atividade (BAKKALI et al., 2008).

Entre os componentes de óleos essenciais que já demonstraram atividade antioxidante, destacam-se timol, carvacrol, *p*-cimeno, linalol, eugenol, alguns dos quais foram testados individualmente em dois modelos de atividade antioxidante (KULISIC et al., 2004; RUBERTO; BARATTA, 2000).

Com relação ao gênero *Eugenia*, há poucos estudos avaliando a atividade antioxidante de óleos essenciais deste gênero, sendo que resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram observados para o óleo essencial de *E. brasiliensis* (SIEBERT et al., 2014). Por outro lado, algumas espécies demonstraram resultados mais promissores, como *E. uniflora* (VICTORIA et al., 2012), *E. involucrata* (MARIN et al., 2008), *E. pruniformis* (ALBUQUERQUE et al., 2012) e *E. caryophyllata*, a qual apresenta eugenol como componente majoritário (CHAIEB et al., 2007b).

Apesar da forte atividade anticolinesterásica observada para os extratos da planta, os óleos essenciais não apresentaram atividade ( $CI_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 14). De maneira similar, o óleo essencial de *E. brasiliensis* também se mostrou inativo (SIEBERT et al., 2014), e o óleo essencial das folhas e frutos de *E. pruniformis* apresentou fraca atividade (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Melhores resultados de atividade anticolinesterásica foram observados para os óleos essenciais das folhas de *E. riedelina* ( $IC_{50} = 67,3 \mu\text{g/mL}$ ) (SOUZA, 2009) e das folhas de *E. sulcata* ( $IC_{50} = 4,66 \mu\text{g/mL}$ ) (LIMA et al., 2012). No primeiro caso, foi verificada a presença de valerianol como componente majoritário, seguido de 10-epi- $\gamma$ -eudesmol e  $\beta$ -cariofileno, porém, não foram encontrados estudos com relação à atividade anticolinesterásica destes compostos. No caso de *E. sulcata*, a presença de  $\alpha$ - e  $\beta$ - pineno, que correspondem juntos a 28,1%

da composição do óleo, pode estar relacionada com a atividade (LIMA et al., 2012).

A atividade anticolinesterásica dos óleos essenciais é resultado de uma complexa interação entre seus constituintes químicos. Já foi demonstrado que os monoterpenos apresentam forte atividade, destacando-se 1,8-cineol (AAZZA; LYOUSSEI; MIGUEL, 2011; DOHI; TERASAKI; MAKINO, 2009; SAVELEV et al., 2003), limoneno, *p*-cimeno,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -terpineno, mentol (MIYAZAWA; WATANABE; KAMEOKA, 1997),  $\delta$ -3-careno (AAZZA; LYOUSSEI; MIGUEL, 2011), bem como  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno citados anteriormente (DOHI; TERASAKI; MAKINO, 2009; MIYAZAWA; YAMAFUJI, 2005) e o eugenol, um derivado de fenilpropanoide (DOHI; TERASAKI; MAKINO, 2009). Com relação aos sesquiterpenos, tem sido observada maior atividade para os oxigenados, como viridiflorol, elemol (MIYAZAWA et al., 1998), e cetonas sesquiterpênicas, como  $\alpha$ - e  $\beta$ -ionona (MIYAZAWA et al., 1998a).

Como comentado anteriormente, apesar da presença de alguns destes compostos sesquiterpênicos nos óleos essenciais avaliados neste trabalho, a interação com os demais componentes, incluindo um efeito sinérgico com os minoritários, pode levar a mudanças no perfil da atividade (BAKKALI et al., 2008)

Tabela 144. Resultados\* da avaliação da atividade antioxidante e anticolinesterásica dos óleos essenciais das folhas de *E. hiemalis*.

	PR (mg AA/g) <sup>a</sup>	DPPH (CE <sub>50</sub> - µg/mL) <sup>β</sup>	AA % <sup>γ</sup>	AChE (CI <sub>50</sub> - µg/mL)
<b>Primavera</b>	88,78 ± 0,61	> 1000,00	19,50 ± 1,00	> 1000,00
<b>Verão</b>	166,15 ± 1,33	> 1000,00	20,99 ± 0,17	> 1000,00
<b>Outono</b>	176,33 ± 1,39	> 1000,00	27,33 ± 0,19	> 1000,00
<b>Inverno</b>	122,64 ± 0,53	> 1000,00	27,71 ± 0,48	> 1000,00
<b>Ácido gálico</b>	-	3,80 ± 0,04	-	-
<b>BHT</b>	-	-	95,87 ± 0,57	-
<b>Galantamina</b>	-	-	-	2,17 ± 0,04

\* Os resultados são expressos como média ± desvio padrão da média (n = 3).

<sup>a</sup> PR = Potencial redutor. mg AA/g: miligramas de ácido ascórbico/grama de amostra.

<sup>β</sup> CE<sub>50</sub> = Concentração efetiva 50 %. Concentração da amostra, em µg/mL, necessária para diminuir a concentração do radical livre DPPH em 50 %.

<sup>γ</sup> AA% = Atividade antioxidante. Porcentagem de inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno em relação à solução sem a presença de um antioxidante.

<sup>δ</sup> CI<sub>50</sub> = Concentração inibitória 50 %. Concentração da amostra, em µg/mL, necessária para inibir a atividade enzimática em 50 %.

Com relação à atividade antibacteriana (Tabela 15), verificou-se que todos os óleos apresentaram  $IC_{50} < 1$  mg/mL contra as cepas testadas, com exceção de *M. genitalium*. No entanto, segundo os critérios utilizados anteriormente no estudo bio guiado, os óleos não são considerados ativos (COS et al., 2006).

O caráter lipofílico do esqueleto carbônico e o caráter hidrofílico dos grupos funcionais dos compostos presentes no óleo são importantes para a atividade. Os componentes que geralmente apresentam melhores atividades são os fenóis, seguidos dos aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres e hidrocarbonetos. Esta atividade varia também em função do tipo de microrganismo testado (KOROCH; JULIANI; ZYGADLO, 2007).

Não há estudos que reportam os componentes com melhor atividade sobre mollicutes, no entanto, alguns compostos de óleos essenciais têm apresentado importante atividade sobre outros microrganismos. Entre os mais ativos, destacam-se carvacrol, timol, terpineol, eugenol, linalol, geraniol (MÓRICZ et al., 2012; KIM; MARSHALL; WEI, 1995), cinamaldeído (SHEN et al., 2015), entre outros.

Alguns compostos monoterpênicos, como  $\alpha$ - e  $\beta$ - pineno, e sesquiterpênicos, como  $\gamma$ -muuroleno, espatulenol,  $\alpha$ -selineno,  $\beta$ -cariofileno, cadinenos,  $\alpha$ - e  $\beta$ - eudesmol, biciclogermacreno, entre outros, também apresentam atividade contra alguns microorganismos. No entanto, em geral, óleos contendo hidrocarbonetos como compostos majoritários apresentam baixa atividade (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; KOROCH; JULIANI; ZYGADLO, 2007). Este fato é importante, visto que os óleos analisados neste trabalho apresentaram hidrocarbonetos como fração majoritária em todas as estações (47,96 - 72,41 %), justificando-se, dessa forma, a baixa atividade apresentada.

Além disso, deve-se considerar também os efeitos sinérgicos entre os componentes, incluindo os minoritários, que podem levar a uma diminuição ou aumento da atividade antimicrobiana (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

Existem poucos relatos na literatura sobre a avaliação da atividade antibacteriana de óleos essenciais contra espécies de micoplasmas. Neste caso, verificou-se atividade do óleo *Thymus vulgaris* contra *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (ARJOON; SAYLOR; MAY, 2012), enquanto o óleo das folhas de *E. brasiliensis* foi inativo contra as cepas de *M. mycoides* subsp. *capri* e *U. urealyticum* (SIEBERT et al., 2014).

No que se refere à atividade contra bactérias com parede celular, há vários trabalhos com óleos essenciais de *Eugenia*, destacando-se as espécies *E. uniflora* (LAGO et al., 2011; OGUNWANDE et al., 2005; VICTORIA et al., 2012), *E. chlorophylla* (STEFANELLO et al., 2008), *E. brasiliensis* (MAGINA et al., 2009a; SIEBERT et al., 2014), *E. umbelliflora* (MAGINA et al., 2009a), *E. jambolana* (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014; SHAFI et al., 2002) e *E. caryophyllata*, a qual apresenta boa atividade devido à presença de eugenol (BURT; REINDERS, 2003; DOBRE; GAGIU; PETRU, 2011; DUSAN et al., 2006; LIS-BALCHIN et al., 1997; SCOPEL et al., 2014; TAREK et al., 2014; LIS-BALCHIN; DEANS, 1997).

Tabela 155. Resultados\* da avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas de *E. hiemalis*.

	CIM (µg/mL)			
	<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	<i>M.</i> <i>genitalium</i>	<i>M.</i> <i>hominis</i>	<i>M.</i> <i>pneumoniae</i> FH
<b>Primavera</b>	208,33	1000	333,33	333,33
<b>Verão</b>	333,33	1000	333,33	416,67
<b>Outono</b>	333,33	1000	333,33	416,67
<b>Inverno</b>	333,33	1000	333,33	416,67
<b>Levofloxacino</b>	1,56	0,78	25	1,56

\* Os resultados são expressos como média (n = 3).





### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre as inúmeras atividades biológicas descritas para Mirtáceas, três foram selecionadas para a investigação bioguiada no âmbito do presente trabalho. Entretanto, outras atividades não investigadas poderiam ser de grande interesse, considerando o grande número de espécies desta família que apresentaram, por exemplo, atividade anti-inflamatória e em modelos de diabetes.

A investigação bioguiada pelas atividades anticolinesterárica e antibacteriana levou ao isolamento de dois metabólitos bioativos majoritários: acetato de miconodina (GE1) e primina (GE2), bem como outros metabólitos estruturalmente relacionados. A presença destas substâncias em uma espécie de Myrtaceae é um fato bastante interessante do ponto de vista quimiossistemático.

Até o momento, primina e miconidina somente foram relatadas em espécies das famílias Primulaceae e Melastomataceae, as quais não são botanicamente relacionadas entre si (KREBS; CHRISTENSIS, 1995). No entanto, Myrtaceae e Melastomataceae pertencem à mesma ordem (Myrtales). Esta é a primeira espécie do gênero *Eugenia* em que foram encontradas quinonas, sendo que este gênero é caracterizado principalmente pela presença de compostos fenólicos, como flavonoides, antocianinas e taninos, bem como triterpenos, esteroides e carotenoides, conforme apresentado no Quadro 1 entre trabalho.

Miconidina tem sido considerada biossinteticamente a forma precursora de primina (CONNOLLY et al., 2004; KREBS; CHRISTENSEN, 1995) e o isolamento de acetato de miconidina como substância majoritária nas folhas e botões florais sugere a hipótese de que esta constitua nesta espécie uma forma de reserva para primina, a qual poderia ser responsável pela proteção contra ataques de microrganismos e herbívoros. O papel fisiológico destas duas substâncias na espécie precisa ser investigado, mas a maior concentração de primina nos botões florais em relação às folhas sugere fortemente uma estratégia de defesa química, para assegurar a reprodução.

Os extratos metanólicos, por sua vez, apresentaram interessante atividade antioxidante, e quercitrina (GE14) foi isolada no extrato das folhas. Esta substância já foi amplamente avaliada com relação às suas propriedades antioxidantes, exibindo bons resultados, bem como já foi reportada em extratos das partes aéreas de *E. hiemalis* coletada no Paraguai (BOKESCH et al., 2008).

A análise do óleo essencial revelou um perfil químico característico para o gênero *Eugenia*, com presença de compostos sesquiterpênicos, destacando-se os de esqueleto cadinano, copaano, aromadendrano e cariofilano. Os resultados encontrados apresentam algumas diferenças em relação ao óleo analisado a partir de uma coleta desta espécie realizada no Rio Grande do Sul (APEL et al., 2004). Já a comparação com a espécie *E. pluriflora*, filogeneticamente relacionada a *E. hiemalis* (MAZINE et al., 2014), evidenciou grandes diferenças, principalmente com relação à presença majoritária de monoterpenos, bem como (*E*)-nerolidol no óleo de *E. pluriflora* (APEL et al., 2002b). Este achado sugere rotas de biossíntese diferenciadas para as espécies *E. hiemalis* e *E. pluriflora*, ambas classificadas na mesma ramificação do clado 9 de análise filogenética de espécies neotropicais de *Eugenia* (MAZINE et al., 2014).

Os dados sugerem que a análise da composição dos óleos pode ser útil e que a realização de estudos mais aprofundados nas espécies deste clado poderia contribuir para uma melhor resolução da análise filogenética.

Apesar de primina e acetato de miconidina já terem sido reportadas no extrato das folhas de *E. hiemalis* (FALKENBERG, 1996), este trabalho revelou que estão presentes também em outras partes da planta, como os botões florais. Além disso, o presente trabalho conta com um enfoque diferenciado, permitindo o isolamento destes e de outros compostos por meio da investigação fitoquímica bioguiada.

A capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase constitui um mecanismo de ação importante para potenciais fármacos a serem utilizados no tratamento da doença de Alzheimer. Os resultados obtidos para primina demonstraram uma atividade promissora neste sentido, com valor de  $CI_{50}$  da mesma ordem daquela apresentada pelo fármaco galantamina. Este constitui o primeiro relato da atividade anticolinesterásica para primina, bem como um dos poucos relatos desta atividade para compostos com estrutura de quinona.

Os resultados da avaliação da atividade antibacteriana contra molicutes foram também bastante promissores. Neste caso, primina e acetato de miconidina foram ativas contra espécies causadoras de infecções em seres humanos e animais. Primina apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e negativas, sendo este o primeiro relato da sua atividade contra bactérias sem parede celular.

Para o acetato de miconidina não há relatos de atividade antimicrobiana, somente para a miconidina (LIMA et al., 1970), o que torna estes resultados bastante relevantes. Avaliações da atividade

antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, negativas e fungos, estão sendo realizadas em conjunto com outro grupo parceiro e têm demonstrado resultados promissores contra diversas cepas, inclusive algumas caracterizadas resistentes a antibióticos (dados não apresentados).

Primina apresentou atividade antiparasitária contra algumas espécies de *Trypanosoma*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* e *Crithidia fasciculata* (TASDEMIR et al., 2006; PAHN; PORTELA; STOPPANI, 1988) e miconidina também apresentou atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* (GOIJMAN et al., 1984), *T. mega* e *C. fasciculata* (PAHN; PORTELA; STOPPANI, 1988). Estes relatos são interessantes, uma vez que podem indicar um potencial importante para a forma acetato de miconidina. Também neste sentido, trabalhos com grupos parceiros estão demonstrando bons resultados de extratos de *E. hiemalis* em atividade antiamebiana (dados não apresentados).

Primina apresentou atividade anti-inflamatória *in vitro*, com seletividade para COX-2 em relação a COX-1 (LANDA et al., 2012), bem como inibição de 5-LOX, superior à do composto de referência zileutona (LANDA et al., 2011). Embora o potencial de oxidação da primina esteja envolvido na sua atividade em vários alvos, no caso específico da 5-LOX, análises *in silico* por docking demonstraram que a estrutura molecular da primina foi essencial para a atividade (LANDA et al., 2013). Considerando, entretanto, a potencial toxicidade da primina, modificações estruturais na molécula podem levar a um composto com melhor perfil de ação.

Tendo em vista sua semelhança estrutural com a primina e sua condição de forma de reserva da mesma, o acetato de miconidina está sendo avaliado em relação à capacidade de inibição dual das enzimas COX-2/5-LOX pelo grupo do prof. Landa e colaboradores.

Cabe destacar que apesar do grande potencial de primina, este é um alérgeno clássico e alguns estudos demonstraram atividade alergizante para a miconidina, porém, este efeito foi justificado pela sua conversão em primina, por processos de oxidação (PAULSEN; CHRISTENSEN; ANDERSEN, 2006). Para o derivado acetato de miconidina, ainda não há estudos a respeito do seu potencial alergênico, bem como toxicidade. Para este último, trabalhos com grupos parceiros estão avaliando o perfil de citotoxicidade em algumas linhagens celulares.

Já foi verificada a atividade citotóxica da primina sobre células normais e tumorais, bem como a toxicidade em modelos *in vivo*.

Modificações estruturais foram realizadas e os resultados demonstraram reduções dos efeitos tóxicos, com manutenção da atividade citotóxica sobre células tumorais (BRONDANI et al., 2005; BRONDANI et al., 2007). Estes resultados são interessantes, uma vez que derivados com maior seletividade podem se tornar potenciais fármacos.

## 4 CONCLUSÕES

- Os extratos diclorometânicos de folhas, galhos e botões florais de *E. hiemalis* apresentaram atividade antiolinesterásica ( $IC_{50} = 199,09 \pm 2,25$  a  $506,63 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$ ) e antibacteriana frente a cepas de mollicutes (CIM = 0,32 a  $416,67 \mu\text{g/mL}$ ); os extratos metanólicos apresentaram atividade antioxidante com destaque para o extrato das folhas nos modelos de potencial redutor ( $405,27 \pm 10,27 \text{ mg AA/g}$ ) e captação do radical livre DPPH ( $CE_{50} = 39,11 \pm 0,74 \mu\text{g/mL}$ );
- O fracionamento bioguiado do extrato diclorometânico de folhas levou ao isolamento de acetato de miconidina e primina, que foram ativas contra espécies de mollicutes (CIM = 0,48 a  $7,80 \mu\text{g/mL}$ ). Primina também apresentou potente atividade acetilcolinesterásica ( $IC_{50} 9,05 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ );
- O fracionamento do extrato diclorometânico dos botões florais levou ao isolamento de primina, acetato de miconidina, metil-oliveto e outra quinona ainda não identificada;
- O fracionamento bioguiado do extrato metanólico das folhas levou ao isolamento de uma substância bioativa identificada como quercitrina, além de nove substâncias cujos espectros de RMN estão sendo obtidos;
- Pelo fracionamento cromatográfico utilizando o reagente de Craven foram isoladas duas quinonas denominadas de 5-acetóxi-primina (GE6) e hiemaloquinona (GE8), além de outra quinona que está em processo de identificação e uma substância ainda não identificada;
- A análise sazonal dos óleos essenciais das folhas de *E. hiemalis* permitiu a identificação de 42 componentes, com destaque para os sesquiterpenos cíclicos espatulenol (5,36 - 16,06 %), biciclogermacreno (5,70 - 14,24 %)  $\delta$ -cadineno (7,50 - 15,93 %) e  $\beta$ -cariofileno (4,80 - 9,43 %), e ausência de monoterpênicos; nas estações mais quentes foi verificado aumento do teor de sesquiterpenos não funcionalizados, numa tendência diferente daquela descrita na literatura para outras mirtáceas. Os óleos essenciais foram inativos nos testes biológicos avaliados;
- O conjunto de resultados obtidos permite concluir que a espécie *E. hiemalis* possui perfil químico diferenciado em relação às outras espécies já investigadas do gênero *Eugenia*, bem como da família Myrtaceae. No entanto, a continuidade dos seus estudos é importante para melhor esclarecer a classificação filogenética da espécie e potencial de seus metabólitos como candidatos a fármacos.



## 5 PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos até o momento com a espécie *E. hiemalis*, pode-se destacar para a continuidade dos estudos algumas propostas:

- Avaliar também outras atividades, como antiviral, antidiabética e anti-inflamatória de extratos (e eventualmente também de compostos isolados) de *E. hiemalis*;
- Avaliar extratos e óleos essenciais de outras populações de *E. hiemalis*, em outras localidades, no sentido de contribuir para a discussão da classificação filogenética do gênero *Eugenia*;
- Completar a elucidação dos compostos ainda não identificados e, eventualmente, encaminhá-los para avaliação de atividade biológica;
- Avaliar atividade antiparasitária do acetato de miconidina (GE1), considerando que a mesma já foi identificada para primina e miconidina;
- Avaliar toxicidade aguda e subcrônica, bem como citotoxicidade de GE1 frente a células normais e linhagens de células tumorais;
- Para a primina (GE2), realizar testes *in silico* com a enzima acetilcolinesterase e testes *ex-vivo* em modelos animais de doença de Alzheimer;
- Analisar as substâncias GE6 e GE8 por *screening* virtual para atividade anticolinesterásica e outras;
- Em função dos resultados que vierem a ser obtidos, planejar a síntese de potenciais derivados.





## REFERÊNCIAS

- AAZZA, S.; LYOUSSI, B.; MIGUEL, M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. **Molecules**, v. 16, n. 9, p. 7672-7690, 2011.
- ABD EL AZIM, M. H. M.; EL-MESALLAMY, A. M. D.; EL-GERBY, M.; AWAD, A. Anti-tumor, antioxidant and antimicrobial and the phenolic constituents of clove flower buds (*Syzygium aromaticum*). **Microbial & Biochemical Technology**, S8, p. 1-4, 2014.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4 ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804p.
- ADEFEGHA, S. A.; OBOH, G. *In vitro* inhibition activity of polyphenol-rich extracts from *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Clove) buds against carbohydrate hydrolyzing enzymes linked to type 2 diabetes and Fe<sup>(2+)</sup>-induced lipid peroxidation in rat pancreas. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 10, p. 774-781, 2012.
- ADEWUNMI, C. O.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEBAJO, A. C.; ALADESANMI, A. J.; MURPHY, N.; WANDO, J. Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 19-24, 2001.
- AFIFY, A. E.; AFIFY, M. R.; FAYED, S. A.; SHALABY, E. A.; EL-SHEMY, H. A. *Syzygium cumini* (pomposia) active principles exhibit potent anticancer and antioxidant activities. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 7, p. 948-956, 2011.
- AFIFY, A. E.; EL-BELTAGI, H. S.; FAYED, S. A.; SHALABY, E. A. Acaricidal activity of different extracts from *Syzygium cumini* L. Skeels (Pomposia) against *Tetranychus urticae* Koch. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 5, p. 359-364, 2011.
- AISHA, A. F. A.; ABU-SALAH, K. M.; ALROKAYAN, S. A.; SIDDIQUI, M. J.; ISMAIL, Z.; MAJID, A. M. S. A. *Syzygium aromaticum* extracts as good source of betulinic acid and potential anti-breast cancer. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 335-343, 2011.
- AKTUMSEK, A.; ZENGİN, G.; GULER, G. O.; ÇAKMAK, Y. S.; DURAN, A. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of

methanolic and aqueous extract of three endemic *Centaurea* L. species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 290-296, 2013.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.

ALBUQUERQUE, R. D. G.; TIETBOHL, L. A. C.; FERNANDES, C. P.; COUTEIRO, P. P.; EIRIZ, D. N.; SANTOS, M. G.; SILVA FILHO, M. V.; ALVES, G. G.; BACHINSKI, R.; ROCHA, L. Chemical and biological study of essential oils from *Eugenia pruniiformis* Cambess., an endemic species from Brazilian Atlantic Forest. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 6, p. 830-834, 2012.

ALIKATTE, K. L.; AKONDI, B. R.; YERRAGUNTA, V. G.; VEERAREDDY, P. R.; PALLE, S. Antiamnesic activity of *Syzygium cumini* against scopolamine induced spatial memory impairments in rats. **Brain & Development**, v. 34, n. 10, p. 844-851, 2012.

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 785-788, 2009.

AL-SOHAIBANI, S.; MURUGAN, K.; LAKSHIMI, G.; ANANDRAJ, K. Xerophilic aflatoxigenic black tea fungi and their inhibition by *Elettaria cardamomum* and *Syzygium aromaticum* extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 4, p. 387-394, 2011.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2013 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 9, p. 208-245, 2013.

AMIR, M.; KHAN, A.; MUJEEB, M.; AHMAD, A.; USMANI, S.; AKHTAR, M. Phytochemical analysis and *in vitro* antioxidant activity of *Zingiber officinale*. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 75-81, 2011.

AMORIM, A. C.; LIMA, C. K. F.; HOWELL, A. M. C.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 923-928, 2009.

ANAGNOSTOPOULOU, M.; KEFALAS, V. P.; ASSIMOPOULOU, A. N.; BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 19-25, 2006.

ANARAT-CAPPILLINO, G.; SATTELY, E. S.; The chemical logic of plant natural product biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 19, p. 51-58, 2014.

APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; NTALANI, H.; MENUT, C.; BASSIERE, J. Chemical composition of the essential oils from Southern Brazilian *Eugenia* species. Part II. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 4, p. 163-166, 2002.

APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; NTALANI, H.; VÉRIN, P.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. Chemical composition of the essential oils from Southern Brazilian *Eugenia* species. Part III. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 4, p. 259-262, 2002.

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. S.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. Chemical composition of the essential oils of *Eugenia hyemalis* and *Eugenia stigmata*. Part VI: Section Biflore. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 437-439, 2004.

ARJOON, A. V.; SAYLOR, C. V.; MAY, M. *In vitro* efficacy of antimicrobial extracts against the atypical ruminant pathogen *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 169, p. 1-6, 2012.

ARUN, R.; PRAKASH, M. V. D.; ABRAHAM, S. K.; PREMKUMAR, K. Role of *Syzygium cumini* seed extract in the chemoprevention of *in vivo* genomic damage and oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 329-333, 2011.

ASHWORTH, M. R. F. **Analytical methods for organic cyano groups** (Monographs in organic functional group analysis). New York: Pergamon, v. 6, 1971, 152 p.

ASSIS, C. P. O.; GONDIM JR., M. G. C.; SIQUEIRA, H. A. A.; CÂMARA, C. A. G. Toxicity of essential oils from plants towards *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) and *Suidasia pontifica* Oudemans (Acari: Astigmata). **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n. 4, p. 311-415, 2011.

ÁVILA-PEÑA, D.; PEÑA, N.; QUINTERO, L.; SUÁREZ-ROCA, H. Antinociceptive activity of *Syzygium jambos* leaves extract on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 380-385, 2007.

AXELSEN, P. H.; KOMATSU, H.; MURRAY, I. V. J. Oxidative stress cell membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Physiology**, v. 26, n. 1, p. 54-69, 2011.

AYER, W. A.; BROWNE, L. M.; LOVELL, S. H. Biological active phenolic metabolites of a *Verticicladiella* species. **Phytochemistry**, v. 22, n. 10, 1983.

BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776-782, 2014.

BAG, A.; BHATTACHARYYA, S. K.; PAL, N. K.; CHATTOPADHYAY, R. R. *In vitro* antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens. **Microbiological Research**, v. 167, n. 6, p. 352-357, 2012.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 722-734, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BANDYOPADHYAY, S. S.; GHOSH, D.; MICARD, V.; SINHA, S.; CHATTERJEE, U. R.; RAY, B. Structure, fluorescence quenching and antioxidant activity of a carbohydrate polymer from *Eugenia jambolana*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 1-2, p. 158-164, 2012.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 727-733, 2005.

BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, M. L.; DEMUNER, A. J.; SILVA, A. A.; PEREIRA, R. C. Preparation and phytotoxicity of sorgoleone analogues. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 751-755, 2001.

- BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O.; HEINZMANN, B. M.; MALLMAN, C. A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.
- BARTOLOME, A.; MANDAP, K.; DAVID, K. J.; SEVILA III, F.; VILLANUEVA, J. SOS-red fluorescent protein (RFP) bioassay system for monitoring of antigenotoxic activity in plant extracts. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 11, p. 2114-2120, 2006.
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.
- BATISH, D.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, S. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.
- BÉBÉAR, C.; BÉBÉAR, C. Antimycoplasmal Agents. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. 573 p.
- BÉBÉAR, C.; ROBERTSON, J. Determination of the minimal inhibitory concentration. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. (Eds.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego: Academic Press, v. 2, 1996. 466 p.
- BENFATTI, C. S.; CORDOVA, S. M.; GUEDES, A.; MAGINA, M. D. A.; CORDOVA, C. M. M. Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp. frente a cepas de mollicutes. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 33-39, 2010.
- BENHERLAL, P. S.; ARUMUGHAN, C. Studies on modulation of DNA integrity in Fenton's system by phytochemicals. **Mutation Research**, v. 648, n. 1-2, p. 1-8, 2008.
- BENTAYEB, K.; VERA, P.; RUBIO, C.; NERÍN, C. The additive properties of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay: the case of essential oils. **Food Chemistry**, v. 1, n. 148, p. 204-208, 2014.
- BERNAYS, E.; LUPI, A.; BETTOLO, M.; MASTROFRANCESCO, C.; TAGLIATESTA, P. Antifeedant nature of the quinone primin and its quinol miconidin from *Miconia* spp. **Experientia**, v. 40, n. 9, p. 1010-1011, 1984.

BHATIA, I. S.; BAJAJ, K. L.; GHANGAS, G. S. Tannins in black plum seeds. **Phytochemistry**, v. 10, n. 1, p. 219-220, 1971.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6852-6865, 2013.

BLUMA, R.; AMAIDEN, M. R.; ETCHEVERRY, M. Screening of Argentine plant extracts: Impact on growth parameters and aflatoxin B1 accumulation by *Aspergillus* section *Flavi*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 1-2, p. 114-125, 2008.

BOKESCH, H. R.; WAMIRU, A.; LE GRICE, S. F. J.; BEUTLER, J. A.; McKEE, T. C.; McMAHON, J. B. HIV-1 Ribonuclease H inhibitory phenolic glycosides from *Eugenia hyemalis*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1634-1636, 2008.

BOLOGNESI, M. L.; CAVALLI, A.; MELCHIORRE, C. Memoquin: a multi-target-directed ligand as an innovative therapeutic opportunity for Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 1, p. 152-162, 2009.

BOX, J. D. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. **Water Research**, v. 17, n. 5, p. 511-525, 1983.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. Brasília: Anvisa, 2010, v. 1, 545 p.

BRONDANI, D. J.; LEITE, A. C.; NASCIMENTO, S. C.; LIMA, R. M. O. C.; BIEBER, L. W. Síntese, avaliação da atividade citotóxica e toxicidade aguda de análogos da primina 3 e 6 alquil-substituídos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 248-251, 2005.

BRONDANI, D. J.; NASCIMENTO, C. R. M.; MOREIRA, D. R.; LEITE, A. C. L.; SOUZA, I. A.; BIEBER, L. W. Synthesis and antitumour activity of the primin (2-methoxy-6-n-pentyl-1,4-benzoquinone) and analogues. **Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 369-372, 2007.

- BRONDANI, D. J.; SILVA FILHO, Á. A.; LEITE, A. C. L.; NASCIMENTO, C. R. M.; ROLIN NETO, P. J.; BIEBER, L. W. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de análogos da primina 5 e 6 alquil-substituídos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n. 3, p. 217-221, 2003.
- BRUNETTI, I. L.; VENDRAMINI, R. C.; JANUÁRIO, A. H.; FRANÇA, S. C.; PEPATO, M. T. Effects and toxicity of *Eugenia punicifolia* extracts in streptozotocin-diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 1, p. 35-43, 2006.
- BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2774-2779, 2001.
- BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 162-167, 2003.
- CALLEJA, M. A.; VIEITES, J. M.; MONTERO-METERDEZ, T.; TORRES, M. I.; FAUS, M. J.; GIL, A.; SUÁREZ, A. The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 3, p. 394-401, 2013.
- CAPASSO, F.; PASQUALE, R.; GRANDOLINI, G. **Farmacognosia: Botanica, chimica e farmacologia delle piante medicinali**. 2. ed. Itália: Springer, 2011, 490 p.
- CARMONA-JIMÉNEZ, Y.; GARCÍA-MORENO, M. V.; IGARTUBURU, J. M.; BARROSO, C. G. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. **Food Chemistry**, v. 165, p. 198-204, 2014.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.
- CARRIZZO, A.; FORTE, M.; DAMATO, A.; TRIMARCO, V.; SALZANO, F.; BARTOLO, M.; MACIAG, A.; PUCA, A. A.; VECCHIONE, C. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 215-226, 2013.

CARVALHO JUNIOR, A. R.; GOMES, G. A.; FERREIRA, R. O.; CARVALHO, M. G. Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 477-482, 2014.

CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L.; CAPSONI, S.; ANDRISANO, V.; BARTOLINI, M.; MARGOTTI, E.; CATTANEO, A.; RECANATINI, M.; MELCHIORRE, C. A small molecule targeting the multifactorial nature of Alzheimer's disease. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 20, p. 3689-3692, 2007.

CAVIN, A.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. **Planta Medica**, v. 64, n. 5, p. 393-396, 1998.

CECÍLIO, A. B.; FARIA, D. B.; OLIVEIRA, P. C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D. A.; SOBRAL, M. E.; DUARTE, M. G.; MOREIRA, C. P.; SILCA, C. G.; ALMEIDA, V. L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 975-981, 2012.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2442-2451, 2011.

CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. J.; MARTINS, D.; ROQUE, N.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007.

CHAIEB, K.; ZMANTAR, T.; KSOURI, R.; HAJLAOUI, H.; MAHDOUANI, K.; ABDELLY, C.; BAKHROUF, A. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. **Mycoses**, v. 50, n. 5, p. 403-406, 2007.



CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 105-108, 2004.

CHANG, C.; CHANG, H.; PENG, C.; LEE, S.; CHEN, I. Antitubercular resorcinol analogs and benzenoid C-glucoside from the roots of *Ardisia cornudentata*. **Planta Medica**, v. 77, n. 1, p. 60-65, 2011.

CHANG, H.; LIN, Y.; LEE, S.; YANG, C.; LIN, W.; TSAI, I.; CHEN, I. Cytotoxic alkyl benzoquinones and alkyl phenols from *Ardisia virens*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 2064-2071, 2009.

CHANGWONG, N.; SABPHON, C.; INKANINAN, K.; SAWASDEE, P. Acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitory activities of mansorins and mansonones. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 3, p. 392-396, 2012.

CHATTERJEE, K.; ALI, K. M.; DE, D.; PANDA, D. K.; GHOSH, D. Antidiabetic and antioxidative activity of ethyl acetate fraction of hydromethanolic extract of seed of *Eugenia jambolana* Linn through *in-vivo* and *in-vitro* study and its chromatographic purification. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 1, p. 21-30, 2012.

CHE, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 5, p. 1013-1024, 2012.

CHEN, X.; WANG, Z.; YANG, Z.; WANG, J.; XU, Y.; TAN, R.; LI, E. *Houttuynia cordata* blocks HSV infection through inhibition of NF-KB activation. **Antiviral Research**, v. 92, n. 2, p. 341-345, 2011.

CHENG, M.; WU, M.; CHEN, I.; CHEN, J.; HSIEH, S.; YUAN, G. A new furan-3-one derivative from the endophytic fungus *Annulohypoxylon* sp. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, n. 3, p. 446-449, 2013.

CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1019-1024, 2010.

CHOI, B. W.; RYU, G.; PARK, S. H.; KIM, E. S.; SHIN, J.; ROH, S. S.; SHIN, H. C.; LEE, B. H. Anticholinesterase activity of plastoquinones from *Sargassum sagamianum*: Lead compounds for

Alzheimer's disease therapy. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 5, p. 423-426, 2007.

CHOI, W.; PARK, B.; LEE, Y.; JANG, D. Y.; YOON, H. Y.; LEE, S. Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. **Crop Protection**, v. 25, n. 4, p. 398-401, 2006.

CHRISTEN, Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 621S-629S, 2000.

CLSI. **Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas; Draft Guideline**. CLSI document M43 (Draft 3). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011, 35 p.

COLE, R. A.; BANSAL, A.; MORIARITY, D. M.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Eugenia zuchowskiae* from Monteverde, Costa Rica. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n. 4, p. 414-417, 2007.

COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 877-886, 2007.

COLLA, A. R. S.; MACHADO, D. G.; BETTIO, L. E. B.; COLLA, G.; MAGINA, M. D. A.; BRIGHENTE, I. M. C.; RODRIGUES, A. L. S. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 720-731, 2012.

COMALADA, M.; CAMUESCO, D.; SIERRA, S.; BALLESTER, I.; XAUS, J.; GÁLVEZ, J.; ZARZUELO, A. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- $\kappa$ B pathway. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 2, p. 584-592, 2005.

CONNOLLY, M.; CUNE, J. M.; DAUNCEY, E.; LOVELL, C. R. *Primula obconica* – is contact allergy on the decline? **Contact Dermatitis**, v. 51, n. 4, p. 167-171, 2004.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 33-39, 1999.

CORDOVA, S. M.; BENFATTI, C. S.; MAGINA, M. D. A.; GUEDES, A.; CORDOVA, C. M. M. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 4, p. 241-244, 2010.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

COSTA, D. P.; ALVEZ FILHO, E. G. A.; SILVA, L. M. A.; SANTOS, S. C.; PASSOS, X.; SILVA, M. R. R.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 851-858, 2010.

COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. M. A.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B. H. N.; SILVA, M. R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 111-117, 2000.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. *In vitro* phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 63-65, 2009.

CRAGG, G. M.; GROTHAU, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemicals Reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012-3043, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug lead. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRAVEN, R. A sensitive color reaction for certain quinines. **Journal of the Chemical Society**, p. 1605-1606, 1931.

CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L.; JOHNSON, A. Thermal induced chemical artifacts in lichens. **Phytochemistry**, v. 16, n. 1, p. 127-130, 1977.

DAN, C.; LIANG, J.; BAI, B.; PENG, S.; DING, L. A new phenolic glucoside gallate from the flower buds of *Eugenia caryophyllate*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 8, n. 3, p. 180-182, 2010.

DAVIS, E.; CROTEAU, R. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In: LEEPER, F. J.; VEDERAS, J. C. (Eds.). **Biosynthesis: aromatic polyketides, isoprenoids, alkaloids** (Topics in Current Chemistry). New York: Springer, 2000, 247 p.

DECAPRIO, A. P. The toxicology of hydroquinone - Relevance to occupational and environmental exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 283-330, 1999.

DENNI, M.; MAMMEN, D. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1365-1368, 2012.

DJIPA, C. D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 307-313, 2000.

DOBRE, A. A.; GAGIU, V.; PETRU, N. Antimicrobial activity of essential oils against food-borne bacteria evaluated by two preliminary methods. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n. 6, p. 119-125, 2011.

DOHI, S.; TERASAKI, M.; MAKINO, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4313-4318, 2009.

DOOMS-GOOSSENS, A.; BIESEMANS, G.; VANDAELE, M.; DEGREEF, H. *Primula* dermatites: more than one allergen? **Contact Dermatitis**, v. 21, n. 2, p. 122-123, 1989.

DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. S204-S215, 2011.

DUSAN, F.; MARIÁN, S.; KATARÍNA, D.; DOBROSLAVA, B. Essential oils - their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 8, p. 1435-1445, 2006.

EFFERTH, T.; RÜCKER, G.; FALKENBERG, M.; MANNS, D.; OLBRICH, A.; FABRY, U.; OSIEKA, R. Detection of apoptosis in KG-1a leukemic cells treated with investigational drugs. **Arzneimittelforschung/Drug Research**, v. 46, n. 2, p. 196-200, 1996.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.

EMMERICH, T.; BORELLI, V.; CARDOSO, T. C.; WISSER, C. S.; WICPOLT, N.; BIFF, C. P.; TRAVERSO, S. D.; GAVA, A. Intoxicação espontânea e experimental por frutos de *Eugenia uvalha* Cambess. (Myrtaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 438-442, 2014.

FALKENBERG, M. B. **Chinone und andere Inhaltstoffe aus *Eugenia hiemalis* Cambessèdes und *Paramyrciaria glazioviana* (Kiaerskou) Sobral (Myrtaceae)**. 1996. 84p. Tese (Doutorado em Pharmazeutische Chemie). Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität Bonn, Bonn, 1996.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1571-1578, 2011.

FAYEMIWO, K. A.; ADELEKE, M. A.; OKORO, O. P.; AWOJIDE, S. H.; AWONIYI, I. O. Larvicidal efficacies and chemical composition of essential oils of *Pinus sylvestris* and *Syzygium aromaticum* against mosquitoes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 1, p. 30-34, 2014.

FERREIRA, F. P. S.; MORAIS, S. R.; BARA, M. T. F.; CONCEIÇÃO, E. C.; PAULA, J. R.; CARVALHO, T. C.; VAZ, B. G.; COSTA, H. B.; ROMÃO, W.; REZENDE, M. H. *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 99, p. 89-96, 2014.

FLORES, G.; DASTMALCHI, K.; PAULINO S.; WHALEN, K.; DABO, A. J.; REYNERTSON, K. A.; FORONJY, R. F.; D'ARMIENTO, J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanins from *Eugenia*

*brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1256-1262, 2012.

FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R. M.; SILVA, A. M. P.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 338-343, 2005.

FURNERI, P. M.; MERINO, A.; SAIJA, A.; UCCELLA, N.; BISIGNANO, G. *In vitro* antimycoplasmal activity of oleuropein. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 20, n. 4, p. 293-296, 2002.

GARMUS, T. T.; PAVIANI, L. C.; QUEIROGA, C. L.; MAGALHÃES, P. M.; CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 4-14, 2014.

GARZÓN, G. A.; NARVÁEZ-CUENCA, C.; KOPEC, R. E.; BARRY, A. M.; RIEDL, K. M.; SCHWARTZ, S. J. Determination of carotenoids, total phenolic content, and antioxidant activity of Arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh), an amazonian fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4709-4717, 2012.

GEHRKE, I. T. S.; NETO, A. T.; PEDROSO, M.; MOSTARDEIRO, C. P.; CRUZ, I. B. M.; SILVA, U. F.; ILHA, V.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 486-491, 2013.

GIEHL, E. L. H. **Flora digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/>>. Acesso em: 21 janeiro 2015.

GIRÓN, L. M.; AGUILAR, G. A.; CÁCERES, A.; ARROYO, G. L. Anticandidal activity of plants used for the treatment of vaginitis in Guatemala and clinical trial of a *Solanum nigrescens* preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 307-313, 1988.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOIJMAN, S. G.; TURRENS, J. F.; MARINI-BETTOLO, G. B.; STOPPANI, O. M. Inhibition del crecimiento y la biosíntesis de macromoléculas en *Trypanosoma cruzi* por productos naturales. **Medicina**, v. 44, n. 4, p. 361-370, 1984.

GONÇALVES, J. L. S.; LOPES, R. C.; OLIVEIRA, D. B.; COSTA, S. S.; MIRANDA, M. M. F. S.; ROMANOS, M. T. V.; SANTOS, N. S. O.; WIGG, M. D. *In vitro* anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 3, p. 403-407, 2005.

GONZÁLEZ, A. G.; BARRERA, J. B.; PÉREZ, E. M. R. Chemical constituents of the lichen *Cladina macaronesica*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 46c, p. 12-18, 1991.

GOSWAMI, S. K.; PANDRE, M. K.; JAMWAL, R.; DETHE, S.; AGARWAL, A.; INAMDAR, M. N. Screening for Rho-kinase 2 inhibitory potential of Indian medicinal plants used in management of erectile dysfunction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 483-489, 2012.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L. R.; MATSUMOTO, K.; MBAZINE, F. F.; LUGHADHA, E. N.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L. H.; WILSON, P. G.; LUCAS, E. **World Checklist of Myrtaceae**, Royal Botanic Garden: Kew, 2008.

GRANGEIRO, M. S.; CALHEIROS-LIMA, A. P.; MARTINS, M. F.; ARRUDA, L. F.; GARCEZ-DO-CARMO, L.; SANTOS, W. C. Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae) in cholinergic nicotinic neurotransmission. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 26-30, 2006.

GROSVENOR, P. W.; SUPRIONO, A.; GRAY, D. O. Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2: antibacterial and antifungal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, n. 2, p. 97-111, 1995.

GROVER, J. K.; VATS, V.; RATHI, S. S. Anti-hyperglycemic effect of *Eugenia jambolana* and *Tinospora cordifolia* in experimental diabetes and their effects on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 3, p. 461-470, 2000.

GROVER, J. K.; VATS, V.; RATHI, S. S.; DAWAR, R. Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 233-238, 2001.

GRUSH, J.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, v. 1, n. 1; p. 46-53, 2004.

GU, J.; PARK, E. J.; LUYENGI, L.; HAWTHORNE, M. E.; MEHTA, R. G.; FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventive activity. **Phytochemistry**, v. 58, n. 1, p. 121-127, 2001.

GUIMARÃES, A. G.; MELO, M. S.; BONFIM, R. R.; PASSOS, L. O.; MACHADO, S. M. F.; RIBEIRO, A. S.; SOBRAL, M.; THOMAZZI, S. M.; QUINTANS-JÚNIOR. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9, n. 4, p. 883-887, 2009.

GÜLÇİN, I.; BEYDEMİR, G.S.S.; ELMASTA, M.; KÜFREVIÖGLU, Ö. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 393-400, 2004.

GÜLÇİN, I.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 489-499, 2012.

GUNATILAKA, A. A. L.; BERGER, J. M.; EVANS, R.; MILLER, J. S.; WISSE, J. H.; NEDDERMANN, K. M.; BURSUKER, I.; KINGSTON, D. G. I. Isolation, synthesis, and structure-activity relationships of bioactive benzoquinones from *Miconia lepidota* from the Suriname Rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 1, p. 2-5, 2001.

GUPTA, G. S.; SHARMA, D. P. Triterpenoid and other constituents of *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 13, n. 9, p. 2013-2014, 1974.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.



GUZMAN, F.; KULCHESKI, F. R.; TURCHETTO-ZOLET, A. C.; MARGIS, R. De novo assembly of *Eugenia uniflora* L. transcriptome and identification of genes from the terpenoid biosynthesis pathway. **Planta Science**, v. 229, p. 238-246, 2014.

HALDER, S.; MEHTA, A. K.; MEDIRATTA, P. K.; SHARMA, K. K. Acute effect of essential oil of *Eugenia caryophyllata* on cognition and pain in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 6, p. 587-593, 2012.

HAM, Y.; YOON, W.; PARK, S.; SONG, G.; JUNG, Y.; JEON, Y.; KANG, S.; KIM, K. Quercitrin protects against oxidative stress-induced injury in lung fibroblast cells via up-regulation of Bcl-xL. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 253-262, 2012.

HAN, M.; KIM, S.; AHN, Y. Insecticidal and antifeedant activities of medicinal plant extracts against *Attagenus unicolor japonicus* (Coleoptera: Dermestidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 42, n. 1, p. 15-22, 2006.

HANIFAH, A. L.; MING, H. T.; NARAINASAMY, V. V.; YUSOFF, A. T. Laboratory evaluation of six crude plant extracts as repellents against larval *Leptotrombidium deliense* (Acari: Trombiculidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S257-S259, 2012.

HANSEN, K.; ADSERSEN, A.; SMITT, U. W.; NYMAN, U.; CHISTENSEN, S. B.; SCHWARTNER, C.; WAGNER, H. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Erythroxylum laurifolium*. **Phytomedicine**, v. 2, n. 4, p. 313-317, 1996.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2831-2846, 2007.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 5, p. 394-396, 2009.

HAUSEN, B. M. On the occurrence of the contact allergen primin and other quinoid compounds in species of the family of Primulaceae. **Archives of Dermatological Research**, v. 261, n. 3, p. 311-321, 1978.

HAUSEN, B. M.; FAASCH, H.; KÖNIG, W. A. Primin as the source of sea-urchin hypersensitivity? **Contact Dermatitis**, v. 17, n. 5, p. 319-321, 1987.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HEMALATHA, E.; SATYANARAYANA, T.; ALEKHYANJALI, G. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Eugenia bracteata* Roxb. **International Journal of Chemical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 1061-1066, 2008.

HENG, L.; LI, C.; KIM, J. C.; LIU, Y.; JUNG, J. S.; KOH, Y. J.; HUR, J. Biruloquinone, an acetylcholinesterase inhibitor produced by lichen-forming fungus *Cladonia macilentata*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 161-166, 2013.

HERNANDEZ, M. F.; FALÉ, P. L. V.; ARAÚJO, M. E. M.; SERRALHEIRO, M. L. M. Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several *Hypericum species*. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1076-1082, 2010.

HONG, C. H.; HUR, S. K.; OH, O.; KIM, S. S.; NAM, K. A.; LEE, K. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 1-2, p. 153-159, 2002.

HONG, C.; RHEE, C. H.; WON, N.; CHOI, H.; LEE, K. Protective effect of 70% ethanolic extract of *Lindera obtusiloba* Blume on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 214-220, 2013.

HORPER, W.; MARNER, F. Phenols and quinones from leaves of *Primula obconica*. **Natural Product Letters**, v. 6, n. 3, p. 163-170, 1995.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUSSEIN, S. A. M.; HASHEM, A. N. M.; SELIEM, M. A.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M. A. M. Polyoxigenated flavonoids from *Eugenia edulis*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 4, p. 883-889, 2003.

INGKANINAN, K.; TEMKITTHAWON, P.; CHUENCHOM, K.; YUYAEM, T.; THONGNOI, W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2-3, p. 261-264, 2003.

ISMAN, M. B.; WAN, A. J.; PASSREITER, C. M. Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 65-68, 2001.

IVANOVIC, J.; DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC, S.; MISIC, D.; RISTIC, M.; ZIZOVIC, I. Evaluation and improvement of antioxidant and antibacterial activities of supercritical extracts from clove buds. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 416-423, 2013.

JACOBSON, M.; HALLER, H. L. The insecticidal component of *Eugenia haitiensis* identified as 1,8-cineol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 69, n. 3, p. 709-710, 1947.

JAGETIA, G. C.; BALIGA, M. S. *Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study. **Toxicology**, v. 132, n. 1, p. 19-25, 2002.

JOHANSSON, K.; PETTERSSON, B. Taxonomy of *Mollicutes*. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002, 573 p.

JUDD, W. S. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 612 p.

JUKIE, M.; POLITEO, O.; MAKSIMOVIC, M.; MILOS, M.; MILOS, M. *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. **Phytochemistry Research**, v. 21, n. 3, p. 259-261, 2007.

JUMBO, L. O. V.; FARONI, L. R. A.; OLIVEIRA, E. E.; PIMENTEL, M. A.; SILVA, G. N. Potential use of clove and cinnamon essential oils to control the beanweevil, *Acanthoscelides obtectus* Say, in small storage units. **Industrial Crops and Products**, v. 56, p. 27-34, 2014.

KADE, I. J.; IBUKUN, E. O.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Sun-drying diminishes the antioxidative potentials of leaves of *Eugenia uniflora* against formation of thiobarbituric acid reactive substances

induced in homogenates of rat brain and liver. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 60, n. 4-6, p. 365-371, 2008.

KAR, A.; CHOUDHARY, B. K.; BANDYOPADHYAY, N. G. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 1, p. 105-108, 2003.

KATO, E.; NAKAGOMI, R.; GUNAWAN-PUTERI, M. D. P. T.; KAWABATA, J. Identification of hydroxychavicol and its dimers, the lipase inhibitors contained in the Indonesian spice, *Eugenia polyantha*. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1239-1242, 2013.

KAWASAKI, M. L. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais, Myrtaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 11, p. 121-170, 1989.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; CARTER, R.; KÖLLNER, T.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. **Phytochemistry**, v. 71, n. 8-9, p. 844-852, 2010.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 416-423, 2012.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. *In vitro* antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 48-55, 2011.

KIM, E.; KIM, H.; AHN, Y. Acaricidal activity of plant essential oils against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 6, n. 1, p. 77-82, 2003.

KIM, H. M.; LEE, E. H.; HONG, S. H.; SONG, H. J.; SHIN, M. K.; KIM, S. H.; SHIN, T. Y. Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 125-131, 1998.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2839-2845, 1995.

KIM, K.; YI, J.; TAK, J.; AHN, Y. Acaricidal activity of plant essential oils against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 4, p. 297-304, 2004.

KIM, S. S.; OH, O.; MIN, H. Y.; PARK, E. J.; KIM, Y.; PARK, H. J.; HAN, Y. N.; LEE, S. K. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolisaccharide-stimulated mouse macrophage TAW264.7 cells. **Life Sciences**, v. 73, n. 3, p. 337-348, 2003.

KIM, S.; NA, Y.; YI, J.; KIM, B.; AHN, Y. Contact and fumigant toxicity of oriental medicinal plant extracts against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 377-382, 2007.

KING, T. J.; NEWALL, C. E. The chemistry of colour reactions. The Craven reaction. **Journal of the Chemical Society**, p. 974-977, 1965.

KOMERSOVÁ, A.; KOMERS, K.; CEGAN, A. New findings about Ellman's method to determine cholinesterase activity. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, n. 1-2, p. 150-154, 2007.

KOROCH, A. R.; JULIANI, H. R.; ZYGADLO, J. A. Bioactivity of essential oils and their components. In: GÜNTER, B. R. (Ed.) **Flavour and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. New York: Springer, 2007, 645 p.

KOSARAJU, J.; MADHUNAPANTULA, S. V.; CHINNI, S.; KHATWAL, R. B.; DUBALA, A.; NATARAJ, S. K. M.; BASAVAN, D. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition by *Pterocarpus marsupium* and *Eugenia jambolana* ameliorates streptozotocin induced Alzheimer's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 267, p. 55-65, 2014.

KREBS, M.; CHRISTENSEN, L. P. 2-methoxy-6-pentyl-1,4-dihydroxybenzene (miconidin) from *Primula obconica*: a possible allergen? **Contact Dermatitis**, v. 33, n. 2, p. 90-93, 1995.

KRISHNAN, K. R.; BABUSKIN, S.; BABU, P. A. S.; SASIKALA, M.; SABINA, K.; ARCHANA, G.; SIVARAJAN, M.; SUKUMAR, M. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, n. 3, p. 32-40, 2014.

KUBOLA, J.; SIRIAMORNUN, S.; MEESE, N. Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 972-981, 2011.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 633-640, 2004.

KUMAR, A.; LLAVARASAN, R.; JAYACHANDRAN, T.; DEECARAMAN, M.; MOHAN KUMAR, R.; ARAVINDAN, P.; PADMANABHAN, N.; KRISHAN, M. R. V. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* seed. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 941-943, 2008.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N. K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxicogenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 539-543, 2010.

KUMAR, P.; SINGH, D. K. Molluscicidal activity of *Ferula asafoetida*, *Syzygium aromaticum* and *Carum carvi* and their active components against the snail *Lymnaea acuminata*. **Chemosphere**, v. 63, n. 9, p. 1568-1574, 2006.

KUNDU, A.; SAHA, S.; WALIA, S.; AHLUWALIA, V.; KAUR, C. Antioxidant potential of essential oil and cadinene sesquiterpenes of *Eupatorium adenophorum*. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 95, n. 1, p. 127-137, 2013.

KUROKAWA, M.; NAGASAKA, K.; HIRABAYASHI, T.; UYAMA, S.; SATO, H.; KAGEYAMA, T.; KADOTA, S.; OHYAMA, H.; HOZUMI, T.; NAMBA, T.; SHIRAKI, K. Efficacy of traditional herbal medicines in combination with acyclovir against herpes simplex virus type 1 infection *in vitro* and *in vivo*. **Antiviral Research**, v. 27, n. 1-2, p. 19-37, 1995.

KUSKOSKI, E. M.; VEGA, J. M.; RIOS, J. J.; FETT, R.; TRONCOSO, A. M.; ASUERO, A. G. Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5450-5454.

LAGO, J. H.; SOUZA, E. D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIM, M. A.; MARTINS, R. C. C.; BAROLI, A. A.; CARVALHO, B. A.; SOARES, M. G.; SANTOS, R. T.; SARTORELI, P. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae – *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9827-9837, 2011.

LANDA, P.; KUTIL, Z.; MALIK, J.; KOKOSKA, L.; WIDOWITZ, U.; MARSIK, P.; BAUER, R.; VANEK, T. *In vitro* inhibition of 5-lipoxygenase by natural quinone compounds. In: 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Turkey. **Anais...** *Planta Medica*, v. 77, n. 12, p. 1425-1425, 2011.

LANDA, P.; KUTIL, Z.; TEMML, V.; KOKOSKA, L.; WIDOWITZ, U.; PRIBYLOVA, M.; DVORAKOVA, M.; MARSIK, P.; SHUSTER, D.; BAUER, R.; VANEK, T. Inhibition of *in vitro* leukotriene B4 biosynthesis in human neutrophil granulocytes and docking studies of natural quinones. **Natural Product Communication**, v. 8, n. 1, p. 105-108, 2013.

LANDA, P.; KUTIL, Z.; TEMML, V.; VUORINEN, A.; MALIK, J.; DVORAKOVA, M.; MARSIK, P.; KOKOSKA, L.; PRIBYLOVA, M.; SCHUSTER, D.; VANEK, T. Redox and non-redox mechanism of *in vitro* cyclooxygenase inhibition by natural quinones. **Planta Medica**, v. 78, n. 4, p. 326-333, 2012.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: An illustrated synoptic treatment and identification Keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.

LEE, M.; CHIOU, J.; YEN, K.; YANG, L. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Letters**, v. 154, n. 2, p. 131-136, 2000.

LEE, M.; NISHIMOTO, S.; YANG, L.; YEN, K.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1343-1349, 1997.

LEITE, J. P. V. Desenvolvimento da fitoterapia. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: Bases clínicas e Tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 3-20.

LI, D. Q.; ZHAO, J.; XIE, J.; LI, S. P. A novel sample preparation and on-line HPLC-DAD-MS/MS-BCD analysis for rapid screening and characterization of specific enzyme inhibitors in herbal extracts: Case study of  $\alpha$ -glucosidase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 130-135, 2014.

LI, Y.; XU, C.; ZHANG, Q.; LIU, J. Y.; TAN, R. X. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat

ulcer diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 3, p. 329-333, 2005.

LIMA, B. G.; TIETBOHL, L. A. C.; FERNANDES, C. P.; CRUZ, R. A. S.; BOTAS, G. S.; SANTOS, M. G.; SILVA-FILHO, M. V.; ROCHA, L. Chemical composition of essential oils and anticholinesterasic activity of *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 1, p. 152-155, 2012.

LIMA, E. O.; GOMPERTZ, O. F.; GIESBRECHT, A. M.; PAULO, M. Q. *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v. 36, n. 9-10, p. 333-336, 1993.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 137-147, 2006.

LIMA, N. P.; CERQUEIRA, S. H.; FÁVERO, O. A.; ROMOFF, P.; LAGO, J. H. G. Composition and chemical variation of the essential oil from leaves of *Eugenia brasiliensis* Lam. and *Eugenia* sp. (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 3, p. 223-225, 2008.

LIMA, O. G.; MARINI-BETTÒLO, G. B.; COELHO, J. S. B.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; CAVALCANTI, M. S. B.; MARTINS, D. G.; OLIVEIRA, L. L. Comunicação XXXIII. Primeiras observações sobre a atividade antimicrobiana e antineoplásica de 2-metóxi-6-*n*-pentil-1,4-dihidroxibenzeno (miconidina), isolada de extratos de raízes de *Miconia* sp. (Herb. IAUPe.-1903) (Melastomaceae). **Revista Instituto de Antibióticos**, v. 10, p. 35-39, 1970.

LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; OLIVEIRA, J. T. A.; VASCONCELOS, I. M.; SCALABRIN, F. B.; ROCHA, T. L.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; SILVA, L. P.; GUADAGNIN, R. V.; QUIRINO, B. F.; CASTRO, C. F. S.; LEONARDECZ, E.; FRANCO, O. L. Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: A novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. **Peptides**, v. 31, n. 8, p. 1426-1433, 2010.

LIN, P.; LI, S.; WANG, S.; YANG, Y.; SHI, J. A nitrogen-containing 3-alkyl-1,4-benzoquinone and a gomphilactone derivative from *Embelia ribes*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 11, p. 1629-1632, 2006.



- LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, n. 6, p. 759-762, 1997.
- LIU, Q.; LUYTEN, W.; PELLENS, K.; WANG, Y.; WANG, W.; THEVISSSEN, K.; LIANG, Q.; CAMMUE, B. P. A.; SCHOOF, L.; LUO, G. Antifungal activity in plants from Chinese traditional and folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 3, p. 772-778, 2012.
- LLORET, A.; GIRALDO, E.; VIÑA, J. Is antioxidant therapy effective to treat Alzheimer's disease? **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1. n. 4, p. 8-14, 2011.
- LONGO, L.; SCARDINO, A.; VASAPOLLO, G.; BLANDO, F. Anthocyanins from *Eugenia myrtifolia* Sims. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 329-332, 2007.
- LORENZI, H.; SARTORI, S.F.; BACHER, L.B.; LACERDA, M.T.C. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 660p.
- LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal of some medicinal plants from Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 100-206, 2005.
- LUNARDI, I.; PEIXOTO, J. L. B.; SILVA, C. C.; SHUQUEL, I. T. A.; BASSO, E. A.; VIDOTTI, G. J. Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 2, p. 180-183, 2001.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970. 354 p.
- MACHADO, K. E.; CECHINEL FILHO, V.; TESSAROLO, M. L.; MALLMANN, R.; MEYRE-SILVA, C.; BELLA CRUZ, A. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 7, p. 636-639, 2005.
- MACHADO, R. R. P.; JARDIM, D. F.; SOUZA, A. R.; SCIO, E.; FABRI, R. L.; CARPANEZ, A. G.; GRAZUL, R. M.; MENDONÇA, J. P. R. F.; LESCHE, B.; AARESTRUP, F. M. The effect of essential oil of *Syzygium cumini* on the development of granulomatous inflammation

in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 488-496, 2013.

MADALOSSO, R. C.; OLIVEIRA, G. C.; MARTINS, M. T.; VIEIRA, A. E. D.; BARBOSA, J.; CALIARI, M. V.; CASTILHO, R. O.; TAGLIATI, C. A. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 3, p. 772-779, 2012.

MAGAJI, R. A.; OKASHA, M. A. M.; ABUBAKAR, M. S.; FATIHU, M. Y. Anti-ulcerogenic and anti-secretory activity of the n-butanol portion of *Syzygium aromaticum* in rat. **Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 119-126, 2007.

MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; DALMARCO, J. B.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 35, n. 6, 1184-1188, 2012.

MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. L.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, n. 3, p. 345-350, 2009.

MAGINA, M. D. A.; PIETROVSKI, E. F.; GOMIG, F.; FALKENBERG, D. B.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Topical antiinflammatory activity and chemical composition of the epicuticular wax from the leaves of *Eugenia beaurepaireana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 45, p. 171-176, 2009.

MAHMOUD, I. I.; MARZOUK, M. S. A.; MOHARRAM, F. A.; EL-GINDI, M.; HASSAN, A. M. K. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1239-1244, 2001.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; LUZ, A. I. R. Essential oil of *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 3, p. 337-338, 1997.

MARIN, R.; APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P.; RASEIRA, M. C. B.; PEREIRA, J. P. M.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Volatile components and antioxidant activity from some myrtaceous fruits

cultivated in Southern Brazil. **Lantin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 172-177, 2008.

MARINI-BETTOLO, G. B.; DELLE-MONACHE, F.; LIMA, O. G.; BARROS-COELHO, S. Miconidin, a new hydroquinone from the wood of *Miconia* sp. (Melastomaceae). **Gazzeta Chimica Italiana**, v. 101, p. 41-46, 1971.

MARTINEZ-CORREA, H. A.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L.; PEIXOTO, C. A.; OLIVEIRA, A. L.; CABRAL, F. A. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 998-1006, 2011.

MATA, A. T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A. R.; SERRALHEIRO, M. L. M.; NOGUEIRA, J. M. F.; ARAÚJO, M. E. M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 778-786, 2007.

MAZINE, F. F.; SOUZA, V. C.; SOBRAL, M.; FOREST, F.; LUCAS, E. A preliminary phylogenetic analysis of *Eugenia* (Myrtaceae: Myrteae), with a focus on Neotropical species. **Kew Bulletin**, v. 69, p. 1-14, 2014.

MAZZANTI, C. M.; SCHOSSLER, D. R.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; SILVA, A. C.; CORREA, M.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; LUNKES, G.; GONZAGA, W. A.; CECIM, M. Efeito do extrato da casca de *Syzygium cumini* sobre a atividade da acetilcolinesterase em ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 803-807, 2004.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

MCCLANAHAN, R. H.; ROBERTSON, L. W. Microbial transformation of olivetol by *Fusarium roseum*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 4, p. 660-663, 1985.

MEHTA, M.; ADEM, A.; SABBAGH, M. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

MEYRE-SILVA, C.; PETRY, C. M.; BERTÉ, T. E.; BECKER, R. G.; ZANATTA, F.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V.; ANDRADE, S. F. Phytochemical analyses and gastroprotective effects

of *Eugenia umbelliflora* (Myrtaceae) on experimental gastric ulcers. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 7, p. 911-916, 2009.

MIDDHA, S. K.; USHA, T.; TRIPATHI, P.; MARATHE, K. Y.; JAIN, T.; BHATT, B.; MASURKAR, Y., P.; PANDE, V. An *in vitro* studies on indigenous ayurvedic plants, having hypoglycemic activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S46-S49, 2012.

MISHRA, M. P.; PADHY, R. N. *In vitro* antibacterial efficacy of 21 indian timber-yielding plants against multidrug-resistant bacteria causing urinary tract infection. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 4, n. 6, p. 347-357, 2013.

MIYAZAWA, M.; KAKIUCHI, A.; WATANABE, H.; KAMEOKA, H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by volatile  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated ketones. **Natural Product Letters**, v. 12, n. 2, p. 131-134, 1998.

MIYAZAWA, M.; WATANABE, H.; KAMEOKA, H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-menthane skeleton. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 677-679, 1997.

MIYAZAWA, M.; WATANABE, H.; UMEMOTO, K.; KAMEOKA, H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3431-3434, 1998.

MIYAZAWA, M.; YAMAFUJI, C. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1765-1768, 2005.

MODI, D. C.; PATEL, J. K.; SHAH, B. N.; NAYAK, B. S. Antiinflammatory activity of seeds of *Syzygium cumini* Linn. **Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 1, n. 1, p. 68-70, 2010.

MOK, S.; LEE, S. Identification of flavonoids and flavonoid rhamnosides from *Rhododendron mucronulatum* for. *albiflorum* and their inhibitory activities against aldose reductase. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 969-974, 2013.

MOKBEL, M. S.; HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 529-534, 2006.

MONKS, N. R.; BORDIGNON, S. A. L.; FERRAZ, A.; MACHADO, K. R.; FARIA, D. H.; LOPES, R.M.; MONDIN, C. A.; SOUZA, I. C.

- C.; LIMA, M. F. S.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Antitumour screening of Brazilian plants. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 8, p. 603-616, 2002.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- MORAIS, S. M.; LIMA, K. S. B.; SIQUEIRA, S. M. C.; CAVALCANTI, E. S. B.; SOUZA, M. S. T.; MENEZES, J. E. S. A.; TREVISAN, M. T. S. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 575-582, 2013.
- MORIARITY, D. M.; BANSAL, A.; COLE, R. A.; TAKAKU, S.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Selective cytotoxic activities of leaf essential oils from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communication**, v. 2, n. 12, p. 1263-1268, 2007.
- MÓRICZ, Á. M.; OTT, P. G.; BÖSZÖRMÉNYI, A.; LEMBERKOVICS, E.; MINCISOVICS, E.; TYIHÁK, E. Bioassay-guided isolation and identification of antimicrobial compounds from thyme essential oil by means of overpressured layer chromatography, bioautography and GC-MS. **Chromatographia**, v. 75, p. 991-999, 2012.
- MORIOKA, K.; NOJIMA, H.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; KURAIISHI, Y.; MOMOSE, Y. Hypotensive action of Nangapiry, a Paraguayan Natural Medicine, in rodents. **Phytomedicine**, v. 7, n. 2, p. 99-103, 2000.
- MUELLER, M.; HOBIGER, S.; JUNGBAUER, A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 987-996, 2010.
- MUKHERJEE, P. K.; SAHA, K.; MURUGESAN, T.; MANDAL, S. C.; PAL, M.; SAHA, B. P. Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 1, p. 85-89, 1998.
- MURAINA, I. A.; PICARD, J.; ELOFF, J. N. Development of a reproducible method to determine minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extract against a low-growing mycoplasmas organism. **Phytochemistry**, v. 1, n. 2-3, p. 262-264, 2009.

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

MUZITANO, M.; CRUZ, E. A.; ALMEIDA, A. P.; SILVA, A. G.; KAISER, C. R.; GUETTE, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Quercitrin: An antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Medica**, v. 72, n. 1, p. 81-83, 2006.

NADRI, H.; PIRALI-HAMEDANI, M.; SHEKARCHI, M.; ABDOLLAHI, M.; SHEIBANI, V.; AMANLOU, M.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. Design, synthesis and anticholinesterase activity of a novel series of 1-benzyl-4-((6-alkoxy-3-oxobenzofuran-2(3H)-ylidene)methyl) pyridinium derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 17, p. 6360-6366, 2010.

NAIR, A. G. R.; KRISHNAN, S.; RAVIKRISHNA, C.; MADHUSUDANAN, K. P. New and rare flavonol glycosides from leaves of *Syzygium samarangense*. **Fitoterapia**, v. 70, n. 2, p. 148-151, 1999.

NERI-NUMA, I. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; MORALES, J. P.; MALTA, L. G.; MURAMOTO, M. T.; FERREIRA, J. E. M.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 70-76, 2013.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 372-378, 2010.

NICHOLAS, R. A. J. Mycoplasmas of small ruminants and their relevance to Macedonia. **Macedonian Veterinary Review**, v. 27, n. 1-2, p. 35-39, 1998.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

NOREEN, Y.; SERRANO, G.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. **Planta Medica**, v. 64, n. 6, p. 520-524, 1998.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT, J. M.; SETZER, W. N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 15, n.3, p. 147-152, 2005.

OLIVEIRA, A. C. P.; ENDRINGER, D. C.; AMORIM, L. A. S.; BRANDÃO, M. G. L.; COELHO, M. M. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 465-469, 2005.

OLIVEIRA, A. L.; DESTANDAU, E.; FOUGÈRE, L.; LAFOSSE, M. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, v. 145, n. 15, p. 522-529, 2014.

OLIVEIRA, A. M.; HUMBERTO, M. M. S.; SILVA, J. M.; ROCHA, R. F. A.; SANT'ANA, A. E. G. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 618-624, 2006.

OLIVEIRA, R. N.; DIAS, I. J. M.; CÂMARA, C. A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 39-43, 2005.

ORHAN, I.; TOSUN, F.; SENER, B. Coumarin, anthroquinone and stilbene derivatives with anticholinesterase activity. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, n. 5-6, p. 366-370, 2008.

ÖZCAN, M. M.; ARSLAN, D. Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 171-174, 2011.

PADOVAN, A.; KESZEI, A.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W. J. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, p. 695-716, 2014.

PAHN, E. M.; PORTELA, M. P. M.; STOPPANI, A. O. M. Efecto de quinonas y nitrofuranos sobre *Trypanosoma mega* y *Crithidia fasciculata*. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 20, n. 3, p. 107-118, 1988.

PAINULY, P.; TANDON, J. S. Two 3-C-methylflavone glycosides from *Eugenia kurzii*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 1, p. 243-245, 1983.

PANDA, S. K. Ethno-medicinal uses and screening of plants for antibacterial activity from Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 158-175, 2014.

PAULSEN, E.; CHRISTENSEN, L.; ANDERSEN, K. E. Miconidin and miconidin methyl ether from *Primula obconica* Hance: new allergens in an old sensitizer. **Contact Dermatitis**, v. 55, n. 4, p. 203-209, 2006.

PAVELA, R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 691-696, 2005.

PEIXOTO, M. P. G.; FREITAS, L. A. P. Spray-dried extracts from *Syzygium cumini* seeds: physicochemical and biological evaluation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 145-152, 2013.

PEREIRA, R. A.; ZOGHBI, M. G. B.; BASTOS, M. N. C. Essential oils of twelve species of Myrtaceae growing wild in the sandbank of the Resex Maracanã, State of Pará, Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 13, n. 4, p. 440-450, 2010.

PHASOMKUSOLSIL, S.; SOONWERA, M. Comparative mosquito repellency of essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. S113-S118, 2011.

PIETROVSKI, E. F.; MAGINA, M. D. A.; GOMING, F.; PIETROVSKI, C. F.; MICKE, G. A.; BARCELLOS, M.; PIZZOLATTI, M. G.; CABRINI, D. A.; BRIGHENTE, I. M. C.; OTUKI, M. F. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 479-487, 2008.

PINHO, B. R.; FERRERES, F.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: an approach to Alzheimer's disease treatment. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 12, p. 1681-1700, 2013.

PINO, J. A.; BELLO, A.; URQUIOLA, A.; AGÜERO, J. Leaf oil of *Eugenia axillaris* (Sw.) Willd. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 15-16, 2003.



PIZZOLATTI, M. G.; KOGA, A. H.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. **Phytomedicine**, v. 9, n. 5, p. 422-426, 2002.

PONGCHAROEN, W.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J. A new dihydrobenzofuran derivative from the endophytic fungus *Botryosphaeria mamane* PSU-M76. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 9, p. 1404-1405, 2007.

POON, H. F.; CALABRESE, V.; SCAPAGNINI, G.; BUTTERFIELD, D. A. Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. **Journal of Gerontology: Medical Sciences**, v. 59A, n. 5, p. 478-493, 2004.

POURGHOLAMI, M. H.; KAMALINEJAD, M.; JAVADI, M.; MAJZOUB, S.; SAYYAH, M. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 2, p. 167-171, 1999.

PRADO, L. C. S.; SILVA, D. B.; OLIVEIRA-SILVA, G. L.; HIRAKI, K. R. N.; CANABRAVA, H. A. N.; BISPO-DA-SILVA, L. B. The Gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 5, p. 722-730, 2014.

PRATA, B.; SCHLUTTENHOFER, C.; WU, Y.; PATTANAIK, S.; YUAN, L. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1829, n. 11, p. 1236-1247, 2013.

PRINCE, P. S. M.; KAMALAKKANNAN, N.; MENON, V. P. *Syzigium cumini* seed extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 2-3, p. 205-209, 2003.

RAINHA, N.; KOCI, K.; COELHO, A. V.; LIMA, E.; BAPTISTA, J.; FERNANDES-FERREIRA, M. HPLC-UV-ESI-MS analysis of phenolic compounds and antioxidant properties of *Hypericum undulatum* shoot cultures and wild-growing plants. **Phytochemistry**, v. 86, p. 83-91, 2013.

RAJ, G.; GEORGE, V.; PRADEEP, N. S.; SETHURAMAN, M. G.; Volatile constituents and antibacterial activity of *Eugenia rotleriana* Wight et Arn. leaf oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 6, p. 588-590, 2007.

RAJASEKARAN, M.; BAPNA, J. S.; LAKSHMANAN, S.; RAMACHANDRAN NAIR, A. G.; VELIATH, A. J.; PANCHANADAM, M. Antifertility effect in male rats of oleanolic acid, a triterpene from *Eugenia jambolana* flowers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, n. 1, p. 115-121, 1988.

RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E. N.; LAKSHMINARASIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332-347, 2014.

RAMOS, M. F.; MONTEIRO, S. S.; SILVA, V. P.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Essential oils from Myrtaceae species of the Brazilian Southeastern Maritime Forest (Restinga). **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 2, p. 109-113, 2010.

RAMOS, M. F. S.; SIANI, A. C.; SOUZA, M. C.; ROSAS, E. C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Avaliação da atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais de cinco espécies de Myrtaceae. **Revista Fitos**, v. 2, n. 2, p. 58-66, 2006.

RANA, I. S.; RANA, A. S. Efficacy of essential oils of aromatic plants as larvicide for the management of filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) with special reference to *Foeniculum vulgare*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 3, p. 184-189, 2012.

RAO, B. G. V.; NIGAM, S. S. The *in vitro* antimicrobial efficiency of essential oils. **Indian Journal of Medical Research**, v. 58, n. 5, p. 627-633, 1970.

RAO, P. S.; KALVA, S.; YERRAMILI, A.; MAMIDI, S. Free radicals and tissue damage: role of antioxidants. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 2-7, 2011.

RATH, S.; PADHY, R. N. Monitoring *in vitro* antibacterial efficacy of 26 Indian spices against multidrug resistant urinary tract infecting bacteria. **Integrative Medicine Research**, v. 3, n. 3, p. 133-141, 2014.

RAVI, K.; RAMACHANDRAN, B.; SUBRAMANIAN, S. Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Life Sciences**, v. 75, p. 2717-2731, 2004.

- RAZIN, S. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*). **Microbiological Reviews**, v. 49, n. 4, p. 419-455, 1985.
- RAZIN, S. The genus *Mycoplasma* and related genera (class Mollicutes). In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT, E. (Eds.). **The Prokaryotes**. New York: Springer, v. 4, 2006. 1110 p.
- RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research - An historical perspective. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 183-190, 2010.
- RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.
- REITZ, R.; LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. **Myrtaceae** (Flora Ilustrada Catarinense) [encadernada]. Itajaí: Herbário “Barbosa Rodrigues”, v. 24, 1967-1971, 487 p.
- REITZ, R.; LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. **Myrtaceae** (Flora Ilustrada Catarinense) [encadernada]. Itajaí: Herbário “Barbosa Rodrigues”, v. 25, 1971-1978, 491-876 p.
- REN, Q.; XING, H.; BAO, Z.; SU, B.; YANG, Q.; YANG, Y.; ZHANG, Z. Recent advances in separation of bioactive natural products. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 9, p. 937-952, 2013.
- REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.
- RIBEIRO, T. G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; VALADARES, D. G.; FRANCA, J. R.; LAGEN P. S.; DUARTE, M. C.; ANDRADE, P. H. R.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E.; ARRUDA, A. L. AL.; FARACO, A. A. G.; COELHO, E. A. F.; CASTILHO, R. O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**, v. 143, p. 60-68, 2014.
- RIDDLES, P. W.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Ellman’s reagent: 5,5’-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) - a reexamination. **Analytical Biochemistry**, v. 94, p. 75-81, 1979.
- RIVIÈRE, C.; HONG, V. N.; PIETERS, L.; DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V.; VAN, M. C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Polyphenols

isolated from antiradical extracts of *Mallotus metcalfianus*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 1, p. 86-94, 2009.

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

ROSAS-PIÑÓN, Y.; MEJÍA, A.; DÍAS-RUIZ, G.; AGUILAR, M. I.; SÁNCHEZ-NIETO, S.; RIVERO-CRUZ, J. F. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 860-865, 2012.

ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 2, p. 417-432, 2003.

ROZAS-MUÑOZ, E.; LEPOITTEVIN, J. P.; PUJOL, R. M.; GIMÉNEZ-ARNAU, A. Allergic contact dermatitis to plants: understanding the chemistry will help our diagnostic approach. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 103, n. 6, p. 456-477, 2012.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 167-174, 2000.

RÜCKER, G.; NEUGEBAUER, M.; WILLEMS, G. G. **Instrumentelle pharmazeutische Analytik**: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden. 3 ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2001, 705 p.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRIO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidante capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

RUFINO, M. S. M.; FERNANDES, F. A. N.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH<sup>•</sup> system. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 693, 695, 2009.

SAHA, S.; SUBRAHMANYAM, V. E. V. S.; KODANGALA, C.; MANDAL, S. C.; SHASTRY, S. C. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and fractions of *Eugenia*

*jambolana* root bark and isolation of phytoconstituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 651-661, 2013.

SAHU, M. C.; DUBEY, D.; RATH, S.; PANDA, T.; PADHY, R. N. Monograph: *In vitro* efficacy of 30 ethnomedicinal plants used by Indian aborigines against 6 multidrug resistant Gram-positive pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 2, p. 136-150, 2015.

SAVELEV, S.; OKELLO, E.; PERRY, N. S. L.; WILKINS, R. M.; PERRY, E. K. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 661-668, 2003.

SAMRA, Z.; ROSENBERG, S.; SOFFER, Y. *In vitro* susceptibility of *Mycoplasma hominis* clinical isolates to tetracyclines, quinolones and macrolides. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, n. 4, p. 359-361, 2002.

SANGWAN, N. K.; VERMA, B. S.; VERMA, K. K.; DHINDSA, K. S. Nematicidal activity of some essential plant oils. **Pesticide Science**, v. 28, n. 3, p. 331-335, 1990.

SANKHARI, J. M.; JADEJA, R. N.; THOUNAOJAM, M. C.; DEVKAR, R. V.; RAMACHANDRAN A. V. Safety evaluation of *Eugenia jambolana* seed extract. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 12, p. 982-987, 2010.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; MENDONÇA, L. Z.; SOARES, M. J. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 283-290, 2007.

SANTOS, D. N.; SOUZA, L. L.; FERREIRA, N. J.; OLIVEIRA, A. L. Study of supercritical extraction from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.) with bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, *In press*.

SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E. S.; BRAGA, M. F. B. M.; GUEDES, G. M. M.; ROLÓN, M.; VEGA, C.; ARIAS, A. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities

of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 130-132, 2012.

SANTOS, K. T.; LIMA, B. G.; TIETBOHL, L. A. C.; FERNANDEZ, C. P.; CARESTIATO, J. C.; SANT'ANNA, L. S.; BRESSA, P. A. C.; SANTOS, M. G.; RUPPELT, B. M.; MOREIRA, C. M.; ROCHA, L. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. (Myrtaceae) on hemodynamic parameters of wistar rats. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32, n. 6, p. 944-947, 2013.

SANTOS, K. T.; SANT'ANNA, L. S.; BRESSA, P. A. C.; TIETBOHL, L. A. C.; LIMA, B. G.; FERNANDES, C. P.; SANTOS, M. G.; ROCHA, L.; MOREIRA, C. M. Cardiovascular effects of the essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Natural Products**, v. 7, p. 177-183, 2014.

SASIKUMAR, J. M.; PATHARAJ, J.; ADITHYA, E. S.; CHRISTABEL, P. H.; SHAMNA, R. Antioxidant capacity and phenolic content of *Elaeagnus kologa* Schlecht. an underexploited fruit from India. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 3, p. 28-35, 2012.

SCHAAF, L. B.; FIGUEIREDO FILHO, A.; GALVÃO, F.; SANQUETTA, C. R.; LONGHI, S. J. Modificações florístico-estruturais de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista Montana no período entre 1979 e 2000. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 3, p. 271-291, 2006.

SCHAPOVAL, E. E. S.; SILVEIRA, S. M.; MIRANDA, M. L.; ALICE, C. B.; HENRIQUES, A. T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, n. 3, p. 137-142, 1994.

SCHENKEL, E. P.; RÜCKER, G.; MANNS, D.; FARKENBERG, M. B.; MATZENBACHER, N. I.; SOBRAL, M.; MENTZ, L. A.; BORDIGNON, S. A. L.; HEINZMANN, B. M. Screening of Brazilian plants for the presence of peroxides. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 191-196, 2002.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; ARIAS, A. R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 183-186, 1987.

SCHMIDT, J.; NOLETTO, J. A.; VOGLER, B.; SETZER, W. N. Abaco Bush medicine: chemical composition of the essential oils of four

aromatic medicinal plants from Abaco Island, Bahamas. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 12, n. 3, p. 43-65, 2006.

SETZER, W. N.; SCHMIDT, J. M.; NOLETTO, J. A.; VOGLER, B. Leaf oil compositions and bioactivities of Abaco Bush medicines. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 794-802, 2006.

SCOPEL, R.; FALCÃO, M. A.; LUCAS, A. M.; ALMEIDA, R. N.; GANDOLFI, P. H. K.; CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. Supercritical fluid extraction from *Syzygium aromaticum* buds: Phase equilibrium, mathematical modeling and antimicrobial activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 223-230, 2014.

SETZER, W. N.; NOLETT, J. A.; VICENT, M. A. 3,5-Trimethoxybenzene and 2,4,6-trimethoxystyrene are the major components in the leaf oil of *Eugenia confusa* from Abaco Island, Bahamas. **Natural Product Communications**, v. 1, p. 43-45, 2006.

SHAFI, P. M.; ROSAMMA, M. K.; JAMIL, K.; REDDY, P. S.; Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 414-416, 2002.

SHAMI, N. J. I.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHARMA, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2376-2383, 2008.

SHARMA, B.; SIDDIQUI, M. S.; KUMAR, S. S.; RAM, G.; CHAUDHARY, M. Liver protective effects of aqueous extract of *Syzygium cumini* in Swiss albino mice on alloxan induced diabetes mellitus. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 8, p. 853-858, 2013.

SHARMA, S. B.; NASIR, A.; PRABHU, K. M.; MURTHY, P. S. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 3, p. 367-373, 2006.

SHARMA, S. B.; NASIR, A.; PRABHU, K. M.; MURTHY, P. S.; DEV, G. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 201-206, 2003.

SHEN, S.; ZHANG, T.; YUAN, Y.; LIN, S.; XU, J.; YE, H. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. **Food Control**, v. 47, p. 196-202, 2015.

SHEPARD, M. C. Standard fluid medium U10 for cultivation and maintenance of *Ureaplasma urealyticum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 24, p. 160-171, 1974.

SHINDE, J.; TALDONE, T.; BARLETTA, M.; KUNAPARAJU, N.; HU, B.; KUMAR, S.; PLACIDO, J.; ZITO, W.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel *in vitro* and in Goto-Kakizaki (GK) rats. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 7, p. 1278-1281, 2008.

SIEBERT, D. A.; TENFEN, A.; YAMANAKA, C. N.; CORDOVA, C. M. M.; SCHARF, D. R.; SIMIONATTO, E. L.; ALBERTON, M. D. Evaluation of seasonal chemical composition, antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activity of essential oil from *Eugenia brasiliensis* Lam. **Natural Product Research**, v. 29, n. 3, p. 289-292, 2015.

SILVA, T.; REIS, J.; TEIXEIRA, J.; BORGES, F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Ageing Research Reviews**, v. 15, p. 116-145, 2014.

SIMIRGIOTISA, M. J.; ADACHIB, S.; TOB, S.; YANGA, H.; REYNERTSONC, K. A.; BASILED, M. J.; GILE, R. R.; WEINSTEINB, I. B.; KENNELLYA, E. J. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of a *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 813-819, 2008.

SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, R.; DHAKA, N. Potential applications of antioxidants: A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 828-835, 2013.

SIRAND-PUGNET, P.; CITTI, C.; BARRÉ, A.; BLANCHARD, A. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. **Research in Microbiology**, v. 158, p. 754-766, 2007.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A. R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, n. 2, p. 191-198 2005.



SLOWING, K.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Eugenia jambos* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 9-11, 1994.

SLOWING, K.; SÖLLHUBER, M.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Flavonoid glycosides from *Eugenia jambos*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 1, p. 255-258, 1994.

SOARES, J. D.; WALKER, J.; PIGNITTER, M.; WALKER, J. M.; IMBOECK, J. M.; EHRNHOFER-RESSLER, M. M.; MONTENEGRO BRASIL, I.; SOMOZA, V. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit juice and two major constituents thereof exhibit anti-inflammatory properties in human gingival and oral gum epithelial cells. **Food & Function**, v. 5, n. 11, p. 2981-2988, 2014.

SOBRAL, M. **A família Myrtaceae no Rio Grande do Sul**. Rio Grande do Sul: Unisinos, 2003. 108 p.

SOBRAL, M. Sinopse de *Myrciaria* (Myrtaceae). **Napaea**, v. 9, p. 13-41, 1993.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10414>. Acesso em: 12 de março de 2013.

SOBRAL-SOUZA, C. E.; LEITE, N. F.; CUNHA, F. A. B.; PINHO, A. I.; ALBUQUERQUE, R. S.; CARNEIRO, J. N. P.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; FRANCO, J. L.; COUTINHO, H. D. M. Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 165-170, 2014.

SOUZA, C. M.; SILVA, H.; VIEIRA-JR, G.; AYRES, M.; COSTA, C.; ARAÚJO, D.; CAVALCANTE, L.; BARROS, E.; ARAÚJO, P.; CHAVES, B. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, R. M. F.; MORAIS, S. A. L.; VIEIRA, R. B. K.; NAPOLITANO, D. R.; GUZMAN, V. B.; MORAES, T. S.; CUNHA, L. C. S.; MARTINS, C. H. G.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, A. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia*

*calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 71-78, 2015.

SOUZA, A. **Variabilidade dos óleos voláteis de espécies de Myrtaceae nativas da Mata Atlântica**. 2009. 351 p. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 704p.

SRITABUTRA, D.; SOONWERA, M. Repellent activity of herbal essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 4, p. 271-276, 2013.

SRITABUTRA, D.; SOONWERA, M.; WALTANACHANOBON, S.; POUNGJAI, S. Evaluation of herbal essential oil as repellents against *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles dirus* Peyton & Harrion. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. S124-S128, 2011.

SRIVASTAVA, R.; SHAW, A. K.; KULSHRESHTHA, D. K. Triterpenoids and chalcone from *Syzygium samarangense*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 3, p. 687-689, 1995.

STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Myrtales medicinais. In: STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002. 604 p.

STEFANELLO, M. É. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011.

STEFANELLO, M. E.; CERVI, A. C.; ITO, I. Y.; SALVADOR, M. J.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. L. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 1, p. 75-78, 2008.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J.S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 7-13, 2009.

STOKES, S. L.; COLE, R. A.; RANGELOVA, M. P.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Cruzain inhibitory activity of the leaf essential oil from an undescribed species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communication**, v. 2, n. 12, p. 1211-1213, 2007.

SUKORINI, H.; SANGCHOTE, S.; KHEWKHOM, N. Control of postharvest green mold of citrus fruit with yeasts, medicinal plants, and their combination. **Postharvest Biology and Technology**, v. 79, p. 24-31, 2013.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1106-1114, 2007.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.

SZEREDI, L.; TENK, M.; DÁN, Á. Infection of two goatherds with *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in Hungary, evidence of a possible faecal excretion. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 50, n. 4, p. 172-177, 2003.

TALBERT, R.; WALL, R. Toxicity of essential and non-essential oils against the chewing louse, *Bovicola (Werneckiella) ocellatus*. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 2, p. 831-835, 2012.

TANAKA, T.; ORII, Y.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I.; KOUNO, I. Syzyginins A and B, two ellagitannins from *Syzygium aromaticum*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1345-1348, 1996.

TAREK, N.; HASSAN, H. M.; ABDELGHANI, S. M. M.; RADWAN, I. A.; HAMMOUDA, O.; EL-GENDY, A. O. Comparative chemical and antimicrobial study of nine essential oils obtained from medicinal plants growing in Egypt. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Science**, v. 3, n. 2, p. 149-156, 2014.

TASDEMIR, D.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; FRANZBLAU, S. G.; RÜEDI, P. Antituberculous and antiprotozoal activities of primin, a

natural benzoquinone: *in vitro* and *in vivo* studies. **Chemistry & Biodiversity**, v. 3, n. 11, p. 1230-1237, 2006.

THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; HIRSCHMANN, G. S. Xathine oxidase inhibitory activity of paraguayan myrtaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, n. 2-3, p. 179-183, 1988.

TIMBOLA, A. K.; SZPOGANICZ, B.; BRANCO, A.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 2, p. 174–176, 2002.

TIWARI, P.; VERMA, R.; AHIRWAR, D.; CHANDY, A.; DWIVEDI, S. Evaluation of anxiolytic effect of *Syzygium aromaticum*: a traditional herb of India. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. S77-S80, 2014.

TONG, W. Y.; WANG, H.; WAISUNDARA, V. Y.; HUANG, D. Inhibiting enzymatic starch digestion by hydrolyzable tannins isolated from *Eugenia jambolana*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 389-395, 2014.

TREVISAN, M. T. S.; BEZESSA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M. P.; FEITOSA, C. M.; VERPOORTE, R.; BRAZ FILHO, R. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 415-418, 2006.

TROPICOS. MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Eugenia hiemalis* **Cambess.** Disponível em: <http://tropicos.org/Name/22100582>. Acesso em: 12 de março de 2013.

TULLY, J. G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of *Mollicutes*. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Eds.) **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego: Academic Press, v. 1., 1995. 483 p.

TULLY, J. G. Molecular properties of mollicutes: a synopsis. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Eds.) **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego: Academic Press, v. 1., 1995. 483 p.

TULLY, J. G.; TAYLOR-ROBINSON, D.; ROSE, D. L.; COLE, R. M.; BOVE, J. M. *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 33, n. 2., 1983.

- UJU, D. E.; OBIOMA, N. P. Anticariogenic potentials of clove, tobacco and bitter kola. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 10, p. 814-818, 2011.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VEIGAS, J. M.; NARAYAN, M. S.; LAXMAN, P. M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 619-627, 2007.
- VEIGAS, J. M.; SHRIVASTHAVA, R.; NEELWARNE, B. Efficient amelioration of carbon tetrachloride induced toxicity in isolated rat hepatocytes by *Syzygium cumini* Skeels extract. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 6, p. 1440-1446, 2008.
- VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; BUSCHIAZZO, P. M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of paraguayian plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1-2, p. 91-97, 2003.
- VELLECA, W. M.; BIRD, B. R.; FORRESTER, F. T. Complete media for growth of mycoplasmas and ureaplasmas from the urogenital tract: arginine broth medium for growth of *M. hominis*. In: VELLECA, W. M.; BIRD, B. R.; FORRESTER, F. T. **Laboratory diagnosis of mycoplasma infections**: course 8226-C. Atlanta: U.S. Department of Health, Education and Welfare, p.120, 1979.
- VICTORIA, F. N.; ANVERSA, R. G.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E. J. Essential oils of *E. uniflora* leaves protect liver injury induced by acetaminophen. **Food Bioscience**, v. 4, p. 50-57, 2013.
- VICTORIA, F. N.; BRAHM, A. S.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience Letters**, v. 544, p. 105-109, 2013.
- VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; SILVA, W. P.; MOTTA, A. S.; NASCENTE, P. S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.:

Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, 2012.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VILLANUEVA-TIBURCIO, J.; CONDEZO-HOYOS, L. A.; ASQUIERI, E. R. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 151-160, 2010.

VILLASEÑOR, I. M.; LAMADRID, M. R. Comparative anti-hyperglycemic potentials of medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 129-131, 2006.

VIUDA-MARTOS, M.; NAVAJAS, Y. R.; ZAPATA, E. S.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 1, p. 13-19, 2010.

WAGNER, C.; FACHINETTO, R.; CORTE, C. L. D.; BRITO, V. B.; SEVERO, D.; DIAS, G. O. C.; MOREL, A. F.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation *in vitro*. **Brain Research**, v. 1107, n. 1, p. 192-198, 2006.

WAITES, K. B.; KATZ, B.; SCHELONKA, R. L. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 757-789, 2005.

WAITES, K. B.; TALKINGTON, D. F. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 697-728, 2004.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific, 1994. 238p.

WEINER, M. W.; AISEN, P. S.; JACK Jr, C. R.; JAGUST, W. J.; TROJANOWSKI, J. Q.; SHAW, L.; SAYKIN, A. J.; MORRIS, J. C.; CAIRNS, N.; BECKETT, L. A.; TOGA, A.; GREEN, R.; WALTER, S.; SOARES, H.; SNYDER, P.; SIEMERS, E.; POTTER, W.; COLE, P. E.; SCHMIDT, M.; ALZHEIMER'S DISEASE NEUROIMAGING

- INITIATIVE. The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Progress report and future plans. **Alzheimer's & Dementia**, v. 6, n. 3, p. 202-211, 2010.
- WERKA, J. S.; BOEHME, A. K.; SETZER, W. N. Biological activities of essential oils from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communication**, v. 2, n. 12, p. 1215-1219, 2007.
- WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apiculture Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.
- WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 940-949, 2007.
- WONG, S. P.; LEONG, L. P.; KOH, J. H. W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p. 775-783, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional medicine**. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. Acesso em: 30 de maio de 2013.
- XIA, L.; ZHANG, J.; GAO, W.; WANG, H. Study on chemical composition, anti-inflammatory and anti-microbial activities of extracts from Chinese pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 10, p. 3673-3679, 2012.
- YAMAZAKI, E.; INAGAKI, M.; KURITA, O.; INOUE, T. Antioxidant activity of Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum* DC.) fruit. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 171-177, 2007.
- YAMING, S.; YAMING, X.; YANPING, S.; ZHENYING, H.; YONGJIANG, L. The antimicrobial activity of *Rodgersia aesculifolia*. **Indian Veterinary Journal**, v. 86, n. 11, p. 1182-1183, 2009.
- YANG, L.; LEE, C.; YEN, K. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 157, n. 1, p. 65-75, 2000.
- YIN, Y.; LI, W.; SON, Y.; SUN, L.; LU, J.; KIM, D.; WANG, X.; YAO, H.; WANG, L.; PRATHEESHKUMAR, P.; HITRON, A. J.; LUO, J.; GAO, N.; SHI, X.; ZHAN, Z. Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 269, n. 2, p. 89-99, 2013.

ZAIDI, YAADA, K.; KADOWAKI, M.; USMANGHANI, K.; SUGIYAMA, T. Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 286-291, 2009.

ZHANG, R.; ZENG, Q.; DENG, Y.; ZHANG, M.; WEI, Z.; ZHANG, Y.; TANG, X. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1169-1176, 2013.

ZHANG, Y.; CHEN, Y. Isobiflorin, a chromene C-glycoside from cloves (*Eugenia caryophyllata*). **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 401-403, 1997.

ZHAO, N. N.; ZHOU, L.; LIU, Z. L.; DU, S. S.; DENG, Z. W. Evaluation of the toxicity of the essential oils of some common Chinese spices against *Liposcelis bostrychophila*. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 486-490, 2012.

ZHELEVA-DIMITROVA, D.; ZHELEV, I.; DIMITROVA-DYULGEROVA, I. Antioxidant activity of some *Carduus* species growing in Bulgaria. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 15-20, 2011.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.

ZKESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; CARTER, R.; KÖLLNER, T.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. **Phytomedicine**, v. 71, n. 8-9, p. 844-852, 2010.

ZOGHBI, M. G. B.; GUILHON, G. M. S. P.; SARGES, F. N.; PEREIRA, F. N.; OLIVEIRA, J. Chemical variability of the volatiles from the leaves of *Eugenia protenta* McVaugh (Myrtaceae) growing wild in the North of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 4-6, p. 660-665, 2011.



## **APÊNDICE A – PROCEDIMENTOS CROMATOGRÁFICOS ADOTADOS NO ESTUDO BIOGUIADO**

Todos os procedimentos descritos abaixo podem ser visualizados nos respectivos fluxogramas apresentados anteriormente em “Resultados e discussão” e a Figura 41 apresenta um resumo de todos os procedimentos cromatográficos realizados, com os respectivos compostos isolados.

### **1 CLV DO EXTRATO EDF – COLUNA A (ALÍQUOTA 1)**

Uma alíquota do extrato bruto diclorometânico das folhas (3,45 g) foi submetida à cromatografia líquida a vácuo com gel de sílica 60. Utilizou-se como fase móvel um gradiente de solventes que iniciou com hexano 100% e finalizou com metanol. Cada fração foi coletada em frasco separado, obtendo-se um total de 15 frações, chamadas de A-1 a A-15. As frações com rendimentos viáveis foram selecionadas para os testes nos modelos de atividade biológica em que o extrato de origem obteve melhores resultados, sendo as amostras ativas selecionadas para procedimentos cromatográficos posteriores.

#### **1.1 CLMP DA FRAÇÃO A-5 – COLUNA A1**

A fração A-5 (436,1 mg) foi submetida a separação cromatográfica em sistema de média pressão (Sepacore/Syncore<sup>®</sup>). Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de hexano com proporções crescentes de acetato de etila. Obtiveram-se 123 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 32 frações, chamadas de A1-1-2 a A1-117-123 (Figura 10).

#### **1.2 CLMP DA FRAÇÃO A-7 – COLUNA A2**

A fração A-7 (198,2 mg) foi submetida a separação cromatográfica em sistema de média pressão (Sepacore/Syncore<sup>®</sup>). Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de hexano com proporções crescentes de acetato de etila. Obtiveram-se 84 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 22 frações, chamadas de A2-1 a A2-83-84 (Figura 10).

### 1.3 CLMP DA FRAÇÃO A-9 – COLUNA A3

A fração A-9 (345,1 mg) foi submetida a separação cromatográfica em sistema de média pressão (Sepacore/Syncore®). Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de diclorometano com proporções crescentes de acetato de etila. Obtiveram-se 60 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 9 frações, chamadas de A3-1 a A3-60 (Figura 21).

### 1.4 CCA DA FRAÇÃO A-10 – COLUNA A4

A fração A-10 (53,1 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de diclorometano com proporções crescentes de acetato de etila. Obtiveram-se 89 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 20 frações, chamadas de A4-1-9 a A4-81-89 (Figura 21).

### 1.5 CCA DA FRAÇÃO A-13 – COLUNA A5

A fração A-13 (250,0 mg) foi submetida a separação cromatográfica em sistema de média pressão (Sepacore/Syncore®). Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de diclorometano com proporções crescentes de metanol. Obtiveram-se 171 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 24 frações, chamadas de A5-1-2 a A5-168-171 (Figura 21).

#### 1.5.1 CCA da fração A5-145-155 – COLUNA A6

A fração A5-145-155 (6,2 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão em resina de Sephadex® LH-20, utilizando-se como eluente metanol. Obtiveram-se 14 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 4 frações, chamadas de A6-1-6 a A6-11-14 (Figura 21).

## 2 CLV DO EXTRATO EDF – COLUNA B (ALÍQUOTA 2)

Uma segunda alíquota do extrato bruto diclorometânico das folhas (4,07 g) foi submetida à cromatografia líquida a vácuo com gel de

sílica 60 (Figura 19). Utilizou-se como fase móvel um gradiente de solventes que iniciou com hexano 100% e finalizou com metanol, em uma esquema de eluição idêntico ao que foi utilizado na coluna A. Cada fração foi coletada em frasco separado, obtendo-se um total de 15 frações, chamadas de B-1 a B-15.

## 2.1 CCA DA FRAÇÃO B-8 – COLUNA B1

A fração B-8 (50,1 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de hexano com proporções crescentes de acetato de etila. Obtiveram-se 80 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 14 frações, chamadas de B1-1-2 a B1-77-80 (Figura 21).

## 2.2 CCA DA FRAÇÃO B-9 – COLUNA B2

A fração B-9 (569,9 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de diclorometano com proporções crescentes de acetato de etila. Obtiveram-se 74 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 13 frações, chamadas de B2-1-4 a B2-70-74 (Figura 20).

### 2.2.1 CCA DA FRAÇÃO B2-45-50 – COLUNA B3

A fração B2-45-50 (51,7 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de hexano com proporções crescentes de diclorometano. Obtiveram-se 49 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 8 frações, chamadas de B3-1-3 a B3-48-49 (Figura 20).

## 2.3 CCA DA FRAÇÃO B-11 – COLUNA B4

A fração B-11 (113,3 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de clorofórmio com proporções crescentes de acetato de etila. Obtiveram-se 98 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 16 frações, chamadas de B4-1-6 a B4-98 (Figura 20).

### **2.3.1 CCA da fração B4-44-49 – COLUNA B5**

A fração B4-44-49 (11,1 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão em resina Sephadex® LH-20, utilizando-se como eluente metanol. Obtiveram-se 12 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 3 frações, chamadas de B5-1-5 a B5-12-14 (Figura 20).

### **2.4 CCA DA FRAÇÃO B-12 – COLUNA B6**

A fração B-12 (78,0 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de clorofórmio com proporções crescentes de acetato de etila. Obtiveram-se 93 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 21 frações, chamadas de B6-1-4 a B6-86-93 (Figura 20).

### **3 CCA do extrato EDB – COLUNA C**

Uma alíquota do extrato bruto diclorometânico dos botões florais (470,0 mg) foi submetida à cromatografia em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de hexano com proporções crescentes de acetato de etila. Obtiveram-se 191 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 49 frações, chamadas de C-1-13 a C-184-194 (Figura 11).

### **3.1 CCA DA FRAÇÃO C-104-110 – COLUNA C1**

A fração C-104-110 (111,8 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de diclorometano com proporções crescentes de acetato de etila. Obtiveram-se 53 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 6 frações, chamadas de C1-1-27 a C1-53 (Figura 11).

### **4 CLV DO EXTRATO EMF – COLUNA D**

O extrato metanólico das folhas foi submetido a separação cromatográfica em três etapas. Inicialmente, uma alíquota do extrato bruto (10,0 g) (Coluna Da) foi submetida à cromatografia líquida a

vácuo com gel de sílica 60, utilizando-se como fase móvel um gradiente de solventes que iniciou com hexano 100% e finalizou com metanol, conforme Tabela 2. Cada fração foi coletada em frasco separado, obtendo-se um total de 20 frações, que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 12 frações chamadas de D-1-3 a D-20. O mesmo procedimento foi aplicado para outras duas alíquotas do extrato bruto (Coluna Db e Dc, com 11,30 e 10,31 g, respectivamente). As frações obtidas nos três processos anteriores foram reunidas em função de sua semelhança cromatográfica, obtendo-se ao fim 18 frações (D1 a D18). Algumas destas frações foram selecionadas para os testes nos modelos de atividade biológica em que o extrato de origem obteve melhores resultados, sendo estas amostras selecionadas para procedimentos cromatográficos posteriores.

#### 4.1 CLV DA FRAÇÃO D-9 – COLUNA D1

Uma alíquota da fração D-9 (2,0 g) foi submetida à cromatografia líquida a vácuo. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de clorofórmio com proporções crescentes de metanol. Obtiveram-se 15 frações, chamadas de D1-1 a D1-15 (Figura 16). A fração D1-4 apresentou formação de duas fases, as quais foram separadas e nomeadas de D1-4a e D1-4b.

##### 4.1.1 CCA da fração D1-6a – COLUNA D2

A fração D1-6 foi dissolvida em metanol, observando-se a formação de um precipitado, que lavado várias vezes com este mesmo solvente. Este procedimento originou 3 frações, denominadas de D1-6a até D1-6c. Uma alíquota da fração D1-6a (243,9 mg) foi submetida à cromatografia em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de clorofórmio com proporções crescentes de metanol. Obtiveram-se 110 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica, em 12 frações, chamadas de D2-1-33 a D2-110 (Figura 16).

##### 4.1.1.1 CCA da fração D2-38-39 – COLUNA D3

A fração D2-38-39 (28,4 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão em resina Sephadex<sup>®</sup> LH-20, utilizando-se como eluente metanol. Obtiveram-se 13 frações, que foram agrupadas em função da

sua semelhança cromatográfica em 6 frações, chamadas de D3-1-4 a D3-11-13 (Figura 16).

#### 4.1.1.2 CCA da fração D2-40-41 – COLUNA D4

A fração D2-40-41 (13,3 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão em resina Sephadex<sup>®</sup> LH-20, utilizando-se como eluente metanol. Obtiveram-se 16 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 3 frações, chamadas de D4-1-11 a D4-16 (Figura 18).

#### 4.1.1.2 CCA da fração D2-58-73 – COLUNA D5

A fração D2-58-73 (32,2 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão em resina Sephadex<sup>®</sup> LH-20, utilizando-se como eluente metanol. Obtiveram-se 17 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 6 frações, chamadas de D5-1-3 a D5-15-17 (Figura 16).

#### 4.1.2 CCA da fração D1-6c – COLUNA D6

A fração D1-6c (95,0 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão em resina Sephadex<sup>®</sup> LH-20, utilizando-se como eluente metanol. Obtiveram-se 20 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 7 frações, chamadas de D6-1 a D6-20 (Figura 16).

#### 4.1.3 CCA da fração D1-7 – COLUNA D7

A fração D1-7 (665,0 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de acetato de etila com proporções crescentes de metanol. Obtiveram-se 101 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 23 frações, chamadas de D7-1-5 a D7-101 (Figura 16).

#### 4.1.3.1 CCA da fração D7-6-7 – COLUNA D8

A fração D7-6-7 (26,8 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão em resina Sephadex<sup>®</sup> LH-20, utilizando-se como eluente metanol. Obtiveram-se 15 frações, que foram agrupadas em função da

sua semelhança cromatográfica em 7 frações, chamadas de D8-1 a D8-15 (Figura 16).

#### 4.1.3.2 CCA da fração D7-8-9 – COLUNA D9

A fração D7-8-9 (19,4 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão em resina Sephadex<sup>®</sup> LH-20, utilizando-se como eluente metanol. Obtiveram-se 23 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 7 frações, chamadas de D9-1-5 a D9-16-23 (Figura 16).

#### 4.1.3.3 CCA da fração D7-44-45 – COLUNA D10

A fração D7-44-45 (70,9 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão em resina Sephadex<sup>®</sup> LH-20, utilizando-se como eluente metanol. Obtiveram-se 16 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 5 frações, chamadas de D10-1-4 a D10-13-16 (Figura 16).

#### 4.1.4 CCA da fração D1-9 – COLUNA D11

A fração D1-9 (109,4 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de diclorometano com proporções crescentes de metanol. Obtiveram-se 130 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 17 frações, chamadas de D11-1-24 a D11-130 (Figura 16).

#### 4.1.5 CCA da fração D1-10 – COLUNA D12

A fração D1-10 (80,1 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão em resina Sephadex<sup>®</sup> LH-20, utilizando-se como eluente metanol. Obtiveram-se 74 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 12 frações, chamadas de D12-1 a D12-74 (Figura 16).

#### 4.1.6 CCA da fração D1-11 – COLUNA D13

A fração D1-9 (46,1 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de diclorometano com

proporções crescentes de metanol. Obtiveram-se 106 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 11 frações, chamadas de D13-1-15 a D13-106 (Figura 16).

#### 4.2 CLV DA FRAÇÃO D-12 – COLUNA D14

Uma alíquota da fração D-12 (8,5342 g) foi submetida à cromatografia líquida a vácuo. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de diclorometano com proporções crescentes de metanol. Obtiveram-se 14 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 9 frações, chamadas de D14-1 a D41-14 (Figura 17).

##### 4.2.1 CCA da fração D14-5 – COLUNA D15

A fração D14-5 (64,7 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de clorofórmio com proporções crescentes de metanol. Obtiveram-se 114 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 23 frações, chamadas de D15-1-6 a D15-112-114 (Figura 17).

##### 4.2.2 CCA da fração D14-6 – COLUNA D16

A fração D14-6 (158,7 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de clorofórmio com proporções crescentes de metanol. Obtiveram-se 150 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 14 frações, chamadas de D16-1-6 a D16-138-150 (Figura 17).

#### 4.3 CCA DA FRAÇÃO D-3 – COLUNA D17

Uma alíquota da fração D-3 (264,2 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de hexano com proporções crescentes de clorofórmio e posteriormente acetato de etila. Obtiveram-se 324 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 61 frações, chamadas de D17-1-19 a D17-322-324 (Figura 22).



#### 4.4 CCA DA FRAÇÃO D-4 – COLUNA D18

Uma alíquota da fração D-4 (302,0 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de hexano com proporções crescentes de clorofórmio e posteriormente acetato de etila. Obtiveram-se 230 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 44 frações, chamadas de D18-1-24 a D18-230 (Figura 18).

##### 4.4.1 CCA da fração D18-71-73 – COLUNA D19

A fração D18-71-73 (15,0 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão em resina Sephadex<sup>®</sup> LH-20, utilizando-se como eluente metanol. Obtiveram-se 10 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 6 frações, chamadas de D19-1-3 a D19-10 (Figura 18).

##### 4.4.2 CCA da fração D18-74-80 – COLUNA D20

A fração D18-74-80 (13,7 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão em resina Sephadex<sup>®</sup> LH-20, utilizando-se como eluente metanol. Obtiveram-se 14 frações, que foram agrupadas em função da sua semelhança cromatográfica em 7 frações, chamadas de D20-1-7 a D20-14 (Figura 18).

Figura 41. Fluxograma geral dos fracionamentos cromatográficos realizados com os extratos de *E. hiemalis*.

