

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

Andressa Gilioli

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
*Eugenia umbelliflora***

Florianópolis
2010

Andressa Gilioli

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Eugenia umbelliflora

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

G474a Gilioli, Andressa

Análise fitoquímica e atividade biológica de Eugenia umbelliflora (dissertação) / Andressa Gilioli ; orientadora, Inês Maria Costa Brighente. - Florianópolis, SC, 2010.

103 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Eugenia umbelliflora. 3. Investigação fitoquímica. 4. Atividade biológica. I. Brighente, Inês Maria Costa. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Andressa Gilioli

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Eugenia umbelliflora

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis-SC, 22 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Inês Maria Costa Briguento
(orientadora- UFSC)

Prof.^a Dr.^a Maique Weber Biviatti
(UFSC)

Prof.^o Dr.^o Miguel Soriano Balparda Caro
(UFSC)

Prof.^o Dr.^o Rosendo Augusto Yunes
(UFSC)

Dedico este trabalho àqueles que nesta vida tive o prazer de ter como pais.

AGRADECIMENTOS

Minha profunda gratidão aos meus pais e meu irmão, que sempre acreditaram em mim, por todos seus esforços para que o meu sonho pudesse se concretizar.

Em especial, a Professora Inês Maria Costa Brighente pela orientação, ensinamentos e amizade.

Ao professor Moacir Geraldo Pizzolatti por toda a sua ajuda.

A todo o grupo do laboratório de Química de Produtos Naturais: Ana Paula, Cristian, Gabriela, Guilherme, Gustavo, Henrique, Heros, Juliana, Leandro, Luciana e Tiago, pelo companheirismo. Em especial ao Gustavo e Guilherme que me auxiliaram na realização do ensaio de atividade alelopática.

Aos professores Eduardo Monguilhott Dalmarco, pela colaboração na realização dos ensaios de atividade antibacteriana, e Adair Roberto Soares Santos, pela colaboração na realização dos ensaios de atividade antiinflamatória.

Ao professor Gustavo Amadeu Micke e a Melina Heller, pelas análises por eletroforese capilar.

Aos inúmeros amigos que participaram nesta minha jornada, principalmente a Aline Maria Signori, Gabriele Bade e Josiane Budni.

Aos professores e funcionários da Central de Análises, em especial a Eliane, pela elaboração dos espectros.

Ao CNPq pelo suporte e apoio financeiro.

A todos que de maneira direta ou indireta, contribuíram para que esse trabalho se realizasse.

RESUMO

As espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) chamam a atenção pelo seu potencial terapêutico, apresentando atividade antiinflamatória, antibacteriana, citotóxica, antitumoral, hipoglicemiante, entre outros. Deste gênero foram isolados principalmente compostos fenólicos, além de compostos terpênicos. Porém a espécie *Eugenia umbelliflora*, conhecida popularmente como “bagaçu”, foi pouco estudada. Considerando o potencial terapêutico e os compostos descritos para o gênero, o objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico e biológico desta espécie. Para tal foi preparado o extrato bruto das folhas, e este foi submetido à partição, gerando frações de diferentes polaridades. O fracionamento cromatográfico destas frações levou ao isolamento dos triterpenos uvaol e eritrodiol, dos esteróis β -sitosterol e estigmasterol, e de dois flavonóides, quercetina e 7- hidroxí - 3', 4' dimetoxiflavonol, além de dois outros compostos cujas estruturas não foram totalmente elucidadas. A análise das frações acetato de etila e butanol, através de eletroforese capilar levou a caracterização dos flavonóides quercetina, mirecetina, canferol e eriodictiol. A atividade alelopática avaliada através da germinação de sementes de *L. sativa* mostrou que a fração diclorometano foi a amostra vegetal mais eficaz em inibir a germinação de sementes de alface. A atividade antibacteriana do extrato bruto, das frações e da mistura de triterpenos, foi avaliada contra quatro bactérias Gram-positivas (sendo uma delas resistente a metilicina) e seis bactérias Gram-negativas. Os melhores resultados foram obtidos para o extrato bruto, e para as frações hexano, diclorometano e acetato de etila, que mostraram atividade que variou de moderada a excelente contra todas as bactérias Gram-positivas testadas, particularmente no caso da MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a metilicina), onde a atividade antibacteriana foi considerada excelente. Já a mistura de triterpenos, uvaol e eritrodiol, isolada das frações hexano e acetato de etila, apresentou uma moderada atividade contra *Listeria monocytogenes*, sendo inativa para as demais bactérias. Somente o extrato bruto foi avaliado quanto a atividade anti-inflamatória, e este não demonstrou resultados relevantes. Os dados preliminares obtidos com esse trabalho levam a concluir que a espécie testada apresenta metabólitos secundários interessantes e grande potencial biológico, o que permite a continuação do estudo em várias frentes de trabalho.

Palavras chaves: *E. umbelliflora*, investigação fitoquímica e atividade biológica

ABSTRACT

The species of *Eugenia* (Myrtaceae) give attention for its therapeutic potential, showing promising results such as anti-inflammatory, antibacterial, cytotoxic, antitumor, hypoglycemic, and others. This genus have been isolated mainly phenolic compounds, and terpenes compounds. But the specie *Eugenia umbelliflora*, popularly known as "bagaçu", has been little studied. Considering the potential therapeutic and the compounds described for the genus, the objective of this study was the biological and phytochemical study of extracts. For this the crude extract of leaves was prepared and it was submitted to partitioning generating different polarities fractions. The chromatographic fractionation of the fractions led to the isolation of triterpenes uvaol and erythrodiol, of sterols, β -sitosterol and stigmasterol, and two flavonoids, quercetin and 7- hydroxy - 3', 4' dimetoxiflavanol, and two other compounds whose structures have not been fully elucidated. Analysis of ethyl acetate and butanol fractions by capillary electrophoresis led to characterization of the flavonoids quercetin, mirecetin, kaempferol and eriodictyol, showing that the flavonoid glycosides derived from these aglycones are present in those fractions analyzed. The allelopathic activity assessed by the germination of *L. sativa* showed that the dichloromethane fraction of the sample plant was more effective in inhibiting the lettuce seeds germination. The antibacterial activity of crude extract, fractions and mixture of triterpenes, was evaluated against four Gram-positive (one methicillin resistant) and six Gram-negative bacteria. The best results were obtained for the crude extract, and for the hexane, dichloromethane and ethyl acetate fractions, which showed activity that varied from moderate to excellent against all Gram-positive bacteria tested, particularly in the case of MRSA, where the antibacterial was considered excellent. Already a mixture of triterpenes, uvaol and erythrodiol, isolated from hexane and ethyl acetate fractions showed a moderate activity against *Listeria monocytogenes*, being inactive for the other Gram-positive and Gram-negative bacteria tested. Only crude extract was evaluated on anti-inflammatory effect, and it has not showed significant results. Preliminary dates obtained from this work lead to the conclusion that the specie tested has interesting secondary metabolites and biological potential, which allows the continuation of the study on several fronts.

Keywords: *E. umbelliflora*, phytochemical study, biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécies representantes da Família Myrtaceae.....	3
Figura 2. Espécies representantes do gênero <i>Eugenia</i>	4
Figura 3. Estrutura dos flavonóides encontrados em espécies do gênero <i>Eugenia</i>	12
Figura 4. Compostos fenólicos isolados de espécies do gênero <i>Eugenia</i>	13
Figura 5. Compostos terpênicos de espécies do gênero <i>Eugenia</i>	14
Figura 6. Continuação compostos terpênicos de espécies do gênero <i>Eugenia</i>	15
Figura 7. Compostos esteroidais de espécies do gênero <i>Eugenia</i>	16
Figura 8. <i>Eugenia umbelliflora</i>	17
Figura 9. Procedimento de fracionamento adotado para o extrato bruto.....	23
Figura 10. Fracionamento cromatográfico da fração insolúvel.....	25
Figura 11. Fracionamento cromatográfico da fração hexano.....	26
Figura 12. Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila.....	27
Figura 13. Fracionamento cromatográfico da fração butanol.....	28
Figura 14. Espectro de Infravermelho (KBr) de C1.....	35
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (acetona deuterada) de C1.....	36
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C (acetona deuterada) de C1.....	37
Figura 17. Espectro de Infravermelho (KBr) de M1.....	38
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) de M1.....	39
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H ampliado (CDCl_3) de M1.....	39
Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3) de M1.....	40
Figura 21. Estrutura dos triterpenos presentes em M1.....	42
Figura 22. Espectro de Infravermelho (KBr) de M2.....	43
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) de M2.....	43
Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3) de M2.....	44
Figura 25. Estrutura dos esteróis presentes em M2.....	45
Figura 26. Espectro de Infravermelho (KBr) de C2.....	46
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD /400MHz) de C2.....	47
Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD /100 MHz) de C2.....	48
Figura 29. Espectro de RMN ^1H (CD_3OD /100 MHz) com constantes de acoplamento (J) de M3.....	49
Figura 30. Estrutura dos flavonóides presentes em M3.....	50
Figura 31. Eletroferograma antes e após a hidrólise da fração acetato de etila.....	52
Figura 32. Eletroferograma antes e após a hidrólise da fração butanol.....	52

Figura 33. Espectros de UV dos flavonóides identificados.....	53
Figura 34. Eletroferograma e espectro de UV de M3.....	55
Figura 35. Velocidade de germinação de sementes de <i>L. sativa</i> na presença de extratos vegetais de <i>E. umbelliflora</i>	57
Figura 36. Comprimento da radícula (CR) e do hipocótilo (CH) de <i>L. sativa</i> na presença de extratos vegetais de <i>E. umbelliflora</i>	58
Figura 37. Efeito antinociceptivo do extrato bruto de <i>Eugenia umbelliflora</i> (30 - 300 mg/kg) administrado pela via oral em relação à primeira (A) e segunda (B) fase da nocicepção induzida pela formalina (2,5%) em camundongos. As barras representam a média de 5 a 7 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: * $p < 0,05$ comparados ao grupo controle (C) pelo teste de Newman-Keuls.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade biológica de extratos e compostos isolados de espécies do gênero <i>Eugenia</i>	5
Tabela 2. Compostos encontrados em espécies do gênero <i>Eugenia</i>	9
Tabela 3. Rendimento do extrato bruto de <i>Eugenia umbelliflora</i>	33
Tabela 4. Rendimento das frações obtidas a partir do extrato bruto de <i>Eugenia umbelliflora</i>	34
Tabela 5. Comparação dos valores dos deslocamentos de RMN ¹³ C do composto majoritário da mistura M1 (uvaol e eritrodiol) com valores descritos na literatura.....	41
Tabela 6. Comparação dos valores de deslocamentos de RMN ¹³ C dos esteróis que compõem a mistura M2 (□-sitosterol e estigmasterol) com valores descritos na literatura.....	45
Tabela 7. Figuras de mérito da análise de flavonóides em extratos de <i>Eugenia umbelliflora</i>	54
Tabela 8. Quantificação dos flavonóides nas frações acetato de etila e butanol obtidas a partir do fracionamento líquido do extrato bruto das folhas de <i>E. umbelliflora</i>	54
Tabela 9. Classificação de atividade antibacteriana para extratos vegetais e compostos isolados.....	60
Tabela 10. Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg.mL ⁻¹) de extratos, frações e uma mistura de triterpenos de <i>Eugenia umbelliflora</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
ATCC	American type culture collection
BuOH	Butanol
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	Correlation Spectroscopy
EB	Extrato Bruto
EtOH	Etanol
FA	Fração Aquosa
FAE	Fração Acetato de Etila
FB	Fração Butanol
FDCM	Fração Diclorometano
FH	Fração Hexano
Gent	Gentamicine
HEX	Hexano
<i>J</i>	Constante de acoplamento (Hz)
IV	Infravermelho
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina
P.F	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – 1
UV/VIS	Ultravioleta visível
Vanc	Vancomycin

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.2. ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO GÊNERO EUGENIA.....	5
2.3. EUGENIA UMBELLIFLORA BERG.....	16
3 OBJETIVOS.....	19
3.1. OBJETIVO GERAL.....	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4 METODOLOGIA.....	21
4.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	21
4.2. MATERIAL VEGETAL.....	22
4.3. ANÁLISE FITOQUÍMICA DE EUGENIA UMBELLIFLORA.....	22
4.3.1. Obtenção da cera epicuticular.....	22
4.3.2. Preparação do extrato bruto.....	22
4.3.3. Fracionamento do extrato bruto.....	23
4.3.3.1. Fracionamento da fração insolúvel.....	24
4.3.3.2. Fracionamento da fração hexano.....	25
4.3.3.3. Fracionamento da fração acetato de etila.....	26
4.3.3.4. Fracionamento da fração butanol.....	28
4.4. ANÁLISE DAS AMOSTRAS VEGETAIS POR ELETROFORESE CAPILAR.....	29
4.5. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	30
4.5.1. Atividade Alelopática.....	30
4.5.2. Atividade Antibacteriana.....	30
4.5.3. Atividade Antinociceptiva.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA DE EUGENIA UMBELLIFLORA.....	33
5.1.1. Obtenção da cera epicuticular.....	33
5.1.2. Preparação do extratobruto.....	33
5.1.3. Fracionamento do extrato bruto.....	33
5.1.3.1. Fracionamento da fração insolúvel.....	34
5.1.3.2. Fracionamento da fração hexano.....	37
5.1.2.3. Fracionamento da fração acetato de etila.....	42
5.1.2.4. Fracionamento da fração butanol.....	49
5.2. ANÁLISE DAS AMOSTRAS VEGETAIS DO POR ELETROFORESE CAPILAR.....	51
5.3. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	55

5.3.1. Atividade Alelopática.....	56
5.3.3. Atividade Antinociceptiva.....	62
6 CONCLUSÕES.....	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Entretanto, é o Reino Vegetal, através das plantas, que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos.

As plantas são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que aproximadamente 50% dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (GURIB-FAKIM, 2006). Embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma das principais alternativas de sucesso. Muitos metabólitos secundários se destacam como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos, comprovando que a parceria entre químicos medicinais e químicos de produtos naturais é fundamental para a descoberta de fármacos inovadores (BARREIRI e BOLZANI, 2009).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, sendo que sua flora corresponde a cerca de 20 % de todas as espécies conhecidas no mundo. Apesar disso, apenas 8 % das espécies vegetais da flora brasileira foi estudada em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais. A Família Myrtaceae é bastante interessante do ponto de vista químico e farmacológico, e muitas espécies desta família são utilizadas na medicina popular. As espécies do gênero *Eugenia*, um dos maiores gêneros desta família, chamam a atenção pelo seu potencial terapêutico, mostrando em vários estudos resultados promissores, como atividade antiinflamatória, antibacteriana, citotóxica e antitumoral. Deste gênero foram isolados principalmente compostos fenólicos, além de compostos terpênicos.

Levando em consideração o potencial terapêutico e os compostos já descritos para espécies do gênero *Eugenia*, teve-se neste trabalho o objetivo de realizar o estudo fitoquímico da espécie *Eugenia umbelliflora*, espécie pouco estudada ainda, com o intuito de contribuir para a elucidação das substâncias presentes nesta planta, além de avaliar os possíveis efeitos biológicos dos extratos, frações e compostos isolados da mesma.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Cerca de 100 gêneros pertencem a Família Myrtaceae, entre eles o gênero *Eugenia*. Esta é a maior família da ordem Myrtales, com dois centros de dispersão, nas Américas e na Austrália, embora ocorram em todo o mundo, pois são todas plantas tropicais ou subtropicais. A Família Myrtaceae compreende aproximadamente 3000 espécies, sendo que no Brasil existem cerca de 1000 espécies (SCHUTZ, 1980).

As espécies brasileiras da Família Myrtaceae caracteristicamente possuem o tronco de casca lisa, separando-se todo o ano o ritidoma, que se renova com cada estação de crescimento. Os gêneros mais importantes são *Psidium* (Goiabeira), *Myrciaria* (Araçá), *Marlierea* (Cambucá), *Campomanesia* (Guabiroba), *Paivaea* (Cambuci), *Syzigium* e *Eugenia* (Pitangueira), a qual pertence a espécie em estudo neste trabalho (Figura 1) (JOLY, 2002).



Figura 1. Espécies representantes da Família Myrtaceae.

2.1. ASPECTOS BOTÂNICOS DO GÊNERO *EUGENIA*

O gênero *Eugenia* possui cerca de 400 espécies (FONTENELLE; COSTA e MACHADO, 1994), sendo um dos maiores gêneros da família Myrtaceae (FISCHER et al., 2005). Distribui-se desde o Brasil até o norte e nordeste da Argentina, Uruguai e Paraguai (CONSOLINI, BALDINI e AMAT, 1999).

Segundo AURICCHIO E BACCHI (2003) as plantas do gênero *Eugenia* consistem em árvores ou arbustos verdes durante o ano todo. O fruto é esférico, geralmente comestível, uma baga de até 3 centímetros de diâmetro, coroado pelo cálice e achatado nas extremidades.

Muitas espécies do gênero *Eugenia* são apreciadas por seus frutos, que são usados como alimento (FISCHER et al., 2005), a exemplo de *Eugenia uniflora*, uma das espécies mais conhecidas do gênero, chamada popularmente de “pitangueira” (CONSOLINI, BALDINI e AMAT, 1999), *Eugenia edulis*, conhecida como jaboticaba, *Eugenia jambolana*, conhecida como jambolão, e *Eugenia brasiliensis*, conhecida como grumixama (Figura 2).



Eugenia jambolana
“jambolão”



Eugenia edulis
“jaboticaba”



Eugenia uniflora
“pitangueira”



Eugenia brasiliensis

Figura 2. Espécies representantes do gênero *Eugenia*.

2.2. ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO GÊNERO *EUGENIA*

As espécies do gênero *Eugenia* apresentam uma variedade de atividades biológicas, entre elas destacam-se a atividade antimicrobiana, antioxidante, antidiabética e antiinflamatória, que comprovam a eficácia do uso das plantas deste gênero na medicina popular. Um exemplo é *Eugenia jambolana*, conhecida como “jambolão”, que é utilizada na medicina popular para problemas estomacais, como diurético e antidiabético (TIMBOLA et al., 2002), e tem sido estudada extensivamente por seu potencial antioxidante e antidiabético (COUTINHO et al., 2009), sendo esta última a aplicação mais usada na medicina popular (PEPATO et al., 2005). *Eugenia uniflora* é outra espécie com uso na medicina popular, sendo utilizada como antihipertensiva, diurética e para distúrbios gástricos (CONSOLINI, BALDINI e AMAT, 1999). Já a espécie *Eugenia edulis*, conhecida popularmente como jaborcaba, é usada em inflamações e infecções (HUSSEIN et al., 2003), bronquites, coqueluches e tosses em geral (REVILLA, 2002).

Dentre as 400 espécies pertencentes ao gênero *Eugenia*, menos de 10 % foram estudadas quimicamente e biologicamente. As principais atividades de espécies do gênero *Eugenia* estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade biológica de extratos e compostos isolados de espécies do gênero *Eugenia*.

Espécie	Extrato/composto	Atividade	Referência
<i>Eugenia aromatica</i>	Eugenol (componente do óleo essencial)	Antibacteriana (bactérias Gram neg)	HEMAISWARAYA e DOBLE, 2009
<i>Eugenia beaurepaireana</i>	Óleo essencial	Antibacteriana	MAGINA et al., 2009
	Cera epicuticular	Antiinflamatória	MAGINA et al., 2009
<i>Eugenia brasiliensis</i>	Óleo essencial	Antibacteriana	MAGINA et al., 2009
	Extratos e compostos das folhas	Antiinflamatória	PIETROVSKI, et al., 2008
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Óleo essência	Acaricida	FICHI et al., 2007
	Óleo essência	Antibacteriana	OUSSALAH et al., 2006
	Extrato metanólico das flores	Antibacteriana contra <i>Helicobacter pylori</i>	LI et al., 2005
	Óleo essencial	Anticonvulsiva	POURGHOLAMI

	Óleo essencial	Antifúngica	et al., 1999 DZAMIC et al., 2009
	Eugenol	Antifúngica	AMIRI et al., 2008
	Óleo essencial e eugenol	Antifúngica	GAYOSO et al., 2005
	Oleo essencial	Antiinflamatória	ÖZTÜRK et al., 2005
	Extrato metanólico das cascas do caule	Antiinflamatória	HONG, 2003
	Botão floral	Antioxidante	JAYATHILAKAN et al., 2007
	Extratos aquoso e etanólico dos brotos	Antioxidante	GULÇIN et al., 2004
	Extratos do cortex e eugenol	Antitumoral	KIM et al., 2003
	Eugenol (componente do óleo essencial)	Citotóxica, indutora de radicais livres e apoptose e antitumoral	YOO et al., 2005
	Extrato metanólico das flores	Inseticida	YI et al., 2008
	Extrato metanólico dos brotos	Inseticida, e <i>antifeedant</i>	HAN, et al., 2006
<i>Eugenia caryophyllus</i>	Óleo essencial	Antibacteriana	OUSSALAH et al., 2007
<i>Eugenia dysenterica</i>	Óleo essencial das folhas	Antifúngica	COSTA et al., 2000
<i>Eugenia hyemalis</i>	Derivados da hidroquinona	Inibição do HIV-1 RNase H <i>in vitro</i>	BOKESCH et al., 2008
<i>Eugenia jambolana</i>	Extrato etanólico das cascas do caule	Antidiarréica	MUKHERJE et al., 1998
	Acido oleanólico isolado das flores	Antifertilidade	RAJASEKARAN et al., 1988
	Extrato etanólico e aquoso da polpa da fruta	Antihiperlicêmica e estimulante da liberação de insulina	SHARMA et al., 2006
	Extrato etanólico e aquoso das sementes	Antihiperlicêmica	GROVER et al., 2000
	Extrato etanólico das sementes	Antihiperlicêmica e antihiperlipidêmica	SHARMA et al., 2003
	Extratos aquoso e alcoólico dos frutos e sementes	Antihiperlicêmica e antihiperinsulinêmica	VIKRANT et al., 2001
	Extrato etanolico das sementes	Antihiperlipidêmica em ratos diabéticos	RAVI, et al., 2005
	Extrato das sementes rico em flavonóides	Antihiperlicêmico e antihiperlipidêmico	SHARMA et al., 2008
	Extrato etanólico das sementes	Hipoglicêmica	KAR et al., 2003
	Extrato etanólico das folhas	Antimicrobiana mediada por luz	COUTINHO et al., 2009
	Extrato hidroalcoólico	Antinociceptiva	VILA-PENÃ et al.,

	das folhas		2007
	Extratos das cascas	Antioxidante	SULTANA et al., 2007
	Extrato etanólico das sementes	Antioxidante	RAVI et al., 2004
	Extrato etanólico das sementes	Proteção gástrica e antioxidante	CHATUVERDI et al., 2007
	Extratos metanólico e diclorometano das folhas	Protetora do DNA exposto à radiação gama	JAGETIA e BALIGA 2002
	Extrato etanolico das sementes e frações	Inibição de α -glucosidase	SHINDE et al., 2008
<i>Eugenia jambos</i>	Extrato 70% acetona das folhas e taninos hidrolisáveis	Ação antitumoral em células HL-60 (leucemia) e SK-HEP-1	YANG et al., 2000
	Extrato metanólico das folhas	Antiinflamatória	SLOWING et al., 1994
<i>Eugenia malaccensis</i>	Extratos metanólico, aquoso e acetoneitrila das folhas e cascas	Anti-viral contra vírus da Herpes, antifúngica e antibacteriana	LOCHER et al., 1995
<i>Eugenia sandwicensis</i>	Extrato clorofórmico do caule, triterpenos β -sitosterol glicosilado e ácido gálico	Ação quimiopreventiva contra câncer de mama em ratas	GU et al., 2001
<i>Eugenia umbelliflora</i>	Extrato metanólico das folhas e frutos	Antibacteriana (bactérias Gram-pos)	MACHADO et al., 2005
	Óleo essencial	Antibacteriana	MAGINA et al., 2009
	Extrato metanólico das folhas	Proteção gástrica	MEYRE-SILVA et al., 2009
<i>Eugenia uniflora</i>	Infusão de folhas frescas	Antiinflamatória	SCHAPOVAL et al., 1994
	Extrato aquoso das folhas	Anti-hipertensivo, efeito inotrópico negativo, ação vasodilatadora e levemente diurética	CONSOLINI, BALDINI E AMAT, 1999
	Extrato aquoso das folhas	Efeito no coração devido a sua ação hipotensiva	CONSOLINI e SARUBIO, 2002
	Extrato metanólico dos frutos e antocianinas	Antioxidante	EINBOND et al., 2004
	Extratos e taninos (oenoteina B, eugeniflorins D1 e D2) e galocatequina	Inibição do DNA do vírus relacionado à gênese de tumores, como o nasofaríngeo	LEE et al., 2000
	Flavonóides (quercetina, quercitrina, miricetina e miricitrina)	Inibidora da enzima xantina oxidase, relacionada à artrite	SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987
	Extratos n-hexano, acetato de etila, clorofórmico e metanólico das folhas e	Tripanomicida	ADEWUNMI et al., 2001

frações		
Óleo essencial das folhas e frutos	Citotóxica	OGUNWANDE et al., 2005
Extratos das folhas	Antihiperglicêmica e antihipertrigliceridêmica	ARAI et al., 1999
Extrato metanólico das partes aéreas	Antimicrobiana	SOUZA et al., 2004

De um modo geral, os compostos que mais se destacam nas espécies do gênero *Eugenia* são os flavonóides e triterpenóides, sendo também encontrados chalconas e taninos.

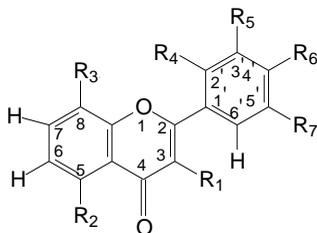
Este gênero é bastante rico em compostos fenólicos, como taninos e flavonóides. O alto conteúdo de compostos fenólicos confere as espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* uma grande atividade antioxidante (EINBOND et al., 2004). Taninos hidrolisáveis foram isolados de *E. caryophyllata* ou cravo-da-india (TANAKA et al., 1996), de *Eugenia uniflora* (LEE et al., 1997) e de *Eugenia jambos* de onde foi isolado a casuarinina do extrato acetônico das folhas (YANG, LEE E YEN, 2000). Entre os flavonóides, na forma de glicosídeo ou na forma livre, observa-se uma predominância do núcleo flavonol poliidroxilado, sendo que as agliconas de flavonóides que aparecem em maior expressão são a quercetina e miricetina. Outras agliconas com o núcleo flavonol também podem ser encontradas, como o canferol, gossipetina e mearnsetina. Na Tabela 2 é apresentada uma panorâmica dos flavonóides presentes em espécies do gênero *Eugenia*, e as suas estruturas são representadas na Figura 3, onde é apresentado o núcleo aglicona e as demais substituições. Na Figura 4 são representadas as estruturas de diferentes classes de compostos fenólicos encontradas em espécies do gênero *Eugenia*.

Além de compostos fenólicos, foram descritos para o gênero *Eugenia* compostos derivados do metabolismo dos terpenos, como os triterpenos e esteróides. Os triterpenos pentacíclicos com o esqueleto lupano, oleanano e ursano se destacam entre estes compostos. Os compostos derivados de terpenos presentes no gênero *Eugenia* são apresentados na Tabela 2 e nas Figuras 5, 6 e 7.

Tabela 2. Compostos encontrados em espécies do gênero *Eugenia*

Espécie	Fenólicos e Terpenóides	Referência
<i>Eugenia brasiliensis</i>	ácido ursólico [1] delfinidina 3-O-□-glicosídeo [2], ácido elágico [3], rutina [4]	FRIGHETTO et al., 2005 REYNERTSON et al., 2008
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Cromonas polioxigenadas C-glicosídeas: isobiflorina [5] e biflorin [6]	ZHANG e CHEN 1997
<i>Eugenia edulis</i>	gossipetina-3,8-dimetiléter-5-O-β-glicosídeo [7], gossipetina-3,5-dimetiléter [8], miricetina-3,5,3'-trimetiléter [9], ácido gálico [10]; ácido protocatequico [11]; epi-galocatequina-3-O-galato [12]; quercetina-3-O-β-galactosídeo [13]; quercetina-3-O-β-(6''-galoilglicosídeo) [14]; quercetina-3-O-α-arabinofuranosídeo [15]; canferol-3-O-α-arabinofuranosídeo [16]; miricetina-3-O-α-ramnosídeo (miricitrina) [17]; e quercetina [18]	HUSSEIN et al., 2003
<i>Eugenia hymalis</i>	3 novos galoil arbutins, 2-O-galoilarbutin, 4-O-galoilarbutin, 2,6-di-O-galoilarbutin, 2,4,6-tri-O-galoilarbutin, 1,2,6-tri-O-galoil-β-D-glucose, camferol- 3-O-(6-O-galoil-β-D-glucopiranosídeo) [19], afzelina 2''-O-galato, afzelina 3''-O-galato, e quercitrina [20].	BOKESCH et al., 2008
<i>Eugenia jambolana</i>	miricetina-3-O-(4''-acetil)-α-L-ramnopiranosídeo [21], quercetina, miricetina [22] e miricitrina. mearnsetina-3-O-(4''-O-acetil)-α-L-ramnopiranosídeo [23] e miricetina-3-O-(4''-O-acetil-2''-O-galoil)-α-L-ramnopiranosídeo [24], além de ácido gálico, galato de metila, canferol [25], miricetina, ácido elágico, ácido 3-O-metilelágico, miricitrina-4''-O-acetil [26], miricetina 4'-metil eter 3-O-α-L-ramnopiranosídeo [27], miricitrina, ácido clorogênico [28], quercetrina 4''-O-acetate [29], canferol 3-O-β-D-glucuronopiranosídeo [30], quercetina 3-O-α-L-ramnopiranosídeo, miricetina 3-O-β-D-glucuronopiranosídeo [31] e um elagitanino (nilocitin) [32]	TIMBOLA et al., 2002 MAHMOUD et al., 2001
<i>Eugenia jambos</i>	Casuarinina [33] e 1-O-galoil castalagina quercetina-3-O-β-D-xilopiranosil [34] e miricetina-3-O-β-D-xilopiranosil [35]	YANG et al., 2000 SLOWING et al., 1994
<i>Eugenia javanica</i>	mearnsetrina [36] e 2'-C-metil-5'-O-galoilmiricetina-3-O-α-L-ramnopiranosídeo [37] 4',6'-dihidroxi-2'-metoxi-3'',5'-dimetilchalcona [38], 3-epi-betulinato de metila [39] além de ácido ursólico, ácido jacumárico [40] e ácido	NAIR et al., 1999 SRIVASTAVA et al., 1995

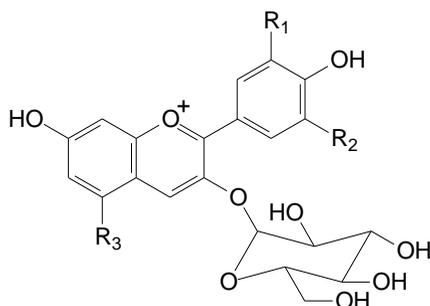
	arjunólico [41] 2,4-dihidroxi-3,5-dimetil-6-metoxichalcona, 2,4-dihidroxi-3-metil-6-metoxichalcona [42], 2,4-dihidroxi-6-metoxichalcona [43], reinoutrin [44], hiperina [45], miricitrina, quercitrina, quercetina, guaijaverina [46], (S)-pinocembrin [47], ácido gálico e ácido elágico	SIMIRGIOTIS et al., 2008
<i>Eugenia kurzii</i>	3- <i>C</i> -metil-apigenina-5- <i>O</i> -ramnosídeo [48] e 3- <i>C</i> -metil-luteolina-5- <i>O</i> -ramnosídeo [49]	PAINULY E TANDON, 1983
<i>Eugenia myrtifolia</i>	malvidina 3,5- <i>O</i> -diglucosídeo [50]	LONGO et al 2007
<i>Eugenia moraviana</i>	ácido 6 α -hidroxibetulínico [51], ácido platânico [52], ácido betulínico [53], e o β -sitosterol [54]	LUNARDI et al., 2001
<i>Eugenia sandwicensis</i>	Acido 3 β -cis- <i>p</i> -cumaroiloxi-2 α ,23-dihidroxiolean-12-en-28-óico [55], ácido 3 β -trans- <i>p</i> -cumaroiloxi-2 α ,23-dihidroxiolean-12-en-28-óico [56], ácido 23-trans- <i>p</i> -cumaroiloxi-2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-óico [57], ácido alfitólico [58], ácido arjunólico, ácido betulínico, ácido 2 α ,3 α -dihidroxilup-20(29)-en-28-óico [59], ácido 3 β ,23-dihidroxilup-20(29)-en-28-óico [60], hederagenina [61], ácido maslínico [62], β -sitosteril 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosídeo [63] e siringaldeído [64], além de ácido gálico	GU et al., 2001
<i>Eugenia umbelliflora</i>	cianidina-3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo e delfinidina-3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo, petunidina-3- <i>O</i> -glucopiranosídeo [65], pelargonidina-3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo [66], peonidina-3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo [67] e malvidina-3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo [68] Taraxerol [69], alfa-amirina [70], beta-amirina [71], betulina [72] e acido betulínico, e acido trimetoxi elágico	KUSKOSKI et al., 2003 MEYRE-SILVA et al., 2009
<i>Eugenia uniflora</i>	licopeno, seguido de rubixantina, <i>cis</i> -rubixantina, β -criptoxantina, <i>cis</i> -licopeno, β -caroteno, γ -caroteno, zeaxantina, luteína, violaxantina e β -caroteno-5,6-epóxido cianidina-3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo [73] e delfinidina-3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo Galocatequina, oenoteína B, eugeniflorins D1 e D2 Eugeniflorins D1 e D2, oenoteína, 1,2,4,6-tetra- <i>O</i> -galoil- β - <i>D</i> -glicose, e galocatequina e miricitrina ácido oleanólico [74] Quercetina, quercitrina, miricetina e miricitrina	AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2004 EINBOND et al., 2004 LEE et al., 2000 LEE et al., 1997 RAJASEKARAN et al., 1988 SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987



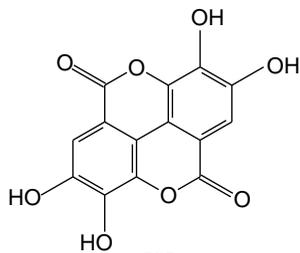
Compostos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
canferol							
[16]	<i>O</i> -Ara	OH	H	H	H	OH	H
[19]	<i>O</i> -Glu(6- <i>O</i> -galoil)	OH	H	H	H	OH	H
[25]	OH	OH	H	H	H	OH	H
[30]	<i>O</i> -Glu	OH	H	H	H	OH	H
gossipetina							
[7]	OCH ₃	<i>O</i> -Glc	OCH ₃	H	H	OH	OH
[8]	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H	OH	OH
mearnsetina							
[23]	<i>O</i> -Rha(4''- <i>O</i> -acetil)	OH	H	H	OH	OCH ₃	OH
[36]	<i>O</i> -Rha	OH	H	H	OH	OCH ₃	OH
miricetina							
[9]	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH	OH
[17]	<i>O</i> -Rha	OH	H	H	OH	OH	OH
[21]	<i>O</i> -Rha(4''- <i>O</i> -acetil)	OH	H	H	OH	OH	OH
[22]	OH	OH	H	H	OH	OH	OH
[24]	<i>O</i> -Rha(4''- <i>O</i> -acetil-2''- <i>O</i> -galoil)	OH	H	H	OH	OH	OH
[26]	<i>O</i> -Rha(4''- <i>O</i> -acetil)	OH	H	H	OH	OH	OH
[27]	<i>O</i> -Rha	OH	H	H	OH	OCH ₃	OH
[31]	<i>O</i> -Glu	OH	H	H	OH	OH	OH
[35]	<i>O</i> -Xyl	OH	H	H	OH	OH	OH
[37]	<i>O</i> -Rha	OH	H	CH ₃	OH	OH	<i>O</i> -galoil
quercetina							
[13]	<i>O</i> -Gal	OH	H	H	OH	OH	H
[14]	<i>O</i> -β-(6''-galoil)glc	OH	H	H	OH	OH	H
[15]	<i>O</i> -Ara	OH	H	H	OH	OH	H
[18]	OH	OH	H	H	OH	OH	H
[20]	<i>O</i> -Rha	OH	H	H	OH	OH	H
[29]	<i>O</i> -Rha(4''- <i>O</i> -acetato)	OH	H	H	OH	OH	H
[34]	<i>O</i> -Xyl	OH	H	H	OH	OH	H

[44]	<i>O</i> -Xyl	OH	H	H	OH	OH	H
[45]	<i>O</i> -Gal	OH	H	H	OH	OH	H
[46]	<i>O</i> -Ara	OH	H	H	OH	OH	H
[48]	CH ₃	<i>O</i> -Rha	H	H	H	OH	H
[49]	CH ₃	<i>O</i> -Rha	H	H	OH	OH	H
[4]	<i>O</i> -Glc(6''-1'''-Rha)	OH	H	H	H	OH	OH

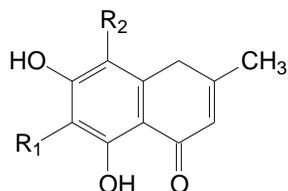
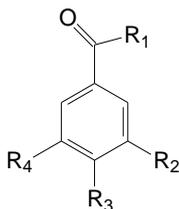
Figura 3. Estrutura dos flavonóides encontrados em espécies do gênero *Eugenia*.



- [2] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH
 [50] R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = O-Gli
 [73] R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = OH
 [65] R₁ = OCH₃, R₂ = OH, R₃ = OH
 [66] R₁ = H, R₂ = H, R₃ = OH
 [67] R₁ = OCH₃, R₂ = H, R₃ = OH
 [68] R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = OH

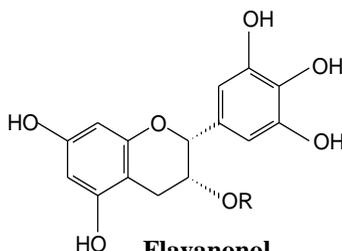


[3]



Cromonas

- [5] R₁ = H, R₂ = Glc
 [6] R₁ = Glc, R₂ = H

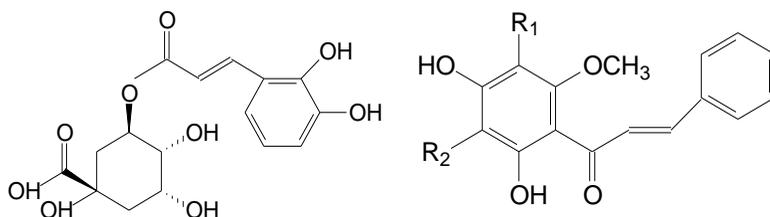


Flavanonol

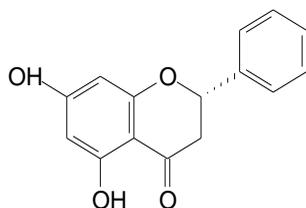
- [12] R = galato

Ácidos fenólicos e derivados

- [10] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = OH
 [11] R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄



[28]

Chalconas[38] $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$ [42] $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$ [43] $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$ **Flavanona**

[47]

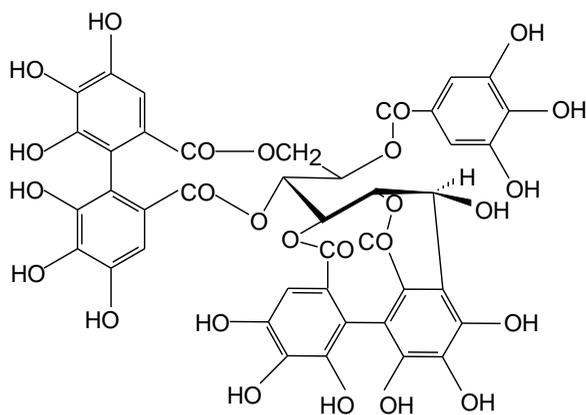
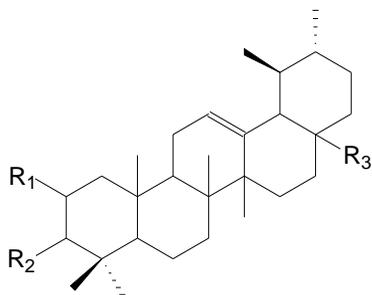
**Tanino [33]**

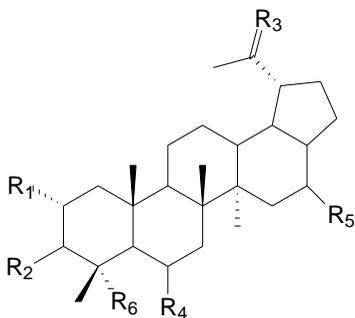
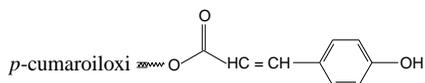
Figura 4. Compostos fenólicos isolados de espécies do gênero *Eugenia*.



[1] R₁ = H, R₂ = βOH, R₃ = COOH

[40] R₁ = OH, R₂ = *trans-p*-cumaroiloxi, R₃ = COOH

[71] R₁ = H, R₂ = β OH, R₃ = CH₃



[39] R₁ = H, R₂ = αOH, R₃ = CH₂, R₄ = H, R₅ = COOCH₃, R₆ = CH₃

[51] R₁ = H, R₂ = βOH, R₃ = CH₂, R₄ = OH, R₅ = COOH, R₆ = CH₃

[52] R₁ = H, R₂ = βOH, R₃ = O, R₄ = H, R₅ = COOH, R₆ = CH₃

[53] R₁ = H, R₂ = βOH, R₃ = CH₂, R₄ = H, R₅ = COOH, R₆ = CH₃

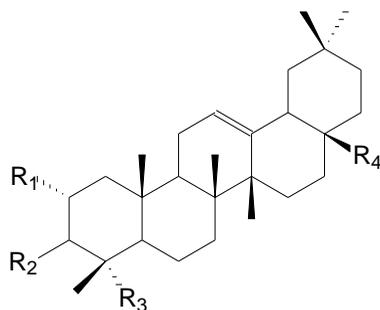
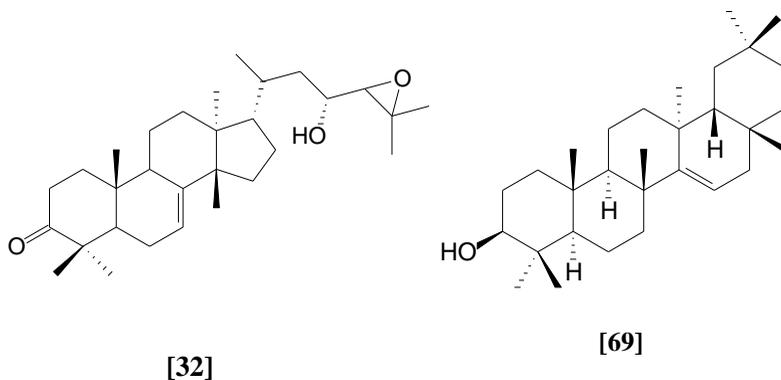
[58] R₁ = OH, R₂ = βOH, R₃ = CH₂, R₄ = H, R₅ = COOH, R₆ = CH₃

[59] R₁ = OH, R₂ = αOH, R₃ = CH₂, R₄ = H, R₅ = COOH, R₆ = CH₃

[60] R₁ = H, R₂ = βOH, R₃ = CH₂, R₄ = H, R₅ = COOH, R₆ = CH₂OH

[72] R₁ = H, R₂ = αOH, R₃ = CH₂, R₄ = H, R₅ = CH₂OH, R₆ = CH₃

Figura 5. Compostos terpênicos de espécies do gênero *Eugenia*.



[41] $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \beta\text{OH}$,

[74] $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \beta\text{OH}$,

[70] $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \square\text{OH}$,

[55] $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{cis-}p\text{-cumaroiloxi}$,

[56] $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{trans-}p\text{-cumaroiloxi}$,

[57] $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \beta\text{OH}$,

[61] $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \beta\text{OH}$,

[62] $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \beta\text{OH}$,

$R_3 = \text{CH}_2\text{OH}$, $R_4 = \text{COOH}$

$R_3 = \text{CH}_3$, $R_4 = \text{COOH}$

$R_3 = \text{CH}_3$, $R_4 = \text{CH}_3$

$R_3 = \text{CH}_2\text{OH}$, $R_4 = \text{COOH}$

$R_3 = \text{CH}_2\text{OH}$, $R_4 = \text{COOH}$

$R_3 = \text{trans-}p\text{-cumaroiloxi}$, $R_4 = \text{COOH}$

$R_3 = \text{CH}_2\text{OH}$, $R_4 = \text{COOH}$

$R_3 = \text{CH}_3$, $R_4 = \text{COOH}$

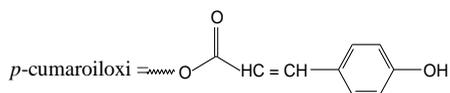
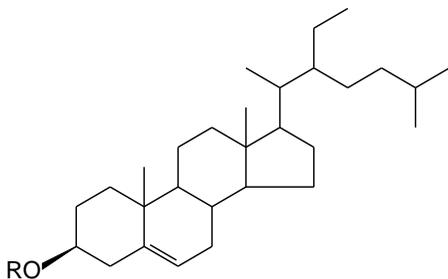


Figura 6. Continuação compostos terpênicos de espécies do gênero *Eugenia*.



[54] R = H

[63] R = Glicose

Figura 7. Compostos esteroidais de espécies do gênero *Eugenia*.

2.3. *EUGENIA UMBELLIFLORA* BERG

Eugenia umbelliflora Berg., tem como nome popular baguaçu, guapê e guamirim. É uma árvore que cresce nas matas do sudeste do Brasil. Na ilha de Santa Catarina muitas vezes é popularmente chamada de “biguaçu” (KUSKOSKI, 2000).

Eugenia umbelliflora tem a seguinte classificação taxonômica: REVILLA (2002),

REINO	Plantae
CLASSE	Magnoliopsida
SUBCLASSE	Rosidae
ORDEM	Myrtales
FAMÍLIA	Myrtaceae
SUBFAMÍLIA	Mytoideae
TRIBO	Myrtae
SUBTRIBO	Eugeniinae
GÊNERO	<i>Eugenia</i>
ESPÉCIE	<i>Eugenia umbelliflora</i> Berg.

Baguaçu é um arbusto ou uma pequena árvore de 3 a 10 metros de altura, de tronco fino, geralmente um pouco tortuoso, casca quase lisa e

clara, ramagem densa formando copa arredondada e espessa (Figura 8). Apresenta folhas verdes opacas, robustas, ovais e largas, igualmente atenuadas para ambos os extremos, de 7,5 a 9,0 cm de comprimento por 2,3 a 4,5 de largura. Os frutos são ovais, de 1 cm ou mais, coroados pelos pequenos sépalos, similares à cerejas, com coloração na casca verde quando imaturos e vermelho-escuro quando maduros e polpa verde-translúcida. Floresce durante os meses de fevereiro, março e abril, e seus frutos estão maduros de julho a outubro (REITZ e KLEIN, 1969).

É nativa do Brasil, típica de dunas fixas e dos terrenos baixos, menos enxutos, bastante planos e arenosos, forma frequentemente agrupamentos muito típicos e muitas vezes densos. É exclusiva da restinga litorânea de Santa Catarina, é encontrada desde o extremo norte, até a altura do Campo de Maciambu, município de Palhoça, indo daí para o Sul do estado. (REITZ e KLEIN, 1969).



Figura 8. *Eugenia umbelliflora*.

Existem poucas referências na literatura a respeito desta planta. Dos frutos desta espécie foi relatada a presença de antocianinas (KUSKOSKI et al., 2003). O óleo essencial das folhas também foi estudado, mostrando um alto teor de α -pineno (24,7%) e β -pineno (23,5%) (APEL et al., 2002). No entanto, em estudo mais recente do

óleo essencial das folhas mostrou que o sesquiterpeno viridiflorol foi o composto encontrado em maior quantidade (17,7%), seguido dos monoterpenos α -pineno (13,2%) e β -pineno (11,2%), diferindo do estudo anterior, onde os monoterpenos foram encontrados em maior quantidade (MAGINA et al., 2009a).

Estudos fitoquímicos com as folhas de *Eugenia umbelliflora* resultaram no isolamento dos triterpenos taraxerol, α -amirina, β -amirina, betulina e ácido betulínico, e ácido trimetoxi elágico dos frutos (MEYRE-SILVA et al., 2009).

Extratos metanólicos das folhas e frutos desta espécie mostraram promissora atividade contra microorganismos gram-positivos, como *Staphylococcus aureus* (MACHADO et al., 2005). Também foi verificada uma potente atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* para o óleo essencial de *E. umbelliflora*, além de uma atividade significativa contra as bactérias *P. aeruginosa* e *E. coli* (MAGINA et al., 2009a). O extrato metanólico das folhas também apresentou atividade de proteção gástrica, demonstrada por uma significativa inibição da formação de úlceras em diferentes modelos, provavelmente devido aos triterpenos isolados das folhas (MEYRE-SILVA et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo fitoquímico da espécie *Eugenia umbelliflora*, juntamente com a avaliação de possíveis atividades biológicas do extrato, frações e compostos isolados da espécie estudada.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar a espécie para o trabalho e realizar sua identificação.
- Obter a cera epicuticular das folhas de *E. umbelliflora*.
- Obter o extrato bruto das folhas da espécie.
- Fracionar o extrato bruto através de particionamento líquido-líquido.
- Isolar, através de métodos cromatográficos, metabólitos secundários presentes na espécie selecionada.
- Identificar os metabólitos isolados através de técnicas espectroscópicas como, espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono.
- Caracterizar os metabólitos secundários presentes no extrato bruto e frações por eletroforese capilar.
- Avaliar o potencial antibacteriano do extrato bruto, frações e compostos isolados contra diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
- Submeter o extrato e frações a testes de atividade antiinflamatória tópica.
- Submeter o extrato bruto, frações e a cera epicuticular a teste de atividade alelopática.

4 METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os solventes utilizados na obtenção do extrato bruto e da cera epicuticular, partição líquido-líquido do extrato bruto, cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada (CCD) foram de grau analítico PA.

As frações obtidas por particionamento líquido-líquido foram submetidas aos procedimentos de fracionamento por cromatografia em coluna (CC) utilizando-se como fase estacionária sílica gel 0,063 - 0,2 *mesh* para CC normal e 0,04 - 0,063 *mesh* para cromatografia em coluna flash.

As frações e compostos obtidos foram analisados através de CCD, utilizando-se placas de alumínio recobertas por sílica gel 60 GF254, de marca Merck, com 0,25 mm de espessura e partículas entre 5 a 40 μm de diâmetro. As substâncias separadas nas placas cromatográficas foram visualizadas utilizando vários métodos: revelação em câmara de iodo, revelação com reagente de cloreto férrico 5% em etanol, com sulfato cério e com reagente anisaldeído-sulfúrico seguido de aquecimento a 110 °C.

Para a concentração dos extratos e das frações foi utilizado o evaporador rotatório a vácuo Fisatom, sob temperatura inferior a 60 °C.

O ponto de fusão dos compostos isolados foi determinado em aparelho digital Micro Química MQA PF – 301. Para a obtenção dos espectros das substâncias na região do infravermelho (IV) utilizou-se um espectrômetro Perkin Elmer FTIR 16 PC usando pastilhas comprimidas de KBr. Os valores foram registrados em centímetros⁻¹ (cm^{-1}). Os espectros de ressonância magnética de hidrogênio e de carbono 13 foram obtidos em espectrofotômetros Varian AS-400, operando em 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C. Os deslocamentos químicos foram registrados em valores adimensionais δ (ppm), tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os registros de constantes de acoplamento foram feitos em Hertz (Hz), e a multiplicidade dos sinais foi indicada como segue: s = simpleto, d = duplete, t = tripleto e m = mutipleteo.

Para o teste de germinação de sementes utilizou-se estufa com fotoperíodo (12h claro / 12h escuro) a 25°C. As sementes de *Lactuca sativa* (alface) foram adquiridas comercialmente em lojas agropecuárias.

4.2. MATERIAL VEGETAL

O material vegetal – folhas de *Eugenia umbelliflora* - foi coletado nas imediações do campus da UFSC, em março de 2008.

As amostras foram identificadas pelo Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg, Departamento de Botânica, UFSC. A exsicata foi depositada no herbário FLOR, no Departamento de Botânica, UFSC, sob os números FLOR –17890.

As folhas secas em estufa e moídas foram destinadas à obtenção do extrato bruto hidroalcoólico e as folhas íntegras recém colhidas foram reservadas para a extração da cera epicuticular, ainda com o material fresco.

4.3. ANÁLISE FITOQUÍMICA DE *EUGENIA UMBELLIFLORA*

4.3.1. Obtenção da cera epicuticular

Para obtenção da cera epicuticular, folhas recém coletadas da espécie vegetal foram submersas em hexano por 5 minutos. Após filtração, o solvente foi evaporado em rotaevaporador, obtendo-se a cera epicuticular.

4.3.2. Preparação do extrato bruto

As folhas destinadas à obtenção do extrato bruto foram submetidas à secagem à 50° C em estufa com circulação de ar. Após a secagem, o material foi moído em moinho de facas.

As folhas secas e moídas de *Eugenia umbelliflora* (1,793 Kg) foram maceradas em etanol 70 % durante 7 dias. O extrato obtido foi filtrado e o solvente extrator evaporado em rota-evaporador (60°C) com condensador acoplado sob vácuo, sendo concentrado até seu volume ser

reduzido em 1/3 do volume inicial, de forma que o solvente evaporado fosse recuperado e posteriormente reutilizado para nova maceração. Este mesmo procedimento foi realizado por mais duas vezes. Os extratos resultantes das três macerações foram então reunidos, resultando no final das extrações em 270 g de extrato bruto seco.

Este extrato foi encaminhado para o procedimento de fracionamento líquido-líquido pra obtenção das frações.

4.3.3. Fracionamento do extrato bruto

O extrato bruto (270 g) foi ressuspensionado em água e deixado em repouso na geladeira por 7 dias. Através deste processo foi obtido um precipitado que foi chamado de fração insolúvel. Após o precipitado ser separado, através de filtração, este extrato foi então fracionado através de partição líquido-líquido por solventes de diferentes polaridades, como hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, segundo o esquema demonstrado na Figura 9, para dar origem a frações de polaridade diferentes.

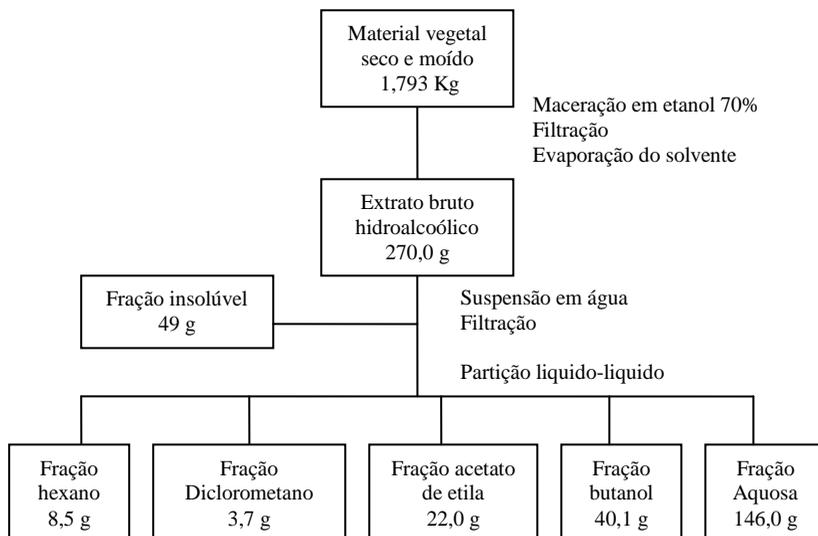


Figura 9. Procedimento de fracionamento adotado para o extrato bruto.

Após o particionamento líquido-líquido do extrato bruto, as frações obtidas neste processo foram concentradas em rota-evaporador sob pressão reduzida até a completa eliminação do solvente, sendo determinados seus rendimentos. O extrato bruto e as frações obtidas foram encaminhados para a avaliação de suas atividades biológicas.

A fração insolúvel e as frações hexano, acetato de etila e butanol, obtidas na partição, foram submetidas às técnicas de cromatografia em coluna, empregando como eluentes misturas de solventes de grau crescente de polaridade, sendo geralmente misturas de hexano:acetato de etila e acetato de etila:etanol.

As frações obtidas das colunas foram analisadas através de cromatografia em camada delgada (CCD), e agrupadas após avaliação de seus índices de retenção (Rf), suas características após a exposição em radiação ultravioleta e coloração após pulverização com reveladores como anisaldeído sulfúrico, sulfato de cério, cloreto férrico e vapores de iodo. As frações agrupadas foram novamente submetidas à cromatografia em coluna, quando necessário, para a obtenção de compostos isolados.

A determinação estrutural dos compostos isolados obtidos se deu através da identificação de características físicas, como o ponto de fusão e do uso de técnicas espectroscópicas, como infravermelho (IV), ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e técnicas como DEPT, HETCOR e COSY. No caso de substâncias não inéditas, o uso de padrões cromatográficos, em cromatografia em camada delgada ou eletroforese capilar, bem como a consulta à literatura para comparação de dados espectroscópicos auxiliou na identificação.

4.3.3.1. Fracionamento da fração insolúvel

A fração insolúvel (42,39 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel. Como fase móvel, iniciou-se a coluna com 100% de hexano, aumentando gradativamente a polaridade do solvente através da adição de acetato de etila e etanol, até a polaridade de 100 % de etanol. Desta coluna foram coletadas 48 frações de 100 mL cada, que depois de evaporadas foram comparadas via cromatografia em camada delgada, e reunidas quando similares (Figura 10).

As frações reunidas 8-9 e 15-33 foram recromatografadas. A fração 8-9 (1,0 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel, sendo eluída com 100% de hexano, aumentando gradativamente a polaridade do solvente através da adição de acetato de etila, até a polaridade de 100 % de acetato de etila. Desta coluna não foi obtido nenhum precipitado. A fração 15-33 (1,58 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel, sendo eluída com 100% de hexano, aumentando gradativamente a polaridade do solvente através da adição de acetato de etila, até a polaridade de 100 % de acetato de etila. Desta coluna foram coletadas 57 frações, sendo que da fração 18 a 23 foi obtido um precipitado branco denominado de **C1**.

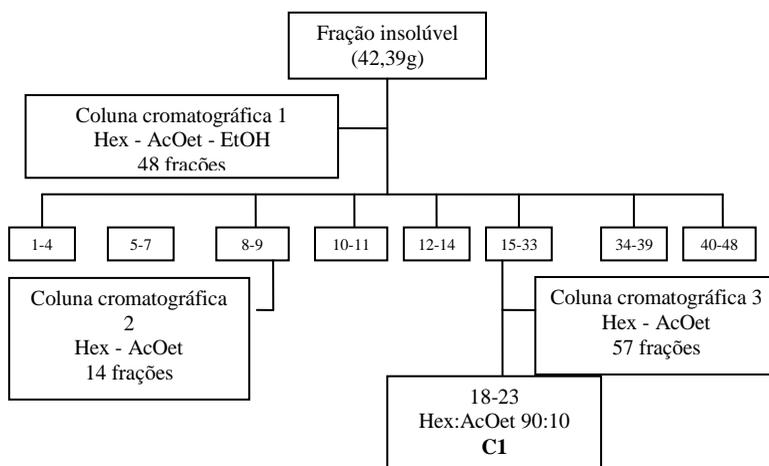


Figura 10. Fracionamento cromatográfico da fração insolúvel.

4.3.3.2. Fracionamento da fração hexano

A fração hexano (4,15 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel. Como fase móvel, iniciou-se a coluna com 100% de hexano, aumentando gradativamente a polaridade do solvente através da adição de acetato de etila, até a polaridade de 100 % de acetato de etila. Desta coluna foram coletadas 34 frações de 100 mL cada, que depois de evaporadas foram comparadas via cromatografia em camada delgada, e reunidas quando similares (Figura 11).

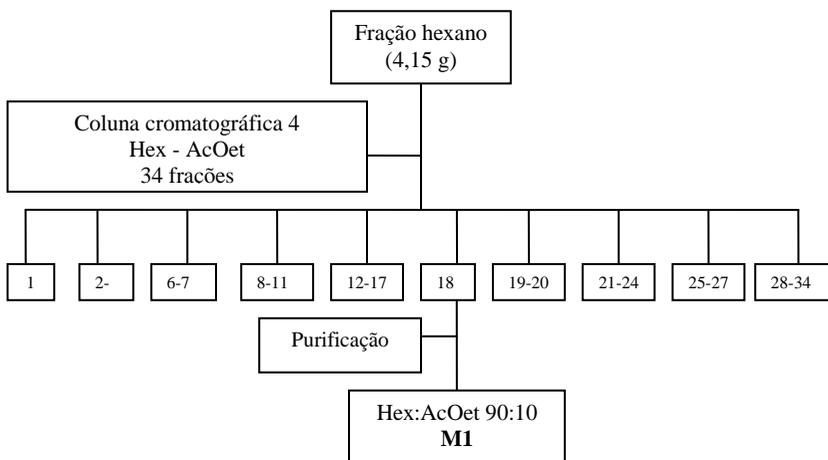


Figura 11. Fracionamento cromatográfico da fração hexano.

A fração 18 após purificada resultou no isolamento de uma mistura de dois triterpenos, e foi denominada de **M1**. Essa mistura de compostos eluiu na proporção de Hex/AcOEt 90:10.

4.3.3.3. Fracionamento da fração acetato de etila

A fração acetato de etila (20,0 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel. Iniciou-se a coluna com 100% de hexano, aumentando gradativamente a polaridade do solvente através da adição de acetato de etila e etanol, até a polaridade de 100 % de etanol. Desta coluna foram coletadas 44 frações de 100 mL cada, que depois de evaporadas foram comparadas via cromatografia em camada delgada, e reunidas quando similares (Figura 12).

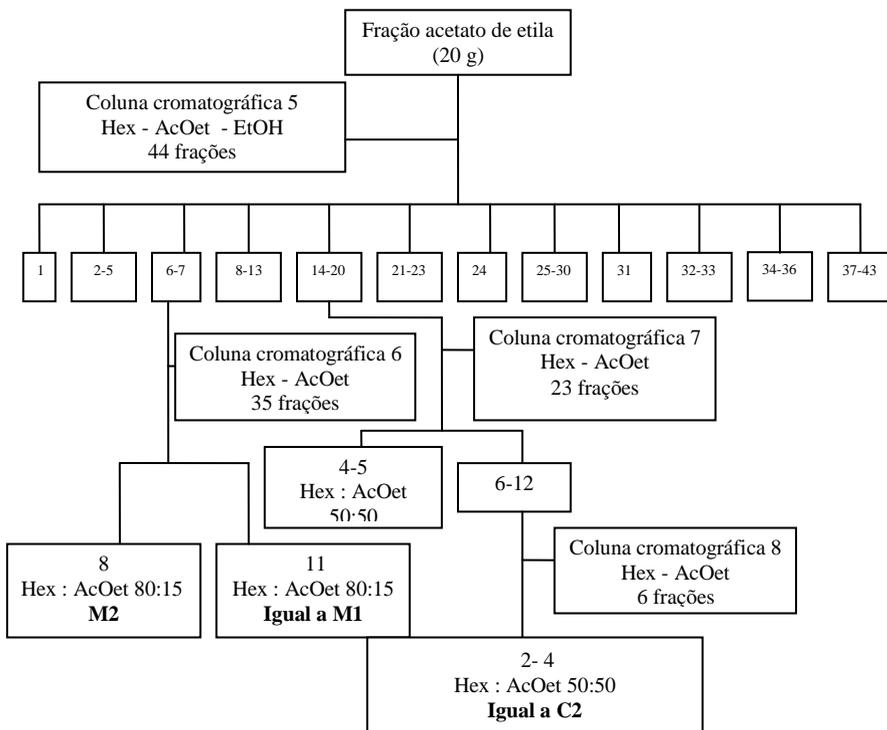


Figura 12. Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila.

As frações reunidas 6-7 e 14-20 foram recromatografadas em coluna de sílica gel, sendo eluídas com 100% de hexano, aumentando gradativamente a polaridade do solvente através da adição de acetato de etila, até a polaridade de 100 % de acetato de etila. Da coluna das frações 6-7 foram coletadas 35 frações, sendo que na fração 8 foi obtido um precipitado branco, correspondente a mistura de dois esteróis, **M2**, e na fração 11 a mesma mistura de triterpenos obtida da fração hexano. Da coluna das frações 14-20 foram coletadas 23 frações, sendo que da fração 4-5 foi obtido um precipitado branco, **C2**. Das frações 6-12 foi obtido novamente o composto 2.

4.3.3.4. Fracionamento da fração butanol

A fração butanol (35,0 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel. Iniciou-se a coluna com 75 % de acetato de etila e 25% de hexano, aumentando gradativamente a polaridade do solvente através da adição de acetato de etila e etanol, até a polaridade de 100 % de etanol. Desta coluna foram coletadas 31 frações de 100 mL cada, que depois de evaporadas foram comparadas via cromatografia em camada delgada, e reunidas quando similares (Figura 13).

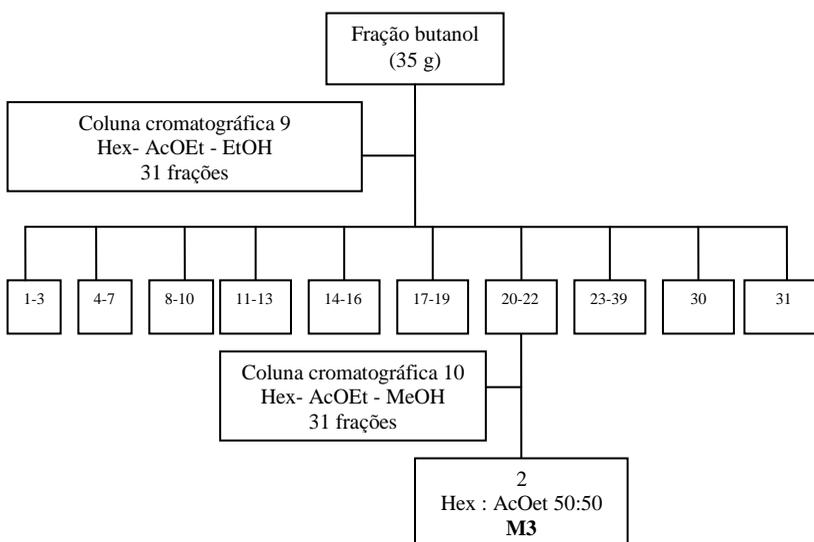


Figura 13. Fracionamento cromatográfico da fração butanol.

A fração 20-22 foi recromatografada em coluna de sílica gel, sendo eluída com 50 % de hexano e 50 % de acetato de etila, aumentando gradativamente a polaridade do solvente através da adição de acetato de etila e, ou, metanol, até a polaridade de 50% de metanol. Na fração 2 foi obtido um precipitado amarelo, **M3**, identificado como sendo o flavonóide quercetina.

4.4. ANALISE DAS AMOSTRAS VEGETAIS POR ELETROFORESE CAPILAR

As análises foram conduzidas em um equipamento de eletroforese capilar HP^{3D}CE da Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipado com um detector de arranjo de diodos. A temperatura do capilar foi mantida em 25 °C e a aquisição e tratamento dos dados foram feitos no programa HP ChemStation (rev A.06.01). As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (50 mbar por 3 s). A voltagem aplicada foi 30 kV, com polaridade positiva no lado da injeção. Todos os experimentos foram realizados usando um capilar de sílica fundida, com revestimento externo de poliimida (Polymicro, Phoenix, AZ, USA) 48.5 cm (8,5 cm effective length) × 50 µm ID × 375 µm.

Todos os reagentes utilizados no preparo dos eletrólitos são de grau analítico. Água deionizada foi usada no preparo de todas as soluções (Milli-Q deionizer, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). Tetraborato de sódio (TBS) foi adquirido da Merck (Rio de Janeiro, Brasil) e metanol (MeOH) da Tedia Brazil (Rio de Janeiro, Brazil). Solução estoque de TBS (100 mMol L⁻¹) foi usada para preparar a solução de eletrólitos. A solução de eletrólito otimizada para a análise de flavonóides era composta de 25 mMol L⁻¹ de TBS e 14 % MeOH a pH 9,30.

O extrato bruto e as frações vegetais, com exceção de **M3**, foram analisados também, após serem submetidos a uma hidrólise ácida. Neste caso, 500 µL de cada extrato vegetal foi diluído duas vezes com água. A amostra diluída foi transferida para um tubo de ensaio com tampa e a ela foi adicionado 200 µL de HCl 8 M e colocado em estufa a 100°C durante 1 hora. Após o tempo de hidrólise, esperou-se arrefecer o tubo e adicionou-se 2 mL de água e 2 mL de acetato de etila para extração das agliconas. Depois da agitação e separação de fases, o sobrenadante foi transferido para um tubo cônico e mais uma extração com 2 mL de acetato de etila foi feita. Em seguida, o sobrenadante foi seco sob fluxo de N₂ e o resíduo foi ressuspenso em 400 µL com uma solução EtOH:H₂O 50 %. Após, as amostras foram diluídas quatro vezes com a mesma solução EtOH : H₂O 50 % e injetadas no equipamento de eletroforese capilar.

4.5. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.5.1. Atividade Alelopática

Este bioensaio foi realizado conforme metodologia utilizada por NISHIMURA *et al.* (1984). Em placas de Petri foram colocados discos de papel-filtro Whatmann nº 1 (5,0 cm de diâmetro), impregnados com 1,0 mL de solução da amostra vegetal nas concentrações de 0,25 a 2,0 % (m/v). Após adicionou-se 1,0 mL de tween 80 (100 ppm).

As placas com o papel impregnado foram deixadas em repouso por 24h. Após esse período cada disco de papel recebeu 25 sementes de *Lactuca sativa* (alface), distribuídas aleatoriamente. O teste foi feito em triplicata para cada concentração de amostra vegetal. Como controle negativo foi utilizado procedimento similar, porém sem a adição de amostra vegetal. A germinação das sementes foi conduzida em estufa com fotoperíodo (12h claro / 12h escuro) a 25°C. Como critério de germinação foi estabelecido a protrusão radicular. Os discos de papel filtro foram mantidos úmidos por meio de regas diárias com água destilada. As leituras das sementes germinadas foram diárias e o experimento foi concluído após cinco dias.

Após o término do experimento foram feitas as medidas do comprimento da radícula e do hipocótilo (ou caulículo) de cinco plântulas por placa utilizando-se papel milimetrado, e foi determinado o índice de velocidade de germinação (IVG). $IVG = N1/T1 + N2/T2 + \dots$, onde N1, N2 é o numero de sementes germinadas no período de tempo T1 e T2, respectivamente. Os dados obtidos para os extratos em diferentes concentrações foram sempre comparados com o controle negativo (testemunha).

O tratamento estatístico segue o modelo ANOVA – O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com três repetições cada. Os dados foram submetidos à análise de variância. Em um nível de confiança de 1%, se o coeficiente de Fisher (F) calculado for maior que o tabelado, então a variação dos parâmetros avaliados é significativa (Vieira, 1989).

4.5.2. Atividade Antibacteriana

Os experimentos para a determinação da atividade antibacteriana do extrato bruto hidroalcolóico, frações e compostos isolados de *E.*

umbelliflora foram realizados no laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Regional de Blumenau, sob a supervisão do professor Eduardo Monguilhott Dalmarco.

Para a determinação da atividade antibacteriana foram utilizadas as bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 35152), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – ATCC 43300); e as Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090) e *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047).

As amostras vegetais foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), com objetivo de se produzir soluções-mãe contendo 100 mg/mL. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas destas soluções em caldo Brain Heart Infusion (BHI), produzindo concentrações variando de 50 mg/mL a 1,5 µg/mL, distribuídas em volumes de 100 µL em cada poço da placa de microdiluição estéril de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 5 µL do inóculo bacteriano contendo 5×10^5 UFC/mL de cada microorganismo testado. Os experimentos foram realizados em duplicata e as placas incubadas em aerobiose a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após esta incubação inicial, adicionou-se 10 µL de cloreto de 2,3,5 trifenil-tetrazólio (5% v/v) em metanol, a cada microcavidade da placa utilizada no experimento (CLSI, 2005). Em seguida, realizou-se outra incubação em aerobiose por 30 minutos à temperatura de $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, onde foi possível verificar a mudança de coloração para vermelho nos micropoços onde há presença de bactérias viáveis, ou seja, onde os extratos, frações e compostos não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano.

A menor concentração onde não houve crescimento bacteriano foi chamada de concentração inibitória mínima (CIM). Como controle de inibição bacteriana foi utilizado o antibiótico de referência gentamicina, um antibiótico que apresenta boa atividade contra todas as cepas testadas em nosso experimento, com exceção para o *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA).

Para a classificação da atividade antibacteriana de extratos e frações, foi utilizado o critério proposto por MACHADO e colaboradores (2005). Os extratos e as frações que apresentaram valores de CIM menores que 10 µg/mL foram considerados excelentes; valores de CIM entre 10 e 100 µg/mL foram considerados bons; valores de CIM entre 100 e 500 µg/mL apresentaram atividade moderada; valores de

CIM entre 500 e 1000 µg/mL apresentaram fraca atividade e para valores de CIM acima de 1000 µg/mL os extratos e frações foram considerados inativos. Já para a classificação da atividade antibacteriana dos compostos isolados, foi utilizado o critério proposto por RÍOS e RECIO (2005), o qual classifica como moderada atividade compostos com valores de CIM entre 10 a 100 µg/mL e como excelente atividade antibacteriana compostos com CIM abaixo de 10 µg/mL.

4.5.3. Atividade Antinociceptiva

Os experimentos para a determinação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico bruto de *E. umbelliflora* foram realizados no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, sob a supervisão do Prof. Dr. Adair Roberto Soares Santos.

Foram utilizados ratos Wistar (180 a 220 g) e camundongos Swiss (25 a 35 g), machos fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em temperatura constante ($23 \pm 2^\circ \text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas e tratados com água e ração *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório por um período de adaptação antes da realização dos experimentos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFSC.

O modelo de nocicepção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta das fibras nociceptivas) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (HUNSKAAR e HOLE, 1987, TJØLSEN et al., 1992). A metodologia utilizada foi essencialmente a mesma descrita por Santos e Calixto (1997). Os animais utilizados foram individualmente ambientados em funis de vidro. Um volume de 20 µL de solução de formalina 2,5% (0,92% formaldeído) foi injetado intraplantarmente (i.pl.) na superfície ventral da pata direita do animal, sendo individualmente observado o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada de 0-5 min (fase neurogênica) e de 15-30 min (fase inflamatória) após a injeção da formalina. Os animais receberam o extrato bruto de *E. umbelliflora* (30 - 300 mg/kg, v.o.) ou veículo (10 mL/kg, v.o.) 1 h antes da administração da formalina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Várias espécies de *Eugenia* foram alvos de estudos químicos e farmacológicos, porém, como já dito anteriormente, para a espécie *E. umbelliflora* poucos estudos foram realizados. Por este motivo ocorreu o interesse no desenvolvimento deste trabalho.

5.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA DE *EUGENIA UMBELLIFLORA*

5.1.1. Obtenção da cera epicuticular

Folhas recém coletadas da espécie vegetal foram submersas em hexano por 5 minutos. Após filtração, o solvente foi evaporado em rotaevaporador, obtendo-se a cera epicuticular com rendimento de 0,204 %.

5.1.2. Preparação do extrato bruto

Após macerado, o material vegetal foi filtrado, e o extrato concentrado no evaporador rotatório. O peso do extrato bruto foi determinado, e seu rendimento foi calculado em porcentagem, em relação à quantidade de material vegetal seco de partida utilizado para a extração. O resultado do rendimento está demonstrado na tabela 3, a seguir:

Tabela 3. Rendimento do extrato bruto de *Eugenia umbelliflora*.

Material	Peso do material (g)	% de rendimento
Folhas secas	1793,0	-
Extrato bruto folhas	270,0	15,06

5.1.3. Fracionamento do extrato bruto

Após ser concentrado, o extrato bruto foi ressuspensionado em água e deixado em repouso na geladeira por 7 dias. Através deste processo foi obtido um precipitado que foi chamado de fração insolúvel. O

precipitado foi separado através de filtração e, o filtrado restante, foi então fracionado através de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). Após a evaporação dos solventes sob pressão reduzida, os pesos das frações foram determinados, e seu rendimento foi calculado em porcentagem, em relação ao peso de extrato bruto obtido no processo de maceração, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Rendimento das frações obtidas a partir do extrato bruto de *Eugenia umbelliflora*.

Fração	Peso do material (g)	% de rendimento
Extrato bruto	270,0	-
Fração insolúvel	49,0	18,15
Fração hexano	8,5	3,15
Fração diclorometano	3,7	1,37
Fração acetato de etila	22,0	8,15
Fração butanol	40,1	14,85
Fração aquosa	146,0	54,07

5.1.3.1. Fracionamento da fração insolúvel

Do fracionamento da fração insolúvel (Figura 10, página 25) foi obtido um precipitado que após recristalização em metanol se apresentou na forma de um sólido branco. Esse sólido, com ponto de fusão 149,2 – 152,0 °C, apresentou apenas uma mancha quando analisado em CCD e foi denominado de **C1**.

Analisando o espectro de infravermelho em pastilha de KBr (Figura 14), observa-se uma banda intensa e larga com máximo de absorção em 3389 cm⁻¹ característica do estiramento do grupo O-H, uma banda em 2931 cm⁻¹ referente a deformação axial de C-H alifático, além de uma banda em 1616 cm⁻¹ de absorção de carbonila, que nesse baixo comprimento de onda indica a presença de algum tipo de conjugação, como a conjugação de ácidos carboxílicos.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 15) mostra um singlete em 10,71 ppm, referente ao hidrogênio de aldeído, e um duplete em 5,56 ppm, com integração para um hidrogênio e com $J = 3,32$ Hz, correspondente a um átomo de hidrogênio ligado a carbono sp^2 . Observa-se a presença de um triplete em 3,13 ppm, com integração para três hidrogênios e com $J = 7,22$. Em 2,79 ppm observa-se um duplo-duplete com integração para dois hidrogênios e com $J = 13,67$ e 2,74 Hz, e em 2,47 um duplo-duplete com integração para dois hidrogênios e com $J = 11,3$ e 2,54 Hz.

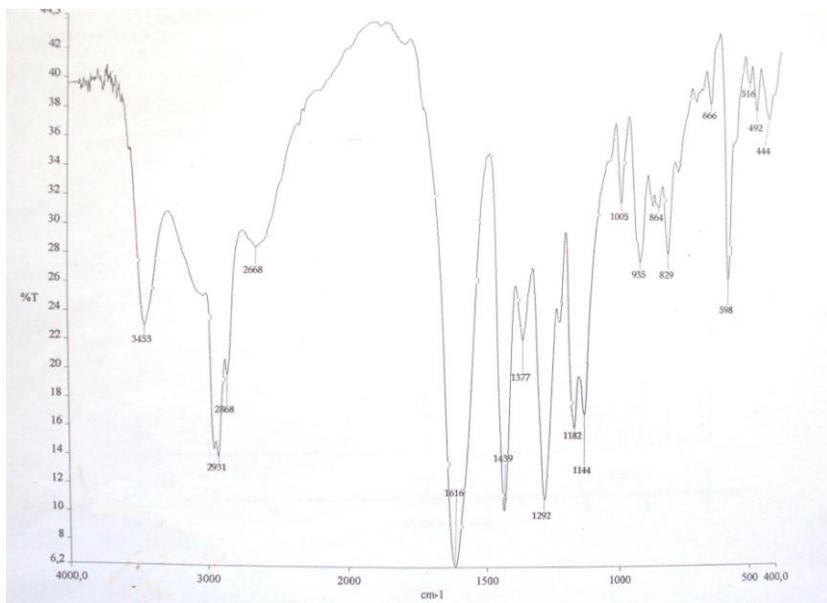


Figura 14. Espectro de Infravermelho (KBr) de C1.

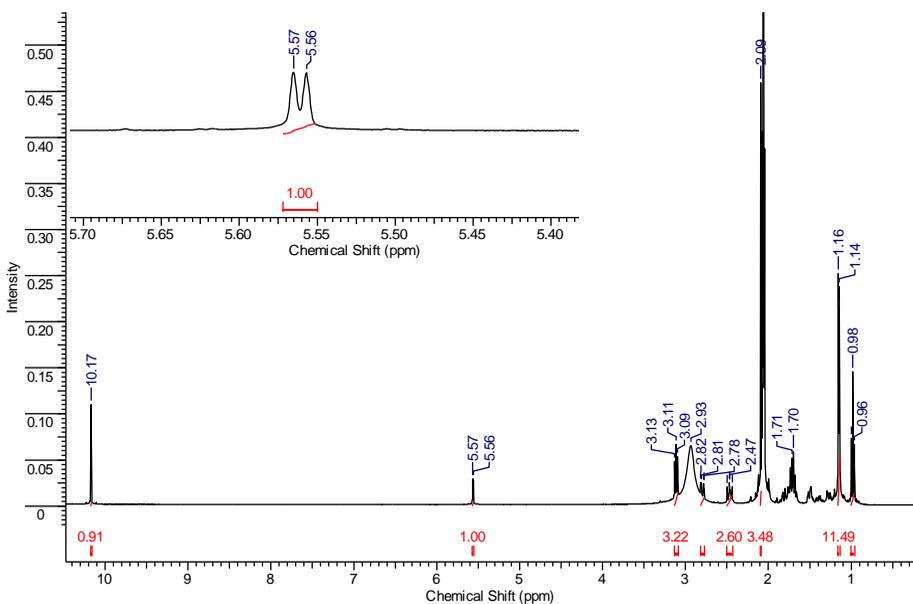


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (acetona deuterada) de **C1**.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 16) observa-se a presença de 20 sinais. O sinal em 193,49 ppm correspondente a carbonila de aldeído. Observou-se ainda em 150,37 ppm um sinal referente a carbono quartenário e em 123,75 ppm um CH que correspondes aos carbono de uma dupla ligação trissubstituída. Foi observado também. O sinal em 73,06 ppm corresponde a um carbono não protonado ligado a uma hidroxila.

A elucidação da estrutura do composto **C1** não foi completada até o momento visto que mais análises são necessárias para a completa elucidação do composto, que parece se tratar de um diterpeno.

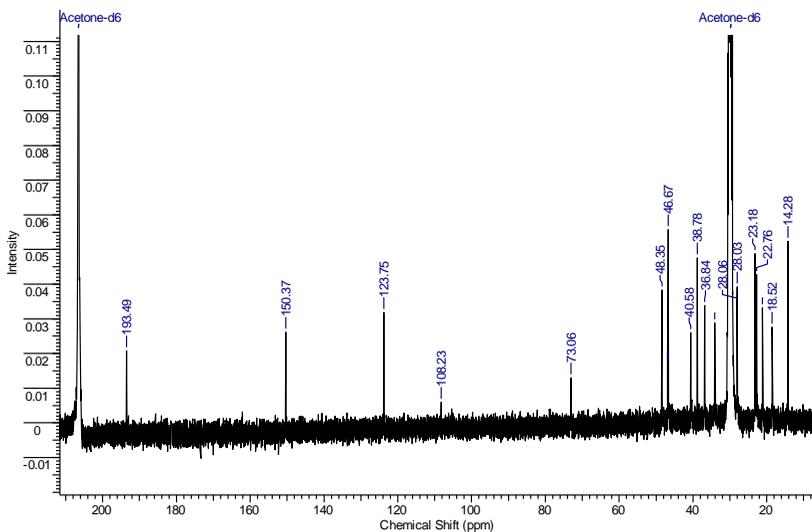


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C (acetona deuterada) de **C1**.

5.1.3.2. Fracionamento da fração hexano

Do fracionamento da fração hexano (Figura 11, página 26) foi obtido um precipitado que após recristalização em metanol se apresentou na forma de um sólido branco. Esse sólido, com faixa de fusão entre 226,7 – 227,0 °C, quando analisado em CCD apresentou uma mancha de coloração violeta ao ser revelado com anisaldeído sulfúrico, e foi denominado de **M1**.

O espectro de infravermelho em pastilha de KBr (Figura 17) apresentou um perfil de absorção típico de estruturas esteroidais ou triterpênicas. Foi verificada a presença de uma banda intensa e larga com máximo de absorção em 3389 cm^{-1} característica do estiramento do grupo O-H. Na região de $2980\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$ foi observado um grupo de bandas de absorção para estiramentos C-H, cuja alta intensidade indica a presença de uma grande cadeia hidrocarbonada que juntamente com a complexidade do espectro na região de deformações angulares abaixo de 1462 cm^{-1} indica não se tratar de uma cadeia hidrocarbonada linear. Além disso, observou-se uma banda de menor intensidade em 1631 cm^{-1} , correspondente a absorção de estiramento de ligação C=C, indicando a

presença de dupla ligação no composto. Considerando-se também o alto ponto de fusão, sugere-se tratar de triterpenos hidroxilados.

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 18) permitiu a visualização de dois tripletes com $J=3,7$ Hz, um em 5,14 ppm, de maior intensidade, e o outro em 5,19 ppm, de menor intensidade, em uma proporção de 2:1 (Figura 19), correspondentes a átomos de hidrogênios ligados a carbono sp^2 , típicos de ligação dupla trissubstituída de alguns triterpenos, como por exemplo os de esqueleto oleanano e ursano. A diferença de intensidade desses sinais sugere a presença de uma mistura de compostos. Observou-se também em 3,53 ppm um duplete com constante de acoplamento para hidrogênios geminais, $J = 10,93\text{Hz}$, atribuído a um dos hidrogênios ligados ao grupo CH_2 ligado a uma hidroxila, em 3,21 ppm um duplo duplete com constantes de acoplamento axial-axial e axial-equatorial, $J_1 = 10,93\text{Hz}$ e $J_2 = 5,07$ Hz, respectivamente, referente ao hidrogênio carbinólico do C-3 dos triterpenos, e sobreposto a esse sinal um duplete com constante de acoplamento para hidrogênios geminais, $J = 10,93\text{Hz}$, referente ao outro hidrogênio do grupo CH_2 ligado a uma hidroxila. Além desses sinais, observou-se duas regiões espectrais muito complexas, uma em 0,73 – 1,25 ppm com seis sinais que foram atribuídos a grupos metílicos e outra em 1,32-1,82 ppm que correspondem a hidrogênios metilênicos e metínicos.

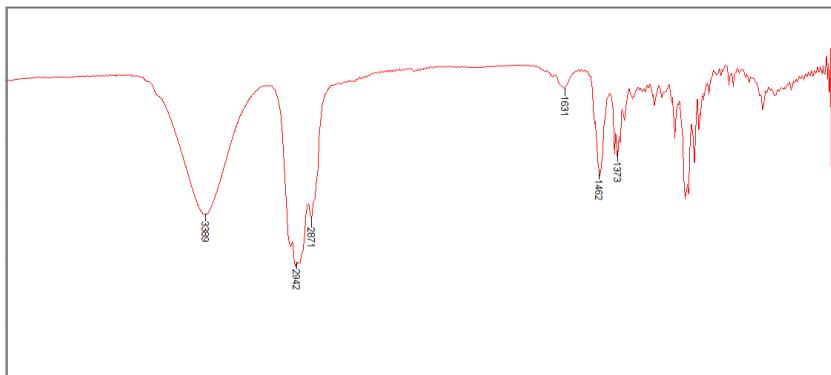


Figura 17. Espectro de Infravermelho (KBr) de **M1**.

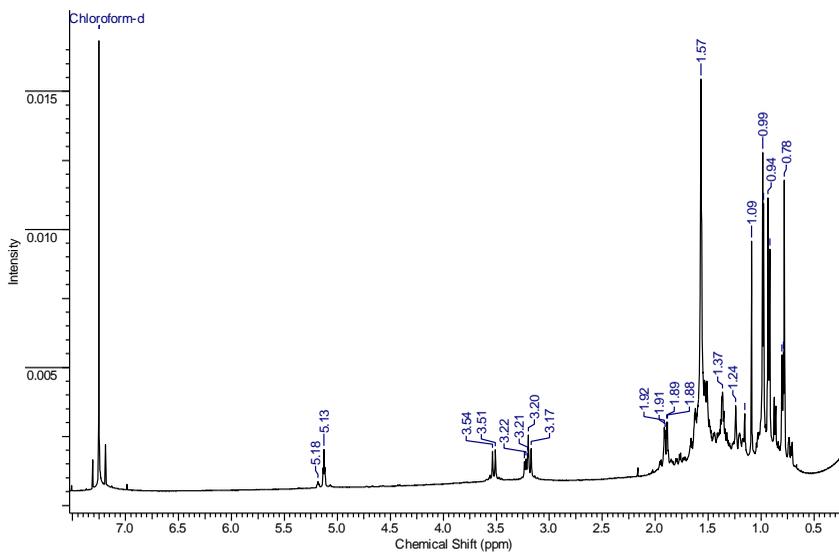


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) de **M1**.

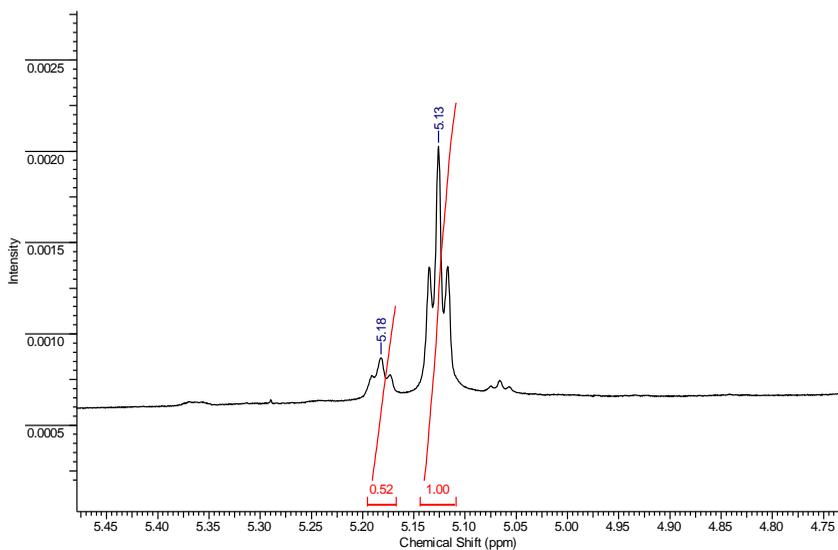


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H ampliado (CDCl_3) de **M1**.

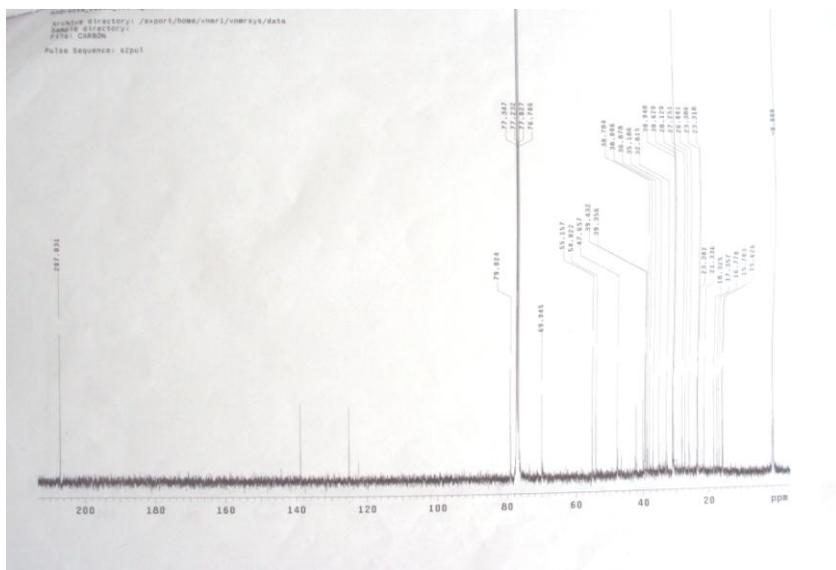


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3) de **M1**.

Na análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 20) pode-se observar a presença de mais de 30 sinais, confirmando a hipótese de uma mistura de triterpenos. Entre 15,0 e 56,0 ppm foi verificado uma grande quantidade de sinais, entre eles seis sinais correspondentes as metilas. Foi observado também dois sinais de carbonos ligados a hidroxila em 79,00 (CH), referente ao C-3, e 69,94 ppm (CH_2), referente ao C-28, além de dois pares de sinais característicos de carbonos olefínicos em 125,04 e 138,08, para o composto majoritário, e em 122,37 e 144,21 ppm, para o composto minoritário, correspondentes aos carbonos da ligação dupla entre C-12 e C-13, que confirmam a presença de uma mistura de triterpenos com esqueleto ursano e oleanano.

A comparação dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C com dados da literatura (PAULETTI et al., 2002, MAHATO e KUNDU, 1994) permitiu concluir que a mistura **M1** é formada pelos triterpenos uvaol, com esqueleto ursano, e eritrodíol, com esqueleto oleanano. Os valores dos deslocamentos químicos do composto majoritário (uvaol) estão listados na Tabela 5 e as estruturas dos compostos na Figura 20.

Tabela 5. Comparação dos valores dos deslocamentos de RMN ^{13}C do composto majoritário da mistura **M1** (uvaol e eritriol) com valores descritos na literatura.

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (100 MHz)	
	Uvaol ^a	Uvaol ^b
1	38,8	38,87
2	27,3	26,00
3	79,0	79,02
4	38,8	38,00
5	55,4	55,16
6	18,4	18,33
7	32,9	32,82
8	39,4	40,00
9	47,8	47,65
10	37,2	36,88
11	23,4	23,32
12	125,0	125,04
13	138,0	138,08
14	42,8	42,04
15	29,2	27,25
16	22,6	23,3
17	36,8	36,9
18	54,1	54,02
19	38,9	39,36
20	39,4	39,43
21	30,7	*
22	30,6	30,62
23	28,1	28,12
24	15,4	15,63
25	15,6	15,70
26	16,9	17,36
27	23,4	23,38
28	69,7	69,49
29	16,2	16,77
30	21,3	21,34

^a MAHATO e KUNDU, 1994, ^b presente na mistura

* sinal não observado no espectro

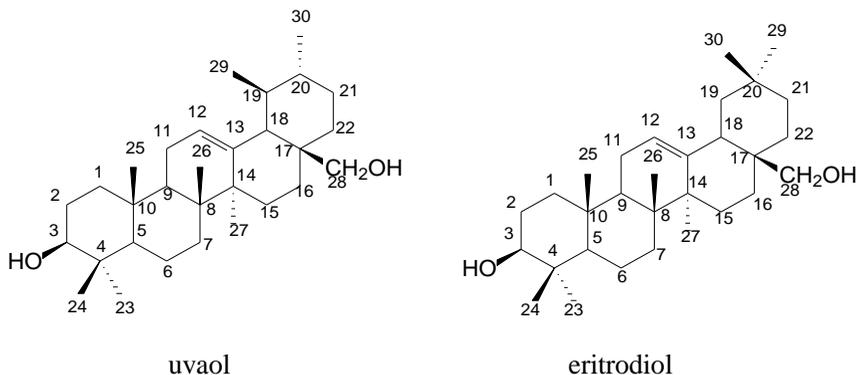


Figura 21. Estrutura dos triterpenos presentes em M1.

Estes triterpenos já foram isolados anteriormente na Família Myrtaceae na espécie *Eucalyptus globulus*, também em mistura, e foi a primeira vez que foram isolados na espécie em estudo, e no gênero *Eugenia*.

5.1.2.3. Fracionamento da fração acetato de etila

Do fracionamento da fração acetato de etila (Figura 11, página 27) foram obtidos dois precipitados. O precipitado obtido na fração 8, após recristalização em metanol apresentou forma cristalina de coloração branca. Esse cristal, com faixa de fusão entre 120,2 – 121,0 °C, quando analisado em CCD apresentou uma mancha de coloração violeta ao ser revelado com anisaldeído sulfúrico, e foi denominado de M2.

O espectro de infravermelho em pastilha de KBr apresentou um perfil de absorção típico de estruturas esteroidais ou triterpênicas. Uma banda intensa e larga com máximo de absorção em 3438 cm^{-1} característica do estiramento da ligação O-H; um grupo de bandas de absorção para estiramentos C-H na região de 2980-2840 cm^{-1} , cuja alta intensidade indica a presença de uma grande cadeia hidrocarbonada que juntamente com a complexidade do espectro na região de deformações angulares abaixo de 1462 cm^{-1} indica não se tratar de uma cadeia hidrocarbonada linear. Além disso, observou-se uma banda de menor intensidade em 1629 cm^{-1} , correspondente a absorção de estiramento de ligação dupla C=C (Figura 22). Estes dados juntamente com o ponto de fusão na faixa de 120,0 °C, sugere-se tratar de uma estrutura esteroidal.

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 23) permitiu a visualização um grupo de sinais na região de campo alto entre 0,6-2,4 ppm típicas de estruturas esteroidais. Verificou-se em 5,34 ppm a presença de um sinal largo referente a hidrogênios ligados a carbono sp^2 . A presença do multiplete centrado em 3,52 ppm sinaliza a presença do hidrogênio carbinólico típico da β -hidroxilação do C-3 do sistema ciclopentanoperidrofenantreno característica dos fitoesteróis.

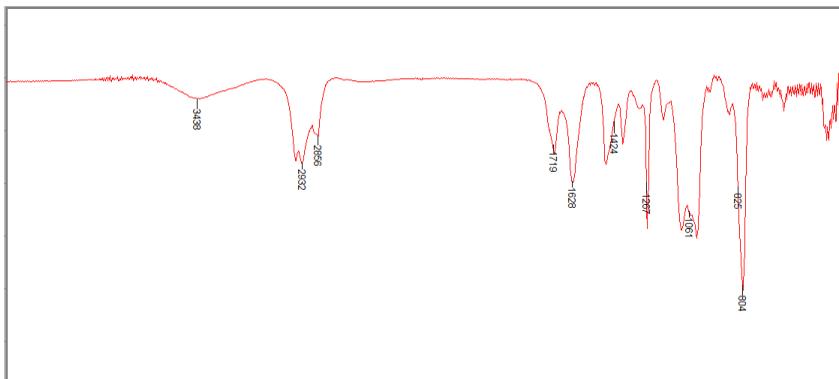


Figura 22. Espectro de Infravermelho (KBr) de M2.

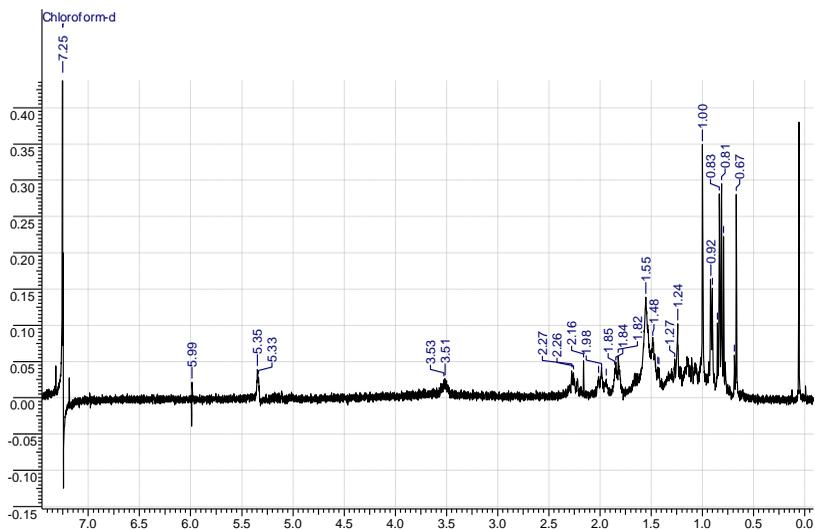


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) de M2.

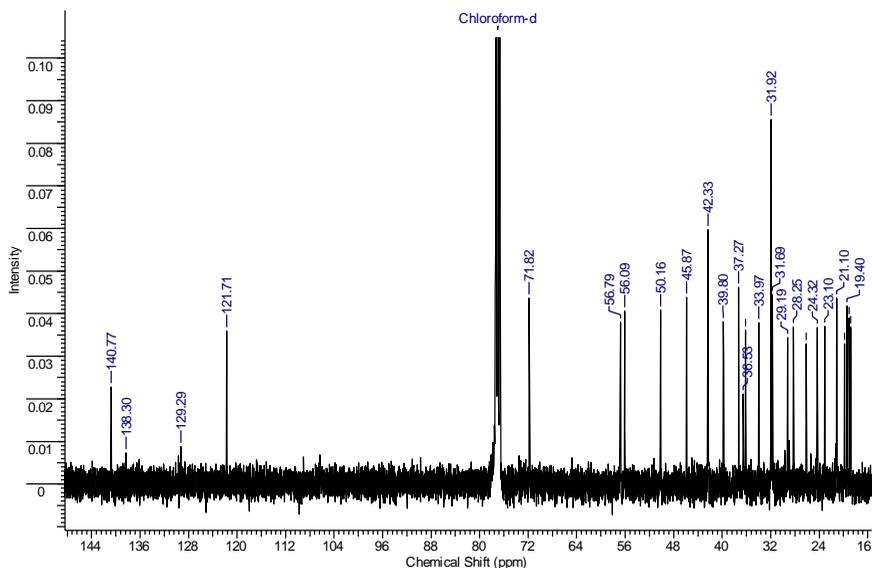


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3) de **M2**.

Na análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 24) observou-se a presença de cerca de 33 sinais, indicando a presença de mistura, visto que os esqueletos esteroidais apresentam entre 27 e 29 carbonos.

Desses sinais, quatro são característicos de carbonos sp^2 (δ_{C} 121,71, 129,29, 138,30 e 140,77 ppm) e sugerem a presença de duas ligações duplas. Estes sinais são característicos de compostos com esqueletos esteroidais ramificados, quando uma das insaturações é a ligação dupla endocíclica localizada entre C-5 e C-6 (δ_{C} 121,71 e 138,30 ppm) e a outra entre C-22 e C-23 (δ_{C} 129,29 e 140,77 ppm). Além desses sinais, foi observado também um sinal em 71,82 ppm correspondente ao C-3 ligado a uma hidroxila (Tabela 6).

A comparação desta mistura com padrões dos esteróis encontrados no nosso laboratório de pesquisa, juntamente com a comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C com os registrados na literatura (KOVGANKO, 2000, FORGO e KÖVÉR, 2004) indica que os dois compostos presentes na **M2** são o β -sitosterol e o estigmasterol (Figura 24), corroborando com os muitos relatos da literatura, em que o fitoesterol β -sitosterol geralmente vem acompanhado de pequenas quantidades de estigmasterol e também com

a fitoquímica do gênero, visto que o β -sitosterol já foi isolado em *Eugenia moraviana*.

Tabela 6. Comparação dos valores de deslocamentos de RMN ^{13}C dos esteróis que compõem a mistura **M2** (\square -sitosterol e estigmasterol) com valores descritos na literatura.

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (100 MHz)			
	β -sitosterol ^a	β -sitosterol ^b	Estigmasterol ^c	Estigmasterol ^b
3	71,8	71,82	72,0	71,82
5	140,8	140,77	140,8	140,77
6	121,7	121,71	121,8	121,71
22	34,0	33,97	138,3	138,30
23	26,2	26,13	129,7	129,65

^a KOVGANKO, 2000, ^b presente na mistura, ^c FORGO e KÖVÉR, 2004

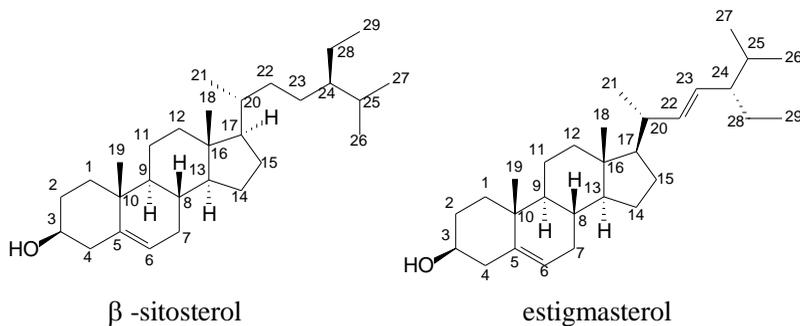


Figura 25. Estrutura dos esteróis presentes em **M2**.

A fração 11 foi purificada por recristalização em metanol fornecendo 43,0 mg de um sólido branco, com ponto de fusão 225,0 – 226,0 °C. A análise do espectro de infravermelho, do RMN ^1H e ^{13}C , juntamente com comparação por CCD desta fração com a **M1**, mostrou que essa fração se trata da mesma mistura de triterpenos (uvaol e eritrodíol) encontrada na fração hexano.

Da coluna 7 foram obtidas 23 frações, sendo que nas frações 4-5 foi obtido um precipitado que quando analisado em CCD e revelado com anisaldeído mostrou perfil de terpenóide. As frações 6-12 foram reunidas para serem recromatografadas.

A fração 4-5 foi purificada por recristalização em metanol fornecendo 26,3 mg do **C2**, na forma de um sólido branco, que degrada antes que seja observado o seu ponto de fusão.

O espectro de infravermelho em pastilha de KBr (Figura 26) apresentou um perfil de absorção típico de estruturas triterpênicas. Uma banda intensa e larga com máximo de absorção em 3451 cm^{-1} característica do estiramento da ligação O-H; um grupo de bandas de absorção para estiramentos C-H na região de $2980\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$, cuja alta intensidade indica a presença de uma grande cadeia hidrocarbonada não linear. Além disso, observou-se uma banda em 1687 cm^{-1} , correspondente a absorção de C=O de ácido. Esta banda juntamente com a banda referente a estiramento de O-H sinaliza a presença de um ácido carboxílico.

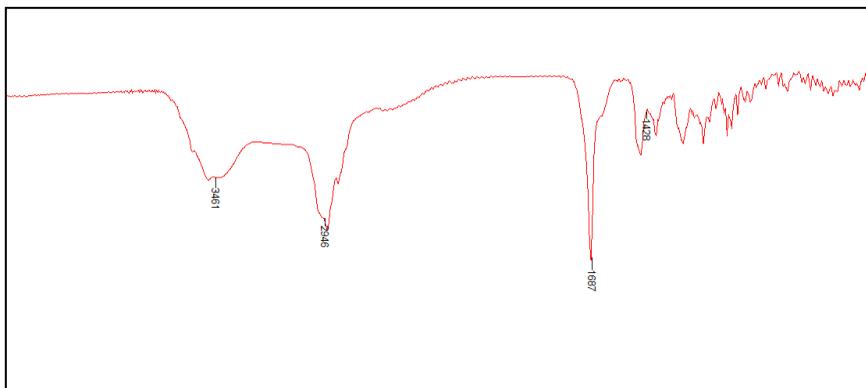


Figura 26. Espectro de Infravermelho (KBr) de **C2**.

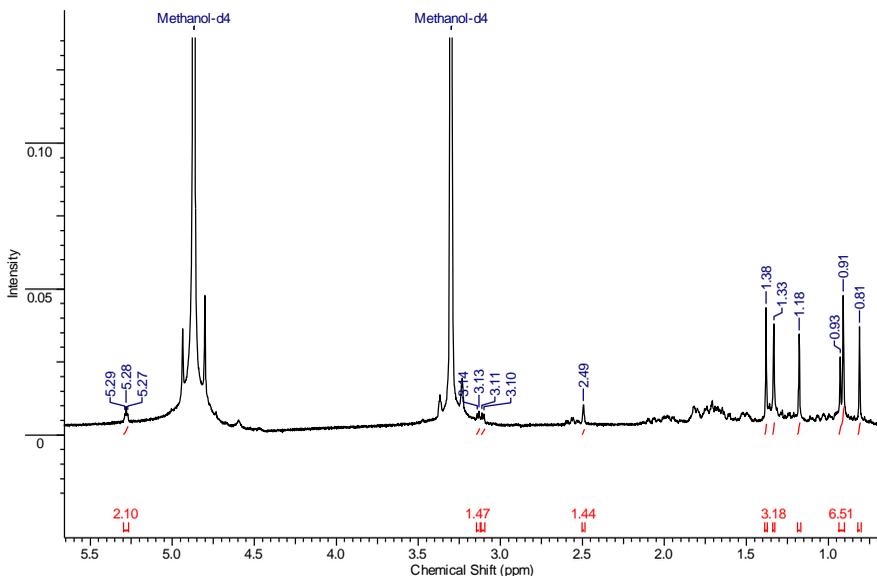


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD /400MHz) de **C2**.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 27), são observados entre outros sinais, seis singletes entre 0,80 e 1,40 ppm referentes a metilas de triterpenos. O triplete centrado em 5,28 ppm para um átomo de hidrogênio ligado a carbono sp^2 , indica a presença de uma ligação dupla trissubstituída. O duplo duplete observado em 3,12 ppm é característico do H-3 carbinólico de triterpenos.

Observa-se que nos esteróis, este H-3 forma um multiplete pelo acoplamento com dois grupos metílenos vizinhos (2- CH_2 e 4- CH_2). Nos triterpenos, a presença de duas metilas em C-4, faz com que o H-3 acople somente com os hidrogênios axial e equatorial do metileno C-2, resultando em um sinal com a forma de um duplo-duplete.

O triplo duplete em 2,55 ppm pode ser atribuído ao hidrogênio vizinho a dupla ligação e a um carbono oxigenado. O deslocamento químico deste átomo de hidrogênio para campo mais baixo é justificado pelos efeitos de desproteção anisotrópica conferido pela carbonila do grupo ácido carboxílico, por exemplo, e pela ligação dupla.

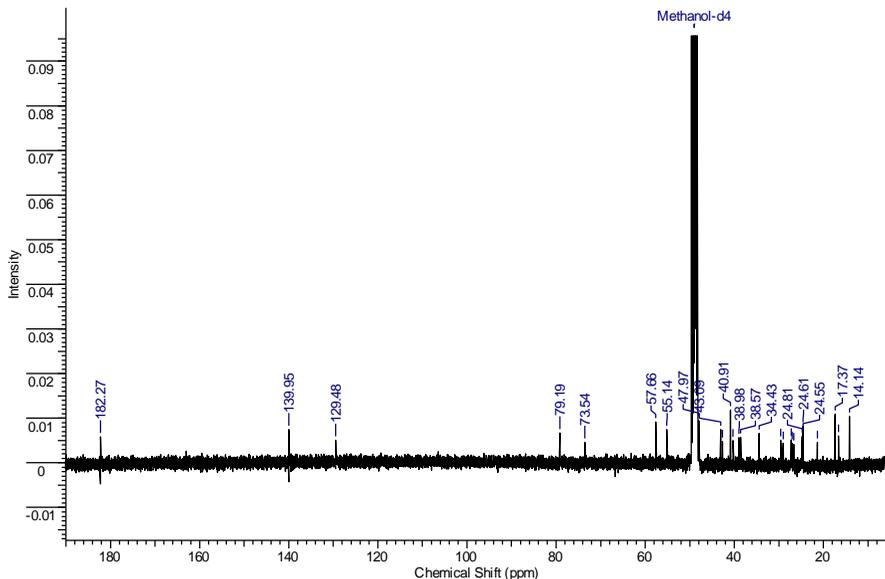


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD}/100\text{ MHz}$) de **C2**.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 28) mostrou a presença de 27 sinais, deixando dúvida quanto ao tipo de esqueleto triterpênico. O sinal em 183,33 ppm corresponde a carbonila de ácido. Foi observado também, os sinais 139,95 e 129,48 ppm que correspondem aos carbonos da dupla ligação endocíclica. Observa-se também a presença de dois sinais característicos de carbonos ligados a OH em 79,19 e 73,54 ppm, este ultimo referente a um carbono não hydrogenado, e o sinal em 79,19 ppm corresponde ao C-3, ligado a uma hidroxila.

Com estas análises a elucidação da estrutura do composto **C2** não foi completada ate o momento, e mais análises serão feitas para isso.

A fração 6-12, obtidas da coluna cromatográfica 6, foi recromatografada em coluna de sílica gel (coluna 8), utilizando como eluentes uma mistura de hexano/acetato de etila com gradiente crescente de polaridade. Dessa coluna foram obtidas 6 frações, sendo que nas frações 2, 3 e 4 foi obtido um precipitado com perfil de triterpenoide. Essas frações foram purificadas por recristalização em metanol fornecendo um sólido branco sem ponto de fusão. A análise do espectro de infravermelho, juntamente com comparação por CCD destas frações com de **C2**, mostrou que essas frações se tratam do mesmo composto que o **C2**.

5.1.2.4. Fracionamento da fração butanol

Do fracionamento cromatográfico da fração butanol (Figura 12, página 28) foram obtidas 31 frações, que foram reunidas conforme sua semelhança através de análise via cromatografia em camada delgada.

As frações reunidas 20-22 foram recromatografadas em coluna de sílica gel (coluna 10), rendendo 31 frações, sendo que na fração 2 foi obtido um precipitado de coloração amarela que quando analisado em CCD e visualizado no UV mostrou-se impuro e apresentou perfil de flavonóide. Essa fração, denominada **M3**, degradou antes da sua fusão e foi analisada por eletroforese capilar, por apresentar perfil de flavonóide, e por RMN de ^1H . Não foi possível a realização de outras análises, como RMN de ^{13}C e dept, devido a pouca quantidade de amostra obtida.

O espectro de RMN de ^1H de **M3** (Figura 29) mostra a presença de 9 sinais na região de hidrogênios aromáticos além de dois singletes em 3,81 e 3,82 ppm referentes a duas metoxilas. Considerando-se que essa mistura apresentou perfil de flavonóide em análise via CCD, juntamente com o fato que os sinais no espectro apresentam dois padrões de integração distintos, confirma-se que **M3** trata-se de uma mistura.

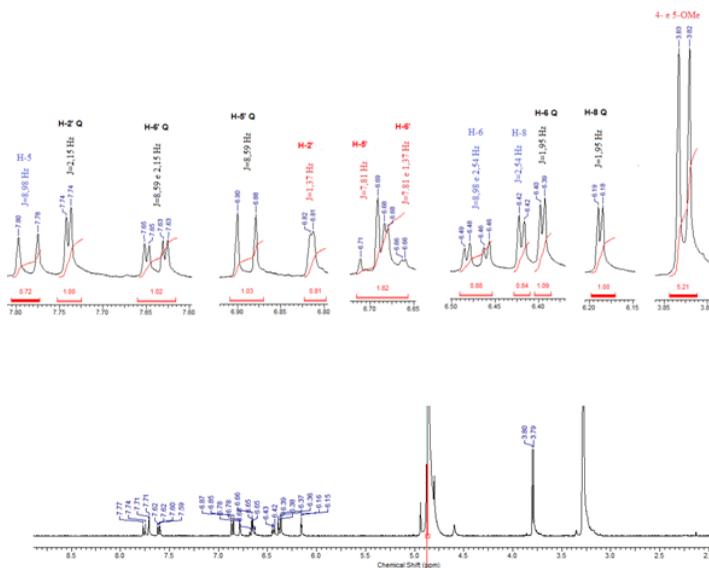
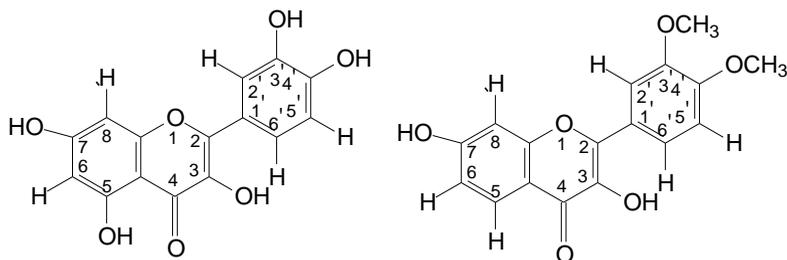


Figura 29. Espectro de RMN ^1H (CD_3OD /100 MHz) com constantes de acoplamento (J) de **M3**.

Os sinais com maiores valores de integração (~1,00), dois dupletos em 6,39 e 6,18 ppm com constante de acoplamento para hidrogênios meta relacionados, $J = 1,95\text{Hz}$, foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, do anel A dos flavonóides. O duplete em 7,74 ppm ($J = 2,15\text{ Hz}$, H2'), juntamente com o duplete em 6,89 ($J = 8,59\text{ Hz}$, H5') e o duplo duplete em 7,64 ($J_1 = 8,59\text{ Hz}$ e $J_2 = 2,15\text{ Hz}$, H6') indicam o padrão de substituição 3', 4' do anel B. Estes dados permitem propor a estrutura como sendo a 3,5,7,3',4' pentahidroxi-flavona, ou seja, o flavonóide quercetina (Figura 30).

Dos sinais com menores valores de integração (~0,80), o sinal mais desblindado, um duplete em 7,79 ppm ($J = 8,98\text{ Hz}$) foi atribuído ao H-5, sendo que a presença de um hidrogênio nessa posição não é comum devido a rota biossintética dos flavonóides. Este sinal, juntamente com o duplo duplete em 6,47 ppm ($J_1 = 8,98\text{ Hz}$ e $J_2 = 2,54\text{ Hz}$) e o duplete em 6,42 ppm ($J = 2,54\text{ Hz}$) foram atribuídos aos hidrogênios H-5, H-6 e H-8, respectivamente, do anel A. O duplete em 6,81 ppm ($J = 1,37\text{ Hz}$, H2'), juntamente com o duplete em 6,70 ($J = 7,81\text{ Hz}$, H5') e o duplo duplete em 6,67 ($J_1 = 7,81\text{ Hz}$ e $J_2 = 1,37\text{ Hz}$, H6') indicam o padrão de substituição 3', 4' do anel B, sendo as duas metoxilas os substituintes nesse anel, visto que o padrão de integração das metoxilas é o mesmo dos demais hidrogênios desse flavonóide. Outro fato que reforça a posição das metoxilas nos carbonos 3', 4' é o fato que o duplete em 6,81 ppm quando expandido apresenta um ombro largo indicando um acoplamento a longa distancia. O mesmo é observado nos sinais das metoxilas. Estes dados permitem propor a estrutura do outro flavonóide que compõe a mistura **M3** como sendo o flavonóide 7 hidroxi- 3', 4' dimetoxiflavanol (Figura 30).



Quercetina

7 hidroxi- 3', 4' dimetoxiflavanol

Figura 30. Estrutura dos flavonóides presentes em **M3**.

5.2. ANÁLISE DAS AMOSTRAS VEGETAIS DO POR ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar tem sido muito usada como método de separação de produtos naturais. A vantagem desta técnica é a rapidez de análise, uso de pouca quantidade de amostra e baixo consumo de solventes (ZHANG et al., 2008). Nesta técnica, a separação de compostos ocorre devido a migração diferencial de compostos iônicos ou ionizáveis após a aplicação de um campo elétrico, sendo que a separação depende da carga e tamanho dos íons e do fluxo eletrosmótico, resultado das cargas das paredes internas do capilar após aplicação do campo elétrico, em um dado pH (SUNTORNUSUK, 2002; ISSAQ, 2000). A eletroforese capilar é especialmente utilizada para a separação de compostos fenólicos, como os flavonóides (GOMEZ-ACARVACA et al., 2005; NONG et al., 2005), pois estes compostos são ácidos fracos e estão carregados negativamente em valores de pH altos, próximos a pH 10. O registro dos compostos é geralmente feita através de detectores por ultravioleta (UV).

Em produtos naturais, os flavonóides e compostos fenólicos estão geralmente associados a açúcares através de ligações O-glicosídica ou C-glicosídica, formando os heterosídeos. Portanto, foram feitas análises das amostras vegetais, antes e após a hidrólise ácida, gerando as agliconas e açúcares. Apenas as ligações O-glicosídicas são clivadas através da hidrólise ácida (HCl). A análise da amostra vegetal antes e após a hidrólise permite uma visualização da composição flavonoidica dos extratos, sob a forma de glicosídeos e de aglicona, comparando com padrões.

Foram analisados o extrato bruto hidroalcoólico de *E. umbelliflora*, as frações acetato de etila, butanol e aquosa e a mistura de flavonóides (M3) isolada da fração butanol. Em uma primeira análise as amostras, com exceção de M3 foram simplesmente centrifugadas por 5 min e injetadas no aparelho sem diluição. Nesta etapa, as amostras representadas pelas frações acetato de etila e butanol se mostraram mais viáveis para uma análise posterior, sob o ponto de vista qualitativo e quantitativo. Não foi possível identificar nenhum composto nas amostras representadas pelo extrato bruto e fração aquosa devido a elevações da linha de base. Para tentar minimizar este efeito, todas as amostras foram diluídas quatro vezes com uma solução de etanol/água 50%. Mesmo assim não foi possível a identificação de compostos flavonoídicos no extrato bruto e na fração aquosa.

As amostras representadas pelas frações acetato de etila e butanol continuaram a apresentar o mesmo perfil após diluídas. Para facilitar a análise e identificação dos compostos, fez-se a hidrólise ácida destas amostras e comparou-se com as amostras não hidrolisadas (Figuras 31 e 32, para as frações acetato de etila e butanol respectivamente). Essa comparação mostrou que os picos existentes antes da hidrólise sumiram após este processo, o que indica que os flavonóides presentes nas frações acetato de etila e butanol são flavonóides do tipo O-glicosilados.

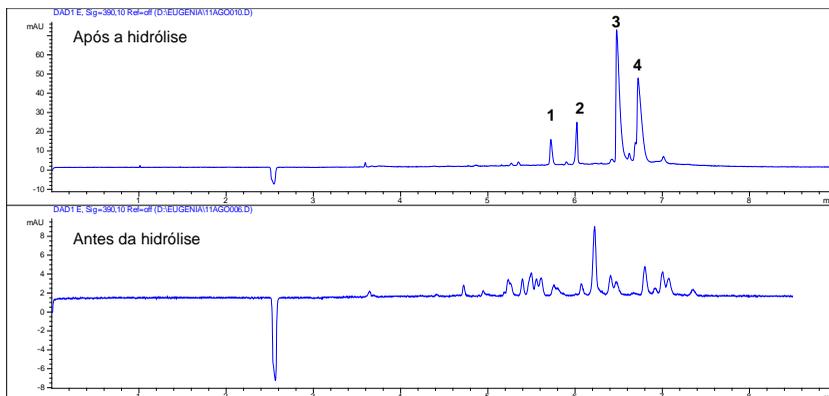


Figura 31. Eletroferograma antes e após a hidrólise da fração acetato de etila.

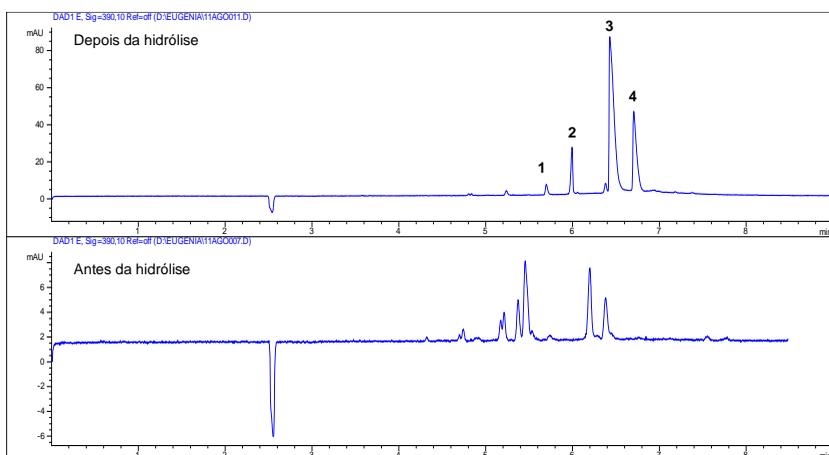


Figura 32. Eletroferograma antes e após a hidrólise da fração butanol.

Após o procedimento de hidrólise nas frações acetato de etila e butanol, identificou-se, por análise dos espectros de ultravioleta (UV), quatro flavonóides na forma de aglicona, denominados canferol (1), eriodictiol (2), miricetina (3) e quercetina (4), sendo o eriodictiol uma flavanona e os demais flavonóis. Na Figura 33 encontram-se os espectros de UV obtidos para os picos 1-4, e as respectivas estruturas dos compostos.

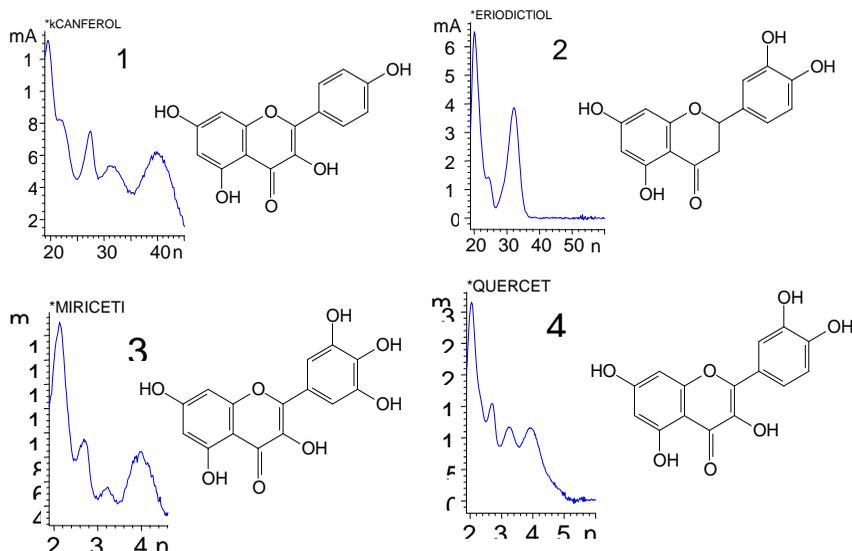


Figura 33. Espectros de UV dos flavonóides identificados.

Para a quantificação destes flavonóides foram feitas curvas analíticas cuja faixa linear variou de 20 a 100 mg L⁻¹ (quercetina e eriodictiol), 40 a 200 mg L⁻¹ (miricetina) e 5 a 30 mg L⁻¹ (canferol), sendo que, as figuras de mérito são mostradas na Tabela 7. A quantificação dos flavonóides identificados está apresentada na Tabela 8.

Tabela 7. Figuras de mérito da análise de flavonóides em extratos de *Eugenia umbelliflora*.

Composto	R ²	a	b	LOD*	LOQ*
Eriodictiol	0,9927	0,656 ± 0,040	-3,956 ± 2,483	11,36	37,86
Canferol	0,9949	0,526 ± 0,022	0,151 ± 0,392	2,24	7,45
Miricetina	0,9935	0,271 ± 0,015	-4,609 ± ,933	21,38	71,27
Quercetina	0,9892	0,427 ± 0,032	-3,251 ± ,973	13,86	46,20

Y = aX + b; *em mg L⁻¹, calculados a partir do desvio padrão do Intercepto. LOD= limite de determinação e LOQ = limite de quantificação.

Tabela 8. Quantificação dos flavonóides nas frações acetato de etila e butanol obtidas a partir do fracionamento líquido do extrato bruto das folhas de *E. umbelliflora*.

Fração	Quercetina*	Miricetina*	Eriodictiol*	Canferol*
Acetato de etila	1140,05 ± 106,50	2238,76 ± 187,99	425,77 ± 44,16	292,92 ± 50,30
Butanol	837,66 ± 8,30	3202,26 ± 36,01	739,58 ± 8,23	93,31 ± 21,27

*em mg L⁻¹.

Dos quatro flavonóides identificados nas frações acetato de etila e butanol após a hidrólise, a miricetina é a que aparece em maior quantidade nas duas frações, sendo que está presente em maior quantidade na fração butanol. Além disso, pode-se observar que os flavonóis (quercetina, miricetina e canferol) representam 90% dos flavonóides analisados da fração acetato de etila e 85% da fração butanol.

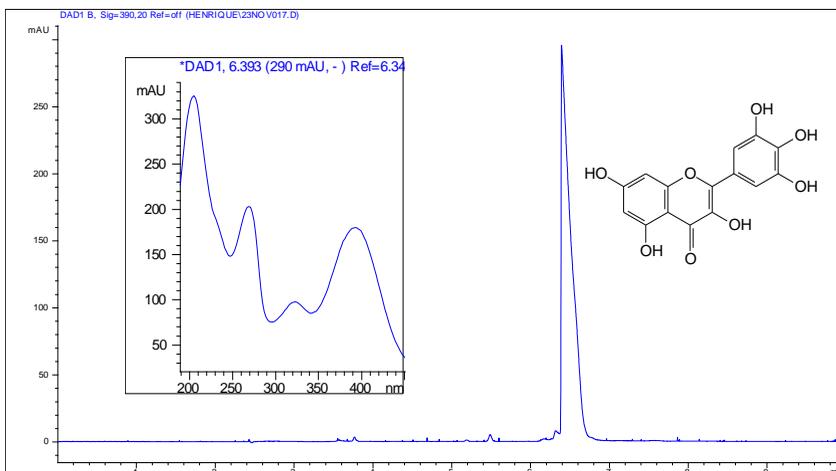


Figura 34. Eletroferograma e espectro de UV de M3

O eletroferograma obtido de M3, isolado da fração butanol, apresentou um único pico majoritário (Figura 34). A análise no espectro de UV (Figura 33) para esse pico, através de comparação com o banco de dados, mostrou que M3 trata-se do flavonóide quercetina. Este resultado corrobora parcialmente com os resultados obtidos através da análise do espectro de RMN de ^1H , onde foi possível concluir que a mistura é composta dos flavonóides quercetina e 3', 4' dimetoxiquercetina.

Os flavonóides identificados através de EC estão em concordância com quimiotaxonomia do gênero *Eugenia*, já que seus esqueletos já foram descritos anteriormente neste gênero. Os flavonóides com o núcleo quercetina e miricetina, tanto na forma de O-glicosídica como na forma de aglicona foram também encontrados na fração acetato de etila das folhas de *E. brasiliensis* através da análise por eletroforese capilar (MAGINA, 2009).

5.3. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.3.1. Atividade Alelopática

A alelopatia é um fenômeno que engloba todas as interferências desencadeadas entre plantas, incluindo microorganismos, provocadas pela liberação de substâncias químicas por eles elaborados, através dos tecidos vivos ou mortos, que abrange efeitos benéficos ou prejudiciais provocados por um organismo sobre outro.

Este fenômeno está relacionado à capacidade de uma planta interferir na germinação de sementes e/ou no crescimento de outras espécies vegetais, influenciando o seu desenvolvimento por meio de compostos químicos que são liberados na atmosfera ou no solo (MEDEIROS, 1990).

Diferentes compostos químicos, como ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, taninos e quinonas complexas podem ser os responsáveis pelos efeitos alelopáticos observados nas plantas (EINHELLIG, 1986; MEDEIROS, 1990). Compostos fenólicos como os ácidos benzóicos substituído e cinâmicos, as cumarinas e os flavonóides estão entre os mais comumente associados com a ação alelopática (EINHELLIG, 1986).

Para que seja indicada como planta teste, a espécie deve apresentar germinação rápida e uniforme, e um grau de sensibilidade que permita expressar os resultados sob baixas concentrações das substâncias alelopáticas (FERREIRA e ÁQUILA, 2000).

A utilização das sementes de alface como parâmetro para avaliar o efeito de substâncias e de extratos de vegetais na germinação é promissor, principalmente em relação a fatores como tempo, custo e espaço. As sementes de alface germinam em poucos dias em condições ideais, entre 4 e 6 dias, proporcionando rápidos resultados. Estas sementes comerciais podem ser adquiridas com facilidade a custo baixo e os testes podem ser realizados em placas de Petri, facilmente manipuladas na câmara de germinação.

Para determinar se um extrato ou composto possui atividade alelopática, utiliza-se o bioensaio que avalia o potencial de inibição, ou até mesmo, a estimulação na germinação de sementes de espécies silvestres ou de cultura. Para sementes de cultura, as quais são preparadas para germinar 100%, avalia-se somente a inibição, enquanto a estimulação causada por muitos aleloquímicos não é detectada. Tal resposta pode ser observada em sementes silvestres (EINHELLIG, 1986).

O teste alelopático aplicado ao extrato bruto, frações e cera epicuticular de *E. umbelliflora* foi avaliado através de germinação de sementes de *Lactuca sativa* e do desenvolvimento da plântula.

As amostras foram testadas em quatro diferentes concentrações. A germinação de sementes de *L. sativa* foi avaliada através do índice de velocidade de germinação, que consistiu na observação da relação entre o número de sementes germinadas e o tempo para germinar. Quanto menor a percentagem de velocidade de germinação, maior o efeito alelopático inibitório. Os resultados obtidos no controle (ausência do extrato vegetal) em relação a velocidade de germinação de sementes e desenvolvimento da plântula foram considerados como 100%.

Através da Figura 35 observa-se que a fração diclorometano (FDCM) foi a amostra vegetal mais eficaz em inibir a germinação de sementes de alface, sendo que nas concentrações de 1,0 e 2,0% não houve germinação. Outra fração de destaque é a acetato de etila (FAE), que na concentração de 2,0% inibiu a germinação de sementes de alface em cerca de 97%. Para a cera epicuticular de *E. umbelliflora* não se observou efeito alelopático inibitório, sendo que nas concentrações de 0,5 a 2,0% foi observado estímulo na germinação.

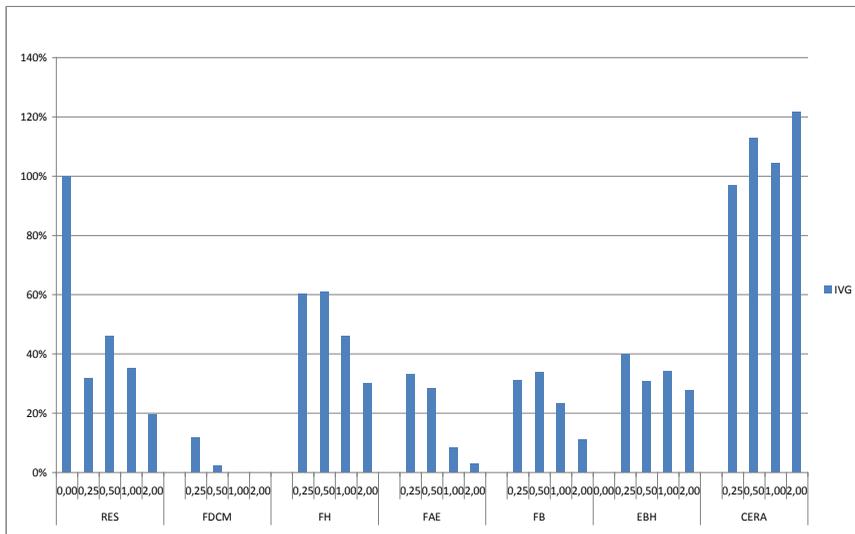


Figura 35. Velocidade de germinação de sementes de *L. sativa* na presença de extratos vegetais de *E. umbelliflora*.

Em relação ao desenvolvimento da plântula (Figura 36), foram observados comportamentos distintos para as amostras vegetais. Para a cera epicuticular, por exemplo, observou-se estímulo do crescimento da radícula para todas as concentrações testadas, e estímulo do crescimento do hipocótilo nas concentrações de 0,25 e 1,00%. Já o extrato bruto estimulou o crescimento da radícula e hipocótilo nas concentrações de 0,25 e 0,50%, enquanto as demais concentrações inibiram o crescimento. A fração diclorometano na concentração de 0,25 % foi a que teve o maior índice de inibição de crescimento do hipocótilo, aproximadamente 60%, sendo que nas demais concentrações não houve desenvolvimento da plântula.

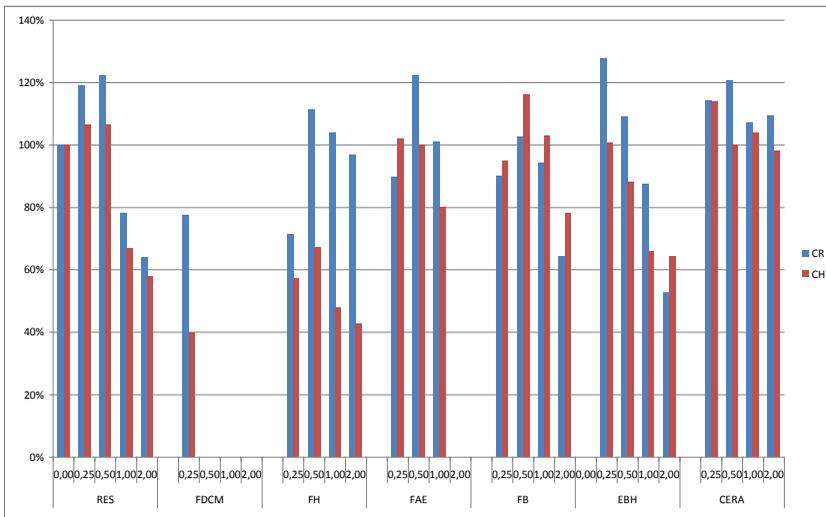


Figura 36. Comprimento da radícula (CR) e do hipocótilo (CH) de *L. sativa* na presença de extratos vegetais de *E. umbelliflora*.

5.3.2. Atividade Antibacteriana

O homem tem usado plantas desde a antiguidade para tratar doenças infecciosas comuns, e alguns desses usos tradicionais ainda estão incluídos como parte de tratamentos para vários males. As bactérias são freqüentemente causa de varias infecções, e apresentam

importante risco para a saúde pública, principalmente quando se tratam de infecções hospitalares (RIOS e RECIO, 2005).

Nos últimos anos, muitos microorganismos patogênicos resistentes em humanos tem se desenvolvido devido ao uso indiscriminado de medicamentos antimicrobianos comerciais usados no tratamento de doenças infecciosas. Esta resistência prolifera-se rapidamente através de transferência genética, atingindo algumas das principais bactérias gram-positivas, como enterococos e estafilococos e bactérias gram-negativas como as enterobactérias e a *Pseudomonas aeruginosa* (SILVEIRA et al., 2006).

O problema da resistência bacteriana é crescente e a perspectiva futura do uso de fármacos antibacterianos é incerta. Por este motivo, torna-se imperativo o estudo acerca de novas substâncias, sejam elas sintéticas ou naturais (NASCIMENTO et al., 2000). Este fato, conjuntamente com os efeitos adversos causados pelos antibióticos, tem levado a busca de novas substâncias antimicrobianas em diversas fontes, incluindo as plantas medicinais.

Plantas do gênero *Eugenia* possuem uma variedade de atividades biológicas, entre elas destacam-se a atividade antimicrobiana, verificada em algumas espécies, como *Eugenia beaurepaireana* e *Eugenia brasiliensis* (MAGINA et al., 2009a). A própria espécie em estudo nesse trabalho apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (MACHADO et al., 2005). Esse fato levou ao interesse da avaliação do extrato bruto e frações de *Eugenia umbelliflora*, contra outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

A atividade antibacteriana foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato bruto, das frações e da mistura dos triterpenos uvaol e eritrodíol isolados de *E. umbelliflora*.

As amostras vegetais foram incubadas em presença do inoculo bacteriano a 36^oC por 24 horas. Após essa incubação inicial adicionou-se 10 µL de cloreto de 2,3,5 trifenil-tetrazólio (5% v/v) em metanol, a cada microcavidade da placa utilizada no experimento. Em seguida, realizou-se outra incubação em aerobiose por 30 minutos à temperatura de 36^oC, onde foi possível verificar a mudança de coloração para vermelho nos micropoços onde há presença de bactérias viáveis, ou seja, onde os extratos, frações e compostos não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. O teste de tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases presentes nos processos respiratórios dos tecidos. Durante a respiração celular, ocorre a liberação de íons hidrogênio, com os quais o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio reage formando uma substância de cor vermelha e insolúvel, denominada de

formazam (JOHNSON et al., 1985; RAHMAN et al., 2004). Então, a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração onde não houve crescimento bacteriano.

A Tabela 9 resume o critério usado para avaliação da atividade antibacteriana baseada na concentração inibitória mínima (CIM).

Tabela 9 Classificação de atividade antibacteriana para extratos vegetais e compostos isolados.

Valor de CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Atividade Extratos MACHADO et al., 2005	Atividade Compostos RIOS e RECIO 2005
< que 10	Excelente	Excelente
10 a 100	Boa	Moderada
100 a 500	Moderada	-
500 a 1000	Fraca	-
> que 1000	Nula	-

Considerando a classificação acima e os resultados da Tabela 10, o extrato bruto (EB) mostrou excelente atividade contra MRSA (CIM= 6,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), boa atividade contra as bactérias Gram-positivas *Listeria monocytogenes* (CIM= 78,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e *Staphylococcus aureus* (MIC = 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), e atividade moderada contra *Staphylococcus epidermidis* (CIM = 180,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Já contra as bactérias Gram-negativas testadas, o extrato bruto se mostrou inativo.

As frações hexano (FH), diclorometano (FDCM) e acetato de etila (FAE) também mostraram boa atividade contra todas as bactérias Gram-positivas testadas, particularmente no caso da MRSA, com um valor de CIM menor que 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, onde a atividade antibacteriana foi considerada excelente.

Essa alta atividade antiestafilococal observada tanto nas frações hexano, diclorometano e acetato de etila quanto no extrato bruto é um resultado muito importante visto que *S. aureus* é uma das bactérias que apresenta maior resistência (RIYAZ-UL-HASSAN et al., 2008). *S. aureus* não é resistente apenas a meticilina, mas também a uma grande gama de agentes antimicrobianos, o que torna o tratamento muito difícil. Este resultado é muito promissor, e torna importante o isolamento dos compostos responsáveis por esse efeito.

O fato das frações hexano, diclorometano e acetato de etila serem mais ativas que o extrato bruto sugere que os compostos ativos encontram-se nessas frações. A mistura de triterpenos (M1) uvaol e

eritrodiol isolada das frações hexano e acetato de etila apresentou uma moderada atividade contra *Listeria monocytogenes* segundo a classificação de RIOS e RECIO (2005), sendo inativa para as demais bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas. Portanto, a significativa atividade da fração acetato de etila pode ser atribuída a presença de flavonóides, cuja presença foi detectada por eletroforese capilar, ou outros compostos fenólicos nessa fração. Sabe-se que essa classe de compostos pode complexar com as células da bactéria impedindo seu crescimento e multiplicação (COWAN, 1999; CUSHNIE e LAMB, 2005).

Por outro lado, a promissora atividade contra bactérias Gram-positivas das frações hexano e dicloro metano pode ser explicado pela presença de compostos de baixa polaridade, como esteróis e triterpenos. O mecanismo de ação destes compostos não é totalmente compreendido, mas tem sido especulado que envolve o rompimento da membrana por compostos lipofílicos (COWAN, 1999).

As frações mais polares mostraram uma atividade discreta. A atividade da fração butanol (FB) contra *L. monocytogenes* e *S. aureus* foi considerada moderada. Contudo, para as demais bactérias e para MRSA esta fração foi inativa, resultando somente em uma fraca atividade contra *S. epidermidis*. Similarmente a fração aquosa (FA) foi inativa contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas.

Tabela 10. Concentração Inibitória Mínima (CIM - $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de extratos, frações e uma mistura de triterpenos de *Eugenia umbelliflora*.

	EB	FH	FDCM	FAE	FB	FA	MT	Gent	Vanc
Bactérias Gram-positivas									
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 35152	78,0	12,0	12,0	7,0	190,0	>1000	24,0	0,2	0,1
<i>MRSA</i> ATCC 43300	6,1	3,0	1,5	0,75	> 1000	>1000	380,0	>100	0,2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	180,0	12,0	23,0	15,0	710,0	>1000	190,0	0,1	0,1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15,0	15,0	15,0	15,0	195,0	>1000	190,0	1,0	0,05
Bactérias Gram-negativas									
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	>1000	980,0	980,0	>1000	780,0	>1000	190,0	6,0	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	>1000	920,0	980,0	>1000	>1000	>1000	190,0	6,0	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>1000	>1000	>1000	>1000	780,0	>1000	190,0	6,0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	>1000	780,0	390,0	>1000	190,0	1,0	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	>1000	920,0	980,0	>1000	>1000	>1000	380,0	6,0	-
<i>Shigella flexnerii</i> ATCC 12022	>1000	>1000	>1000	>1000	710,0	>1000	190,0	3,1	-

Gent = Gentamicine; Vanc = Vancomycin; ATCC = American Type Collection Culture; EB = Extrato Bruto; FH = Fração Hexano; FDCM = Fração Diclorometano; FAE = Fração Acetato de Etila; FB = Fração Butanol, FA = Fração Aquosa; MT = Mistura de Triterpenos.

5.3.3. Atividade Antinociceptiva

A dor foi conceituada, em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável a qual esta associada a lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tais lesões”. Portanto a dor possui, dentre outros, um caráter subjetivo. Cada indivíduo aprende a utilizar este termo através de suas experiências. Este conceito não admite uma relação direta entre lesão tecidual e dor, e enfatiza o aspecto da subjetividade na interpretação do fenômeno doloroso (LOESER e MELZACK, 1999; MERKLEY, 1991).

Os receptores da dor (nociceptores) na pele e em outros tecidos estão presentes em terminações nervosas livres sensíveis a estímulos dolorosos. A atividade no nociceptor e a via nociceptiva e outros processos neurofisiológicos induzidos pelo estímulo doloroso é chamado de nocicepção (DICKENSON, 1997). Enquanto a dor representa uma percepção subjetiva com uma dimensão psicológica, a nocicepção consiste na recepção dos estímulos pelos nociceptores que codificam sinais para fornecer informações ao SNC da existência da lesão. Portanto dor seria o termo mais apropriado para o homem, enquanto que nocicepção seria o mais indicado para animais experimentais (WALL e MELZACK, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001).

O modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongoa permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica, devido a estimulação direta das fibras nociceptivas, e a de origem inflamatória, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR e HOLE, 1987, TJØLsen et al., 1992)

Os resultados apresentados na Figura 37 mostram que o extrato bruto (30-300 mg/kg, *v.o.*) não foi capaz de inibir a fase neurogênica (1ª fase: 0-5 min) da nocicepção induzida pela formalina. Já a segunda fase deste modelo, a fase inflamatória, foi reduzida de forma parcial, mas significativa, sendo que na maior dose testada (300 mg/kg) ocorreu uma inibição da nocicepção de $37 \pm 10\%$.

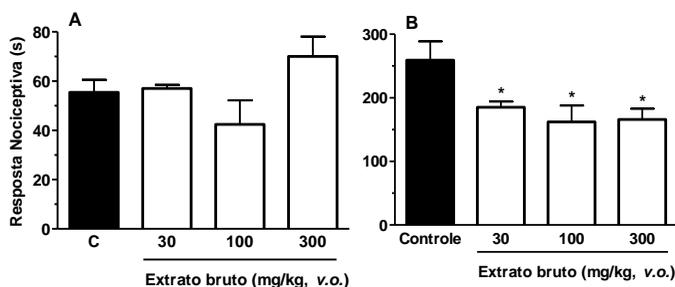


Figura 37. Efeito antinociceptivo do extrato bruto de *Eugenia umbelliflora* (30 - 300 mg/kg) administrado pela via oral em relação à primeira (A) e segunda (B) fase da nocicepção induzida pela formalina (2,5%) em camundongos. As barras representam a média de 5 a 7 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: * $p < 0,05$ comparados ao grupo controle (C) pelo teste de Newman-Keuls.

6 CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas com este trabalho foram:

A) Em relação ao estudo fitoquímico:

- O estudo fitoquímico de *Eugenia umbelliflora* levou ao isolamento e identificação de uma mistura de triterpenos, uvaol e eritrodiol, das frações hexano e acetato de etila, de uma mistura de esteróis, Δ^5 -sitosterol e estigmasterol, da fração acetato de etila, e uma mistura de flavonóides, quercetina e um derivado da quercetina, a 3', 4' metoxiquercetina, da fração butanol. Além desses compostos, foram isolados dois compostos cujas estruturas não foram completamente elucidadas até o momento.

- A análise das frações acetato de etila e butanol de *Eugenia umbelliflora* através de eletroforese capilar levou a caracterização dos flavonóides quercetina, mirecetina, canferol e eriodictiol, após a hidrólise dos extratos, mostrando que estão presentes nessas frações flavonóides glicosilados derivados dessas agliconas.

B) Em relação ao estudo das atividades biológicas:

- O extrato bruto, frações e cera epicuticular de *Eugenia umbelliflora* apresentaram discreta atividade alelopática, com exceção da fração diclorometano, que foi a amostra vegetal mais eficaz em inibir a germinação de sementes de alface.

- A atividade antibacteriana do extrato bruto, das frações e da mistura de triterpenos, foi avaliada contra quatro bactérias Gram-positivas (sendo uma resistente a meticilina - MRSA) e seis bactérias Gram-negativas. Os melhores resultados foram obtidos para o extrato bruto, e para as frações hexano, diclorometano e acetato de etila, que mostraram atividade em vários níveis, variando de moderada a excelente contra todas as bactérias Gram-positivas testadas, particularmente no caso da MRSA, onde a atividade antibacteriana foi considerada excelente. Já a mistura de triterpenos, uvaol e eritrodiol, isolada das frações hexano e acetato de etila apresentou uma moderada atividade contra *Listeria monocytogenes*, sendo inativa para as demais bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas.

- O extrato bruto não demonstrou relevante atividade anti-inflamatória, não sendo capaz de inibir a fase neurogênica (1ª fase: 0-5 min) da nocicepção induzida pela formalina, e reduzindo apenas parcialmente a segunda fase deste modelo, a fase inflamatória.

Os resultados obtidos com esse trabalho levam a concluir que a espécie testada apresenta metabólitos secundários interessantes e grande potencial biológico, o que permite a continuação do estudo em várias frentes de trabalho.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A´ VILA-PENÃ, D.; PENÃ, N.; QUINTERO, L.; SUAREZ-ROCA, H. Antinociceptive activity of *Syzygium jambos* leaves extract on rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 112, p. 380-385, 2007.

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, p. 19-24, 2001.

AMIRI, A.; DUGAS, R.; PICHOT, A.L.; BOMPEIX, G. In vitro and in vivo activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, v. 126, p. 13-19, 2008.

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

ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 68, p. 307-314, 1999.

AURICCHIO, M.; BACCHI, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 62, n. 1, p. 55-61, 2003.

AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 17, p. 385-396, 2004.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

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.

CHATURVEDI, A.; MOHAN KUMAR, M.; BHAWANI, G.; CHATURVEDI, H.; KUMAR, M.; GOEL, R.K. Effect of ethanolic extract of *Eugenia jambolana* Seeds on gastric ulceration and secretion in rats. *Indian J Physiol Pharmacol.*, v. 51, n. 2, p. 131-140, 2007.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15o. suplemento informativo. Wayne: CLSI, 2005. 177 p. (M. 100/ v.25, n.1).

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, p. 33-39, 1999.

CONSOLINI, A.E.; SARUBBIO, M.G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, n. 1, p. 57-63, 2002.

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

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, p. 63-65, 2009.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, J.A. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, p. 343-356, 2005.

DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control. In: Besson, M.J.; Dickenson, A. *The pharmacology of pain*. Springer-Verlag, Berlin. P. 21-41, 1997.

DZAMIC, A.; SOKOVIC, M.; RISTIC, M.S.; GRIJIC-JOVANOVIC, S.; VUKOJEVIC, J.; MARIN, P.D. Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 45, n. 2, p. 269-271, 2009.

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

EINHELLIG, F.A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A.R.; TANG, Chung-Shih. *The science of allelopathy*. Toronto: John Wiley & Sons, p. 171-187, 1986.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E. *Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, p. 175-204, 2000.

FICHI, G.; FLAMINI, G.; GIOVANELLI, F.; OTRANTO, D.; PERRUCCI, S. Efficacy of an essential oil of *Eugenia caryophyllata* against *Psoroptes cuniculi*. *Experimental Parasitology* v. 115, p. 168-172, 2007.

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

FONTENELLE, G.B.; COSTA, C.G.; MACHADO, R.D. Foliar anatomy and micromorphology of eleven species of *Eugenia L.* (Myrtaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 115, p. 111-133, 1994.

FORGO, P. e KÖVÉR, K.E. Gradient enhanced selective experiments in the ^1H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain

resonances of stigmasterol, a phytosterol derivate. *Steroids*, v. 69, p. 43-50, 2004.

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.

GAYOSO, C.W.; LIMA, V.T.; OLIVEIRA, E.O.; PEREIRA, F.O.; SOUZA, E.L.; LIMA, I.O.; NAVARRO, D.F. Sensivity of fungi isolated from onicomicosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia*, v. 76, n. 2, p. 247-249, 2005.

GÓMEZ-CARAVACA, A.M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURACARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p.1220-1234, 2006.

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, p. 461-470, 2000.

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

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

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine*, v. 27, p.1-93, 2006.

HAN, M.; KIM, S.; AHN, Y. Insecticidal and antifeedant activities of medicinal plant extracts against *Attagenus unicolor japonicus*

(Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Store Products Research*, v. 42, n. 1, p. 15-22, 2006.

HEMAISSWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine*, v. 16, p. 997-1005, 2009.

HONG, C.H.; HUR S.K.; O, O.; KIM, S.K.; NAM, K.A.; LEE, S.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, p. 153-159, 2002.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v. 30, p. 103-114, 1987.

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, p. 883-889, 2003.

ISSAQ, H.J. A decade of capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 21, n.10, p.1921-1939, 2000.

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

JAYATHILAKAN, K.; SHARMA, G.K.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A.S. Antioxidant potential of synthetic and natural antioxidants and its effect on warmed-over-flavour in different species of meat. *Food Chemistry* v. 105 p. 908-916, 2007.

JOLY, A.B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 13 ed. São Paulo: Nacional, 2002. 777p.

JOHNSON, T.L.; FORBES, B.A.; O'CONNOR-SCARLET, M.; MACHINSKI, A.; McCLATCHEY, K.D. Rapid method of MIC

determinations utilizing tetrazolium reduction. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 83, n. 3, p. 374-378, 1985.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, p. 203-210, 2001.

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, p. 105-108, 2003.

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.

KOVGANKO, N.V.; KASHKAN, N.Z.; BORISOV, E.V. ¹³C NMR Spectra of functionally substituted 3-chloroderivatives of cholesterol and α -sitosterol. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 36, n. 6, 2000.

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

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

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

LI, Y.; XU, C.; ZHANG, Q.; LIU, J.; TAN, R. 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.

LOCHER, C.P.; BURCH, M.T.; MOWER, H.F.; BERESTECKY, H.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D.A.;

VLIETINCK, A.J. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 49, n. 1, p. 23-32, 1995.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. *Lancet*, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LONGO, L.; SCARDINO, A.; VASAPOLLO, G.; BLANDO, F. Anthocyanins from *Eugenia myrtifolia* Sims Innovative. *Food Science and Emerging Technologies*, v. 8, n. 329-332, 2007.

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.

MACHADO, K.E.; CECHINEL FILHO, V.; TESSAROLO, R.; MALLMANN, C.; MEYRE-SILVA, C.; BELLA CRUZ, A. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. *Pharmaceutical Biology*, v. 43, p. 636-639, 2005.

MAGINA, M.D.A.; DALMARCO, E.M.; WISNIEWSKI, 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 p. 345-350, 2009a.

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). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, n. 1, p. 171-176, 2009b.

MAGINA, M.D.A. Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero *Eugenia*. Tese de Doutorado - Departamento de Química, UFSC, Florianópolis, 2009.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

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

MEDEIROS, A.R.M. Alelopatia. *Horti Sul*, v. 1, n. 3, p. 27-32, 1990.

MERSKLEY, H. The definition of pain. *European Journal of Psychiatry*, v. 6, p. 153-159, 1991.

MEYRE-SILVA, C.; PETRY, C.M.; BERTE, 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.

MUKHERJE, P.H.; SAHA, K.; MURUGESAN, T.; MANDAL, S.C.; PAL, M.; SAHA, 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.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

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

NONG, C.; HE, W.; FLEMING, D.; PAN, L.; HUANG, H. Capillary electrophoresis analysis of mangiferin extracted from *Mangifera indica* L. bark and *Mangifera persiciformis* C.Y. Wu et T.L. Ming leaves. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 826, p. 226-231, 2005.

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

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, v. 73, p. 236-244, 2006.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, v. 18, p. 414-420, 2007.

ÖZTÜRK, A.; ÖZBEK, H. The anti inflammatory activity of *Eugenia caryophyllata* essential oil: an animal model of anti-inflammatory activity. *Eur J Gen Med.*, v. 2 n. 4, p. 159-163, 2005.

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

PAULETTI, P.M.; ARAÚJO, A.R.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M. Triterpenos de *Styrax camporum*. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 349-352, 2002.

PEPATO, M.T.; MORI, D.M.; BAVIERA, A.M.; HARAMI, J.B.; VENDRAMINI, R.C., BRUNETTI, I.L. Fruit of the jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, n. 1-2, p. 43-48, 2005.

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

POURGHOLAMI, M.H.; KAMALINEJAD, M.; JAVADI, M.; MAJZOOB, 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.

RAHMAN, M.; KUHN, I.; RAHMAN, M.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; MOLBY, R. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 4, p. 2398-2403, 2004.

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.

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, n. 22, p. 2717-2731, 2004.

REITZ, R.D.; KLEIN, R.M. Mirtáceas. In: *Flora Illustrada Catarinense* (Reitz, P. R., ed), I parte. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1969. p 63.

REVILLA, J. *Plantas úteis da bacia amazônica*. Rio de Janeiro: Inpa, 2002 v. 44 p.

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.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 80-84, 2005.

RIYAZ-UL-HASSAN, S.; VERMA, V.; QAZI, G.N. Evaluation of three different molecular markers for the detection of *Staphylococcus*

aureus by polymerase chain reaction. *Food Microbiology*, v. 25, n. 3, p. 452-459, 2008.

SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachylinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides*, v. 31, p. 382-389, 1997.

SCHAPOVAL, E.E.S.; SILVEIRA, S.M.; MIRANDA, C.B.A.; HENRIQUES, A.T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 44, n. 3, p. 137-142, 1994.

SCHMEDA-HIRSCHMAN, G; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; DE 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.

SCHUTZ, A.R. *Introdução a Botânica Sistemática*. 5 ed. Porto Alegre: Ed UFRGS, 1980.

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.

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, B.; VISWANATH, G.; SALUNKE, R.; ROY, P. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food chemistry*, v. 110, n. 3, p. 697-705, 2008a.

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, p.2376-2383, 2008b.

SHINDE, J.; TALDONE, T.; BARLETTA, M.; KUNAPARAJU, N.; HU, B.; KUMAR, S.; PLACIDO, J.; ZITO, W.S. a-Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto–Kakizaki (GK) rats. *Carbohydrate Research* v. 343, p. 1278-1281, 2008.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M.; TERÉNZI, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SIMIRGIOTIS, M.R.; ADACHI, S.; TO, S.; YANG, H.; REYNERTSON, K.A.; BASILE, M.J.; GIL, R.R.; BERNARD WEINSTEIN, I.; KENNELLY, E.J.; Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). *Food Chemistry*, v. 107, p. 813-819, 2008.

SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, p. 135-143, 2004.

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.

SRIVASTAVA, R.; SHAW, A.K.; KULSHRESHTHA, D.K. triterpenoids and chalcone from *Syzygium samarangense*. *Phytochemistry*, v. 38, n. 3, p. 687-689, 1995.

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, p. 1106-1114, 2007.

SUNTORNUSUK, L. Capillary electrophoresis of phytochemical substances. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 27, p. 679 – 698, 2002.

TANAKA, T.; ORII, Y.; NONAKA, G.I.; NISHIOKA, I.; KOUNO, I. Syzyginins A and B, two ellagitannins from *Syzygium aromaticum*. *Phytochemistry*, v. 43, n. 6, p. 1345-1348, 1996.

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

TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROLAND, J.L.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, v. 51, p. 5-17, 1992.

VIKRANT, V.; GROVER, J.K.; TANDON, N.; RATHI, S.S.; GUPTA, N. Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, n. 2, p. 139-143, 2001.

WALL, P.D.; MELZACK, R. *Textbook of pain*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

YANG, L.L.; LEE, C.Y.; YEN, K.Y. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer Letters*, v. 157, p. 65-75, 2000.

YI, JEE-HWAN.; PARK, IL-KWON.; CHOI, KWANG-SIK.; SHIN, SANG-CHEOL.; AHN, YOUNG-JOON. Toxicity of medicinal plant extracts to *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae) and *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 11, n. 4, p. 221-223, 2008.

YOO, C.; HAN, K.; CHO, K.; HA, J.; PARK, H.; NAM, J.; KIL, U.; LEE, K. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters*, v. 225, n. 1, p. 41-52, 2005.

ZHANG, Y.; CHEN, Y. Isobiflorin, a chromone c-glucoside from cloves (*Eugenia caryophyllata*). *Phytochemistry*, v. 45, n. 2, p. 401-403, 1997.

ZHANG, S.; DONG, S.; CHI, L.; HE, P.; WANG, Q.; FANG, Y. Simultaneous determination of flavonoids in chrysanthemum by capillary zone electrophoresis with unning buffer modifiers. *Talanta*, v. 76, p.780-784, 2008.