

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

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *EUGENIA***

MICHELE DEBIASI ALBERTON MAGINA

Florianópolis

2008

Michele Debiasi Alberton Magina

**“ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *EUGENIA*”**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente

Co-Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

**Florianópolis
Universidade Federal de Santa Catarina
2008**

Michele Debiasi Alberton Magina

**“ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *EUGENIA*”**

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa de Pós Graduação em Química

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Inês M. Costa Brighente
Orientadora

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti
Co-Orientador

Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel
(Relator/Depto. de Farmácia/UFPR)

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
(QMC/UFSC)

Prof.^a Dr.^a Maique W. Biavatti
(CCS/ Univali)

Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo
(Depto. Química/ FURB)

Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes
(Depto. de Química/ UFSC)

*Dedico este trabalho ao meu marido Wanderson,
companheiro de todas as horas,
por seu amor, paciência e amizade.*

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por me dar a vida e dar vida à natureza, principal fonte de inspiração para a realização deste trabalho.

À professora Inês, pela oportunidade que me deu de fazer parte deste grupo de pesquisa, pela orientação e confiança em mim depositada. Mesmo em momentos de dificuldade, sempre esteve disposta a me dar estímulo e apoio para desenvolver o trabalho. Ao professor Moacir, pela co-orientação, pelo conhecimento compartilhado e pelas opiniões valiosas nas discussões e no laboratório. Tenham certeza de que aprendi muito com vocês.

Ao meu companheiro Wanderson, meu porto seguro. Obrigada por seu amor, por estar sempre disposto a me ajudar, me compreender com paciência... Não tenho palavras para explicar o tamanho da minha gratidão.

Aos meus pais, pela sólida formação que me deram, obrigada por me proporcionarem a oportunidade de seguir meus estudos, para que hoje eu pudesse estar aqui. A toda a minha família, inclusive a “emprestada”, meus sinceros agradecimentos por estarem sempre presentes na minha vida.

À minha querida amiga Beatriz, pelo grande prazer que tive em trabalharmos e convivermos juntas desde o mestrado. Muito obrigada por sua amizade e por tudo que me ensinou com sua dedicação e profissionalismo.

Aos amigos Juliana e Eduardo, obrigada pela colaboração na realização da atividade antibacteriana, amizade e também pelos bons momentos de descontração que passamos juntos.

A todos os colegas de laboratório: Heros, Fabiana, Aline, Andressa, Solomon, Guedes, Luciana, Analice, Verdi (*in memoriam*), pelos bons momentos que compartilhamos nestes anos. Gostaria de fazer um agradecimento especial aos colegas Henrique e Munique, que me auxiliaram na realização dos ensaios de atividade biológica e ao Cristian, que me auxiliou nas reações de modificação estrutural.

Ao professor Gustavo Amadeu Micke e Michele Barcellos, pelas análises por eletroforese capilar.

Aos professores Alberto Wisniewski Jr. e Edésio Luiz Simionatto do IPTB-FURB, pelas análises por CG-EM dos óleos essenciais.

Aos professores Michel Fleith Otuki e Daniela Almeida Cabrini da UFPR, pela realização dos ensaios de atividade antiinflamatória. À professora Maria Aparecida de

Resende e Susana Johann da UFMG, pela realização dos ensaios de atividade antifúngica.

Aos funcionários da Central de Análises da UFSC, pelos espectros de IV e RMN.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e contribuírem na avaliação da tese.

À FURB, especialmente ao Departamento de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio dado na realização do trabalho.

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

Muito obrigada!

Michele

O homem; as viagens

O homem, bicho da Terra tão pequeno
 chateia-se na Terra
 lugar de muita miséria e pouca diversão,
 faz um foguete, uma cápsula, um módulo
 toca para a Lua, desce cauteloso na Lua
 pisa na Lua, planta bandeirola na Lua
 experimenta a Lua, coloniza a Lua
 civiliza a Lua, humaniza a Lua.

Lua humanizada: tão igual à Terra.
 O homem chateia-se na Lua.
 Vamos para Marte — ordena a suas máquinas.
 Elas obedecem, o homem desce em Marte
 pisa em Marte, experimenta
 coloniza, civiliza
 humaniza Marte com engenho e arte.

Marte humanizado, que lugar quadrado.
 Vamos a outra parte?
 Claro — diz o engenho sofisticado e dócil.
 Vamos a Vênus.
 O homem põe o pé em Vênus,
 vê o visto — é isto?
 idem, idem, idem.

(...)

Outros planetas restam para outras colônias.
 O espaço todo vira Terra-a-terra.
 O homem chega ao Sol ou dá uma volta
 só para tiver?
 Não-vê que ele inventa
 roupa insidervel de viver no Sol.
 Põe o pé e:
 mas que chato é o Sol, falso touro
 espanhol domado.

Restam outros sistemas fora
 do solar a colonizar.
 Ao acabarem todos só resta ao homem (estará equipado?)
 a difícilíssima dangerousíssima viagem
 de si a si mesmo: pôr o pé no chão
 do seu coração
 experimentar
 colonizar
 civilizar
 humanizar
 o homem
 descobrindo em suas próprias inexploradas entranhas
 a perene, insuspeitada alegria
 de con-viver.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A pesquisa em produtos naturais apresenta um grande potencial para a descoberta de novas substâncias químicas bioativas, devido a enorme diversidade de compostos químicos que as plantas desenvolveram durante milhões de anos. Algumas espécies de *Eugenia* (Myrtaceae), como *E. jambolana* e *E. uniflora*, foram amplamente estudadas do ponto de vista químico e farmacológico, mostrando um perfil fitoquímico interessante, contendo flavonóides e triterpenos principalmente, e uma diversidade de atividades, como antibacteriana, hipoglicemiante, antiinflamatória, antioxidante, entre outras. Porém, as espécies *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana* e *Eugenia umbelliflora*, conhecidas como “grumixama”, “ingabaú” e “baguaçu”, respectivamente, foram pouco estudadas. Levando em consideração o potencial terapêutico e os compostos descritos para o gênero, o objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico destas espécies, e em adição, avaliar os efeitos biológicos dos extratos, frações e compostos isolados das mesmas. Foram preparados extratos brutos das partes aéreas das espécies, que foram submetidos ao fracionamento por partição líquido-líquido. O fracionamento cromatográfico das frações de *E. beaurepaireana* levou ao isolamento dos triterpenos α -amirina e β -amirina, em mistura, β -sitosterol e ácido gálico. De *E. brasiliensis* foram isolados uma mistura de α -amirina e β -amirina, betulina, ácido 29-hidroxi-oleanólico, e o flavonóide quercetina, juntamente com catequina e galocatequina. A análise da fração acetato de etila desta última espécie através da eletroforese capilar levou à caracterização de flavonóides glicosilados, derivados das agliconas quercetina e miricetina, provavelmente também ligados ao ácido gálico. O isolamento da betulina em quantidade suficiente permitiu a realização de modificações em sua estrutura utilizando os grupos hidroxila primário e secundário presentes nesta molécula. Foram obtidos dois derivados oxidados e seis esterificados. A atividade antibacteriana dos derivados foi avaliada contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Alguns compostos, como os derivados di-oxidados e di-acetilados mostraram atividade interessante contra as bactérias gram-negativas e melhora em relação à atividade da betulina. Os óleos essenciais das três espécies foram extraídos e sua composição foi determinada através de CG-EM. Para *E. brasiliensis*, os compostos majoritários foram o espatulenol (12,60 %) e o τ -cadinol (8,68 %); no óleo de *E. beaurepaireana*, os compostos presentes em maior quantidade foram o β -cariofileno (7,97 %) e o biciclogermacreno (7,24 %), e no óleo essencial de *E. umbelliflora* os compostos majoritários foram o viridiflorol (17,74 %) e o aromadendreno (6,90%). A atividade antibacteriana dos óleos também foi avaliada contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, e todas as amostras mostraram-se ativas

contra ao menos uma das bactérias testadas. Os extratos brutos e frações de *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora* foram testados também quanto à sua letalidade em larvas de *A. salina*, atividade antioxidante, atividade antibacteriana e antifúngica. O extrato bruto, frações e compostos fenólicos isolados de *E. brasiliensis* foram avaliados ainda quanto à sua atividade antiinflamatória tópica. Os resultados encontrados no trabalho permitem concluir que as espécies estudadas apresentam metabólitos secundários interessantes e grande potencial biológico, o que permite a continuação do estudo em várias frentes de trabalho.

Palavras chave: *Eugenia*, investigação fitoquímica, atividade biológica.

ABSTRACT

The research in natural products has great potential for the discovery of new bioactive molecules, due to the enormous diversity of chemical compounds that plants have developed over millions of years. Some species of *Eugenia* (Myrtaceae), e.g. *E. jambolana* and *E. uniflora* have been widely studied from chemical and pharmacological aspects, showing an interesting phytochemical profile, containing mainly flavonoids and triterpenes, and showing diversity of activities such as antibacterial, hypoglycemic, antiinflammatory, antioxidant, and others. However, the species *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana* and *Eugenia umbelliflora*, known as "grumixama", "ingabaú" and "baguaçu" respectively, have been little studied. Considering the therapeutic potential and the compounds described for the genus, the objective of this study was the phytochemical study of these species, and in addition, to search the biological effects of the extracts, fractions and compounds isolated from these species. Crude extracts were prepared from the aerial parts of species, which were submitted to fractionation by liquid-liquid partition. Chromatographic fractionation of fractions of *E. beaurepaireana* led to the isolation of triterpenes α -amyrin and β -amyrin, in mixture, β -sitosterol and gallic acid. From *E. brasiliensis* fractions were isolated a mixture of α -amyrin and β -amyrin, betulin, 29-hydroxy-oleanolic acid, the flavonoid quercetin, catechin and gallocatechin. The analysis of the ethyl acetate fraction of the latter species by capillary electrophoresis led to the characterization of flavonoid glycosides, derivatives of the aglycones quercetin and myricetin, probably linked to gallic acid. The isolation of betulin in sufficient quantity allowed the implementation of changes in its structure using primary and secondary hydroxyl groups in this molecule. Were obtained eight derivatives, two oxidized and six esterified. The antibacterial activity of derivatives was evaluated against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. Some compounds, such as di-oxidized and di-acetylated derivatives showed interesting activity against gram-negative bacteria and improves on the activity of betulin. The essential oils of three species were extracted and its composition was determined by GC-MS. For *E. brasiliensis*, the major compounds were spathulenol (12.60 %) and τ -cadinol (8.68 %); in the *E. beaurepaireana* oil, the major compounds were β -caryophyllene (7.97 %) and bicyclogermacrene (7.24 %); and in the *E. umbelliflora* oil the major compounds were the viridiflorol (17.74 %) and aromadendrene (6.90%). The antibacterial activity of oils was also evaluated against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*, and all samples were shown to be active against at least one of the bacteria. The crude extracts and fractions of *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* and *E. umbelliflora* were also tested against larvae of *A. salina*, and its

antioxidant, antibacterial and antifungal activities were evaluated. Topical anti-inflammatory activity of the crude extract, fractions and phenolic compounds isolated from *E. brasiliensis* were also evaluated. The results show that the studied species have interesting secondary metabolites and biological potential, which allows the continuation of the study on several fronts to work.

Keywords: *Eugenia*, phytochemical study, biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Moléculas de origem vegetal usadas como medicamentos ou protótipos para a produção de fármacos.....	7
Figura 2. Espécies representantes da família Myrtaceae.....	11
Figura 3. Estrutura da casuarinina, um tanino hidrolisável isolado do gênero <i>Eugenia</i>	13
Figura 4. Estrutura de antocianinas isoladas de espécies de <i>Eugenia</i>	13
Figura 5. Esqueleto básico dos flavonóis e flavonas.....	14
Figura 6. Principais agliconas com esqueleto tipo flavonol encontradas em espécies do gênero <i>Eugenia</i>	14
Figura 7. Flavonóides e outros compostos fenólicos isolados de espécies do gênero <i>Eugenia</i>	15
Figura 8. Compostos triterpênicos e esteroidais encontrados em plantas do gênero <i>Eugenia</i>	18
Figura 9. Componentes terpênicos de óleos essenciais encontrados em plantas do gênero <i>Eugenia</i>	19
Figura 10. Aspecto de folhas, flores e frutos de <i>Eugenia brasiliensis</i>	22
Figura 11. Aspecto da árvore, folhas e frutos de <i>Eugenia beaurepaireana</i>	23
Figura 12. Aspecto de folhas e frutos de <i>Eugenia umbelliflora</i>	24
Figura 13. Fracionamento da fração insolúvel das folhas de <i>E. beaurepaireana</i>	31
Figura 14. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃), dos compostos 51 e 52. Ampliação da região entre 5,0 – 5,3 ppm.....	33
Figura 15. Cromatograma comparativo da fração 10 da coluna 2 (compostos 51 e 52) e padrão da mistura de α e β-amirina (Coluna: DB-1 (30 m x 0,25 mm); T injetor: 300 °C; T detector: 290 °C; esquema de aquecimento: 200 – 300 °C, 10 °C/ min).....	34
Figura 16. Compostos extraídos de <i>E. beaurepaireana</i> e <i>E. brasiliensis</i>	35
Figura 17. Fracionamento da fração AcOEt das folhas de <i>E. beaurepaireana</i>	38
Figura 18. Fracionamento da fração insolúvel das folhas de <i>E. brasiliensis</i>	39
Figura 19. Esquema de fracionamento da fração hexano das folhas de <i>E. brasiliensis</i>	41
Figura 20. Fracionamento da fração diclorometano das folhas de <i>E. brasiliensis</i>	42
Figura 21. Fracionamento da fração AcOEt das folhas de <i>E. brasiliensis</i>	44
Figura 22. Compostos fenólicos isolados da fração acetato de etila das folhas de <i>E. brasiliensis</i>	45

Figura 23. Eletroferogramas.....	49
Figura 24. Espectro de UV de *a (heterosídeo flavonoídico, fração AcOEt) (A) e rutina (B).....	49
Figura 25. Esquema reacional para obtenção de derivados oxidados da betulina.....	52
Figura 26. Esquema reacional para obtenção dos derivados esterificados da betulina.....	53
Figura 27. Porcentagem de monoterpenos e sesquiterpenos encontrados nos óleos essenciais de <i>Eugenia</i>	61
Figura 28. Cromatograma dos óleos essenciais de <i>E. brasiliensis</i> (1), <i>E. beaurepaireana</i> (2) e <i>E. umbelliflora</i> (3).....	63
Figura 29. Espectro de massas do espatulenol (A), em comparação ao espectro da biblioteca NIST 98 (B).....	65
Figura 30. Espectro de massas do 1,8-cineol (A), em comparação ao espectro da biblioteca NIST 98 (B).....	65
Figura 31. Espectro de massas do alfa-pineno (A), em comparação ao espectro da biblioteca NIST 98 (B).....	66
Figura 32. Espectro de massas do beta-pineno (A), em comparação á literatura (B) (ADAMS, 2007).....	66
Figura 33. Espectro de massas do β -cariofileno (A), em comparação ao espectro da biblioteca NIST 98 (B).....	67
Figura 34. Espectro de massas do viridiflorol (A), em comparação ao espectro da biblioteca NIST 98 (B).....	67
Figura 35. Complexo formado entre a estrutura do flavonóide quercetina e o reagente $AlCl_3$	77
Figura 36. Equação básica da reação do DPPH com um flavonóide.....	79
Figura 37. Estrutura do ácido ascórbico.....	81
Figura 38. Concentração de compostos fenólicos (mg ácido gálico/g de extrato ou fração) (A) e flavonóides (mg ácido gálico/g de extrato ou fração) (B) do extrato e frações das folhas de <i>E. brasiliensis</i> vs. potencial redutor (mg ácido ascórbico/g extrato ou fração).....	83
Figura 39. Ação protetora contra a peroxidação lipídica de extratos e frações de folhas e caules de <i>E. brasiliensis</i> , <i>E. beaurepaireana</i> e <i>E.umbelliflora</i>	84
Figura 40. Estrutura do 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).....	99
Figura 41. Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>E. brasiliensis</i> e da dexametasona (dexa) administrados topicamente sobre o edema de orelha induzida pelo óleo de	

cróton.....	99
Figura 42. Efeito das frações da <i>E. brasiliensis</i> , Diclorometano (A), Hexano (B) e Acetato de etila (C), e da dexametasona (dexa) administrados topicamente no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.....	100
Figura 43. Efeito dos compostos isolados da fração acetato de etila da <i>E. brasiliensis</i> administrados topicamente no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.....	101
Figura 44. Efeito do extrato da <i>E. brasiliensis</i> e da indometacina (indo) administrados topicamente no edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (2 mg/orelha).....	102
Figura 45. Efeito do extrato hidroalcoólico da <i>E. brasiliensis</i> administrado topicamente sobre a atividade da enzima mieloperoxidase induzida pelo óleo de cróton.....	103
Figura 46. Efeito dos compostos isolados da fração acetato de etila de <i>E. brasiliensis</i> administrados topicamente sobre a atividade da enzima mieloperoxidase.....	104
Figura 47. Fotos representativas de cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x) 24 h após a aplicação de óleo de cróton.....	105
Figura 48. Fluxograma dos procedimentos adotados no trabalho.....	114
Figura 49. Procedimento de fracionamento adotado para os extratos vegetais.....	115
Figura 50. Estruturas da gentamicina (A) e oxacilina (B).....	126
Figura 51. Estrutura da anfotericina B.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimentos dos extratos brutos das espécies de <i>Eugenia</i> estudadas.....	28
Tabela 2. Análise fitoquímica preliminar dos extratos brutos das folhas das espécies de <i>Eugenia</i> estudadas.....	29
Tabela 3. Rendimentos das frações obtidas a partir do extrato bruto hidroalcoólico das espécies de <i>Eugenia</i> estudadas.....	30
Tabela 4. Valores de deslocamento de RMN ¹ H (ppm, CDCl ₃ , 400 MHz) de triterpenóides e esteróides isolados das espécies de <i>Eugenia</i>	35
Tabela 5. Valores de deslocamento de RMN ¹³ C (ppm, CDCl ₃ , 100 MHz) de triterpenóides e esteróides isolados das espécies de <i>Eugenia</i>	36
Tabela 6. Valores de deslocamento de RMN ¹ H (ppm, CD ₃ OD, 400 MHz) de compostos fenólicos isolados da fração AcOEt de <i>Eugenia brasiliensis</i>	45
Tabela 7. Valores dos principais deslocamentos químicos de RMN ¹ H dos derivados preparados a partir do triterpeno betulina.....	54
Tabela 8. Concentração inibitória mínima dos derivados da betulina.....	55
Tabela 9. Compostos identificados (%) nos óleos essenciais das três espécies analisadas.....	58
Tabela 10. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) (µL/mL) dos óleos essenciais de espécies de <i>Eugenia</i>	68
Tabela 11. Toxicidade de extratos e frações de <i>E. brasiliensis</i> , <i>E. beaurepaireana</i> e <i>E. umbelliflora</i> sobre larvas de <i>A. salina</i>	72
Tabela 12. Teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos e frações das espécies estudadas.....	75
Tabela 13. Teor de flavonóides presentes nos extratos e frações das espécies estudadas.....	77
Tabela 14. Capacidade sequestrante do radical livre DPPH (IC ₅₀ [*] - µg/mL) nos extratos e frações das espécies estudadas.....	80
Tabela 15. Potencial redutor* dos extratos e frações das espécies estudadas.....	81
Tabela 16. Inibição da peroxidação lipídica (%)* pelos extratos e frações das espécies estudadas.....	86
Tabela 17. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) (mg/mL) de extratos e frações de folhas e caules de <i>E. brasiliensis</i>	88
Tabela 18. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) (mg/mL) de extratos e frações de folhas e caules de <i>E. beaurepaireana</i>	89
Tabela 19. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM)	

(mg/mL) de extratos e frações de folhas e caules de <i>E. umbelliflora</i>	90
Tabela 20. Atividade antifúngica (concentração inibitória mínima, µg/mL) de extratos e frações de caule e folhas de <i>E. brasiliensis</i>	95
Tabela 21. Atividade antifúngica (concentração inibitória mínima, µg/mL) de extratos e frações de caule e folhas de <i>E. beaurepaireana</i>	96
Tabela 22. Atividade antifúngica (concentração inibitória mínima, µg/mL) de extratos e frações de caule e folhas de <i>E. umbelliflora</i>	97

LISTA DE ABREVIATURAS

δ - deslocamento químico

AA – ácido ascórbico

Ac₂O – anidrido acético

AcOEt – acetato de etila

AG – ácido gálico

ATCC – *American type culture collection*

BHT - 2,6-di-terc-butil-4-hidroxitolueno

BuOH - butanol

CBM – concentração bactericida mínima

CC – cromatografia em coluna

CCD – cromatografia em camada delgada

CG – cromatografia gasosa

CG-EM - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CIM – concentração inibitória mínima

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

COX – 2 - ciclooxigenase-2

d – duplete

DAD – detector de arranjo de diodo

DCM - diclorometano

dd – duplo duplete

dexa - dexametasona

DI₅₀ – dose inibitória 50 %

DL₅₀ – dose letal 50 %

DMAP – dimetilaminopiridina

DMSO - dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EC – eletroforese capilar

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

Et₃N - trietilamina

Et₂O – éter di-etílico

EtOH - etanol

FID – detector de ionização em chama

H_{equat.} – hidrogênio equatorial

HEX – hexano

HL-60 - linhagem celular de leucemia
HTAB – brometo de hexadeciltrimetilamônio
IC₅₀ – concentração inibitória 50 %
IC₉₅ – índice de confiança para $\alpha = 0,05$
IM – inibição máxima
IR (E) – índice de retenção experimental
IR (T) – índice de retenção teórico
IV – infravermelho
J – constante de acoplamento
LDL – colesterol de baixa densidade
m - múltiplo
mDO – milidensidade óptica
MeOH - metanol
M.M. – massa molecular
MPO - mieloperoxidase
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina
P.A. – para análise
PBS – tampão fosfato de sódio
PCC – clorocromato de piridinium
py – piridina
QUE - quercetina
Rf - fator de retenção
r.t. – temperatura ambiente
RMN ¹H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono treze
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*
SAR – relação estrutura- atividade
SK-HEP-1 - linhagem celular de adenocarcinoma
s – singlete
spp. - espécies
TPA – 12-O-tetradecanoil-13-acetato
Tr/min. – tempo de retenção (minutos)
TMS – tetrametilsilano
TSB – Caldo tripticaseína-soja
UFC – unidade formadora de colônia
UV – ultravioleta
UV/Vis – ultravioleta/visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Metabolismo vegetal.....	5
2.2. O uso de produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos.....	5
2.3. Fármacos obtidos através da modificação estrutural de produtos naturais.....	8
2.4. Ensaio para a verificação da atividade biológica de produtos naturais....	9
2.5. Família Myrtaceae.....	10
2.6. Considerações sobre o gênero <i>Eugenia</i>.....	11
2.6.1. Usos populares de plantas do gênero <i>Eugenia</i>	12
2.6.2. Compostos isolados de plantas do gênero <i>Eugenia</i>	12
2.6.3. Atividades farmacológicas descritas para o gênero <i>Eugenia</i>	19
2.6.4. <i>Eugenia brasiliensis</i> , <i>Eugenia beaurepaireana</i> e <i>Eugenia umbelliflora</i>	21
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral.....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Estudo fitoquímico das espécies de <i>Eugenia</i>.....	28
4.1.1. Obtenção dos extratos vegetais.....	28
4.1.2. Análise fitoquímica preliminar dos extratos brutos.....	28
4.1.3. Fracionamento líquido-líquido dos extratos brutos.....	30
4.1.4. Fracionamento cromatográfico de <i>Eugenia beaurepaireana</i>	30
4.1.4.1. Fracionamento da fração insolúvel.....	31
4.1.4.2. Fracionamento da fração acetato de etila.....	37
4.1.5. Fracionamento cromatográfico de <i>Eugenia brasiliensis</i>	39
4.1.5.1. Fracionamento da fração insolúvel.....	39
4.1.5.2. Fracionamento da fração hexano.....	40
4.1.5.3. Fracionamento da fração diclorometano.....	41
4.1.5.4. Fracionamento da fração acetato de etila.....	43
4.1.6. Análise da fração acetato de etila das folhas de <i>E. brasiliensis</i> através de eletroforese capilar.....	47
4.2. Modificação estrutural de obtenção de derivados da betulina.....	50
4.2.1. Obtenção dos derivados oxidados da betulina.....	51
4.2.2. Obtenção dos derivados esterificados da betulina.....	52
4.2.3. Atividade antibacteriana dos derivados da betulina.....	54

4.3. Avaliação química e biológica dos óleos essenciais das espécies de <i>Eugenia</i>.....	56
4.3.1. Avaliação da composição do óleo essencial de <i>E. brasiliensis</i> , <i>E. beaurepaireana</i> e <i>E. umbelliflora</i>	56
4.3.2. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das espécies de <i>Eugenia</i>	68
4.4. Avaliação da atividade biológica dos extratos brutos, frações e compostos isolados das espécies de <i>Eugenia</i>.....	70
4.4.1. Avaliação da letalidade utilizando larvas de <i>Artemia salina</i>	70
4.4.2. Avaliação da atividade antioxidante.....	73
4.4.2.1. Avaliação do conteúdo de compostos fenólicos totais.....	74
4.4.2.2. Avaliação do conteúdo de flavonóides.....	76
4.4.2.3. Avaliação da ação seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	78
4.4.2.4. Determinação do potencial redutor.....	80
4.4.2.5. Verificação do potencial protetor contra a peroxidação lipídica.....	83
4.4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	86
4.4.3.1. Atividade antibacteriana.....	87
4.4.3.2. Atividade antifúngica.....	93
4.4.4. Determinação da atividade antiinflamatória tópica.....	98
4.4.4.1. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton.....	98
4.4.4.2. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico.....	101
4.4.4.3. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase tecidual.....	103
4.4.4.4. Análise histológica.....	105
5. CONCLUSÕES.....	107
6. METODOLOGIA.....	112
6.1. Materiais utilizados.....	112
6.2. Equipamentos.....	112
6.3. Material vegetal.....	113
6.4. Análise fitoquímica das espécies de <i>Eugenia</i>.....	114
6.4.1. Preparação dos extratos vegetais.....	114
6.4.2. Análise fitoquímica preliminar dos extratos brutos.....	115
6.4.3. Procedimentos de fracionamento dos extratos vegetais.....	115
6.4.4. Análise da fração acetato de etila das folhas de <i>E. brasiliensis</i> através de eletroforese capilar.....	117
6.5. Modificação estrutural de obtenção dos derivados da betulina.....	117

6.5.1. Obtenção dos derivados oxidados da betulina.....	117
6.5.1.1. Obtenção do ácido betulínico (Ácido lup-20(29)-eno, 3 β -ol, 28-óico) (60).....	117
6.5.1.2. Obtenção do ácido betulônico (Ácido lup-20(29)-eno, 3-oxo, 28-óico) (61).....	118
6.5.2. Obtenção dos derivados esterificados da betulina.....	118
6.5.2.1. 28-acetato de betulina- (Lup-20(29)-eno,-3 β -ol,28-acetato) (62).....	118
6.5.2.2. 3,28-diacetato de betulina- (Lup-20(29)-eno, 3,28-diacetato) (63).....	119
6.5.2.3. 3,28-dibutanoato de betulina (Lup-20(29)-eno, 3,28-dibutanoato) (64).....	119
6.5.2.4. 3,28-dihexanoato de betulina (Lup-20(29)-eno, 3,28-dihexanoato) (65).....	119
6.5.2.5. 3,28-dioctanoato de betulina (Lup-20(29)-eno, 3,28-dioctanoato) (66).....	120
6.5.2.6. 3,28-didecanoato de betulina (Lup-20(29)-eno, 3,28-didecanoato) (67).....	120
6.6. Extração e análise dos óleos essenciais de <i>E. brasiliensis</i>, <i>E. beaurepaireana</i> e <i>E. umbelliflora</i>.....	121
6.7. Avaliação da atividade biológica dos extratos, frações e compostos isolados das espécies de <i>Eugenia</i>.....	122
6.7.1. Determinação da letalidade usando larvas de <i>Artemia salina</i> (TAS).....	121
6.7.2. Determinação da atividade antioxidante.....	122
6.7.2.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais nas amostras.....	122
6.7.2.2. Determinação do teor de flavonóides nas amostras.....	123
6.7.2.3. Determinação da ação seqüestradora do radical livre DPPH (2,2-Difenil-picril-hidrazil).....	123
6.7.2.4. Determinação do potencial redutor.....	124
6.7.2.5. Determinação do potencial inibidor da peroxidação lipídica.....	124
6.7.3. Determinação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	125
6.7.3.1. Determinação da atividade antibacteriana.....	125
6.7.3.2. Determinação da atividade antifúngica.....	127
6.7.4. Determinação da atividade antiinflamatória tópica.....	128
6.7.4.1. Animais.....	128
6.7.4.2. Avaliação do edema de orelha.....	129
6.7.4.3. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton.....	129
6.7.4.4. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico.....	129
6.7.4.5. Medida da atividade enzimática da mieloperoxidase.....	130
6.7.4.6. Análise histológica.....	130
6.7.4.7. Análise Estatística.....	131
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
8. ANEXOS.....	150

1. Introdução

Os vegetais sempre estiveram presentes na vida do homem, fornecendo os mais diversos materiais, como alimentos, vestuário, habitação, utilidades domésticas, produção de meios de transporte e recursos terapêuticos para a cura de suas doenças.

Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais, ou seja, as plantas e seus extrativos constituíam a maioria dos medicamentos. Com a revolução industrial e o desenvolvimento da química orgânica, esses recursos começaram a ser estudados e estabeleceu-se a tendência da utilização das substâncias ativas isoladas. Esse fato resultou na preferência por medicamentos sintéticos para o tratamento das doenças, devido à facilidade de obtenção e baixo custo destes compostos. A descoberta das substâncias ativas das plantas contribuiu rapidamente para o desenvolvimento do arsenal terapêutico atual.

É impressionante o fato destes produtos encontrados na natureza revelarem uma imensa gama de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas; apesar do aumento de estudos nesta área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17 % das espécies vegetais existentes foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal.

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo. Sua flora corresponde a cerca de 20 % de todas as espécies conhecidas no mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 e 550.000. 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 úteis ao homem. O gênero *Eugenia*, um dos maiores desta família, a qual pertencem as plantas selecionadas para a realização deste trabalho, chama a atenção pelo seu potencial terapêutico. Vários estudos desenvolvidos com espécies deste gênero mostraram resultados promissores, como atividade antiinflamatória, antibacteriana, citotóxica e antitumoral, tripanocida, antiviral contra o vírus Epstein-barr, hipoglicemiante e estimulante da liberação de insulina, entre outros. Deste gênero foram isolados principalmente compostos fenólicos, incluindo os flavonóides e taninos, além de compostos terpênicos, como os de esqueleto triterpênico. Além destes, vários óleos essenciais de espécies pertencentes a este gênero também foram estudados.

Levando em consideração o potencial terapêutico e os compostos já descritos para espécies do gênero *Eugenia*, e que algumas espécies deste gênero ainda

apresentam poucos estudos na literatura, como *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana* e *Eugenia umbelliflora*, o objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico destas espécies, com o intuito de contribuir para a elucidação das substâncias presentes nestas plantas, além de avaliar os possíveis efeitos biológicos dos extratos, frações e compostos isolados das mesmas.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Metabolismo vegetal

Durante milhões de anos, a natureza desenvolveu uma enorme diversidade biológica, e estimava-se que, em 1998, existissem ao menos 250.000 espécies vegetais, 30 milhões de espécies de insetos e 1,5 milhões de espécies de fungos. Estas espécies coexistem em ecossistemas e interagem umas com as outras através de mecanismos químicos, por exemplo, de defesa ou simbiose. Estes organismos, de uma maneira geral, possuem um metabolismo em comum, essencial à sua sobrevivência, chamado de **metabolismo primário**, mas em adição, produzem uma grande variedade de compostos chamados **metabólitos secundários**, que, apesar de não serem essenciais à sobrevivência das espécies, estão envolvidos nestas interações. Considerando o número de espécies citado, existe um número infinito de interações possíveis, e conseqüentemente uma grande variedade destes compostos presentes nestes organismos (VEERPORTE, 1998).

Uma grande diversidade de metabólitos secundários complexos biossintetizados pelas plantas evoluiu como forma de mecanismo de defesa às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos e animais. Os vegetais, enraizados no solo, não podem responder ao meio ambiente pelas vias possíveis aos animais, necessitando produzir metabólitos como condição de adaptação e regulação (HARBORNE, 1988).

Os metabólitos secundários, por serem então fatores de interação entre organismos, na maioria das vezes apresentam atividades biológicas interessantes. Muitos destes compostos são de importância na área farmacêutica, pois representam uma fonte promissora para a descoberta de novas moléculas úteis ao homem (SANTOS, 2003).

2.2. O uso de produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos

A natureza é uma das mais importantes fontes de descoberta de novos medicamentos. De 520 novos fármacos aprovados entre 1983 e 1994, 78 % dos medicamentos recomendados para o tratamento de doenças infecciosas e 61 % dos antineoplásicos eram provenientes de produtos naturais e seus derivados (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006). E ainda, dos 20 medicamentos mais vendidos mundialmente em 1999, 9 deles eram derivados ou foram desenvolvidos com base em pesquisas sobre produtos naturais (HARVEY, 2000).

Os primeiros registros do uso de plantas como medicamentos datam de 2600 a.C., na Mesopotâmia, onde determinadas espécies como *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) e *Papaver somniferum* (papoula), usadas até hoje, eram empregados para tratamento

de tosse, resfriados e infecções parasitárias (GURIB-FAKIM, 2006). Antes do início do século XX, o uso dos produtos naturais se limitava principalmente ao uso de extratos e preparados a partir de plantas, baseado na observação empírica do efeito causado pela sua administração. Pouco se conhecia a respeito da química de plantas medicinais (CLARK, 2002).

Os metabólitos secundários produzidos por plantas tiveram um papel fundamental no desenvolvimento de fármacos e da química sintética moderna. Historicamente, a química orgânica desenvolveu-se paralelamente ao estudo da química de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando algumas substâncias ativas de plantas foram isoladas. Eventos como o isolamento do princípio ativo anti-malárico, a quinina, das cascas do caule de espécies de *Cinchona* (*Cinchona officinalis*), reportado em 1820 por farmacêuticos franceses, o isolamento da morfina do ópio produzido nas flores de papoula (*Papaver somniferum*), e da salicilina e ácido salicílico das cascas do salgueiro (*Salix alba*) contribuíram para o desenvolvimento da fitoquímica, química medicinal e farmacologia (CLARK, 2002; BARREIRO e FRAGA, 2001).

Esse processo resultou na inserção de compostos isolados na terapêutica, que continuam, até hoje, sendo empregados para o tratamento de algumas doenças, a exemplo da morfina, quinina e cocaína (figura 1) (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

A indústria farmacêutica reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal depois da descoberta de fármacos complexos, como o taxol (figura 1), entre outros, difícil de ser obtido por um processo sintético de custo racional (HARVEY, 2000). Outro aspecto importante do metabolismo vegetal é a obtenção de substâncias enantiomericamente puras. Após os episódios de teratogenicidade causados pelo enantiômero (-) da talidomida, a preocupação com os produtos quirais intensificou-se, sendo um desafio para a produção em laboratório, que a natureza realiza de maneira excepcional (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Durante os últimos 40 anos, vários fármacos foram desenvolvidos a partir de plantas, incluindo as espécies de *Dioscorea*, ricas em saponinas esteroidais, que através de algumas modificações estruturais deram origem aos contraceptivos usados na terapêutica; o alcalóide reserpina (figura 1), e outros alcalóides anti-hipertensivos e tranqüilizantes extraídos do gênero *Rauwolfia*; a pilocarpina, utilizada para o tratamento do glaucoma, derivada de espécies de *Pilocarpus* (jaborandi); dois potentes antitumorais, vincristina (figura 1) e vinblastina, extraídos de *Cathartus roseus* (maria-sem-vergonha); laxantes derivados de espécies de *Cassia* (sene), e agentes cardiotônicos, como a digoxina, derivados de espécies de *Digitalis* (dedaleira) são usados na clínica médica nos dias de hoje (GURIB-FAKIM, 2006).

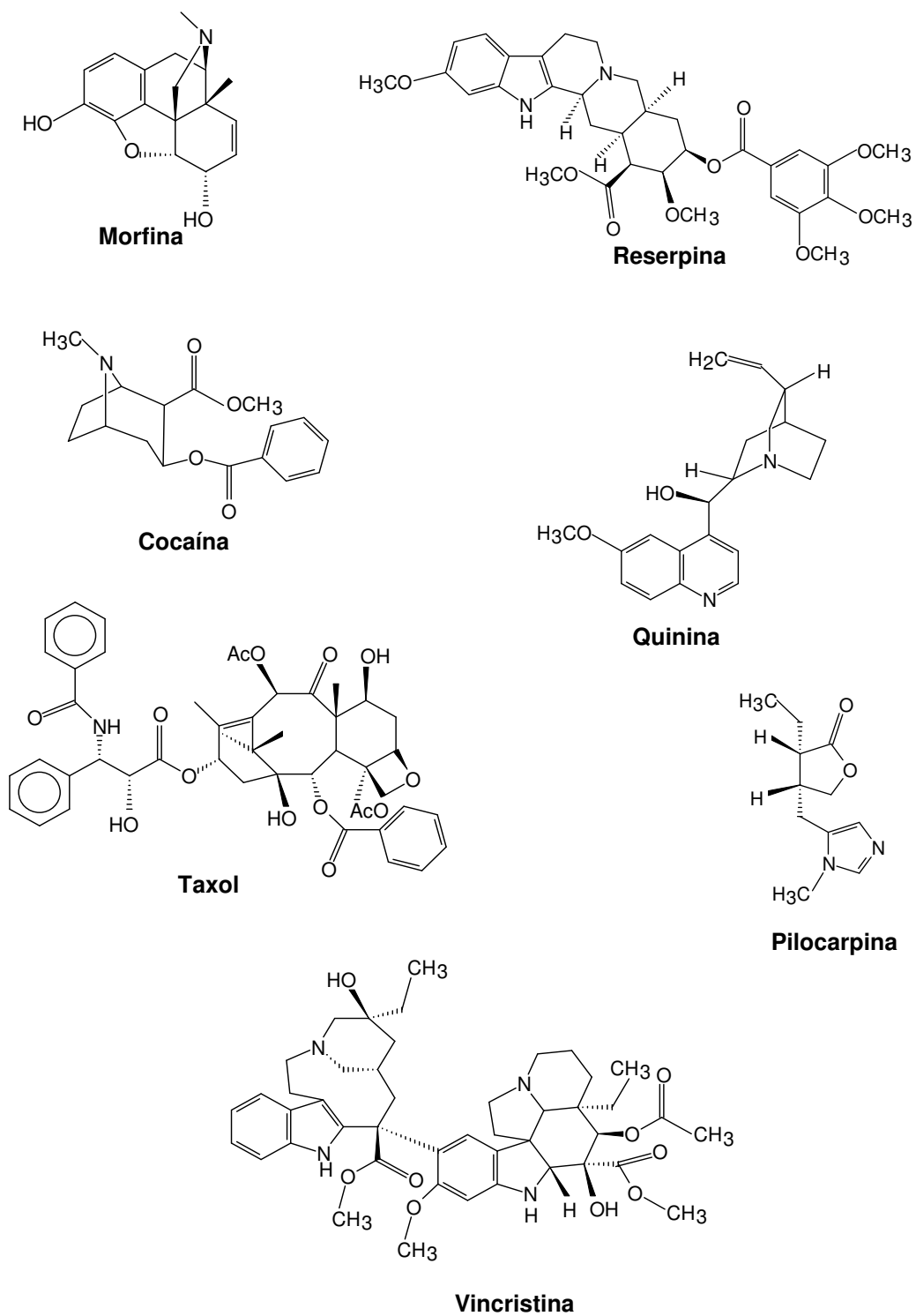


Figura 1. Moléculas de origem vegetal usadas como medicamentos ou protótipos para a produção de fármacos.

2.3. Fármacos obtidos a partir da modificação estrutural de produtos naturais

A pesquisa em produtos naturais é uma das maiores fontes para a descoberta de novas substâncias químicas bioativas, que podem ser usadas como matrizes para a descoberta de novos fármacos. A avaliação e confirmação iniciais da bioatividade de uma substância frente a um determinado alvo biológico (receptor ou enzima) não caracterizam que esse princípio ativo torne-se necessariamente um novo fármaco, mas poderá ser um novo composto protótipo.

Muitas vezes, substâncias bioativas de origem vegetal não possuem propriedades de absorção e distribuição ideais para que se tornem um fármaco, porém, podem ser adequadas através de modificações moleculares racionalmente planejadas na estrutura deste protótipo, em um projeto de química medicinal (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Uma das alternativas para um estudo desta natureza é a geração de uma série de análogos a partir de um composto protótipo, através de pequenas alterações na sua estrutura, seguidas da avaliação do seu efeito biológico. Estas alterações podem envolver a modificação das dimensões da molécula com a inserção de novos substituintes, através do aumento do seu esqueleto de carbono, inserção de grupos metileno ou introdução de um sistema de anel. Podem ser realizadas ainda modificações das suas características físico-químicas, como por exemplo, a substituição de um grupo hidroxila por um grupo metila, o que provocaria diminuição da sua solubilidade em água e também sua capacidade de formar ligações hidrogênio, porém poderia contribuir para sua absorção no trato gastrointestinal por facilitar sua passagem através das membranas biológicas.

A correlação destes dados pode dar origem ao estudo da relação estrutura química e atividade biológica (SAR), que pode ser utilizado para determinar as partes da estrutura do protótipo que são responsáveis por sua atividade biológica, ou seja, quais são seus grupos farmacofóricos. Essa informação pode ser utilizada, futuramente, para o desenvolvimento de um composto otimizado, ou seja, com atividade aumentada em relação ao composto de partida, ou mesmo com atividade diferente (GARETH, 2003).

Um dos primeiros exemplos históricos e marcantes da modificação molecular com êxito em produtos naturais possui mais de 100 anos. Em 1898, a partir do ácido salicílico extraído da casca do salgueiro (*Salix alba*), Felix Hofmann sintetizou, através de reações simples, o ácido acetil salicílico, que até hoje é um dos fármacos mais vendidos no mundo e teve seu mecanismo de ação elucidado apenas na década de 70, o que rendeu um prêmio Nobel em medicina para o farmacologista britânico Sir

Jon Robert Vane. Apesar da idade, esta molécula ainda continua sendo fonte de pesquisas sobre sua aplicação terapêutica (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006; BROWN, 2006).

Dos 1031 novos compostos registradas como fármacos em agências regulatórias internacionais entre 1981 e 2002, 23 % foram obtidas a partir de derivados semi-sintéticos de produtos naturais, com um destaque para moléculas com ação antibacteriana, antitumoral e antiinflamatória (NEWMAN, CRAGG e SNADER, 2003).

2.4. Ensaios para a verificação da atividade biológica de produtos naturais

Muitos compostos vegetais foram isolados, identificados e publicados sem a pesquisa de suas atividades biológicas, que permaneciam muitas vezes desconhecidas por anos. A pesquisa da atividade biológica dos extratos vegetais pode aumentar o conhecimento a respeito de espécies e gêneros botânicos, e contribuir para a sua inserção na terapêutica (LAHLOU, 2004).

No sentido de pesquisar, através de triagem, as possíveis ações farmacológicas para os extratos ou compostos isolados, e dessa maneira orientar o processo de extração e isolamento de compostos provenientes de plantas medicinais, o trabalho laboratorial do químico de produtos naturais pode ser acompanhado por ensaios simples, que podem ser executados no próprio laboratório de química. Para ser compatível com o grande número de amostras a serem testadas, estes ensaios devem ser, além de simples, reprodutíveis, rápidos e de baixo custo (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991).

Um dos exemplos é o ensaio de toxicidade aplicando o microcrustáceo *Artemia salina*. Neste ensaio, a letalidade de extratos e compostos isolados é testada sobre a larva desta espécie, após incubação de 24 horas. Uma das vantagens deste ensaio é que, devido à grande sensibilidade deste crustáceo, várias atividades biológicas podem estar relacionadas a este, pois os compostos ativos podem ser potencialmente tóxicos, em relação à dose (MEYER et al., 1982). Existe boa correlação deste bioensaio com as atividades citotóxica *in vitro*, atividade larvicida e inseticida (McLAUGHLIN, 1991). Outra vantagem deste ensaio é o fato de os cistos de *A. salina* manterem-se viáveis por vários anos, sem a necessidade de culturas (MEYER et al., 1982). Este teste tem sido usado como forma de triagem da atividade biológica, como a citotóxica (FAVILLA et al., 2006; PIMENTA et al., 2003).

Os ensaios de atividade antioxidante *in vitro* também são bastante úteis neste processo. A pesquisa do potencial antioxidante de alguns compostos vegetais, principalmente os fenólicos, como os flavonóides, têm sido bastante estudada, uma

vez que a formação de radicais livres e o processo oxidativo no organismo humano foi relacionado à gênese de várias doenças, como aterosclerose, doenças cardíacas, do sistema nervoso central, entre outras (URSO e CLARKSON, 2003; AUROMA, 1998; WANG, CAO e PRIOR, 1996; STEINBERG, 1991).

Estes ensaios antioxidantes podem envolver várias metodologias químicas *in vitro*, sem o uso de microorganismos ou animais, o que facilita também a sua realização nos laboratórios de química de produtos naturais; além disso, podem ser correlacionadas às ações seqüestrantes de radicais livres, potencial redutor sobre íons, como o íon férrico ou sobre o radical hidroxila, inibição da peroxidação lipídica, inibição de enzimas oxidantes, entre outros (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999). Estes ensaios têm sido amplamente utilizados para a verificação do potencial antioxidante de plantas medicinais (DJERIDANE et al., 2006).

Além destes, outros ensaios mais complexos podem ser realizados em laboratórios específicos, como a avaliação da atividade antimicrobiana. Os produtos naturais são uma grande fonte de compostos com atividade antimicrobiana, pois muitos de seus metabólitos secundários são sintetizados como forma de defesa contra microorganismos, insetos e herbívoros (COWAN, 1999). Soma-se a isto o fato de que os microorganismos são frequentemente causa de sérias infecções, o que acarreta um grande problema de saúde, juntamente com a emergência de cepas cada vez mais resistentes aos antibióticos usados na terapêutica (SOUZA et al., 2004). Devido a isto, o número de trabalhos buscando potenciais substâncias com ação antimicrobiana em produtos naturais tem aumentado (RIOS e RECIO, 2005). Testes como a microdiluição em caldo, com a determinação da concentração inibitória mínima podem ser realizados.

2.5. Família Myrtaceae

A esta família pertencem cerca de 100 gêneros, com aproximadamente 3000 espécies, sendo que no Brasil existem aproximadamente 1000 espécies (SCHUTZ, 1980). É a maior família da ordem Myrtales, com dois centros de dispersão, nas Américas e na Austrália, embora ocorram em todo o mundo. Segundo Limberger e colaboradores (2004), a família é dividida em duas subfamílias: Myrtoideae e Leptospermoideae. São todas plantas tropicais ou subtropicais.

No Brasil, todos os representantes nativos pertencem à subfamília Myrtoideae, que é constituída de apenas uma tribo, Myrtae, a qual se subdivide em três subtribos: Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae (LIMBERGER et al., 2004). As mirtáceas brasileiras 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, araçá), *Martierea* (Cambucá), *Campomanesia* (Guabiroba), *Paivaea* (Cambuci), *Syzigium* e *Eugenia*, ao qual pertencem as espécies em estudo neste trabalho (figura 2) (JOLY, 2002).

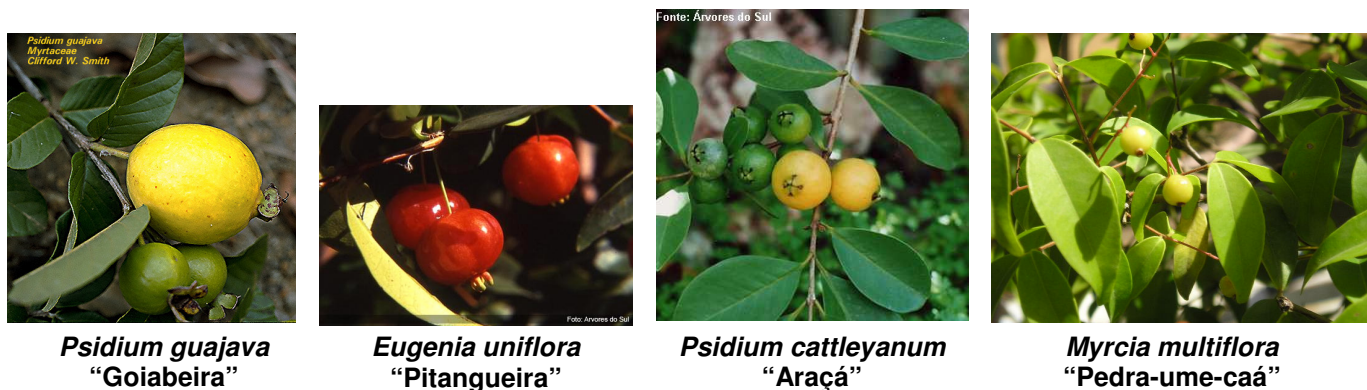


Figura 2. Espécies representantes da família Myrtaceae.

2.6. Considerações sobre o gênero *Eugenia*

O gênero *Eugenia* compreende cerca de 400 espécies (FONTENELLE; COSTA e MACHADO, 1994), sendo um dos maiores 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, corado pelo cálice e achatado nas extremidades.

Segundo REVILLA (2002), o gênero *Eugenia* tem a seguinte classificação taxonômica:

REINO: Plantae

CLASSE: Magnoliopsida

SUBCLASSE: Rosidae

ORDEM: Myrtales

FAMÍLIA: Myrtaceae

SUBFAMÍLIA: Myrtoideae

TRIBO: Myrtae

SUBTRIBO: Eugeniinae

GÊNERO: *Eugenia*

O gênero *Eugenia* foi subdividido por Berg, em 1861, em oito seções, de acordo com o tipo de inflorescência apresentado: *Uniflorae*, *Biflorae*, *Glomeratae*, *Umbellatae*, *Corymbiflorae*, *Racemosae*, *Dichotomae*, *Racemosae*, *Phylocalyx* e *Stenocalyx*.

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).

2.6.1. Usos populares de plantas do gênero *Eugenia*

As plantas do gênero *Eugenia* têm ampla utilização na medicina popular, sendo utilizadas como recurso terapêutico para o tratamento de diversas enfermidades.

A espécie *Eugenia uniflora*, conhecida como pitanga, foi citada pela medicina popular como antihipertensiva, diurética e tem sido usada para desordens gástricas (CONSOLINI, BALDINI e AMAT, 1999); também como eupéptica, carminativa e digestiva (LEE et al., 1997). Seu uso em infecções também foi relatado (COELHO de SOUZA et al., 2004).

Os frutos de *Eugenia jambolana*, conhecida popularmente como “jambolão”, são usados como adstringentes (REVILLA, 2002), estomáquicos, diuréticos e anti-diabéticos (TIMBOLA et al., 2002).

Eugenia edulis tem o nome popular de “jaboticaba”, “jabuticaba”, “jaboticabeira”, é usada na medicina tradicional em inflamações e infecções (HUSSEIN et al., 2003), bronquites, coqueluche e tosses em geral (REVILLA, 2002).

2.6.2. Compostos isolados de plantas do gênero *Eugenia*

O gênero *Eugenia* é bastante rico em compostos fenólicos, como taninos e flavonóides. Devido ao alto teor de compostos fenólicos, as espécies do gênero *Eugenia* apresentam atividade antioxidante, relacionada a estes compostos (EINBOND et al., 2004).

De *Eugenia jambos* foram isolados dois taninos hidrolisáveis, 1-*O*-galoilcastalgina e casuarinina [1] do extrato acetônico a 70 %, com ação antitumoral em células HL-60 (leucemia) e SK-HEP-1 (adenocarcinoma) (YANG, LEE E YEN, 2000). Taninos hidrolisáveis foram isolados de *Eugenia uniflora*, como a eugenina D₁ e D₂, além de outros conhecidos, como a oenoteína, 1,2,4,6-tetra-*O*-galoil-β-D-glicose, e o flavonóide miricitrina (LEE et al., 1997). Do extrato acetônico das folhas de *Eugenia*

caryophyllata, ou cravo-da-índia, foram isolados os elagitaninos sizigininas A e B e eugeniina (TANAKA et al., 1996).

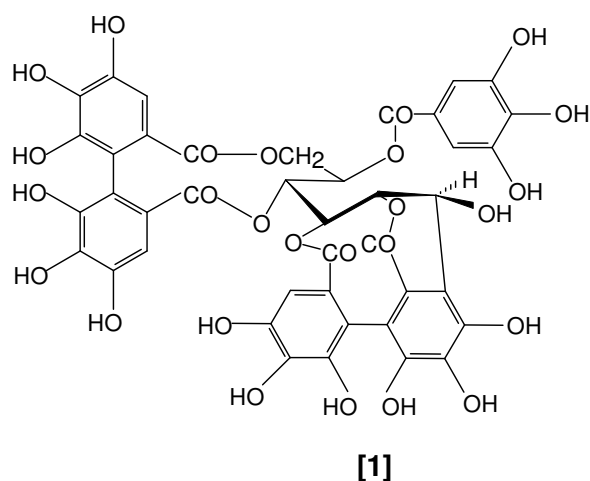


Figura 3. Estrutura da casuarinina, um tanino hidrolisável isolado do gênero *Eugenia*.

Da espécie *Eugenia uniflora* foram isoladas cianidina-3-*O*- β -glucopiranosídeo **[2]** e delphinidina-3-*O*- β -glucopiranosídeo **[3]**, ambas antocianinas, uma subclasse de flavonóides, importante na pigmentação de flores e frutos, que apresentaram ação antioxidante (EINBOND et al., 2004). Estes compostos foram isolados também dos frutos de *Eugenia umbelliflora*, juntamente com outras quatro antocianinas, petunidina-3-*O*- β -glucopiranosídeo **[4]**, pelargonidina-3-*O*- β -glucopiranosídeo **[5]**, peonidina-3-*O*- β -glucopiranosídeo **[6]** e malvidina-3-*O*- β -glucopiranosídeo **[7]** (KUSKOSKI et al., 2003).

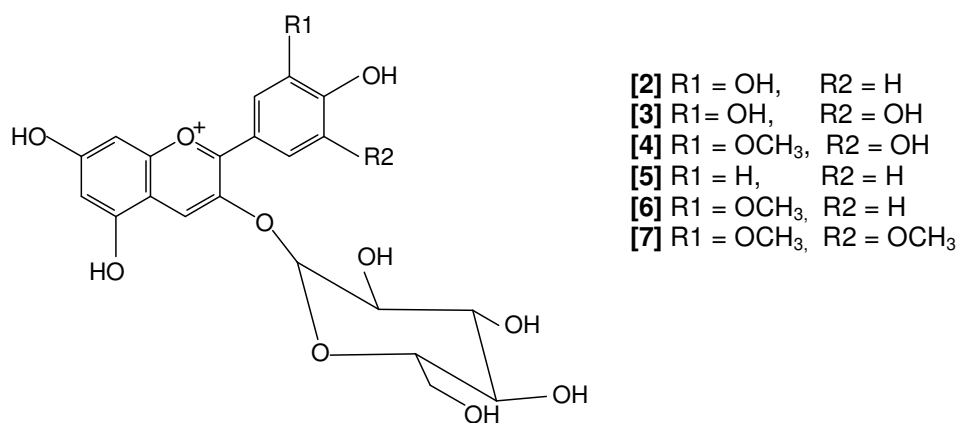


Figura 4. Estrutura de antocianinas isoladas de espécies de *Eugenia*.

A presença de flavonóis poliidroxilados (figura 5) já foi descrita em várias espécies do gênero *Eugenia*, formados principalmente pelas agliconas quercetina e miricetina. Outras agliconas também podem ser encontradas, como o canferol, gossipetina e mearnsetina (figura 6), sendo que muitas delas são relacionadas às

atividades biológicas apresentadas para estas espécies, como antiinflamatória, inibidora da xantina oxidase, enzima relacionada à patologia da artrite e gota (THEODULOZ et al., 1988; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987) e antioxidante (EINBOND et al., 2004).

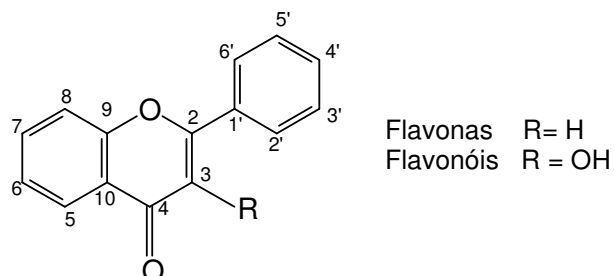
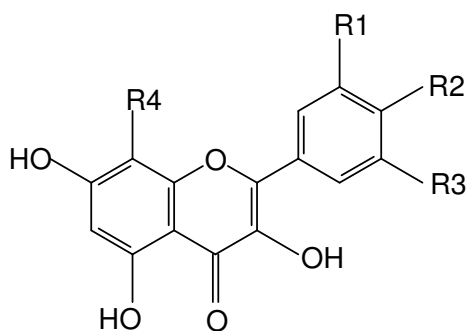


Figura 5. Esqueleto básico dos flavonóis e flavonas.



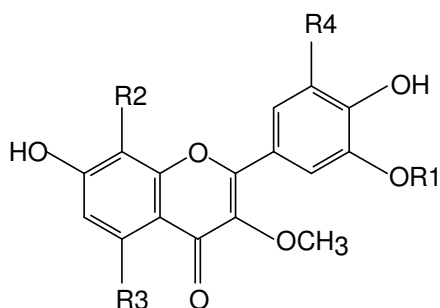
Quercetina	R1 = H,	R2 = OH,	R3 = OH,	R4 = H
Miricetina	R1 = OH,	R2 = OH,	R3 = OH,	R4 = H
Canferol	R1 = H,	R2 = OH,	R3 = H,	R4 = H
Mearnsetina	R1 = OH,	R2 = OCH ₃ ,	R3 = OH,	R4 = H
Gossipetina	R1 = H,	R2 = OH,	R3 = OH,	R4 = OH

Figura 6. Principais agliconas com esqueleto tipo flavonol encontradas em espécies do gênero *Eugenia*.

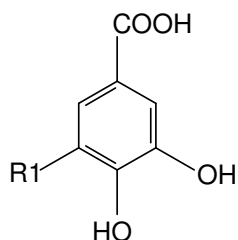
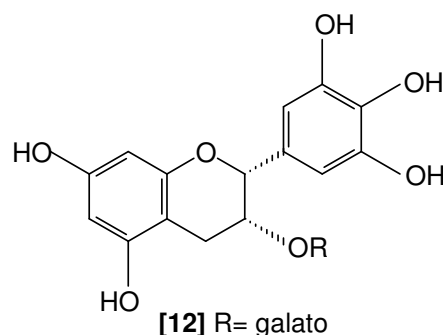
Da espécie *Eugenia edulis*, foram isolados e caracterizados três novos flavonóides derivados de gossipetina e miricetina, componentes majoritários das folhas: gossipetina-3,8-dimetiléter-5-*O*-β-glicosídeo [8]; gossipetina-3,5-dimetiléter [9], e miricetina-3,5,3'-trimetiléter [10]. Além destes, compostos polifenólicos conhecidos foram isolados desta espécie: ácido gálico; ácido protocatéquico [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 (HUSSEIN et al., 2003).

Das folhas de *Eugenia jambolana* foi isolado e identificado um novo flavonóide, miricetina-3-*O*-(4''-acetil)- α -*L*-ramnopiranosídeo [18], além dos flavonóides quercetina, miricetina e miricitrina (TIMBOLA et al., 2002). Desta espécie foram isolados ainda outros dois glicosídeos flavonoídicos acilados, a mearnsetina-3-*O*-(4''-*O*-acetil)- α -*L*-ramnopiranosídeo [19] e miricetina-3-*O*-(4''-*O*-acetil-2''-*O*-galoil)- α -*L*-ramnopiranosídeo [20], além de ácido gálico, galato de metila, canferol, miricetina, ácido elágico [21], miricitrina-4''-*O*-acetil, quercitrina-4''-*O*-acetil [22], juntamente com outros derivados da quercetina e miricetina (MAHMOUD et al., 2001).

Da espécie *E. jambos*, foram isolados também dois diglicosídeos derivados de quercetina e miricetina, a quercetina-3-*O*- β -*D*-xilopiranosil e miricetina-3-*O*- β -*D*-xilopiranosil (SLOWING, CARRETERO e VILLAR, 1994). Das folhas de *Syzygium samarangense* (sinonímia *Eugenia javanica*), além da mearnsitrina [23] foi isolado um novo glicosídeo derivado da miricetina, a 2'-*C*-metil-5'-*O*-galoilmiricetina-3-*O*- α -*L*-ramnopiranosídeo [24] (NAIR et al., 1999). Desta espécie foi isolada também uma chalcona, a 4',6'-dihidroxi-2'-metoxi-3',5'-dimetilchalcona [25] (SRIVASTAVA, SHAW e KULSHRESHTHA, 1995). Além de flavonóis, foram descritas para o gênero flavonas. Duas 3-*C*-metil flavonas foram isoladas de *Eugenia kurzii*, a 3-*C*-metil-apigenina-5-*O*-ramnosídeo [26] e 3-*C*-metil-luteolina-5-*O*-ramnosídeo [27], além de ácido gálico (PAINULY e TANDON, 1983).



- [8] R1 = H, R2 = OCH₃, R3 = O - Glicose, R4 = H
 [9] R1 = H, R2 = OH, R3 = OCH₃, R4 = H
 [10] R1 = CH₃, R2 = H, R3 = OCH₃, R4 = OH



- [11] R1 = H

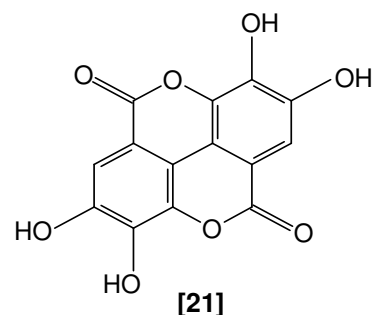


Figura 7. Flavonóides e outros compostos fenólicos isolados de espécies do gênero *Eugenia*.

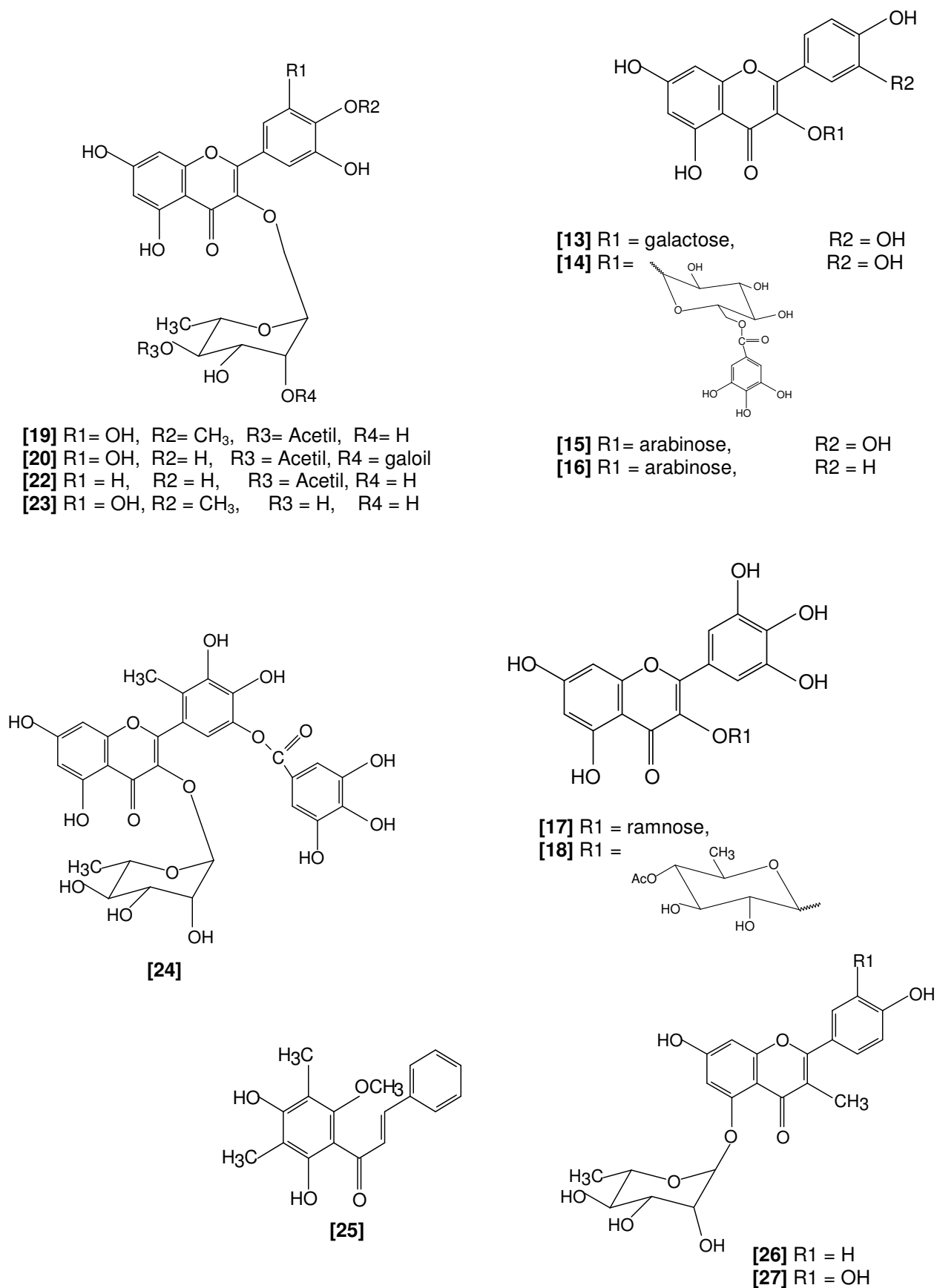


Figura 7.(Continuação) Flavonóides e outros compostos fenólicos isolados de espécies do gênero *Eugenia*.

Além de compostos fenólicos, foram descritos para o gênero *Eugenia* compostos derivados do metabolismo dos terpenos, como os triterpenos e esteróides.

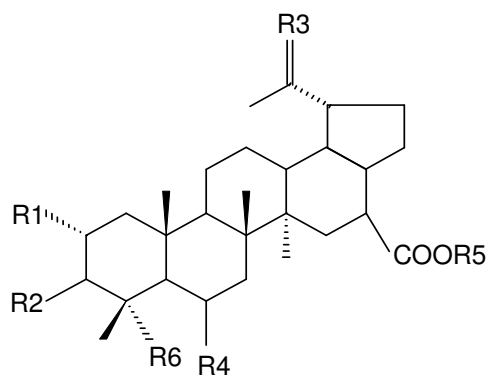
Triterpenos com o esqueleto lupano, derivados do lupeol, como o ácido 6 α -hidroxibetulínico [28], ácido platânico [29] e ácido betulínico, além de um esteróide, o β -sitosterol, foram isolados das folhas e caules de *E. moraviana*, conhecida popularmente como “cambuí “ (LUNARDI et al., 2001).

Dos extratos clorofórmicos de *E. sandwicensis* foram isolados três novos triterpenos, o ácido 3 β -*cis-p*-cumaroiloxi-2 α ,23-dihidroxiolean-12-en-28-óico [30], ácido 3 β -*trans-p*-cumaroiloxi-2 α ,23-dihidroxiolean-12-en-28-óico [31] e ácido 23-*trans-p*-cumaroiloxi-2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-óico [32], que mostraram potencial ação quimiopreventiva contra câncer de mama em ratas, especialmente o composto [31]. Além destes, outras dez substâncias conhecidas foram isoladas, como ácido alfitólico [33], ácido arjunólico [34], ácido betulínico, ácido 2 α ,3 α -dihroxilup-20(29)-en-28-óico [35], ácido 3 β ,23-dihroxilup-20(29)-en-28-óico [36], hederagenina [37], ácido maslínico [38], β -sitosteril 3-*O*- β -*D*-glucopiranosídeo [39] e siringaldeído, além de ácido gálico, composto fenólico isolado do extrato acetato de etila (GU et al., 2001).

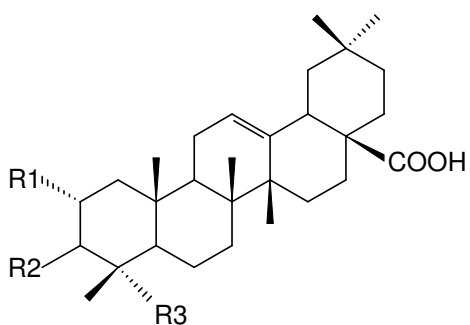
Da fração clorofórmica extraída do extrato alcoólico de partes aéreas de *Syzygium samarangense* (sinonímia *Eugenia javanica*) foram isolados triterpenos, dentre eles uma nova estrutura, o 3-*epi*-betulinato de metila [40] um éster do ácido betulínico, além de ácido ursólico [41], ácido jacumárico [42] e ácido arjunólico [34] (SRIVASTAVA, SHAW e KULSHRESHTHA, 1995).

No extrato acetônico dos frutos de *Eugenia uniflora* foram identificados carotenóides, sendo que o majoritário encontrado foi o licopeno, seguido de rubixantina, *cis*-rubixantina, β -criptoxantina, *cis*-licopeno, β -caroteno, γ -caroteno, zeaxantina, luteína, violaxantina e β -caroteno-5,6-epóxido (AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2004). Das flores desta espécie foi isolado triterpeno, o ácido oleanólico [43] (RAJASEKARAN et al., 1988).

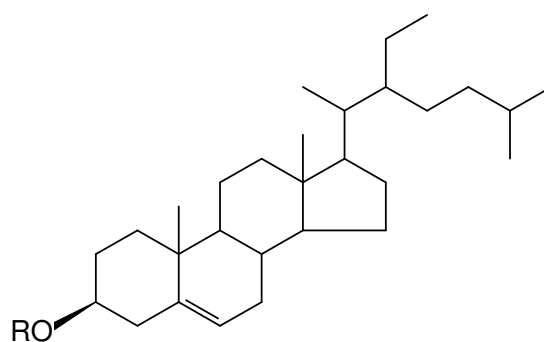
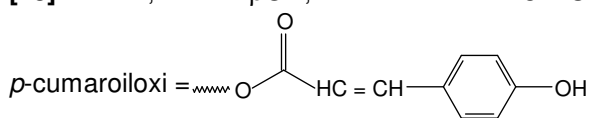
A composição dos óleos essenciais de espécies de *Eugenia*, bem como outras plantas da família Myrtaceae já foi amplamente estudada. Existe uma grande predominância de monoterpenos e sesquiterpenos nos óleos essenciais de espécies desta família (LIMBERGER et al., 2004). As exceções são as espécies *E. caryophyllata* e *E. stigmatica*, cujos compostos majoritários são o eugenol e o ácido (Z)-tetra-5-enóico, respectivamente (OLIVEIRA, DIAS e CÂMARA, 2005). Diferenças quantitativas e qualitativas nos óleos essenciais entre espécies de *Eugenia* têm sido propostas como dado útil para melhor caracterização taxonômica de espécies do gênero (COLE, HARBER e SETZER, 2007).



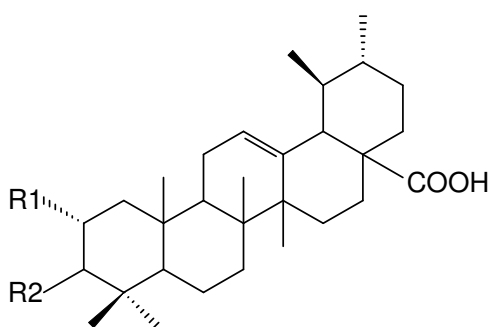
- [28] R1 = H, R2 = β OH, R3 = CH₂, R4 = OH, R5 = H, R6 = CH₃
 [29] R1 = H, R2 = β OH, R3 = O, R4 = H, R5 = H, R6 = CH₃
 [33] R1 = OH, R2 = β OH, R3 = CH₂, R4 = H, R5 = H, R6 = CH₃
 [35] R1 = OH, R2 = α OH, R3 = CH₂, R4 = H, R5 = H, R6 = CH₃
 [36] R1 = H, R2 = β OH, R3 = CH₂, R4 = H, R5 = H, R6 = CH₂OH
 [40] R1 = H, R2 = α OH, R3 = CH₂, R4 = H, R5 = CH₃, R6 = CH₃



- [30] R1 = OH, R2 = *cis-p*-cumaroiloxi, R3 = CH₂OH
 [31] R1 = OH, R2 = *trans-p*-cumaroiloxi, R3 = CH₂OH
 [32] R1 = OH, R2 = β OH, R3 = *trans-p*-cumaroiloxi
 [34] R1 = OH, R2 = β OH, R3 = CH₂OH
 [37] R1 = H, R2 = β OH, R3 = CH₂OH
 [38] R1 = OH, R2 = β OH, R3 = CH₃
 [43] R1 = H, R2 = β OH, R3 = CH₃



- [39] R = Glucose



- [41] R1 = H, R2 = β OH
 [42] R1 = OH, R2 = *trans-p*-cumaroiloxi

Figura 8. Compostos triterpênicos e esteroidais encontrados em plantas do gênero *Eugenia*.

Compostos sesquiterpênicos com esqueleto cadinano, como γ -cadineno [44], cariofilano, como o β -cariofileno [45], humulano, como o α -humuleno (α -cariofileno) [46] e germacrano, como o germacreno A [47] são bastante comuns em óleos essenciais de espécies de *Eugenia* (FISCHER et al., 2005; VILA et al., 2004; APEL et al., 2005; APEL et al., 2004a; PINO et al., 2003; COSTA et al., 2000).

Dentre os monoterpenos, destaca-se o esqueleto pinano, como é o caso dos compostos α -pineno [48] e β -pineno [49]. Compostos acíclicos também são encontrados, como o mirceno [50].

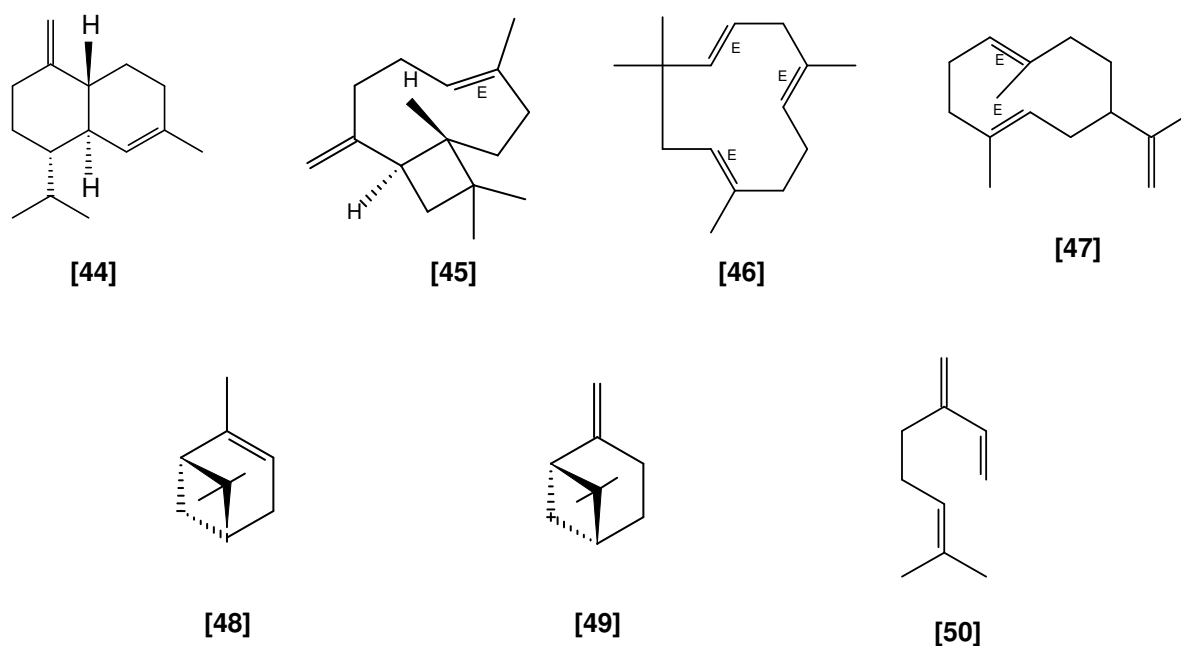


Figura 9. Componentes terpênicos de óleos essenciais encontrados em plantas do gênero *Eugenia*.

2.6.3. Atividades farmacológicas descritas para o gênero *Eugenia*

Dentre as espécies do gênero *Eugenia*, poucas foram amplamente estudadas do ponto de vista farmacológico, destacando-se apenas algumas espécies.

Um estudo farmacológico mais amplo foi realizado com o óleo essencial *Eugenia caryophyllata*. Foram relatadas atividades antibacteriana, contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas putida* (OUSSALAH et al., 2007), atividade antiepilética contra convulsões tônicas induzidas por eletrochoque em ratos machos (POURGHOLAMI et al., 1999), e para o eugenol, principal constituinte extraído do seu óleo, foi descrita

atividade citotóxica, indutora de radicais livres e apoptose, antitumoral (YOO et al., 2005) e antifúngica (onicomicose) (GAYOSO et al., 2005).

Para o extrato metanólico desta espécie foram encontradas também atividade inseticida, e *antifeedant* (impede a alimentação e afasta predadores) (HAN, KIM e AHN, 2006), antibacteriana contra *Helicobacter pylori* (LI et al., 2005), antioxidante no extrato etanólico (GÜLÇİN et al., 2004), antiinflamatória (inibidora da COX-2 e inibidora da formação de radicais livres derivados do óxido nítrico) (HONG, 2003) e antitumoral (KIM et al., 2003).

Outra espécie de destaque é *Eugenia jambolana*, que tem sido estudada com ênfase em seu potencial hipoglicemiante e antidiabético, sendo esta a aplicação mais usada na medicina popular (PEPATO et al., 2005). Os extratos etanólicos e aquosos, principalmente dos frutos e sementes mostraram ação hipoglicemiante e estimulante da liberação de insulina em coelhos diabéticos (SHARMA et al., 2006; RAVI, RAMACHANDRAN e SUBRAMANIAN, 2004 a,b; SHARMA et al., 2003) além de prevenir a hiperglicemia e hiperinsulinemia em ratos resistentes à insulina (VIKRANT et al., 2001). Estas ações foram relacionadas à atividade em enzimas chaves do metabolismo dos carboidratos (GROVER et al., 2000) e atividade antioxidante e protetora no fígado de ratos diabéticos (RAVI, RAMACHANDRAN e SUBRAMANIAN, 2004 a,b). O metabolismo dos lipídeos, bastante alterado na patologia do *diabetes mellitus*, também é alterado pelo uso destes extratos. Estudos mostraram ação antihiperlipêmica em ratos diabéticos (RAVI, RAJASEKARAN e SUBRAMANIAN, 2005; SHARMA et al., 2003). A atividade protetora dos rins de ratos diabéticos, outra complicação do diabetes, foi demonstrada para esta espécie (GROVER et al., 2001). Um extrato das sementes rico em flavonóides mostrou a alteração de vários parâmetros bioquímicos relacionados ao diabetes, como tolerância à glicose, perfil lipídico, síntese de glicogênio, recaptção de glicose e insulina, gerando diminuição dos níveis de glicose e lipídeos em ratos diabéticos (SHARMA et al., 2008).

Outras atividades não relacionadas ao diabetes foram demonstradas para os extratos metanólico e diclorometano das folhas de *E. jambolana*, como protetora do DNA exposto à radiação gama (JAGETIA e BALIGA, 2002). O extrato etanólico das cascas do caule mostrou ação antidiarréica, através da diminuição dos níveis de prostaglandina E₂ e diminuição da motilidade no trato gastrointestinal de ratos (MUKHERJE et al., 1998). O ácido oleanólico isolado das flores mostrou ainda diminuição da espermatogênese em ratos machos (RAJASEKARAN et al., 1988).

Para a espécie *Eugenia uniflora*, alguns estudos também foram desenvolvidos utilizando principalmente extratos polares, como aquoso, metanólico e acetato de etila das folhas. Foi demonstrada a atividade antioxidante no extrato metanólico das folhas,

através da captação do ânion superóxido (VELÁZQUEZ et al., 2003) e captação do radical livre DPPH, atividade atribuída às antocianinas isoladas desta espécie (EINBOND et al., 2004). O extrato aquoso desta espécie demonstrou ação hipotensiva, efeito inotrópico negativo, ação vasodilatadora e levemente diurética em ratos (CONSOLINI e SARUBIO, 2002; CONSOLINI, BALDINI e AMAT, 1999), o que contribui para o seu uso como antihipertensiva, aplicação bastante usada na medicina popular.

A atividade tripanocida (ADEWUNMI et al., 2001), antiviral contra o vírus Epstein-barr, relacionado à gênese de tumores, como o nasofaríngeo (devido à presença de taninos hidrolisáveis) (LEE et al., 2000), antibacteriana do óleo essencial (SOUZA et al., 2004), e inibidora da enzima xantina oxidase, relacionada à artrite (ação atribuída aos flavonóides quercetina, quercitrina, miricetina e miricitrina) (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987) também foram demonstradas para *E. uniflora*. Um *screening* realizado com a infusão de folhas frescas da espécie demonstrou ainda atividade antiinflamatória em ratos e aumento do tempo de sono induzido por barbitúricos, além de baixa toxicidade aguda (SCHAPOVAL et al., 1994).

Outras atividades relevantes relatadas para espécies do gênero *Eugenia* foram atividade antitumoral (YANG, LEE e YEN, 2000) e antiinflamatória para *Eugenia jambos* (SLOWING, CARRETERO e VILLAR, 1994), atividade antiviral contra HSV-1, antifúngica e antibacteriana para *Eugenia malaccensis* (LOCHER et al., 1995) e antitumoral para *E. sandwicensis* (GU et al., 2001).

2.6.4. *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana* e *Eugenia umbelliflora*

A espécie *Eugenia brasiliensis* Lamarck (figura 10), sinonímia *E. bracteolaris*, *E. dombeyi*, *Stenocalyx brasiliensis*, seção *stenocalyx*, é conhecida popularmente como grumixama, grumixameira, grumixaba, itapoiroti (REITZ e KLEIN, 1969) e cumbixaba (PIO-CORRÊA, 1978).

Segundo Reitz e Klein (1969), é uma árvore pequena ou arbusto, de até 10-15 metros de altura, de tronco curto, casca fina e descamante, galhos racemosos, finos e abundantes, que formam uma copa estreita e muito alongada. Suas folhas são coriáceas, oblongas ou ovaladas, verde-escuras e muito densas, opostas, de 6,5 a 10 cm de comprimento e 2,5 – 5 cm de largura, atenuadas na base, com pecíolo de 4 a 7 mm. Possui pedúnculos com apenas uma flor, de 2 a 4 cm. Seus frutos são globosos, tipo baga, podem ser roxo-escuros, vermelhos ou amarelos, com cerca de 1 cm, coroados pelas sépalas resistentes, e contém uma semente. São ligeiramente ácidos e agradáveis, com a polpa vermelha ou branca (PIO-CORRÊA, 1978). Segundo

Moreno et al. (2007), existem três variedades da espécie, de acordo com a cor de seus frutos: variedade α , com frutos roxos, sendo a mais comum; variedade β , com frutos vermelhos e variedade γ , com frutos amarelos.

Ocorre desde os estados do Nordeste até a mata atlântica de Santa Catarina. Distribui-se na mata pluvial atlântica do Sul do Brasil, tendo como limite sul a Serra do Tabuleiro. Devido aos seus frutos, que são comestíveis, esta árvore é frequentemente cultivada, resultando numa copa maior. Em Santa Catarina foi registrada a presença desta espécie nos municípios de Brusque, Ibirama, Itajaí, Joinville e região de Florianópolis (REITZ e KLEIN, 1969).



Figura 10. Aspecto de folhas, flores e frutos de *Eugenia brasiliensis*

Na medicina popular, o uso da espécie, na forma de infusão das folhas, foi relatado para o tratamento de artrite, reumatismo e como diurética. Os frutos maduros são usados como alimento e para a preparação de bebidas fermentadas (REVILLA, 2002). Devido ao seu alto teor de taninos, o que lhe confere ação adstringente, as cascas eram usadas na indústria de couro, como tanantes (PIO-CORRÊA, 1978).

Poucos relatos sobre compostos químicos e atividades farmacológicas foram registrados na literatura. Foi realizado o estudo dos componentes do óleo essencial de dois exemplares desta espécie, coletados no estado de São Paulo. Os compostos majoritários encontrados foram α -selineno (17,3 e 12,6 %) e β -selineno (13,3 e 14,8 %), β -cariofileno (8,7 e 12,6 %) e α -pineno (0,7 e 6,6 %) (FISCHER et al., 2005). Estudos realizados com o óleo essencial extraído de frutos de variedades diferentes mostraram uma maior proporção de sesquiterpenos oxigenados (33,9 %) presentes nos frutos escuros, em relação aos de cor amarela, que apresentaram menor quantidade destes compostos (3,8 %), sendo distinguidas como dois quimiotipos diferentes (MORENO et al., 2007). Desta espécie foi isolado o ácido ursólico [41], um ácido triterpênico (FRIGHETTO et al., 2005). Uma análise do extrato metanol-ácido fórmico dos frutos desta espécie levou à detecção da antocianina delfinidina 3-glicosídeo [3], do ácido elágico [21] e do flavonóide rutina (REYNERTSON et al., 2008).

Eugenia beaurepaireana (Kiaesrkou) Legrand (figura 11), sinonímia *Myrtus beaurepaireana*, *Pilothecium ternatifolium*, seção *dichotomae*, é conhecida como ingabaú e guamirim-ferro. É uma árvore com tronco geralmente reto e cilíndrico, tendo comumente uma altura de 10-15 metros e diâmetro de 20-30 cm; sua casca é tipicamente de cor cinza-clara. Sua copa é bastante arredondada, com esgalhamento abundante e folhagem espessa. Suas folhas são de forma elíptica, de acúmum estreito, e base aguda. Medem de 3 – 9,5 cm de comprimento por 1,3 a 4 cm de largura. Os pedúnculos florais tem três flores. Seus frutos são amarelos e rugosos, globosos, com cerca de 2 cm. Floresce durante os meses de março a dezembro, sendo predominante na primavera, e apresenta frutos maduros de agosto a outubro.

Ocorre desde a Serra dos Órgãos, no Rio de Janeiro, até a mata atlântica de Santa Catarina. Em Santa Catarina possui distribuição uniforme, através de toda a mata atlântica, desde o extremo norte ao extremo sul, do Vale do Itajaí até o município de Rio do Sul (REITZ e KLEIN, 1969).

Da mesma maneira que *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana* possui poucos estudos na literatura. Apenas um artigo a respeito do estudo do óleo essencial foi encontrado. Os compostos majoritários presentes no óleo essencial desta espécie são biciclogermacreno (14,3%), Δ -cadineno (7,2%), T-cadinol (6,5%), α -cadinol (6,1%) e β -cariofileno (6,4%) (APEL et al., 2004b).



Figura 11. Aspecto da árvore, folhas e frutos de *Eugenia beaurepaireana*.

Eugenia umbelliflora Berg. (figura 12), seção *umbellatae*, tem como nome popular baguaçu, guapê e guamirim, dado à árvore e seus frutos, que crescem nas matas do sudeste do Brasil. É uma arvoreta de tronco um pouco tortuoso, de 3 – 10 metros de altura, de casca quase lisa e clara, raramente densa, formando copa arredondada e espessa. Suas folhas são robustas, geralmente largas de forma oval,

igualmente atenuadas para ambos os extremos, de 7,5 – 9 cm de comprimento por 2,3 – 4,5 de largura, pecíolo de 70 – 10 mm. Os pedúnculos florais medem de 5 a 10 mm e são umbelados. Os frutos são ovais, de 1 cm ou mais, coroados pelos pequenos sépalos (REITZ e KLEIN, 1969), similares à cerejas, com coloração vermelho-escura na casca e polpa verde-translúcida (KUSKOSKI et al., 2003). Floresce durante os meses de fevereiro, março e abril, e seus frutos estão maduros de julho a outubro (REITZ e KLEIN, 1969).

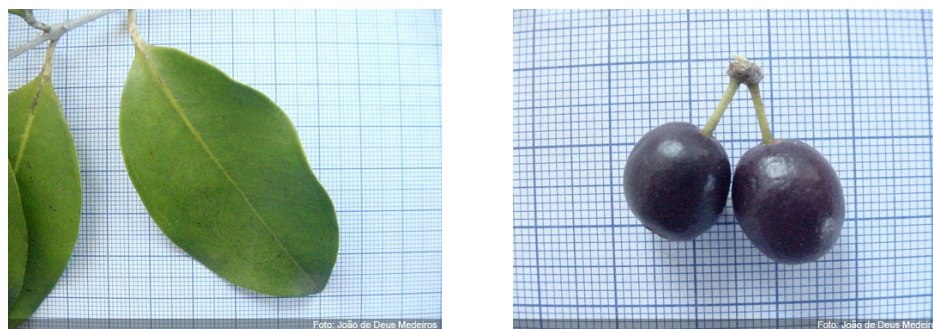


Figura 12. Aspecto de folhas e frutos de *Eugenia umbelliflora*

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 também foi estudado, mostrando um alto teor de α -pineno (24,7%) e β -pineno (23,5%) (APEL et al., 2002).

A respeito da atividade biológica, a atividade antibacteriana desta planta já foi descrita. Extratos metanólicos das folhas e frutos da espécie mostraram promissora atividade contra microorganismos gram-positivos, como *Staphylococcus aureus* (MACHADO et al., 2005).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Realizar o estudo fitoquímico das espécies *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana* e *Eugenia umbelliflora*, juntamente com a pesquisa de possíveis atividades biológicas dos extratos, frações, compostos isolados obtidos das espécies estudadas e derivados semi-sintéticos produzidos a partir destes.

3.2. Objetivos específicos

- Coletar as espécies de *Eugenia* para o trabalho e realizar sua identificação botânica.
- Obter e fracionar os extratos brutos das espécies selecionadas para o trabalho.
- Realizar a análise fitoquímica preliminar dos extratos brutos das espécies.
- Isolar, através de métodos cromatográficos, metabólitos secundários presentes nas espécies selecionadas.
- Identificar os metabólitos isolados através das técnicas de espectroscopia disponíveis (ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio, espectroscopia no infravermelho).
- Caracterizar os metabólitos secundários presentes na fração acetato de etila das folhas de *Eugenia brasiliensis* através da técnica de eletroforese capilar.
- Realizar modificações estruturais no triterpeno betulina, isolado das folhas de *Eugenia brasiliensis*, bem como testar sua atividade antimicrobiana.
- Extrair o óleo essencial das espécies estudadas e identificar seus componentes, através da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.
- Biomonitorar os extratos e frações obtidas através do teste de letalidade utilizando larvas de *A. salina*.
- Biomonitorar os extratos e frações obtidas através de testes antioxidantes, utilizando os métodos de verificação da captação de radicais livres com DPPH, verificação do potencial redutor do íon férrico e inibição da peroxidação lipídica, e correlacionar estes resultados aos conteúdos de compostos fenólicos e flavonóides presentes nas espécies.
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos, frações e óleos essenciais das espécies contra bactérias e fungos de interesse clínico através de testes de microdiluição em caldo.
- Submeter os extratos, frações e compostos isolados das folhas de *Eugenia brasiliensis* a testes para a avaliação da atividade antiinflamatória tópica.

4. Resultados e discussão

As espécies de *Eugenia* possuem grande potencial para a realização trabalhos de pesquisa na área química e farmacológica, visto a grande quantidade de compostos isolados e atividades biológicas descritas em estudos publicados com plantas deste gênero. Porém, como descrito anteriormente, para as espécies *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora* poucos estudos foram realizados. Devido a este fato, ocorreu o interesse no desenvolvimento deste trabalho.

4.1. ESTUDO FITOQUÍMICO DAS ESPÉCIES DE *EUGENIA*

4.1.1. Obtenção dos extratos vegetais

Após macerado em etanol hidroalcoólico, o material vegetal foi filtrado, e o extrato concentrado à secura no evaporador rotatório. Os pesos dos extratos foram determinados, e seu rendimento foi calculado em porcentagem, em relação à quantidade de material vegetal seco de partida utilizado para a extração. Os resultados dos rendimentos obtidos variaram entre 3,52 e 10,82 %, e estão demonstrados na tabela (tabela 1) a seguir.

Tabela 1. Rendimentos dos extratos brutos das espécies de *Eugenia* estudadas.

Material	<i>E. brasiliensis</i>		<i>E. umbelliflora</i>		<i>E. beaurepaireana</i>	
	Peso do material	% de rendimento	Peso do material	% de rendimento	Peso do material	% de rendimento
Folhas secas	1.570 g	---	220 g	---	468 g	---
Extrato bruto folhas	170 g	10,82	18 g	8,18	42 g	8,97
Caule seco	569 g	---	70 g	---	307 g	---
Extrato bruto caule	43 g	7,52	6 g	8,57	10 g	3,52

4.1.2. Análise fitoquímica preliminar dos extratos brutos

A análise fitoquímica visa o conhecimento dos constituintes químicos de uma espécie vegetal. Esta é feita pela realização de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003). Com o objetivo de pesquisar as classes de compostos presentes nos extratos brutos das folhas das espécies, foram feitas reações colorimétricas para identificação de características comuns aos esqueletos dos diferentes compostos. A tabela abaixo (tabela 2) mostra os resultados obtidos.

Tabela 2. Análise fitoquímica preliminar dos extratos brutos das folhas das espécies de *Eugenia* estudadas.

Classes de compostos	<i>Eugenia brasiliensis</i>	<i>Eugenia beaurepaireana</i>	<i>Eugenia umbelliflora</i>
Heterosídeos cianogênicos	ND	ND	D
Fenóis	D	D	D
Taninos hidrolisáveis	D	D	D
Taninos condensados	D	D	D
Antocianinas e antocianidinas	D	D	D
Flavononóis	D	ND	ND
Flavononas	ND	ND	ND
Chalconas e auronas	D	D	D
Flavonas e flavonóis	D	D	D
Xantonas	D	D	D
Leucoantocianidinas	ND	ND	ND
Catequinas	D	D	D
Esteróides livres	D	D	D
Triterpenos livres	D	D	D
Saponinas	D	D	D
Resinas	D	ND	ND
Alcalóides	ND	ND	ND
Bases quaternárias	ND	ND	ND
Ácidos fixos	ND	ND	ND
Quinonas	ND	ND	ND
Antranóis	ND	ND	ND
Cumarinas	ND	ND	ND

D = detectado / ND = não detectado

A análise fitoquímica preliminar das espécies mostrou resultados coincidentes com a literatura, confirmando a posição quimiotaxonômica das espécies estudadas dentro do gênero *Eugenia*. Como já citado anteriormente, estudos mostram a presença de fenóis, taninos hidrolisáveis e condensados (YANG, LEE E YEN, 2000), antocianinas (EINBOND et al., 2004), flavonas (PAINULY e TANDON, 1983), flavonóis, na forma de agliconas e heterosídeos, catequinas (HUSSEIN et al., 2003), chalconas (SRIVASTAVA, SHAW e KULSHRESHTHA, 1995), esteróides (LUNARDI et al., 2001) e triterpenos livres e também na forma de saponinas (GU et al., 2001). Não foram encontrados nas espécies estudadas, através dos testes, bem como na

literatura pesquisada, a presença de alcalóides, bases quaternárias, quinonas, antranóis e cumarinas.

4.1.3. Fracionamento líquido-líquido dos extratos brutos

Após serem concentrados, os extratos brutos das folhas de *E. brasiliensis* e *E. beaurepaireana* foram re-suspendidos em água, originando 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, obtiveram-se as frações conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3. Rendimentos das frações obtidas a partir do extrato bruto hidroalcoólico das espécies de *Eugenia* estudadas.

Fração	<i>E. brasiliensis</i>		<i>E. umbelliflora</i>		<i>E. beaurepaireana</i>	
	Peso do material (g)	% de rendimento	Peso do material (g)	% de rendimento	Peso do material (g)	% de rendimento
FOLHAS						
Extrato bruto	170,0	---	18,0	---	42,0	---
Fração insolúvel	77,0	45,29	---	---	15,4	36,76
Fração hexano	30,4	17,88	2,3	12,66	1,9	4,52
Fração DCM	15,5	9,11	0,4	2,00	2,7	6,42
Fração AcOEt	33,4	19,64	6,9	38,55	16,2	38,57
Fração BuOH	8,5	5,00	1,5	8,33	1,8	4,35
Fração Aquosa	5,0	2,94	6,4	35,55	3,9	9,28
CAULE						
Extrato bruto caule	43,0	---	6,0	---	10,0	---
Fração hexano	1,9	4,37	0,5	8,75	0,5	5,00
Fração DCM	0,9	2,02	0,7	9,83	4,5	45,00
Fração AcOEt	27,0	62,79	0,8	14,00	1,5	15,30
Fração BuOH	5,4	12,41	0,6	10,66	0,4	3,80
Fração Aquosa	7,6	17,76	3,7	61,66	2,7	26,90

* Não foi obtida fração insolúvel desta espécie.

4.1.4. Fracionamento cromatográfico de *Eugenia beaurepaireana*

Para esta espécie, foram fracionadas a partir de métodos cromatográficos a fração insolúvel e fração acetato de etila das folhas, devido ao fato de que estas apresentavam maior massa (g), o que possibilitou um trabalho fitoquímico mais detalhado. Os procedimentos desenvolvidos estão descritos a seguir.

4.1.4.1. Fracionamento da fração insolúvel

O extrato bruto hidroalcoólico das folhas desta espécie gerou um precipitado, que foi filtrado e chamado de fração insolúvel. Uma alíquota de 6,9 g deste precipitado foi dissolvida em diclorometano, adicionada de carvão ativo e aquecida até a ebulição durante cinco minutos. Após, foi filtrada novamente, e depois de evaporada rendeu 3,5 g de extrato seco. Após este tratamento, a fração insolúvel foi então fracionada através de cromatografia em coluna (coluna 1), utilizando como eluentes uma mistura de hexano/AcOEt/EtOH, com gradiente crescente de polaridade. Desta coluna foram obtidas 22 frações, que foram reunidas conforme suas semelhanças através da análise na cromatografia em camada delgada, conforme apresentado no fluxograma da figura 13.

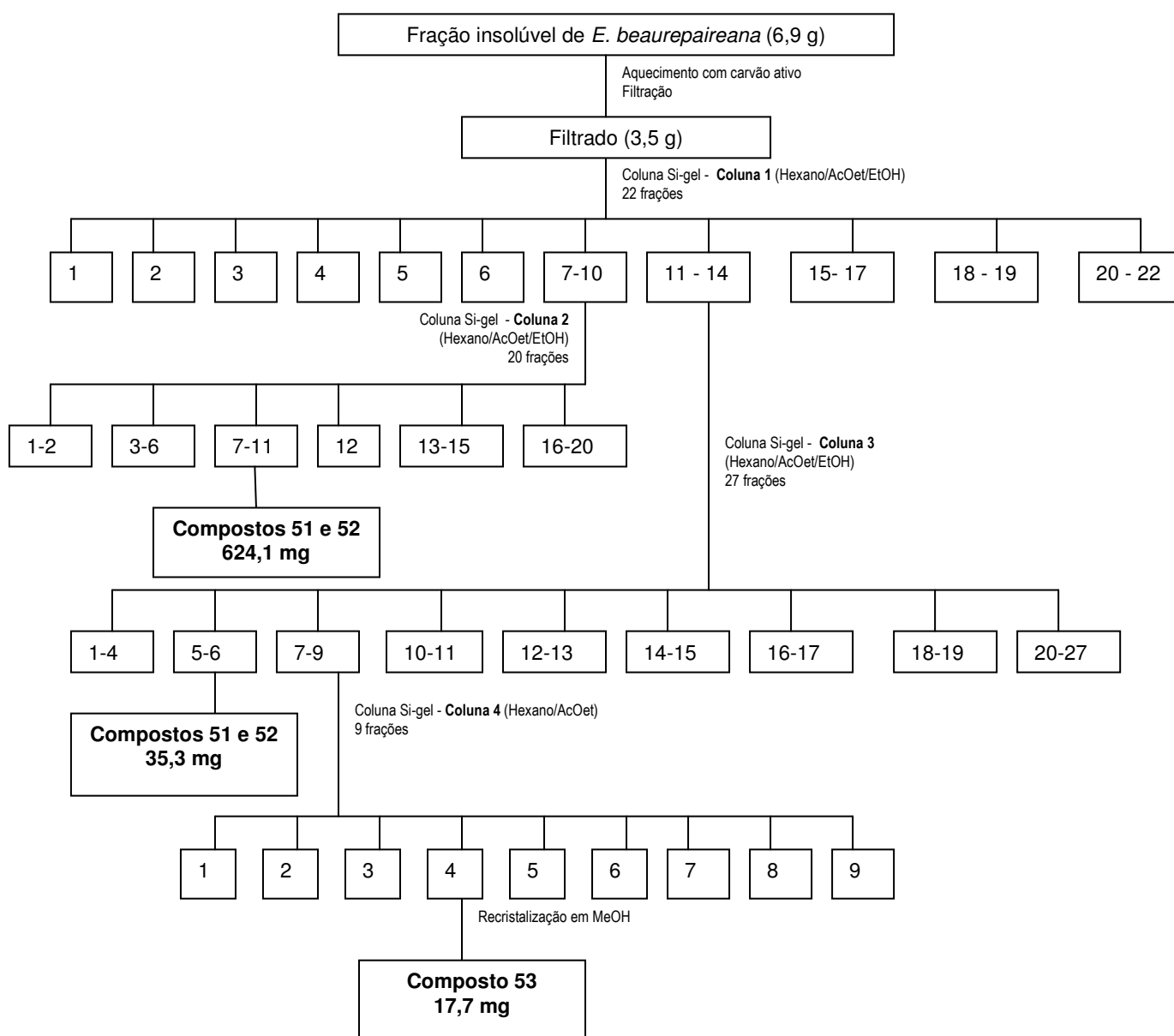


Figura 13. Fracionamento da fração insolúvel das folhas de *E. beaurepaireana*.

As frações 7-10 obtidas da coluna 1 foram reunidas e recromatografadas utilizando o mesmo sistema de eluente (coluna 2), onde foram obtidas 20 frações. As subfrações 7 a 11 apresentaram-se como cristais brancos, de onde foi obtida mistura dos compostos 51 e 52.

O precipitado correspondente à mistura dos compostos **51** e **52** (figura 16), um sólido branco, apresentou faixa de fusão entre 184,9 – 187,4 °C. A análise por CCD (hexano/AcOEt 9:1) apresentou uma mancha, que quando revelada com anisaldeído sulfúrico desenvolveu a coloração violeta. A análise do espectro de IV (anexo 1) mostrou um perfil de absorção característico de compostos triterpênicos e esteroidais. Foi verificada a presença, em 3299 cm^{-1} , de uma absorção correspondente ao estiramento do grupo O-H. Na região de 2942 cm^{-1} foi observada a presença de uma banda intensa, característica das ligações C-H. Observou-se ainda, em 1644 cm^{-1} , a presença de uma pequena banda correspondente à ligação C=C. A análise do conjunto de dados cromatográficos e espectroscópicos, juntamente com a faixa de fusão, reforçou a hipótese da estrutura tratar-se de um triterpeno ou esteróide.

Em uma primeira análise do espectro de RMN de ^1H verificou-se a presença de uma grande quantidade de sinais entre 0,7 – 2 ppm, correspondente a átomos de hidrogênio alifático incluindo oito singletos em 1,58, 1,13, 0,99, 0,96, 0,93, 0,86, 0,82 e 0,78 ppm, atribuídos a oito grupos metila. Foi observado um duplo duplete centrado em 3,21 ppm, com $J_1 = 12$ Hz e $J_2 = 4,4$ Hz, que corresponde a um CH oxigenado, atribuído ao H3 (anexo 2). Ao analisar a região próxima de 5 ppm, observou-se a presença de dois sinais correspondentes a átomos de hidrogênio ligados a carbono sp^2 , um deles em 5,12 ppm, de menor intensidade e outro em 5,18 ppm de maior intensidade, (figura 14) correspondente a ligação dupla trissubstituída de alguns triterpenos, como por exemplo os de esqueletos oleanano e ursano. Como cada esqueleto tem geralmente uma ligação dupla apenas, com a presença de um hidrogênio cada, a presença do sinal de menor intensidade deu indício da presença de uma contaminação da amostra.

Na análise do espectro de RMN ^{13}C da amostra (anexo 3) pode-se observar a presença de 30 sinais confirmando a hipótese de um triterpeno. Foram observados dois sinais em 121,7 e 145,2 ppm, correspondentes aos carbonos da ligação dupla entre C-12 e C-13 respectivamente, dos triterpenos de esqueleto oleanano. Foi observado um sinal, em 79,01 ppm, correspondente ao carbono 3, ligado a uma hidroxila. Pôde-se verificar ainda uma grande quantidade de sinais entre 15 e 55 ppm, e oito sinais correspondentes às metilas.

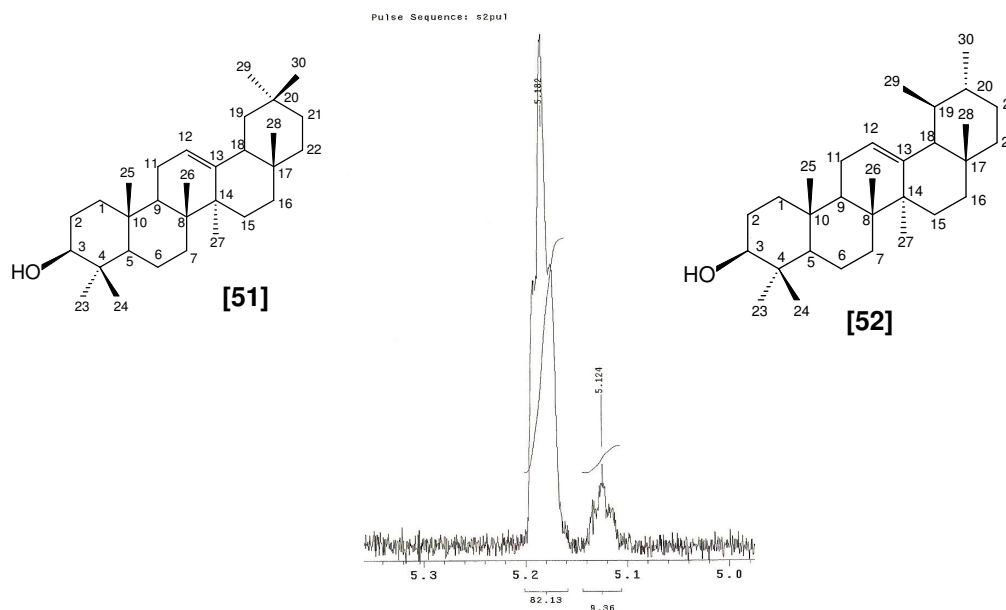


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), dos compostos 51 e 52. Ampliação da região entre 5,0 – 5,3 ppm.

A comparação dos deslocamentos químicos do espectro de RMN ^{13}C com dados da literatura (BALESTRIN et al., 2008; MAHATO e KUNDU, 1994) permitiu identificar a estrutura como a β -amirina (**composto 51**) na fração. Os valores de deslocamento químico estão listados nas tabelas 4 e 5, e sua estrutura mostrada na figura 16.

A fração 10 da coluna 2, de onde foi obtido o composto 51, foi analisada através de cromatografia gasosa (figura 15) em comparação aos padrões de α e β -amirina. A análise do cromatograma permitiu a observação de dois sinais na fração, semelhantes ao tempo de retenção dos padrões de alfa e beta-amirina, mostrando que, juntamente com a β -amirina, estava presente a α -amirina, de esqueleto ursano (**composto 52**), o que justifica a presença do sinal de pequena intensidade (5,12 ppm) observado no espectro de RMN ^1H . Embora α e β -amirina sejam estruturas semelhantes e difíceis de separar através de procedimentos cromatográficos em coluna de sílica, podem ser detectadas separadamente por cromatografia gasosa. Devido à mudança da posição das metilas 29 e 30, ligadas aos carbonos 19 e 20, no caso da α -amirina, e ligadas no mesmo carbono (C-20), no caso da β -amirina, há uma diferença no ambiente químico próximo à ligação dupla, fazendo com que haja um aumento a interação desta última com a fase estacionária, com consequente aumento no tempo de retenção cromatográfica.

A comparação da fração 10 com a mistura padrão de α e β -amirina, através de cromatografia gasosa, confirma a presença destas duas estruturas na fração, sendo que a β -amirina está em maior quantidade, na proporção de 3:1.

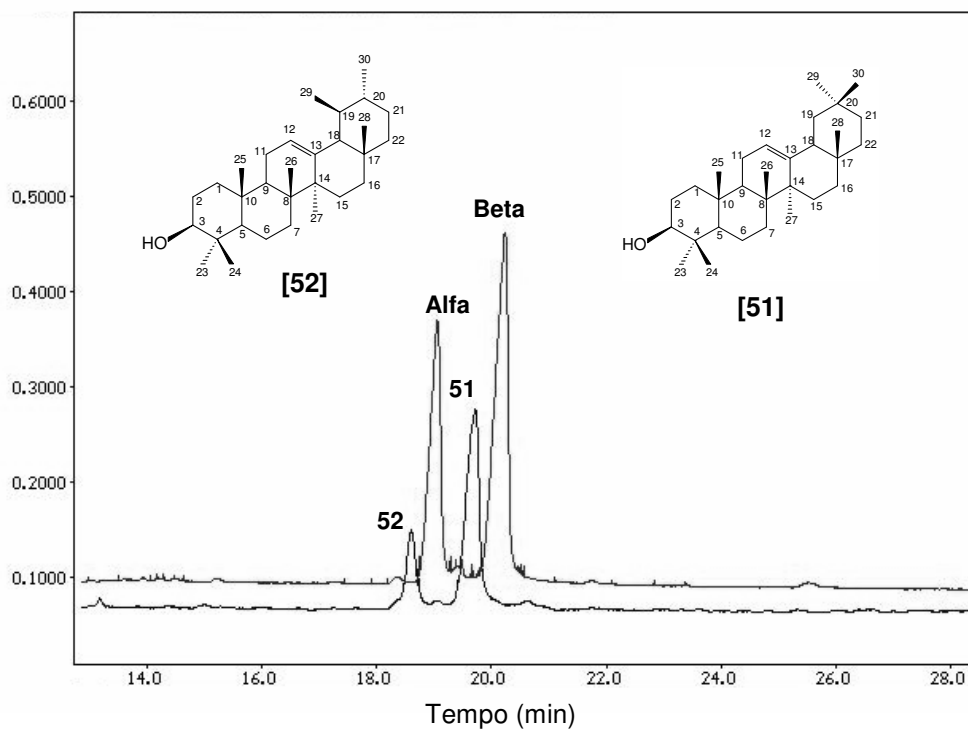


Figura 15. Cromatograma comparativo (expandido) da fração 10 da coluna 2 (compostos 51 e 52) e padrão da mistura de α e β -amirina (Coluna: DB-1 (30 m x 0,25 mm); T injetor: 300 °C; T detector: 290 °C; esquema de aquecimento: 200 – 300 °C, 10 °C/ min).

As frações 11-14 obtidas da coluna 1 foram recromatografadas (coluna 3), usando como eluentes uma mistura de hexano/AcOEt/EtOH, em ordem crescente de polaridade, de onde foram obtidas 27 frações, reunidas conforme seu perfil cromatográfico. As frações 5-6 desta coluna apresentaram-se como um sólido branco, e após análises espectroscópicas e ponto de fusão, foram também identificadas como uma mistura de α e β -amirina (compostos 52 e 51). Somando-se a quantidade obtida nas frações 7-11 da coluna 2, juntamente com as frações 5-6 da coluna 3, o total isolado da mistura dos compostos 51 e 52 foi de 659,4 mg.

Tabela 4. Valores de deslocamento de RMN ^1H (ppm, CDCl_3 , 400 MHz) de triterpenóides e esteróides isolados das espécies de *Eugenia*.

Hidrogênio	δ ^1H (ppm), CDCl_3 (400 MHz)			
	Composto 51 β -amirina	Composto 53 β -sitosterol	Composto 55 Betulina	Composto 56 Ácido 29-hidroxi-oleanólico
CH_3	0,79 (s, 3H, H28) 0,83 (s, 3H, H30) 0,87 (s, 3H, H25) 0,93 (s, 3H, H29) 0,96 (s, 3H, H26) 0,99 (s, 3H, H23) 1,13 (s, 3H, H24) 1,59 (s, 3H, H27)	0,67 (s, 3H, H18) 0,80 (s, 3H, H26) 0,82 (s, 3H, H27) 0,86 (s, 3H, H29) 0,92 (d, 3H, $J=7,6$, H21) 1,01 (s, 3H, H19)	0,96 (s, 3H, H23) 0,76 (s, 3H, H24) 0,82 (s, 3H, H25) 1,02 (s, 3H, H26) 0,98 (s, 3H, H27) 1,68 (s, 3H, H30)	0,77 (s, 3H, H30) 0,81 (s, 3H, H25) 0,93 (s, 3H, H26) 0,94 (s, 3H, H23) 0,97 (s, 3H, H24) 1,17 (s, 3H, H27)
H sp^2	β -amirina = 5,18 (m, H12)	5,37 (s, 1H, H6)	4,58 (s, 1H, H29a) 4,68 (s, 1H, H29b)	5,25 (t, 1H, H12)
Hidrogênios de carbono Carbinólico	3,21 (dd, 1H, $J_1 = 12$ Hz, $J_2 = 4,4$ Hz)	3,50 (m, 1H, H3)	3,18 (m, 1H, H3) 3,33 (d, $J_1 = 10,4$ Hz, H28a) 3,80 (d $J_1 = 10,4$ Hz, H28b)	3,18 (s, 2H, H29) 3,37 (m, 1H, H3)

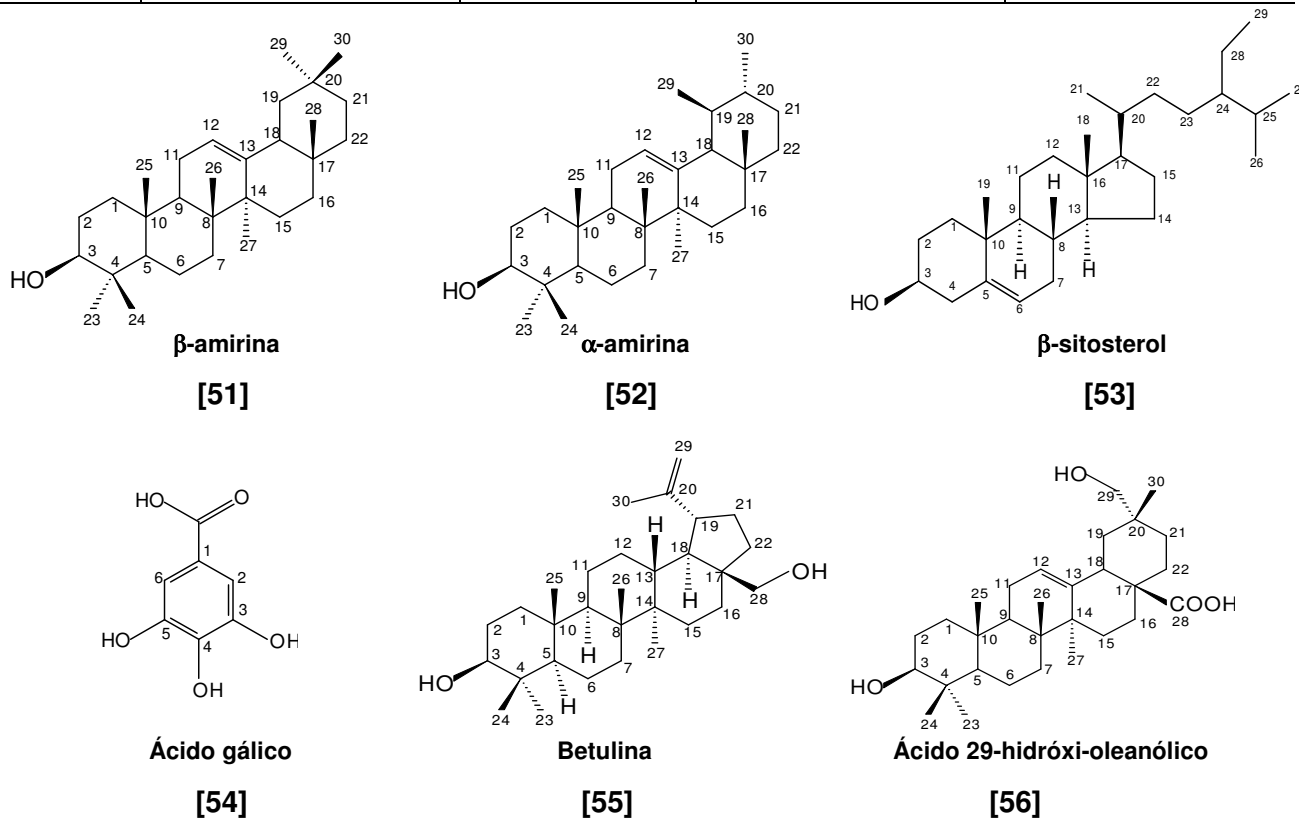


Figura 16. Compostos extraídos de *E. beaurepaireana* e *E. brasiliensis*

Tabela 5. Valores de deslocamento de RMN ^{13}C (ppm, CDCl_3 , 100 MHz) de triterpenóides e esteróides isolados das espécies de *Eugenia*.

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm), CDCl_3 (100 MHz)			
	Composto 51 β -amirina	Composto 53 β -sitosterol	Composto 55 Betulina	Composto 56 Ácido 29-hidroxi-oleanólico
1	38,5	37,4	38,9	38,6
2	27,2	31,8	27,6	27,5
3	79,0	72,0	79,2	78,5
4	39,7	42,5	39,0	38,7
5	55,1	140,9	55,4	55,6
6	18,3	121,9	18,5	18,3
7	32,6	32,1	34,4	32,8
8	38,7	32,1	41,1	39,3
9	47,6	50,3	50,6	46,7
10	37,1	36,7	37,3	36,9
11	23,5	21,3	21,0	23,3
12	121,7	39,9	25,4	122,6
13	145,2	42,5	37,5	143,9
14	41,7	56,9	42,9	41,6
15	26,1	24,5	27,2	27,6
16	26,9	28,4	29,3	22,9
17	32,4	56,2	48,0	46,4
18	47,2	12,0	48,9	40,7
19	46,8	20,0	48,0	40,2
20	31,1	36,3	150,7	35,6
21	34,7	19,0	29,9	29,5
22	36,9	34,1	34,2	37,9
23	28,1	26,2	28,2	28,1
24	15,6	46,0	15,5	15,1
25	15,6	29,3	16,3	14,7
26	16,8	19,6	16,2	16,5
27	25,9	19,2	14,9	25,2
28	28,4	23,2	60,8	180,0
29	33,3	12,2	109,9	73,2
30	23,6	---	19,3	18,3

As frações 7-9 obtidas da coluna 3 foram reunidas e recromatografadas, utilizando como eluente uma mistura de hexano/ AcOEt, em gradiente crescente de

polaridade (coluna 4), originando 9 frações. A fração 4, após ser purificada por recristalização em metanol, resultou em cristais brancos em forma de agulhas e foi denominada composto 53, sendo submetida análises espectroscópicas e determinação do seu ponto de fusão.

O composto **53** apresentou ponto de fusão 129-130 °C . Na análise do espectro de RMN ¹H (anexo 4), verificou-se uma grande quantidade de sinais na região de campo alto, entre 0,6 e 2,3 ppm, padrão encontrado em substâncias esteroidais e triterpênicas. Verificou-se também a presença de um sinal largo região de 5,4 ppm, correspondente a hidrogênios ligados a carbonos sp². A presença de um multiplete na região de 3,5 ppm caracteriza a presença de hidrogênio alfa ao carbono carbinólico. A análise do espectro de RMN de ¹³C (anexo 5) mostrou a presença de 27 sinais, descartando a hipótese de a estrutura ser um triterpeno, e verificou-se que a estrutura tratava-se de um esteróide. Observou-se a presença de dois sinais, em 140,9 e 121,9 ppm, correspondentes aos hidrogênios da ligação dupla, e um sinal em 72,05 ppm, correspondente a carbono carbinólico. A presença do sinal em 12,22 ppm reforçou a hipótese da estrutura tratar-se de um esteróide, pois este sinal é correspondente à metila ligada ao C-29 da cadeia lateral acíclica. A comparação dos dados espectrais com a literatura (KONGDUANG, WUNGSINTAWEEKUL e DEEKNAMKUL, 2008; JAYAPRAKASHA et al., 2007) confirmou a estrutura como sendo o **β-sitosterol** (p.f. lit. 138-139 °C) (DOMINGUEZ e VANEGAS, 1972). Os sinais relativos aos espectros de RMN ¹H e ¹³C podem ser observados nas tabelas 4 e 5 (páginas 35 e 36). A estrutura do composto 53 pode ser observado na figura 16 (página 34).

4.1.4.2. Fracionamento da fração acetato de etila

A fração acetato de etila (AcOEt) das folhas de *E. beaureapaireana* (3,65 g) foi submetida à cromatografia em coluna (coluna 5), utilizando como eluentes uma mistura de hexano/AcOEt/EtOH, de onde foram obtidas 24 frações. O procedimento de fracionamento está demonstrado na figura 17. A fração 7 – 10 obtida da coluna 5 foi submetida novamente ao fracionamento cromatográfico (coluna 6), utilizando como eluente uma mistura de hexano/AcOEt (1:1), de onde foram obtidas 24 frações. A reunião das frações 4 – 6 da coluna 6, foi recristalizada em metanol e apresentou-se como um cristal branco, que foi chamado de composto **54**.

O composto 54 apresentou ponto de fusão 248 °C (p.f. lit. 250-252 °C) (BACKHEET, 2003). O espectro de IV (anexo 6) mostra uma intensa banda em 3408 cm⁻¹, correspondente ao estiramento de ligações O-H, uma banda intensa e muito larga na região de 3000 – 3400 cm⁻¹ que juntamente com a intensa absorção devido

ao estiramento de carbonila em 1695 cm^{-1} identifica a presença da função carboxila. Entre outras absorções observam-se as bandas características de estiramento C=C em 1617 cm^{-1} e a presença de uma banda intensa em 1328 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação C-O. A análise do espectro de IV, juntamente com o alto ponto de fusão sugeriu que a estrutura tratava-se de um ácido carboxílico poliidroxilado.

No espectro de RMN de ^1H (anexo 7) observa-se a presença de apenas um singlete em 7,11 ppm correspondente a hidrogênio aromático. A análise do espectro de RMN de ^{13}C (anexo 8) mostrou a presença de 5 sinais, sendo um deles correspondente à carbonila de ácido em 169,63 ppm, e quatro sinais restantes na região dos aromáticos estão de acordo com a simetria da molécula de ácido gálico. Assim, podemos atribuir os valores de 109,66 ppm, sinal mais intenso, aos carbonos CH-2 e CH-6 e o sinal em 144,71 ppm aos carbonos oxigenados C-3 e C-5. Os dois sinais restantes, de mais baixa intensidade foram então atribuídos ao carbono C-1 (120,98 ppm) e ao carbono oxigenado C-4 (137,69 ppm) que pelo seu deslocamento químico em campo mais alto caracteriza um carbono oxigenado entre dois carbonos oxigenados. Este fato pode ser explicado pelo efeito de ressonância, que provoca maior blindagem eletrônica e deslocamento do sinal do carbono para campo mais alto. Desta forma, e com a comparação dos dados de RMN com os da literatura (HSU et al., 2007) fica confirmada a estrutura do composto 54 como sendo o ácido 3,4,5-hidroxi-benzóico (ácido gálico) (figura 16, página 34).

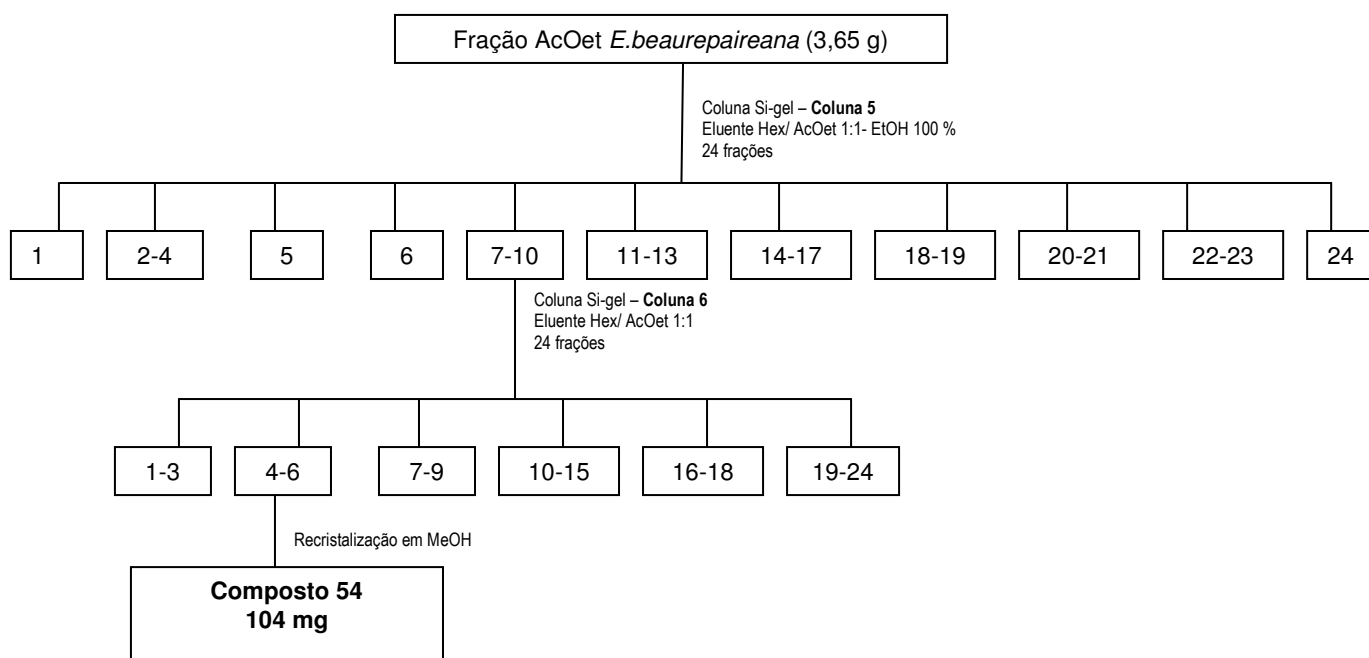


Figura 17. Fracionamento da fração AcOEt das folhas de *E. beurepaireana*

4.1.5. Fracionamento cromatográfico de *Eugenia brasiliensis*

Na espécie *E. brasiliensis* a fração insolúvel, fração hexano, diclorometano e acetato de etila das folhas, obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto, foram submetidas a procedimentos cromatográficos. Como resultado destes processos foram encontrados compostos fenólicos e triterpênicos, como descrito a seguir.

4.1.5.1. Fracionamento da fração insolúvel

O procedimento utilizado para o fracionamento da fração insolúvel das folhas de *E. brasiliensis* está demonstrado na figura 18. A fração insolúvel de *E. brasiliensis* foi submetida à cromatografia em coluna (coluna 7), usando como eluente gradientes de hexano/ AcOEt, partindo de hexano 100 % até AcOEt 100 %. Foram obtidas 27 frações, que foram agrupadas conforme sua polaridade e semelhança após análise por CCD. As frações reunidas 13 – 15 apresentaram-se como cristais brancos, que foram analisadas através de seu ponto de fusão, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa, espectroscopia no infravermelho, ressonância nuclear magnética de ^1H e ^{13}C , sendo identificadas como uma mistura de α e β -amirina (compostos 52 e 51, página 35), na proporção de 1:2,5, determinado por análise em CG.

A fração 21-23 apresentou-se como um precipitado branco opaco, que após recristalização em uma mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1 apresentou-se como cristais brancos, e foi denominado composto **55**.

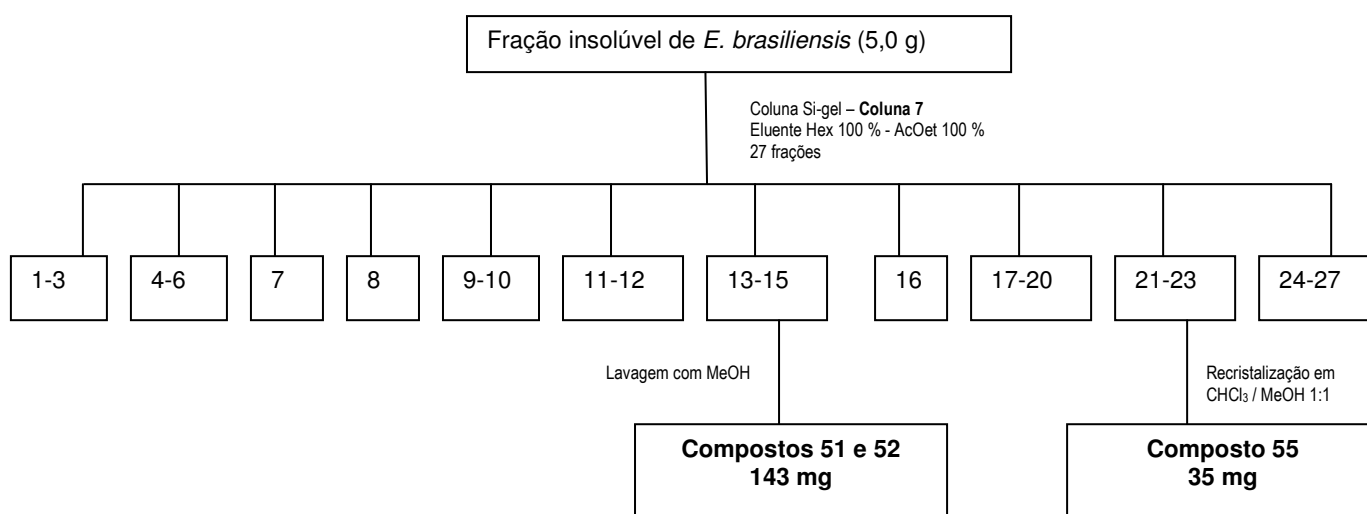


Figura 18. Fracionamento da fração insolúvel das folhas de *E. brasiliensis*

O precipitado correspondente ao composto 55, apresentou ponto de fusão de 256-257° C. No espectro de infravermelho (anexo 9), este composto apresentou uma banda característica de estiramento da ligação - OH em 3.399 cm⁻¹. Em 2941 cm⁻¹ apresentou uma banda correspondente ao estiramento de ligação C-H. A grande intensidade da banda de estiramento de ligações carbono-hidrogênio propõe que a estrutura seja relativa a triterpenos ou esteróides. Ainda em 1639 cm⁻¹ observou-se uma banda que corresponde a ligações C=C.

A análise do espectro de RMN de ¹H (anexo 10) mostrou a presença de sinais na região de 0,65 a 2,5 ppm, padrão encontrado em estruturas triterpênicas. Em 3,18 ppm observou-se a presença de um duplo duplete com integração para 1 hidrogênio, característico do H3 α de triterpenos C3 hidroxilados. Em 4,58 e 4,68 ppm observa-se dois singletos largos, típicos de um grupo exo-metileno de triterpenos com esqueleto lupano. Observou-se também a presença de um par de dupletos centrados em 3,33 e 3,80 ppm, com *J* = 10,4 Hz, com integração para um hidrogênio cada, sugerindo uma metade estrutural – CH₂OH.

No espectro de RMN de ¹³C (anexo 11), a presença de trinta sinais indica que o composto trata-se de um triterpeno. A comparação dos dados de RMN de ¹³C e de ¹H com os da literatura indicam que o composto trata-se da betulina (tabelas 4 e 5, páginas 35 e 36). No espectro de RMN de ¹³C, os sinais em 150,71 e 109,94 ppm correspondem aos carbonos da dupla ligação C-20 e C-29, respectivamente, sinais característicos de triterpenos com o esqueleto dos lupanos. Em 79,22 e 60,79 ppm observam-se os carbonos hidroxilados correspondentes a C-3 e C-28, respectivamente. A presença de seis metilas, que correspondem a duas ligadas em C-4 (C23 e C24), e outras em C-8 (C-26), C-10 (C-25), C-14 (C-27) e C-20 (C-30), e confirmam a estrutura da **betulina** (lit. 255 – 257 °C) (TANAKA, TABUSE e MATSUNAGA, 1988) (figura 16, página 34).

4.1.5.2. Fracionamento da fração hexano

A fração hexano de *E. brasiliensis* foi submetida à cromatografia em coluna (coluna 8), utilizando como eluentes uma mistura de hexano/AcOEt, partindo de hexano 100 % até AcOEt 100 %, em grau crescente de polaridade. A coluna rendeu 37 frações, agrupadas conforme suas características cromatográficas. Os procedimentos de fracionamento cromatográfico estão demonstrados na figura 19.

A fração 9 apresentou-se como um pó branco opaco, que foi recristalizado com uma mistura de CHCl₃/MeOH 1:1, e após a determinação do ponto de fusão, bem

como a análise das suas características espectroscópicas no IV, RMN de hidrogênio e carbono, foi identificada como betulina (composto 55).

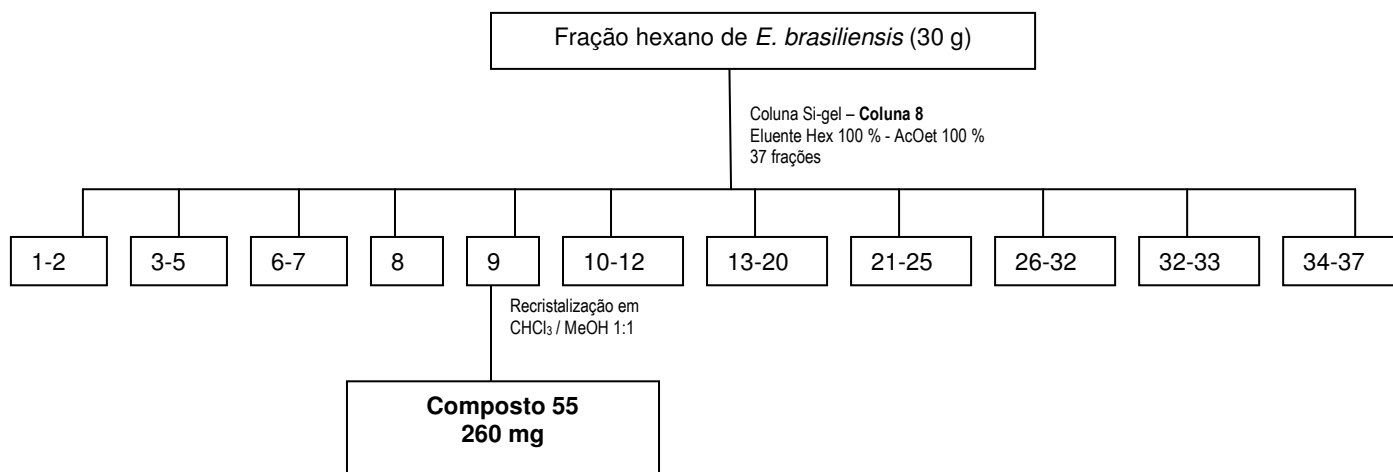


Figura 19. Esquema de fracionamento da fração hexano das folhas de *E. brasiliensis*

4.1.5.3. Fracionamento da fração diclorometano

A fração diclorometano de *E. brasiliensis* foi submetida à cromatografia em coluna (coluna 9), utilizando como eluentes uma mistura de hexano/AcOEt, partindo de hexano 100 % até AcOEt 100 %, em grau crescente de polaridade. A coluna rendeu 33 frações, agrupadas conforme suas características cromatográficas. Os procedimentos de fracionamento cromatográfico estão demonstrados na figura 20.

As frações 4-9, apresentaram-se como um pó branco opaco, que foi recristalizado com uma mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1, e após a determinação do ponto de fusão, bem com a análise das suas características espectroscópicas no IV, RMN de hidrogênio e carbono, foi identificada novamente como o triterpeno betulina (composto 55). Somando a quantidade obtida nas frações insolúvel, hexano e diclorometano, a quantidade total isolada do composto 55 foi de 805 mg.

A fração 16, de onde foi extraído o composto **56**, apresentou-se como um pó branco opaco, que foi encontrado apenas na fração diclorometano e apresentou ponto de fusão de 286 – 292, 5 °C. Quando eluído por CCD (eluente: hexano/AcOEt 1:1, revelador sulfato de cério 2%) apresentou menor *Rf* que o da betulina, o que indicou que o composto tem maior polaridade em relação a este triterpeno, e coloração arroxeadada, característica dos triterpenos e esteróides. A análise do espectro de RMN de ^1H (anexo 12) mostrou um sinais na região região de 0,7 – 2,25 ppm, característica correspondente aos compostos da classe dos triterpenos e esteróides. Observou-se também um singleto, com integral para dois hidrogênios em 3,18 ppm, e um multipletto em 3,37 ppm, com integral para um hidrogênio, correspondentes aos átomos de

hidrogênio ligados a um carbono oxigenado. Observou-se também um tripleto em 5,25 ppm com integral para um hidrogênio, correspondente a um hidrogênio de carbono sp^2 .

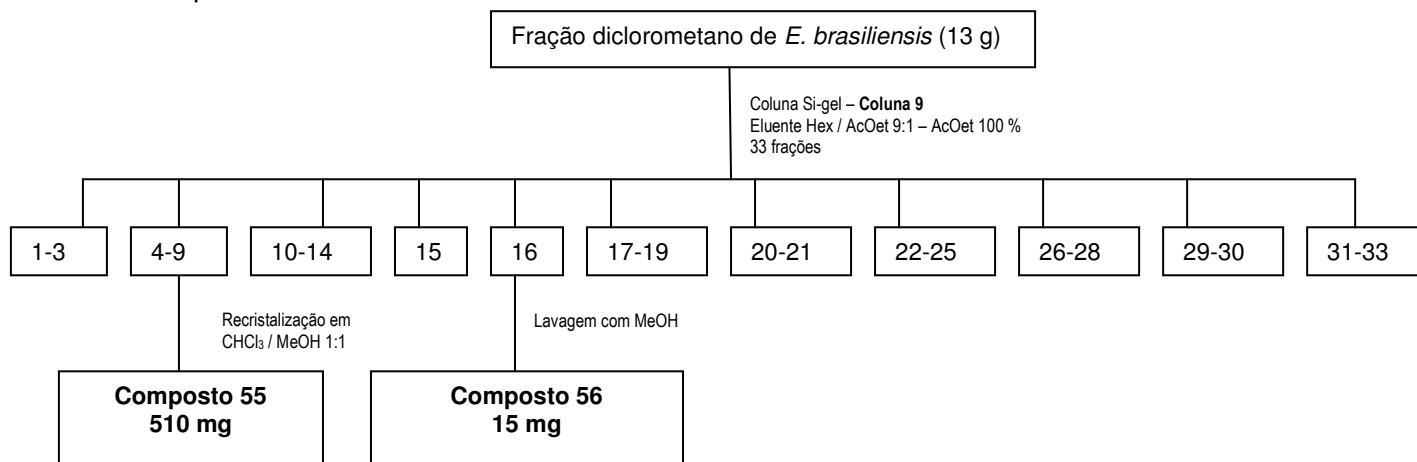


Figura 20. Fracionamento da fração diclorometano das folhas de *E. brasiliensis*.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (anexo 13) mostrou a presença de um sinal em 180,0 ppm, correspondente a um carbono de grupo carboxila, sugerindo que o composto fosse um derivado ácido carboxílico. A presença dos sinais em 122,6 ppm e 143,9 ppm, correspondente aos carbonos 12 e 13 da ligação dupla dos triterpenos com esqueleto oleanano confirmou o esqueleto do composto. Foram observados, na região de 78,5 e 73,2 ppm dois sinais correspondentes a carbonos alifáticos oxigenados. No espectro de RMN ^{13}C DEPT (anexo 14), foi observado que o sinal em 78,5 ppm tratava-se de um CH, sendo esse sinal atribuído então ao C3 do esqueleto dos triterpenos. O sinal em 73,2 ppm que corresponde a um carbono metilênico, sugere que este carbono presente na estrutura esteja hidroxilado, fato que pôde ser observado também no espectro de RMN de 1H (sinal em 3,18 ppm, com integral para dois hidrogênios). A comparação dos deslocamentos químicos dos espectros de RMN do composto 56 (tabelas 4 e 5, páginas 35 e 36) com a literatura (MAHATO e KUNDU, 1994; IKUTA e ITOKAWA, 1989) levou à conclusão que esta hidroxila estaria ao carbono 29, sendo este composto identificado como o ácido **29-hidroxi-oleanólico**, ou **ácido mesembriantemoidigênico** (lit. 305 - 309 °C) (TURSCH, LECLERCQ e CHIURDOGLU, 1965). Este triterpeno já foi isolado de espécies da família Araliaceae (GUO, LIN e LI, 2005; JIANG et al., 2006), Litraceae (DOU et al., 2005), Ranunculaceae (DAWIDAR et al., 2001), Rubiaceae (LAPIKANON et al., 1983), Vitaceae (BRIESKORN e BLOSCZYK, 1981), dentre outras. Porém, nas espécies da família Myrtaceae não foram encontrados registros do isolamento ou identificação deste composto.

4.1.5.4. Fracionamento da fração acetato de etila

A fração acetato de etila de *E. brasiliensis* apresentou-se com aspecto de pó castanho, e após diversas cromatografias em coluna de sílica, utilizando como eluentes misturas de hexano/AcOEt/EtOH, em gradiente crescente de polaridade, resultou no isolamento de alguns compostos fenólicos.

A fração foi primeiramente submetida à cromatografia em coluna (coluna 10) utilizando como eluentes uma mistura inicial de hexano/AcOEt 3:7, que teve sua polaridade aumentada através da adição de etanol, até a mistura final de AcOEt/EtOH (7:3). A coluna rendeu 34 frações, que foram agrupadas por semelhança cromatográfica, conforme demonstrado na figura 21.

As frações 2 – 5 da coluna 10, após agrupadas, foram cromatografadas em coluna (coluna 11) (figura 21), utilizando como eluentes misturas de hexano/ AcOEt, de onde foram obtidas 25 frações. As frações 5-6 foram novamente submetidas ao fracionamento em coluna (coluna 12), conforme mostra a figura 21. As frações 5 – 12 da coluna 12 foram reunidas (16 mg), e apresentaram-se como um sólido amarelo claro, opaco, porém impuro quando analisados por CCD (hexano/ AcOEt 6:4, revelador anisaldeído sulfúrico). Como as impurezas eram de natureza mais apolar que a amostra, esta foi purificada através de lavagem com hexano, de onde foi obtido o composto 57.

O composto **57** apresentou-se como um sólido amarelo claro de ponto de fusão 304-307 °C. O espectro de infravermelho (anexo 15) em pastilha de KBr apresentou uma banda de absorção larga em 3410 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da ligação O-H, e em 1693 cm^{-1} , uma banda intensa correspondente ao grupo carbonila conjugado.

O espectro de RMN de ^1H apresentou apenas 5 sinais com integração para um hidrogênio cada, na região dos aromáticos com um perfil típico de 5,7,3',4'-tetrahidroxi flavonóides (anexo 16). Os dois singletos largos em 6,1 e 6,3 ppm correspondem aos átomos de hidrogênio H6 e H8 do anel A dos flavonóides. O duplete em 7,7 ppm (H2'), juntamente com o duplo duplete em 7,6 ppm ($J_1 = 8,4$ Hz e $J_2 = 1,2$ Hz, H6'), e o duplete em 6,9 ppm ($J = 8,4$ Hz, H5') indicam o padrão de substituição 3', 4' do anel B. Estes dados permitem propor a estrutura como a 3,5,7,3',4' pentahidroxi flavona, cujos dados espectroscópicos (tabela 6) estão de acordo a literatura (NAWWAR et al., 1984).

O espectro de ^{13}C apresentou sinais em 176,1 ppm, correspondente à carbonila em C4, os sinais em 136,0, 161,3, 164,4 145,0, e 146,7 ppm, correspondentes aos carbonos 3, 5, 7, 3', e 4', ligados a grupos hidroxila (anexo 17). A comparação destes

dados, juntamente com os sinais em 157,0 (C9), 147,5 (C2), 122,9 (C1'), 120,4 (C6'), 115,0 (C2'), 114,7 (C5'), 103,0 (C10), 98,0 (C6) e 93,2 (C8) com a literatura (AGRAWAL, 1989), confirma a estrutura 3,5,7,3',4' – pentahidroxi-flavona, ou seja, o flavonóide **quercetina** (p.f. lit. 310 - 312 °C) (KORUL'KINA et al., 2004) (figura 22). A amostra também foi co-eluída em cromatografia em camada delgada com um padrão deste flavonóide, demonstrando o mesmo o *R_f* (0,6, no eluente hexano/acetato de etila 6:4), e as mesmas formas e cores da mancha, após a revelação com anisaldeído sulfúrico.

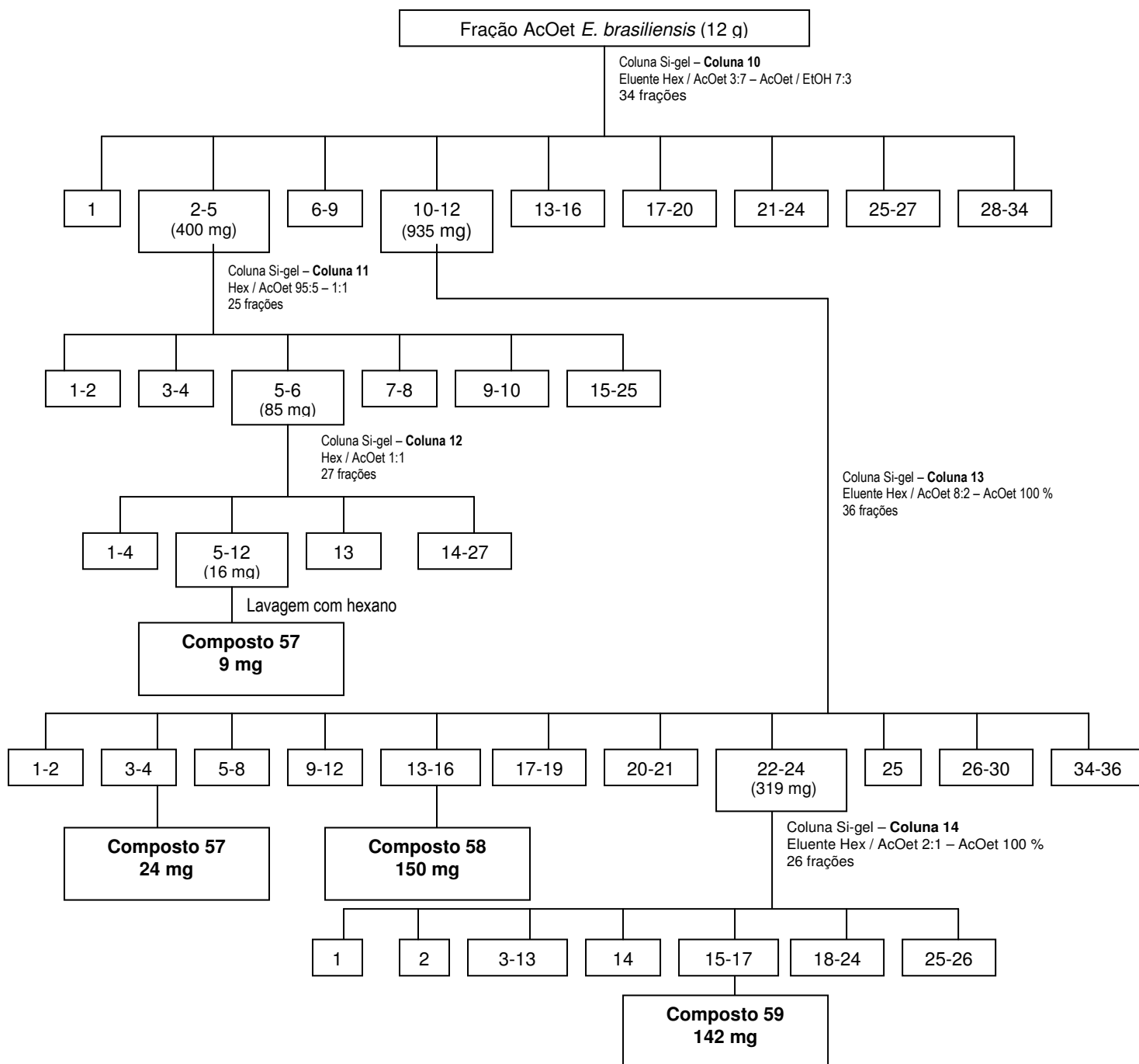


Figura 21. Fracionamento da fração AcOEt das folhas de *E. brasiliensis*

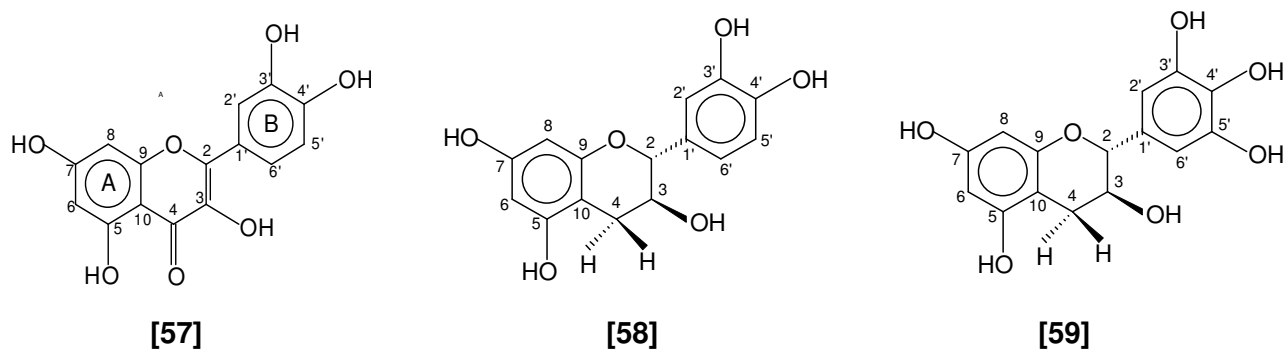


Figura 22. Compostos fenólicos isolados da fração acetato de etila das folhas de *E. brasiliensis*.

Tabela 6. Valores de deslocamento de RMN ^1H (ppm, CD_3OD , 400 MHz) de compostos fenólicos isolados da fração AcOEt de *Eugenia brasiliensis*.

Hidrogênio	δ ^1H (ppm) (CD_3OD , 400 MHz)		
	Composto 57 Quercetina	Composto 58 Catequina	Composto 59 Galocatequina
H-2	---	4,56 (d) ($J_1 = 7,6$)	4,5 (d) ($J_1 = 6,8$)
H-3	---	3,86 (m)	3,9 (m)
H-4	---	$H_{\text{axial}} = 2,38$ (dd) ($J_1 = 16,0; J_2 = 7,9$)	$H_{\text{axial}} = 2,5$ (dd) ($J_1 = 16,0; J_2 = 7,6$)
		$H_{\text{equat.}} = 2,68$ (dd) ($J_1 = 16,0; J_2 = 5,2$)	$H_{\text{equat.}} = 2,8$ (dd) ($J_1 = 16,0; J_2 = 5,6$)
H-6	6,1 (s) largo	5,9 (dd) ($J_2 = 2,4$)	5,9 (d) ($J_1 = 2,4$)
H-8	6,3 (s) largo	5,8 (dd) ($J_2 = 1,6$)	5,8 (d) ($J_1 = 2,4$)
H-2'	7,7 (s) largo	6,74 (d) ($J_2 = 1,6$)	6,4 (s)
H-5'	6,9 (d) ($J_1 = 8,4$)	6,66 (d) ($J_1 = 8,0$)	---
H-6'	7,6 (dd) ($J_1 = 8,4; J_2 = 1,2$)	6,63 (dd) ($J_1 = 8,0; J_2 = 1,6$)	6,4 (s)

As frações 10-12 da coluna 10 foram recromatografadas (coluna 13) (figura 21), usando como eluentes uma mistura de hexano/AcOEt 8:2, aumentando sua polaridade até AcOEt 100%. Foram obtidas nesse fracionamento 34 frações, que foram analisadas por CCD e reunidas quando necessário.

As frações 3-4 da coluna 13, após reunidas, tinham a aparência de um sólido amarelo pálido, que após a determinação do ponto de fusão e análise espectroscópica de IV e RMN de hidrogênio, puderam ser identificadas novamente como o flavonóide **quercetina** (composto 57).

Já as frações 13-16 da coluna 13 mostraram-se como um sólido alaranjado-pálido, que foi denominado composto **58**. Este composto apresentou faixa de fusão entre 165,4 – 172,5 °C. O espectro de infra-vermelho (anexo 18) apresentou uma banda intensa em 3.386 cm^{-1} , correspondente aos grupos hidroxila, uma banda intensa em 1615 cm^{-1} , correspondente ao estiramento das ligações C=C, e bandas na região de 1142 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento das ligações C-O.

A análise do espectro de RMN ^1H (anexo 19) (tabela 6, página 45) mostrou sinais na região dos hidrogênios aromáticos semelhantes ao padrão de substituição 5, 7 no anel A, e 3', 4' no anel B dos flavonóides, semelhantes aos encontrados na estrutura da quercetina. Porém, a presença de dois sinais, um na região de 2,38 ppm (dd, $J=16,0$ e 7,9), e outro em 2,68 ppm (dd, $J=16$ Hz e 5,2 Hz) correspondente aos hidrogênios axial e equatorial na posição 4, sugeriu que a estrutura tivesse o esqueleto tipo flavan-3-ol, sem a presença da carbonila no carbono 3, característica típica das estruturas do grupo das catequinas. A presença de um duplete em 4,56, com $J_1 = 7,6$ Hz (axial-equatorial), correspondente ao hidrogênio 2, reforçou a hipótese da estrutura ser a catequina. Os dados de RMN foram comparados à literatura (SHEN, CHANG e HO, 1993) e a amostra foi co-eluída em CCD com um padrão de catequina ($R_f = 0,6$, eluente: hexano/AcOEt 3:1, revelador anisaldeído sulfúrico), apresentando o mesmo R_f , cor e forma da mancha após a revelação, confirmando a estrutura como a **catequina** (p.f. lit. 172 – 175 °C) (DU et al., 2005) (figura 22, página 45).

As frações 22-24 da coluna 13 foram cromatografadas em coluna (coluna 14) (figura 21) usando como eluente uma mistura de hexano/AcOEt 2:1, em gradiente crescente de polaridade até AcOEt 100 %. Foram obtidas 26 frações, sendo que as frações 15-17, após agrupadas, apresentaram-se também como um sólido alaranjado-pálido, que foi denominado composto **59**. O composto 59 apresentou ponto de fusão 225 – 228,3 °C. No espectro de IV, observou-se uma banda intensa em 3564 cm^{-1} , correspondente a presença de vários grupos –OH. Observou-se também a banda intensa em 1621 cm^{-1} correspondente ao estiramento de ligações C=C. A análise do espectro de RMN ^1H mostrou o padrão de substituição 5,7 presente no anel A dos flavonóides, e as características espectrais do esqueleto flavan-3-ol. Porém, a análise dos sinais na região dos hidrogênios aromáticos demonstrou padrões de substituição diferentes de 3', 4' no anel B. Ao invés disto, foi verificada a presença de um singlete em 6,4 ppm, com integral para 2 hidrogênios, sugerindo um radical pirogalo. A

comparação dos dados espectrais de IV (anexo 20) e RMN ^1H (tabela 6, página 45) (anexo 21) com a literatura (FOO et al., 2000), bem como a co-eluição da amostra com um padrão, através de CCD ($R_f = 0,72$, Hexano/AcOEt 1:3, revelador anisaldeído sulfúrico) confirmou a estrutura como sendo a **galocatequina** (p.f. lit. 218 °C) (DAT et al., 2005 (figura 22, página 45).

4.1.6. Análise da fração acetato de etila das folhas de *E. brasiliensis* através de eletroforese capilar.

A fração acetato de etila das folhas de *E. brasiliensis* foi submetida a uma análise para determinação do seu perfil fitoquímico, mais especificamente com a intenção de determinar o perfil dos seus compostos fenólicos. Esta análise é comumente feita através de métodos cromatográficos como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Porém, um novo método tem sido usado para a análise de produtos naturais, a eletroforese capilar (EC). Dentre as técnicas de separação, a EC é das mais econômicas, e possui ainda várias vantagens como a eficiência de separação superior aos métodos cromatográficos, rapidez na análise, pouca quantidade de amostra necessária e baixo consumo de solventes, o que produz menos resíduos para descarte (ZHANG et al., 2008). A EC tem sido usada como uma nova técnica para a análise de compostos fenólicos (GÓMEZ-CARAVACA et al, 2006), mostrando sucesso na análise destes no vinho e em extratos vegetais (NONG et al., 2005; DEMIANOVA et al., 2003). Estudos mostram superioridade da técnica em relação à CLAE na análise de flavonóides (KOCEVAR et al., 2008).

Na EC, a separação ocorre devido à migração diferencial de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico, a qual é função da razão entre carga e tamanho do íon e da presença do fluxo eletrosmótico (resultado da carga das paredes internas do capilar após aplicação do campo elétrico) para um dado pH (SUNTORNUSUK, 2002; ISSAQ, 2000). Como os compostos fenólicos e flavonóides são ácidos fracos, os experimentos são conduzidos com soluções tampão de pH próximo a 10, para a melhor separação dos componentes. Acoplados ao equipamento, estão comumente detectores por ultravioleta (UV) ou arranjos de fotodiodos (DAD).

Como os flavonóides e compostos fenólicos são moléculas que podem comumente estar ligadas a açúcares formando heterosídeos, análises foram realizadas com as amostras antes e após um processo de hidrólise ácida. A hidrólise tem por objetivo quebrar as ligações entre agliconas e açúcares, e permite visualizar,

por exemplo, a região do eletroferograma onde se localizam estes compostos, estimar suas agliconas através do uso de padrões, além de outras informações.

Os eletroferogramas obtidos nas análises estão demonstrados na figura 23. O eletroferograma da fração acetato de etila antes da hidrólise apresentou vários picos. A análise dos espectros de UV de alguns picos na região de 6 a 8 minutos (picos *a–*e, figura 23-A), demonstra uma grande similaridade com os espectros apresentados por flavonóides ligados a açúcares. Este fato é confirmado quando se observa o espectro do flavonóide glicosilado rutina (figura 24-B), que apresenta dois máximos de absorção característicos, na região de 280 e 380 nm, de maneira similar ao espectro de UV de *a (figura 24-A).

Na análise do eletroferograma antes da hidrólise (figura 23-A) pode-se observar também a presença de flavonóides livres, como as agliconas miricetina e quercetina, correspondentes aos picos 3 e 4 do eletroferograma. Além de flavonóides, observa-se também a presença de compostos fenólicos simples, como o ácido gálico, correspondente ao pico 5.

Após a hidrólise ácida (figura 23-B), os sinais da região entre 6 e 8 minutos diminuíram consideravelmente, e os picos correspondentes às agliconas quercetina e miricetina apresentaram um aumento de intensidade. Este fato reforça que estes sinais possam se tratar de flavonóides ligados à açúcares através de ligações O-glicosídeo, quebradas durante o processo de aquecimento em meio ácido, cujas agliconas seriam provavelmente quercetina e miricetina. Observou-se um aumento do pico corresponde ao ácido gálico, sugerindo que estes derivados possam estar ligados, além de açúcares, a unidades do radical galato.

Compostos fenólicos como flavonóides, na forma livre e como heterosídeos, bem como outros fenóis foram isolados de várias espécies do gênero *Eugenia*, como *Eugenia jambolana* (TIMBOLA et al., 2002), *E. jambos* (SLOWING, CARRETERO e VILLAR, 1994; SRIVASTAVA, SHAW e KULSHRESHTHA, 1995) *Eugenia edulis* (HUSSEIN et al., 2003) entre outras. Muitas atividades biológicas destas espécies estão relacionadas à presença destes compostos, como a atividade antioxidante (EINBOND et al., 2004), antiinflamatória e inibidora da xantina oxidase (enzima relacionada à patologia da artrite reumatóide) (THEODULOZ et al., 1988; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987).

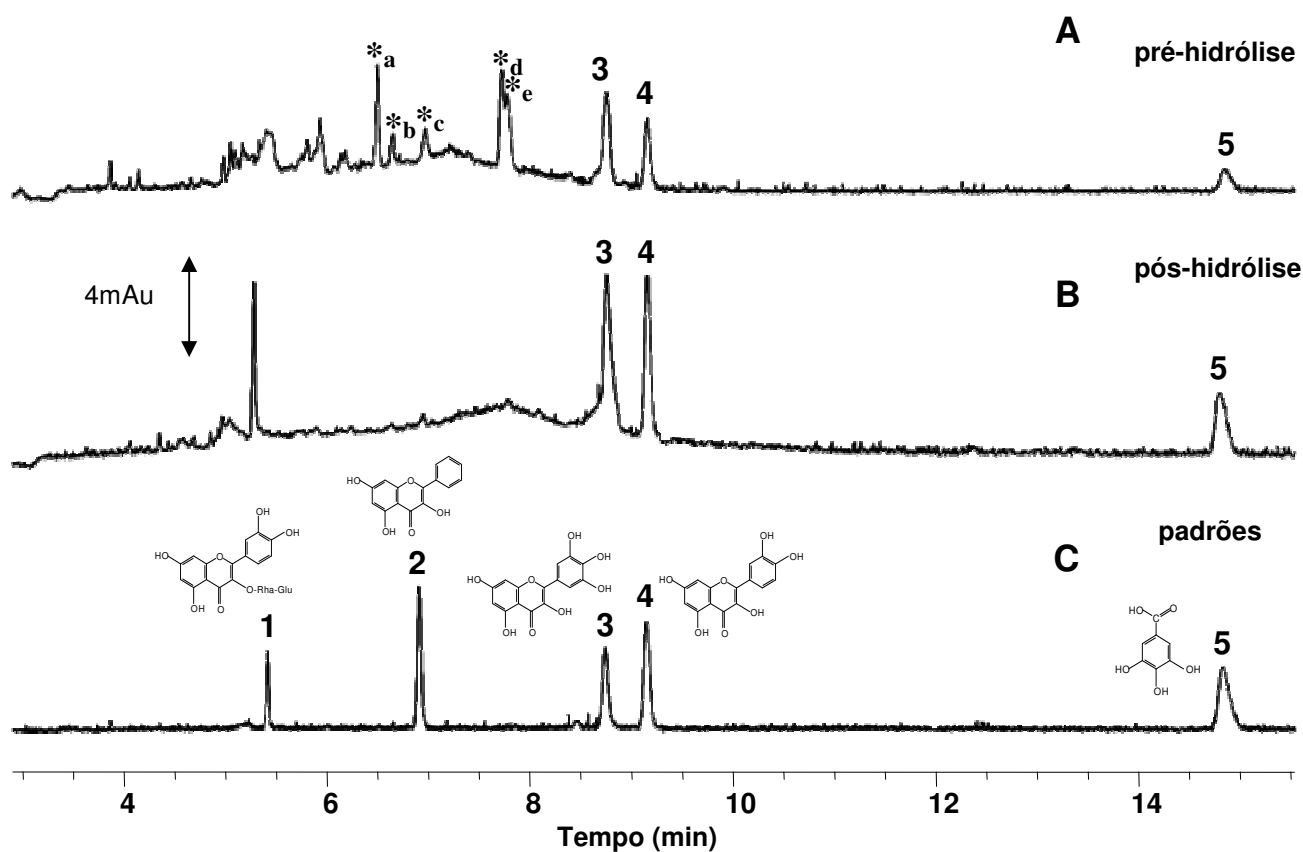


Figura 23. Eletroferogramas: **A** – fração AcOEt das folhas de *E. brasiliensis* (2g/L) em metanol (antes da hidrólise). (*a – e: heterosídeos flavonoídicos) **B** - fração AcOEt das folhas de *E. brasiliensis* após a hidrólise. **C** - Soluções padrão: 1 – Rutina; 2 – Galangina; 3- Miricetina; 4 – Quercetina; 5 – Ácido gálico. Condições: capilar de sílica fundida (50 μ m d.i.x 45 cm comprimento total (36,5 cm até o detector). Eletrólitos: tetraborato de sódio 40 mM (v/v) (em metanol 10 %), pH 9,3; voltagem de separação: 30 kV; injeção hidrodinâmica 4 s a 50 mbar; temperatura 25 °C, detecção a 280 nm.

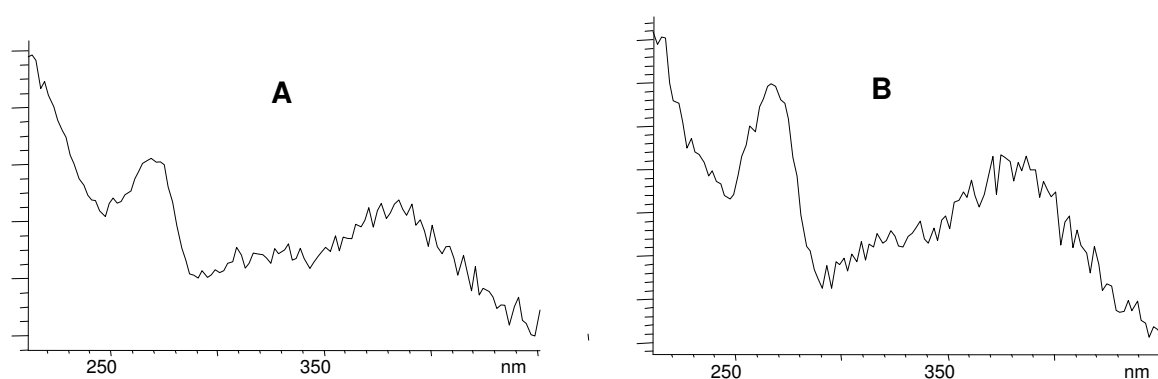


Figura 24. Espectro de UV de *a (heterosídeo flavonoídico, fração AcOEt) (A) e rutina (B).

Os compostos isolados e identificados de *E. brasiliensis* e *E. beaurepaireana* pelas diferentes metodologias empregadas neste trabalho foram compostos fenólicos, triterpenóides e esteróides. Estes compostos estão em concordância com as rotas biossintéticas e a fitoquímica descrita para a família Myrtaceae e o gênero *Eugenia*, já que seus esqueletos já foram anteriormente descritos nesta família e gênero, confirmando a posição taxonômica destas espécies e os resultados da análise fitoquímica preliminar desenvolvida no início do trabalho. Os compostos aqui descritos são inéditos nestas espécies, e dentre todas as substâncias isoladas, o ácido 29-hidroxi-oleanólico ou ácido mesembriantemoidigênico (composto 56) foi isolado pela primeira vez em uma espécie da família Myrtaceae.

4.2. MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL E OBTENÇÃO DE DERIVADOS DA BETULINA

Devido à quantidade isolada do triterpeno betulina (lup-20(29)-eno-3 β ,28-diol), pertencente à classe dos lupanos, a partir de frações das folhas de *Eugenia brasiliensis* (805 mg), foi possível realizar reações de modificação estrutural neste composto. Este triterpeno (figura 25) possui três posições alvo para a modificação estrutural, sendo o grupo hidroxila secundário em C-3, menos reativo, devido ao maior impedimento estérico, o grupo hidroxila em C-28, ligado a um carbono primário, mais reativo, e a ligação dupla entre C20 – C29. Estas posições foram bastante exploradas com vistas a estudos de relação estrutura-atividade envolvendo várias atividades farmacológicas (SAMI et al., 2006).

Muitos estudos com derivados da betulina foram encontrados na literatura, relatando atividade antiviral, contra os vírus influenza A, causador da gripe, contra o vírus herpes simplex tipo 1, causador da herpes (BALTIMA et al., 2003), contra o vírus HIV (YUAN et al., 2004; SUN et al., 1998). Foram encontrados trabalhos sobre a síntese de derivados da betulina com atividades antiinflamatória e antitumoral, como por exemplo, contra células de melanoma (KASPERCZYK et al., 2005), e de carcinoma pulmonar e endotelial (MUKHERJEE et al., 2004), contra células de câncer prostático, ovariano (URBAN et al., 2004), contra leucemia (HATA, HORI, e TAKAHASHI, 2002), contra câncer de mama (URBAN et al., 2004; FULDA et al., 1997), contra osteosarcoma (SAREK et al., 2003), entre outros.

Sobre a atividade antibacteriana da betulina alguns relatos foram encontrados, mostrando que este triterpeno não possui atividade antibacteriana satisfatória (SAMI et al., 2006). Com seus derivados, porém, poucos estudos foram realizados no sentido de avaliar se modificações estruturais em sua molécula promoveriam melhoras na atividade. Deste modo, a modificação estrutural da betulina realizada neste trabalho,

através de reações simples, teve o objetivo de avaliar a influência de diferentes substituintes colocados nos grupos hidroxila primário e secundário (posições C-28 e C-3, respectivamente) na atividade antibacteriana desta substância. Estes grupos foram submetidos a reações de oxidação e esterificação, e os derivados obtidos foram identificados através de seu ponto de fusão e espectros de IV e RMN de hidrogênio. Foram obtidos no total oito derivados, sendo dois deles oxidados, e seis deles esterificados. De todos os compostos obtidos, apenas um deles, o derivado esterificado 3,28-decanoato de betulina é inédito na literatura.

4.2.1. Obtenção dos derivados oxidados da betulina

Os derivados oxidados foram obtidos através de reações utilizando o clorocromato de piridínio (PCC), com rendimentos de 67 e 68 %. O resumo dos procedimentos está demonstrado na figura 25.

O tratamento da betulina com o PCC em CH_2Cl_2 objetivou a preparação de derivados com os grupos formila no carbono 28 e carbonila no carbono 3. A diferença de reatividade dos grupos hidroxila da molécula foi explorada, e a reação de oxidação pôde originar dois produtos diferentes, de acordo com o tempo de reação, primeiramente oxidado apenas na posição 28 (5 minutos), e posteriormente oxidado nas posições 28 e 3 (1,5 horas). O objetivo inicial era a obtenção dos compostos lup-20(29)-eno, 3 β -ol, 28-al e lup-20(29)-eno, 3-oxo, 28-al como produtos. Porém, como resultados da reação foram obtidos o ácido lup-20(29)-eno, 3 β -ol, 28-óico, ou ácido betulínico (**60**) e o ácido lup-20(29)-eno, 3-oxo, 28-óico, ou ácido betulônico (**61**) (figura 25). O diclorometano, solvente utilizado na reação, não foi seco, e a pequena quantidade de água contida neste levou à oxidação do aldeído ao grupo ácido carboxílico no carbono 28. Devido a uma baixa quantidade de betulina disponível para a obtenção dos derivados, estas reações não puderam ser repetidas.

A estrutura dos derivados obtidos pôde ser confirmada a partir dos seus dados espectroscópicos. Ambos conservaram as características espectroscópicas do esqueleto lupano, mas algumas modificações puderam ser observadas. No espectro de infra-vermelho (anexos 22 e 23), observou-se o aparecimento da banda correspondente à carbonila de ácidos, na região de 1688 cm^{-1} (composto 60) e 1703 cm^{-1} (composto 61). Esperava-se que os produtos obtidos apresentassem um grupo aldeído em C-28, que poderia ser verificado pelo aparecimento da banda correspondente à ligação C=O do grupo aldeído ($\sim 1730\text{ cm}^{-1}$). Porém, isso não foi observado, dando indícios de que as reações levaram a obtenção do derivado de maior grau de oxidação nesta posição.

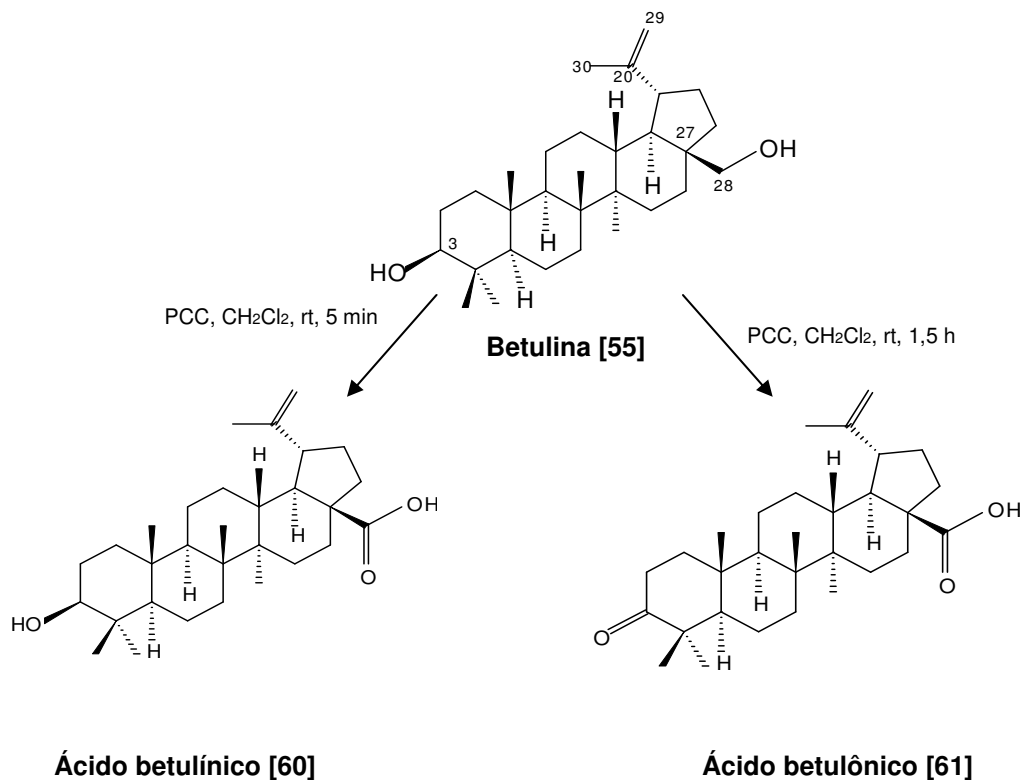


Figura 25. Esquema reacional para obtenção de derivados oxidados da betulina.

Nos espectros de RMN ¹H de 60 e 61 (anexos 24 e 25) observou-se a ausência do hidrogênio do aldeído na região de 9 ppm, confirmando a obtenção do grupo carboxila no carbono 28 nestes compostos. Verificou-se também o desaparecimento dos dubletos na região de 3,33 e 3,80 ppm, correspondentes ao acoplamento geminal dos hidrogênios H28a e H28b da betulina. A diferença espectral principal entre 60 e 61 ocorre na oxidação o grupo hidroxila na posição 3. Verificou-se o desaparecimento do multiplete em 3,18 ppm no composto 61, correspondente ao H3 da betulina, pois este teve esta posição oxidada, e manutenção deste sinal em 60, onde o grupo hidroxila permaneceu sem modificações. A comparação entre as principais modificações dos deslocamentos químicos obtidos nos derivados preparados, em relação ao composto de partida, pode ser observada na tabela 7 (página 54).

4.2.2. Obtenção dos derivados esterificados da betulina

Os derivados esterificados da betulina e ácido betulínico foram obtidos através do tratamento destes compostos, dissolvidos em piridina ou trietilamina com anidrido acético e cloretos de acila correspondentes, com rendimentos de 45,2 a 78,9 %. O resumo dos procedimentos realizados está demonstrado na figura 26.

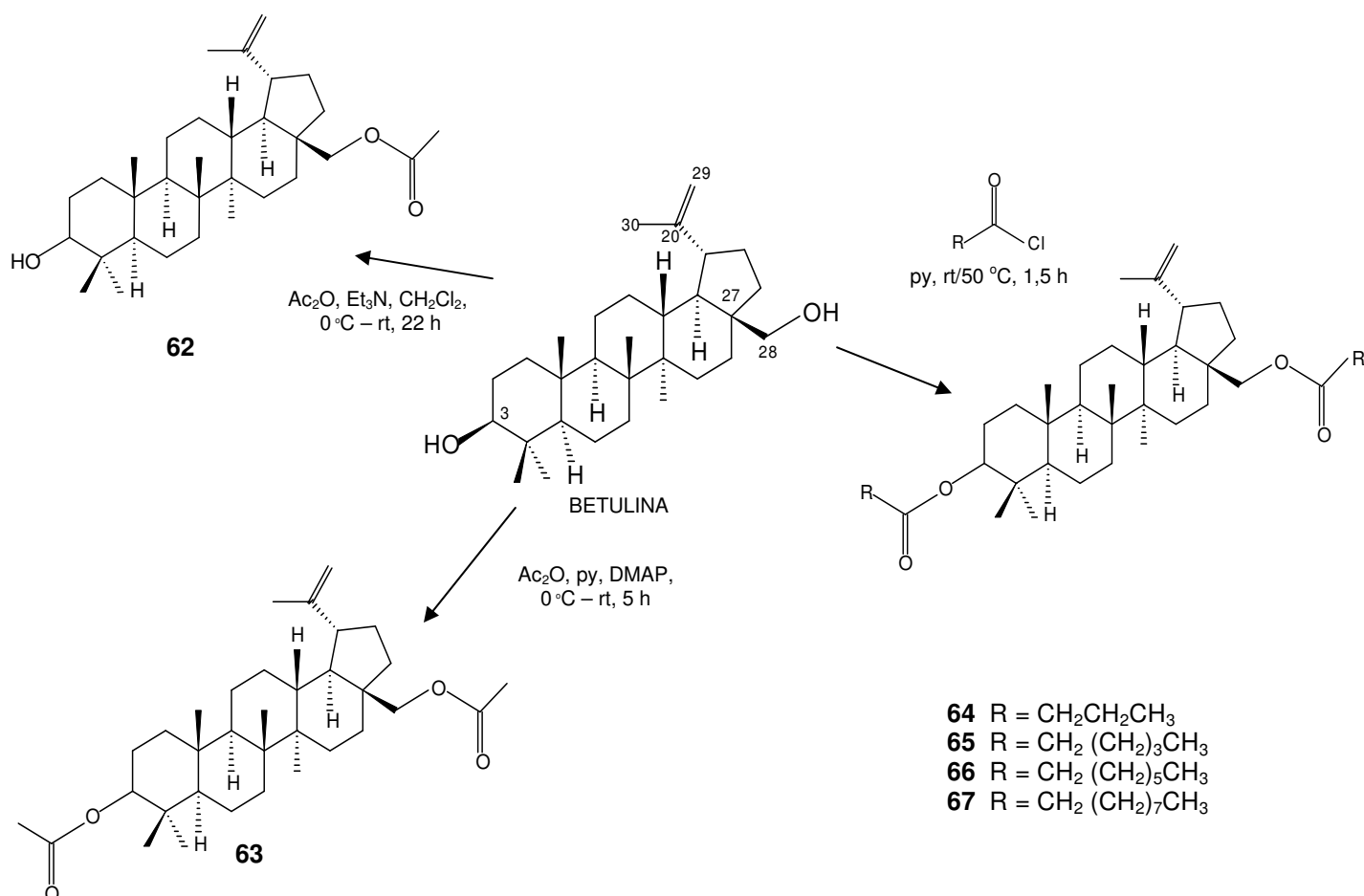


Figura 26. Esquema reacional para obtenção dos derivados esterificados da betulina.

Para a obtenção de **62** (figura 26), explorou-se a maior reatividade do OH primário em C28, obtendo-se um derivado esterificado apenas nesta posição, em condições de esterificação regioseletiva, com a presença do grupo 3-OH livre, conforme descrito por Hiroya et al. (2002). O espectro de infravermelho (anexo 26) deste derivado mostrou o aparecimento de uma banda em 1728 cm^{-1} , característica de grupo carbonila de ésteres. Observou-se a permanência da banda correspondente ao estiramento do grupo 3-OH, mostrando que este não reagiu. No espectro de RMN de ^1H (tabela 7, anexo 27) observou-se o aparecimento de um singleto em 2,07 ppm, com integração para 3 hidrogênios, correspondente aos hidrogênios pertencentes ao $-\text{CH}_3$ do grupo acetil. Observou-se também um deslocamento dos dois dubletos correspondentes aos hidrogênios H28a e H28b, de 3,3 – 3,8 ppm para 3,85 – 4,24 ppm, respectivamente, devido à influência do grupo carbonila vizinho, bem como a permanência do sinal correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono na posição 3, confirmando que o grupo $-\text{OH}$ ligado a este não reagiu.

Os compostos **63 - 67** (figura 26) apresentaram espectros de IV e RMN bastante similares. Nestes derivados, ambos grupos $-\text{OH}$ foram esterificados. No espectro de IV de 63 pode-se observar o aparecimento da banda correspondente à carbonila do

éster em 1737 cm^{-1} , além do desaparecimento da banda correspondente ao estiramento das ligações -OH (anexo 28). No espectro de RMN de 63 (tabela 7, anexo 29), observou-se, assim como em 62, o deslocamento dos dois dubletos correspondentes aos hidrogênios H28a e H28b, de 3,3 – 3,8 ppm para 3,79 – 4,18 ppm, respectivamente. Observou-se também o deslocamento do duplo duplete correspondente ao H3 de 3,2 ppm para a região de 4,40 a 4,48 ppm, onde apareceu como multiplete, devido à esterificação do grupo -OH em C3. Podem ser visualizados ainda os sinais correspondentes aos átomos de hidrogênio pertencentes aos grupos CH_2 vizinhos à carbonila (α -carbonila) dos radicais acila adicionados, na região de 2,0 a 2,5 ppm.

Tabela 7. Valores dos principais deslocamentos químicos de RMN ^1H dos derivados preparados a partir do triterpeno betulina.

Derivado	δ (ppm) CDCl_3 , 400 MHz			
	H3	H28a, b	$\alpha\text{-CH}_2$	CH_3 terminal
Betulina (55)	3,18	3,33; 3,80	----	----
60	3,20	----	----	----
61	----	----	----	----
62	3,19	3,85; 4,24	----	2,07
63	4,40	3,79; 4,18	----	1,98; 2,01
64	4,48	3,85; 4,27	2,2 – 2,3	1,25
65	4,47	3,87; 4,25	2,0 - 2,4	1,25
66	4,45	3,83; 4,25	2,1 – 2,3	1,25, 1,28
67	4,47	3,85; 4,28	2,0 – 2,5	1,26, 1,26

4.2.3. Atividade antibacteriana dos derivados da betulina

Como citado anteriormente, poucos trabalhos na literatura mostram a atividade antibacteriana de derivados da betulina. A tabela 8 mostra os resultados de atividade antibacteriana obtidos para betulina e os seus derivados.

Segundo Rios e Recio (2005), compostos testados isoladamente são considerados ativos se sua concentração inibitória mínima encontra-se abaixo de $100\text{ }\mu\text{g/mL}$. Observando os resultados acima, constata-se que a betulina não possui atividade significativa contra nenhuma das bactérias testadas. Porém, algumas modificações estruturais realizadas neste composto melhoraram o perfil de ação, em alguns casos. Verificou-se também que nenhum dos derivados obtidos foi ativo contra *S. aureus*, um microorganismo gram-positivo. Segundo este critério, os compostos

considerados ativos foram o ácido betulônico e 3,28-diacetato de betulina, principalmente contra as bactérias gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Tabela 8. Concentração inibitória mínima dos derivados da betulina

Compostos		<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
		µg/mL	µmol/mL	µg/mL	µmol/mL	µg/mL	µmol/mL
55	Betulina	620	1,40	150	0,33	620	1,40
60	Ácido betulínico	1.120	2,45	560	1,22	280	0,61
61	Ácido betulônico	310	0,68	78	0,17	78	0,17
62	28-acetato de betulina	310	0,63	150	0,31	150	0,31
63	3,28-diacetato de betulina	620	1,17	310	0,59	78	0,15
64	3,28-dibutirato de betulina	1.500	2,57	370	0,63	370	0,63
65	3,28-dihexanoato de betulina	1.520	2,37	380	0,59	1.520	2,37
66	3,28-dioctanoato de betulina	1.370	1,97	680	0,97	2.750	3,95
67	3,28-didecanoato de betulina	2.500	3,60	310	0,45	1.250	1,80
--	Gentamicina*	5	0,002	7,5	0,003	8	0,004

*Controle positivo

Quando se compara as estruturas em relação à sua atividade em µmol/mL, o derivado mais ativo foi o 3,28-diacetato de betulina, que apresentou valor de CIM = 0,15 µmol/mL contra *P. aeruginosa*, uma bactéria gram-negativa. Porém, a esterificação apenas do carbono 28 (28-acetato de betulina) não demonstrou a mesma atividade, sendo esta aproximadamente a metade da atividade para o 3,28-diacetato de betulina. A colocação de substituintes maiores que o grupo acetil nas posições 3 e 28 da betulina também diminui a atividade dos compostos em relação à betulina, como pode ser observado nos derivados 64 – 67.

O derivado ácido betulônico, obtido através da oxidação dos dois grupos – OH presentes na estrutura da betulina, também apresentou potência semelhante ao derivado diacetilado, com resultados de CIM de 0,17 µmol/mL para *E. coli* e também para *P. aeruginosa*, sendo que a atividade contra esta última bactéria não foi observada no derivado diacetilado. Ao comparar este resultado ao obtido com o ácido betulínico, observa-se que o grupo carbonila na posição 3, no caso do ácido betulônico, aumenta consideravelmente a atividade em relação a presença do grupo – OH livre na posição 3, como é o caso do ácido betulínico. O aumento da atividade farmacológica devido à oxidação do grupo – OH na posição 3 já foi relatada na literatura para outros modelos, por exemplo, em células de melanoma (MEL-2), tumor endotelial (ECV304), tumor do cólon (HT29), de próstata (PC3) e alguns tumores da boca e, em comparação ao ácido betulínico (SAMI et al., 2006).

As modificações estruturais, apesar de serem realizadas por reações simples, mudaram o perfil de atividade da betulina demonstrando sucesso, pois foi observada a melhora da atividade em relação ao composto de partida, em alguns dos casos. O isolamento de maior quantidade deste triterpeno e o estudo mais aprofundado da influência de substituintes colocados nos grupos hidroxila desta molécula, juntamente com estudos de relação quantitativa entre estrutura química e atividade antibacteriana seria uma perspectiva de pesquisa interessante para a continuação deste trabalho.

4.3. AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ESPÉCIES DE *EUGENIA*

4.3.1. Análise da composição do óleo essencial de *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora*

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, são óleos obtidos de materiais vegetais (flores, folhas, sementes, frutas, raízes, etc.), e são uma mistura de compostos apolares de baixa massa molecular, formada geralmente por terpenos e fenilpropanóides (BURT, 2004).

Apesar das espécies em estudo possuírem trabalhos anteriores descrevendo a composição do óleo essencial de suas folhas, o presente estudo torna-se válido, pois se sabe que a composição dos óleos essenciais sofre variações de acordo com o clima, época e região de coleta (CELIK TAS et al., 2007), além das condições do solo, adubação, entre outras (GOODNER et al., 2006), sendo importante para a discussão do ponto de vista quimiotaxonômico.

Após a extração, o rendimento (v/p) dos óleos essenciais das folhas das três espécies *Eugenia* foram os seguintes: *Eugenia brasiliensis*, 0,07%; *Eugenia beaurepaireana*, 0,20% e *Eugenia umbelliflora*, 0,33%.

A identificação dos compostos foi realizada através do uso de softwares com bibliotecas de dados experimentais (NIST 98), índices de retenção (RI), interpretação visual dos espectros de massa em comparação com a literatura (ADAMS, 2007). Os componentes dos óleos essenciais não foram identificados na sua totalidade, estando representados na tabela apenas aqueles em que a identificação foi concluída. No total, 65 compostos foram identificados, representando 83,053 a 93,385% dos constituintes. A composição quali e quantitativa dos óleos essenciais das três espécies estudadas podem ser visualizados na tabela a seguir (tabela 9). A figura 28 ilustra os cromatogramas dos óleos essenciais das três espécies.

Todos os óleos mostraram algumas semelhanças na composição qualitativa, mas diferiram significativamente do ponto de vista quantitativo, mostrando algumas variações nos seus principais constituintes. O sesquiterpenóides constituíram a fração dominante desses óleos (figura 27). Dois dos óleos apresentaram baixas quantidades de monoterpenos, o de *E. brasiliensis* (14,682%) e *E. beaurepaireana* (6,998%). Porém, o óleo de *E. umbelliflora* apresentou 34,063% de monoterpenos. Pode-se observar através destes dados que a via biossintética dos terpenóides responde por quase a totalidade dos compostos presentes nestes óleos, perfil que já foi observado na maioria das congêneres investigadas. Algumas exceções são reportadas na literatura para as espécies *E. stigmatosa*, cujo óleo é constituído basicamente por um derivado de ácido carboxílico, o ácido (Z)-tetradec-5-enóico e o fenilpropanóide eugenol que é o componente majoritário do óleo de *E. caryophyllata* (OLIVEIRA, DIAS e CÂMARA, 2005).

Para *E. brasiliensis*, os sesquiterpenos na forma funcionalizada foram os mais encontrados (figura 28), e seus componentes majoritários foram os álcoois sesquiterpênicos espatulenol (12,60 %) (figura 29), τ -cadinol (8,68%), α -cadinol (6,64 %) e 1-*epi*-cubenol (6,27 %). Dentre os monoterpenos, os presentes em maior quantidade foram 1,8-cineol (3,22%) (figura 30) e alfa-pineno (2,89%) (figura 31).

Estudos prévios com exemplares de *E. brasiliensis* coletados na região Sul do Brasil mostraram como compostos majoritários os monoterpenos alfa e beta-pineno (figura 32) (10,3 e 10,4%, respectivamente) e β -cariofileno (12,60%). A concentração de espatulenol, composto majoritário identificado para o óleo analisado neste trabalho, foi de 7,7 % (APEL et al., 2004a). Já para exemplares coletados no Sudeste, os compostos majoritários identificados em duas amostras foram o alfa e beta-selineno (FISCHER et al., 2005), no entanto, estes compostos não foram detectados no óleo de *E. brasiliensis* analisado neste trabalho. Um outro estudo comparativo entre variedades diferentes de *E. brasiliensis*, com relação aos frutos (púrpura e amarelo), coletadas no estado de São Paulo mostra que os componentes majoritários das folhas foram os monoterpenos α -pineno (18,8 e 33,5%), β -pineno (11,0 e 14,4 %) e 1,8-cineol (9,6 e 28,7 %) (MORENO et al., 2007), perfil bem diferente observado em relação aos óleos estudados neste trabalho. Todos os relatos da literatura encontrados para os óleos essenciais de *E. brasiliensis* estudados mostraram também alta quantidade de sesquiterpenos, especialmente os hidrocarbonetos, em relação aos monoterpenos. Uma exceção são as folhas da variedade amarela, que apresentou um total de 88,2 % destes últimos compostos, na forma de hidrocarbonetos e também oxigenados, e apenas 3,8 % de sesquiterpenos (MORENO et al., 2007; FISCHER et al., 2005).

Tabela 9. Compostos identificados (%) nos óleos essenciais das três espécies analisadas.

N	Compostos	Fórmula	M.M.^a	Tr/min^b	IR (L)^c	IR (E)^d	<i>E. brasiliensis</i>	<i>E. beaurepaireana</i>	<i>E. umbelliflora</i>
1	α -Tujeno	C ₁₀ H ₁₆	136	6,317	931	936	--	--	0,291
2	α -Pineno	C ₁₀ H ₁₆	136	6,551	939	944	2,895	4,138	11,173
3	Sabineno	C ₁₀ H ₁₆	136	7,795	976	984	--	0,310	--
4	β -Pineno	C ₁₀ H ₁₆	136	7,814	980	984	2,253	--	13,167
5	Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	136	8,068	991	991	0,403	--	0,481
6	α -Felandreno	C ₁₀ H ₁₆	136	8,598	1005	1008	--	0,419	1,465
7	Δ -3-Careno	C ₁₀ H ₁₆	136	8,674	1011	1011	--	--	0,177
8	α -Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	136	8,908	1018	1020	--	--	0,537
9	<i>o</i> -Cimeno	C ₁₀ H ₁₄	134	9,142	1022	1028	--	0,238	0,255
10	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	136	9,282	1031	1033	2,261	1,268	1,368
11	β -Felandreno	C ₁₀ H ₁₆	136	9,343	1031	1035	--	--	0,568
12	1,8-Cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	9,394	1033	1037	3,222	--	--
13	β -(E)-Ocimeno	C ₁₀ H ₁₆	136	9,742	1050	1049	--	--	0,214
14	γ -Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	136	10,140	1062	1062	--	--	0,378
15	Terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	136	10,968	1088	1088	--	0,410	2,920
16	Mircenol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	14,254	1118	1119	--	0,215	--
17	Terpin-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	13,828	1177	1185	0,456	--	0,156
18	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	14,251	1189	1198	2,031	--	0,913
19	Acetato de mirtenila	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	194	17,793	1235	1250	1,161	--	--
20	Δ -Elemeno	C ₁₅ H ₂₄	204	18,040	1339	1336	--	0,340	--
21	α -Cubebeno	C ₁₅ H ₂₄	204	18,444	1351	1351	--	1,380	0,157

Tabela 9 (Continuação). Compostos identificados (%) nos óleos essenciais das três espécies analisadas.

	Compostos	Fórmula	M.M.^a	Tr/min^b	IR (L)^c	IR (E)^d	<i>E. brasiliensis</i>	<i>E. beaurepaireana</i>	<i>E. umbelliflora</i>
22	Isoledeno	C ₁₅ H ₂₄	204	19,225	1373	1380	0,433	0,200	0,243
23	α-Copaeno	C ₁₅ H ₂₄	204	19,239	1376	1381	--	2,286	--
24	β-Bourboneno	C ₁₅ H ₂₄	204	19,461	1384	1389	--	0,214	--
25	β-Elemeno	C ₁₅ H ₂₄	204	19,580	1391	1393	--	3,148	--
26	α-Gurjuneno	C ₁₅ H ₂₄	204	20,070	1409	1411	--	0,333	0,984
27	β-Cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	204	20,417	1418	1426	3,644	7,968	4,345
28	β- Gurjuneno	C ₁₅ H ₂₄	204	20,598	1432	1436	--	--	1,156
29	γ- Elemeno	C ₁₅ H ₂₄	204	20,693	1433	1437	--	0,750	--
30	Aromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	204	20,851	1439	1445	0,738	0,625	6,897
31	α-Guaieno	C ₁₅ H ₂₄	204	20,896	1439	1445	--	1,041	--
32	α- <i>neo</i> -Cloveno	C ₁₅ H ₂₄	204	21,107	1454	1455	0,332	0,585	0,245
33	α-Humuleno	C ₁₅ H ₂₄	204	21,318	1454	1462	0,744	2,317	0,418
34	Aloaromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	204	21,436	1461	1467	0,546	0,871	0,754
35	β-Chamigreno	C ₁₅ H ₂₄	204	21,691	1475	1479	--	0,741	--
36	γ-Muuroleno	C ₁₅ H ₂₄	204	21,744	1477	1477	0,500	--	0,694
37	Germacreno D	C ₁₅ H ₂₄	204	21,858	1480	1483	0,273	1,560	--
38	β-cis-Guaieno	C ₁₅ H ₂₄	204	22,030	1490	1489	0,263	0,583	0,121
39	Valenceno	C ₁₅ H ₂₄	204	22,187	1491	1496	1,119	5,462	1,526
40	Biciclogermacreno	C ₁₅ H ₂₄	204	22,323	1494	1501	2,391	7,241	1,445
41	β-trans-Guaieno	C ₁₅ H ₂₄	204	22,458	1500	1507	0,282	0,380	0,221
42	γ-Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	204	22,723	1513	1518	0,414	1,554	0,294

Tabela 9 (Continuação). Compostos identificados (%) nos óleos essenciais das três espécies analisadas.

	Compostos	Fórmula	M.M.^a	Tr/min^b	IR (L)^c	IR (E)^d	<i>E. brasiliensis</i>	<i>E. beaurepaireana</i>	<i>E. umbelliflora</i>
43	Δ-Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	204	22,850	1524	1524	2,671	4,875	2,637
44	trans-Calameno	C ₁₅ H ₂₂	202	22,928	1532	1527	1,005	--	--
45	Cadina-1,4-dieno	C ₁₅ H ₂₄	204	23,161	1532	1537	0,247	0,744	0,266
46	α-Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	204	23,257	1538	1539	--	1,567	--
47	α-Calacoreno	C ₁₅ H ₂₀	200	23,406	1542	1548	0,367	--	--
48	Selina-3,7-(11)-dieno	C ₁₅ H ₂₄	204	23,436	1542	1549	--	0,335	--
49	Germacreno B	C ₁₅ H ₂₄	204	23,843	1556	1566	--	--	0,130
50	Ledol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	23,910	1565	1569	--	2,127	4,725
51	Espatulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	24,312	1576	1586	12,599	4,868	3,148
52	Óxido de cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	220	24,436	1581	1590	3,120	--	0,898
53	Viridiflorol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	24,540	1590	1595	7,080	4,904	17,738
54	Guaiol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	24,732	1595	1603	5,450	3,719	2,501
55	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	24,988	1614	1615	1,121	1,781	0,183
56	10- <i>epi</i> -γ-Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	25,250	1619	1626	3,099	1,613	1,657
57	1- <i>epi</i> -Cubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	25,450	1627	1636	6,266	1,504	1,689
58	γ-Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	25,578	1630	1640	2,660	--	--
59	τ-Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	25,783	1640	1650	8,678	1,983	--
60	Cubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	25,795	1642	1651	--	3,165	2,498
61	α-Muurolol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	25,870	1645	1654	2,799	--	0,354
62	α-Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	26,083	1653	1663	6,643	--	1,273
63	7- <i>epi</i> -α-Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	26,102	1658	1665	--	3,291	--
64	Khusinol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	26,352	1674	1679	0,291	--	0,125

Tabela 9 (Continuação). Compostos identificados (%) nos óleos essenciais das três espécies analisadas.

65	Khusimol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	27,733	1737	1739	0,181	--	--
Total identificado							90,638	83,053	93,385
Total de monoterpenos							14,682	6,998	34,063
Hidrocarbonetos monoterpênicos							7,812	6,783	32,994
Monoterpenos oxigenados							6,870	0,215	1,069
Total de sesquiterpenos							75,956	76,055	59,322
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos							15,969	47,100	22,533
Sesquiterpenos oxigenados							59,987	28,955	36,789

Os compostos identificados estão listados por ordem de eluição em coluna apolar (CP-SIL 8 CB).

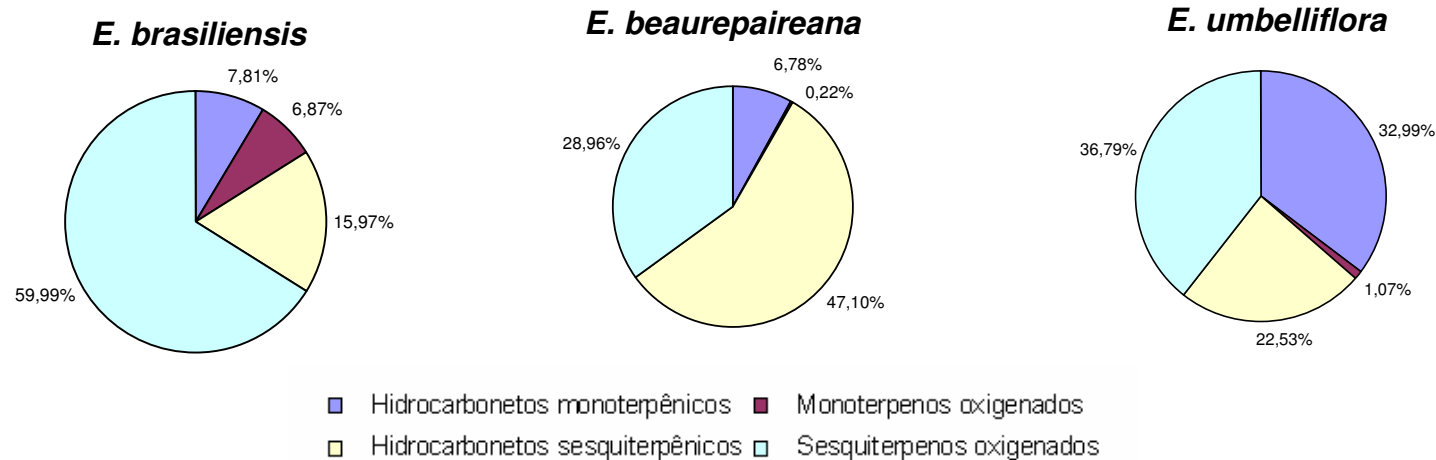
^a M.M. = massa molecular

^b Tr/min = Tempo de retenção (min)

^c IR (L) = Índices de retenção (dados literatura (ADAMS, 2007)).

^d IR (E) = Índices de retenção (dados experimentais)

-- não detectado

**Figura 27.** Porcentagem de monoterpenos e sesquiterpenos encontrados nos óleos essenciais de *Eugenia*.

Para *E. beaurepaireana*, os sesquiterpenos não funcionalizados foram os compostos mais encontrados, sendo que os compostos majoritários encontrados no óleo essencial desta espécie foram os sesquiterpenos β -cariofileno (7,97%) (figura 33), biciclogermacreno (7,24 %), valenceno (5,46 %), Δ -cadineno (4,87 %), viridiflorol (4,90 %) e espatulenol (4,87 %), sendo estes dois últimos álcoois sesquiterpênicos. Dentre os monoterpenos mais presentes nesta espécie destacam-se os hidrocarbonetos alfa-pineno (figura 31) (4,14 %) e limoneno (1,27 %), ambos hidrocarbonetos. Estudos anteriores com espécimes de *E. beaurepaireana* coletados na região Sudeste mostraram a prevalência de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, e como compostos majoritários o biciclogermacreno (14,3%) e os álcoois de esqueleto cadinano, como o τ -cadinol (6,5 %) e α -cadinol (6,1%), além de Δ -cadineno (7,2 %) e cariofileno (6,4%) (APEL et al., 2004b). Compostos com o esqueleto cadinano foram encontrados no óleo de *E. beaurepaireana* estudado, na sua maioria na forma de hidrocarbonetos. Foi verificada similaridade em relação à presença de cariofileno e biciclogermacreno como compostos de maior relevância nestes óleos.

Para o óleo essencial de *E. umbelliflora*, a principal diferença diz respeito ao teor de monoterpenos encontrados, sensivelmente maior que o verificado em relação às outras duas espécies. Apesar deste fato, o teor de sesquiterpenos ainda é maior em relação à quantidade de monoterpenos encontrada. Os compostos majoritários encontrados foram os sesquiterpenos viridiflorol (17,74 %) (figura 34), aromadendreno (6,90%) e ledol (4,72 %), e os monoterpenos α -pineno (11,17 %) e β -pineno (13,17%), mostrando um perfil diferente do que foi observado nos óleos descritos anteriormente. Exemplares de *E. umbelliflora* da região Sul anteriormente estudados mostraram a presença de alfa e beta-pineno como compostos majoritários nas concentrações de 24,7 % e 23,5 % (APEL et al., 2002), diferindo do óleo aqui estudado, que mostrou o viridiflorol como composto de maior quantidade. As quantidades de alfa e beta-pineno encontradas no óleo estudado no presente trabalho também foram significativamente menores.

De todos os compostos majoritários citados acima, dois deles, o α -pineno e o viridiflorol, aparecem em grandes quantidades em todos os óleos testados. Outros dezoito sesquiterpenos (β -cariofileno, aromadendreno, valenceno, biciclogermacreno, Δ -cadineno, espatulenol e 1-*epi*-cubenol, isoleveno, α -neo-cloveno, α -humuleno, aloaromadendreno, β -cis-guaieno, β -trans-guaieno, γ -cadineno, cadina-1,4-dieno, guaiol, 1,10-diepi-cubenol e 10-*epi*- γ -eudesmol), além de um monoterpeno (limoneno) foram comuns a todos os óleos das espécies de *Eugenia* estudadas neste trabalho.

Pode-se observar uma importante diferença entre os resultados obtidos nesta investigação em comparação àqueles encontrados na literatura. De fato, a observação das diferenças na mistura de compostos nos óleos essenciais de espécies de *Eugenia* pode fornecer características úteis para a compreensão das relações filogenéticas neste grande gênero. Algumas espécies são notoriamente difíceis de classificar e identificar, e ainda, existem diferentes variedades e quimiotipos diferentes para uma mesma espécie, que podem possuir vias metabólicas e acumulação de compostos em seus óleos essenciais de uma maneira bem distinta (MORENO et al., 2007).

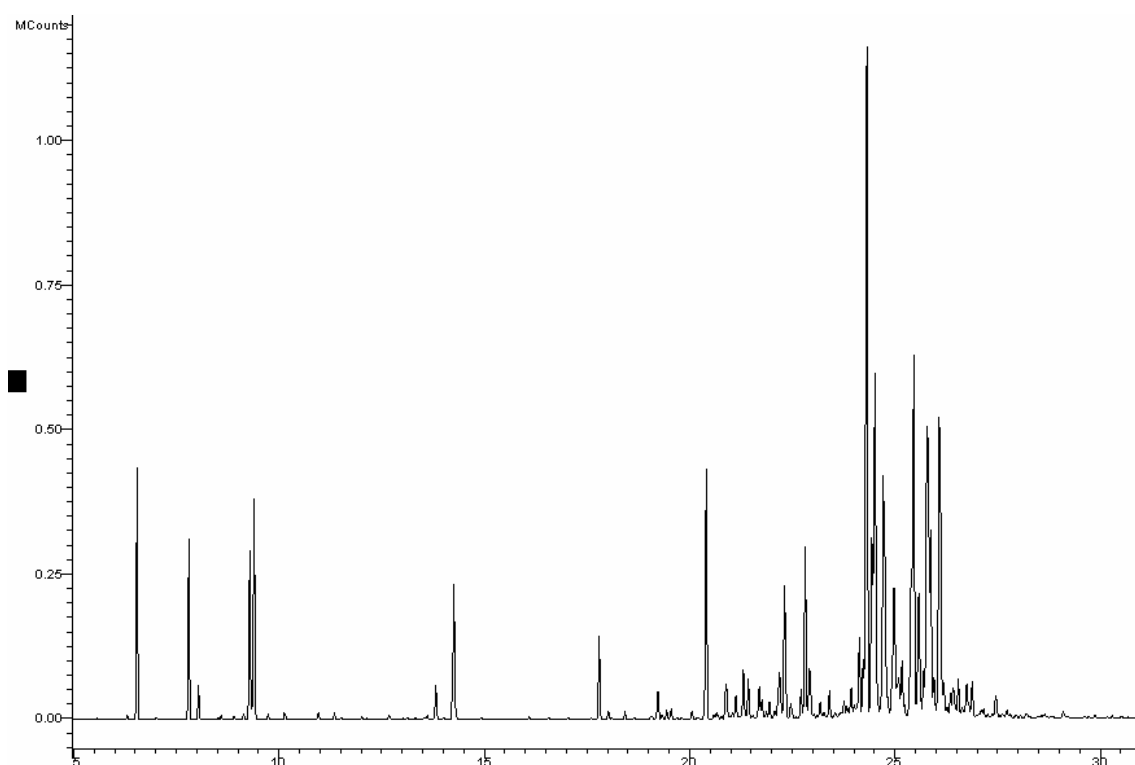


Figura 28. Cromatograma do óleo essencial de *E. brasiliensis* (1). Coluna CP Sil 8 CB (30 m x 0,25 mm, filme de 0,25 μ m). Gás de arraste: hélio (1 mL/min.) Programa de temperatura: 60° C/ 3 min/ 5° C/ min até 220° C (15 min.).

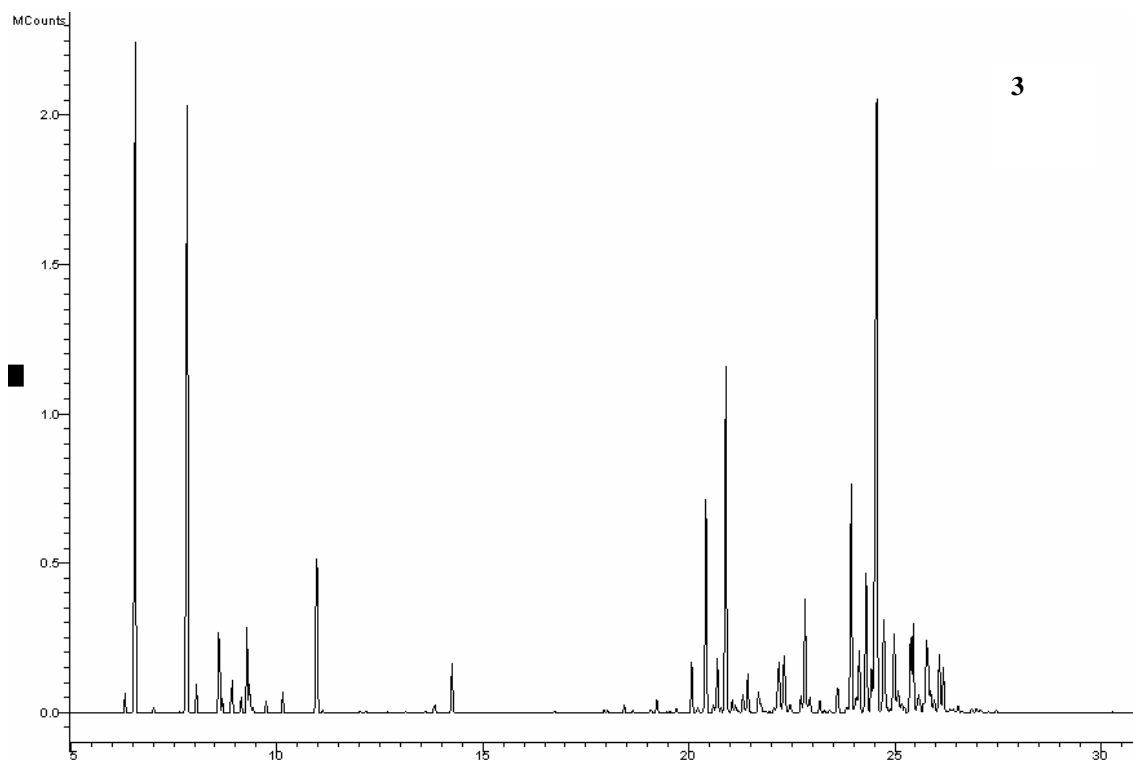
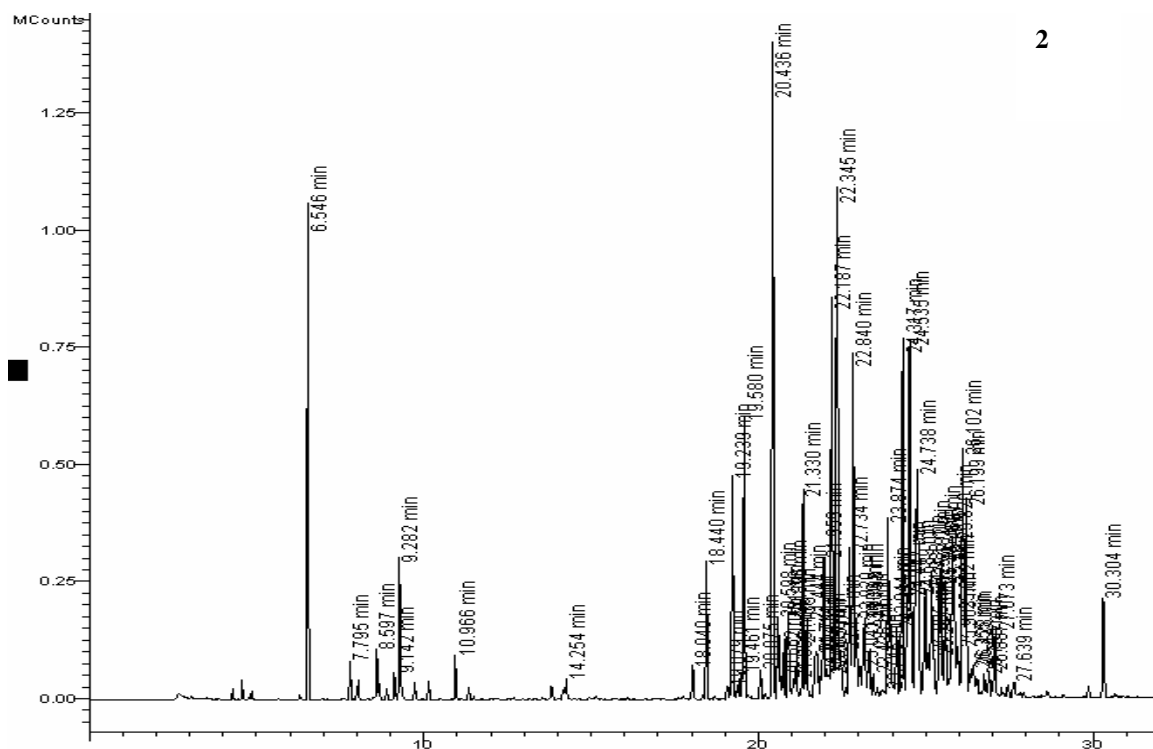


Figura 28 (Continuação). Cromatograma do óleo essencial de *E. beaurepaireana* (2) e *E. umbelliflora* (3). Coluna CP Sil 8 CB (30 m x 0,25 mm, filme de 0,25 μ m). Gás de arraste: hélio (1 mL/min.) Programa de temperatura: 60° C/ 3 min/ 5° C/ min até 220° C (15 min.).

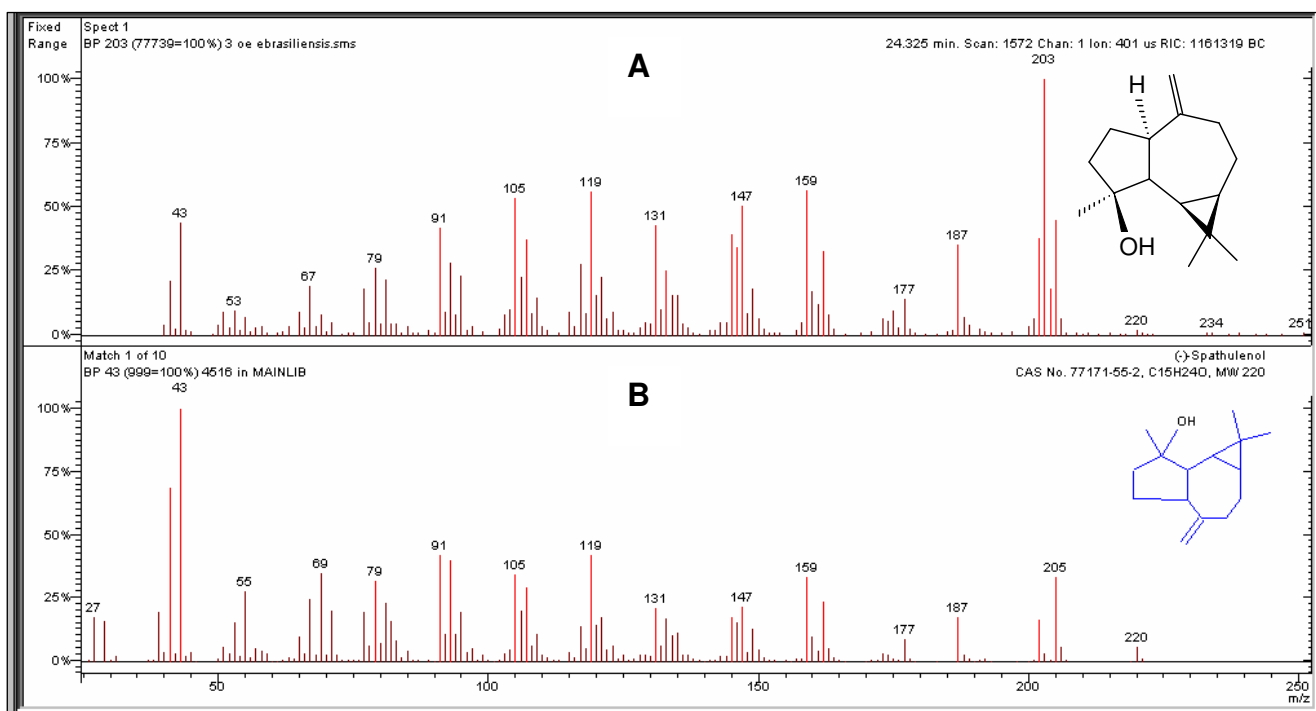


Figura 29. Espectro de massas do espatulenol (A), em comparação ao espectro da biblioteca NIST 98 (B).

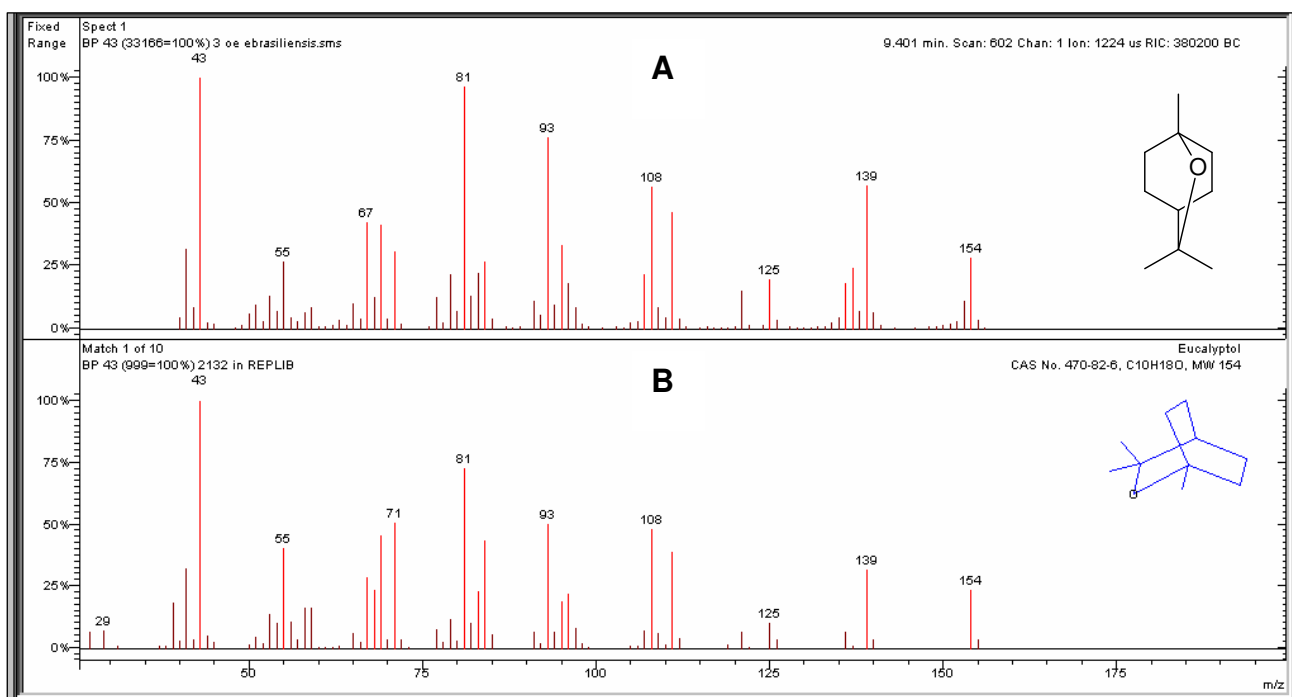


Figura 30. Espectro de massas do 1,8-cineol (A), em comparação ao espectro da biblioteca NIST 98 (B).

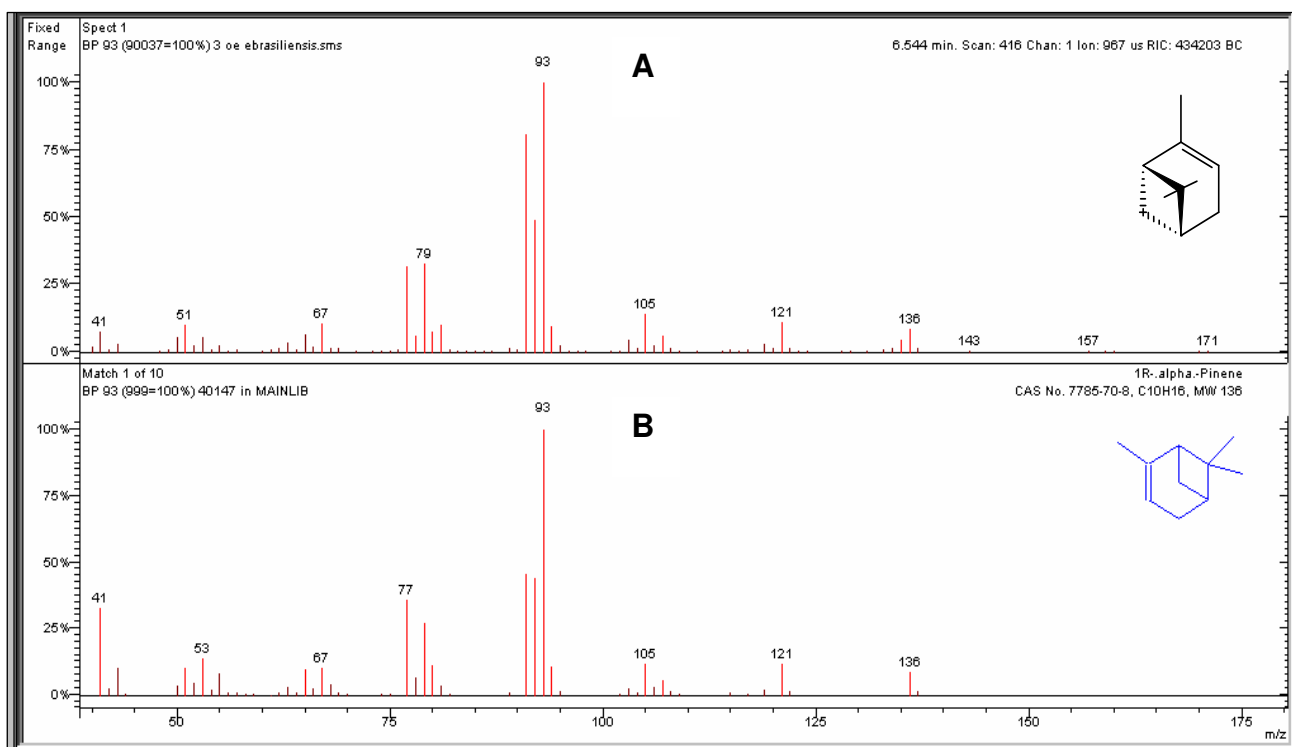


Figura 31. Espectro de massas do alfa-pineno (A), em comparação ao espectro da biblioteca NIST 98 (B).

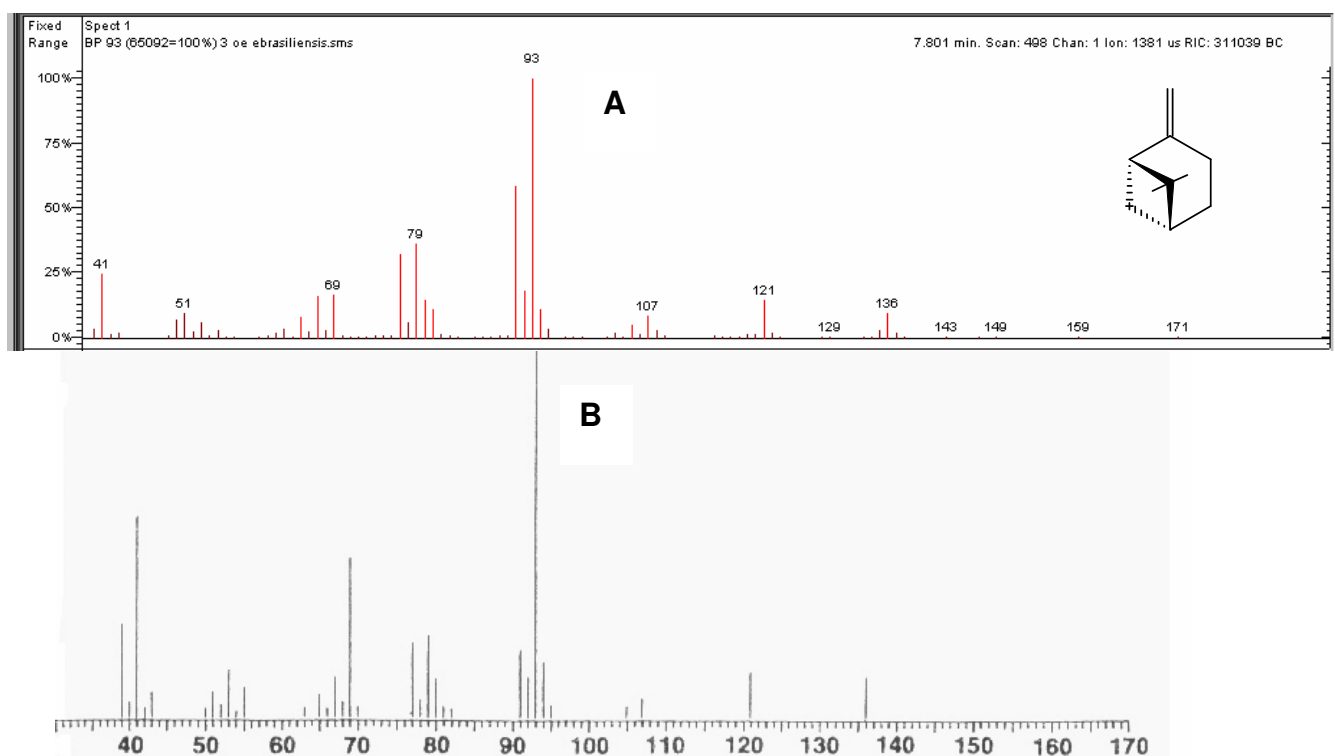


Figura 32. Espectro de massas do beta-pineno (A), em comparação á literatura (B) (ADAMS, 2007).

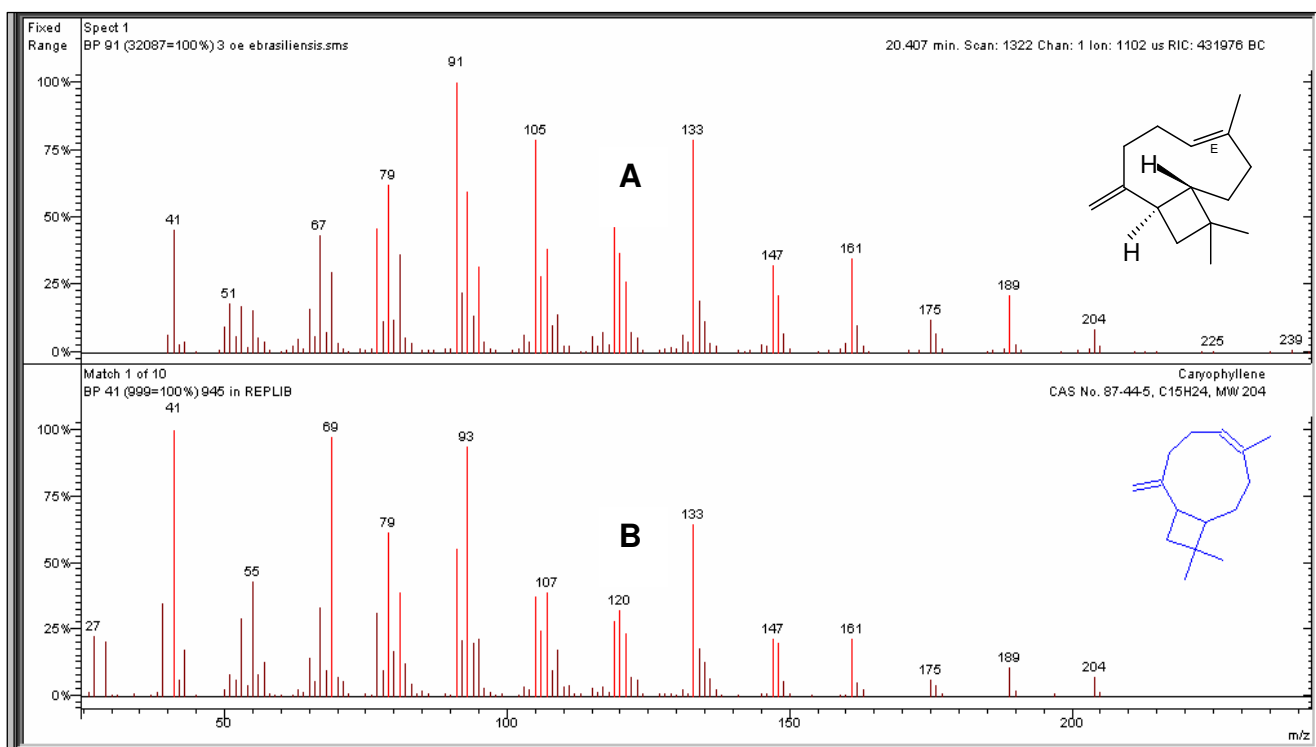


Figura 33. Espectro de massas do β -cariofileno (A), em comparação ao espectro da biblioteca NIST 98 (B).

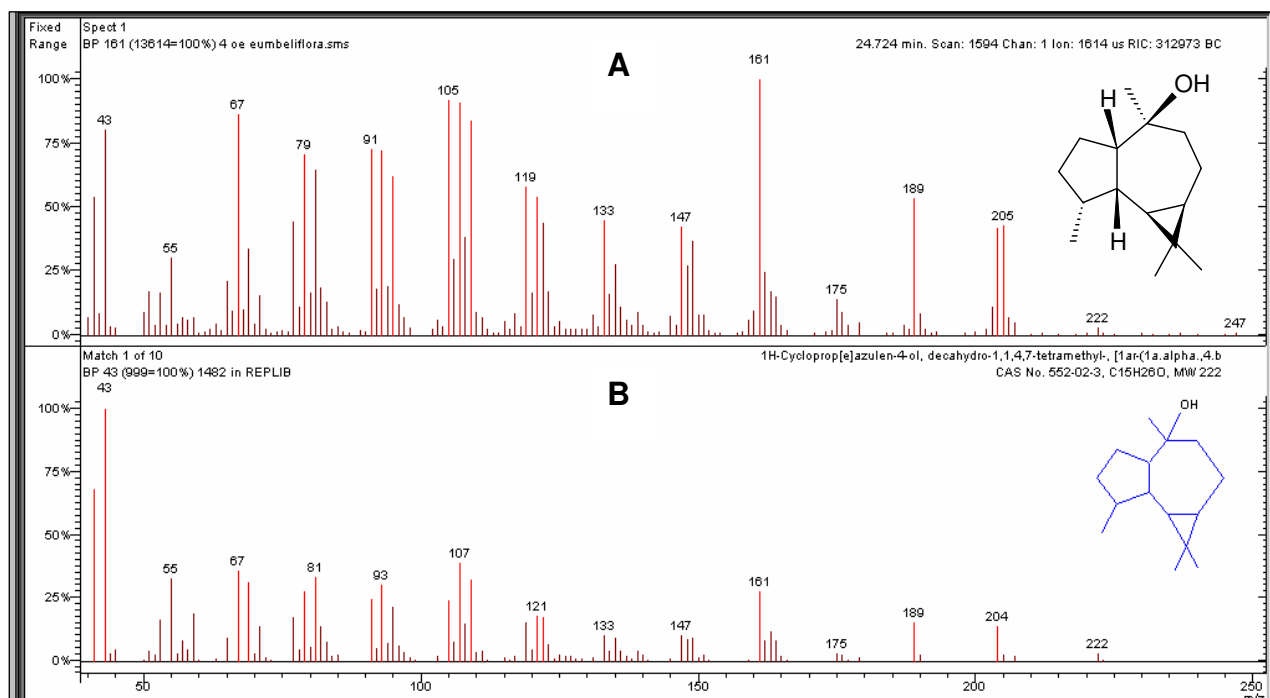


Figura 34. Espectro de massas do viridiflorol (A), em comparação ao espectro da biblioteca NIST 98 (B).

4.3.2. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das espécies de *Eugenia*

Os óleos voláteis, uma mistura de compostos apolares, há muito conhecidos devido às suas propriedades biológicas. Os óleos essenciais apresentam diversas propriedades interessantes, como antimicrobiana (MOUREY e CANILLAC, 2002), antiviral (BISHOP, 1995), antimicótica (MARI, BERTOLINI e PRATELLA, 2003), antiparasitária (PESSOA et al., 2002), e inseticida (KARPOUHTSIS et al., 1998).

Os óleos essenciais são potenciais fontes de novas estruturas com ação antimicrobiana, especialmente contra bactérias patogênicas (AL-BAYATI, 2008). Já foi demonstrado anteriormente que monoterpenos, oxigenados ou não, são capazes de destruir a integridade celular, inibir a capacidade respiratória e atrapalhar o transporte iônico através das membranas celulares de bactérias (DEBA et al., 2008). Alguns compostos, como o sesquiterpeno β -cariofileno, bastante comum nos óleos essenciais de espécies do gênero *Eugenia*, são conhecidos por exercerem funções de defesa contra microorganismos invasores nas plantas (AL-BAYATI, 2008).

Os três óleos essenciais de *Eugenia* extraídos foram testados contra *Staphylococcus aureus*, uma bactéria gram-positiva, e contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias gram-negativas. A tabela 10 mostra os resultados de atividade antibacteriana obtidos para os óleos essenciais das três espécies testadas.

Tabela 10. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{L/mL}$) e concentração bactericida mínima (CBM) ($\mu\text{L/mL}$) dos óleos essenciais de espécies de *Eugenia*.

Amostra	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Eugenia brasiliensis</i>	0,15	0,62	0,62	0,62	0,62	1,25
<i>Eugenia beaurepaireana</i>	1,25	2,50	0,62	1,25	0,31	1,25
<i>Eugenia umbelliflora</i>	0,15	0,62	0,62	0,62	0,62	1,25
Gentamicina ^a	0,005	--	0,0075	--	0,001	--

a = controle positivo, em $\mu\text{g/mL}$.

Para a classificação da atividade antibacteriana, foi utilizado o critério proposto por Souza et al. (2007), aplicável a óleos essenciais. Extratos e frações que apresentaram valores de CIM menores que $0,5 \mu\text{L/mL}$ foram considerados inibidores fortes; valores entre $0,6$ e $1,5 \mu\text{L/mL}$ foram considerados moderados, e para valores

de CIM foram acima de 1,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$, os extratos e frações foram considerados inibidores fracos. Utilizando este critério, observa-se uma atividade bastante promissoras para os óleos testados, já que todas as amostras apresentaram valores inferiores a 1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para todas as bactérias testadas. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais geralmente é atribuída aos seus compostos majoritários, porém, deve-se levar em consideração a ação sinérgica ou efeito antagonista dos seus componentes majoritários (BURT, 2004).

Os óleos essenciais de *E. brasiliensis* e *E. umbelliflora* mostraram potente atividade contra *S. aureus*, apresentando valores de CIM = 0,15 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Este resultado é especialmente importante considerando que *S. aureus* é uma das principais bactérias causadoras de infecções no homem, podendo atingir diversos tecidos e órgãos, com manifestações das mais brandas às mais invasivas e severas (SCHWARZ-LINEK, HÖÖK e POTTS, 2006).

O óleo essencial de *E. beaurepaireana* mostrou forte inibição contra *P. aeruginosa*, uma bactéria gram-negativa, com valor de CIM = 0,31 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Este resultado é interessante devido ao fato de que a grande maioria dos extratos e compostos extraídos de plantas é ativa contra bactérias gram-positivas, e não gram-negativas. Esta resistência pode ser explicada pela presença de uma série de substâncias hidrofílicas presentes na membrana celular externa das bactérias gram-negativas que funciona como barreira contra substâncias antibióticas de característica apolar (PALOMBO e SEMPLE, 2001), bem como a presença de enzimas capazes de destruir substâncias estranhas à bactéria (DUFFY e POWER, 2001).

O uso de espécies de *Eugenia* para o tratamento de doenças infecciosas é bem conhecido na medicina popular (HUSSEIN et al., 2003). Estudos anteriores mostram que óleos essenciais extraídos de espécies deste gênero mostram atividade contra bactérias como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* (OUSSALAH et al., 2007).

O estudo realizado mostra que, apesar das semelhanças qualitativas, os óleos essenciais de *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora* estudados neste trabalho mostram diferenças quantitativas importantes na composição percentual e também no número de compostos encontrados, contribuindo para a discussão quimiotaxonômica e geográfica de espécies do gênero *Eugenia*. A potencial atividade antibacteriana sugere a continuação do estudo, por bioautografia, por exemplo, para a detecção dos componentes mais ativos presentes nos óleos, bem como para a elucidação do seu mecanismo de ação.

4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DAS ESPÉCIES DE *EUGENIA*

4.4.1. Avaliação da letalidade utilizando larvas de *Artemia salina*

O ensaio de letalidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* é amplamente usado como técnica de triagem para verificar a atividade biológica de toxinas naturais (MOHAMED, EL-SHAROUNY, e ALI, 2006; BAIG, SAIFULLAH e DAR, 2006) e de extratos vegetais e seus compostos isolados (LUNA et al., 2005). As amostras são colocadas em incubação durante 24 horas com a larva do microcrustáceo, e após este período, conta-se o número de sobreviventes. Uma das vantagens deste ensaio é que, devido à grande sensibilidade deste crustáceo, várias atividades biológicas podem estar relacionadas ao ensaio, pois os compostos ativos podem ser potencialmente tóxicos, em relação à dose (MEYER et al., 1982).

Existe boa correlação deste bioensaio com a atividade citotóxica *in vitro*, atividade larvicida e inseticida (McLAUGHLIN, 1991). Outra vantagem deste ensaio é o fato dos cistos de *A. salina* manterem-se viáveis por vários anos, sem a necessidade de culturas (MEYER et al., 1982).

São considerados ativos através deste teste os extratos ou frações que apresentam valores da DL₅₀ de até 1000 µg/mL. A tabela 11 apresenta os resultados do ensaio de letalidade utilizando larvas de *A. salina* para os extratos e frações das espécies de *Eugenia*.

Verificando os resultados apresentados na tabela, nota-se que entre as três espécies testadas, a que apresentou maior toxicidade sobre as larvas de *A. salina* foi *E. umbelliflora*. Das frações testadas, a mais ativa foi a fração diclorometano das folhas desta espécie, que apresentou DL₅₀ = 186,21 µg/mL, seguida da fração hexano, também das folhas, cuja DL₅₀ = 295,12 µg/mL. Surpreendentemente, esta espécie também apresentou várias frações inativas neste teste (DL₅₀ >1000 µg/mL). Considerando que tanto o extrato bruto das folhas quanto do caule desta espécie mostrou atividade no ensaio, pode-se observar que os compostos ativos encontram-se distribuídos em frações de polaridade bastante específica.

Para *E. beaurepaireana*, as frações mais ativas foram hexano e diclorometano das folhas, que apresentaram valores iguais no ensaio (DL₅₀ = 537,00 µg/mL). Para *E. brasiliensis*, as frações mais ativas foram a fração aquosa e acetato de etila do caule (DL₅₀ = 645,65 e 676,10 µg/mL, respectivamente). Através dos resultados obtidos

pode-se observar que a atividade dividiu-se homoganeamente entre as frações de polaridade diferente nestas duas espécies.

Considerando-se que este ensaio é uma triagem preliminar que pode apresentar correlação com várias atividades biológicas, como atividade citotóxica *in vitro*, atividade larvicida e inseticida (McLAUGHLIN, 1991), e também o grande número de extratos e frações ativos obtidos, seria interessante a continuação do estudo das potenciais atividades destas espécies vegetais, como por exemplo, atividade citotóxica e antitumoral.

Tabela 11. Toxicidade de extratos e frações de *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora* sobre larvas de *A. salina*.

Extrato/fração	<i>E. brasiliensis</i>		<i>E. beaurepaireana</i>		<i>E. umbelliflora</i>	
	FOLHAS		FOLHAS		FOLHAS	
	*DL ₅₀	IC 95%	DL ₅₀	IC 95%	DL ₅₀	IC 95%
Extrato bruto	807,23	656,1 - 993,1	676,08	523,6 – 872,9	446,68	444,59 – 448,77
Fração hexano	801,70	864,9 - 743,0	537,00	426,7 - 675,9	295,12	292,94 – 297,30
Fração DCM**	816,63	740,9 - 899,9	537,00	708,8 - 406,9	186,21	184,03 – 188,39
Fração AcOEt**	788,92	605,3 - 1028,1	933,25	662,6 - 1314,3	316,23	314,13 – 318,32
Fração BuOH**	691,85	754,4 - 634,4	776,25	625,1 - 963,8	> 1000	----
Fração aquosa	794,33	858,9 - 734,7	> 1000	----	> 1000	----
	CAULE		CAULE		CAULE	
	DL ₅₀	IC 95%	DL ₅₀	IC 95%	DL ₅₀	IC 95%
Extrato bruto	972,75	822,8 - 1150,0	831,76	686,7 - 1007,3	562,34	560,30 – 564,38
Fração hexano	891,25	632,3 - 1256,3	955,00	807,2 - 1129,8	> 1000	----
Fração DCM**	977,20	727,3 - 1313,1	575,40	494,6 - 669,4	> 1000	----
Fração AcOEt**	676,10	561,6 - 813,9	645,65	461,3 - 742,6	645,65	643,62 – 647,67
Fração BuOH**	691,83	595,6 - 803,5	676,08	586,6 - 779,1	> 1000	----
Fração aquosa	645,65	537,6 – 775,3	954,99	794,3 – 1 147,8	891,25	889,23 – 893,26

*DL₅₀ = Dose letal 50 % - É a concentração de extrato ou necessária, em µg/mL, para matar 50 % do número de larvas presentes. IC 95 % = Índice de confiança para α= 0,05.

**DCM = diclorometano; AcOEt = acetato de etila; BuOH = n-butanol

4.4.2. Avaliação da atividade antioxidante

Os efeitos que espécies oxidantes produzem sobre o organismo tornaram-se alvo de interesse e intensa investigação científica, uma vez que a causa de uma série de patologias, incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento têm sido relacionada ao estresse oxidativo (CHISOLM e STEINBERG, 2000).

Estes efeitos são resultantes da oxidação de componentes celulares, como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos, principalmente ácidos graxos poliinsaturados, mediados principalmente por espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), produzidas como parte do processo metabólico (de 2 a 5 % do oxigênio respirado, por exemplo), e conhecidas genericamente como radicais livres (URSO e CLARKSON, 2003). A reação destas espécies com ácidos graxos e lipoproteínas presentes em membranas celulares inicia um processo em cadeia, conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que é um dos principais fatores causadores do estresse oxidativo e conseqüente morte celular (LIMA e ABDALLA, 2001).

Os antioxidantes são substâncias que, numa concentração menor que a do substrato oxidável, retardam o processo oxidativo, diminuindo sua velocidade da reação (HALLIWELL et al., 1995). Tendo em vista uma rápida avaliação da capacidade e eficácia antioxidante de compostos químicos ou extratos vegetais, muitos ensaios estão descritos na literatura, como a oxidação forçada de um substrato lipídico, a co-oxidação de substratos, como por exemplo, o β -caroteno, a atividade seqüestrante de radicais livres, utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), avaliação do potencial redutor, entre outros (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999).

Várias espécies de *Eugenia* foram estudadas com vistas à identificação do seu potencial antioxidante. O extrato metanólico de *E. caryophyllata* mostrou inibição na geração de radicais livres derivados do óxido nítrico, atividade esta correlacionada com o potencial inflamatório (HONG, 2003). Os extratos etanólico e aquoso desta espécie também demonstraram atividade antioxidante *in vitro*, através da captação de radicais livres e ação quelante de metais (GÜLÇIN et al., 2004). O extrato etanólico das sementes de *E. jambolana* apresentou atividade antioxidante em fígado de ratos diabéticos, o que pode contribuir para diminuir a morbidade em casos de *diabetes mellitus* (RAVI, RAMACHANDRAN e SUBRAMANIAN, 2004a). Os extratos metanólico e hidroalcoólico das folhas de *E. uniflora*, bem como os flavonóides isolados quercitrina, quercetina, miricetina e miricitrina mostraram atividade antioxidante através de ensaios para a avaliação da atividade seqüestrante de radicais livres tais

como o DPPH e ânion superóxido, além da inibição da enzima xantina oxidase, uma enzima antioxidante relacionada à artrite (VELÁZQUEZ et al., 2003; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987).

O conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides foram determinados para as espécies, a fim de se correlacionar estes dados com a atividade antioxidante dos extratos e frações vegetais. A atividade antioxidante foi avaliada a partir de três métodos diferentes: o ensaio com o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), a medida do potencial redutor e a capacidade de inibir a peroxidação de um substrato lipídico.

4.4.2.1. Avaliação do conteúdo de compostos fenólicos totais

Como a atividade antioxidante está geralmente relacionada à quantidade de compostos fenólicos nas plantas, avaliou-se o teor destes compostos nos extratos e frações estudados. Numerosos estudos demonstram que os fenóis possuem alta capacidade antioxidante, especialmente os ortodifenóis, ou catecóis (TUCK e HAYBALL, 2002). Estudos mostraram que classes destes compostos em vegetais, como, por exemplo, os taninos, exibem ainda potencial redutor sobre íons metálicos, como Cr^{6+} , Fe^{3+} e Cu^{2+} , reduzindo-os para Cr^{3+} , Fe^{2+} and Cu^{+1} , respectivamente. A inibição da peroxidação lipídica também foi colocada como uma das mais importantes atividades exibidas por estes compostos (OKUDA et al., 1982).

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi baseada no método de Folin-Ciocalteu (ANAGNOSTOPOULOU et al., 2006). O reagente de Folin-Ciocalteu consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotúngstico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ . Porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, que são oxidados a íon fenolato, em condições básicas, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais é de entre 5^+ e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (SOUSA et al., 2007; WATERMAN e MOLE, 1994). Para o cálculo do teor de compostos fenólicos nos extratos foi construída uma curva de calibração com o padrão ácido gálico, onde obteve-se a equação de reta $y = 5,51x + 1,77$, com o valor de $r^2 = 0,997$.

A tabela 12 apresenta os resultados obtidos na determinação do teor de compostos fenólicos nos extratos e frações das espécies de *Eugenia* estudadas.

Quando maior a quantidade de ácido gálico encontrada em equivalente por g de extrato ou fração, maior a porcentagem de compostos fenólicos presentes.

Tabela 12. Teor de compostos fenólicos totais* presentes nos extratos e frações das espécies estudadas.

Extrato/fração	<i>E. brasiliensis</i>	<i>E. beaurepaireana</i>	<i>E. umbelliflora</i>
	FOLHAS	FOLHAS	FOLHAS
Extrato bruto	162,65 ± 9,26	137,98 ± 8,70	128,15 ± 2,91
Fração hexano	48,49 ± 2,91	40,94 ± 2,47	77,66 ± 4,04
Fração DCM**	85,88 ± 1,82	129,00 ± 5,03	62,94 ± 0,15
Fração AcOEt**	494,51 ± 1,18	321,00 ± 5,61	115,69 ± 3,56
Fração BuOH**	461,65 ± 2,09	166,20 ± 9,64	363,58 ± 0,32
Fração Aquosa	205,78 ± 0,55	287,96 ± 12,8	181,05 ± 14,56
	CAULE	CAULE	CAULE
Extrato bruto	174,36 ± 1,63	225,41 ± 8,14	105,82 ± 2,59
Fração hexano	51,31 ± 1,36	32,16 ± 2,64	41,82 ± 0,73
Fração DCM**	116,28 ± 1,18	136,33 ± 2,64	57,76 ± 3,88
Fração AcOEt**	328,08 ± 2,09	306,47 ± 2,48	77,98 ± 0,48
Fração BuOH**	285,96 ± 1,90	226,53 ± 7,51	262,28 ± 1,29
Fração Aquosa	249,39 ± 3,82	111,93 ± 3,32	80,49 ± 0,57

* O teor de compostos fenólicos totais é expresso em mg de ácido gálico/ g de extrato ou fração seca da planta (mg AG/g).

**DCM = diclorometano; AcOEt = acetato de etila; BuOH = n-butanol

É importante esclarecer que, apesar do resultado ser expresso em equivalentes de ácido gálico, um composto fenólico simples, a metodologia não apresenta seletividade para subtipos de compostos fenólicos vegetais, e podem ser detectados no teste, além de flavonóides, catequinas, compostos fenólicos simples e seus polímeros, como os taninos hidrolisáveis, dentre outras substâncias.

Segundo a tabela, pode-se verificar que o extrato bruto do caule de *Eugenia brasiliensis* apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos quando comparado ao mesmo extrato das folhas, porém, de uma maneira geral, as frações obtidas das folhas de *Eugenia brasiliensis* apresentam a maior quantidade de compostos fenólicos, especialmente a fração acetato de etila, que apresentou o equivalente a concentração de 494,51 ± 1,18 mg de ácido gálico por grama de fração seca (mg AG/g).

Para *E. beaurepaireana*, novamente o extrato bruto do caule apresentou maior quantidade de compostos fenólicos em relação ao extrato bruto das folhas. Das frações das folhas de *Eugenia beaurepaireana*, a que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos foi a fração acetato de etila, com 321,00 ± 5,61 mgAG/g. No

caule, a fração que apresentou maior teor de fenólicos foi também à fração acetato de etila, com $306,47 \pm 2,48$ mgAG/g.

Já para a *E. umbelliflora*, o extrato bruto das folhas apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos em relação ao extrato bruto do caule. As frações mais concentradas em compostos fenólicos na espécie *Eugenia umbelliflora* foram as frações butanólicas das folhas ($363,58 \pm 0,32$ mgAG/g) e do caule ($262,28 \pm 1,29$ mgAG/g), o que pode indicar o aumento da polaridade dos compostos fenólicos desta espécie em relação às duas anteriores.

Observam-se, em todos os extratos estudados, que as frações mais concentradas em compostos fenólicos são as frações acetato de etila e butanólica, o que é esperado quando se realiza o fracionamento líquido-líquido utilizando solventes de polaridade crescente. Esses compostos são mais polares, e geralmente são separados com o uso de solventes também de polaridade mais elevada.

4.4.2.2. Avaliação do conteúdo de flavonóides

Os flavonóides são uma classe de metabólitos vegetais secundários, de natureza fenólica, que possuem notável capacidade antioxidante. Dietas que incluem quantidades razoáveis de alimentos ricos em flavonóides estão associadas à redução de problemas cardiovasculares, como diminuição de infarto do miocárdio, das doenças coronarianas e acidente vascular cerebral, efeitos relacionados à inibição da oxidação do colesterol de baixa densidade (LDL) (YOCHUM et al., 1999).

Os efeitos protetores dos flavonóides em sistemas biológicos provêm de sua capacidade de transferir elétrons aos radicais livres, estabilizando-os, além de possuírem ação quelante de íons metálicos, ativarem enzimas antioxidantes, reduzirem a quantidade de radicais livres derivados do tocoferol e inibirem as oxidases (HEIM, TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002).

Foi realizada a determinação do teor de flavonóides nos extratos e frações através do método utilizando a complexação com o reagente cloreto de alumínio (AlCl_3) (WOISKY E SALATINO, 1998). Para melhor determinar o teor de flavonóides através de espectroscopia no UV/VIS, sem que ocorra a interferência de compostos lipofílicos, como clorofila e outras substâncias, foi utilizado um reagente complexante como o AlCl_3 . Este agente forma um quelato com as hidroxilas orto fenólicas e com o grupo carbonila nos flavonóides (figura 35), proporcionando um deslocamento batocrômico das bandas de absorvância do espectro de UV/VIS para uma região característica (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003). Para o cálculo do teor de flavonóides

nas espécies estudadas, foi construída uma curva de calibração utilizando o flavonóide quercetina, de onde obteve-se a equação da reta $y = 8,776x + 0,869$, $r^2 = 0,999$.

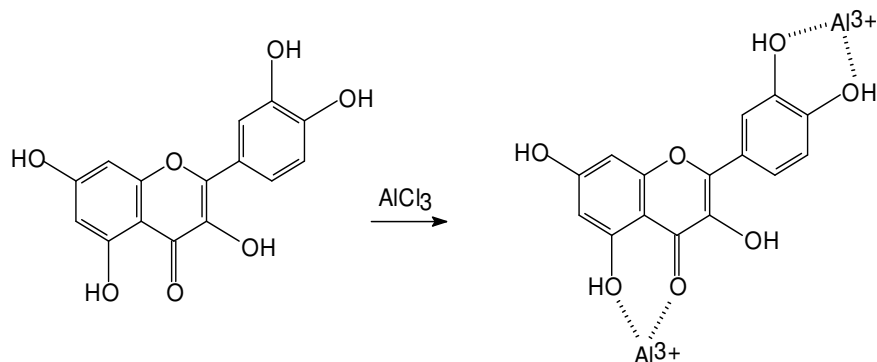


Figura 35. Complexo formado entre a estrutura do flavonóide quercetina e o reagente $AlCl_3$.

A tabela 13 mostra os resultados para este teste. Quanto maior o teor de quercetina encontrado nos extratos e frações testados, maior a porcentagem de flavonóides encontrados por grama de extrato bruto ou fração.

Tabela 13. Teor de flavonóides* presentes nos extratos e frações das espécies estudadas.

Extrato/fração	<i>E. brasiliensis</i>	<i>E. beaurepaireana</i>	<i>E. umbelliflora</i>
	FOLHAS	FOLHAS	FOLHAS
Extrato bruto	14,44 ± 1,08	31,17 ± 1,67	10,45 ± 1,49
Fração hexano	35,19 ± 2,05	21,10 ± 0,39	0,15 ± 0,01
Fração DCM**	24,71 ± 0,13	63,46 ± 0,64	0,10 ± 0,01
Fração AcOEt**	54,12 ± 0,01	114,56 ± 0,85	32,81 ± 2,00
Fração BuOH**	12,44 ± 0,20	18,84 ± 0,05	61,19 ± 0,74
Fração Aquosa	2,89 ± 0,10	23,97 ± 0,06	24,59 ± 0,23
	CAULE	CAULE	CAULE
Extrato bruto	5,81 ± 0,13	10,47 ± 0,39	1,29 ± 0,21
Fração hexano	25,39 ± 1,98	68,41 ± 0,28	0,88 ± 0,03
Fração DCM**	9,09 ± 0,06	25,68 ± 0,40	0,17 ± 0,01
Fração AcOEt**	33,94 ± 0,80	27,61 ± 0,85	1,92 ± 0,51
Fração BuOH**	18,94 ± 0,33	18,33 ± 1,14	8,55 ± 0,58
Fração Aquosa	16,62 ± 0,57	14,97 ± 0,51	9,73 ± 0,51

* O teor de flavonóides totais é expresso em mg de quercetina/ g de extrato ou fração seca da planta (mgQUE/g).

** DCM = diclorometano; AcOEt = acetato de etila; BuOH = n-butanol

Analisando a tabela, pode-se observar que a espécie *Eugenia beaurepaireana* é possui um maior teor de flavonóides, com um equivalente de $114,56 \pm 0,85$ mg de

quercetina por grama de fração seca (mgQUE/g) na fração acetato de etila das folhas. As espécies *E. brasiliensis* e *E. umbelliflora* apresentaram teores menores de flavonóides, os quais estão concentrados na fração acetato de etila das folhas ($54,12 \pm 0,01$ mgQUE/g) para *E. brasiliensis* e na fração butanólica das folhas ($61,19 \pm 0,74$ mgQUE/g) para *E. umbelliflora*. Pode-se observar ainda que os teores de flavonóides são maiores nas folhas, em relação às frações obtidas com o extrato dos caules. Este fato é esperado, pois uma das principais funções deste grupo de compostos é proteger os vegetais contra os raios ultravioleta. Como as folhas constituem as partes aéreas dos vegetais são, portanto, alvo mais fácil deste tipo de radiação, quando comparadas ao caule (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

4.4.2.3. Avaliação da ação seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

Um radical livre é qualquer espécie capaz de existir contendo um ou mais elétrons desemparelhados. As espécies reativas de oxigênio (ERO), radicais livres de maior importância no organismo, incluem todos os radicais gerados a partir do oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (OH^{\bullet}), alcoxila (RO^{\bullet}) e peroxila (ROO^{\bullet}). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2) e o ozônio (O_3), apesar de não serem radicais livres, podem induzir reações radicalares no organismo e por isso são considerados também como espécies reativas (PATEL et al., 1999). Os radicais livres atacam lipídeos insaturados das biomembranas, iniciando o processo de peroxidação lipídica. Estes radicais podem também atacar o DNA, causando mutação, o que pode levar ao desenvolvimento de câncer (GAO, IGARASHI e NUKINA, 2000). A atividade antimutagênica de alguns antioxidantes deve-se, muitas vezes à capacidade de captarem radicais livres ou induzirem enzimas antioxidantes.

O ensaio utilizando o radical livre DPPH avalia a capacidade seqüestrante de radicais livres da amostra analisada. O radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) é relativamente estável e suficientemente solúvel em álcoois miscíveis em água, como o metanol. A ação seqüestrante de radicais livres deve-se à reação entre o DPPH e compostos presentes nos extratos e frações, geralmente fenólicos, através da abstração de um radical hidrogênio, conforme ilustrado na equação da figura 35. O DPPH, ao reagir com o flavonóide é reduzido, formando espécies mais estáveis e diminuindo a intensidade de sua coloração, o que pode ser facilmente determinado sob luz UV-VIS (517 nm). A estabilização de radicais livres e formação de espécies pouco reativas inibem a propagação do processo de peroxidação lipídica, um dos

eventos biológicos mais importantes relacionados aos processos oxidativos (LUGASI et al., 1998).

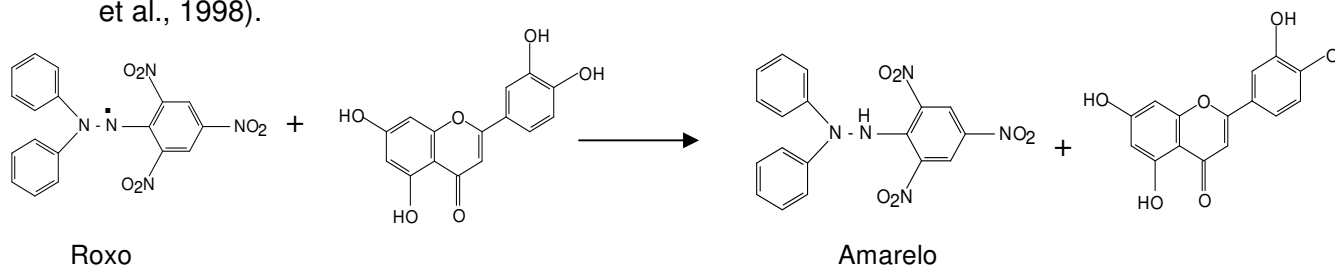


Figura 36. Equação básica da reação do DPPH com um flavonóide.

A tabela 14 mostra o resultado do ensaio de atividade sequestrante do radical livre DPPH. Considera-se, para interpretação do ensaio, que a diminuição da absorvância em 517 nm e o aumento do aparecimento da coloração amarela em solução correspondem a um maior potencial antioxidante por parte da solução teste. Os resultados obtidos são expressos em IC_{50} , que significa a concentração de extrato, fração ou composto isolado necessária para reduzir em 50 % a concentração de DPPH em solução, e pode ser obtida através do gráfico de concentração do DPPH em solução *versus* concentração da solução amostra com o extrato ou a fração analisada. Neste caso, quanto menor a concentração necessária para alcançar a IC_{50} , melhor a capacidade seqüestrante do radical livre por parte da amostra.

Analisando os resultados, observa-se que a fração butanólica das folhas de *E. brasiliensis* apresenta a maior capacidade de captação de radicais livres, com $IC_{50} = 6,2 \mu\text{g/mL}$, seguida da fração acetato de etila do caule da mesma espécie, com $IC_{50} = 8,8 \mu\text{g/mL}$. Os valores obtidos equiparam-se ao valor de IC_{50} do ácido ascórbico, um antioxidante usado como padrão, que apresentou $IC_{50} = 9,2 \mu\text{g/mL}$. Em *E. beaurepaireana*, a fração com melhor capacidade antioxidante foi a acetato de etila das folhas com $IC_{50} = 10,3 \mu\text{g/mL}$, seguida pela mesma fração do caule, $IC_{50} = 12,0 \mu\text{g/mL}$. Já para *E. umbelliflora*, a fração mais ativa foi a butanólica das folhas, $IC_{50} = 15,2 \mu\text{g/mL}$. Das três espécies avaliadas, esta última parece ter menor capacidade antioxidante.

Ao relacionar os resultados de atividade antioxidante com a quantidade de fenóis e flavonóides determinada no ensaio anterior, percebe-se que existe uma maior correlação entre os valores de IC_{50} para a atividade seqüestradora de radicais livres com o conteúdo de compostos fenólicos do que com o conteúdo de flavonóides presentes nas amostras vegetais. A correlação entre a quantidade de compostos fenólicos e os valores de IC_{50} apresentou coeficientes da ordem de 64,5, 65,3 e 57,7 %, para os extratos e frações das folhas de *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E.*

umbelliflora, respectivamente. Esta correlação, quando feita com os extratos e frações dos caules das espécies apresentou coeficientes de 88,47, 62,03 e 70,54, respectivamente. De fato, como citado anteriormente, a literatura atribui a esses grupos de substâncias a atividade antioxidante de extratos vegetais. Porém, nenhuma relação se mantém quando se correlacionam a capacidade sequestrante do DPPH com a quantidade de flavonóides presentes nos mesmos extratos e frações.

Tabela 14. Capacidade sequestrante do radical livre DPPH (IC_{50}^* - $\mu\text{g/mL}$) nos extratos e frações das espécies estudadas.

Extrato/fração	<i>E. brasiliensis</i>	<i>E. beurepaireana</i>	<i>E. umbelliflora</i>
	FOLHAS	FOLHAS	FOLHAS
Extrato bruto	27,6	18,0	39,7
Fração hexano	459,3	841,2	361,1
Fração DCM**	136,9	27,3	199,3
Fração AcOEt**	14,7	10,3	31,1
Fração BuOH**	6,2	22,2	15,2
Fração Aquosa	21,6	12,4	29,0
	CAULE	CAULE	CAULE
Extrato bruto	19,9	12,6	52,2
Fração hexano	613,2	225,1	167,7
Fração DCM**	186,6	25,4	201,7
Fração AcOEt**	8,8	12,0	51,1
Fração BuOH**	15,6	12,5	23,2
Fração Aquosa	14,6	45,6	123,7
Ácido gálico		2,4	
Ácido ascórbico		9,2	
BHT		17,2	

* IC_{50} = Concentração de extrato ou fração necessária, em $\mu\text{g/mL}$, para diminuir a concentração do radical livre DPPH em 50 %.

**DCM = diclorometano; AcOEt = acetato de etila; BuOH = n-butanol

4.4.2.4. Determinação do potencial redutor

A oxidação de lipídios envolve reações radicalares, capazes de auto-propagação, que dependem de ação catalítica, como temperatura, radicais livres, pH e ação de íons metálicos (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999). A capacidade de reduzir íons metálicos ou intermediários do processo de peroxidação lipídica, através da doação de elétrons, é caracterizado como potencial redutor de uma amostra (YEN e CHEN, 1995).

O ensaio para a determinação da atividade do potencial redutor baseia-se no método de Price e Butler, proposto por Waterman e Mole (1994), com adaptações. Este método baseia-se no fato de que, hidroxilas fenólicas, presentes nos compostos e extratos vegetais são oxidadas a íons fenolato, os íons férricos, adicionados à solução na forma de FeCl_3 , são reduzidos para íons ferrosos, e detectados a partir da formação de um complexo azul ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) com o reagente ferricianeto de potássio (WATERMAN e MOLE, 1994). Para a atribuição de valores de potencial redutor, utilizou-se uma curva de calibração com diversas concentrações de ácido ascórbico (figura 37), um composto com potencial redutor, de onde se obteve a equação de reta $y = 0,0015x + 0,124$, $r^2 = 0,999$.

A tabela 15 apresenta os resultados do ensaio para a determinação do potencial redutor. Valores maiores significam maior capacidade redutora, quando comparados ao ácido ascórbico.

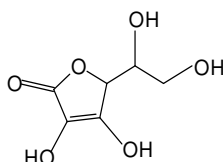


Figura 37. Estrutura do ácido ascórbico.

Tabela 15. Potencial redutor* dos extratos e frações das espécies estudadas.

Extrato/fração	<i>E. brasiliensis</i>	<i>E. beaurepaireana</i>	<i>E. umbelliflora</i>
	FOLHAS	FOLHAS	FOLHAS
Extrato bruto	318,33	473,33	154,66
Fração hexano	12,66	0,00	0,00
Fração DCM**	153,33	309,33	0,00
Fração AcOEt**	834,99	1292,99	301,66
Fração BuOH**	790,66	571,66	654,66
Fração Aquosa	553,66	953,99	431,21
	CAULE	CAULE	CAULE
Extrato bruto	544,33	625,66	124,33
Fração hexano	0,00	0,00	0,00
Fração DCM**	286,66	435,66	0,00
Fração AcOEt**	1119,66	791,00	283,99
Fração BuOH**	756,66	681,00	623,99
Fração Aquosa	1595,66	268,00	372,66

* O potencial redutor é expresso em equivalentes de mg de ácido ascórbico/ g de extrato ou fração seca da planta (mgAA/g).

**DCM = diclorometano; AcOEt = acetato de etila; BuOH = n-butanol

A análise dos resultados obtidos para as três espécies testadas mostra que, tanto para o extrato bruto das folhas como para o caule, a espécie *E. beaurepaireana* tem maior capacidade redutora sobre os íons férricos, com valores equivalentes a 473,33 mg de ácido ascórbico/ g de extrato (mgAA/g) e 625,66 mgAA/g, respectivamente. A fração com maior potencial redutor, tanto nas folhas quanto no caule desta espécie foi a acetato de etila, com valores de 1292,99 mgAA/g e 791,0 mgAA/g, respectivamente.

A exemplo de *E. beaurepaireana*, o extrato bruto do caule de *E. brasiliensis* também demonstrou maior capacidade redutora (544,33 mgAA/g) em relação ao extrato bruto das folhas (318,33 mgAA/g). Nesta espécie as frações mais ativas foram a acetato de etila, para as folhas, e a fração aquosa, para o caule, com valores de 834,99 e 1595,66 mgAA/g. A espécie *E. umbelliflora* mostrou a menor atividade das plantas em estudo, resultado também observado na avaliação da capacidade seqüestrante do radical livre DPPH. O extrato bruto das folhas desta espécie mostrou potencial redutor equivalente a 154,66 mgAA/g, enquanto que o extrato bruto do caule apresentou potencial redutor de 124,33 mgAA/g de extrato. Nesta espécie, as frações mais ativas foram aquelas extraídas com butanol, tanto nas folhas quanto no caule, apresentando valores equivalentes a 654,66 e 623,99 mgAA/g, respectivamente.

Da mesma maneira que a capacidade seqüestrante do radical livre DPPH, o potencial redutor dos extratos e frações aumenta conforme o aumento do conteúdo de compostos fenólicos. Apesar da relação entre a quantidade de compostos fenólicos e o potencial redutor não ser linear, como se pode observar no gráfico da figura 38-A, que correlaciona os teores destes compostos no extrato bruto e nas frações das folhas de *Eugenia brasiliensis* com o seu potencial redutor, existe uma clara tendência diretamente proporcional do aumento do teor de fenóis e aumento do potencial redutor destas amostras. Uma análise por regressão linear mostra que os coeficientes de correlação ficaram entre 85,18 e 97,32 % para extratos e frações das folhas das espécies testadas e entre 64,61 e 96,10 % para os caules.

Mas, assim como descrito anteriormente para o ensaio do DPPH, esta correlação não se observa quando se analisam os resultados do ensaio de potencial redutor destas mesmas amostras juntamente com o seu conteúdo de flavonóides. A exceção para este caso é a correlação entre o teor de flavonóides e o potencial redutor dos extratos e frações de *Eugenia umbelliflora*, que mostraram coeficientes de correlação de 91,74 e 73,06 % para extratos e frações das folhas e caule, respectivamente. A mesma correlação, quando realizada com *E. beaurepaireana* apresenta coeficientes bem menores (36,18 % (folhas) e - 46,76 % (caules)), enquanto que para *E. brasiliensis* não foi observada qualquer correlação (0,27 %

(folhas) e -3,0 % (caules)) (figura 38-B). Ao observar estes resultados, conclui-se que o conteúdo de compostos fenólicos está diretamente relacionado aos resultados positivos de atividade antioxidante demonstrados nestes dois ensaios, enquanto o teor de flavonóides contribui em alguns casos.

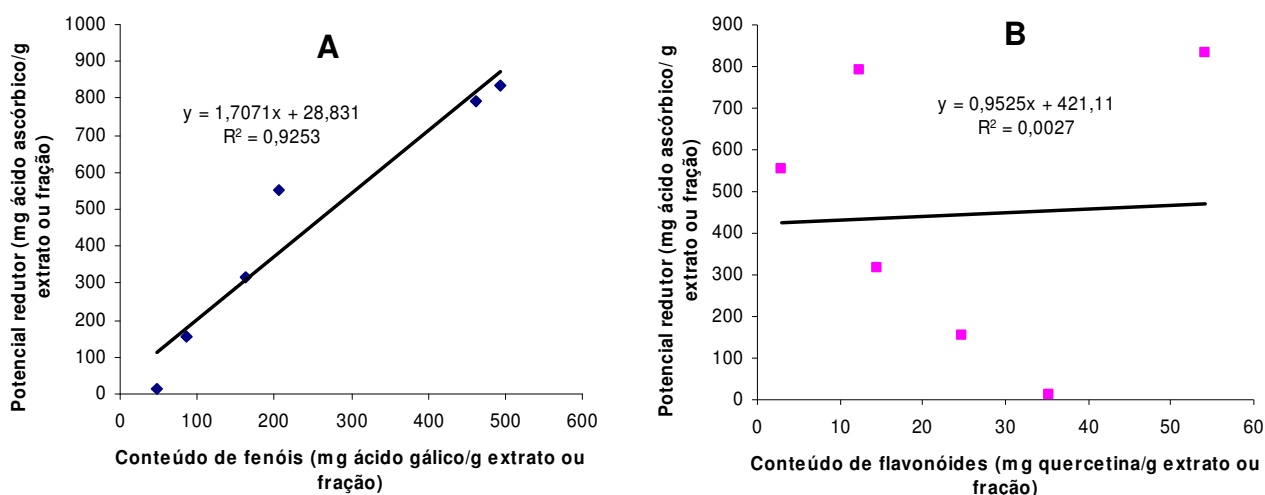


Figura 38. Concentração de compostos fenólicos (mg ácido gálico/g de extrato ou fração) (A) e flavonóides (mg quercetina/g de extrato ou fração) (B) do extrato e frações das folhas de *E. brasiliensis* vs. potencial redutor (mg ácido ascórbico/g extrato ou fração).

4.4.2.5. Verificação do potencial protetor contra a peroxidação lipídica

As membranas lipídicas são ricas em ácidos graxos susceptíveis ao processo oxidativo, especialmente o ácido linoléico e o ácido araquidônico, precursor de prostaglandinas, constituintes alvo do processo oxidativo (YU, 2001). A inibição da peroxidação lipídica envolve alguns mecanismos, como a captação de radicais livres. Estes radicais atacam os lipídios insaturados das membranas lipídicas, o que resulta no processo de peroxidação (GAO, IGARASHI e NUKINA, 2000).

Este ensaio é baseado em reações de oxi-redução, onde agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio, que, ao atacarem substratos lipídicos (ácido linoléico, neste caso) dão origem á produtos de oxidação que induzem a descoloração do β -caroteno, que pode ser avaliada através da determinação da absorvância da solução em espectrofotômetro UV-VIS em 470 nm. A adição de agentes antioxidantes inibe estas reações, mantendo a cor do β -caroteno, conseqüentemente a absorvância da solução estável. Soluções com a presença de antioxidantes, como o BHT (controle positivo) e ausência de antioxidantes (controle negativo), bem como soluções contendo as amostras a serem testadas são incubadas e suas absorvâncias são determinadas a cada 30 minutos, até 180 minutos, onde é avaliado o desaparecimento

ou não da coloração do β -caroteno, em relação ao controle negativo. O método é amplamente usado para a avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999).

Os gráficos a seguir (figura 39) demonstram os perfis de inibição da peroxidação lipídica pelos extratos e frações testados, em função do tempo, que são observados através da descoloração do beta-caroteno nas soluções. Nestes gráficos, pode-se avaliar que as soluções do controle negativo, ou seja, sem a presença dos antioxidantes, que apresentam clara descoloração, que pode ser verificado através do decaimento das absorvâncias. Já as soluções contendo BHT como agente antioxidante (controle positivo) mostram a permanência da coloração ao longo do tempo, pois seus valores de absorvância permanecem mais estáveis. Quanto mais semelhantes ao perfil apresentado pelo BHT forem as soluções teste, melhores os resultados de inibição da peroxidação lipídica.

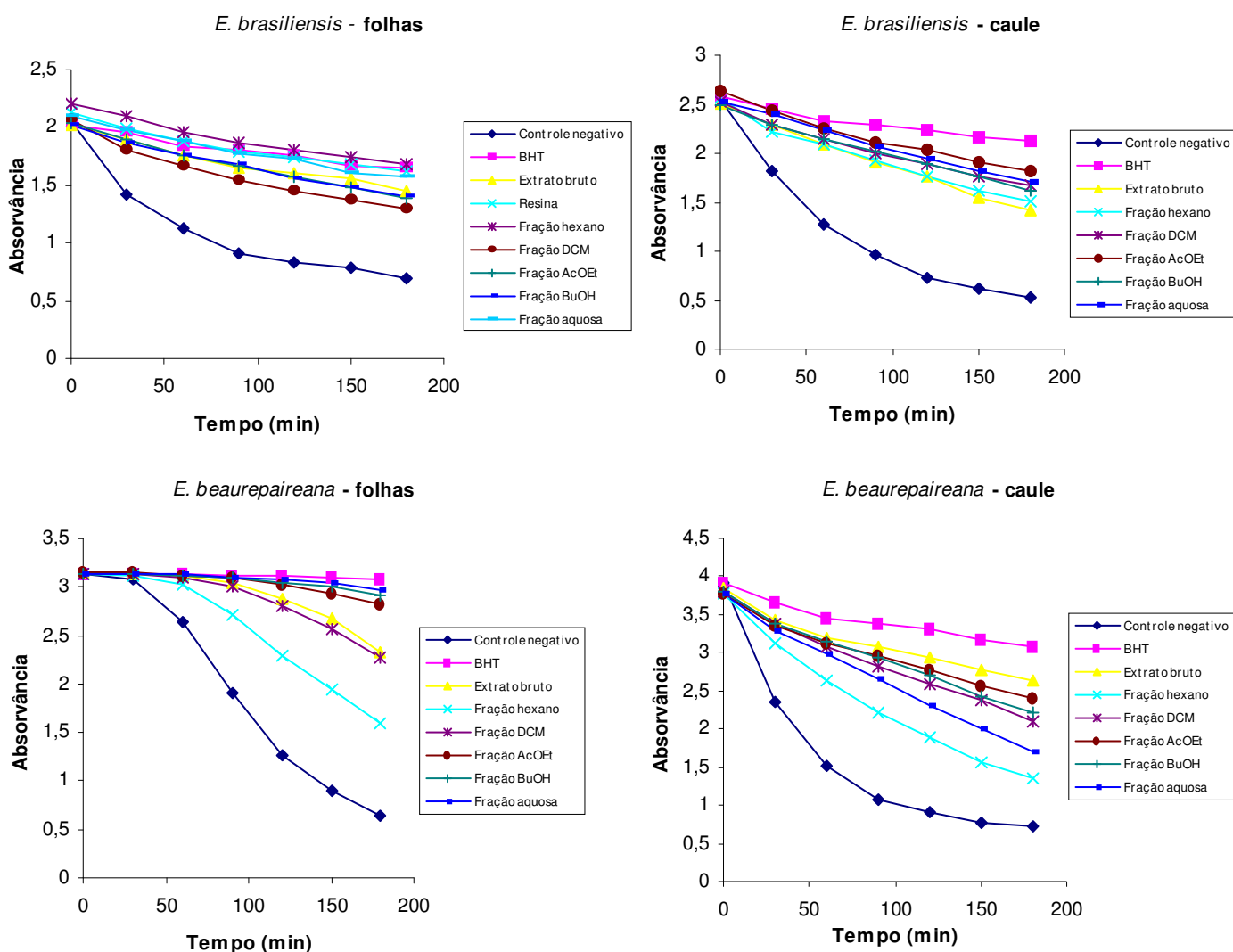


Figura 39. Ação protetora contra a peroxidação lipídica de extratos e frações de folhas e caules de *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E.umbelliflora*.

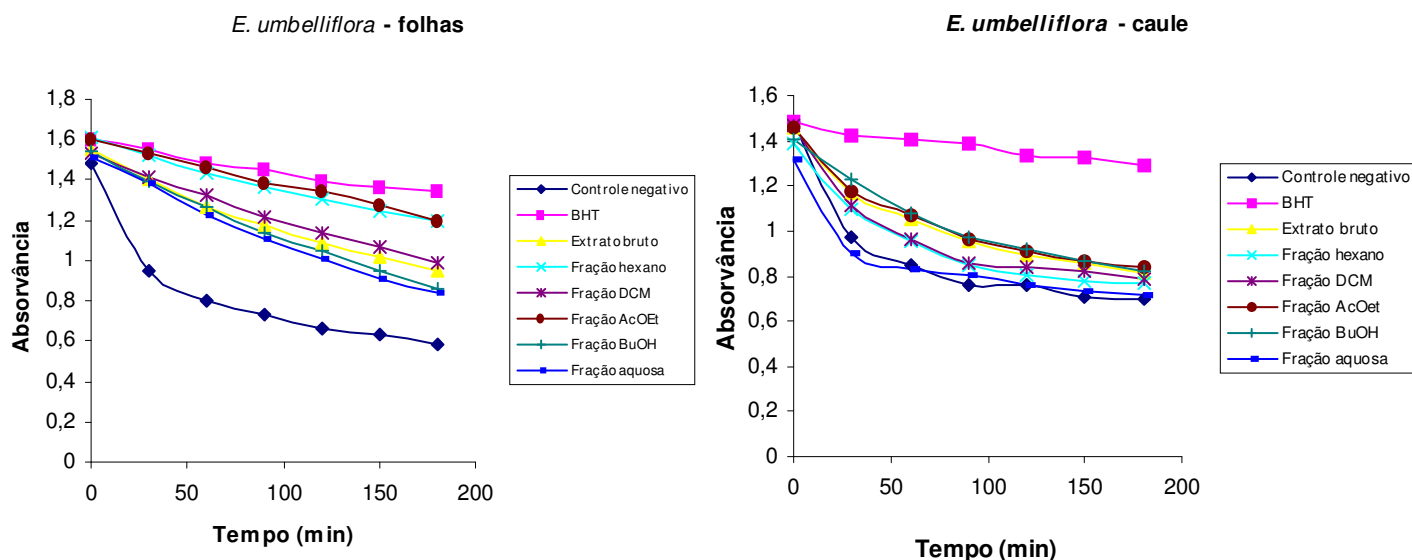


Figura 39 (Continuação). Ação protetora contra a peroxidação lipídica de extratos e frações de folhas e caules de *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E.umbelliflora*.

A tabela 16 apresenta os dados da inibição do processo de peroxidação lipídica por parte dos extratos e frações estudados. Os resultados abaixo estão expressos em porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (descoloração do β -caroteno) em relação à solução sem a presença de antioxidantes, calculados a partir dos dados de absorvância no tempo de 180 minutos. Maiores valores significam maior potencial inibidor da reação de peroxidação lipídica e conseqüentemente inibição da descoloração do β -caroteno.

Os resultados do ensaio mostram de uma maneira geral que, as substâncias antioxidantes dos extratos estão localizadas em maiores quantidades nas folhas do que no caule das espécies estudadas. Dos extratos brutos testados, aqueles produzidos a partir das folhas demonstraram maior capacidade de inibição da peroxidação lipídica, em porcentagem. Dentre os extratos brutos das espécies testadas, o extrato das folhas de *Eugenia beaurepaireana* demonstrou maior poder antioxidante (67,23 %). Em seguida, observa-se 57,66 % de inibição pelo extrato das folhas de *E. brasiliensis* e 32,77 % pelo extrato das folhas de *E. umbelliflora*.

Dentre as frações mais ativas, encontra-se a fração aquosa e butanólica das folhas de *E. beaurepaireana* para (97,80 e 91,09 %), (mostrando atividade antioxidante comparável ao controle positivo utilizado no ensaio, o BHT¹) seguida da fração acetato de etila (87,09%). Para *E. brasiliensis*, as frações hexânica e aquosa das folhas (60,99 e 60,84 %) foram as mais ativas. A espécie *E. umbelliflora* foi novamente a menos

¹ O BHT ou butil-hidroxi-tolueno é um antioxidante utilizado na preservação de alimentos e medicamentos, sendo utilizado principalmente para evitar a rancificação de gorduras.

ativa nos ensaios antioxidantes, mostrando resultados concordantes com os outros testes realizados. Suas frações mais ativas foram a acetato de etila e hexânica das folhas (55,26 e 53,57 %, respectivamente). Verificou-se que a maior atividade antioxidante não se concentrou apenas nas frações de maior polaridade, como nos outros ensaios, mas sim distribuiu-se em frações de polaridades diferentes.

Tabela 16. Inibição da peroxidação lipídica (%)* pelos extratos e frações das espécies estudadas.

Extrato/fração	<i>E. brasiliensis</i>	<i>E. beaurepaireana</i>	<i>E. umbelliflora</i>
	FOLHAS	FOLHAS	FOLHAS
Extrato bruto	57,66	67,23	32,77
Fração hexano	60,99	38,37	53,57
Fração DCM**	42,93	66,07	39,26
Fração AcOEt**	51,96	87,09	55,26
Fração BuOH**	54,26	91,09	23,15
Fração Aquosa	60,84	97,80	25,17
	CAULE	CAULE	CAULE
Extrato bruto	46,45	61,74	17,55
Fração hexano	47,69	23,26	21,54
Fração DCM**	57,53	46,45	13,68
Fração AcOEt**	59,21	56,44	21,67
Fração BuOH**	57,08	49,89	25,22
Fração Aquosa	59,71	34,04	23,95
BHT		93,28	

* A medida da inibição peroxidação lipídica em porcentagem refere-se à inibição da descoloração do beta-caroteno, na ausência de um antioxidante.

**DCM = diclorometano; AcOEt = acetato de etila; BuOH = n-butanol

4.4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

Os microorganismos são freqüentemente causa de várias infecções, e apresentam um sério risco para a saúde pública, principalmente quando se tratam de infecções hospitalares (SOUZA et al., 2004).

Nas últimas décadas, com o descobrimento de vários antibióticos, muitos microorganismos causadores destas patologias têm-se tornado multiresistentes, principalmente devido ao uso indiscriminado destes medicamentos antibacterianos. Este fato, conjuntamente com os efeitos adversos causados pelos antibióticos, tem levado os pesquisadores à procura de novas substâncias antimicrobianas em diversas fontes, incluindo as plantas medicinais (ZAMPINI, VATTUONE e ISLA, 2005).

4.4.3.1. Atividade antibacteriana

O método utilizado para a determinação da atividade antibacteriana foi a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que é definida como a última concentração de extrato ou fração capaz de inibir a presença de turbidez no micropoço. Para a confirmação da CIM, foi realizada a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) que é definida como a última concentração capaz de inibir 99% o crescimento bacteriano após semeadura em ágar sangue.

O experimento foi realizado utilizando as bactérias *Staphylococcus aureus*, um coco gram-positivo e as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que esta última está bastante relacionada aos casos de infecção hospitalar. Os extratos ativos contra *S. aureus* foram testados contra uma outra cepa desta bactéria, isolada clinicamente em um hospital, porém resistente a muitos antibióticos, a cepa de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), principalmente β -lactâmicos da classe das penicilinas. Os resultados do ensaio de atividade antibacteriana estão demonstrados nas tabelas 17, 18 e 19.

Para a classificação da atividade antibacteriana, foi utilizado o critério proposto por Machado e colaboradores (2005). Extratos e frações que apresentaram valores de CIM menores que 0,01 mg/mL foram considerados antibacterianos excelentes; valores entre 0,01 e 0,10 mg/mL foram considerados bons; valores entre 0,10 e 0,50 mg/mL foram considerados de atividade moderada; valores entre 0,5 e 1 mg/mL de atividade fraca, e para valores de CIM foram acima de 1 mg/mL, os extratos e frações foram considerados inativos.

Os extratos e frações testados para as três espécies apresentaram atividade antibacteriana em diversos níveis. Para *E. brasiliensis*, observou-se que o extrato bruto das folhas demonstrou atividade fraca contra *E. coli* e *P. aeruginosa*, com valores de MIC de 0,78 mg/mL. Já o extrato bruto do caule demonstrou maior atividade contra *S. aureus*, (CIM = 0,78 mg/mL), sendo inativo para as outras bactérias testadas. Quando se analisou as frações da partição, verificou-se que, das frações obtidas das folhas, a mais ativa é a acetato de etila, com CIM = 0,39 mg/mL para *E. coli*. Outras duas frações demonstraram atividade fraca para esta bactéria, as frações aquosa e hexânica, com valores de CIM = 0,78 mg/mL. A fração acetato de etila apresentou ação fraca também contra *P. aeruginosa* (CIM = 0,78 mg/mL).

Tabela 17. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) (mg/mL) de extratos e frações de folhas e caules de *E. brasiliensis*.

Extrato/frações	S. aureus ATCC 25923		E. coli ATCC 25922		P. aeruginosa ATCC 27853		MRSA	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
FOLHAS								
Extrato bruto	6,25	6,25	0,78	0,78	0,78	1,56	n.t.	n.t.
Fração hexano	3,12	3,12	0,78	0,78	6,25	6,25	n.t.	n.t.
Fração DCM**	6,25	12,50	3,12	3,12	6,25	12,5	n.t.	n.t.
Fração AcOEt**	1,56	1,56	0,39	0,78	0,78	1,56	n.t.	n.t.
Fração BuOH**	3,12	6,25	1,56	3,12	3,12	3,12	n.t.	n.t.
Fração Aquosa	3,12	3,12	0,78	0,78	6,25	6,25	n.t.	n.t.
CAULE								
Extrato bruto	0,78	0,78	6,12	6,12	3,12	3,12	0,78	0,78
Fração hexano	1,56	1,56	12,50	12,50	6,25	6,25	n.t.	n.t.
Fração DCM**	0,78	0,78	3,09	3,09	3,12	3,12	0,78	0,78
Fração AcOEt**	1,56	1,56	0,39	0,39	1,56	1,56	n.t.	n.t.
Fração BuOH**	1,56	1,56	0,39	0,39	6,25	6,25	n.t.	n.t.
Fração Aquosa	0,39	0,39	6,12	6,12	3,12	3,12	0,78	0,78
Controle positivo*	0,005	---	0,0075	---	0,001	---	0,008	--

*Controle positivo = gentamicina, com exceção de MRSA onde foi usada oxacilina; n.t. = não testado

**DCM = diclorometano; AcOEt = acetato de etila; BuOH = *n*-butanol

Tabela 18. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) (mg/mL) de extratos e frações de folhas e caules de *E. beaurepaireana*.

Extrato/frações	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		MRSA	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
FOLHAS								
Extrato bruto	50,00	50,00	50,00	50,00	3,06	3,06	n.t.	n.t.
Fração hexano	1,56	1,56	12,50	12,50	6,12	6,12	n.t.	n.t.
Fração DCM	6,12	6,12	3,06	3,06	3,06	3,06	n.t.	n.t.
Fração AcOEt	1,56	1,56	12,50	12,50	0,39	0,39	n.t.	n.t.
Fração BuOH	1,56	1,56	3,06	3,06	0,78	0,78	n.t.	n.t.
Fração Aquosa	n.o.	n.o.	6,12	6,12	12,5	12,50	n.t.	n.t.
CAULE								
Extrato bruto	0,39	0,39	3,12	3,12	0,78	0,78	0,62	0,62
Fração hexano	25,00	25,00	n.o.	n.o.	50,00	50,00	n.t.	n.t.
Fração DCM	6,25	6,25	1,56	1,56	12,50	12,50	n.t.	n.t.
Fração AcOEt	0,07	0,07	0,78	0,78	12,50	12,50	1,25	1,25
Fração BuOH	0,78	0,78	0,39	0,39	25,00	25,00	0,78	0,78
Fração Aquosa	0,15	0,15	1,56	1,56	12,50	12,50	0,62	0,62
Controle positivo*	0,005	---	0,0075	---	0,001	---	0,008	--

* Controle positivo = gentamicina, com exceção de MRSA, onde foi usada oxacilina; n.t. = não testado.

**DCM = diclorometano; AcOEt = acetato de etila; BuOH = *n*-butanol

Tabela 19. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) (mg/mL) de extratos e frações de folhas e caules de *E. umbelliflora*.

Extrato/frações	S. aureus ATCC 25923		E. coli ATCC 25922		P. aeruginosa ATCC 27853		MRSA	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
FOLHAS								
Extrato bruto	0,015	0,015	1,56	1,56	6,25	6,25	0,0061	0,0061
Resina	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Fração hexano	0,015	0,015	6,25	6,25	3,12	3,12	0,00300	0,00300
Fração DCM	0,015	0,015	3,12	3,12	1,56	1,56	0,00150	0,00150
Fração AcOEt	0,015	0,015	1,56	1,56	0,78	0,78	0,00075	0,00075
Fração BuOH	0,195	0,195	0,78	0,78	0,39	0,39	n.o.	n.o.
Fração Aquosa	6,25	6,25	6,25	6,25	3,12	3,12	n.t.	n.t.
CAULE								
Extrato bruto	3,12	3,12	12,5	12,5	12,5	12,5	n.t.	n.t.
Fração hexano	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	n.t.	n.t.
Fração DCM	12,5	12,5	3,12	3,12	6,25	6,25	n.t.	n.t.
Fração AcOEt	3,12	3,12	12,5	12,5	1,56	1,56	n.t.	n.t.
Fração BuOH	1,56	1,56	3,12	3,12	3,12	3,12	n.t.	n.t.
Fração Aquosa	12,5	12,5	12,5	12,5	6,25	6,25	n.t.	n.t.
Controle positivo*	0,005	---	0,0075	---	0,001	---	0,008	--

*Controle positivo = gentamicina, com exceção de MRSA onde foi usada oxacilina; n.t. = não testado; n.o. = não observada

**DCM = diclorometano; AcOEt = acetato de etila; BuOH = *n*-butanol

Das frações obtidas do caule, observou-se atividade moderada das frações acetato de etila e butanol (CIM = 0,39 mg/mL) para *E. coli*. Este resultado mostra que, apesar do extrato bruto do caule não apresentar atividade contra esta bactéria, à medida que se fraciona o extrato bruto e os compostos vão sendo concentrados, a atividade pode tornar-se mais intensa. As frações diclorometano (CIM = 0,78 mg/mL) e aquosa (CIM = 0,39 mg/mL) mostraram ação contra *S. aureus*.

Para *E. beaurepaireana*, observa-se que o extrato bruto das folhas não demonstra atividade bacteriana significativa. O extrato bruto do caule apresentou ação moderada (CIM= 0,39 mg/mL) contra *S. aureus* e fraca (CIM = 0,78 mg/mL) contra *P. aeruginosa*. Quando se analisam as frações obtidas na partição, observa-se, para as folhas desta espécie, atividade moderada da fração acetato de etila (CIM=0,39 mg/mL) e fraca da fração butanólica (CIM = 0,78 mg/mL) contra *P. aeruginosa*, apesar de o extrato bruto não ter demonstrado ação significativa.

Para as frações obtidas do caule de *E. beaurepaireana*, observa-se ação antibacteriana mais marcante. A fração acetato de etila apresentou boa atividade contra *S. aureus* (CIM = 0,075 mg/mL), sendo ativa também contra *E. coli* (CIM = 0,78 mg/mL). As frações aquosa (CIM = 0,15 mg/mL) e butanólica (CIM = 0,78 mg/mL) também mostraram ação contra *S. aureus*, sendo que esta última também foi ativa contra *E. coli* (CIM = 0,39 mg/mL), uma bactéria gram-negativa. Este fato também é relevante, uma vez que é sabido que estas bactérias são mais resistentes à ação de extratos e compostos, pois possuem uma membrana externa que funciona como barreira para diversas substâncias, inclusive os antibióticos. Além disso, seu espaço periplasmático contém diversas enzimas capazes de quebrar moléculas estranhas ao metabolismo bacteriano (ROSSI e ANDREAZZI, 2005) tornando mais difícil a ação de substâncias estranhas contra estas cepas. De uma maneira geral, as frações mais polares, com destaque para as frações acetato de etila, demonstraram melhor atividade.

Os resultados obtidos com extratos e frações de *E. umbelliflora* foram bastante interessantes, e verificou-se que a espécie apresenta uma atividade relevante contra bactérias gram-positivas. Os resultados de CIM obtidos com o extrato bruto, as frações hexano, diclorometano e acetato de etila das folhas desta espécie contra *S. aureus* foram de 0,015 mg/mL, os menores observados até então, e foram considerados bons. A atividade antiestafilocócica elevada é interessante, pois esta é uma das bactérias mais comuns presentes em infecções hospitalares, e uma das mais difíceis de eliminar do ambiente humano (RIYAZ-UL-HASSAN, VERMA e QAZI, 2008). Diversas cepas de *Staphylococcus* expressam também multiresistência a vários antibióticos (LECHNER et al., 2004). Uma atividade menos significativa foi observada em relação às bactérias

gram-negativas. A fração butanólica das folhas de *E. umbelliflora* mostrou fraca atividade contra *E.coli*, e moderada contra *P. aeruginosa*. Extratos e frações do caule não foram ativos contra nenhuma das bactérias testadas.

Com o objetivo de verificar se as frações citadas acima apresentavam atividade também contra uma cepa de *S. aureus* multiresistente, realizou-se o ensaio com uma cepa MRSA. Esta sigla designa uma cepa de bactérias chamada “methicillin resistant *Staphylococcus aureus*”, ou *S. aureus* resistentes à meticilina, isto é, multiresistente aos antibióticos beta-lactâmicos e a vários outros antibióticos. Esta é uma das cepas patogênicas mais críticas encontradas em infecções humanas, sendo importante causa de infecções hospitalares (KHANNA et al., 2008). Surpreendentemente, os resultados obtidos com as frações foram melhores que os obtidos com controle positivo utilizado, a oxacilina, uma penicilina resistente á degradação por enzimas bacterianas (MITSCHER, 2002). Os valores de CIM obtidos foram de 0,0061 mg/mL para o extrato bruto, 0,003 mg/mL para a fração hexano, 0,0015 mg/mL para a fração diclorometano e 0,00075 mg/mL para a fração acetato de etila de *E. umbelliflora*, que foram considerados resultados excelentes. As outras espécies apresentaram atividade moderada contra MRSA. Os extrato bruto do caule de *E. brasiliensis*, bem como as frações diclorometano e aquosa obtidas através da partição deste extrato, e o extrato bruto do caule de *E. beaurepaireana*, juntamente com as frações butanólica e aquosa, apresentaram valores de CIM entre 0,62 e 0,78 mg/mL.

Os resultados descritos mostram a presença de compostos altamente ativos contra *S. aureus* e MRSA, e sugerem a continuação do estudo fitoquímico para o posterior isolamento e identificação destes compostos. Estudos semelhantes foram encontrados na literatura, onde foi demonstrada a ação antimicrobiana moderada do extrato bruto hidroalcoólico, frações diclorometano e acetato de etila de *E. umbelliflora* contra *B. cereus*, *S. aureus* não-resistente, *S. saprophyticus* e *S. agalactiae* (MACHADO et al., 2005).

A atividade antibacteriana já foi relatada anteriormente para outras plantas da família das Mirtaceas, relatada para óleos essenciais, flavonóides (SLOWING, CARRETERO e VILLAR, 1994) e taninos (DJIPA, DELMEE e QUENTIN-LECLERCQ, 2000) extraídos de folhas ou caules destas espécies. Para o gênero *Eugenia*, a atividade antibacteriana foi relatada para o óleo essencial de *E. caryophyllata*, que apresentou ação antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (OUSSALAH et al., 2007); seus extratos metanólico e aquoso inibiram o crescimento de *Helicobacter pylori* (CIM 40 µg/mL e 60 µg/mL) (LI et al., 2005). O extrato metanólico das folhas de *E. uniflora*

(SOUZA et al., 2004), aquoso dos frutos, caule e raízes de *E. malaccensis* (LOCHER et al., 1995) também apresentou atividade antibacteriana.

Uma análise por regressão linear mostrou que os resultados obtidos têm pouca correlação com o ensaio de toxicidade em larvas de *Artemia salina*. Em geral, os coeficientes de correlação aproximaram-se de zero, com exceção do extrato bruto e frações das folhas de *E. brasiliensis*, onde a relação entre a letalidade em larvas de *A. salina* e a atividade antibacteriana contra *S. aureus* chegou a 76 %. Além disto, observou-se que o extrato e as frações de *E. umbelliflora*, a espécie mais ativa contra *A. salina*, apresentou também maior atividade contra esta bactéria.

4.4.3.2. Atividade antifúngica

Fungos são organismos bastante comuns na natureza, e as infecções causadas por fungos patogênicos são cada vez mais freqüentes. Com o advento do vírus HIV, infecções oportunistas têm se tornado comumente causa de morbidade e mortalidade nos pacientes imunocomprometidos ou imunodeficientes (WEBSTER et al., 2008). Apesar da existência de agentes antifúngicos cada vez mais potentes, cepas resistentes ou multi-resistentes continuam aparecendo (BRAGA et al., 2007).

O ensaio de atividade antifúngica foi realizado em leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus*. As leveduras são preferidas para a realização de ensaios de atividade antifúngica devido à sua importância como causadoras de infecções oportunistas, especialmente em pacientes HIV positivos. O fungo *Cryptococcus neoformans* é um importante agente causador de meningite, que permanece ainda sem alternativa de cura na população com AIDS. Outro fungo, *Candida albicans*, é um causador de infecções oportunistas locais e sistêmicas em pacientes predispostos, que comumente afeta os pacientes imunodeprimidos (JONES et al., 2000).

Para a classificação da atividade antifúngica, foi utilizado o critério proposto por Rios e Recio (2005). De acordo com este estudo, extratos e frações vegetais cujo valor da concentração inibitória mínima encontra-se abaixo de 1000 µg/mL são considerados ativos, e abaixo de 100 µg/mL são considerados muito potentes. Os resultados de atividade antifúngica das espécies de *Eugenia* estudadas estão nas tabelas a seguir. Algumas frações não puderam ser testadas, pois foram extraviadas ou danificadas quando o material foi enviado para os testes, e foram referidas na tabela como não testadas (n.t.) (tabelas 20, 21 e 22).

Para a espécie *E. brasiliensis*, observa-se resultados bastante diversos. A maioria das frações não apresentou atividade contra as leveduras testadas, porém

observam-se várias frações com atividade interessante. Observou-se que o extrato bruto do caule desta espécie foi mais ativo que o extrato das folhas, apresentando valores de CIM = 7,8 µg/mL para *C. albicans* e *C. neoformans*, o que corresponde a uma alta atividade inibitória contra estes fungos. Ao analisar as frações obtidas da partição, observa-se que os valores de CIM obtidos foram menores que os obtidos com o extrato bruto total, sugerindo que a ação destes compostos seja sinérgica, ou seja, a soma de vários compostos encontrados neste extrato. Para o extrato bruto das folhas, observou-se atividade contra *C. krusei* e *C. tropicalis*, com CIM = 500 µg/mL. Quanto às frações obtidas das folhas, a fração aquosa foi a mais ativa, apresentando valores de CIM = 15,6 µg/mL para *C. neoformans* e 60 µg/mL para *C. krusei*.

À exemplo da espécie citada acima, o fungo mais sensível aos extratos e frações de *E. beauverbia* foi *C. neoformans*. Porém, para esta espécie, observa-se que um maior número de frações foi ativa contra as cepas de leveduras testadas. O melhor resultado obtido com o extrato bruto das folhas foi contra *C. glabrata*, com CIM = 92,5 µg/mL. Das frações testadas, a mais ativa foi a fração butanólica, que apresentou CIM = 45 µg/mL contra *C. neoformans* e 60 µg/mL contra *C. krusei*, sugerindo que os compostos mais ativos deste extrato sejam de maior polaridade. Das frações obtidas a partir do extrato bruto do caule destaca-se a fração diclorometano, ativa contra todos os microorganismos testados, com valores de CIM entre 30 e 125 µg/mL.

A espécie *E. umbelliflora* apresentou os valores menos significativos contra os fungos testados. O extrato das folhas foi mais ativo que o do caule, com o melhor resultado de CIM = 125 µg/mL para *C. krusei*. Das frações obtidas na partição, tanto para as folhas como para o caule, a fração mais ativa foi a butanólica, com valores de CIM = 30 µg/mL e 60 µg/mL para *C. krusei*, respectivamente. De fato, esta espécie de *Candida* foi a mais sensível à ação de *E. umbelliflora*. Estes resultados mostram a diferença de atividade desta espécie contra fungos e bactérias, já que esta inibiu mais efetivamente o crescimento bacteriano, em relação ao fúngico.

A atividade antifúngica já foi relatada na literatura para outras espécies de *Eugenia*. O eugenol, composto majoritário do óleo essencial de *E. caryophyllata* apresentou atividade contra fungos causadores de onicomicoses (GAYOSO et al., 2005), assim como o óleo essencial de *E. disenterica* (COSTA et al., 2000). O extrato etanólico de *E. uniflora* inibiu o crescimento de espécies de *Trichophyton* e *Microsporum*, fungos dermatófitos causadores de infecções da pele, unhas e cabelos (HASIMOTO E SOUZA et al., 2002). O extrato etanólico dos frutos, caule e raízes de *E. malaccensis* também inibiu o crescimento fúngico (LOCHER et al., 1995).

Tabela 20. Atividade antifúngica (concentração inibitória mínima, µg/mL) de extratos e frações de caule e folhas de *E. brasiliensis*.

Extrato/frações	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. neoformans</i>
	ATCC 18804	ATCC 200298	ATCC 2001	ATCC 22019	ATCC 22019	ATCC 32608
FOLHAS						
Extrato bruto	≥ 1000	500	≥ 1000	≥ 1000	500	≥ 1000
Fração hexano	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
Fração DCM**	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
Fração AcOEt**	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
Fração BuOH**	≥ 1000	125	≥ 1000	≥ 1000	500	500
Fração aquosa	≥ 1000	60	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	15,6
CAULE						
Extrato bruto	7,8	≥ 1000	≥ 1000	500	≥ 1000	7,8
Fração hexano	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
Fração DCM**	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
Fração AcOEt**	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
Fração BuOH**	≥ 1000	125	≥ 1000	250	≥ 1000	250
Fração aquosa	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

*n.t. = não testada

**DCM = diclorometano; AcOEt = acetato de etila; BuOH = n-butanol

Tabela 21. Atividade antifúngica (concentração inibitória mínima, µg/mL) de extratos e frações de caule e folhas de *E. beaurepaireana*.

Extrato/frações	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. neoformans</i>
	ATCC 18804	ATCC 200298	ATCC 2001	ATCC 22019	ATCC 22019	ATCC 32608
FOLHAS						
Extrato bruto	125	250	92,5	500	≥ 1000	125
Fração hexano	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	500	125
Fração DCM**	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Fração AcOEt**	60	125	250	60	125	≥ 1000
Fração BuOH**	125	60	250	250	500	45
Fração aquosa	≥ 1000	125	≥ 1000	375	415	375
CAULE						
Extrato bruto	≥ 1000	250	500	≥ 1000	500	≥ 1000
Fração hexano	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	500
Fração DCM**	45	60	60	125	60	30
Fração AcOEt**	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	30
Fração BuOH**	250	250	250	≥ 1000	≥ 1000	30
Fração aquosa	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	250

* n.t. = não testada

** DCM = diclorometano; AcOEt = acetato de etila; BuOH = n-butanol

Tabela 22. Atividade antifúngica (concentração inibitória mínima, µg/mL) de extratos e frações de caule e folhas de *E. umbelliflora*.

Extrato/frações	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. neoformans</i>
	ATCC 18804	ATCC 200298	ATCC 2001	ATCC 22019	ATCC 22019	ATCC 32608
FOLHAS						
Extrato bruto	≥ 1000	125	500	≥ 1000	500	≥ 1000
Fração hexano	≥ 1000	500	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	250
Fração DCM**	≥ 1000	125	500	500	500	≥ 1000
Fração AcOEt**	≥ 1000	≥ 1000	125	≥ 1000	≥ 1000	125
Fração BuOH**	250	30	500	500	250	500
Fração aquosa	750	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
CAULE						
Extrato bruto	≥ 1000	250	≥ 1000	≥ 1000	500	≥ 1000
Fração hexano	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Fração DCM**	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
Fração AcOEt**	≥ 1000	500	500	≥ 1000	125	500
Fração BuOH**	≥ 1000	60	≥ 1000	≥ 1000	250	≥ 1000
Fração aquosa	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000

*n.t. = não testada

**DCM = diclorometano; AcOEt = acetato de etila; BuOH = n-butanol

4.4.4. Determinação da atividade antiinflamatória tópica

O processo inflamatório está envolvido em muitas das lesões e disfunções da pele. A inflamação representa uma complexa mobilização dos sistemas de defesa celular e humoral do organismo, com participação vascular, neural e hormonal, desencadeada por estímulos físicos, químicos ou biológicos. A sua finalidade é tentar limitar a lesão ao local de sua incidência e evitar a sua disseminação a outras regiões do organismo. As doenças inflamatórias tópicas atingem uma grande parcela da população. Algumas destas patologias, como a psoríase, afetam cerca de 1 a 3 % da população em todo o mundo (GOTTLIEB, 2005).

Muitos dos medicamentos utilizados atualmente para o tratamento de doenças inflamatórias da pele, como os antiinflamatórios não esteroidais, glicocorticóides e imunossupressores não são efetivos em doenças inflamatórias crônicas, como a psoríase e a dermatite atópica. Os produtos naturais, inclusive derivados de vegetais, têm sido muito usados atualmente na pesquisa de novos compostos ativos contra estas patologias (DISEPIO, CHANDRARATNA e NAGPAL, 1999; CAUWENBERGH, 2002; MENDONÇA e BURDEN, 2003).

A avaliação da atividade antiinflamatória tópica foi realizada com o extrato bruto das folhas de *Eugenia brasiliensis*, juntamente com as frações hexano, diclorometano e acetato de etila obtidas a partir da partição do mesmo extrato. Compostos fenólicos isolados da fração acetato de etila, quercetina, catequina e galocatequina também foram alvo de investigação da atividade antiinflamatória tópica, realizada em diferentes modelos de inflamação cutânea em camundongos.

4.4.4.1. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton

O óleo de cróton é um agente flogístico extraído das sementes de *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae), que apresenta um efeito irritante e vesicante na pele. O óleo de cróton é constituído por ésteres de forbol, no qual o principal componente é o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (figura 40). A aplicação cutânea de TPA ou óleo de cróton resulta em derrame vascular, infiltração de leucócitos e hiperplasia epidérmica. Estes efeitos se devem à ativação direta da proteína quinase C, que funciona como gatilho para o aumento da liberação de ácido araquidônico e seus metabólitos, especialmente leucotrienos, que são mediadores da inflamação. Além disso, promove indução enzimática, aumento da síntese de proteínas no local e aumento da síntese de DNA e RNA (GÁBOR, 2000; GARRIDO et al., 2006).

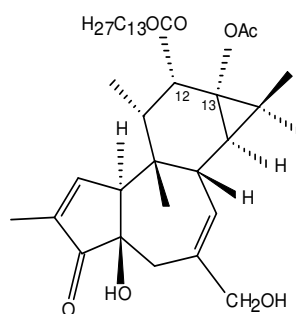


Figura 40. Estrutura do 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).

O extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* e suas frações causaram uma significativa inibição dose-dependente na inflamação provocada pela aplicação do óleo de cróton, inibindo o edema e a migração celular. O extrato hidroalcoólico mostrou um valor de DI_{50} de 0,17 mg (0,12 – 0,24) com inibição máxima (IM) de $79 \pm 7 \%$ do edema de orelha. A dexametasona, utilizada como controle positivo reduziu o edema em $92 \pm 4\%$, em comparação ao controle negativo (apenas o veículo) (figura 41).

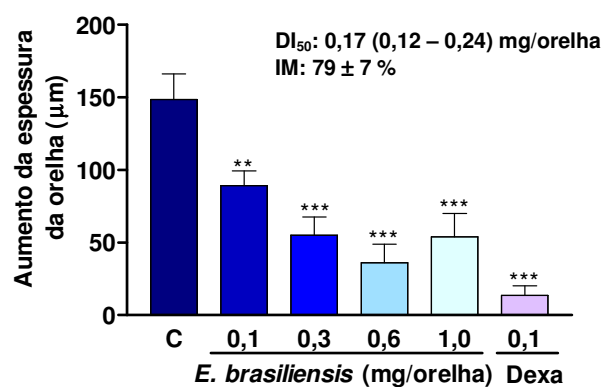


Figura 41. Efeito do extrato hidroalcoólico de *E. brasiliensis* e da dexametasona (dexa) administrados topicamente sobre o edema de orelha induzida pelo óleo de cróton. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 4-6 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle (C). Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. DI_{50} : dose inibitória 50 %. IM: inibição máxima do edema.

As frações obtidas através da partição do extrato bruto, fração hexano, diclorometano e acetato de etila, apresentaram valores de DI_{50} de 0,29 mg (0,20 – 0,43), 0,14 mg (0,03 – 0,63) e 0,13 mg (0,06 – 0,26), e IM de $87 \pm 5 \%$, $96 \pm 2 \%$ e 88

$\pm 5\%$, respectivamente. Neste experimento, a inibição do edema de orelha provocada pela dexametasona foi de $96 \pm 3\%$ (figura 42). Todas as frações demonstraram inibir significativamente o edema nas doses de 0,3 e 0,6 mg/orelha, porém, pode-se observar que a fração acetato de etila apresentou o melhor resultado dentre as três frações testadas, pois apresentou menor DI_{50} , ou seja, necessitou de uma menor dose para inibir 50% da espessura da orelha provocada pelo edema. Pode-se observar também que o valor de IM obtido para esta fração foi semelhante ao obtido com a dexametasona, o composto antiinflamatório utilizado padrão. Observando os resultados, verifica-se um alto potencial antiinflamatório presente nas frações obtidas através do extrato bruto, sugerindo a continuação do estudo para elucidação dos possíveis mecanismos de ação.

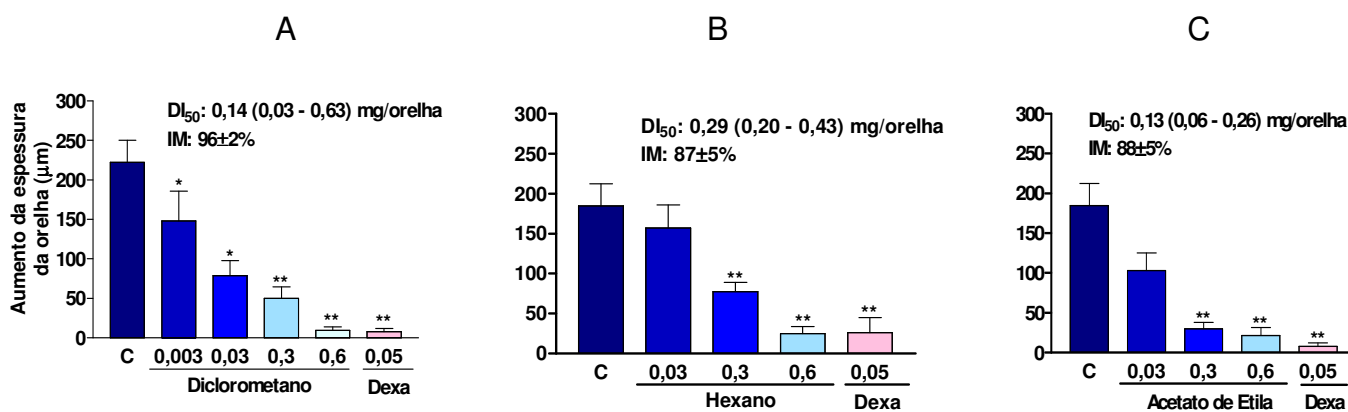


Figura 42. Efeito das frações da *E. brasiliensis*, Diclorometano (A), Hexano (B) e Acetato de etila (C), e da dexametasona (dexa) administrados topicamente no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 4-8 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle (C). Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. DI_{50} : dose inibitória 50%. IM: inibição máxima do edema.

Na gráfico da figura 43 estão apresentados os resultados obtidos pela aplicação dos compostos fenólicos quercetina, catequina e galocatequina, extraídos da fração acetato de etila, na orelha de camundongos. Os compostos foram aplicados apenas na dose de 0,6 mg/orelha, de onde foi extraído o dado de inibição máxima. Como não foram aplicados em mais de uma dose, não existem dados de DI_{50} para estes compostos. A inibição máxima (IM) obtida para estas amostras foi de $61 \pm 5\%$, $66 \pm 2\%$ e $37 \pm 9\%$ do edema provocado pela aplicação do óleo de cróton, respectivamente.

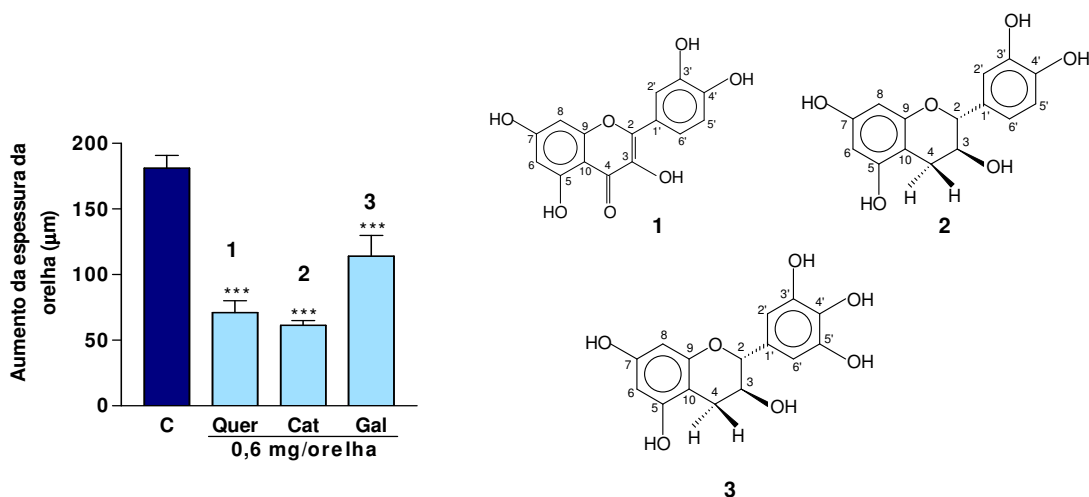


Figura 43. Efeito dos compostos isolados da fração acetato de etila da *E. brasiliensis* administrados topicamente no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 4-6 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle, *** $P < 0,001$. Quer (1): quercetina; Cat (2): catequina; Gal (3): galocatequina.

Como mencionado anteriormente, o gênero *Eugenia* é rico em compostos fenólicos, como catequinas e flavonóides. Estes compostos foram isolados de muitas espécies de *Eugenia*, como *Eugenia jambolana* (TIMBOLA et al 2002), *E. jambos* (SLOWING, CARRETERO e VILLAR, 1994; SRIVASTAVA, SHAW e KULSHRESHTHA, 1995) *Eugenia edulis* (HUSSEIN et al., 2003) e outras. Devido ao alto conteúdo de compostos fenólicos, estas espécies possuem atividades biológicas interessantes, incluindo antioxidante (EINBOND et al., 2004), antiinflamatória e inibidora da xantina oxidase, enzima relacionada à patologia da artrite (THEODULOZ et al., 1988; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987). O flavonóide quercetina, por exemplo, tem sido sugerido como modulador da resposta inflamatória em vários modelos e exerce muitas funções farmacológicas, como prevenção de tumores, inibição de fosfolipase A₂, proteínas quinase e outros efeitos (MAMANI-MATSUDA et al., 2006; PAWLIKOWSKA-PAWLEGA et al., 2007). Catequinas também apresentam efeito antiinflamatório através de vários mecanismos (SUZUKI et al., 2007).

4.4.4.2. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico

O ácido araquidônico é um precursor prostanóide, sendo convertido a mediadores da inflamação pelas enzimas lipooxigenase e ciclooxigenase. A aplicação tópica de ácido araquidônico (AA) provoca a rápida produção de

prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios, alcançando o pico de produção em 15 minutos (GÁBOR, 2000; CARLSON et al., 1985). Isto provoca uma rápida e intensa resposta inflamatória na orelha dos camundongos, pois estes mediadores promovem vasodilatação local, aumento da permeabilidade vascular e podem sinergicamente participar na produção de edema. Esta resposta pode ser bloqueada por inibidores da lipooxigenase (YOUNG et al., 1984; DE YOUNG et al., 1989).

Da mesma maneira que o controle positivo utilizado no experimento, a indometacina (inibidor da ciclooxigenase/ lipooxigenase, na dose de 1,0 mg/orelha), a aplicação do extrato hidroalcoólico resultou em uma significativa inibição dose-dependente no edema induzido pelo ácido araquidônico na orelha dos camundongos. O valor estimado da DI_{50} para o extrato bruto foi de 1,94 (1,24 – 3,03) mg/orelha. O percentual IM foi de $60 \pm 7\%$, em comparação com a indometacina, que reduziu o edema em $84 \pm 5\%$ (figura 44).

Existem diferenças entre o mecanismo de resposta inflamatória induzido pelo AA e pelo óleo de cróton. Inibidores da fosfolipase A_2 e ciclooxigenase têm pouco ou nenhum efeito sobre o edema induzido pelo AA, mas são bastante efetivos contra a inflamação causada pelo óleo de cróton (SANCHEZ e MORENO, 1999; OTUKI, PIETROVSKI e CABRINI, 2005). Sendo assim, o extrato bruto de *Eugenia brasiliensis* parece atuar como inibidor do edema e inflamação local através de diferentes mecanismos.

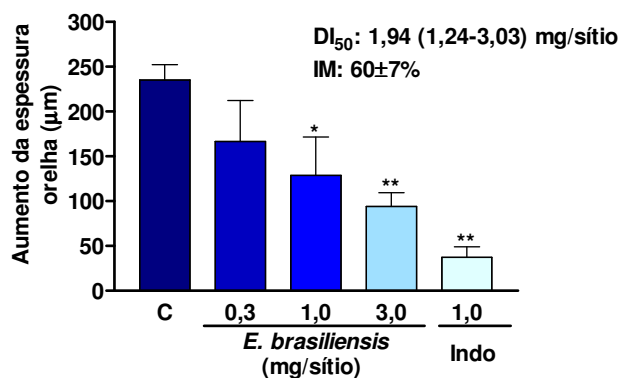


Figura 44. Efeito do extrato da *E. brasiliensis* e da indometacina (indo) administrados topicamente no edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (2 mg/orelha). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 4-7 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle (C). Indo: indometacina. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. DI_{50} : dose inibitória 50 %. IM: inibição máxima do edema.

4.4.4.3. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase tecidual

A enzima mieloperoxidase (MPO) é uma enzima produzida por células de defesa, principalmente em neutrófilos, estando presente também em monócitos. Nos neutrófilos, é armazenada em grânulos, e liberada durante a fagocitose. Esta enzima é um marcador indireto da presença de neutrófilos, resultado da infiltração destas células no tecido inflamado (WINTERBOURN, VISSERS e KETTLE, 2000; LAU e BALDUS, 2006). Portanto, a diminuição dos níveis de MPO indica a diminuição da atividade inflamatória.

Como pode ser observado no gráfico a seguir (figura 45), o extrato bruto hidroalcoólico apresentou IM de 85 ± 6 % da atividade enzimática da MPO, enquanto a dexametasona, usado como controle positivo, inibiu em 85 ± 6 % a atividade enzimática. Este resultado confirma a atividade antiinflamatória do extrato de *E. brasiliensis*, e sugere que este diminui a migração de células de defesa, como os neutrófilos, por exemplo, para o tecido inflamado. Esta ação é interessante devido ao fato de que a acumulação de neutrófilos é um dos estágios críticos de doenças inflamatórias, como a dermatite (SANCHEZ e MORENO, 1999; SCHAERLI et al., 2004; OTUKI, PIETROVSKI e CABRINI, 2006).

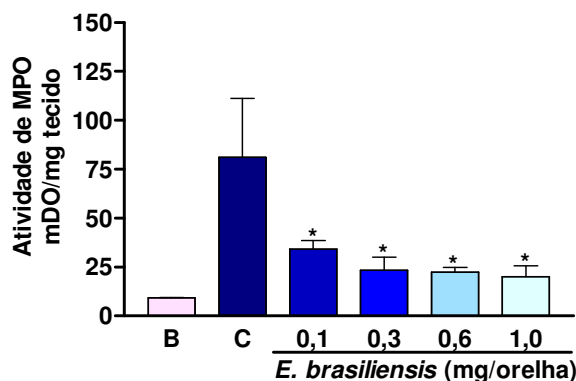


Figura 45. Efeito do extrato hidroalcoólico da *E. brasiliensis* administrado topicamente sobre a atividade da enzima mieloperoxidase induzida pelo óleo de cróton. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 4-6 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle (C) e B representa o grupo sem tratamento. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Os compostos isolados da fração acetato de etila também demonstraram inibir a migração celular. Quercetina, catequina e galocatequina apresentaram IM da atividade

enzimática em $81 \pm 5 \%$, $73 \pm 6 \%$, e $76 \pm 6\%$ (figura 46), indicando que estes compostos participam na atividade antiinflamatória do extrato bruto e fração acetato de etila de *E. brasiliensis*.

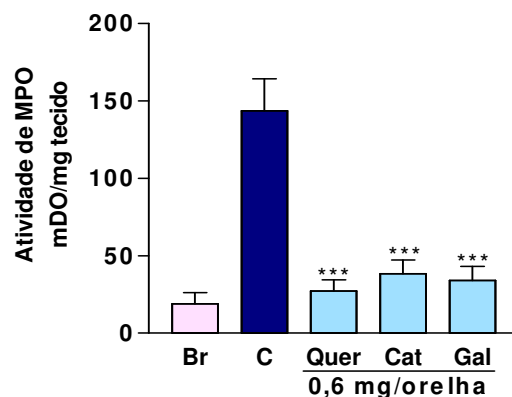


Figura 46. Efeito dos compostos isolados da fração acetato de etila de *E. brasiliensis* administrados topicamente sobre a atividade da enzima mieloperoxidase. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 4-6 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle (C) e Br representa o grupo sem tratamento. Diferença significativamente do grupo controle, *** $P < 0,001$.

4.4.4.4. Análise histológica

Conforme mostra a figura 47 - B, 24 h após a aplicação do óleo de cróton, os cortes histológicos das orelhas dos camundongos demonstram hiperplasia, aumento da espessura da orelha, intensa infiltração celular (polimorfonucleares) na derme, que pode ser observado pelo número dos pontos arroxeados na figura, além de edema, causado pela dilatação dos vasos sangüíneos, quando comparado ao animal que não recebeu o óleo de cróton (figura 47- A). Estes eventos foram drasticamente reduzidos pela aplicação tópica do extrato bruto hidroalcoólico de *E. brasiliensis* (0,6 mg/orelha) (figura 47 - C), bem como o controle positivo usado no experimento, a dexametasona (0,05 mg/orelha) (figura 47 - D). Confirmando os resultados anteriores, a análise histológica demonstrou que o extrato bruto de *E. brasiliensis* reduziu a hiperplasia, diminuiu a dilatação dos vasos sangüíneos e a migração de células inflamatórias.

Este estudo confirma o efeito antiinflamatório do extrato bruto, frações hexano, diclorometano e acetato de etila de *E. brasiliensis*, dando suporte ao uso popular como antiinflamatória e no tratamento de problemas como a artrite. Todas as frações testadas apresentaram ação antiedematogênica, sendo a fração acetato de etila a mais ativa e

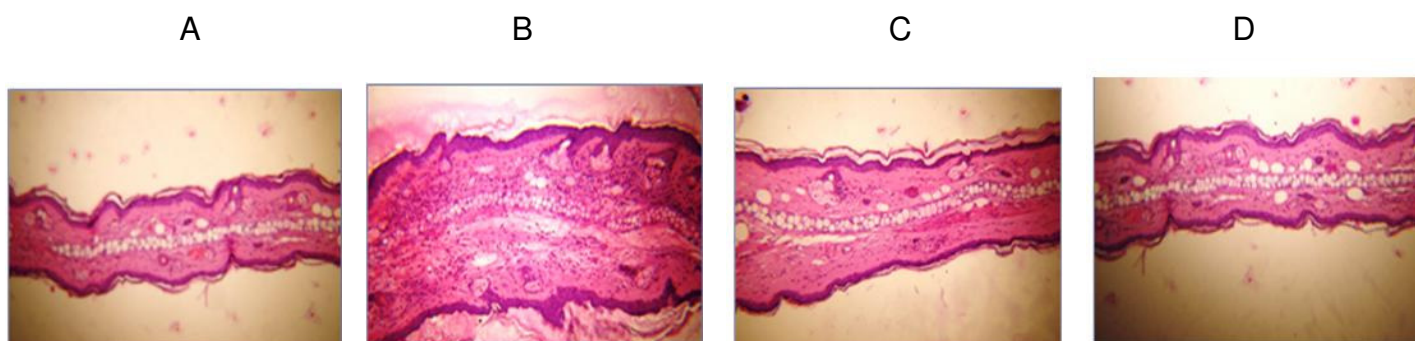


Figura 47. Fotos representativas de cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x) 24 h após a aplicação de óleo de cróton. (A) animal tratado com veículo (acetona), (B) controle (óleo de cróton), (C) extrato *E. brasiliensis* (0,6 mg/orelha), (D) dexametasona (0,1 mg/orelha).

os compostos fenólicos isolados desta fração contribuem para a atividade antiinflamatória tópica desta planta. Estes resultados abrem a possibilidade de mais estudos para a identificação de outros compostos bioativos nesta planta, bem como nas outras espécies utilizadas neste trabalho, porém não testadas, e a validação do seu uso em doenças inflamatórias da pele.

5. Conclusões

Ao término do trabalho, foi possível obter as seguintes conclusões:

1. Em relação ao estudo fitoquímico:

- A análise fitoquímica preliminar dos extratos brutos de *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora* permitiu a caracterização das seguintes classes de compostos: fenóis, taninos hidrolisáveis, taninos condensados, antocianinas e antocianidinas, chalconas e auronas, flavonas e flavonóis, xantonas, catequinas, esteróides livres, triterpenos livres e saponinas. A presença de flavononóis e resinas foi detectada apenas em *E. brasiliensis*, e em *E. umbelliflora* foi detectada a presença de heterosídeos cianogênicos.

- O estudo fitoquímico de *E. beaurepaireana* levou ao isolamento de uma mistura dos triterpenos α -amirina e β -amirina juntamente com o esteróide β -sitosterol da fração insolúvel. Da fração acetato de etila foi isolado e identificado o ácido gálico. Todos os compostos isolados são inéditos na espécie.

- O estudo fitoquímico da espécie *E. brasiliensis* levou ao isolamento, na fração insolúvel, de uma mistura de α -amirina e β -amirina e da betulina, todos triterpenos. Este último foi isolado também nas frações hexano e diclorometano. Da fração diclorometano foi isolado o ácido 29-hidroxi-oleanólico ou ácido mesembriantemoidigênico, pela primeira vez descrito na família Myrtaceae. Da fração acetato de etila de *E. brasiliensis* foi isolado o flavonóide quercetina, juntamente com os compostos catequina e galocatequina.

- A análise da fração acetato de etila de *E. brasiliensis* através de eletroforese capilar permitiu caracterizar a presença de flavonóides glicosilados derivados da quercetina e miricetina, e provavelmente ligados também á unidades de ácido gálico. Estes três compostos também foram identificados na forma livre na fração.

2. Em relação as modificações estruturais realizadas na estrutura da betulina:

- O isolamento do triterpeno betulina de *E. brasiliensis* em quantidade suficiente (805 mg) permitiu a realização de modificações estruturais, utilizando para isso os grupos funcionais hidroxila presentes nas posições 3 e 28 de sua estrutura. Foram obtidos dois derivados oxidados nestas posições, através de oxidação com PCC e seis derivados esterificados, através de reações com cloretos de acila correspondente.

- A atividade antibacteriana dos derivados obtidos foi testada contra as bactérias gram (+) *S. aureus* e gram (-) *E. coli* e *P. aeruginosa*. Alguns compostos mostraram atividade melhorada em relação ao composto de partida betulina, especialmente os derivados oxidados e acetilados nas posições 3 e 28, que mostraram atividade interessante contra as bactérias gram (-). Os derivados não foram ativos contra *S. aureus*, uma bactéria gram (+).

3. Em relação ao estudo dos óleos essenciais de *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora*:

- Foram extraídos os óleos essenciais das folhas de *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E.umbelliflora*, com rendimentos (p/v) de 0,07%, 0,20% e 0,33%, respectivamente. Os óleos foram submetidos à análise por CG-EM, e foram identificados no total 65 compostos, representando 83,053 a 93,385% dos constituintes. O sesquiterpenóides constituíram a fração dominante desses óleos. Dois dos óleos apresentaram baixas quantidades de monoterpenos, o de *E. brasiliensis* (14,682%) e *E. beaurepaireana* (6,998%). O óleo de *E. umbelliflora* apresentou 34,063% de monoterpenos. Todos os óleos analisados mostraram perfis quantitativos diferentes dos já relatados na literatura.

- Para o óleo de *E. brasiliensis*, os sesquiterpenos foram oxigenados foram os compostos mais presentes, e seus componentes majoritários foram os álcoois sesquiterpênicos espatulenol (12,60 %), τ -cadinol (8,68%), α -cadinol (6,64 %) e 1-*epi*-cubanol (6,27 %). Dentre os monoterpenos, os presentes em maior quantidade foram 1,8-cineol (3,22%) e alfa-pineno (2,89%).

- Para *E. beaurepaireana*, os hidrocarbonetos sesquiterpênicos foram os prevalentes, sendo que os compostos majoritários encontrados no óleo essencial desta espécie foram os sesquiterpenos β -cariofileno (7,97%), biciclogermacreno (7,24 %), valenceno (5,46 %), Δ -cadineno (4,87 %) e viridiflorol (4,90 %), este último um álcool sesquiterpênico. Dentre os monoterpenos mais presentes nesta espécie foram encontrados o alfa-pineno (4,14 %) e alfa-cubebeno (1,38 %), ambos hidrocarbonetos.

- Para o óleo essencial de *E. umbelliflora*, os compostos majoritários encontrados foram o viridiflorol (17,74 %), aromadendreno (6,90%) e ledol (4,72 %), todos

sesquiterpenos, além de α -pineno (11,17 %) e β -pineno (13,17%), hidrocarbonetos monoterpênicos.

- A atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi testada contra as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Todas as amostras testadas foram ativas, com destaque para os óleos essenciais de *E. brasiliensis* e *E. umbelliflora* que mostraram potente atividade contra *S. aureus*, apresentando valores de CIM = 0,15 μ L/mL.

4. Em relação ao estudo das atividades biológicas dos extratos e frações de *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora*:

- Os extratos brutos das folhas e dos caules, bem como suas frações, obtidas através de fracionamento líquido-líquido foram avaliadas em alguns modelos de atividade biológica. Um dos testes realizados foi a avaliação da letalidade em larvas de *A. salina*, onde a espécie mais ativa foi *E. umbelliflora*.

- A atividade antioxidante dos extratos e frações das três espécies foi avaliada, juntamente com o seu conteúdo de fenóis e flavonóides. Nos testes de avaliação da captura do radical livre DPPH e de avaliação do potencial redutor, foi observada uma tendência no aumento da atividade diretamente relacionada ao aumento do conteúdo de fenóis nos extratos e frações. Para o teste de inibição da peroxidação lipídica, os resultados foram mais bem distribuídos entre as frações, sendo mais ativas as frações mais polares das folhas de *E. beaurepaireana*.

- A atividade antibacteriana dos extratos brutos e frações das espécies de *Eugenia* foram avaliadas contra as bactérias *S. aureus* e MRSA (Gram (+)), *E. coli* e *P. aeruginosa* (Gram -). Os extratos apresentaram atividade em vários níveis, com destaque para o extrato bruto e frações das folhas de *E. umbelliflora*, que mostraram atividade antibacteriana bastante potente contra as bactérias Gram (+), semelhante ao controle positivo oxacilina, utilizado no teste. Apesar desta espécie também ser a mais ativa contra *A. salina*, foi encontrada pouca correlação entre os resultados destes dois ensaios.

- A atividade antifúngica dos extratos brutos e frações das espécies de *Eugenia* foi avaliada contra as leveduras *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida krusei* (ATCC 200298), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 22019) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32608). O

extrato bruto do caule de *E. brasiliensis* mostrou maior atividade dentre todas as amostras testadas, contra as leveduras *C. albicans* e *C. neoformans*.

- A atividade antiinflamatória tópica do extrato bruto de *E. brasiliensis* foi avaliada nos modelos de edema de orelha provocado pela aplicação do óleo de cróton e de ácido araquidônico. Os animais foram submetidos à análise da atividade da enzima mieloperoxidase tecidual e também foram realizados cortes histológicos dos tecidos inflamados. Foi observado que nas doses de 0,1 a 1,0 mg de extrato/orelha, o extrato bruto de *E. brasiliensis* inibiu o edema provocado pelo óleo de cróton, e nas doses de 3,0 mg de extrato/orelha, inibiu o edema provocado pelo ácido araquidônico. Foi observada uma inibição significativa da atividade da enzima mieloperoxidase. No corte histológico, foi possível observar a diminuição da espessura da orelha, bem como a diminuição da migração de leucócitos polimorfonucleares no tecido, o que representa um efeito antiinflamatório.

- As frações hexano, diclorometano e acetato de etila, bem como os compostos fenólicos quercetina, catequina e galocatequina, extraídos desta última, foram avaliados nos modelos de edema induzido pela aplicação do óleo de cróton e atividade da mieloperoxidase tecidual. A fração mais ativa foi a acetato de etila, o que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela presença dos compostos isolados. Dentre os compostos testados, o mais ativo foi a catequina.

- Os resultados encontrados no trabalho permitem concluir que as espécies do gênero *Eugenia* estudadas apresentam metabólitos secundários interessantes, bem como grande potencial biológico, o que permite a continuação do estudo em várias frentes de trabalho. Uma das perspectivas seria o re-isolamento de uma quantidade maior do triterpeno betulina e preparação de novos derivados e o estudo do mecanismo de ação e compostos responsáveis pela atividade antibacteriana de *E. umbelliflora* e também dos óleos essenciais das três espécies.

6. Metodologia

6.1. MATERIAIS UTILIZADOS

Os solventes utilizados na partição líquido-líquido, cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada, bem como reagentes utilizados para modificação estrutural foram de grau PA.

Os extratos obtidos através das macerações, frações e compostos sintetizados foram submetidos 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 analisadas através de cromatografia em camada delgada (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.

6.2. EQUIPAMENTOS

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 ou filme em NaCl. Os valores foram registrados em centímetros⁻¹ (cm⁻¹). As determinações de absorção na região do UV-Vis foram realizadas em espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Lambda 2S.

Os espectros de ressonância magnética de hidrogênio e de carbono 13 foram obtidos em espectrofotômetros Bruker AC-200F, operando em 200 MHz para o espectro de ¹H e 50 MHz para ¹³C e Varian, 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 = singleto, d = duplete, t = tripleto e m = multiplete.

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu CG-14B, com detector de ionização em chama (FID) (290° C), e coluna capilar DB-1 (30 m x 0,25 mm), injetor split/splitless (300° C). O processamento e conversão dos dados foram realizados através de software Microquímica.

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) foram realizadas no laboratório de cromatografia do IPTB – FURB, em Blumenau, em cromatógrafo gasoso Varian CP 3800, acoplado ao espectrômetro de

massas Saturn® 2000. Os componentes foram separados por coluna CP Sil 8 CB (30 m x 0,25 mm, filme de 0,25 µm); temperatura do injetor: 250° C. Como auxílio na identificação dos componentes foi utilizada a biblioteca de espectros de massa NIST® 98.

As análises por eletroforese capilar foram realizadas no Departamento de Química da UFSC, em equipamento Agilent CE^{3D}, com detector diode-array (DAD) on-column e temperatura controlada de 25 °C. As amostras foram injetadas no equipamento através de injeção hidrodinâmica a 50 mbar/4 s. Foram utilizados capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) com dimensões de 45 cm de comprimento total, 36,5 cm de tamanho efetivo, 50 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. No início do dia de trabalho, o equipamento foi condicionado com a injeção de soluções de NaOH 1 M (5 minutos), água deionizada (5 minutos) e solução eletrolítica (10 minutos). No início das análises, o aparelho foi novamente reconicionado com solução eletrolítica (2 minutos).

6.3. MATERIAL VEGETAL

O material vegetal a ser utilizado durante o trabalho foi coletado nos seguintes locais:

- *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia beaurepaireana*: foram coletados no município de Santo Amaro da Imperatriz, em julho de 2004.
- *Eugenia umbelliflora*: foi coletada nas imediações do campus da UFSC, em outubro de 2004.

As amostras foram identificadas pelo Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg, Departamento de Botânica, UFSC. As exsicatas foram depositadas no herbário FLOR, no Departamento de Botânica, UFSC, sob os números FLOR – 34675, 34674 e 17890, respectivamente.

As partes aéreas obtidas nas coletas foram separadas em folhas e galhos, que no trabalho foram chamados de caules. A porção das folhas foi dividida em duas partes: a maior parte do material foi destinada à obtenção do extrato bruto hidroalcoólico e uma segunda parte foi encaminhada para a extração do óleo essencial, ainda com o material a fresco. O resumo dos procedimentos adotados no trabalho está mostrado na figura 48.

Os caules e a porção das folhas destinada à obtenção dos extratos foram submetidos à secagem à 40° C em estufa com circulação de ar. Após a secagem, o material foi moído em moinho de facas.

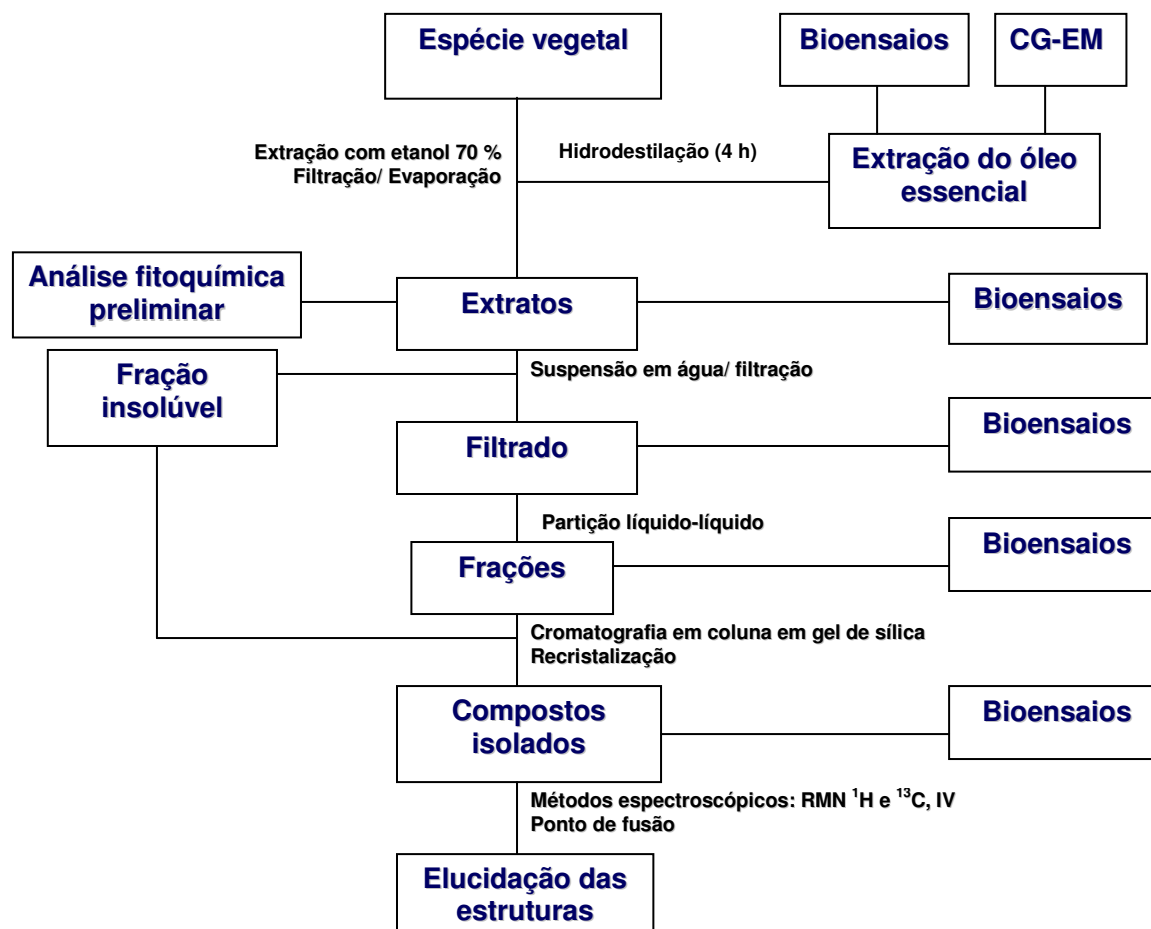


Figura 48. Fluxograma dos procedimentos adotados no trabalho.

6.4. ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS ESPÉCIES DE *EUGENIA*

6.4.1. Preparação dos extratos vegetais

Os galhos e folhas secos e moídos das espécies foram macerados separadamente em etanol 70 % durante 7 dias. Após a extração, os extratos foram filtrados e o procedimento foi repetido mais duas vezes. Os extratos resultantes de três macerações foram então reunidos e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, em banho-maria com temperatura controlada de 60°C durante todo o procedimento. Estes extratos foram encaminhados para os procedimentos de fracionamento e isolamento de seus constituintes ativos, bem como para a avaliação da sua atividade biológica.

6.4.2. Análise fitoquímica preliminar dos extratos brutos

A fim de identificarem-se as classes de compostos presentes nos extratos brutos preparados a partir das folhas, estes foram submetidos a reações colorimétricas de acordo com o preconizado por WHO (1984) e MATOS (1997). Foram realizadas análises para a pesquisa de heterosídeos cianogênicos, fenóis, taninos, flavonóides, antocianinas, antocianidinas e leucoantocianinas, catequinas, xantonas, esteróides e triterpenóides, saponinas, ácidos fixos, resina, alcalóides, bases quaternárias, quinonas, antranóis e cumarinas.

6.4.3. Procedimentos de fracionamento dos extratos vegetais

Os extratos, depois de concentrados, foram ressuspensos em água. Os extratos brutos das folhas de *E. beaurepaireana* e *E. brasiliensis*, através deste processo, originaram um precipitado que foi chamado de fração insolúvel. Após ser separado o precipitado, através de filtração, estes extratos, bem como os extratos do caule, foram então fracionados através de partição líquido-líquido, com solventes de diferentes polaridades, como hexano, diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (BuOH), segundo o esquema demonstrado na figura 13, para dar origem às diferentes frações.

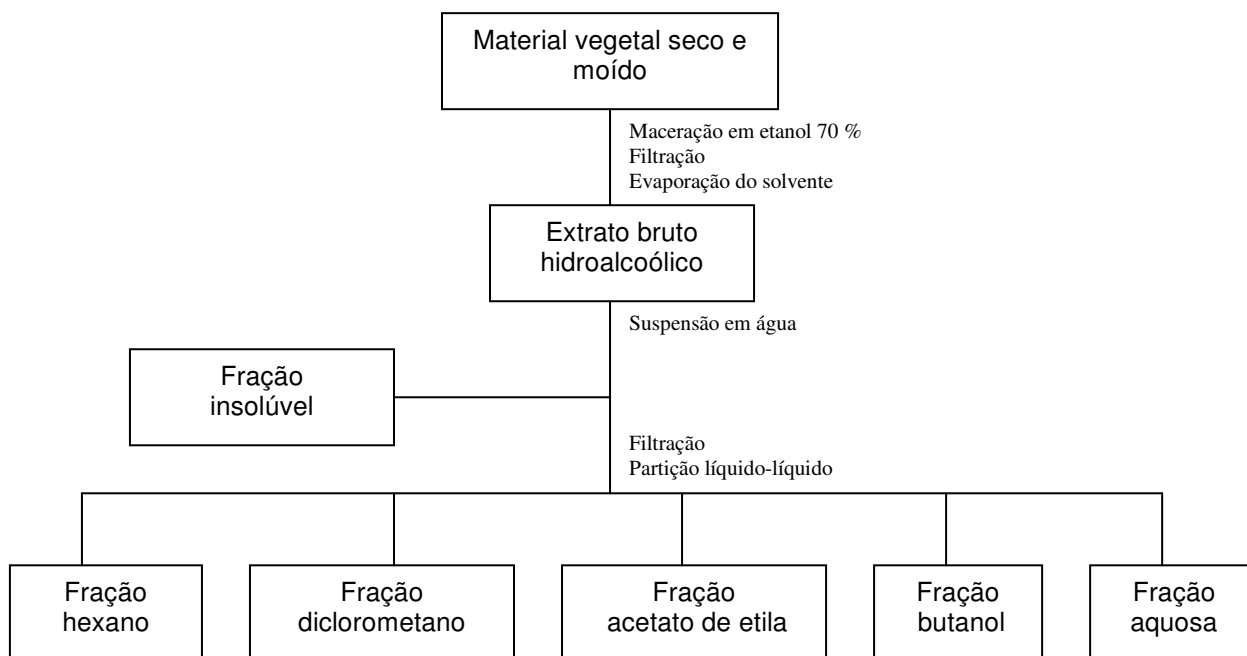


Figura 49. Procedimento de fracionamento adotado para os extratos vegetais.

Após o particionamento dos extratos, as frações obtidas neste processo foram concentradas em rota-evaporador sob pressão reduzida até a completa eliminação do solvente. As frações 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:EtOH.

As subfrações obtidas das colunas foram analisadas através de cromatografia em camada delgada (CCD), e agrupadas após avaliação do seu tempo de retenção (Rf), sua característica após a exposição em radiação ultravioleta e coloração após pulverização com reveladores como anisaldeído sulfúrico (WAGNER e BLADT, 1996), vapores de iodo, cloreto férrico (5 % em EtOH) e sulfato de cério (2% em H₂SO₄ 2 N). As subfrações 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 propriedades físicas, como o ponto de fusão e do uso de técnicas espectroscópicas, como infravermelho (IV), ultravioleta (UV), espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C e técnicas como DEPT, HETCOR e COSY. No caso de substâncias conhecidas, o uso de padrões cromatográficos, em cromatografia em camada delgada ou cromatografia gasosa, bem como a consulta à literatura para comparação de dados espectroscópicos auxiliou na identificação.

Todo o processo de extração e fracionamento foi monitorado através de ensaios biológicos usando modelos *in vitro* e *in vivo*, que foram realizados no próprio laboratório de fitoquímica, como a avaliação da atividade antioxidante e o teste de letalidade em larvas de *Artemia salina*, como serão descritos posteriormente. Ensaios de atividade antibacteriana, antifúngica e ensaios farmacológicos *in vivo*, como atividade antiinflamatória, foram realizados através da colaboração com outros departamentos e grupos de pesquisa. Deste modo, os extratos, frações e compostos obtidos em quantidade suficiente foram encaminhados para avaliação da atividade biológica (descrito no item 5.7.).

6.4.4. Análise da fração acetato de etila das folhas de *E. brasiliensis* através de eletroforese capilar.

As análises por eletroforese capilar foram realizadas no Departamento de Química da UFSC, sob a supervisão do Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke.

A fração acetato de etila das folhas de *Eugenia brasiliensis* foi dissolvida em metanol, na concentração de 2 mg/mL, e injetada diretamente no equipamento de eletroforese capilar. A mesma fração foi analisada também após um procedimento de hidrólise ácida, que consistiu no tratamento de 300 µL da solução amostra com 60 µL de HCl 6 M, sob aquecimento de 95 °C, durante 45 minutos. Após, a mistura foi seca com fluxo de gás nitrogênio, e redissolvida em metanol para completar volume final de 300 µL.

Análises em paralelo foram realizadas também com padrões de compostos fenólicos como o ácido gálico, e os flavonóides rutina, galangina, miricetina, quercetina. Estes compostos foram dissolvidos em metanol na concentração de 20 mg/L, e também aplicados no equipamento de eletriforese capilar.

6.5. MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL E OBTENÇÃO DE DERIVADOS DA BETULINA

O triterpeno betulina (lup-20(29)-eno, 3β, 28-diol), utilizado como material de partida para a obtenção de derivados, foi obtido da espécie *Eugenia brasiliensis* a partir das frações hexano, diclorometano e fração insolúvel como descrito no estudo fitoquímico da espécie (páginas 39 - 42). A betulina foi submetida a reações de oxidação e esterificação, as quais foram acompanhadas através de cromatografia em camada delgada, usando como padrão de comparação o composto de partida. Os derivados obtidos foram identificados através de seu ponto de fusão e espectros de IV e RMN de hidrogênio.

6.5.1. Obtenção dos derivados oxidados da betulina

Os derivados oxidados foram obtidos através de reações utilizando o clorocromato de piridinium (PCC). Após cinco minutos, a reação de oxidação foi interrompida e o produto obtido foi o ácido betulínico (ácido lup-20(29)-eno, 3β-ol, 28-óico) (**60**). A reação foi repetida, durante um tempo maior (1,5 h), de onde foi obtido o ácido betulônico (ácido lup-20(29)-eno, 3-oxo, 28-óico) (**61**). A metodologia para obtenção dos derivados está descrita a seguir.

6.5.1.1. Obtenção do ácido betulínico (Ácido lup-20(29)-eno, 3β-ol, 28-óico) (**60**).

A uma solução de betulina (43,5 mg, 0,1 mmol) em CH₂Cl₂ (2 mL) foi adicionado PCC (33 mg, 0,153 mmol) sob temperatura ambiente. Após agitação durante 5 minutos, sílica gel e éter etílico foram sucessivamente adicionados à mistura, que foi mantida sob agitação por alguns minutos. A mistura foi filtrada e lavada com éter etílico (Et₂O),

e o solvente foi removido em evaporador rotatório a vácuo. A mistura foi purificada através de cromatografia em coluna flash em gel de sílica, usando como eluente uma mistura de hexano-acetato de etila, (75:25), obtendo-se o composto **60** (30 mg, 67 %) como um sólido branco. p.f. 298 – 300 °C (lit. 305-307 °C) IV (KBr) cm^{-1} : 3418, 2939, 1688, 1454. ^1H NMR (400 MHz) δ : 0,75 (3H, d, $J = 3,1$, H24), 0,82 (3H, s, H25), 0,93 (3H s, H23), 0,96 (6H, s, H27), 1,02 (3H, s, H26), 1,69 (3H, s, H30), 2,87 (1H, td, $J=11,0, 5,5$ Hz), 3,20 (1H, dd, $J=11,0, 5,5$ Hz, H3), 4,68 (1H, s, H29a), 4,74 (1H, s, H29b).

6.5.1.2. Obtenção do ácido betulônico (Ácido lup-20(29)-eno, 3-oxo, 28-óico) (61).

A uma solução de betulina (39 mg, 0,09 mmol) em CH_2Cl_2 (2 mL) foi adicionado PCC (59,25 mg, 0,275 mmol) sob temperatura ambiente. Após agitação durante 1,5 h, sílica gel e Et_2O foram sucessivamente adicionados à mistura, que foi mantida sob agitação por alguns minutos. A mistura foi filtrada e lavada com Et_2O , e o solvente foi removido em evaporador rotatório a vácuo. A mistura foi purificada através de cromatografia em coluna flash em gel de sílica, usando como eluente uma mistura de hexano- acetato de etila, (75:25), obtendo-se o composto **61** (27,3 mg, 68 %) como um sólido branco. p.f. 235-238 °C (lit. 243 -244 °C) IV (KBr) cm^{-1} : 2941, 1703, 1456, 1381. ^1H NMR (400 MHz) δ : 0,93 (3H, s, H26), 0,97 (3H, s, H25), 0,98 (3H, s, H27), 1,01 (3H, s, H24), 1,03 (3H, s, H23), 1,69 (3H, s, H30), 4,61 (1H, s, H29a), 4,73 (1H, s, H29b).

6.5.2. Obtenção dos derivados esterificados da betulina

Os derivados esterificados da betulina foram obtidos através do tratamento deste composto, dissolvido em piridina ou trietilamina com anidrido acético e cloretos de acila correspondentes. A metodologia para obtenção dos derivados está descrita a seguir.

6.5.2.1. 28-acetato de betulina- (Lup-20(29)-eno,-3 β -ol,28-acetato) (62). A uma solução de betulina (49,4 mg, 0,112 mmol) em diclorometano (1 mL) foi adicionado trietilamina (34,0 mg, 0,343 mmol) e anidrido acético (16 mg, 0,157 mmol) a 0 °C. A mistura foi aquecida lentamente á temperatura ambiente. Após, agitou-se a mistura durante 22 h. A mistura foi diluída com Et_2O , e a solução orgânica lavada com solução saturada de NH_4Cl . A fase aquosa foi extraída novamente com Et_2O e fase orgânica foi lavada com uma solução de NaCl . A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como eluente hexano – acetato de etila (94:6) para a obtenção do composto **62** (42,7 mg,

78,9%) como um sólido branco. p.f. 198 – 202 °C (lit. 210 – 212 °C). IV (KBr) cm^{-1} : 3557, 2957, 1728, 1647. ^1H NMR (400MHz) δ : 0,76 (3H, s, H24), 0,82 (3H, s, H25), 0,96 (3H, s, H23), 0,97 (3H, s, H27), 1,03 (3H, s, H26), 1,68 (3H, s, H30), 2,07 (3H, s, H acetil), 2,44 (2H, m, H19), 3,19 (1H, dd, $J_1=11,2$, $J_2=4,6$ Hz, H3), 3,85 (1H, d, $J=11,8$ Hz, H28a), 4,24 (1H, d, $J=11,8$ Hz, H28b), 4,59 (1H, s, H29a), 4,69 (1H, s, H29b).

6.5.2.2. 3,28-diacetato de betulina- (Lup-20(29)-eno, 3,28-diacetato) (63). A uma solução de betulina (54 mg, 0,121 mmol) em piridina (1,3 mL) foi adicionado DMAP em quantidades catalíticas e anidrido acético (36,95 mg, 0,360 mmol) a 0°C, deixando aquecer lentamente até a temperatura ambiente. Após agitação durante 5 h, a piridina foi removida em evaporador rotatório a vácuo. O resíduo foi extraído com CH_2Cl_2 e foi purificado por cromatografia em coluna em gel de sílica, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila (94:6), de onde foi obtido o composto **63** (41,8 mg, 65,05 %) como um sólido branco. p.f. 205 - 207 °C (lit. 216 – 218 °C). IV (KBr) cm^{-1} : 2947, 1737, 1646, 1458. ^1H NMR (400 MHz) δ : 0,76 (3H, s, H24), 0,78 (3H, s, H25), 0,90 (3H, s, H23), 0,96 (3H, s, H27), 1,19 (3H, s, H26), 1,62 (3H, s, H30), 1,98 (3H, s, H acetil), 2,07 (3H, s, H acetil), 2,37 (1H, m, H19), 3,79 (1H, d, $J=10,8$ Hz, H28a), 4,18 (1H, d, $J=10,8$ Hz, H28b), 4,40 (1H, m, H3), 4,53 (1H, s, H29a), 4,62 (1H, s, H29b).

6.5.2.3. 3,28-dibutanoato de betulina (Lup-20(29)-eno, 3,28-dibutanoato) (64). A uma solução de betulina (25 mg, 0,056 mmol) em piridina (2 mL) foi adicionado cloreto de butanoíla (12 mg, 0,113 mmol) sob temperatura ambiente. Após agitação durante 1,5 h, a mistura foi lavada com HCl 0,5 N e então extraída com CH_2Cl_2 . A fase orgânica foi extraída com solução saturada de NaHCO_3 . O resíduo orgânico foi evaporado a vácuo e purificado através de cromatografia em coluna flash em gel de sílica, usando como eluente uma mistura de hexano-acetato de etila, (4:1), obtendo-se o composto **64** (18,9 mg, 57,47 %) como um sólido branco. p.f. 206 - 210 °C. (lit. não encontrado). IV (KBr) cm^{-1} : 2946, 1732, 1652, 1462. ^1H NMR (400 MHz) δ : 0,84 (6H, s, H24, H25), 0,95 (3H, s, H23), 0,97 (3H, s, H27), 1,03 (3H, s, H26), 1,25 (6H, s, CH_3 terminal), 1,68 (3H, s, H30), 2,28 (4 H, m, CH_2 alfa carbonila), 2,46 (1H, m, H19), 3,85 (1H, d, $J=11,5$ Hz, H28a), 4,27 (1H, d, $J=11,5$ Hz, H28b), 4,48 (1H, m, H3), 4,59 (1H, s, H29a), 4,69 (1H, s, H29b).

6.5.2.4. 3,28-dihexanoato de betulina (Lup-20(29)-eno, 3,28-dihexanoato) (65). A uma solução de betulina (25 mg, 0,056 mmol) em piridina (2 mL) foi adicionado cloreto de hexanoíla (30 mg, 0,22 mmol) sob temperatura ambiente. Após agitação durante

1,5 h, a mistura foi lavada com HCl 0,5 N e então extraída com CH₂Cl₂. A fase orgânica foi então extraída com solução saturada de NaHCO₃. O resíduo orgânico foi evaporado a vácuo e purificado através de cromatografia em coluna flash em gel de sílica, usando como eluente uma mistura de hexano-acetato de etila, (3:1), obtendo-se o composto **65** (16,3 mg, 45,21 %) como um óleo transparente. IV (filme) cm⁻¹: 2947, 1735, 1654, 1443. ¹H NMR (400 MHz) δ: 0,75 (3H, s, H24), 0,82 (3H, s, H25), 0,97 (6H, s, H23, H27), 1,02 (3H, s, H26), 1,25 (6H, s, CH₃ terminal), 1,68 (3H, s, H30), 2,07 (2H, s), 2,17 (8H, s), 2,32 (4 H, m, CH₂ alfa carbonila), 3,87 (1H, d, J=10,7 Hz, H28a), 4,25 (1H, d, J=10,7 Hz, H28b), 4,47 (1H, m, H3), 4,58 (1H, s, H29a), 4,68 (1H, s, H29b).

6.5.2.5. 3,28-dioctanoato de betulina (Lup-20(29)-eno, 3,28-dioctanoato) (66). A uma solução de betulina (25 mg, 0,056 mmol) em piridina (2 mL) foi adicionado cloreto de octanoíla (46 mg, 0,282 mmol) sob temperatura ambiente. A mistura foi mantida sob aquecimento de 50 °C e agitação durante 1,5 h. A mistura foi então resfriada, lavada com HCl 0,5 N e extraída com CH₂Cl₂. A fase orgânica foi extraída com solução saturada de NaHCO₃. O resíduo orgânico foi evaporado a vácuo e purificado através de cromatografia em coluna flash em gel de sílica, usando como eluente uma mistura de hexano-acetato de etila, (8:2), obtendo-se o composto **66** (23,8 mg, 60,6 %) como um óleo amarelo claro. IV (filme) cm⁻¹: 2944, 1733, 1648, 1446. ¹H NMR (400 MHz) δ: 0,83 (3H, s, H24), 0,88 (3H, s, H25), 0,93 (3H, s, H23), 0,97 (3H, s, H27), 1,03 (3H, s, H26), 1,25 (3H, s, CH₃ terminal), 1,28 (3H, s, CH₃ terminal), 1,68 (3H, s, H30), 2,17 (s, 4 H) 2,30 (4 H, m, CH₂ alfa carbonila), 3,83 (1H, d, J=10,8 Hz, H28a), 4,25 (1H, d, J=10,8 Hz, H28b), 4,45 (1H, m, H3), 4,69 (1H, s, H29a), 4,74 (1H, s, H29b).

6.5.2.6. 3,28-didecanoato de betulina (Lup-20(29)-eno, 3,28-didecanoato) (67). A uma solução de betulina (25 mg, 0,056 mmol) em piridina (2 mL) foi adicionado cloreto de decanoíla (89,29 mg, 0,47 mmol) sob temperatura ambiente. A mistura foi mantida sob aquecimento de 50 °C e agitação durante 1.5 h. A mistura foi então resfriada, lavada com HCl 0,5 N e extraída com CH₂Cl₂. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO₃. O resíduo orgânico foi evaporado a vácuo e purificado através de cromatografia em coluna flash em gel de sílica, usando como eluente uma mistura de hexano-acetato de etila, (5:1), obtendo-se o composto **67** (20 mg, 47,20 %) como um óleo transparente. IV (filme) cm⁻¹: 2934, 1732, 1634, 1450. ¹H NMR (400 MHz) δ: 0,84 (3H, s, H24), 0,86 (3H, s, H25), 0,88 (3H, s, H23), 0,97 (3H, s, H27), 1,03 (3H, s, H26), 1,25 (3H, s, CH₃ terminal), 1,26 (3H, s, CH₃ terminal), 2,05 (2H, s) 2,17 (4 H, s),

2,17 (16H, s), 2,30 (4 H, m, CH₂ alfa carbonila), 3,85 (1H, d, J=11,2 Hz, H28a), 4,28 (1H, d, J=11,2 Hz, H28b), 4,47 (1H, m, H3), 4,59 (1H, s, H29a), 4,69 (1H, s, H29b).

6.6. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *E. BRASILIENSIS*, *E. BEAUREPAIREANA* E *E. UMBELLIFLORA*

A extração dos óleos essenciais foi realizada através da extração por arraste de vapor, em aparelho de Clevenger, como descrito por HOUGHTON e RAMAN (1998). Em um balão de fundo redondo, o material fresco a ser extraído foi adicionado de água, e aquecido até a fervura, durante 4 horas. O vapor, contendo o óleo, depois de condensado, foi recolhido em reservatório graduado preenchido com água. Após a destilação, a fase superior (óleo condensado), bem como a fase aquosa foram extraídas com éter etílico, secas com sulfato de sódio anidro e armazenadas sob refrigeração, em frasco de vidro protegido da luz, enquanto aguardaram as análises em CG-EM e avaliação da atividade antimicrobiana.

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) foram realizadas no laboratório de cromatografia do IPTB – FURB, em Blumenau, pelo químico Alberto Wisniewski Júnior, sob a supervisão do Prof. Dr. Edésio L. Simionatto. O óleo foi analisado em cromatógrafo gasoso Varian®CP 3800, acoplado ao espectrômetro de massas Saturn®2000. Os componentes foram separados por coluna CP Sil 8 CB (30 m x 0,25 mm, filme de 0,25 µm). Como gás de arraste foi usado hélio, com fluxo constante de 1 mL/minuto. Usou-se temperatura programada de 60° C/ 3 min, seguida do aumento de 5° C/ min até 220° C, durante 15 minutos; temperatura do injetor: 250° C. A identificação dos componentes foi baseada na biblioteca NIST® 98 e no cálculo dos índices de Kóvats para os compostos, juntamente com a comparação do seus espectros de massa com a literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram obtidos pela co-injeção com uma série de hidrocarbonetos lineares (C₁₀ – C₂₅) e calculados para cada composto a partir da fórmula:

$$IR = 100.Z + 100 (\log t'_{RX} - \log t'_{RZ}) / (\log t'_{RZ+1} - \log t'_{RZ})$$

Onde:

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

t'_{RX} = tempo de retenção do composto a ser calculado

t'_{RZ} = tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente inferior ao tempo de retenção do composto a ser calculado

t'_{RZ+1} = tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente superior ao tempo de retenção do composto a ser calculado

6.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DAS ESPÉCIES DE *EUGENIA*

6.7.1. Determinação da letalidade usando larvas de *Artemia salina* (TAS)

Os testes para determinação da letalidade usando larvas de *A. salina* foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC, sob a supervisão da Profa. Inês M.C. Brighente.

Para os bioensaios de letalidade em *A. salina*, utilizou-se a metodologia de MEYER *et al.* (1982), com pequenas modificações. A solução teste, preparada a partir de extratos brutos e frações das espécies estudadas, foi diluída em um solvente apropriado a fim de obterem-se concentrações de 10 a 1000 ppm. O meio para o cultivo das larvas de *A. salina* foi água salgada (3,8 g de sal marinho/ L de água). As larvas foram utilizadas nos ensaios 48 h após a eclosão, em fase náupilo. Aproximadamente 10 larvas de *A. salina* foram transferidas para placas de 24 poços, contendo 1 mL de mar artificial em cada poço, juntamente com a solução teste em diferentes concentrações (ppm). A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24 h da incubação das larvas com a solução teste. A dose letal necessária para matar 50 % das larvas (DL_{50}) foi obtida através do gráfico da % de animais mortos em função do logaritmo da dose testada, com um intervalo de confiança de 95%. Como controle positivo foram utilizadas soluções de $K_2Cr_2O_7$ ($DL_{50} = 20 - 40$ ppm), e como controle negativo empregou-se apenas o solvente utilizado para a preparação das soluções teste. Os testes foram realizados em triplicata.

6.7.2. Determinação da atividade antioxidante

Os testes para determinação da atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC, sob a supervisão da Profa. Inês M.C. Brighente.

6.7.2.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais nas amostras

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do reativo de Folin-ciocalteau, de acordo com o método descrito por Anagnostopoulou e colaboradores

(2006). A 0,5 mL de uma solução teste (extratos e frações na concentração de 1000 ppm, diluídos em metanol), foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reativo de Folin-ciocalteau. Após 3 minutos, foi adicionado 1,0 mL da solução saturada de Na_2CO_3 , agitou-se e a solução descansou por 1 hora. As absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 725 nm. Como branco utilizou-se uma solução preparada conforme descrito acima, porém, sem a presença da solução teste. Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de ácido gálico, nas concentrações de 25 a 500 mg/mL, diluídas em metanol, para comparação ($y = 5,51x + 1,77$, $r^2 = 0,997$). Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado em mg de ácido gálico/g de extrato ou fração seco.

6.7.2.2. Determinação do teor de flavonóides nas amostras

A determinação do teor de flavonóides foi realizado conforme método descrito por Woisky e Salatino (1998). A 0,5 mL de uma solução teste (extratos e frações na concentração de 1000 ppm, diluídos em metanol), foram adicionados 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de uma solução de AlCl_3 2 %. Após 1 hora, as absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 415 nm. Como branco foi utilizado etanol. Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de quercetina nas concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$, diluídas em metanol, para comparação ($y = 8,776x + 0,869$, $r^2 = 0,999$). Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos flavonóides foi determinado em mg de quercetina/g de extrato ou fração seco.

6.7.2.3. Determinação da ação seqüestradora do radical livre DPPH (2,2-Difenil-picril-hidrazil)

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil) baseia-se no método descrito por Cavin e colaboradores (1998), com algumas modificações.

Uma solução de DPPH 0,004% foi adicionada à solução teste nas concentrações de 5 a 200 ppm. A absorvância das soluções foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS (517nm) após 30 minutos. Através da leitura da absorvância de uma solução de DPPH (2 mL de solução 0,004%), acrescentado de 1 mL de MeOH, obteve-se a absorvância no tempo inicial (A_0). A cada uma das concentrações da solução teste em análise (1 mL) foram adicionados 2 mL de solução de DPPH, obtendo-se a absorvância de cada amostra nas diferentes concentrações. A absorvância de uma

solução teste (1 mL) em metanol (2 mL), foi descontada da absorvância das amostras analisadas, a fim de descontar a possível interferência do extrato nesse comprimento de onda. A análise foi feita em triplicata. Os valores obtidos foram graficados na forma de % de decréscimo da absorvância de DPPH em função da concentração da solução teste, onde determinou-se a concentração necessária para diminuir a concentração do DPPH em 50 % (IC₅₀) nas soluções testadas.

6.7.2.4. Determinação do potencial redutor

O ensaio para a análise da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor baseia-se no método de Price e Butler, proposto por Waterman e Mole (1994), com adaptações.

A 100 µL das soluções teste (extratos brutos e frações, diluídos em metanol, na concentração de 1000 ppm) foram adicionados 8,5 mL de água deionizada. Adicionou-se então 1,0 mL da solução de FeCl₃ 0,1 M, e após 3 minutos, 1,0 mL da solução de ferricianeto de potássio 0,08 M, e misturou-se. Após 15 minutos, foi realizada a leitura da absorvância da solução em espectrofotômetro a 720 nm. A análise foi feita em triplicata. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição da amostra. Foi realizada uma curva de calibração utilizando soluções padrões de ácido ascórbico nas concentrações de 100 a 1000 ppm ($y = 0,0015x + 0,124$, $r^2 = 0,999$). O potencial redutor das amostras foi expresso em mg de ácido ascórbico por g de amostra.

6.7.2.5. Determinação do potencial inibidor da peroxidação lipídica

A inibição da peroxidação lipídica foi avaliada através do modelo β-caroteno-ácido linoléico (MOKBEL e HASHINAGA, 2006).

Uma emulsão foi preparada com 3,0 mg de β-caroteno, 1,0 mL de CHCl₃, 45 mg de ácido linoléico e 215 mg de tween-80. O clorofórmio foi removido em evaporador rotatório, durante 4 minutos, sob temperatura de 45° C. À mistura resultante foram adicionadas 6,0 mL de água destilada, sob agitação, para fazer a emulsão. A emulsão foi então dissolvida para 100 mL com peróxido de hidrogênio 0,01 M. Alíquotas desta emulsão (4,0 mL) foram adicionadas à tubos contendo 0,2 mL das soluções teste (extratos e frações na concentração de 1000 ppm, dissolvidas em metanol). Como controle positivo foi utilizado uma solução de BHT (2,6-di-terc-butil-4-hidroxitolueno) (figura x) na concentração de 1000 ppm. Um controle negativo, contendo 0,2 mL de metanol e 4,0 mL da emulsão acima também foi preparado. Todos os tubos foram

colocados em banho-maria, a 50° C, e as absorvâncias das soluções foram determinadas no tempo zero, e a cada 30 minutos, em espectrofotômetro a 470 nm, até a descoloração do tubo contendo o controle negativo (180 minutos). Como branco, foi utilizada uma emulsão preparada como descrito acima, porém sem a presença de β-caroteno.

Os resultados dos ensaios foram expressos através de gráficos, onde foram cruzados os valores de absorvância das soluções em função do tempo de ensaio. A atividade antioxidante (potencial inibidor da peroxidação lipídica, em porcentagem) (AA) foi calculado através da seguinte fórmula:

$$AA = 100 [1 - (A_0 - A_t) / (A_0^0 - A_t^0)]$$

Onde:

A_0 e A_t são as absorvâncias da amostra no tempo zero e após 180 minutos, respectivamente e A_0^0 e A_t^0 são as absorvâncias do controle negativo no tempo zero e negativo após 180 minutos.

6.7.3. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*

6.7.3.1. Determinação da atividade antibacteriana

Os experimentos para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos foram realizados no laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Regional de Blumenau, sob a supervisão do professor Eduardo Monguilhott Dalmarco.

a) Microrganismos teste

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos e frações foram utilizadas a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, adquirida comercialmente (ATCC 25923) e também uma cepa multiresistente, isolada clinicamente em hospital. As bactérias gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) também foram testadas.

b) Preparo do inóculo bacteriano

Os extratos brutos hidroalcolóicos e frações foram testados frente a microorganismos padrões, conforme recomendado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2005). Estas determinações foram realizadas em microplacas estéreis, contendo 96 micropoços. Os extratos e frações foram colocados

nas primeiras microcavidades, contidas nas microplacas, os quais em seguida foram transferidos para microcavidades adjacentes, as quais já continham caldo Trypticase Soy Broth (TSB), com objetivo de se obter diluição seriada de ordem dois, do extrato e das frações originais (de 1:2 até 1:256 partindo da concentração de 50mg/mL para o extrato bruto e frações). O inóculo (5 μ L), correspondente a solução ajustada para 0,5 da escala de McFarland, foi adicionado em cada poço, resultando em uma concentração de 5×10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) do microorganismo a ser testado. Alguns poços de cada microplaca, foram reservados para realização do controles negativos (DMSO + bactéria em estudo e TSB + DMSO) e para controle de crescimento (TSB + bactéria em estudo). Como controle positivo, a bactéria em estudo foi incubada com o antibiótico gentamicina, ou oxacilina, no caso de cepas MRSA (figura 48). As microplacas foram incubadas aerobicamente a 35° C, por 24 horas.

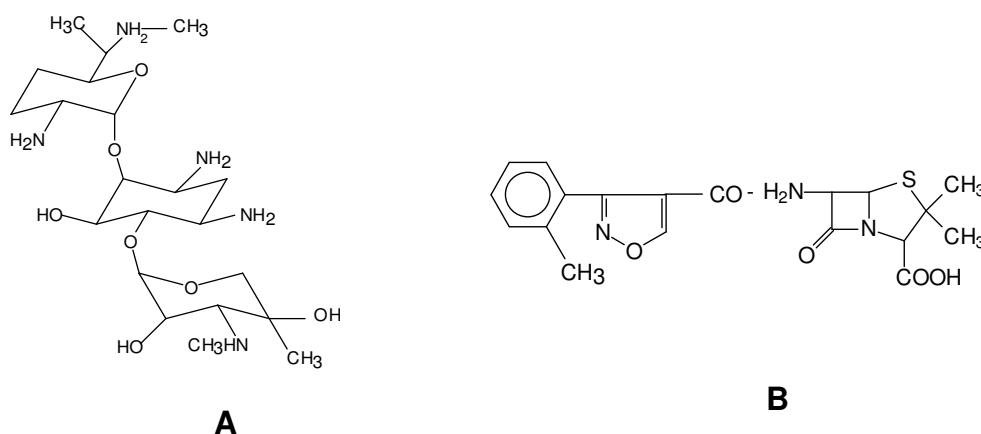


Figura 50. Estruturas da gentamicina (A) e oxacilina (B).

c) Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após a incubação, o crescimento bacteriano será verificado visualmente pela presença de turbidez ou presença de “botão” bacteriano no fundo de cada microplaca. A CIM foi definida como a última concentração de extrato ou fração capaz de inibir a presença de turbidez no micropoço.

d) Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), 1 μ L do micropoço que contém a CIM, além do mesmo volume de dois micropoços com concentrações inferiores e dois micropoços com concentrações superiores a CIM,

foram semeadas em ágar sangue de carneiro a 5%, e incubados aerobicamente a 35 °C por 24h. A CBM é determinada como sendo a última concentração capaz de inibir 99% o crescimento bacteriano após semeadura em ágar sangue. Cada experimento foi realizado em duplicata.

6.7.3.2. Determinação da atividade antifúngica

Os ensaios para a determinação da atividade antifúngica foram realizados no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende.

a) Microrganismos teste

Os microrganismos utilizados nos ensaios de atividade antifúngica foram as leveduras *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida krusei* (ATCC 200298), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 22019) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32608).

b) Preparo do inóculo

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

Para os ensaios de microdiluição em caldo, as amostras foram ressuspensas, com o auxílio de uma alça de platina, em solução fisiológica esterilizada e homogeneizada em vórtex, e ajustada à turbidez de 0,5 da escala de McFarland, equivalente a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL. A partir deste inóculo, foram feitas diluições para 1:20 e 1:50, correspondendo a um inóculo de $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ UFC/mL para todas as amostras de *Candida* spp. e *C. neoformans*.

c) Método de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os extratos e frações foram dissolvidos em 200 µL de DMSO para a obtenção de várias diluições, sendo, após, adicionados a 1800 µL do meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute). Posteriormente foram feitas diluições seriadas das amostras usando como diluente o meio RPMI, sendo mantido o volume constante de 1000 µL em cada tubo. Assim, as amostras foram testadas em oito concentrações,

que variaram de 1000 a 7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. De cada diluição, alíquotas de 100 μl foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição. Como controle de crescimento e de esterilidade foi usado somente o RPMI sem a adição do extrato e solvente. Como controle de toxidez do solvente foi usado o meio de cultura juntamente com o solvente. Como controles positivos foram usados o RPMI adicionado de anfotericina B (antifúngico padrão) (figura 49). As concentrações do antifúngico de referência usadas variaram, desta forma, de 0,12 a 64,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após a montagem das placas, cada orifício teste e controle de crescimento recebeu 100 μL do inóculo microbiano, descrito no item anterior. As placas foram incubadas a temperatura de 35 °C e lidas após 48 horas para as amostras de *Candida* spp., e após 72 horas para *Cryptococcus neoformans*, C (JOHANN, 2003; NCCLS M27, 2002).

A CIM foi considerada como a menor concentração da amostra ou antifúngico, em $\mu\text{g}/\text{mL}$, que inibiu o totalmente o crescimento do microorganismo, em relação ao controle de crescimento, após a incubação.

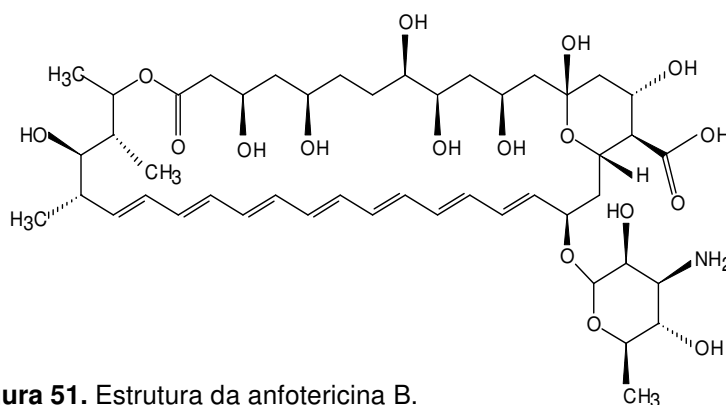


Figura 51. Estrutura da anfotericina B.

6.7.4. Determinação da atividade antiinflamatória tópica

Os experimentos para a determinação da atividade antiinflamatória tópica dos extratos e frações testados foram realizados no Laboratório de inflamação, dor e febre do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, sob a supervisão dos Profs. Drs. Michel Fleith Otuki e Daniela de Almeida Cabrini.

6.7.4.1. Animais

Os animais utilizados nos experimentos foram camundongos suíços machos (25-35 g), aclimatados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da UFPR a uma temperatura de 22 ± 2 °C, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso a água e ração *at libitum*. Os experimentos foram realizados durante o ciclo de

luminosidade. Os animais foram adaptados ao laboratório ao menos 1 hora antes do início dos experimentos e utilizados somente uma vez para cada teste. Os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética para experimentação animal da UFPR (protocolo n^o 127) e conduzidos de acordo com orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

6.7.4.2. Avaliação do edema de orelha

O edema foi expresso como o aumento da espessura (em μm) da orelha dos camundongos. A espessura da orelha foi medida antes e após a indução do processo inflamatório utilizando um micrômetro (Great, MT-045B). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha e a sua espessura foi registrada em μm . Para minimizar variações devido à técnica, os experimentos foram realizados por um único experimentador. Os compostos, extratos e agentes flogísticos foram dissolvidos em 20 μL de acetona e aplicados na orelha direita de camundongos (OTUKI et al, 2005).

6.7.4.3. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton

O edema foi induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton (0,1 mg/orelha, dissolvido em 20 μL de acetona) na orelha direita de camundongos. Os extratos (0,03 – 1,0 mg/orelha), frações (0,003 – 0,6 mg/orelha) e compostos isolados (0,6 mg/orelha), a dexametasona (0,05 mg/orelha), utilizada como controle positivo, ou acetona (20 μL /orelha), utilizada como controle negativo, foram aplicados topicamente logo após a aplicação do óleo de cróton. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 6 h após a aplicação do agente flogístico (SWINGLE, REITER e SCHWARTZMILLER, 1981; TRAGNI et al., 1985). Os resultados foram expressos como medidas da inibição máxima do edema (IM máx), que significa a maior inibição do edema obtida no teste, independente da dose utilizada. Além disso, os valores de inibição foram graficados contra as doses utilizadas, de onde foi extraída a dose inibitória 50 % (DI_{50}), ou seja, a dose necessária para inibir 50 % da espessura da orelha, quando comparada ao controle negativo (acetona).

6.7.4.4. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico

O extrato bruto hidroalcoólico (0,03 – 3,0 mg/orelha), indometacina (1 mg/orelha), usado como controle positivo e acetona (20 µL/orelha), utilizada como controle negativo, foram administrados topicamente, simultaneamente ao ácido araquidônico (2 mg/orelha) na orelha direita de camundongos. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 1 h após a indução da inflamação (YOUNG et al., 1984; CRUMMEY et al., 1987). Os resultados foram expressos também como inibição máxima e através da DI_{50} .

6.7.4.5. Medida da atividade enzimática da mieloperoxidase

A atividade da enzima mieloperoxidase, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, foi avaliada utilizando metodologia Suzuki et al (1983) modificada por De Young e colaboradores (1989). Biópsias (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) das orelhas dos camundongos foram coletadas 24 horas após a aplicação do óleo de cróton e submetidas à avaliação histológica e da atividade das enzima mieloperoxidase. As biópsias foram adicionados a 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM e pH 5,4 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0 °C em homogeinizador mecânico.

O homogenato foi decantado em microtubos e adicionados 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubo e centrifugada a 12000 x g a 4°C por 15 min. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente adicionados 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio (PBS) 80 mM pH 5,4, 85 µL, PBS 0,22 M pH 5,4 e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço.

A reação foi iniciada pela adição de 20 µL de cloridrato de tetrametilbenzidina (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%. A placa foi incubada a 37°C por 3 min e então colocada em banho de gelo. A reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M pH 3,0 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) na absorvância de 630 nm e expressa como milidensidade óptica por mg de tecido (mDO/mg de tecido).

6.7.4.6. Análise histológica

Amostras de orelhas coletadas de camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton foram fixadas em

formalina tamponada a 4%. As orelhas foram desidratadas, blocadas em parafina, seccionadas em cortes de 3-4 μm e corados com hematoxilina e eosina. Uma área representativa da amostra foi selecionada para análise qualitativa da resposta celular inflamatória (RECIO et al., 2000). Para minimizar a chance de erros, as amostras não foram identificadas para conhecimento do analista.

6.7.4.7. Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto para os valores das DI_{50} (dose de extrato, fração ou composto necessária para reduzir em 50% as respostas inflamatórias em relação ao grupo controle), que são representados como a média geométrica acompanhada de seu respectivo intervalo de confiança 95%. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) ou teste t de student, seguida do teste de múltipla comparação de Student Newman Keuls. Valores de P menores do que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os valores de DI_{50} foram determinados através de regressão linear utilizando o software GraphPad (Califórnia, EUA).

7. Referências bibliográficas

ADAMS, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography, mass spectroscopy*. 4 ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804p.

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.

AGRAWAL, P.K. *Carbon-13 NMR of flavonoids*. Amsterdam: Elsevier, 1989.

AL-BAYATI, F.A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v.116, p. 403–406, 2008.

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

APEL, M.A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; HENRIQUES, A.T.; MENUT, C.; BESSIERE, J.M. Volatile constituents of *Eugenia mattosi* Legr. *Journal of Essential Oil Research*, v.17, p. 284-285, 2005.

APEL, M.A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; HENRIQUES, A.T.; MENUT, C.; BESSIERE, J.M. Essential oils from *Eugenia* species - Part VII: sections Phylloclalyx and Stenocalyx. *Journal of Essential Oil Research*, v.16, n.3, p.135-138, 2004a.

APEL, M.A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; HENRIQUES, A.T. Chemical Composition of the Essential Oils of *Eugenia beaurepaireana* and *Eugenia pyriformis*: Section Dichotomae. *Journal of Essential Oil Research*, v.16, n.3, p. 191-192, 2004b.

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.

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.

AUROMA, O.I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, v.75, p.199-212, 1998.

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.

BACKHEET, E.Y. Gallotannin and flavonoid glycosides from the stem bark of *Acer negundo* (L.). *Bulletin of Pharmaceutical Sciences*, v. 26, n.1, p. 77-82, 2003.

BAIG, H.S.; SAIFULLAH, S.M.; DAR, A. Occurrence and toxicity of *Amphidinium carterae* Hulburt in the North Arabian Sea. *Harmful Algae*, v. 5, n. 2, p.133-140, 2006.

BALESTRIN, L.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, O.G.; DALL' STELLA, D.S.G.; MIGUEL, M.D. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 230 – 235, 2008.

BALTINA, L.A.; FLEKHTER, O.B.; NIGMATULLINA, L.R.; BOREKO, E.I.; PAVLOVA, N.I.; NIKOLAEVA, S.N.; SAVINOVA, O.V.; TOLSTIKOV, G.A. Lupane triterpenes and derivatives with antiviral activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 13, n. 20, p. 3549-3552, 2003.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: ArtMed, 2001. 243 p.

BISHOP, C.D. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *Journal of Essential Oil Research*, v. 7, p.641– 644, 1995.

BRAGA, P.C.; DAL SASSO, M.; CULICI, M.; ALFIERI, M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. *Fitoterapia*, v. 78, p. 396–400, 2007.

BRIESKORN, C.H.; BLOSCZYK, G. New triterpenic acids from the peel of grapes. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, v. 172, n. 3, p. 201-205, 1981.

BROWN, D. Overview of source of new drugs. In: TAYLOR, J.B.; TRIGGLE, D.J. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Vol 1: Global perspective. Elsevier, 2006.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 223– 253, 2004.

CARLSON, R.P.; ONEIL, L.D.; CHANG, J.; LEWIS, A.J. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents and Actions*, v. 17, p. 197–204, 1985.

CAUWENBERGH, G. The role of the pharmaceutical industry in drug development in dermatology. *Clinical Dermatology*, v. 20, p. 467–473, 2002.

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

CELIK TAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, v. 100, p. 553–559, 2007.

CHISOLM, G.M.; STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free radical biology and medicine*, v. 28, n.12, p. 1815 – 1826, 2000.

CLARK, A. Natural Products. In: WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L. *Foye's principles of medicinal chemistry*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 24 –26.

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

COELHO DE SOUZA, G.; 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.

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

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.

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.

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.

COWAN, M.M. Plant products and antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, v. 12, n. 4, p. 564 – 582, 1999.

CRUMMEY, A.; HARPER, G.P.; BOYLE, E.A.; MANGAN, F.R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. *Agents and Actions*, v. 20, p. 69–76, 1987.

DAT, N.T.; CAI, X.F.; SHEN, Q.; LEE, I.S.; KIM, Y.H. New inhibitor against nuclear factor of activated T cells transcription from *Ribes fasciculatum* var. Chinense. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 53, n.1, p. 114-117, 2005.

DAWIDAR, A. M.; EZMIRLY, S. T.; ABDEL-MOGIB, M.; HASHEM, N.; KASEM, T. New p-hydroxyacetophenone from *Nigella sativa*. *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 5, n. 2, p. 189-192, 2001.

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separated and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and Actions*, v. 26, p. 335–341, 1989.

DEBA, F.; XUAN, T.D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control*, v. 19, p. 346–352, 2008.

DEMIANOVA, Z., SIREN, H., KULDVEE, R., RIEKKOLA, M. L. Nonaqueous capillary electrophoretic separation of polyphenolic compounds in wine using coated capillaries at high pH in methanol. *Electrophoresis*, v. 24, p. 4264 – 4271, 2003.

DISEPIO, D.; CHANDRARATNA, R.A.S.; NAGPAL, S. Novel approaches for the treatment of psoriasis. *Therapy Focus*, v. 4, p. 222–231, 1999.

DJERIDANE, A.; YOUS, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, v. 97, p. 654–660, 2006.

DJIPA, C.D.; DELMEE, M.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 307-313, 2000.

DOMINGUEZ, X.A.; VANEGAS, M.T. Mexican medicinal plants. XX. Terpenoids of the aerial parts of *Asclepias latifolia*. *Phytochemistry*, v. 11, n. 2, p. 848, 1972.

DOU, H.; ZHANG, R.; LOU, X.; JIA, J.; ZHOU, C; ZHAO, YU. Constituents of three species of *Lagerstroemia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 33, p. 639–642, 2005.

DU, Z.; ZHAO, P.; HE, H.; ZHU, N.; HAO, X.; SHEN, Y. The chemical constituents from the callus culture of *Trewia nudiflora*. *Helvetica Chimica Acta*, v.88, n.9, p. 2424-2429, 2005.

DUFFY, C.F.; POWER, R.F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 17, n. 527-529, 2001.

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.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2003.p. 403-434.

FAVILLA, M.; MACCHIA, L.; GALLO, A.; ALTOMARE, C. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food and Chemical Toxicology*, v.44, n. 11, p. 1922-1931, 2006.

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.

FOO, L.Y.; LU, Y.; MOLAN, A.L.; WOODFIELD, D.R., MCNABB, W.C. The phenols and prodelphinidins of white clover flowers. *Phytochemistry*, v. 54, p. 539-548, 2000.

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.

FULDA, S.; FRIESEN, C.; LOS, M.; SCAFFIDI, C.; MIER, W.; BENEDICT, M.; NUNEZ, G.; KRAMMER, P.H.; PETER, M.E.; EBATIN, K. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas) and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Research*, v. 57, p. 4956–4964, 1997.

GÁBOR, M. Mouse ear inflammation models: croton oil ear oedema. In: GÁBOR, M. (ed.) *Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000. p. 24–37.

GAO, I., IGARASHI, K., & NUKINA, M. Three new phenylethanoid glycosides from *Caryopteris incana* and their antioxidative activity. *Chemical and Farmaceutical Bulletin*, v.48, p. 1075–1078, 2000.

GARETH, T. *Química medicinal: uma introdução*. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2003.

GARRIDO, G.; GONZALEZ, D.; LEMUS, Y.; DELPORTE, C.; DELGADO, R. Protective effects of a standard extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG) against mouse ear edemas and its inhibition of eicosanoid production in J774 murine macrophages. *Phytomedicine*, v. 13, p. 412–418, 2006.

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 onicomycosis 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., SEGURA-CARRETERO, 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.

GOODNER, K.L.; MAHATTANATAWEEA, K.; PLOTTO, A.; SOTOMAYOR, J.A.; JORDÁN, M.J. Aromatic profiles of *Thymus hyemalis* and Spanish *T. vulgaris* essential oils by GC–MS/GC–O. *Industrial Crops and Products*, v. 24, n. 3, p. 264-268, 2006.

GOTTLIEB, A. B. Psoriasis: emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 19–34, 2005.

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.; KÜFREVIÖGLÜ, 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.

GUO, F.; LIN, S.; LI, Y. Isolation and identification of triterpenoids from *Schefflera arboricola*. *Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi*, v.15, n.5, p. 294-296, 2005.

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

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. *Food chemistry and toxicology*, v. 33, p. 601, 1995.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v. 30, n. 12, p. 3864 - 3874, 1991.

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.

HARBORNE, J.B. *Introduction to ecological biochemistry*. 3 ed. London: Academic Press, 1988.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.

HASIMOTO E SOUZA, L.K.; OLIVEIRA, C.M.A.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.G.; MIRANDA, A.T.B.; LIÃO, L.M.; SILVA, M.R.R. Antifungal properties of brazilian cerrado plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, p.247-249, 2002.

HATA, K.; HORI, K.; TAKAHASHI, S. Differentiation and apoptosis-inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line. *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 645–648, 2002.

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

HIROYA, K.; TAKAHASHI, T.; MIURA, N.; NAGANUMA, A.; SAKAMOTO, T. Synthesis of betulin derivatives and their protective effects against the cytotoxicity of cadmium. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 10, p. 3229–3236, 2002.

HONG, N.H. kava root (*Piper methysticum* L.) as a potencial natural herbicide and fungicide. *Crop protection*, v.22, p. 873-881, 2003.

HOUGHTON, P.J.; RAMAN, A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. London: Chapman & Hall, 1998.

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.

IKUTA, A.; ITOKAWA, H. The triterpenes from *Stauntonia hexaphylla* callus tissues and their biosynthetic significance. *Journal of Natural Products*, v. 52, n. 3, p. 623-8, 1989.

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

KARPOUHTSIS, I., PARDALI, E., FEGGOU, E., KOKKINI, S., SCOURAS, Z.G., MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 1111– 1115, 1998.

KASPERCZYK, H.; LA FERLA-BRUEHL, K.; WESTHOFF, M.A.; BEHREND, L.; ZWACKA, R.M.; DEBATIN, K.; FULDA, S. Betulinic acid as new activator of NF- κ B:

molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene*, v. 24, p. 6945–6956, 2005.

KHANNA, T.; FRIENDSHIP, R.; DEWEY, C.; WEESE, J.S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Veterinary Microbiology*, v. 128, n. 3-4, p. 298-303, 2008.

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.

KOCEVAR, NINA; GLAVA, I.; INJAC, R.; KREFT, S. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in *Achillea millefolium*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 46, p. 609–614, 2008.

KONGDUANG, J.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; DE-EKNAMKUL, W. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. *Tetrahedron Letters*, v. 49, p. 4067 – 4072, 2008.

KORUL'KINA, L. M.; SHUL'TS, E. E.; ZHUSUPOVA, G.E.; ABILOV, Z.A.; ERZHANOV, K.B.; CHAUDRI, M.I. Biologically active compounds from *Limonium gmelinii*. *Chemistry of natural products*, v. 40, n. 5, p. 465-471, 2004.

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.

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

JAYAPRAKASHA, G.K.; MANDADI, K.K.; POULOSE, S.M.; JADEGOUD, Y.; GOWDA, G.A.N.; PATILA, B.S. Inhibition of colon cancer cell growth and antioxidant activity of bioactive compounds from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Biorganic and Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 4923 – 4932, 2007.

JIANG, W.; LI, W.; HAN, L.; LIU, L.; ZHANG, Q.; ZHANG, S.; NIKAIDO, T.; KOIKE, K. Biologically active triterpenoid saponins from *Acanthopanax senticosus*. *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 1577-1581, 2006.

JOHANN, S. *Avaliação da atividade antimicrobiana de flavonóides isolados de Citrus spp.* Mestrado em Biotecnologia (Dissertação). Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSC, Florianópolis, 2003. 83 p.

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

JONES, N.P.; ARNASON, J.T.; ABOU-ZAID, M.; AKPAGANA, K.; SANCHES-VINDAS, P.; SMITH, M.L. Antifungal activity of extracts from medicinal plants used by first nations peoples of eastern Canada. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, p. 191–198, 2000.

- LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, v.18, n. 6, p. 435-448, 2004.
- LAPIKANON, P.; TOVIVICH, P.; WOO, W.S.; CHOI, J.S. Phytochemical study on *Randia siamensis*. *Archives of Pharmaceutical Research*, v. 6, n. 1, p. 29-33, 1983.
- LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 111, p. 16–26, 2006.
- LECHNER, D., STAVRI, M., OLUWATUYI, M., PEREDA-MIRANDA, R., GIBBONS, S. The anti-staphylococcal activity of *Angelica dahurica* (BaiZhi). *Phytochemistry*, v. 65, p.331–335, 2004.
- 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.
- LEE, M.; NISHIMOTO, S.; YANG, L.; YEN, A.Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. *Phytochemistry*, v.44, p. 1343-1349, 1997.
- 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.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n3, p. 293 – 303, 2001.
- LIMBERGER, R.P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A.T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J.M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* Nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.
- 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 if extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.49, n. 1, p. 23-32, 1995.
- LUGASI, A., DWORSCHAK, E., BLAZOVICS, A., KERY, A. Antioxidant and free radical scavenging properties of squeezed juice from black radish (*Raphanus sativus* L., var. niger) root. *Phytotherapy Research*, v.12, p. 502–506, 1998.
- LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W. SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, p. 199–206, 2005.
- LUNARDI, I.; PEIXOTO, J.L.B.; SILVA, C.C.; SHUQUEL, I.T. A., BASSO, E. A.; VIDOTTI, G. J. Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 12, n. 2, p. 180-183, 2001.
- 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.

- 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.
- MAMANI-MATSUDA, M.; KAUSS, T.; AL-KHARRAT, A.; RAMBERT, J.; FAWAZ, F.; THIOLAT, D.; MOYNET, D.; COVES, S.; MALVY, D.; MOSSALAYI, M. D. Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. *Biochemical Pharmacology*, v.72, p.1304–1310, 2006.
- MARI, M., BERTOLINI, P., PRATELLA, G.C. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, 761– 766, 2003.
- MATOS, F.J.A. *Introdução à fitoquímica experimental*. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141 p.
- McLAUGHLIN, J.L. *Methods in plant biochemistry*. Vol. 6. Londres: Academic Press, 1991.
- MENDONÇA, C. O.; BURDEN, A. D. Current concepts in psoriasis and its treatment. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 99, p.133–147, 2003.
- MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v. 45, p. 31-34, 1982.
- MITSCHER, L.A. Antibiotics and antimicrobial agents. In: WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L. *Foye's principles of medicinal chemistry*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 819.
- MOHAMED, Z.A.; EL-SHAROUNY, H.M.; ALI, W.S.M. Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. *Toxicon*, v. 47, n. 5, p. 584-590, 2006.
- MOKBEL, M.S.; HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. *Food Chemistry*, v.94, n.4, p. 529-534, 2006.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p.105-111, 2001.
- MORENO, P.R.H.; LIMA, M.E.L.; SOBRAL, M.; YOUNG, M.C.M.; CORDEIRO, I.; APEL, M.A.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T. Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. *Scientia Agricola*, v. 64, n. 4, p. 428 – 432, 2007.
- MOUREY, A., CANILLAC, N., Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, v.13, p. 289– 292, 2002.

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.

MUKHERJEE, R.; JAGGI, M.; RAJENDRAN, P.; SIDDIQUI, M.J.A.; SRIVASTAVA, S.K.; VARDHAN, A.; BURMAN, A.C. Betulinic acid and its derivatives as anti-angiogenic agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, p. 2181–2184, 2004.

NAWWAR, M.A.M.; ISHAK, M.S.; MICHAEL, H.N.; BUDDRUS, J. Leaf flavonoids of *Ziziphus spina-christi*. *Phytochemistry*, v.23, n.9, p. 2110-2111, 1984.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved Standard*. Second edition, document M27- A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, Pa, 2002.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1022 – 1037, 2003.

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.

OKUDA, T., YOSHIDA, T., HATANO, T., YAKAZI, K., ASHIDA, M. Ellagitannins of the casuarinaceae, stachyuraceae and myrtaceae. *Phytochemistry*, v.21, n. 12, p. 2871-2874, 1982.

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

OTUKI, M.F.; PIETROVSKI, E.F.; CABRINI, D.A. Topical simvastatin: preclinical evidence for a treatment of skin inflammatory conditions. *Journal of Dermatological Science*, v. 44, p. 45–47, 2006.

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology*, v. 507, p. 253–259, 2005.

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.

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

PALOMBO, E.A., SEMPLE, S.J. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 151-157, 2001.

PATEL, R.P.; MCANDREW, J.; SELLA, H.; WHITE, C.R.; JO, H.; FREEMAN, B.A.; DARLEY-USMAR, V.M. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1411, p. 385–400, 1999.

PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, B.; IGNACY GRUSZECKI, W.; MISIAK, L.; PADUCH, R.; PIERSIAK, T.; ZARZYKA, B.; PAWELEC, J.; GAWRON, A. Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1768, p. 2195–2204, 2007.

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.

PESSOA, L.M., MORAIS, S.M., BEVILAQUA, C.M.L., LUCIANO, J.H.S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 109, n.1– 2, p. 59–63, 2002.

PIMENTA, L. P.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G. F.; BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine*, v. 10, p. 209–212, 2003.

PINO, J.A.; MARBOT, R.; BELLO, A.; URQUIOLA, A. Essential Oil of *Eugenia meladenia* Krug et Urb. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, v.15, p. 256-258, 2003.

PIO-CORRÊA, M. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926-1978.

POURGHOLAMI, M.H.; KAMALINEJAD, M.; JAVADI, M.; MAJZOUB, S.; SAYYAH, M. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, n.2, p.167 - 171, 1999.

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.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 43, n. 9, p.1433 – 1439, 2005.

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, 2004a.

RAVI, K.; RAMACHANDRAN, B.; SUBRAMANIAN, S. Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense. *Life Science*, v. 75, p. 2717–31, 2004b.

RECIO, M.C.; GINER, R.M.; URIBURU, L.; MANEZ, S.; CERDA, M.; DE LA FUENTE, J.R.; RIOS, J.L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. *Life Science*, v. 66, p. 2509–2518, 2000.

REITZ, R. D.; KLEIN, R. M. Mirtáceas. In: *Flora Ilustrada 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.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. *Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma*. São Paulo : Atheneu, 2005. 118 p.
- 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.
- SAMI, A.; TARU, M.; SALMEA, K.; JARI, Y. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European journal of pharmaceutical sciences*, v. 29, p.1–13, 2006.
- SANCHEZ, T.; MORENO, J.J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. *Biochemical Pharmacology*, v. 58, p. 877–879, 1999.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2003.p. 403-434.
- SAREK, J.; KLINOT, J.; DZUBAK, P.; KLINOTOVA, E.; NOSKOVA, V.; KRECEK, V.; KORINKOVA, G.; THOMSON, J.O.; JANOSTAKOVA, A.; WANG, S.; PARSONS, S.; FISCHER, P.M.; ZHELEV, N.Z.; HAJDUCH, M. New lupane derived compounds with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure–activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, p. 5402–5415, 2003.
- SCHAERLI, P.; BRITSCHGI, M.; KELLER, M.; STEINER, U.C.; STEINMANN, L.S.; MOSER, B.; PICHLER, W.J. Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation. *Journal of Immunology*, v. 173, p. 2151–2158, 2004.
- 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 à botânica sistemática*. 5 ed. Porto Alegre: Ed UFRGS, 1980.
- SCHWARZ-LINEK, U.; HÖÖK, M.; POTTS, J.R. Fibronectin-binding proteins of Gram-positive cocci. *Microbes and Infection*, v. 8, n. 8, p. 2291 – 2298, 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, 2008.

SHARMA, S.B.; NASIR, A.; PRABHU, K.M.; MURTHY, P.S. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, n. 3, p. 367 - 373, 2006.

SHARMA, S.B.; NASIR, A.; PRABHU, K.M.; MURTHY, P.S.; DEV, G. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, v.85, n.2-3, p.201-206, 2003.

SHEN, C.C; CHANG, Y.S.; HO, L.K. Nuclear magnetic resonance studies of 5,7-dihydroxyflavonoids. *Phytochemistry*, v. 34, n.3, p. 843-845, 1993.

SILVA, F.A.M; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v.22, n.1, p.94 – 103, 1999.

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.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, v. 18, p. 409-413, 2007.

SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.S.; POSER, G.L. von; 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.

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

STEINBERG, D. Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation*, v. 84, p.1420 – 1425, 1991.

SUN, I.; SHEN, J.; WANG, H.; COSENTINO, L.M.; LEE, K. Anti-AIDS agents. 32. Synthesis and anti-HIV activity of betulin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 8, n.10, p. 1267-1272, 1998.

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

SUZUKI, J.; OGAWA, M.; MAEJIMA, Y.; ISOBE, K.; TANAKA, H.; SAGESAKA, Y.; M, ISOBE, M. Tea catechins attenuate chronic ventricular remodeling after myocardial ischemia in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 42, p. 432–440, 2007.

SUZUKI, K.; OTA, H.; SASAGAWA, S.; SAKATANI, T.; FUJIKURA, T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry*, v. 132, p. 345–352, 1983.

SWINGLE, K.F.; REITER, M.J.; SCHWARTZMILLER, D.H. Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, v. 254, p. 168–176, 1981.

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.

TANAKA, R.; TABUSE, M.; MATSUNAGA, S. Triterpenes from the stem bark of *Phyllanthus flexuosus*. *Phytochemistry*, v. 27, n. 11, p. 3563 – 3567, 1988.

THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan myrtaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 24, n. 2-3, p. 179 – 183, 1988.

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

TRAGNI, E.; TUBARO, A.; MELIS, S.; GALLI, C.L. Evidence from two classic irritation tests for an anti-inflammatory action of a natural extract, Echinacina B. *Food Chemistry and Toxicology*, v. 23, p. 317–319, 1985.

TUCK, K.L.; HAYBALL, P.J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.13, p. 636–644, 2002.

TURSCH, B.; LECLERCQ, J.; CHIURDOGLU, G. Structure of mesembryanthemoidigenic acid a new terpene from Cactaceae. *Tetrahedron Letters*, v. 47, p. 4161-4166, 1965.

URBAN, M.; SAREK, J.; KLINOT, J.; KORINKOVA, G.; HAJDUCH, M. Synthesis of A-seco derivatives of betulinic acid with cytotoxic activity. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 1100–1105, 2004.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, v. 189, p. 41 – 54, 2003.

VEERPORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug discovery today*, v.3, n.5, p. 232 – 238, 1998.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; MORDUJOVICH, P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, v. 74, p. 91-97, 2003.

VIEGAS JÚNIOR., C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

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.

- VILA, R.; IGLESIAS, J.; CAÑIGUERAL, S.; SANTANA, A.I.; SOLÍS, P.; GUPTA, M.P. Constituents and biological activity of the essential oil of *Eugenia acapulcensis* Steud. *Journal of Essential Oil Research*, v. 16, p. 384-386, 2004.
- WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2ed. Heidelberg : Springer, 1996. 384 p.
- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.44, p. 701-705, 1996.
- WATERMAN, P.G.; MOLE, S. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford : Blackwell Scientific, 1994. 238p.
- WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts: preliminary screening studies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 115, p. 140–146, 2008.
- WHO - World Health Organization. *Bulletin of World Health Organization*, v.33, p. 567, 1984.
- WINTERBOURN, C.C.; VISSERS, M.C.; KETTLE, A.J. Myeloperoxidase. *Current Opinion in Hematology*, v. 7, p. 53–58, 2000.
- WOISKY, R. G., SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apiculture Research*, v. 37, p. 99–105, 1998.
- 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.
- YEN, G. C., CHEN, H. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.43, p. 27-32, 1995.
- YOCHUM, L. KUSHI, L.H. MEYER, K. FOLSOM, A.R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, v. 149, p. 943–949, 1999.
- 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.
- YOUNG, J.M.; SPIRES, D.A.; BEDORD, C.J.; WAGNER, B.; BALLARON, S.J.; DE YOUNG, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 82, p. 367–371, 1984.
- YU, L. L. Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n.7, p. 3452–3456, 2001.
- YUAN, X.; HUANG, L.; HO, P.; LABRANCHE, C.; CHEN, C.H.. Conformation of gp120 determines the sensitivity of HIV-1 DH012 to the entry inhibitor IC9564. *Virology*, v. 324, p. 525–530, 2004.

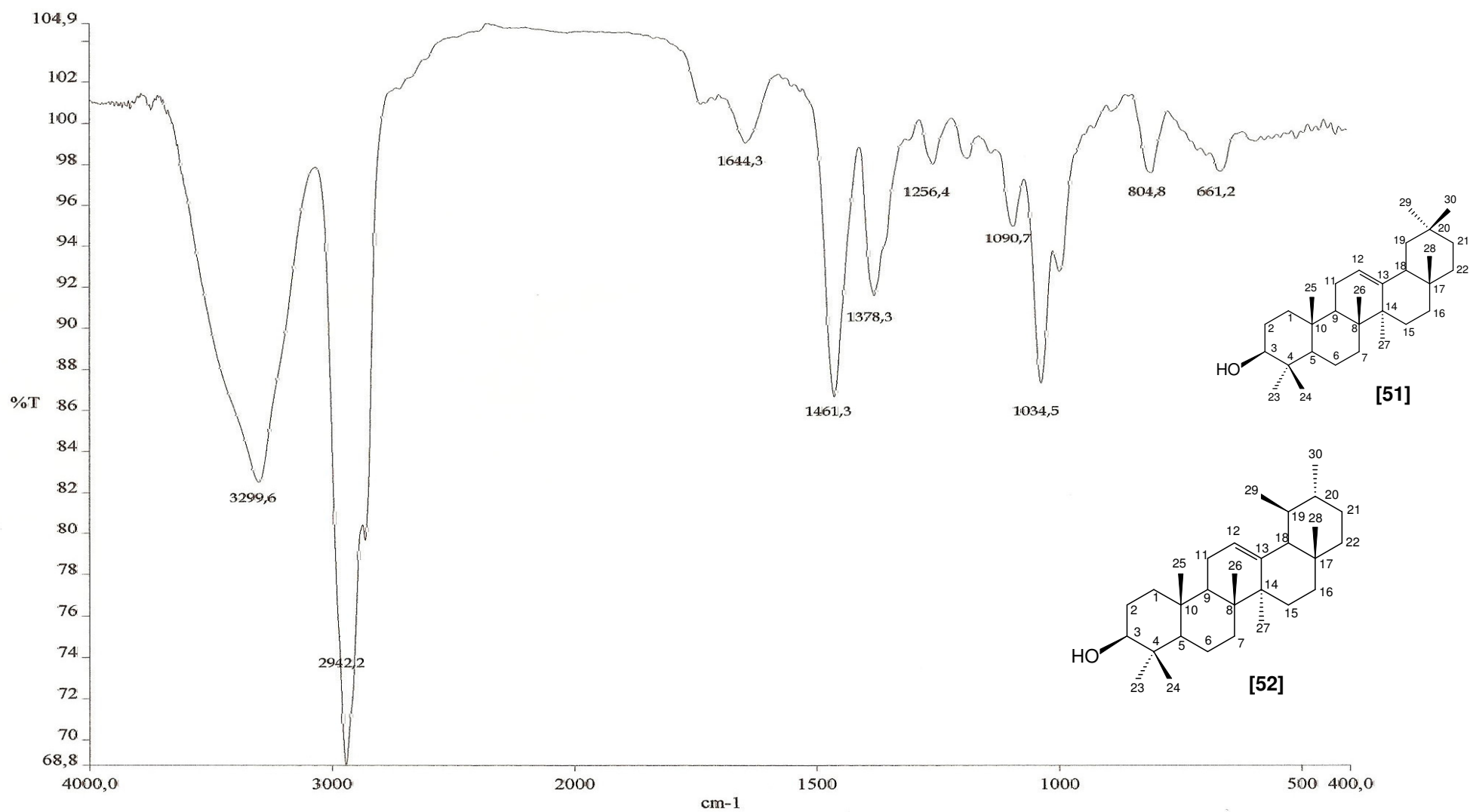
ZAMPINI, I.C.; VATTUONE M. A.; ISLA. M.I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v.102, n. 3, p. 450-456, 2005.

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

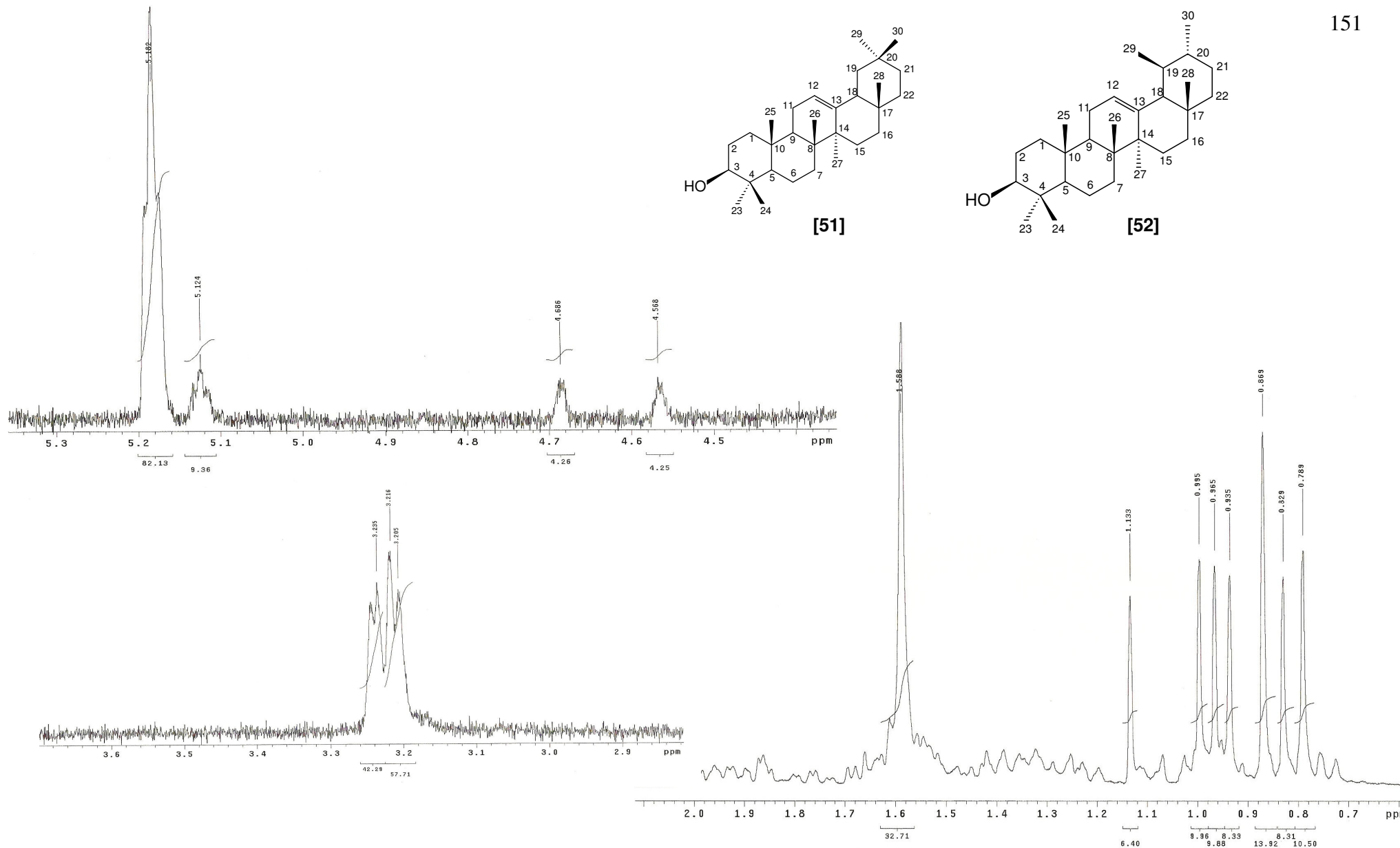
ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, p. 109–110, 1983.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed UFRGS/Ed. UFSC, 2003. p. 576-614.

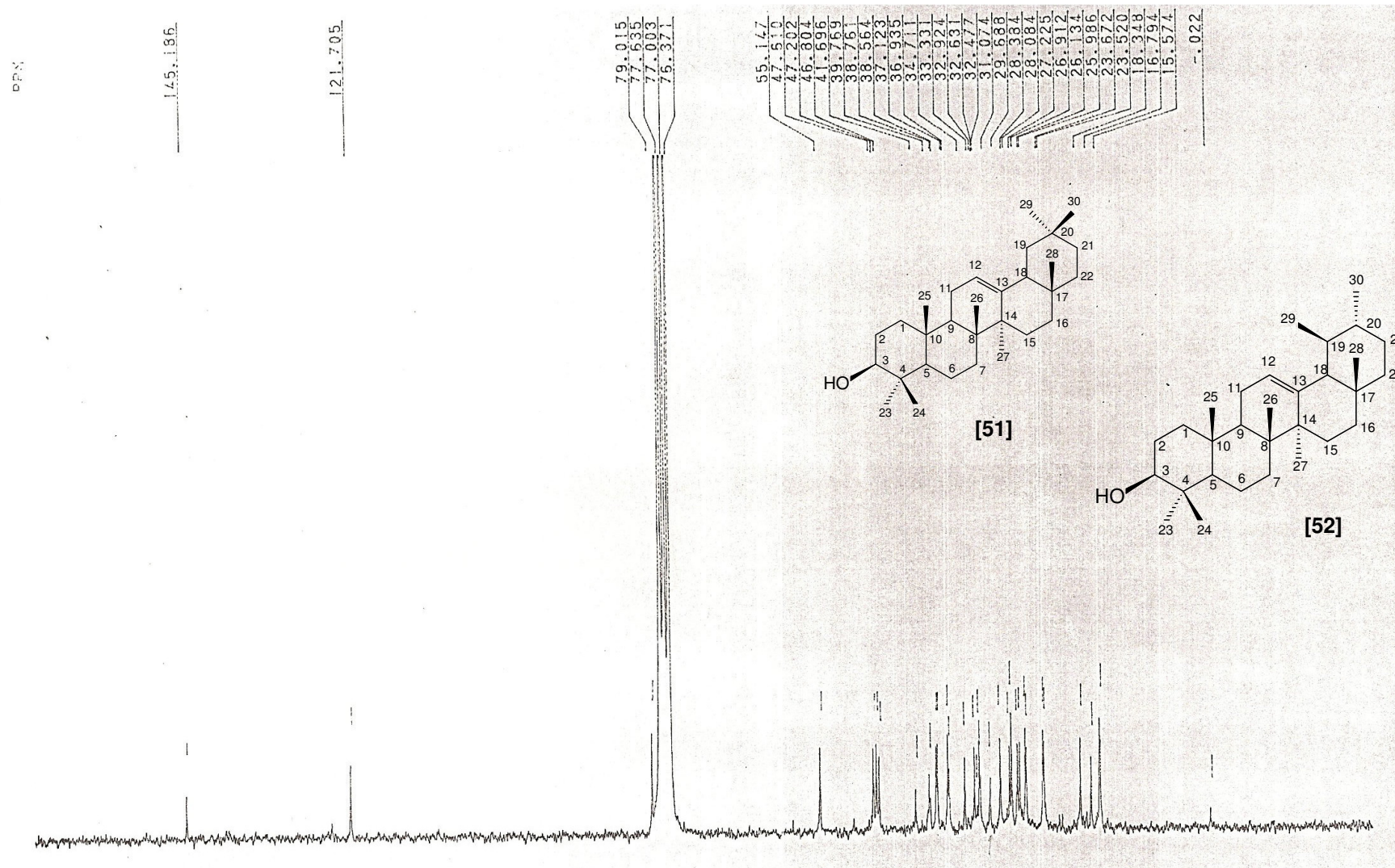
8. Anexos



Anexo 1. Espectro de infra-vermelho (IV) (KBr) da mistura dos compostos beta-amirina e alfa-amirina (51 e 52).

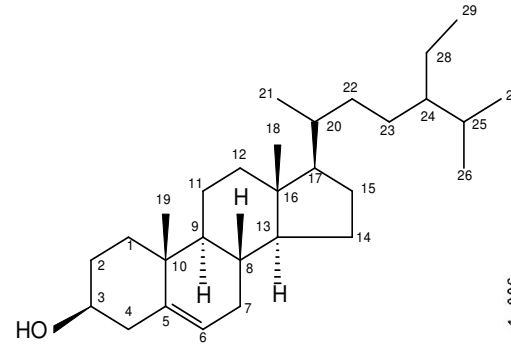
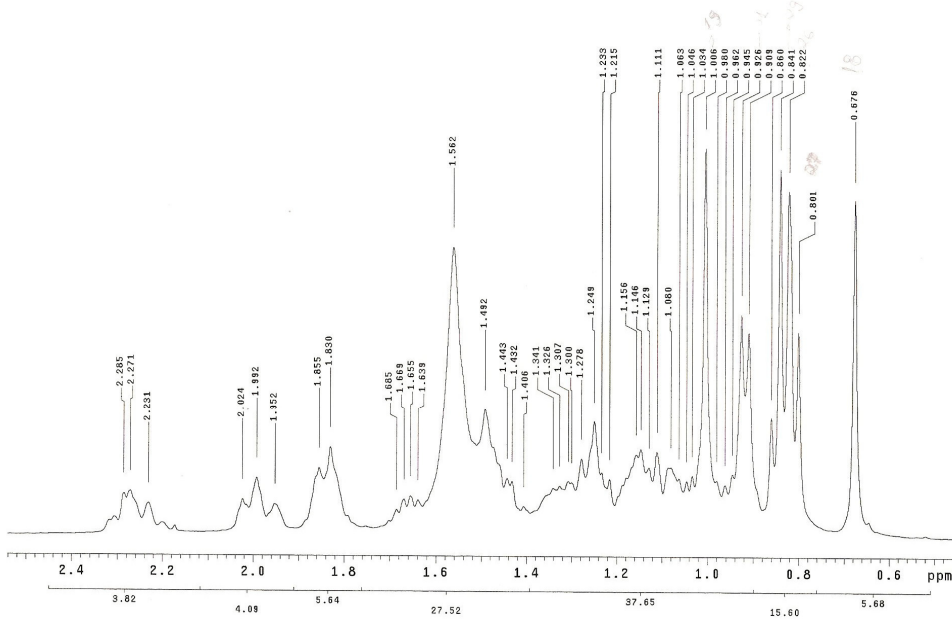


Anexo 2. Ampliações do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) (400 MHz, CDCl₃) da mistura dos compostos beta-amirina e alfa-amirina (**51** e **52**).

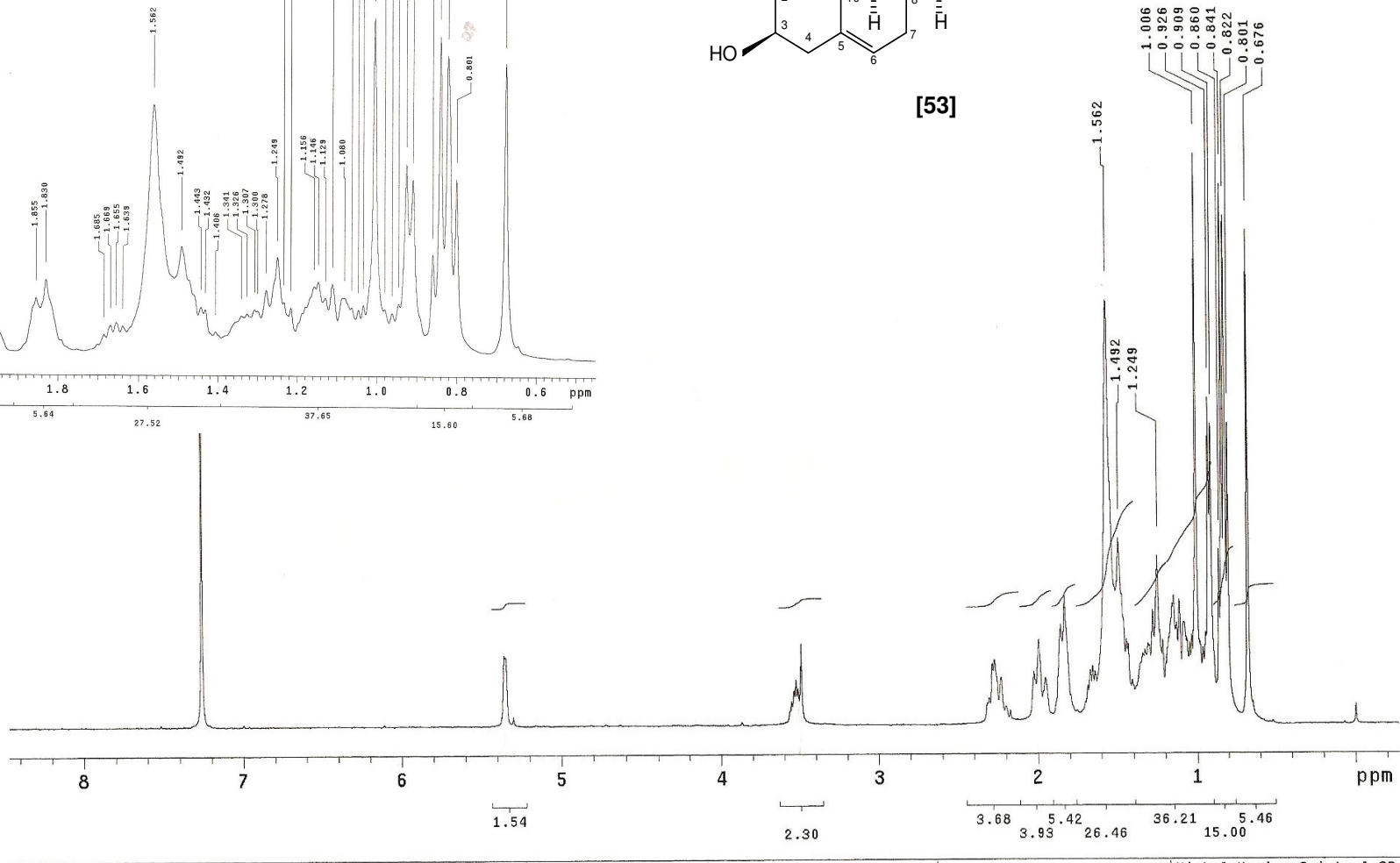


Anexo 3. Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C) (50 MHz, CDCl_3) da mistura dos compostos beta-amirina e alfa-amirina (**51** e **52**).

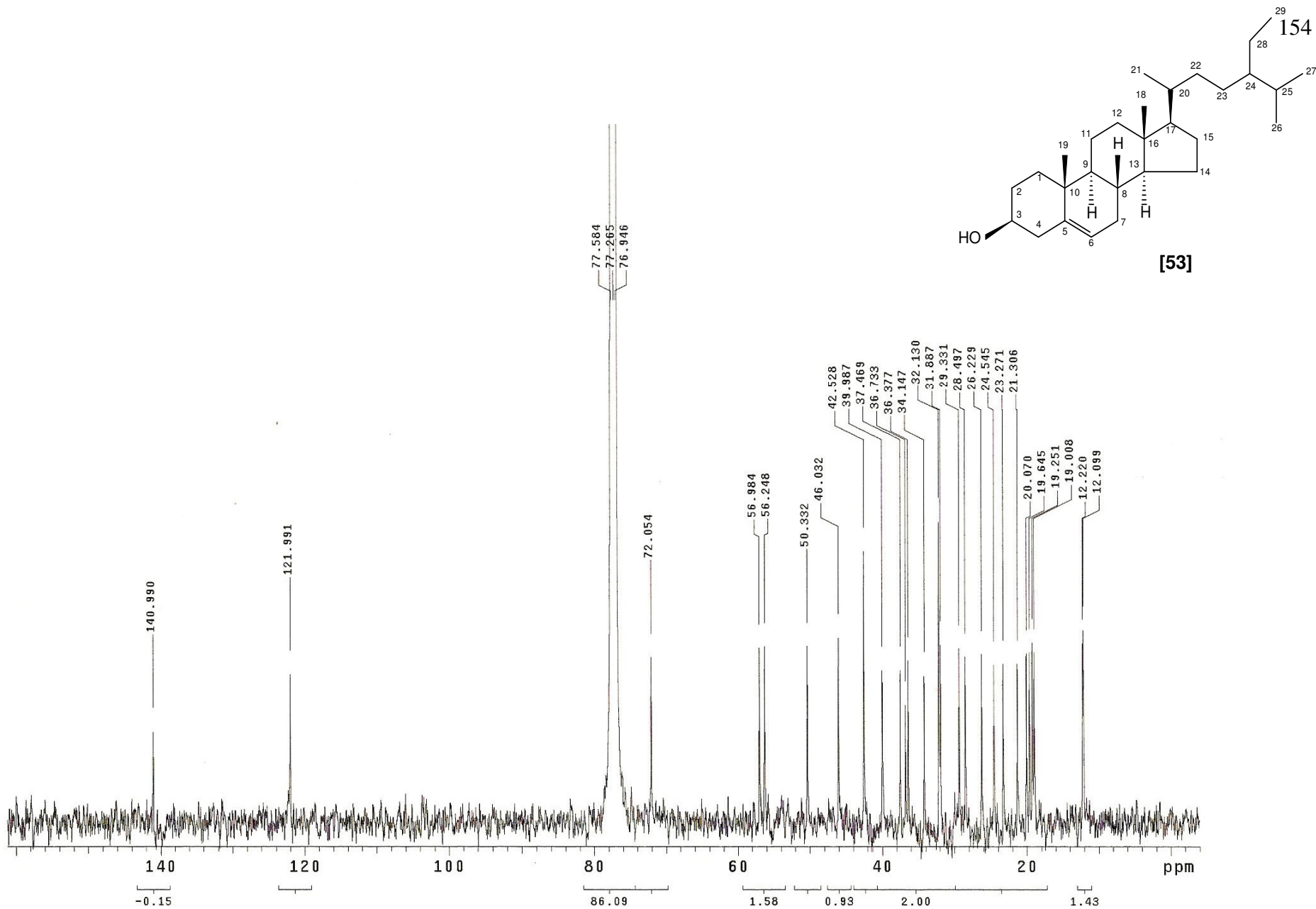
Pulse Sequence: szpu1



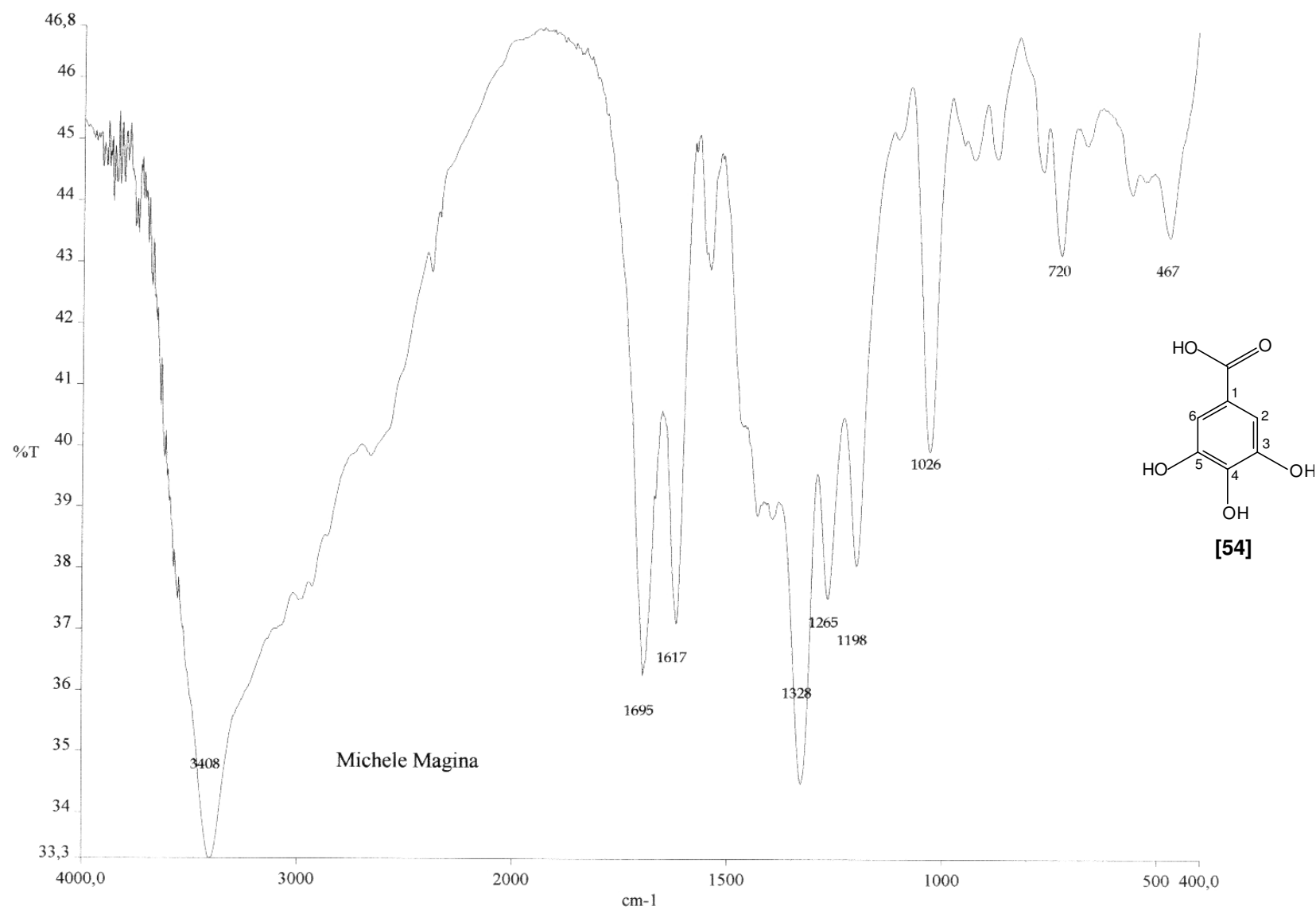
[53]



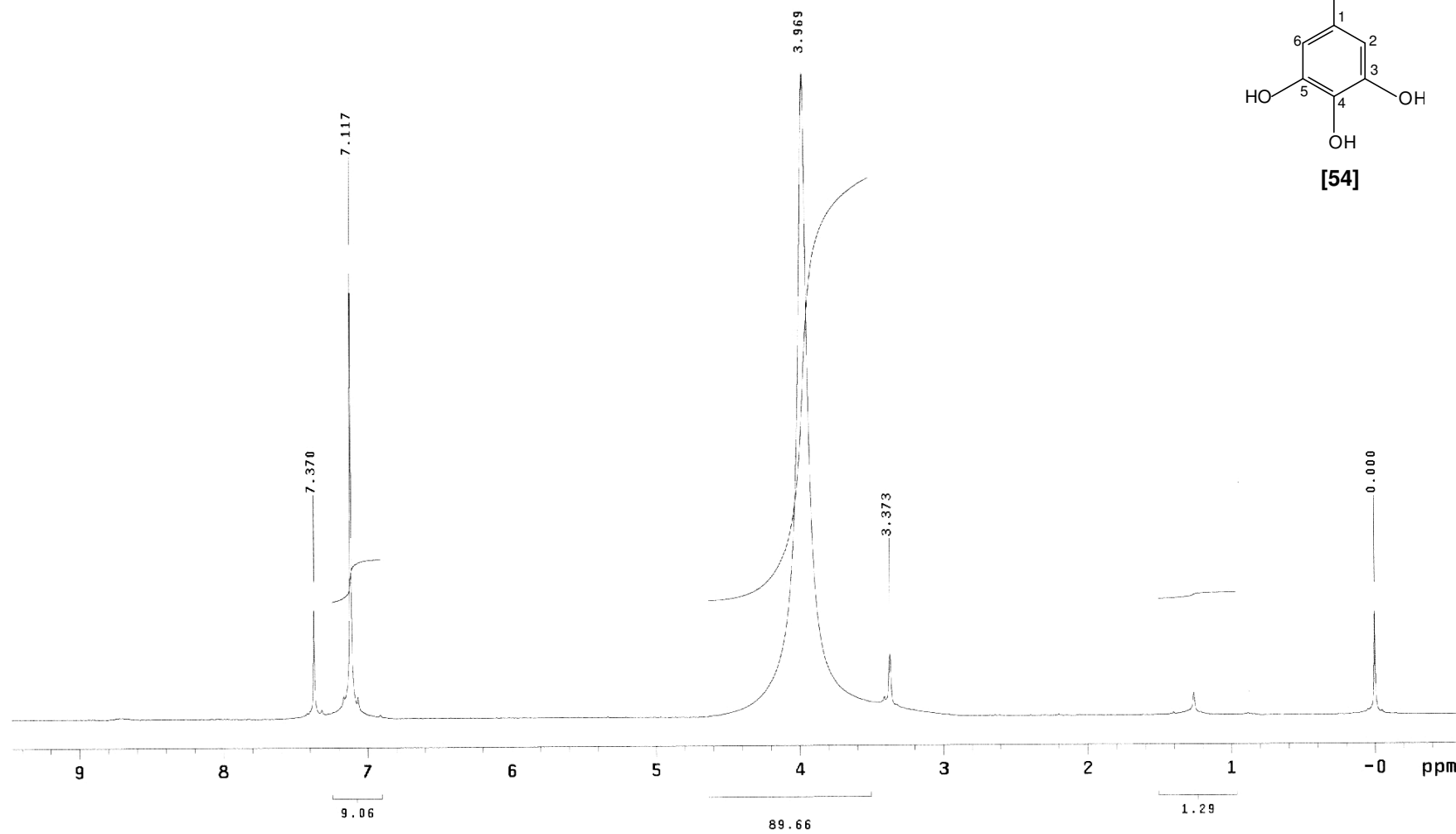
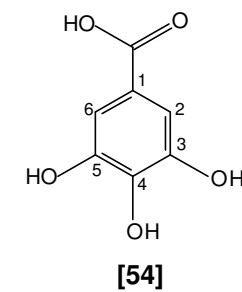
Anexo 4. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) do esteróide β-sitosterol (53).



Anexo 5. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do esteróide β-sitosterol (53).



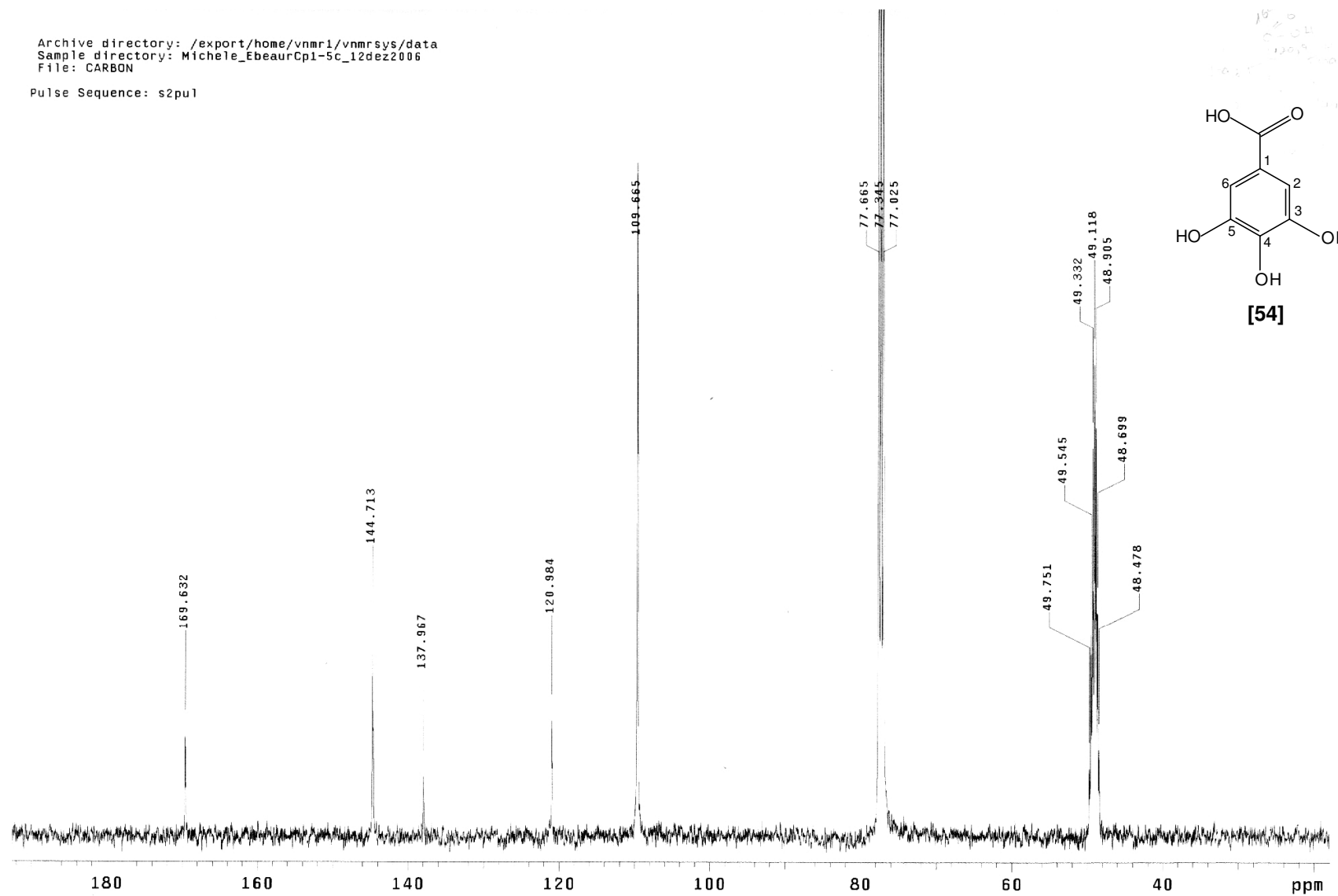
Anexo 6. Espectro de IV (KBr) do ácido gálico (54).



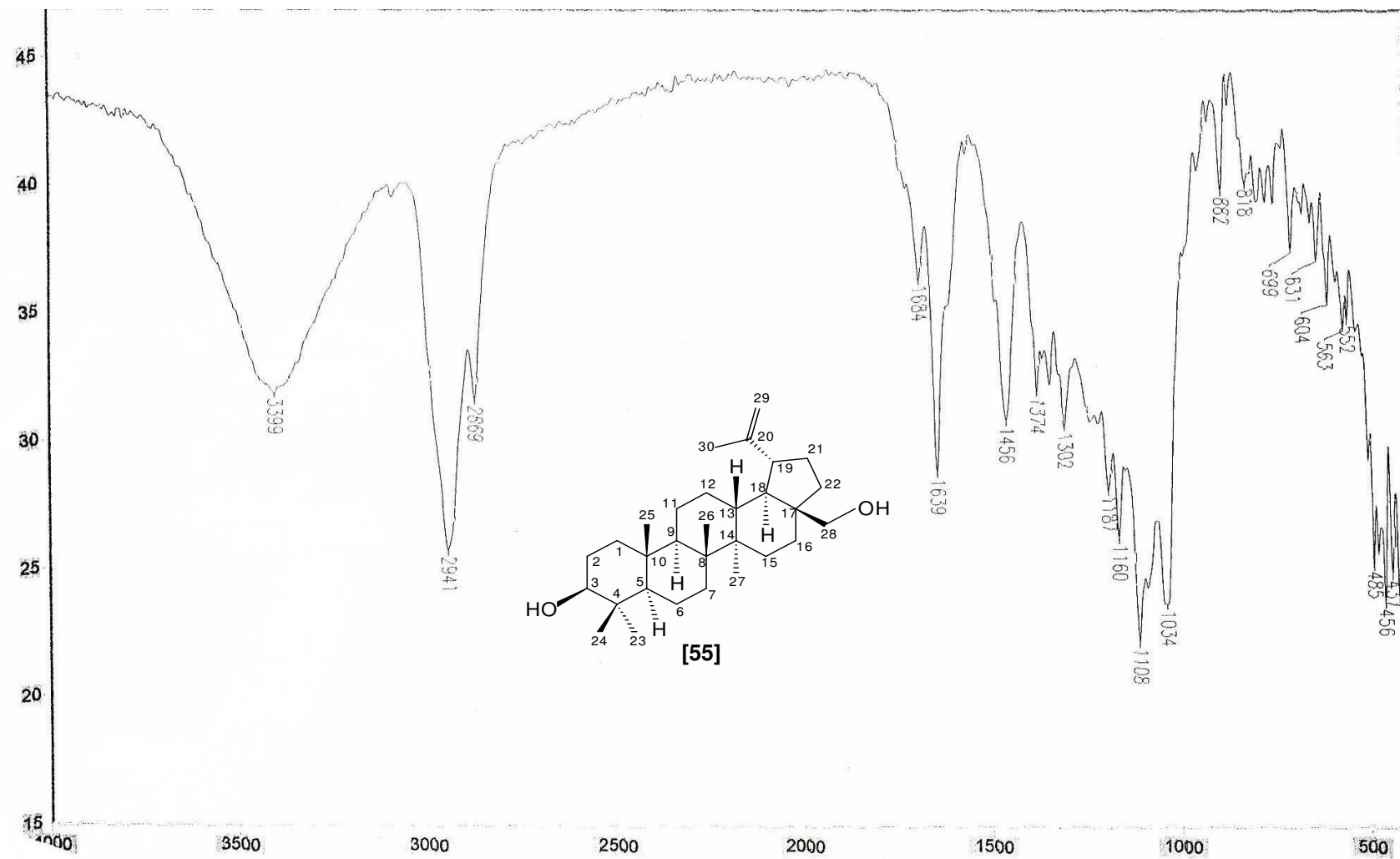
Anexo 7. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD/ CDCl_3) do ácido gálico (54).

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: Michele_EbeaurCp1-5c_12dez2006
File: CARBON

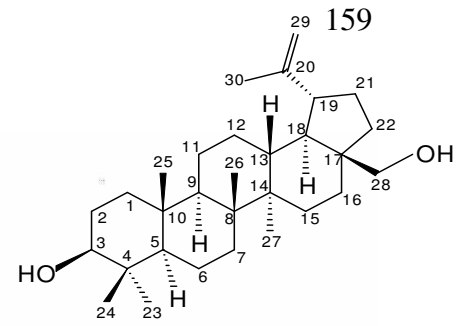
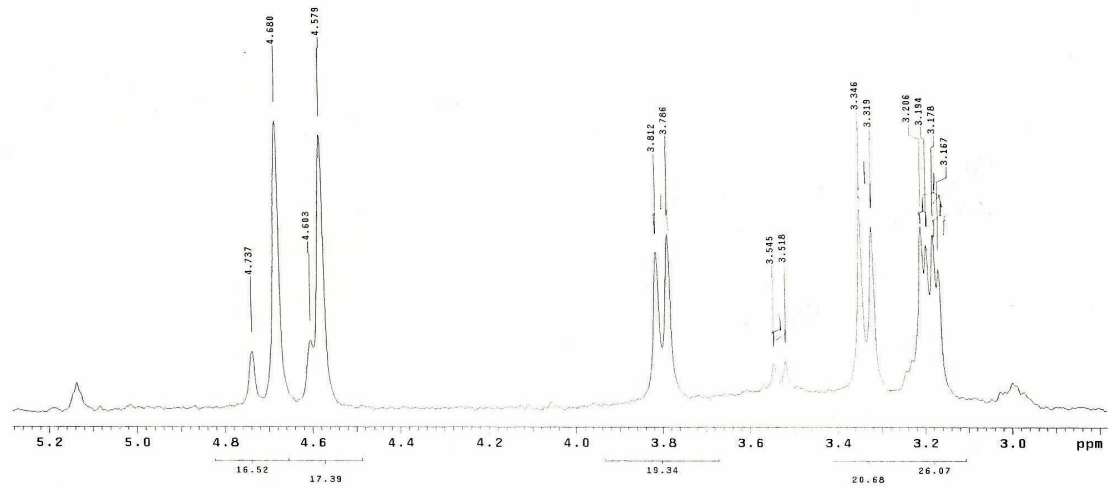
Pulse Sequence: s2pu1



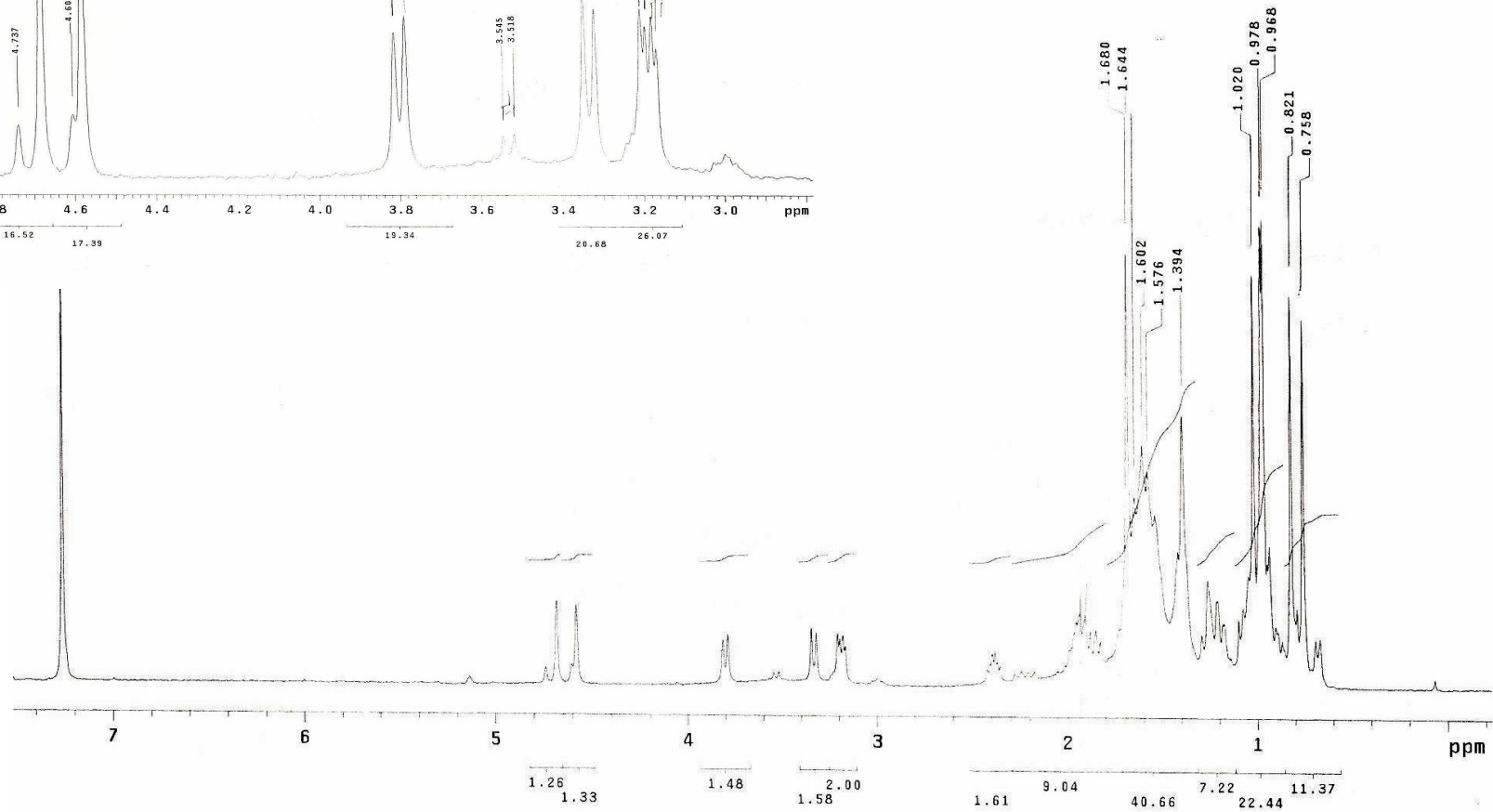
Anexo 8. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD/ CDCl_3) do ácido gálico (54).



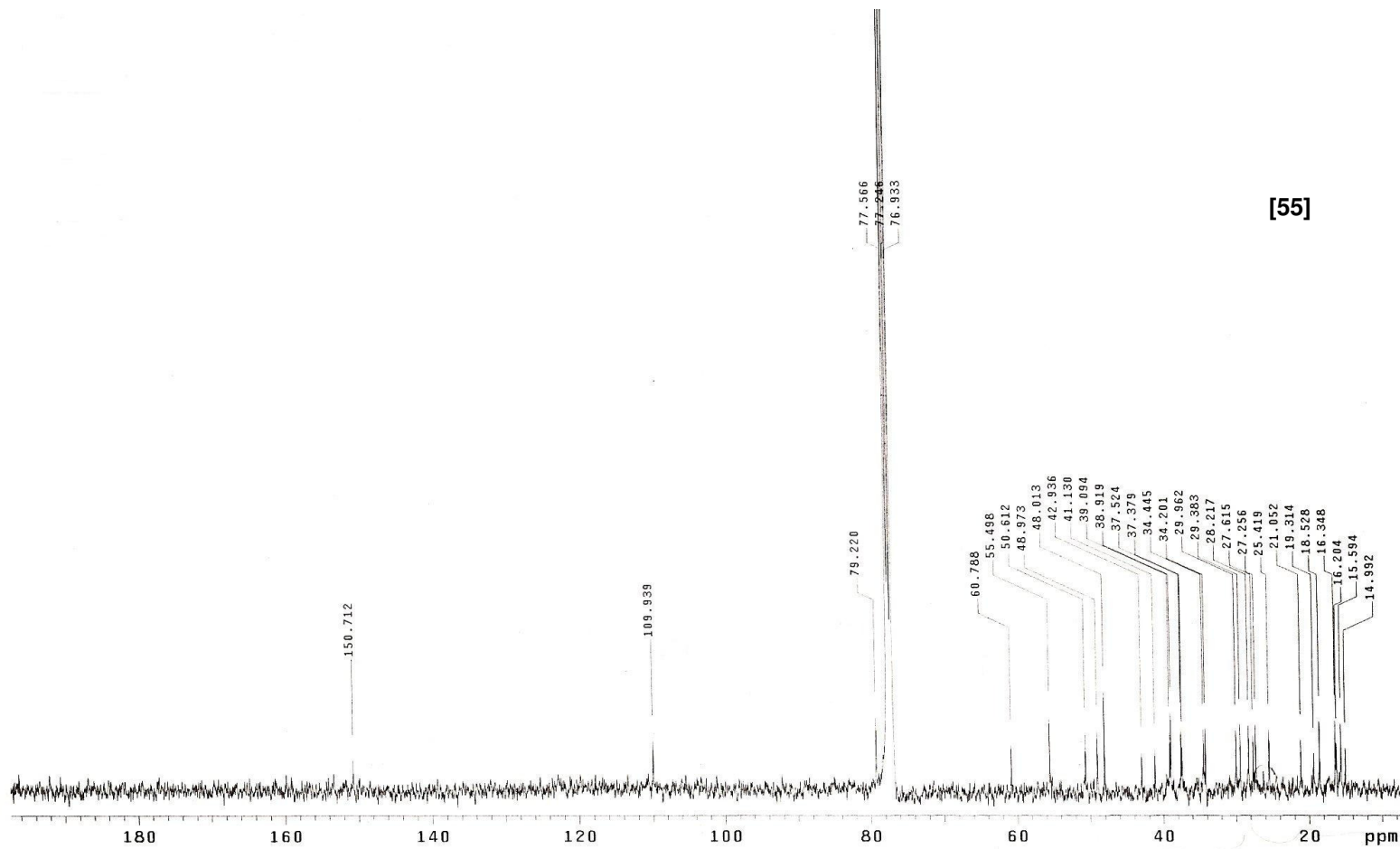
Anexo 9. Espectro de IV (KBr) do triterpeno betulina (55).



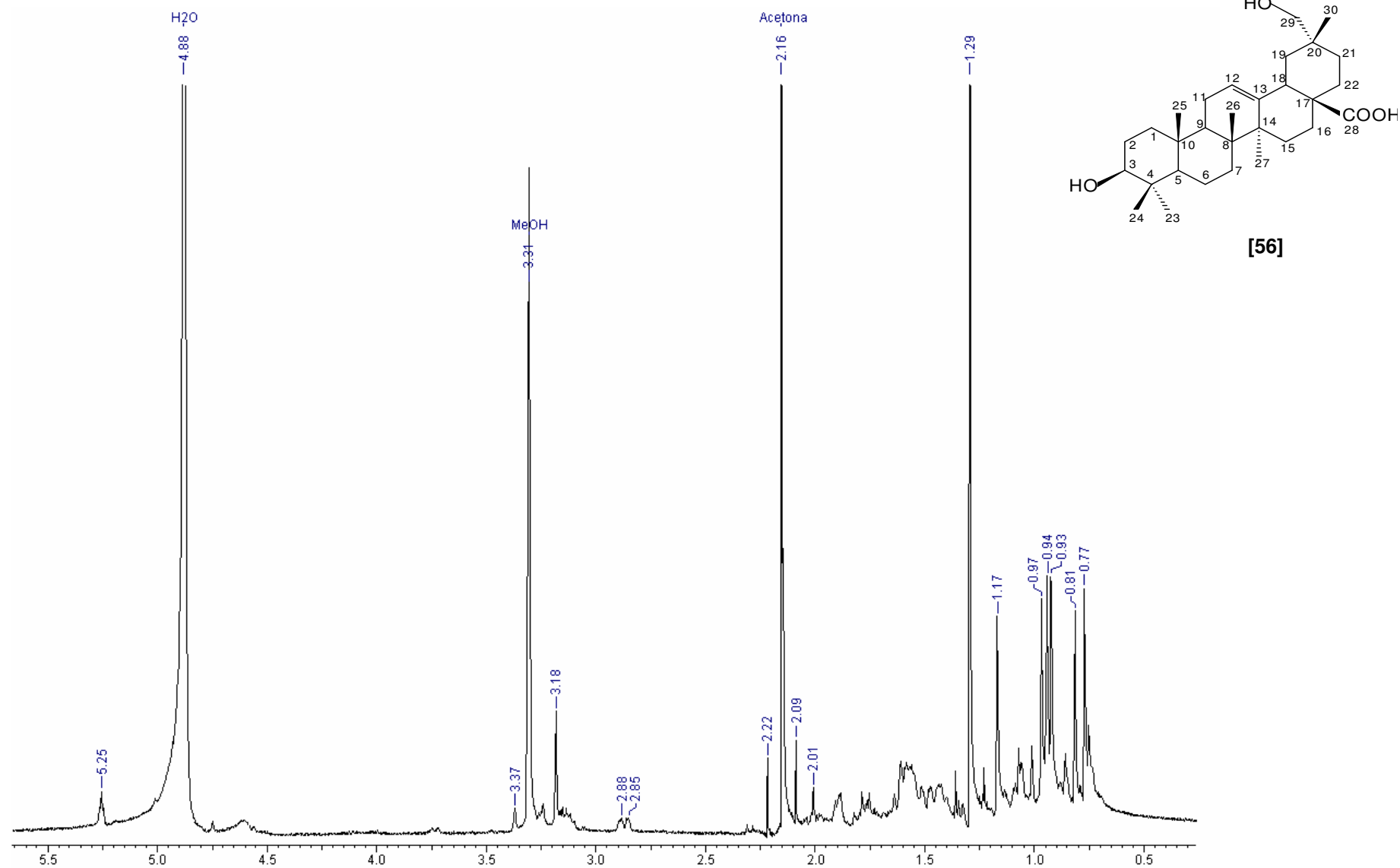
[55]



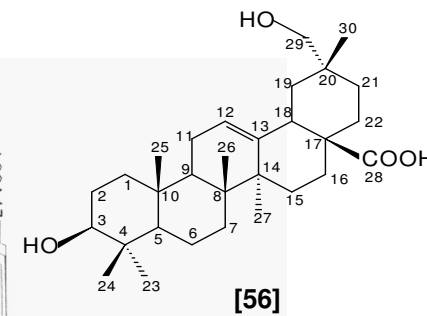
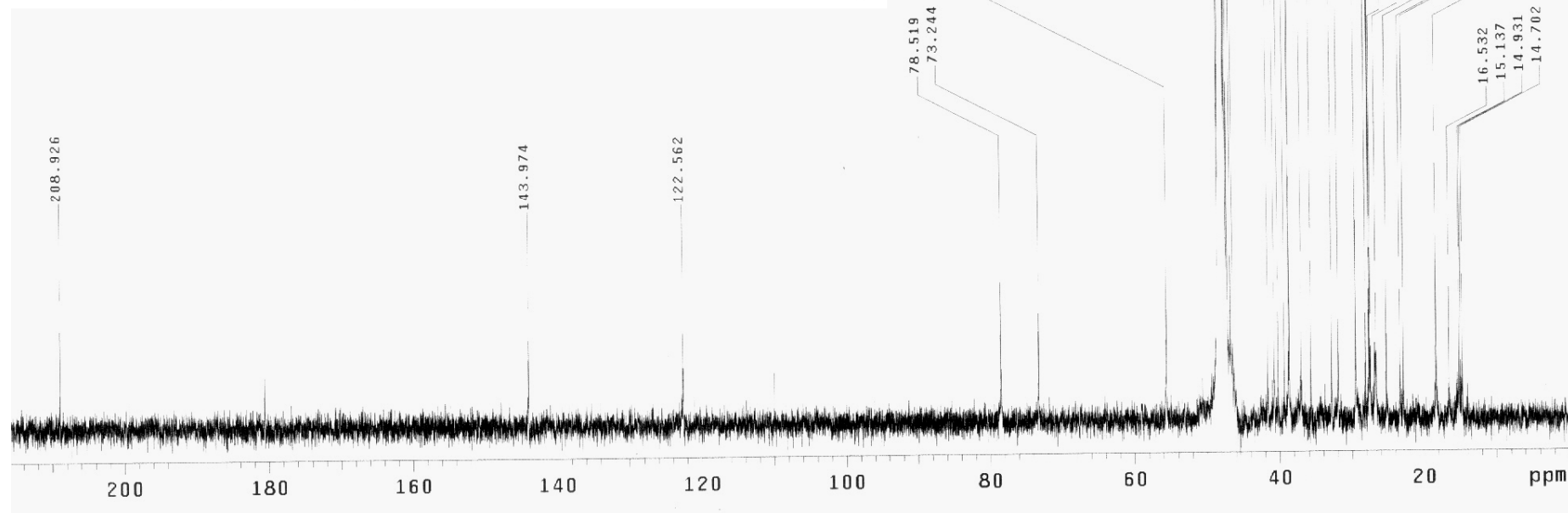
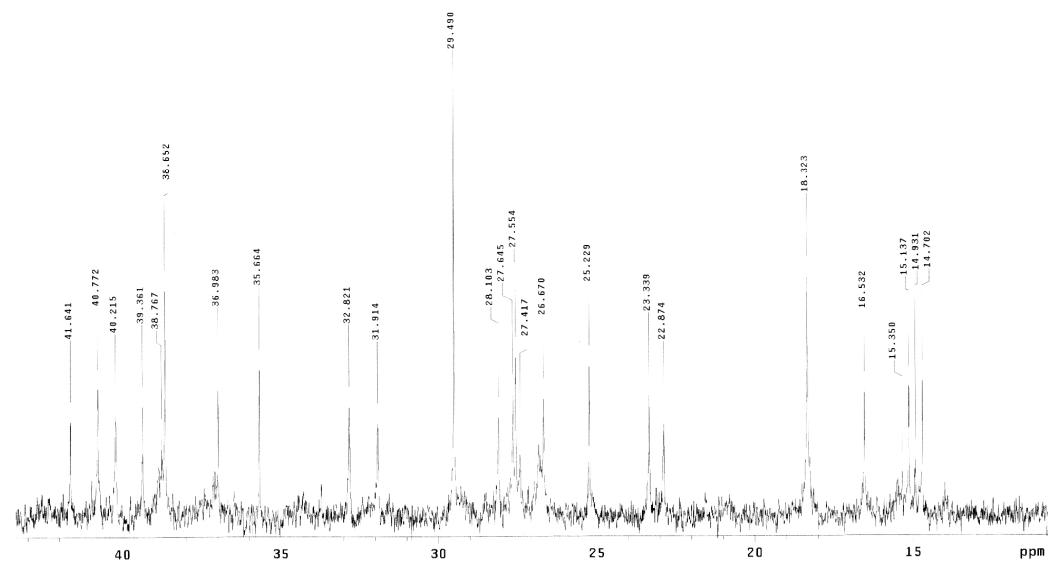
Anexo 10. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) do triterpeno betulina (55).



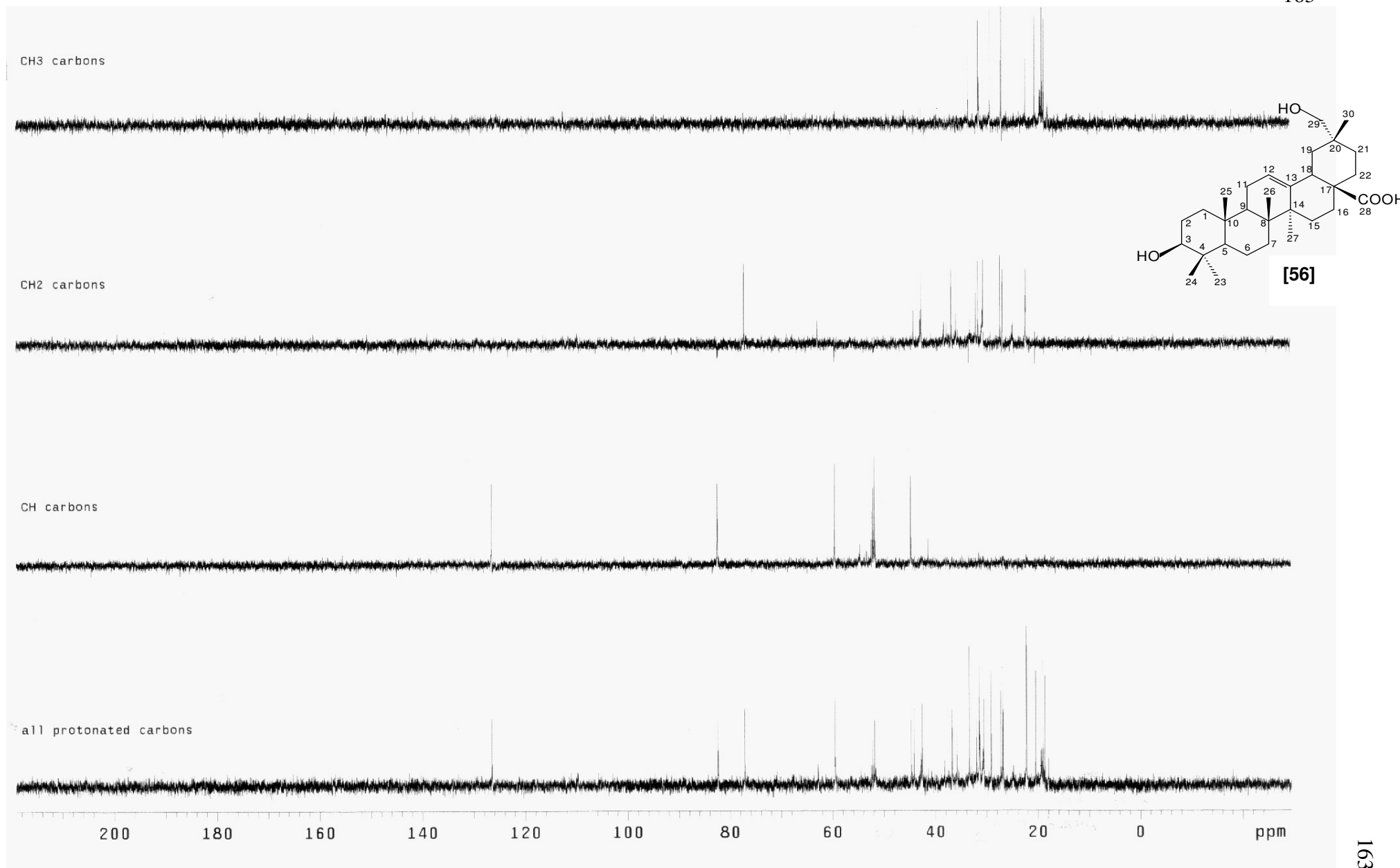
Anexo 11. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do triterpeno betulina (55).



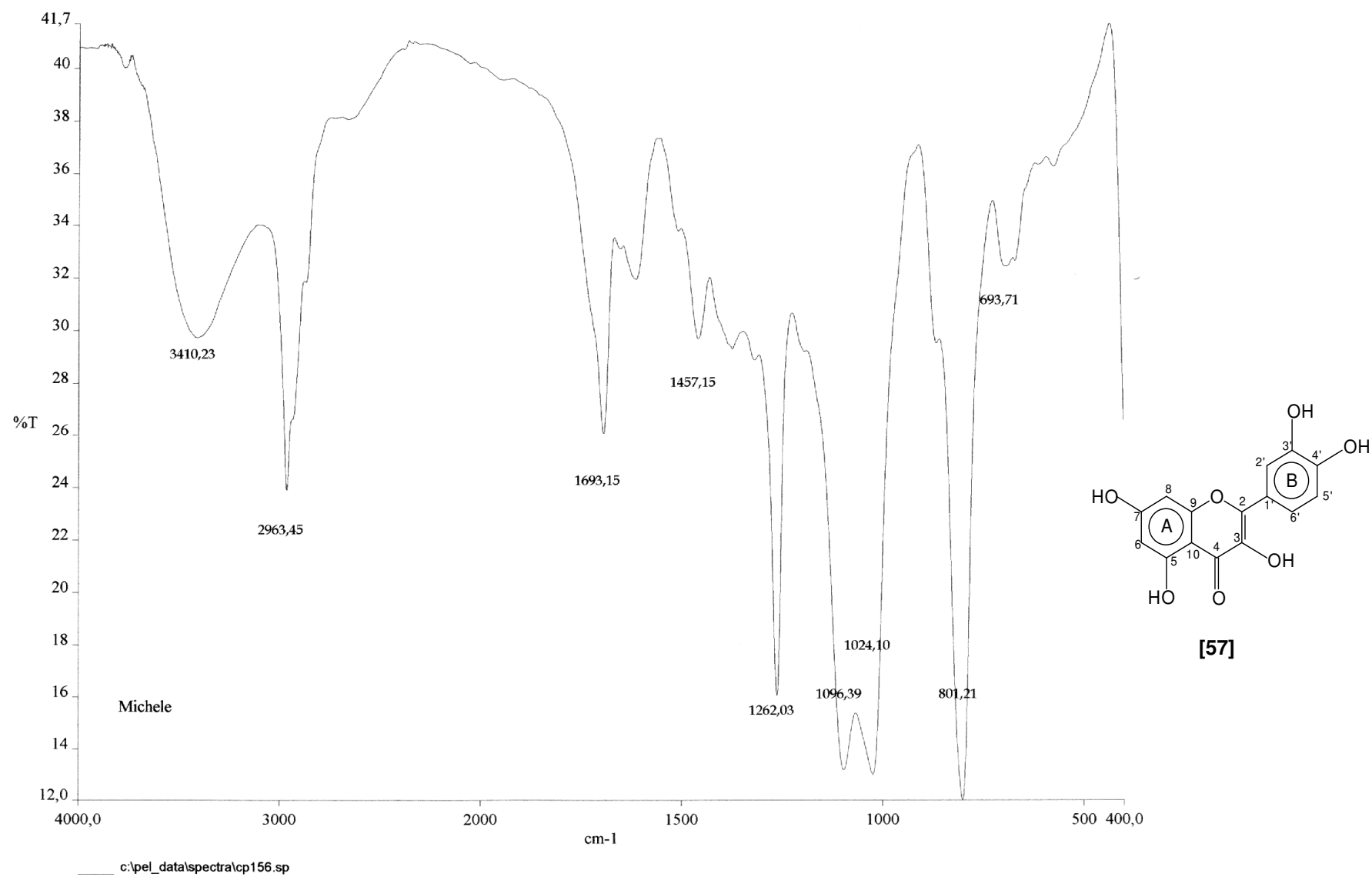
Anexo 12. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, MeOD) do ácido mesembriantemoidigênico (56).



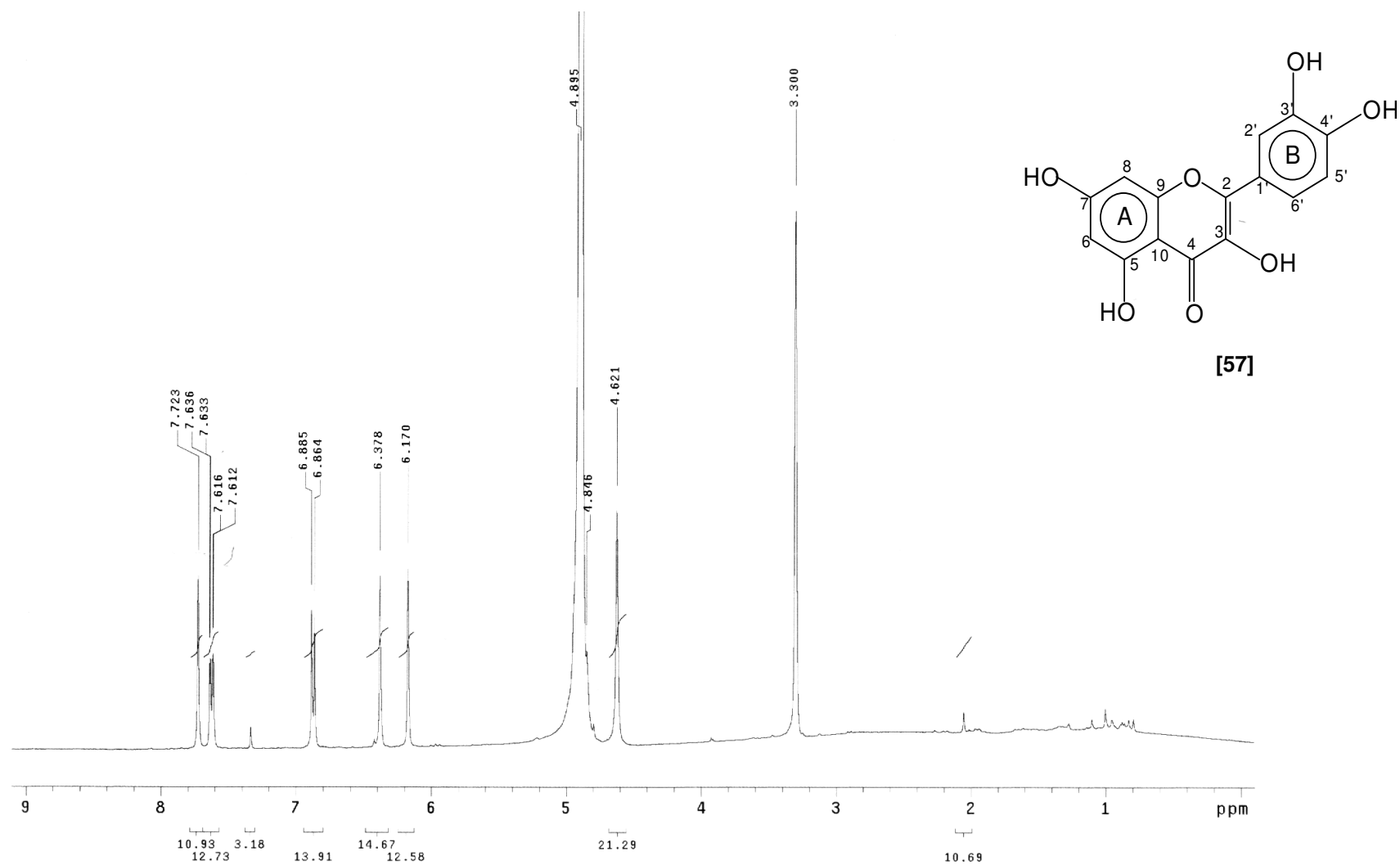
Anexo 13. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do ácido mesembriantemoidigênico (56).



Anexo 14. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT) (100 MHz, CDCl_3) do ácido mesembriantemoidigênico (56).

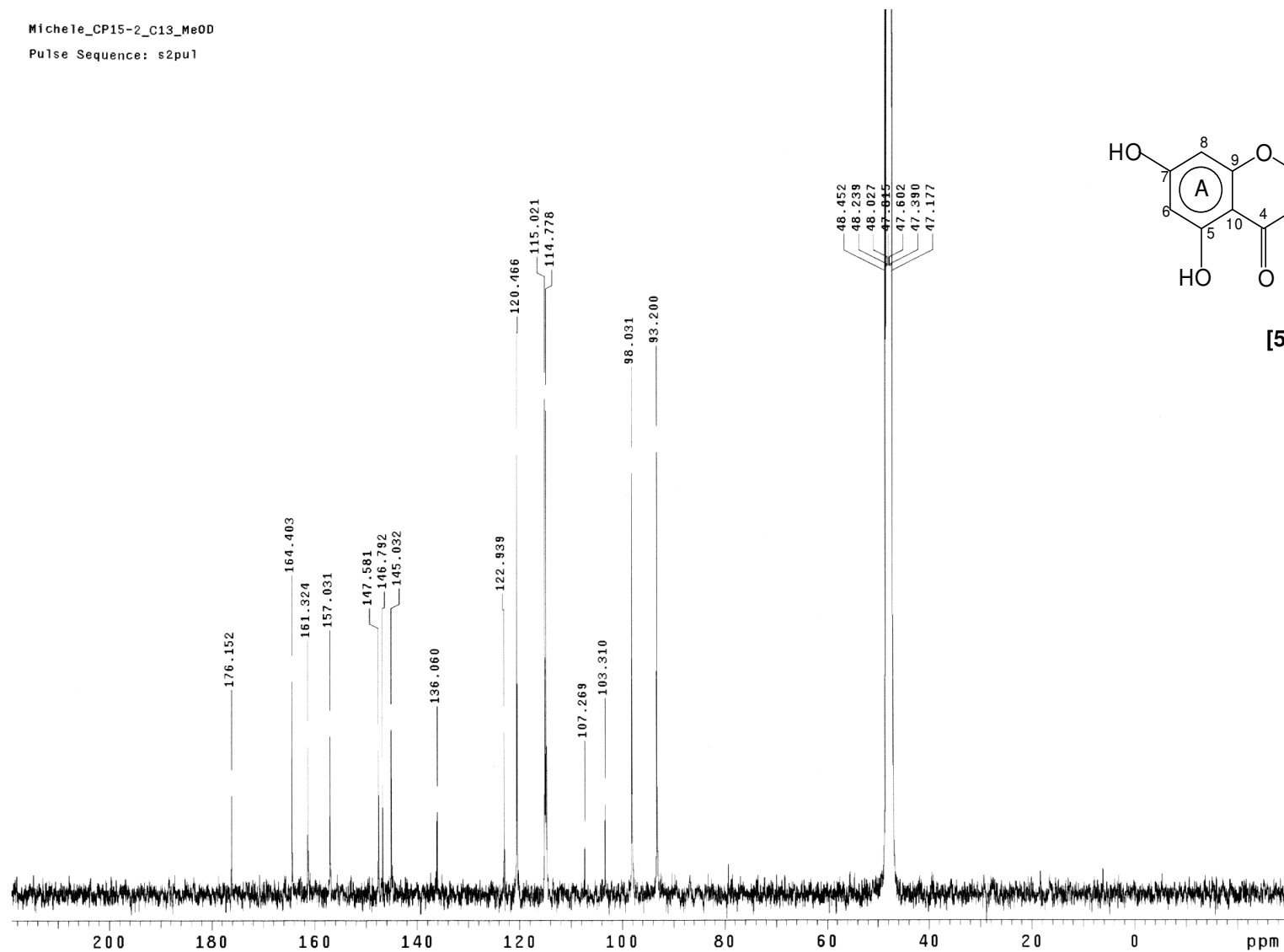


Anexo 15. Espectro de IV (KBr) do flavonóide quercetina (57).

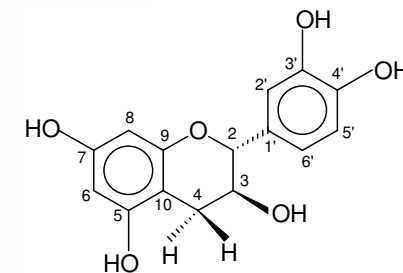
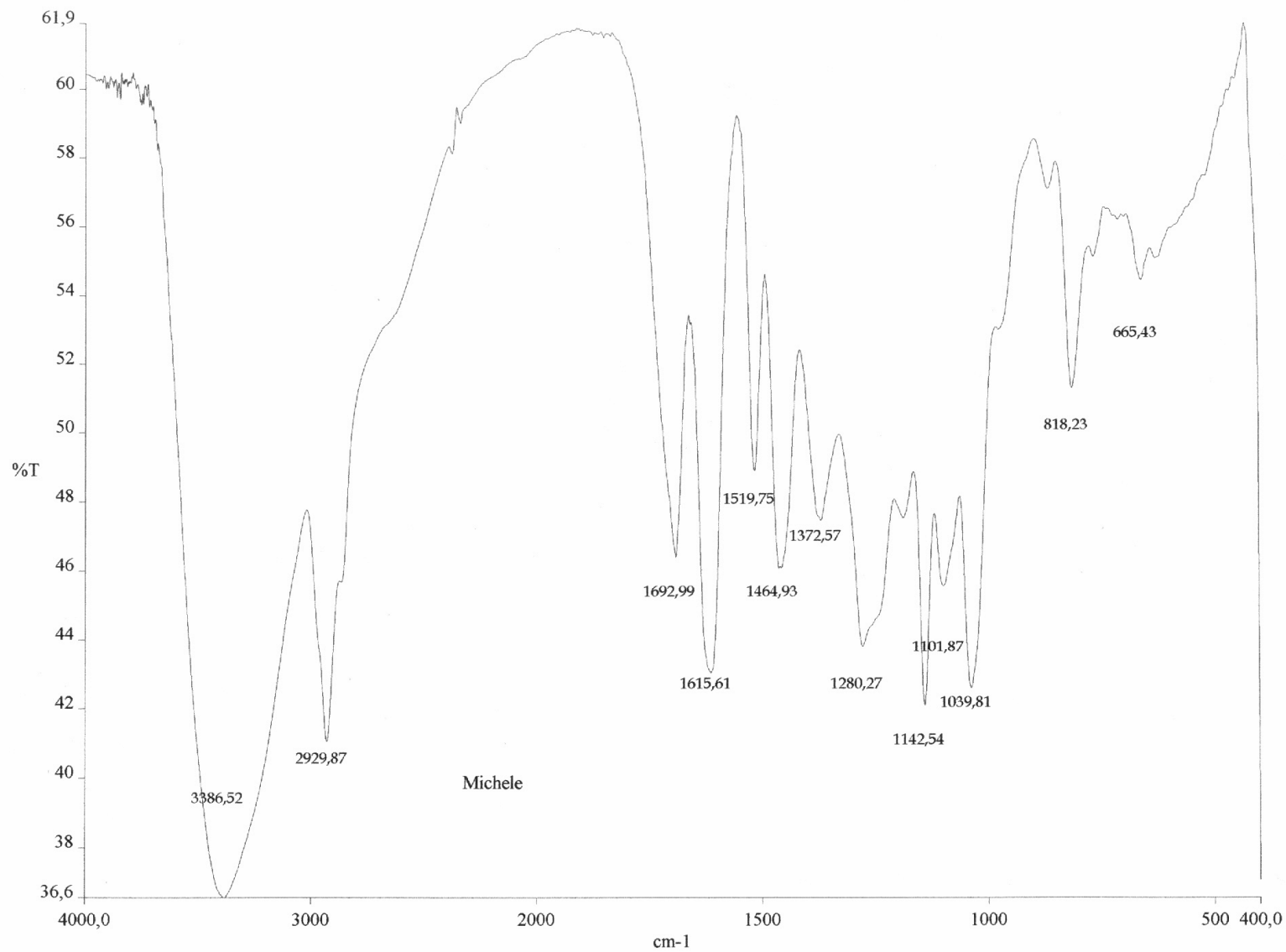


Anexo 16. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) do flavonóide quercetina (57).

Michele_CP15-2_C13_MeOD
Pulse Sequence: s2pu1



Anexo 17. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do flavonóide quercetina (57).



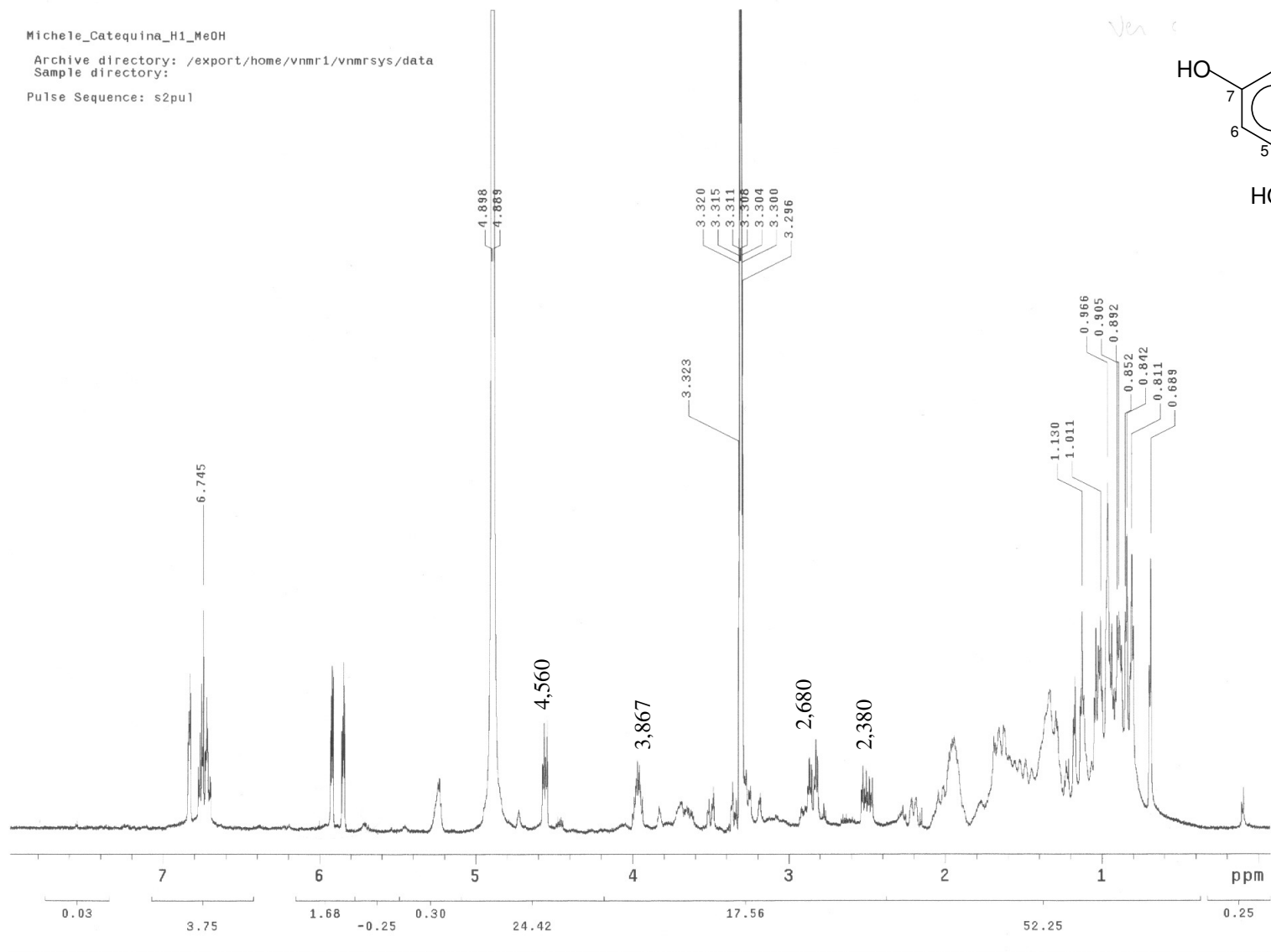
[58]

Anexo 18. Espectro de IV (KBr) da catequina (58).

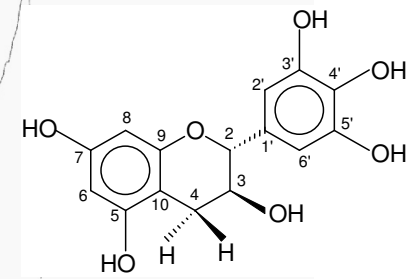
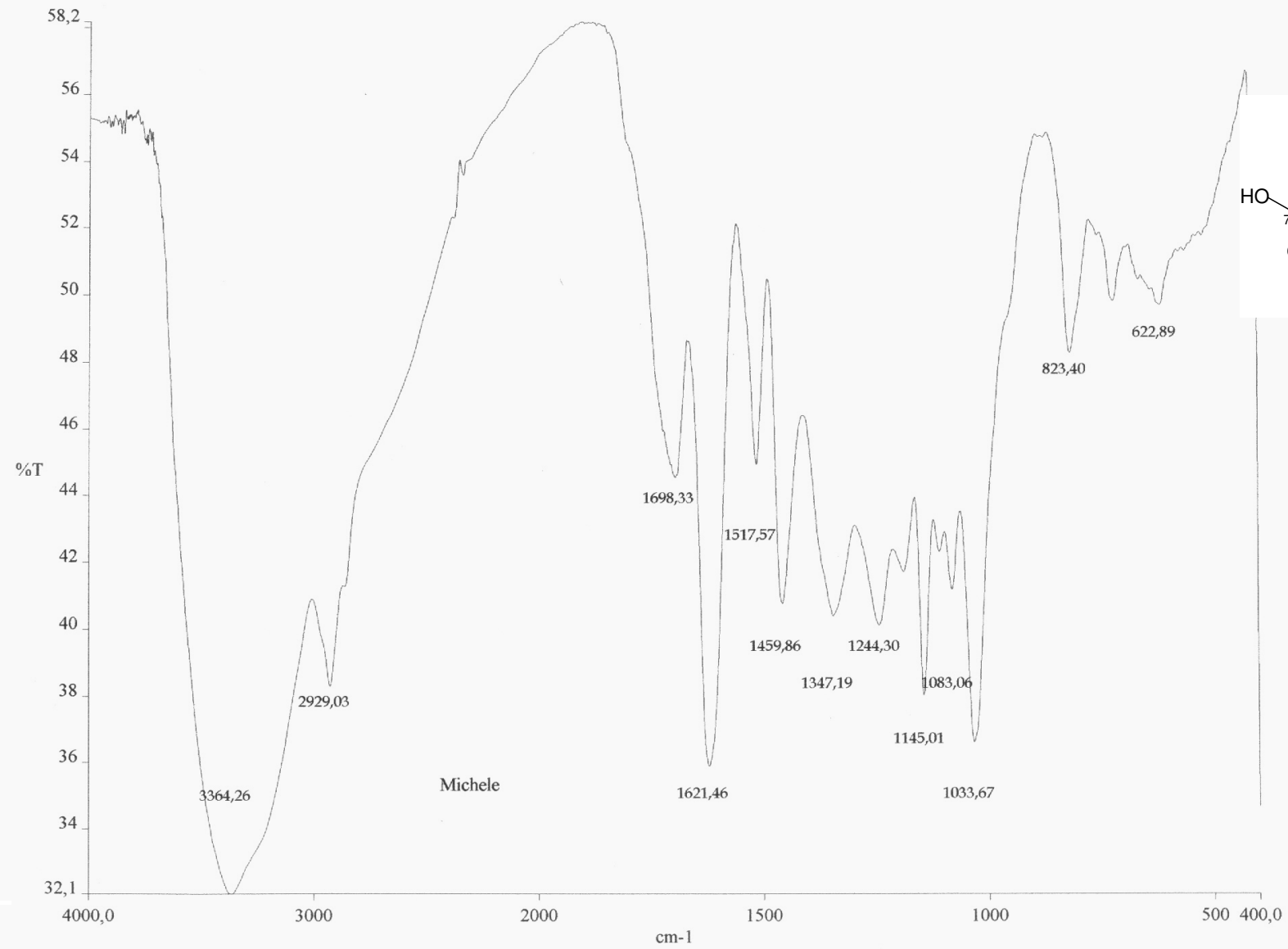
Michele_Catequina_H1_MeOH

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:

Pulse Sequence: s2pu1

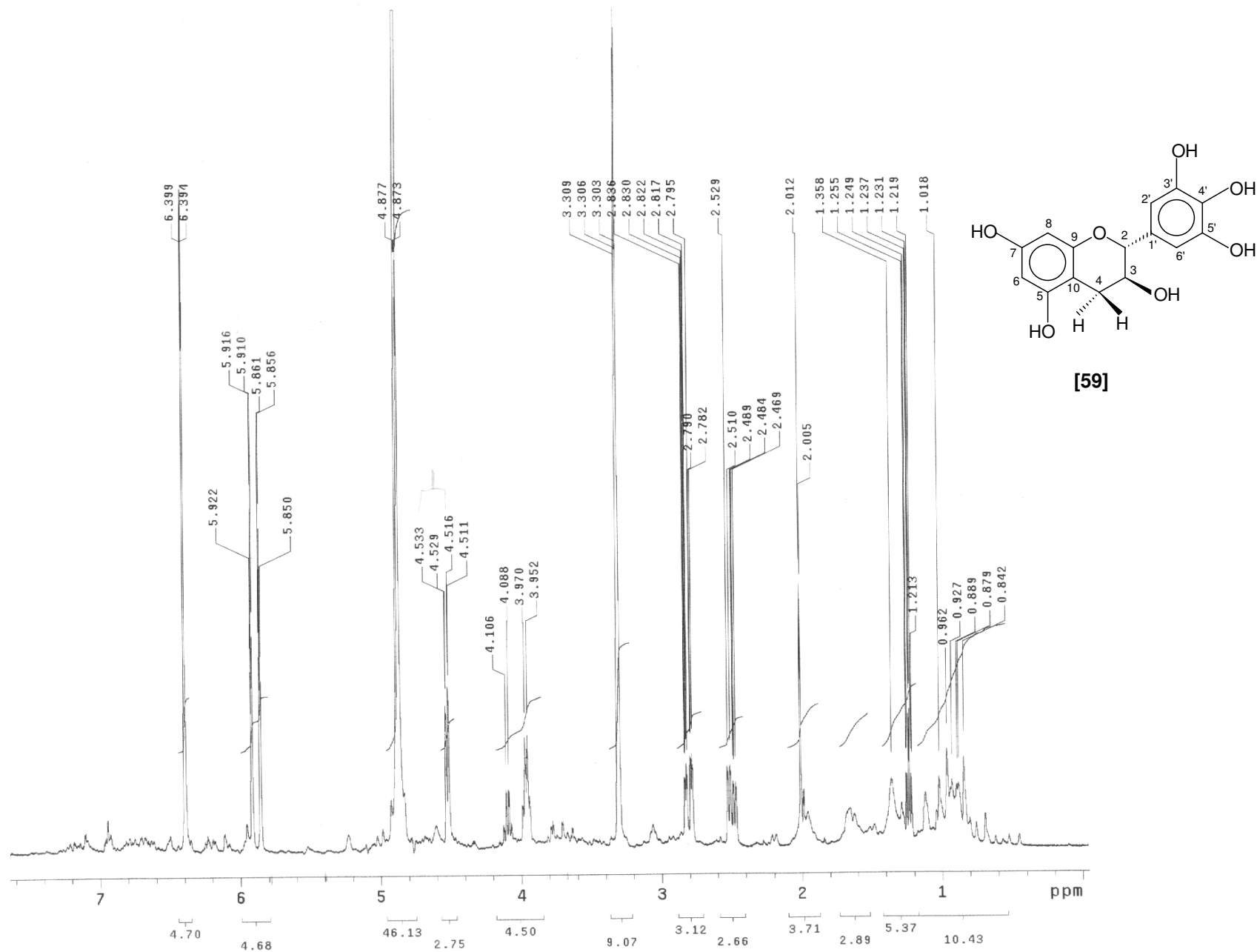


Anexo 19. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) da catequina (58).

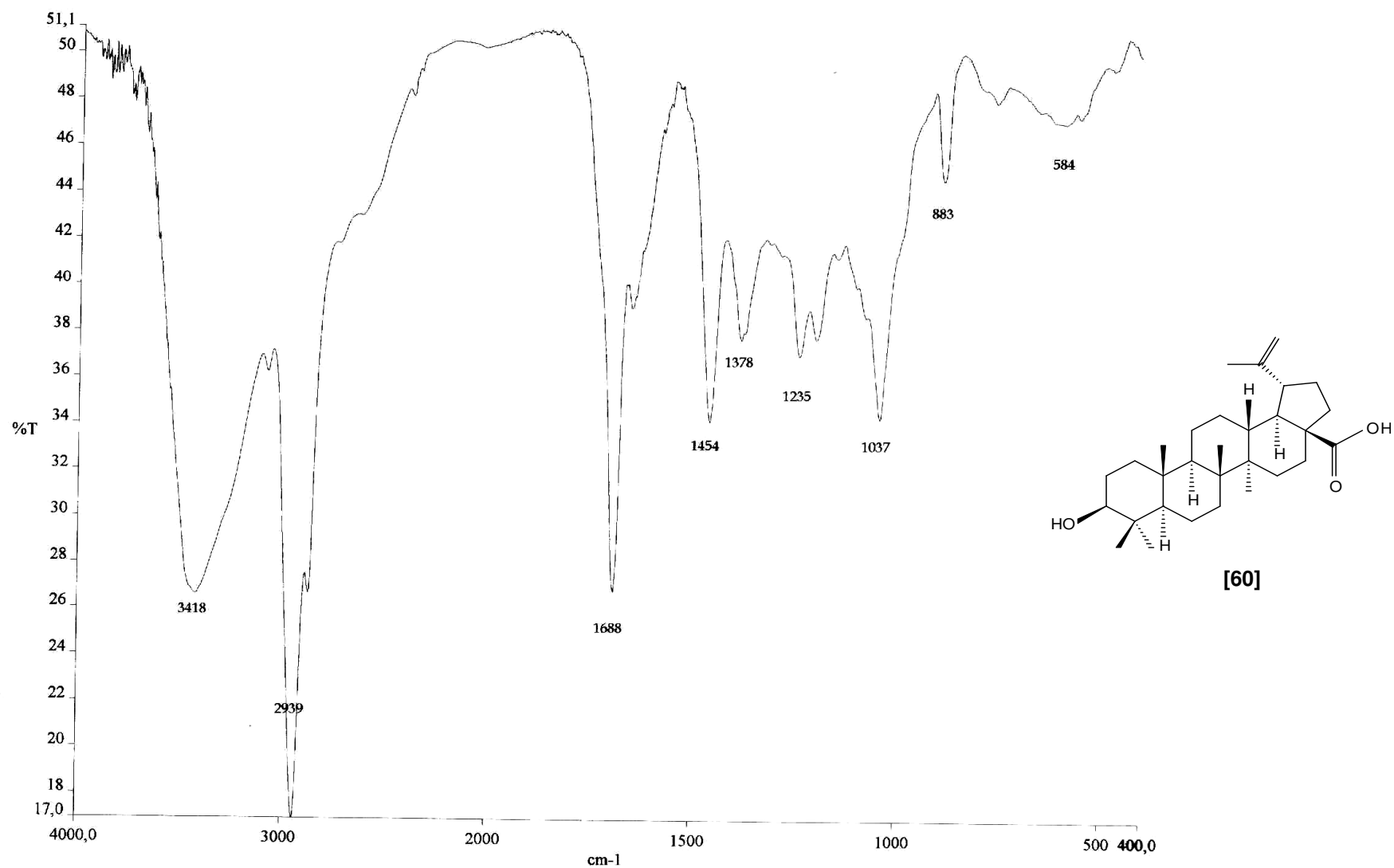


[59]

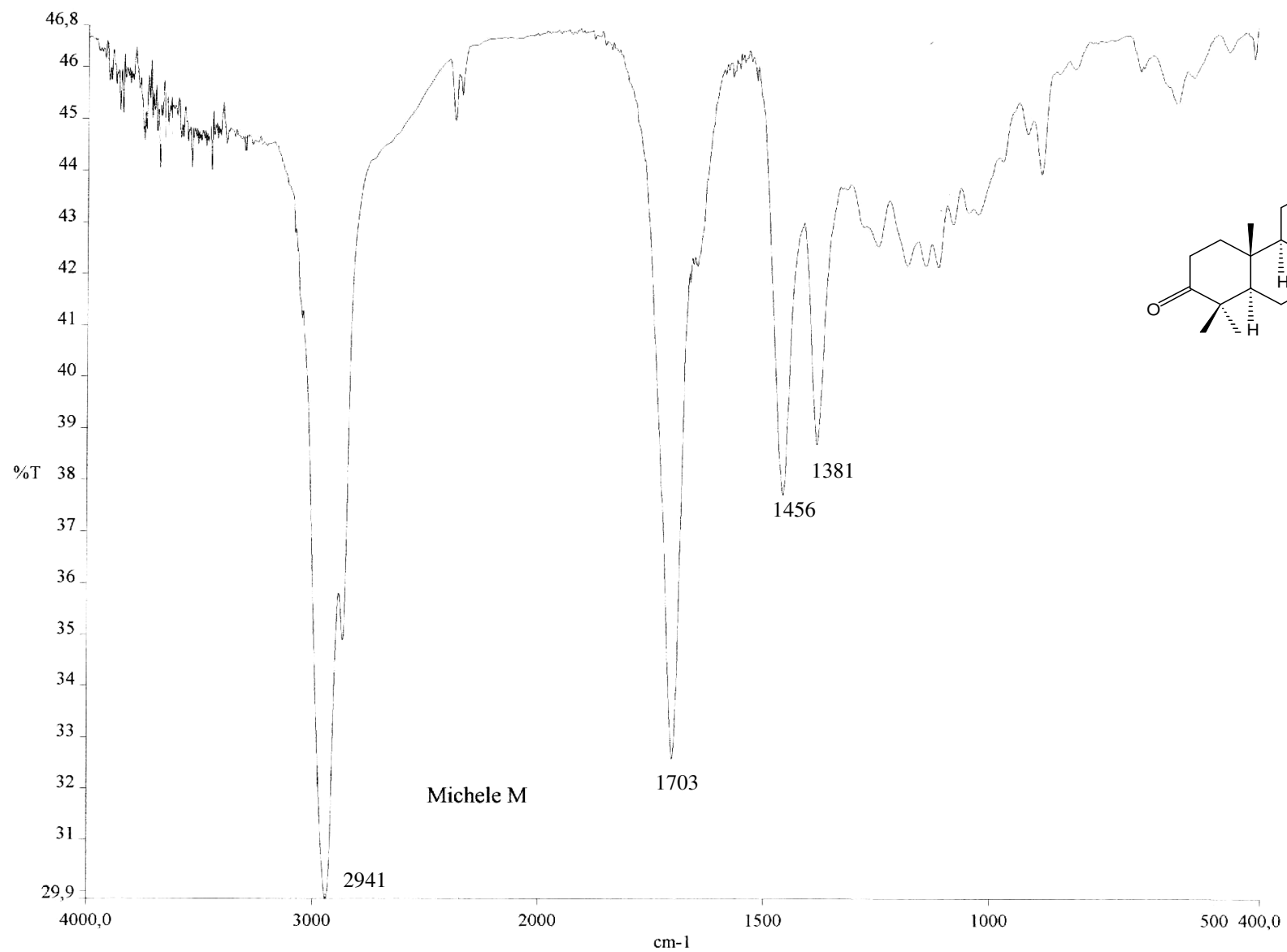
Anexo 20. Espectro de IV (KBr) da galocatequina (59).



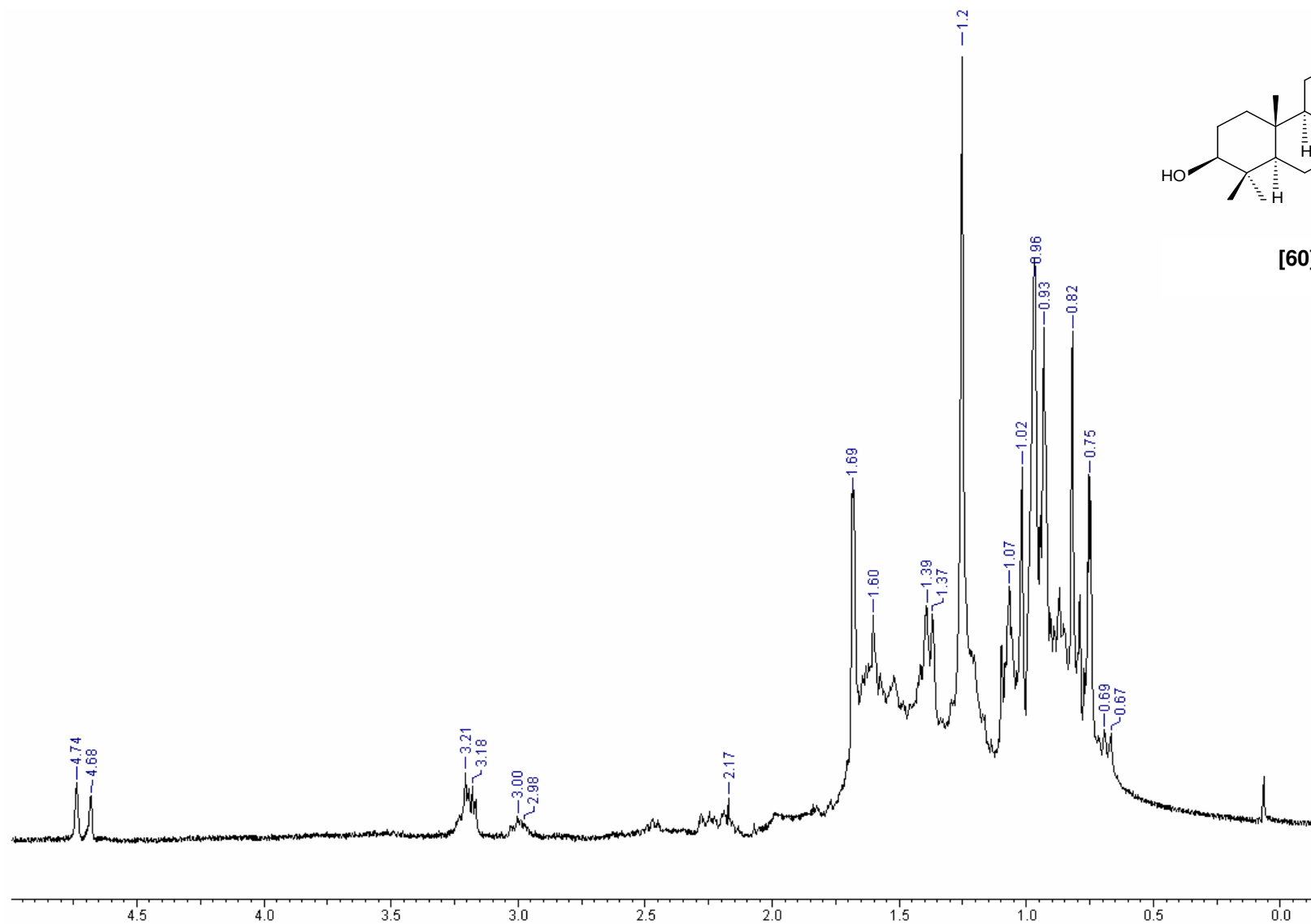
Anexo 21. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) da galocatequina (59).



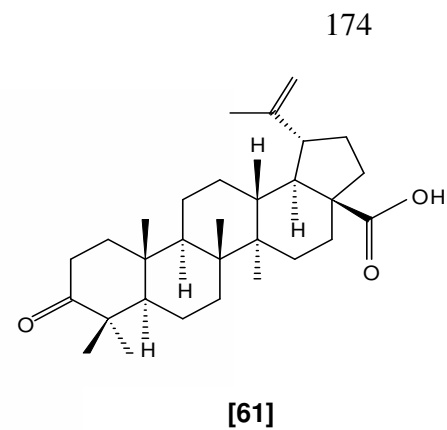
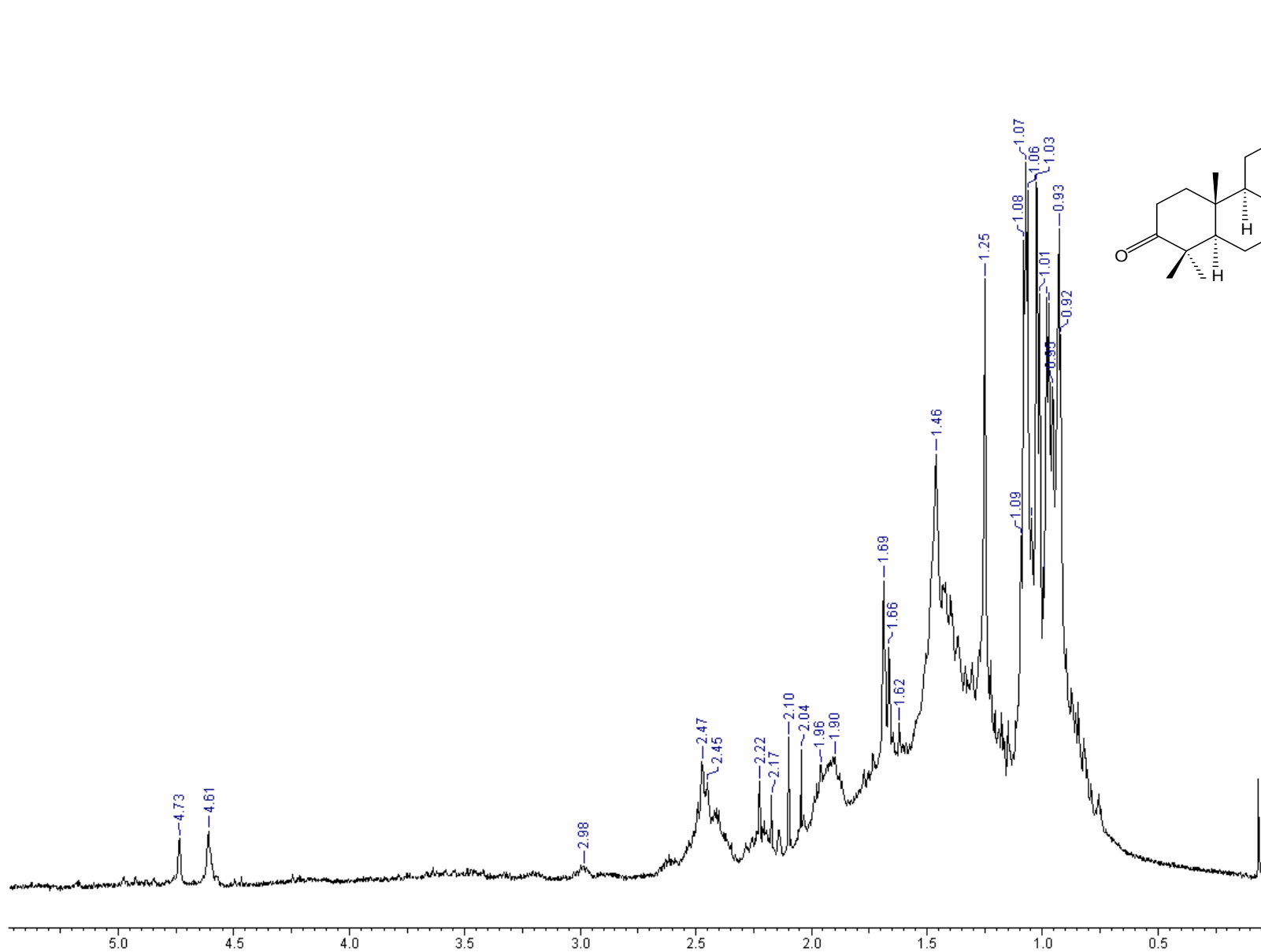
Anexo 22. Espectro de IV (KBr) do ácido betulínico (60).



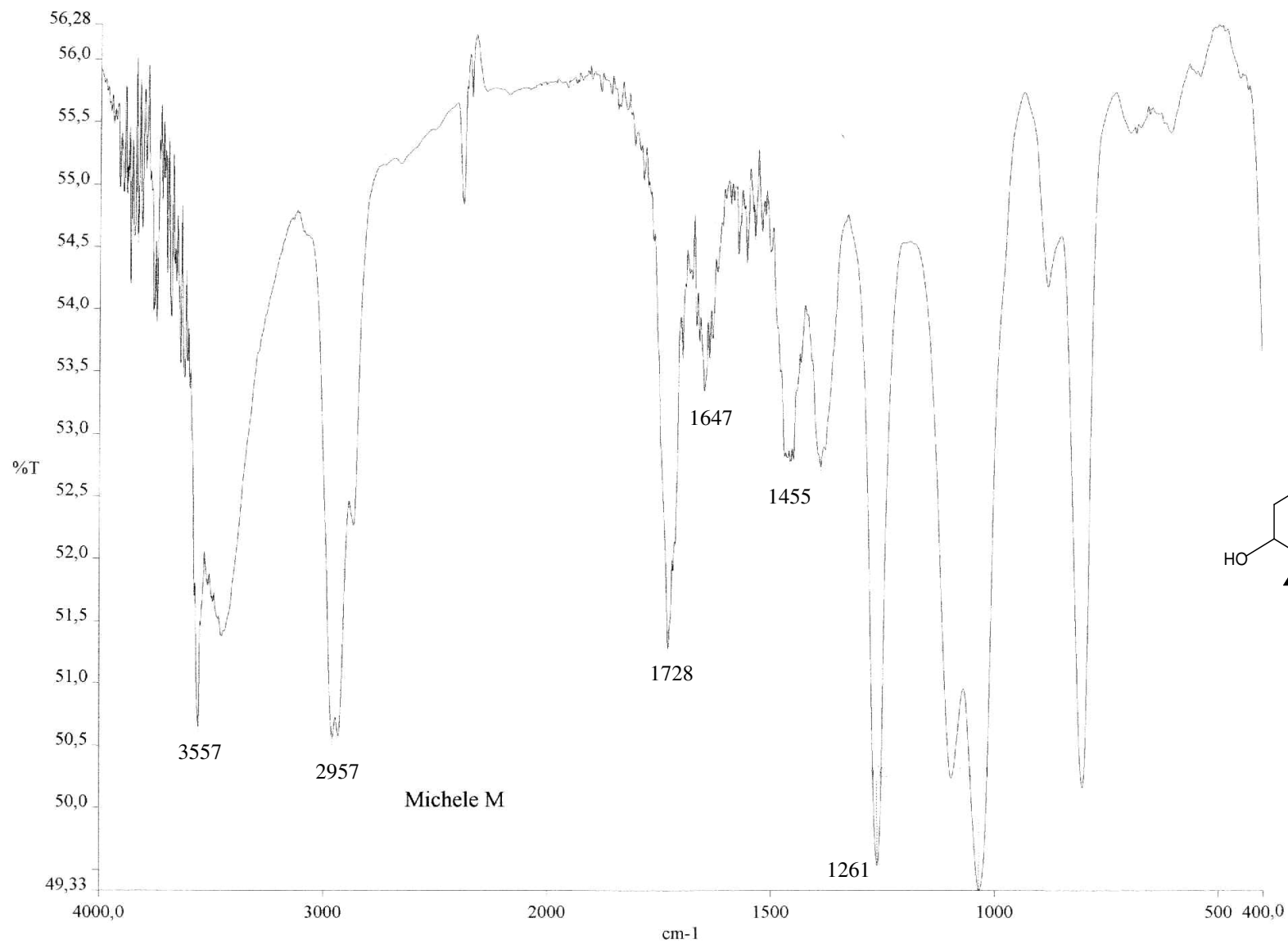
Anexo 23. Espectro de IV (KBr) do ácido betulônico (61).



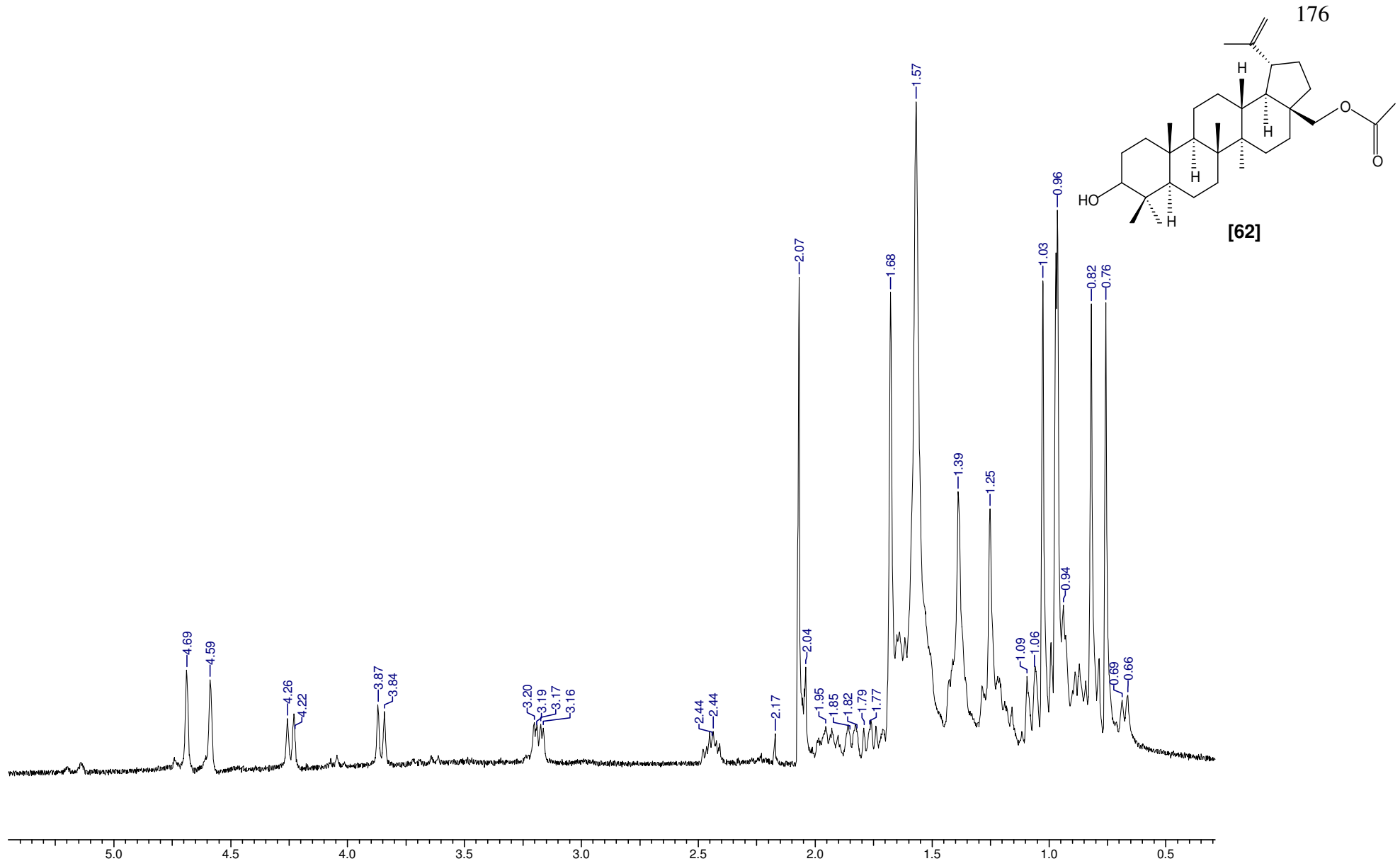
Anexo 24. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do ácido betulínico (60).



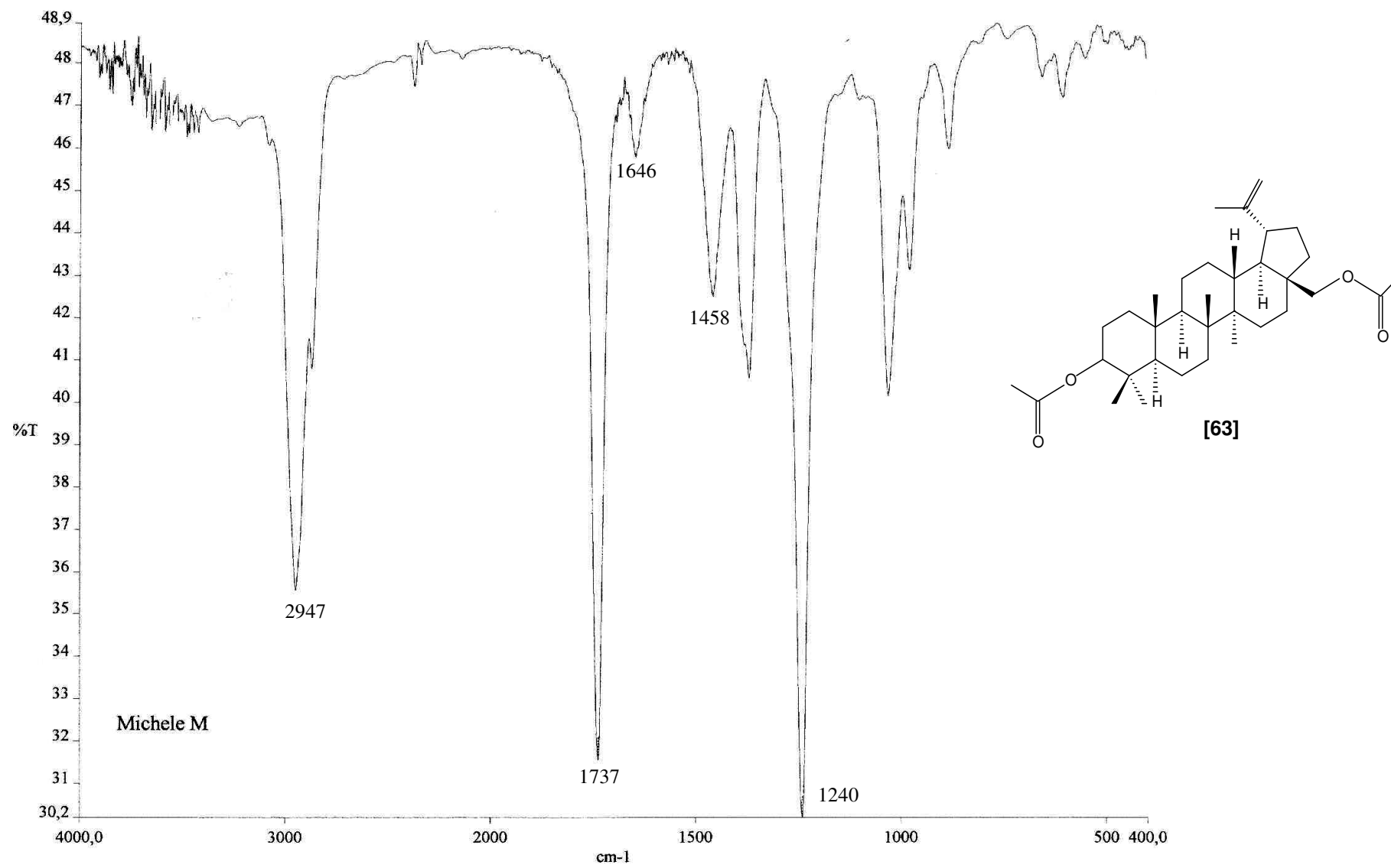
Anexo 25. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do ácido betulônico (**61**).



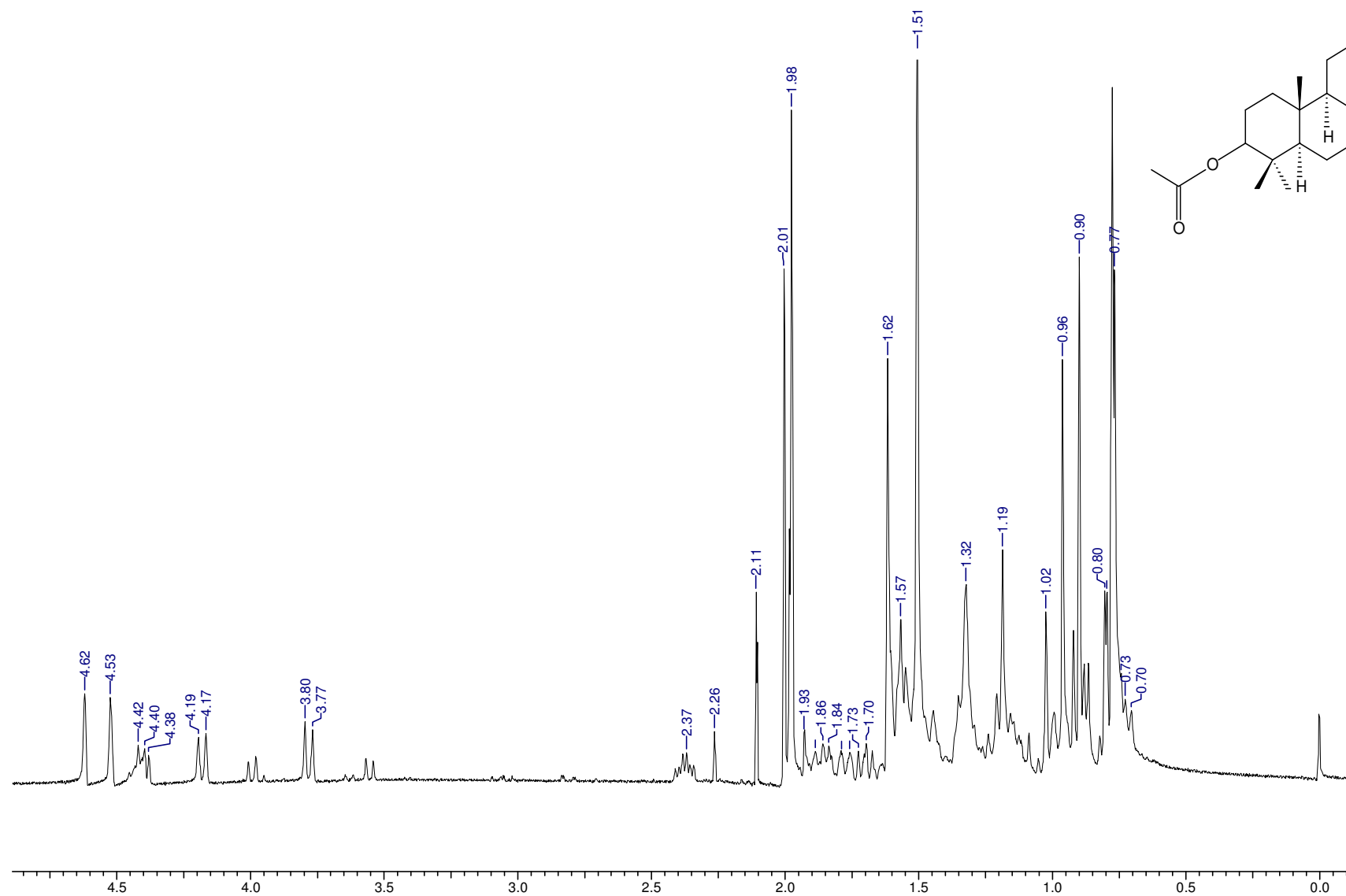
Anexo 26. Espectro de IV (KBr) do 28-acetato de betulina (62).



Anexo 27. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 28-acetato de betulina (62).



Anexo 28. Espectro de IV (KBr) do 3,28-acetato de betulina (63).



Anexo 29. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,28-acetato de betulina (63).