

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DE *Eugenia copacabanensis*
Kiaersk (Myrtaceae) E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIOXIDANTE
E ANTIMICROBIANA**

ALMIR RIBEIRO DE CARVALHO JUNIOR

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DE *Eugenia copacabanensis*
Kiaersk (Myrtaceae) E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIOXIDANTE
E ANTIMICROBIANA**

ALMIR RIBEIRO DE CARVALHO JUNIOR

Sob a orientação do professor
Dr. MÁRIO GERALDO DE CARVALHO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica.

Seropédica, RJ
Março de 2013

547
C331m
T

Carvalho Junior, Almir Ribeiro de,
1987-

Metabólitos especiais isolados de
Eugenia copacabanensis Kiaersk
(Myrtaceae) e avaliação de
atividades antioxidante e
antimicrobiana / Almir Ribeiro de
Carvalho Junior. - 2013.
146 f.: il.

Orientador: Mário Geraldo de
Carvalho.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Química, 2013.
Bibliografia: f. 115-126.

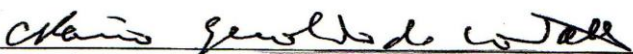
1. Química orgânica - Teses. 2.
Plantas - Composição - Teses. 3.
Plantas medicinais - Teses. 4.
Antioxidantes - Teses. 5. Eugênia
(Planta) - Teses. I. Carvalho,
Mário Geraldo de, 1952-. II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Curso de Pós-Graduação
em Química. III. Título.

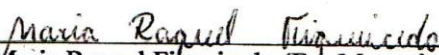
UNIVERSIDADE FEDEAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA


ALMIR RIBEIRO DE CARVALHO JUNIOR

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de *Mestre em Ciências* no Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração Química Orgânica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 01 / 03 / 2013


Dr. Mário Geraldo de Carvalho (DEQUIM-ICE-UFRRJ)
(Orientador)


Dra. Maria Raquel Figueiredo (Far-Manguinhos/FIOCRUZ)
(Membro Titular)


Dr. Rodrigo Rodrigues de Oliveira (CCT-LCQui-UENF)
(Membro Titular)

Dra. Márcia Cristina Campos de Oliveira (DEQUIM-ICE-UFRRJ)
(Membro Suplente)

*Aos meus pais, Almir e Irani, e irmãos Cristiano, Adriano e Fabiano,
pelo amor, dedicação, cuidados e ensinamentos.*

*Á Rafaela pelo amor, incentivos
e companherismo*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e motivação, para alcançar meus objetivos.

Ao professor Dr. Mario Geraldo de Carvalho pela gentil orientação, ensinamentos, atenção e paciência, dedicados durante a realização deste trabalho.

A Geovany A. Gomes, por ceder os extratos para os estudos, além de outras contribuições.

À professora Dra. Rosane Nora Castro, pela ajuda nas análises em HPLC, dentre outras contribuições.

À professora Dra. Daniela Sales Alviano e aluna Paula Monteiro (Laboratório de Estrutura de Superfície de Microorganismo-UFRJ) pelos ensaios antimicrobianos.

Aos professores do PQ, por sempre estarem dispostos a ajudar, em diversas ocasiões.

A todos os técnicos do PQ, pelas análises realizadas.

Aos amigos do LQPN, Débora, Mirza, Priscila, Daiane, Tereza, Marcelo, Ceará, Ana Paula, pela amizade e convivência agradável.

A Carolina, Marcela, Cristiane, Sabrina e Mariana, pela amizade e ajuda nos estudos.

A Rafaela O. Ferreira, pela ajuda nos ensaios de atividades antioxidante e teor de flavonoides, dentre outras colaborações.

Aos estagiários, Tarso, Douglas e Giuliano, pela amizade e ajuda na execução desse trabalho.

Aos amigos Leandro, Leilson, Rafael e Jeferson pelos momentos de alegria e descontração.

Aos meus pais, irmãos e familiares pelo apoio e incentivo.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

1D	unidimensional
AcOEt	acetato de etila
Ara	arabinosideo
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CDCl ₃	clorofórmio delterado
CD ₃ OD	metanol deuterado
CG-EM	cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
COSY	Correlation Espectroscopy
d	dupleto
dd	duplo dupleto
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
EM	espectrometria de massas
EMF	extrato metanólico das folhas
EMF-B	fração em butanol do extrato metanólico das folhas
EMF-D	fração em diclorometano do extrato metanólico das folhas
EMF-H	fração hexânica do extrato metanólico das folhas
EMG	extrato metanólico dos galhos
EMG-Ae	fração em acetato de etila do extrato metanólico dos galhos
EMG-B	fração em butanol do extrato metanólico dos galhos
EMG-D	fração em diclorometano do extrato metanólico dos galhos
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	multipleto
m/z	relação massa/carga

M ⁺	íon molecular
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
OMe	metoxila
P-EMF	precipitado do extrato metanólico das folhas
P-EMG	precipitado do extrato metanólico dos galhos
pf	ponto de fusão
Ram	raminosídeo
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de próton
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono -13
s	simpleto
t	triplete
TMS	trimetilsilano
TR	tempo de retenção
δ _C	deslocamento químico de carbono
δ _H	deslocamento químico de hidrogênio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de espécies do gênero <i>Eugenia</i> com frutos comestíveis.	3
Figura 2. Alguns triterpenos e esteroides isolados do gênero <i>Eugenia</i>	10
Figura 3. Alguns flavonoides isolados de espécies do gênero <i>Eugenia</i>	14
Figura 4. Alguns taninos isolados do gênero <i>Eugenia</i>	17
Figura 5. Folhas, flores e frutos de <i>Eugenia copacabanensis</i>	20
Figura 6. Reação de acetilação do composto 8: obtenção do paroduto 8a.....	26
Figura 7. Reação de metilação do composto 8a: obtenção do composto 8b.....	26
Figura 8. Estruturas das substâncias isoladas de folhas e galhos de <i>E. copacabanensis</i>	32
Figura 9. Espectro de RMN (500 MHz, CDCl ₃) de 1 e 2.	34
Figura 10. Expansão do espectro de ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) de 1 e 2 (2,0 a 5,3 ppm)..	34
Figura 11. Expansão do espectro de ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) de 1 e 2 (0,75 a 1,15 ppm).	35
Figura 12. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 1 e 2.....	35
Figura 13. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 1 e 2 (12,0 a 50,0 ppm).	36
Figura 14. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) de 3.....	37
Figura 15. Expansão do espectro de ¹ H RMN (500 MHz, DMSO-d ₆) de 3 (0,45 a 1,65 ppm).	38
Figura 16. Espectro de DEPTQ (125 MHz, DMSO-d ₆) de 3.....	38
Figura 17. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, DMSO-d ₆) de 3 (15 a 30 ppm).	39
Figura 18. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 4.....	41
Figura 19. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 4 (3,1 a 4,7 ppm).	41
Figura 20. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 4. de (0,6a 1,75 ppm). 42	42
Figura 21. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 4.	42
Figura 22. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 4 (15 a 28 ppm).....	43
Figura 23. Cromatograma de 4.....	43
Figura 24. Espectro de massas de 4.	44

Figura 25. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 5.	46
Figura 26. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 5 (2,95 a 4,20 ppm). ..	46
Figura 27. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 5 (0,80 a 1,15 ppm). ..	46
Figura 28. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 5.	47
Figura 29. Espectro de HMQC (500 MHz, CDCl ₃) de 5.	47
Figura 30. Expansão do espectro de HMQC (500 MHz, CDCl ₃) de 5 (0,4 a 2,4 ppm).	48
Figura 31. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de 5.	48
Figura 32. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de 5 (3,15 a 4,05).	49
Figura 33. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de 5.	49
Figura 34. Espectro de NOE-1D (500 MHz, CDCl ₃) de 5, irradiação na frequência do H-2. 50	
Figura 35. Espectro de NOE-1D (500 MHz, CDCl ₃) de 5, irradiação na frequência do H-9. 50	
Figura 36. Espectro de NOE-1D (500 MHz, CDCl ₃) de 5, irradiação na frequência do H-13.	51
Figura 37. Espectro de NOE-1D (500 MHz, CDCl ₃) de 5, irradiação na frequência do H-14.	51
Figura 38. Espectro de NOE-1D (500 MHz, CDCl ₃) de 5, irradiação na frequência do H-15.	51
Figura 39. Correlações observadas através dos experimentos de NOE e HMBC.	52
Figura 40. Cromatograma da mistura das substâncias 5, 6 e 7.	52
Figura 41. Espectro de Massas de 5.	52
Figura 42. Espectro de massas de 6 e comparação com a biblioteca do aparelho.	54
Figura 43. Espectro de massas de 7 e comparação com a biblioteca do aparelho.	55
Figura 44. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 6 e 7.	55
Figura 45. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) de 8.	57
Figura 46. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) de 8 (2,0 a 5,5 ppm). ..	57
Figura 47. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) de 8 (0,55 a 1,15 ppm).	58
Figura 48. Espectro de DPTQ (125 MHz, DMSO-d ₆) de 8.	58

Figura 49. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, DMSO-d ₆) de 8 (13,0 a 35,0 ppm).	59
Figura 50. Espectro de HMQC (500 MHz, DMSO-d ₆) de 8.....	59
Figura 51. Expansão do espectro de HMQC (500 MHz, DMSO-d ₆) de 8 (1,80 a 5,80 ppm). 60	
Figura 52. Expansão do espectro de HMQC (500 MHz, DMSO-d ₆) de 8 (0,40 a 2,80 ppm). 60	
Figura 53. Espectro de HMBC (500 MHz, DMSO-d ₆) de 8.....	61
Figura 54. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, DMSO-d ₆) de 8 (2,80 a 5,40 ppm). 61	
Figura 55. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, DMSO-d ₆) de 8 (0,70 a 2,4 ppm). . 62	
Figura 56. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, DMSO-d ₆) de 8 (0,40 a 1,60 ppm). 62	
Figura 57. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 8a.	64
Figura 58. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 8a (3,70 a 5,50 ppm).. 65	
Figura 59. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 8a (0,50 a 2,20 ppm).. 65	
Figura 60. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 8a.....	66
Figura 61. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 8a (15,0 a 28,0 ppm)... 66	
Figura 62. Espectro de HMQC (500 MHz, CDCl ₃) de 8a.	67
Figura 63. Expansão do espectro de HMQC (500 MHz, CDCl ₃) de 8a (0,0 a 3,0 ppm).....	67
Figura 64. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de 8a.....	68
Figura 65. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de 8a (0,40 a 3,80 ppm). ... 68	
Figura 66. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de 8a (0,40 a 1,90 ppm). ... 69	
Figura 67. Correlações observadas no espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de 8a.	69
Figura 68. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 8b.....	72
Figura 69. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 8b (3,5 a 5,4 ppm).	72
Figura 70. Espectro de DEPTQ (100 MHz, CDCl ₃) de 8b.	73
Figura 71. Expansão do espectro de DEPTQ (100 MHz, CDCl ₃) de 8b (14,0 a 56,0 ppm)... 73	
Figura 72. Espectro de NOE-1D (400 MHz, CDCl ₃) de 8b, irradiação na frequência do H30a (a), H30b (b) e H18 (c).....	74
Figura 73. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 9.....	76
Figura 74. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 9 (3,4 a 5,5 ppm).	76

Figura 75. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 9 (0,60 a 1,40 ppm). ..	77
Figura 76. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 9.	77
Figura 77. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 9 (10,0 a 40,0 ppm).....	78
Figura 78. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, Py-d ₅) de 10.....	80
Figura 79. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, Py-d ₅) de 10 (2,5 a 5,5 ppm).	80
Figura 80. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, Py-d ₅) do composto 10 (0,65 a 1,00 ppm).	81
Figura 81. Espectro de DEPTQ (500 MHz, Py-d ₅) de 10.	81
Figura 82. Espectro de RMN ¹ H (500MHz, Metanol-CD ₃ OD) de 11.	83
Figura 83. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) de 11 (5,2 a 8,0 ppm). ..	83
Figura 84. Espectro de DEPTQ (500 MHz, CD ₃ OD) de 11.	84
Figura 85. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CD ₃ OD) de 11 (60,0 a 185,0 ppm).	84
Figura 86. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) de 12.	86
Figura 87. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) de 12 (5,2 a 7,8 ppm). ..	86
Figura 88. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CD ₃ OD) de 12.	87
Figura 89. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CD ₃ OD) de 12 (60 a 180 ppm). ...	87
Figura 90. Cromatogramas e curvas UV obtidos com a análise CLAE-UV de 13 (a) e padrão quercetina (b).	88
Figura 91. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 14.	90
Figura 92. Expansão do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 14 (0,7 a 2,6 ppm). 90	
Figura 93. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 14.	91
Figura 94. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 14 (4 a 44 ppm).....	91
Figura 95. Cromatograma CG de 14.....	92
Figura 96. Espectro de massas de 14.	92
Figura 97. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 15.	94
Figura 98. Expansão do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 15 (1,8 a 4,4 ppm). 95	
Figura 99. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 15 (0,75 a 1,60 ppm)..	95

Figura 100. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 15.	95
Figura 101. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 15 (13 a 36 ppm).....	96
Figura 102. Espectro de HMQC (500 MHz, CDCl ₃) de 15.....	96
Figura 103. Expansão do espectro de HMQC (500 MHz, CDCl ₃) de 15 (0,2 a 3,0 ppm).....	97
Figura 104. Espectro de ¹ H- ¹ H COSY (500 MHz, CDCl ₃) de 15.	97
Figura 105. Expansão do espectro de ¹ H- ¹ H COSY (500 MHz, CDCl ₃) de 15 (1,0 a 4,5 ppm).	98
Figura 106. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de 15.....	98
Figura 107. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de 15 (1,0 a 4,0 ppm).....	99
Figura 108. Expansão do Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de 15 (0,70 a 1,25 ppm).	99
Figura 109. Espectro de RMN 1H (500 MHz, CDCl ₃) do composto 15.	101
Figura 110. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 16 (3,0 a 5,6 ppm).	102
Figura 111. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 16 (0,7 a 2,1 ppm).	102
Figura 112. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 16.	103
Figura 113. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 16 (15 a 36 ppm).....	103
Figura 114. Cromatograma CG do composto 16.....	104
Figura 115. Espectro de massas de 16.	104
Figura 116. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 17-20.....	106
Figura 117. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 17-20 (6,2 a 7,8 ppm).	106
Figura 119. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) de 17-20.	107
Figura 120. Espectro de massas da fração dos compostos 17-20.....	107
Figura 121. Espectro EM2 do composto 17.....	108
Figura 122. Espectro EM2 da do composto 19.	108
Figura 123. Espectro EM2 do derivado cumárico 20.	109
Figura 124. Formação do complexo flavonoide-alumínio em solução de AlCl ₃	110
Figura 125. Teor de flavonóides dos extratos e frações das folhas e galhos de <i>E. copacabanensis</i>	110

Figura 126. Atividade sequestradora do radical DPPH do extrato e frações das folhas e galhos de <i>E. copacabanensis</i>	112
Figura 127. Correlação de Pearson ($r = 0,997$, $P < 0,05$ e $R = 0,993$) entre os valores de $1/CE_{50}$ do ensaio do DPPH e o teor de flavonoides presentes no extrato e frações dos galhos de <i>E. copacabanensis</i>	112
Figura 128. Atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoleico dos extratos e frações das folhas e galhos de <i>E. copacabanensis</i>	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns usos etnofarmacológicos de espécies do gênero <i>Eugenia</i>	4
Tabela 2. Algumas atividades farmacológicas de espécies do gênero <i>Eugenia</i>	5
Tabela 3. Alguns triterpenos isolados do gênero <i>Eugenia</i>	8
Tabela 4. Alguns flavonoides isolados do gênero <i>Eugenia</i>	11
Tabela 5. Alguns taninos isolados do gênero <i>Eugenia</i>	15
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CDCl_3) de 1 e 2.....	33
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, DMSO-d_6) de 3.....	37
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CDCl_3) de 4.	40
Tabela 9. Dados de RMN ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz) de 5.....	45
Tabela 10. Dados de DEPTQ (125 MHz) das substâncias 6 e 7.	54
Tabela 11. Dados de RMN ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, DMSO-d_6) de 8.....	56
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CDCl_3) do derivado 8a.....	64
Tabela 13. Dados de RMN ^1H e DEPTQ (400 e 100 MHz, CDCl_3) de 8b.....	71
Tabela 14. Dados de RMN ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz) de 9.....	75
Tabela 15. Dados de RMN ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CD_3OD) de 10.....	79
Tabela 16. Dados de RMN ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CD_3OD) de 11.....	82
Tabela 17. Dados de RMN ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CD_3OD) de 12.....	85
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CDCl_3) de 14.	89
Tabela 19. Dados de RMN de DEPTQ (500 e 125 MHz, CDCl_3) do composto 15.....	93
Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DEPTQ), (500 e 125 MHz, CDCl_3) de 16.....	100
Tabela 21. Tabela 21. Dados de RMN de ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CDCl_3) de 17-20.	105
Tabela 22. Resultado do ensaio antimicrobiano extratos e frações de <i>E. copacabanensis</i> ...	114

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Partição do extrato EMF.	23
Esquema 2. Fracionamento cromatográfico de EMF-H.	24
Esquema 3. Fracionamento cromatográfico de EMF-D.	25
Esquema 4. Partição do extrato ECRGM.....	27
Esquema 5. Fracionamento cromatográfico de P-EMG.	28
Esquema 6. Fracionamento cromatográfico de EMG-D.....	28
Esquema 7. Proposta de fragmentação de massas de 4.....	44
Esquema 8. Proposta de fragmentação de 5.....	53
Esquema 9. Mecanismo proposto para reação de acetilação de 8.	63
Esquema 10. Mecanismo proposto para a reação de metilação de 8a.	71
Esquema 11. Proposta de fragmentação de massas de 14.....	92
Esquema 12. Proposta de fragmentação de massas de 16.....	104
Esquema 13. Proposta de fragmentação de massas dos derivados 17-20.....	109

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 <i>A Família Myrtaceae</i>	2
2.2. <i>O gênero Eugenia</i>	2
2.3 <i>Usos populares de espécies do gênero Eugenia</i>	3
2.4 <i>Aspectos farmacológicos do gênero Eugenia</i>	4
2.4.1 <i>Atividade antioxidante</i>	6
2.5 <i>Algumas considerações sobre a química do gênero Eugenia</i>	7
2.5.1 <i>Triterpenos</i>	7
2.5.2 <i>Flavonoides</i>	10
2.5.3 <i>Taninos</i>	14
2.6 <i>Algumas informações sobre a espécie Eugenia copacabanensis</i>	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 <i>Objetivos Gerais</i>	20
3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	20
4 PARTE EXPERIMENTAL	21
4.1. <i>Reagentes e equipamentos</i>	21
4.2 <i>Material vegetal</i>	22
4.3 <i>Obtenção dos extratos brutos</i>	22
4.4 <i>Fracionamento do extrato EMF</i>	22
4.4.1 <i>Fração EMF-H</i>	23
4.4.2.1 <i>Fração EMF-D</i>	24
4.4.2.2 <i>Acetilação do composto 8</i>	25
4.4.2.3 <i>Metilação do produto 8a</i>	26
4.5 <i>Particionamento do Extrato EMG</i>	27
4.5.1 <i>Fração P-EMG</i>	27
4.5.2 <i>Fração EMG-D</i>	28
4.6 <i>Determinação do teor de flavonoides totais dos extratos e frações de E. copacabanensis</i>	29
4.7 <i>Avaliação da atividade antioxidante dos extratos e frações de E. copacabanensis pelo método DPPH</i>	29

<i>4.8 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos e frações de E. copacabanensis pelo método b-caroteno-ácido linoleico</i>	30
<i>4.9 Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos e frações de E. copacabanensis</i>	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
<i>5.1. Determinação estrutural das substâncias isoladas de folhas de E. copacabanensis</i>	33
<i>5.1.1. Substâncias 1 e 2</i>	33
<i>5.1.2 Substância 3</i>	36
<i>5.1.3 Substância 4</i>	39
<i>5.1.4 Substâncias 5, 6 e 7</i>	44
<i>5.1.4.1 Composto 5</i>	44
<i>5.1.4.2. Substâncias 6 e 7.</i>	53
<i>5.1.5.1. Substância 8</i>	55
<i>5.1.5.2 Substância 8a</i>	63
<i>5.1.5.3 Derivado 8b</i>	69
<i>5.1.6. Substância 9</i>	74
<i>5.1.7 Composto 10</i>	78
<i>5.1.8 Substância 11</i>	81
<i>5.1.9 Substância 12</i>	85
<i>5.1.10 Substância 13</i>	87
<i>5.2 Metabolitos especiais isolados de galhos de E. copacabanensis</i>	88
<i>5.2.1 Substância 14</i>	88
<i>5.2.2 Substância 15</i>	93
<i>5.2.3 Substância 16</i>	100
<i>5.2.4 Substâncias 17, 18, 19 e 20</i>	104
<i>5.4 Ensaio antimicrobiano de extratos e frações de E. copacabanensis</i>	114
6 CONCLUSÕES	114
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

RESUMO

CARVALHO JUNIOR, Almir Ribeiro. **Metabólitos Especiais Isolados de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae) e Avaliação de Atividades Antioxidante e Antimicrobiana**. 2013. 126 p. Dissertação (Mestrado em Química, Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O gênero *Eugenia* (Myrtaceae) compreende cerca 550 espécies de árvores e arbustos, principalmente, encontrados nas Américas do Sul e Central. Várias espécies do gênero são usadas na medicina popular no tratamento de enfermidades, tais como: diabetes, diarreia crônica, dores no corpo, irritação na pele, etc. Isto tem motivado diversos estudos relacionados tanto a composição química, quanto às propriedades biológicas do gênero. O objetivo deste trabalho foi estudar o perfil químico da espécie *Eugenia copacabanensis* Kiaersk, além de avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano da mesma. As substâncias descritas nesse trabalho foram isoladas a partir de técnicas cromatográficas e identificadas através de experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura. Das folhas de *E. copacabanensis* foram isolados os triterpenos α e β -amirina, ácido ursólico, ácido 30-hidroxi-ursólico (ácido rubifólico) e betulina, os sesquiterpenos clovanodiol, globulol, viridiflorol, esteroides β -sitosterol, β -sitosterol glicosilado e flavonoides canferol-3-O-ramnosideo, quercetina-3-O-arabinosideo, quercetina. Enquanto que dos galhos foram isolados, friedelina, friedelan-3,4-lactona, taraxerol e os cumaratos de octacosanila, heptacosanila, hexacosanila e teracosanila. A partir de reações de acetilação e metilação do ácido 30-hidroxi-ursólico foram obtidos dos derivados: o ácido diacetil rubifólico e diacetil metil rubifolato, respectivamente. A atividade antioxidante dos extratos e frações foi avaliada pelos métodos DPPH e β -caroteno-ácido linoleico. Em ambos os casos, obteve-se ótimos resultados, com valores de CE_{50} variando entre $0,92 \pm 0,04$ e $40,7 \pm 1,0$ $\mu\text{g/mL}$ e % de inibição de degradação entre $28,7 \pm 7,9$ a $90,0 \pm 0,1\%$. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente aos microorganismos, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Rhizopus oryzae* e os extratos e frações de *E. copacabanensis* não foram ativos até a concentração de 2,5 mg/mL.

Palavras-chave: *E. copacabanensis*, triterpenos, atividade antioxidante.

ABSTRACT

CARVALHO JUNIOR, Almir Ribeiro. **Metabólitos Especiais Isolados de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae) e Avaliação de Atividades Antioxidante e Antimicrobiana**. 2013. 126 p. Dissertação (Mestrado em Química, Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The genus *Eugenia* (Myrtaceae) comprises about 550 species of trees and shrubs, mainly found in Central and South America. Several species are used in folk medicine to treat diseases such as diabetes, chronic diarrhea, body aches, skin rash, etc. This has motivated diverse studies related to both the chemical composition and the biological properties of the genus. The objective of this work was to study the chemical profile of the species *Eugenia copacabanensis*, besides evaluating its antioxidant and antimicrobial potential. The compounds described in this work were isolated from chromatographic techniques and identified by ¹H and ¹³C NMR, GC-MS experiments besides comparison with literature data. From leaves of *E. copacabanensis* were isolated α and β -amyrin, ursolic acid, 30-hydroxy-ursolic acid (rubifólico), betulin, β -sitosterol, β -sitosterol glycoside, clovanodiol, globulol, viridiflorol and the flavonoids kaempferol-3-O-ramnoside, quercetin-3-O-arabinside, and quercetin. While from branches were isolated, friedelin, friedelan-3,4-lactone, taraxerol, octacosanyl coumarate, heptacosanyl coumarate, hexacosanyl coumarate and teracosanyl coumarate. From acetylation and methylation reactions of acid 30-hydroxy-ursolic it were obtained: diacetyl rubifolic acid methyl diacetyl rubifolato respectively. The antioxidant activity of the extracts and fractions was evaluated by DPPH and β -carotene-linoleic acid methods. In both cases, we obtained excellent results with EC₅₀ values ranging between 0.92 \pm 0.04 and 40.7 \pm 1.0 μ g/ml and % inhibition between 28.7 \pm 7.9 to 90.0 \pm 0.1%. Antimicrobial activity was evaluated against the microorganisms, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Rhizopus oryzae* and extracts and fractions of *E. copacabanensis* were not active until the concentration of 2.5 mg / mL.

Keywords: *E. copacabanensis*, triterpenos, atividade antioxidante.

INTRODUÇÃO

Há milhares de anos os produtos naturais são usados pela humanidade na busca de alívio e cura de doenças (VIEGAS JR & BOLZANI, 2006). Porém, apenas recentemente, as plantas se tornaram objetos de estudos científicos relacionados às suas propriedades medicinais além da procura de suas funções para o entendimento do ecossistema. Estima-se que das 500.000 espécies de plantas superiores existentes no planeta, apenas 1% tenha sido estudado, pelo seu potencial farmacológico (MELENDÉZ & CAPRILES, 2006).

Mesmo nos dias atuais, apesar do desenvolvimento da indústria farmacêutica, as plantas medicinais continuam ocupando lugar de destaque no tratamento de diversas enfermidades. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, 80 % da população mundial usa recursos das medicinas populares para suprir a necessidade de assistência médica privada (MACEDO *et al.*, 2007). O consumo de plantas medicinais tem base na tradição familiar e tornou-se prática generalizada na medicina popular. O difícil acesso da população à assistência médica, o alto custo de medicamentos industrializados bem como a tendência, atual, ao uso de produtos de origem natural, são fatores que vêm contribuindo para o aumento da utilização desses recursos (BRASILEIRO *et al.*, 2008).

Dados confirmam que cerca de 25% das prescrições dispensadas nos países desenvolvidos durante os últimos 25 anos estavam relacionadas a medicamentos que continham princípios ativos de origem natural ou semi sintético, normalmente oriundos de plantas superiores (NEWMAN *et al.*, 2003). Porém, a necessidade de informações que comprovem, cientificamente, a eficácia de plantas como medicamentos tem despertado interesse de muitos estudiosos ao redor do mundo. Neste sentido, a química de produtos naturais, aliada às outras áreas de conhecimento, vem sendo a ferramenta utilizada na busca por substâncias ativas, que justifiquem usos de plantas como alternativas terapêuticas. Pesquisas na área de produtos naturais têm possibilitado encontrar novos modelos estruturais e substâncias bioativas eficazes, o que tem contribuído de forma significativa para a obtenção de novos medicamentos (BAHIA, 2007).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Família Myrtaceae

A família Myrtaceae é dividida em duas subfamílias conhecidas como Myrtoideae e Leptospermoideae (VIEIRA *et al.*, 2004; CARDOSO & SAJO, 2006). Composta por cerca de 5500 espécies, distribuídas em aproximadamente 142 gêneros (THORNHILL *et al.*, 2012), essa família é largamente encontrada em regiões tropicais e subtropicais e alguns de seus exemplares fazem parte da flora brasileira (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006). Segundo ROMAGNOLO e SOUZA (2006), no Brasil, podem ser encontradas em torno de 23 gêneros que totalizam 1000 espécies.

Várias espécies desta família apresentam valor econômico, como o eucalipto (*Eucalyptus spp.*), utilizado na produção de madeira e aromatizantes, e a goiabeira (*Psidium guajava*), frutífera cujos frutos são apreciados *in natura* e industrializados.

2.2. O gênero Eugenia

O gênero *Eugenia*, um dos maiores da família Myrtaceae (GOMES DA SILAVA & PINHEIRO, 2007), é encontrado, principalmente, nas Américas Central e do Sul (VAN DER MERWE *et al.*, 2005), sendo constituído de aproximadamente 550 espécies de árvores e arbustos (FRIGHETTO *et al.*, 2005). Destas, 400 podem ser encontradas no Brasil (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005).

As espécies deste gênero são encontradas na forma de arbustos a árvores com altura entre 3 e 12 metros, apresentando frutos de formato elíptico de coloração amarelada, alaranjada, vermelha vinácea, até preta quando maduro (ROMAGNOLO & SOUZA, 2006).

Algumas de suas espécies desempenham um papel socioeconômico importante em determinadas regiões, por terem frutos utilizados na alimentação (MAGINA *et al.*, 2009), serem utilizadas em ornamentação (CASSANITI *et al.*, 2009), produzirem óleos essenciais de valor comercial (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006) e serem utilizadas na medicina popular (YANG *et al.*, 2000). Como exemplos de espécies que apresentam frutos empregados na alimentação podem ser citadas *E. neonitida*, *E. rontifolia* (DEFAVERI *et al.*, 2011), *E. uniflora* (SANTOS *et al.*, 2012), *E. edulis* (HUSSEIN *et al.*, 2003), *E. desynerica* (OLIVEIRA *et al.*, 2011), *E. candolleana* (GUIMARÃES *et al.*, 2009). A **Figura 1**, abaixo, mostra algumas espécies do gênero em período de frutificação.



E. candolleana



E. dysenterica



E. uniflora

Figura 1. Exemplos de espécies do gênero *Eugenia* com frutos comestíveis.

2.3 Usos populares de espécies do gênero Eugenia

Em diversas partes do globo, plantas deste gênero vêm sendo utilizadas na medicina popular como agentes farmacêuticos, auxiliando no tratamento de diversas doenças.

Sementes de *E jambolana* (popularmente conhecida como jabolão) são largamente utilizadas por populares em países como Malásia e Austrália, no tratamento de doenças causadas por bactérias, fungos e vírus. Extratos das sementes da planta são empregados no tratamento de resfriado, tosse, febre, problemas de pele e ulcera (CHANDRASEKARAN & VENKATESALU, 2004).

Extratos obtidos através de infusões ou decocções das folhas de pitangueira (*E. uniflora*) são empregados no tratamento de inflamações, dores reumáticas, febre e atuam na prevenção de doenças estomacais (AMORIM *et al.*, 2009; VICTORIA *et al.*, 2012). Diarreia, hiperglicemia e hipertensão são outros exemplos de enfermidades tratadas através do uso desta espécie vegetal (COSTA *et al.*, 2010).

Outros exemplos de usos etnofarmacológicos de espécies do gênero encontram-se disponíveis, de forma resumida, na **Tabela 1**.

Tabela 1. Alguns usos etnofarmacológicos de espécies do gênero *Eugenia*.

Espécie	Parte utilizada	Usos etnofarmacológicos	Referência
<i>E. axillares</i>	Ramos	Afrodisíaca e diarreia	SETZER, <i>et al.</i> , 2006
<i>E. beaurepaireana</i>	Folhas	Adstringente, inflamações e úlcera	REVILLA, 2002
<i>E. brasiliensis</i>	Folhas, frutos e cascas do caule	Adstringente, diurético e tratamento de reumatismo	REVILHA, 2002
<i>E. caryophyllata</i>	Botões florais	Diarreia, dispepsia, dor de dente e gastrite crônica	YOO <i>et al.</i> , 2005
<i>E. cauliflora</i>	Cascas	Asma, diarreia e dor de garganta	CRUZ & KAPLAN, 2004
<i>E. cordata</i>	Folhas	Diabetes mellitus, diarreia, doenças respiratórias, dor de estômago, intolerância a glicose e tuberculose	DEWIR <i>et al.</i> , 2011
<i>E. condelleana</i>	Folhas	Febre e dor	DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2006
<i>E. cauliflora</i>	Cascas do caule	Asma, diurético e dor de garganta	CRUZ & KAPLAN, 2004
<i>E. dysenterica</i>	Folhas e frutos	Bexiga, cicatrizante, diarreia, laxativo e rins	CRUZ & KAPLAN, 2004
<i>E. involucrata</i>	Frutos	Digestivo, diarreia e reumatismo	HENRIQUE <i>et al.</i> , 1993
<i>E. jambolana</i>	Folhas, caule e sementes	Diabetes, diarreia, desinteira e úlceras	SOOD <i>et al.</i> , 2012; CHANDRASIKARAN & VENKATESALU, 2004
<i>E. jambos</i>	Folhas	Febre, inflamações e úlceras gástricas	YANG <i>et al.</i> , 2000
<i>E. javanica</i>	Flores e frutos	Antipirético, diarreia diurético e febre	SIMIRGIOTIS <i>et al.</i> , 2008; KUO <i>et al.</i> , 2004
<i>E. malaccense</i>	Folhas e frutos	Adstringente, anemia, catarro nos pulmões, coceira, diabetes, dores de cabeça, disenteria, diurético, estimulante de apetite, febre e inflamações	DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2006
<i>E. puniceifolia</i>	Folhas e raízes	Diabetes mellitus, febre, males do fígado e resfriado	CRUZ & KAPLAN, 2004
<i>E. rotundifolia</i>	Folhas	Hipoglicemiante	
<i>E. singampattiana</i>	Folhas, flores e frutos	Asma, problemas gástricos e reumatismo	KALA <i>et al.</i> , 2011
<i>E. sulcata</i>	Folhas	Diarreia em crianças e febre	CRUZ & KAPLAN, 2004
<i>E. uniflora</i>	Folhas, frutos e caule	Antifebril, colesterol, diarreia, disenteria, febre, gota, gripe e reumatismo	CRUZ & KAPLAN, 2004
<i>S. guineense</i>	Caule	Diarreia e dor de estômago	DJOUKENG <i>et al.</i> , 2005

2.4 Aspectos farmacológicos do gênero *Eugenia*

O extenso uso etnofarmacológico e alimentício de espécies do gênero *Eugenia* estimularam vários trabalhos de investigação farmacológica das mesmas, tanto com extratos brutos e frações, como com princípios ativos isolados. Alguns destes trabalhos serão destacados a seguir.

Os extratos aquoso e metanólico das sementes de *E. jambolana* exibiram atividades antibacteriana e antifúngica *in vitro*, sendo efetivos contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus Níger*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (CHANDRASIKARAN & VENKATESALU, 2004).

O óleo essencial extraído das folhas frescas de *E. zuchowskiae* apresentou atividade citotóxica *in vitro* frente a linhagens de células tumorais, os constituintes majoritários α -pineno, α -copaeno, β -cariofileno e α -humuleno apresentaram citotoxicidade similar ao agente anticâncer doxorubicina frente a linhagens de células de carcinoma mamário, sugerindo que estes metabólitos são os principais responsáveis pela citotoxicidade deste óleo essencial (COLE *et al.*, 2007).

Já o óleo essencial extraído das folhas de *E. condolleana* exibiu atividade antinoceptiva e ação anti-inflamatória (GUIMARÃES *et al.*, 2009) Outras atividades farmacológicas também foram relatadas para outras espécies (**Tabela 2**).

Tabela 2. Algumas atividades farmacológicas de espécies do gênero *Eugenia*

Espécies	Parte usada	Atividade farmacológica	Referência
<i>E. beaurepaireana</i>	Folhas	Antibacteriana e anti-inflamatória	MAGINA <i>et al.</i> , 2009
<i>E. brasiliensis</i>	Folhas	Antibacteriana e antidepressiva	COLLA <i>et al.</i> , 2012
<i>E. caryophyllata</i>	Folhas	Anticariogênica, antimicrobiana, antioxidante, citotóxica e diabetes	NONSEE <i>et al.</i> , 2011; KOUIDHI <i>et al.</i> , 2010; SHUKRI <i>et al.</i> , 2010
<i>E. chlorophylla</i>	Folhas e flores	Antibacteriana e antifúngica	STEFANELLO <i>et al.</i> , 2008
<i>E. condolleana</i>	Folhas	Anti-inflamatória e antinoceptiva	GIMARÃES <i>et al.</i> , 2009
<i>E. discifera</i>	Folhas	Antiinflamatória	MARIDASS, 2008
<i>E. dysenterica</i>	Frutos	Laxativa	LIMA <i>et al.</i> , 2010
<i>E. jambolana</i>	Caule, folhas e sementes	Antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiprotozoário, antiviral, citotóxica e hipolipidêmica	SOOD <i>et al.</i> , 2012; CHANDRASIKARAN & VENKATESALU, 2004; DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2012; SULTAMA <i>et al.</i> , 2007
<i>E. jambos</i>	Folhas	Antiinflamatória e citotóxica	YANG <i>et al.</i> , 2000; SLOWING <i>et al.</i> , 1994
<i>E. javanica</i>	Frutos	Antibacteriana, antioxidante e imunoestimulante	SIMIRGIOTIS <i>et al.</i> , 2008; KUO <i>et al.</i> , 2004
<i>E. pollicina</i>	Folhas	Antioxidante	RAMFUL <i>et al.</i> , 2011
<i>E. punicifolia</i>	Folhas	Ação colinérgica em receptores nicotínicos	GRANGEIRO <i>et al.</i> , 2006
<i>E. malaccensis</i>	Cascas de caule e folhas	Antibacteriana, antifúngica, antiviral e moluscicida	LOCHER <i>et al.</i> , 1995
<i>E. rottleriana</i>	Folhas	Antibacteriana	GOPAN <i>et al.</i> , 2007
<i>E. singampattiana</i>	Frutos	Antifúngica	JOTHI <i>et al.</i> , 2009
<i>E. triquetra</i>	Folhas	Larvicida	MORA <i>et al.</i> , 2010
<i>E. umbelliflora</i>	Folhas e frutos	Antibacteriana e antifúngica	MACHADO <i>et al.</i> , 2009
<i>E. uniflora</i>	Folhas e sementes	Antibacteriano, antioxidante, antimalárica, antiprotozoário, citotóxica, diurético e hipotensor	VICTORIA <i>et al.</i> , 2012; SANTOS <i>et al.</i> , 2012

2.4.1 Atividade antioxidante

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, desta forma, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres são denominados Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) (BARREIROS *et al.*, 2006). O estresse oxidativo é causado pelo desbalanço entre os sistemas antioxidantes e a produção de substâncias oxidativas (radicais livres) e está associado à ocorrência de várias doenças, especialmente câncer, doenças cardiovasculares e desordens inflamatórias (ATOUI *et al.*, 2005).

O termo antioxidante pode ser definido como “qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne a oxidação do mesmo” (HALLIWELL, 2000). O organismo humano possui defesas antioxidantes endógenas (por ex., superóxido desmutase), porém quando estas substâncias não são capazes de conter a produção excessiva de EROs, o uso de antioxidantes exógenos provenientes da dieta alimentar ou outras fontes se faz necessária (PIETA, 2000). Estudos epidemiológicos têm associado dietas ricas em frutas e hortaliças com a redução do risco de doenças crônicas, cardíacas, neurológicas e cardiovasculares, bem como diversos tipos de câncer (PODSEDEK, 2007; BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 2001). Os principais antioxidantes em vegetais são os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides e compostos fenólicos, especialmente os flavonoides (LIU *et al.*, 2011; PODSEDEK *et al.*, 2007).

Admite-se que a propriedade antioxidante de compostos fenólicos esteja relacionada à suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, atuando tanto na etapa de iniciação como na propagação de processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUZA *et al.*, 2007; HASLAM, 1996).

Relatos têm demonstrado que antioxidantes sintéticos empregados em indústrias alimentícias com o intuito de inibir a peroxidação lipídica dos alimentos, tais como, butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT) e galato de propila (GP), têm apresentado efeitos tóxicos (SOUZA *et al.*, 2007; SOARES, 2002). Considerando que os consumidores

vêm apresentando rejeição pelo uso de antioxidantes sintéticos, há um crescente interesse na busca de antioxidantes provenientes de produtos naturais (LIU *et al.*, 2011; MURCIA *et al.*, 2004).

2.5 Algumas considerações sobre a química do gênero *Eugenia*

Uma revisão acerca da constituição química deste gênero registra como principais fitoconstituintes os óleos essenciais (ricos em monoterpenos e sesquiterpenos), taninos condensados e hidrolisáveis, flavonoides, triterpenos, ácido elágico e seus derivados, cromonas e fenilpropanóides nas diferentes espécies. Além disto, alguns trabalhos destacam o valor nutricional dos frutos de *Eugenia* ricos em vitamina C (ácido ascórbico) e carotenoides (licopeno, β -caroteno, luteína, rubixantina, dentre outros) que asseguram seu potencial como fonte de antioxidantes naturais.

2.5.1 Triterpenos

Triterpenos compreendem um vasto grupo de substâncias naturais que apresentam uma gama de atividades biológicas, tais como anti HIV, anti-inflamatória e antimalarial (LUNARDI *et al.*, 2001). Essa classe de substâncias tem se mostrado presente em espécies do gênero *Eugenia* e essas substâncias são ditas como responsáveis por diversas propriedades biológicas observadas no gênero (JUNGES *et al.*, 1999). Em relação aos triterpenos isolados no gênero, observa-se predominância de pentacíclicos com esqueletos dos tipos lupano, ursano e oleanano. Friedelanos e taraxeranos também são observados no gênero, porém, com ocorrências mais restritas.

Das folhas de *E. moraviana* foi isolado um triterpeno inédito (**Figura 2**), derivados do ácido betulínico, conhecido como ácido 6α -hidroxibetulínico (**22**), além de outras substâncias mais comuns, tais como ácido betulínico (**21**) e β -sitosterol (**31**) (LUNARDI *et al.*, 2001).

O estudo químico de *E. grandis*, realizado por MANOHARAN *et al.*, (2007), resultou no isolamento do ácido $2\alpha,3\beta$ -dihidroxilup-12-em-28-oico (**25**), um triterpeno inédito com esqueleto lupano, além de um conhecido como ácido 3β -dihidroxilup-12-em-28-oico (**26**) e outras substâncias mais comuns, como friedelina (**27**), friedelinol (**28**) e ácido aleanólico (**10**).

Friedelan-3,4-lactona é um triterpeno raro, cujo primeiro relato de isolamento ocorreu na espécie *Euonymus japonicus* em 2006 (MASAAKI *et al.*, 2006). Este composto foi isolado

dos galhos de *E. copacabanensis* (CARVALHO JR *et al.*, 2012). Na **Tabela 3** são mostrados outros exemplos de triterpenos e esteroides presentes no gênero.

Tabela 3. Alguns triterpenos isolados do gênero *Eugenia*

Composto	Espécie	Referência
α -amirina (1)	<i>E. singampattiana</i>	KALA <i>et al.</i> , 2011
	<i>E. gustavinoides</i>	BANNON <i>et al.</i> , 1976
	<i>E. copacabanensis</i>	CARVALHO <i>et al.</i> , 2012B
	<i>E. brasiliensis</i>	MAGINA <i>et al.</i> , 2012
Ácido ursólico (2)	<i>E. javanica</i>	SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 1995
	<i>E. gustavinoides</i>	BANNON <i>et al.</i> , 1976
	<i>E. copacabanensis</i>	CARVALHO JUNIOR <i>et al.</i> , 2012B
Ácido 2-hidroxi-ursólico (3)	<i>E. gustavinoides</i>	BANNON <i>et al.</i> , 1976
Ácido 30-hidroxi-ursólico (4)	<i>E. copacabanensis</i>	CARVALHO JUNIOR <i>et al.</i> , 2012B
Ácido asiático (5)	<i>E. crebrinervis</i>	BANNON <i>et al.</i> , 1976
	<i>E. gustavinoides</i>	BANNON <i>et al.</i> , 1976
Ácido 6-hidroxi-ursólico (6)	<i>E. guineensis</i>	DJOUKENG <i>et al.</i> , 2005
Ácido asiático 6-glucopiranosil ester (7)	<i>E. guineensis</i>	DJOUKENG <i>et al.</i> , 2005
Ácido jacoumarico (8)	<i>E. javanica</i>	SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 1995
β -amirina (9)	<i>E. biflora</i>	GOTTLIEB <i>et al.</i> , 1971
	<i>E. copacabanensis</i>	CARVALHO <i>et al.</i> , 2012B
	<i>E. brasiliensis</i>	MAGINA <i>et al.</i> , 2012
Ácido oleanólico (10)	<i>E. jambilana</i>	RAJASEKARAN <i>et al.</i> , 1998
	<i>E. jambilana</i>	SUBRAMANIAN E NAIR, 1972
	<i>E. grandis</i>	MANOLARAN <i>et al.</i> , 2007
Ácido arjunólico (11)	<i>E. gustavinoides</i>	BANNON <i>et al.</i> , 1976
	<i>E. javanica</i>	SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 1995
	<i>E. cordata</i>	CANDY <i>et al.</i> , 1968
	<i>E. crebrinervis</i>	BANNON <i>et al.</i> , 1976
Ácido 3 β -cis-p-coumaroiloxi-2 α , 23-dihidroxiolean-12-en-28-oico (12)	<i>E. gustavinoides</i>	BANNON <i>et al.</i> , 1976
	<i>E. sandwicensis</i>	GU <i>et al.</i> , 2001
Ácido 3 β -trans-p-coumaroiloxi-2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oico (13)	<i>E. sandwicensis</i>	GU <i>et al.</i> , 2001
Ácido 23-trans-p-coumaroiloxi-2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oico (14)	<i>E. sandwicensis</i>	GU <i>et al.</i> , 2001
Eritrodiol (15)	<i>E. formosa</i>	MAJUDAR & THAKUR, 1970
Ácido cratególico (16)	<i>E. gustavinoides</i>	BANNON <i>et al.</i> , 1976
	<i>E. jambilana</i>	GUPTA & SHARMA, 1974
Ácido terminólico (17)	<i>E. guineensis</i>	DJOUKENG <i>et al.</i> , 2005
Ácido arjunólico β -glucopiranosil ester (18)	<i>E. guineensis</i>	DJOUKENG <i>et al.</i> , 2005
Lupeol (19)	<i>E. jambos</i>	KUIATE <i>et al.</i> , 2007
Betulina (20)	<i>E. jambos</i>	KUIATE <i>et al.</i> , 2007
	<i>E. copacabanensis</i>	CARVALHO JUNIOR <i>et al.</i> , 2012a
	<i>E. brasiliensis</i>	MAGINA <i>et al.</i> , 2012
Ácido betunfílico (21)	<i>E. moraviana</i>	LUNARDI <i>et al.</i> , 2001

	<i>E. jabolana</i>	BHARGAVA <i>et al.</i> , 1974
	<i>E. maire</i>	GUPTA & SHARMA, 1974
	<i>E. sandwicensis</i>	BRIGGS <i>et al.</i> , 1961
	<i>E. jambos</i>	GU <i>et al.</i> , 2001
	<i>E. grandis</i>	KUIATE <i>et al.</i> , 2007
	<i>E. grandis</i>	MANOHARAN <i>et al.</i> , 2007
Ácido 6- α -hidroxi-betulínico (22)	<i>E. moraviana</i>	LUNARDI <i>et al.</i> , 2001
3 metil epi-betulinato (23)	<i>E. javanica</i>	SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 1995
29-hidroxiplatan-28-ato de β -glicosila (24)	<i>E. florida</i>	JUNGES <i>et al.</i> , 1999
Ácido 2 α ,3 β -hidroxilup-12-en-28-oico (25)	<i>E. grandis</i>	MANOHARAN <i>et al.</i> , 2007
Ácido 3 β -hidroxilup-12-en-28-oico (26)	<i>E. grandis</i>	MANOHARAN <i>et al.</i> , 2007
Friedelina (27)	<i>E. jabolana</i>	BHARGAVA <i>et al.</i> , 1974
	<i>E. jambos</i>	KUIATE <i>et al.</i> , 2007
	<i>E. cordata</i>	CANDY <i>et al.</i> , 1968
	<i>E. grandis</i>	MANOHARAN <i>et al.</i> , 2007
	<i>E. copacabanensis</i>	CARVALHO JR <i>et al.</i> , 2012a
Friedelinol (28)	<i>E. jabolana</i>	BHARGAVA <i>et al.</i> , 1974
	<i>E. cordata</i>	CANDY <i>et al.</i> , 1968
	<i>E. grandis</i>	MANOHARAN <i>et al.</i> , 2007
	<i>E. Jambos</i>	KUIATE <i>et al.</i> , 2007
Friedelan-3,4-lactona (29)	<i>E. copacabanensis</i>	CARVALHO JR <i>et al.</i> , 2012b
Taraxerol (30)	<i>E. copacabanensis</i>	CARVALHO JR <i>et al.</i> , 2012b
β -sitosterol (31)	<i>E. jabolana</i>	BHARGAVA <i>et al.</i> , 1974
	<i>E. maire</i>	BRIGGS <i>et al.</i> , 1961
	<i>E. cordata</i>	CANDY <i>et al.</i> , 1968
	<i>E. moraviana</i>	LUNARDI <i>et al.</i> , 2001
	<i>E. grandis</i>	MANOHARAN <i>et al.</i> , 2007
β -sitosterol-3-O-glicosideo (32)	<i>E. jabolana</i>	BHARGAVA <i>et al.</i> , 1974

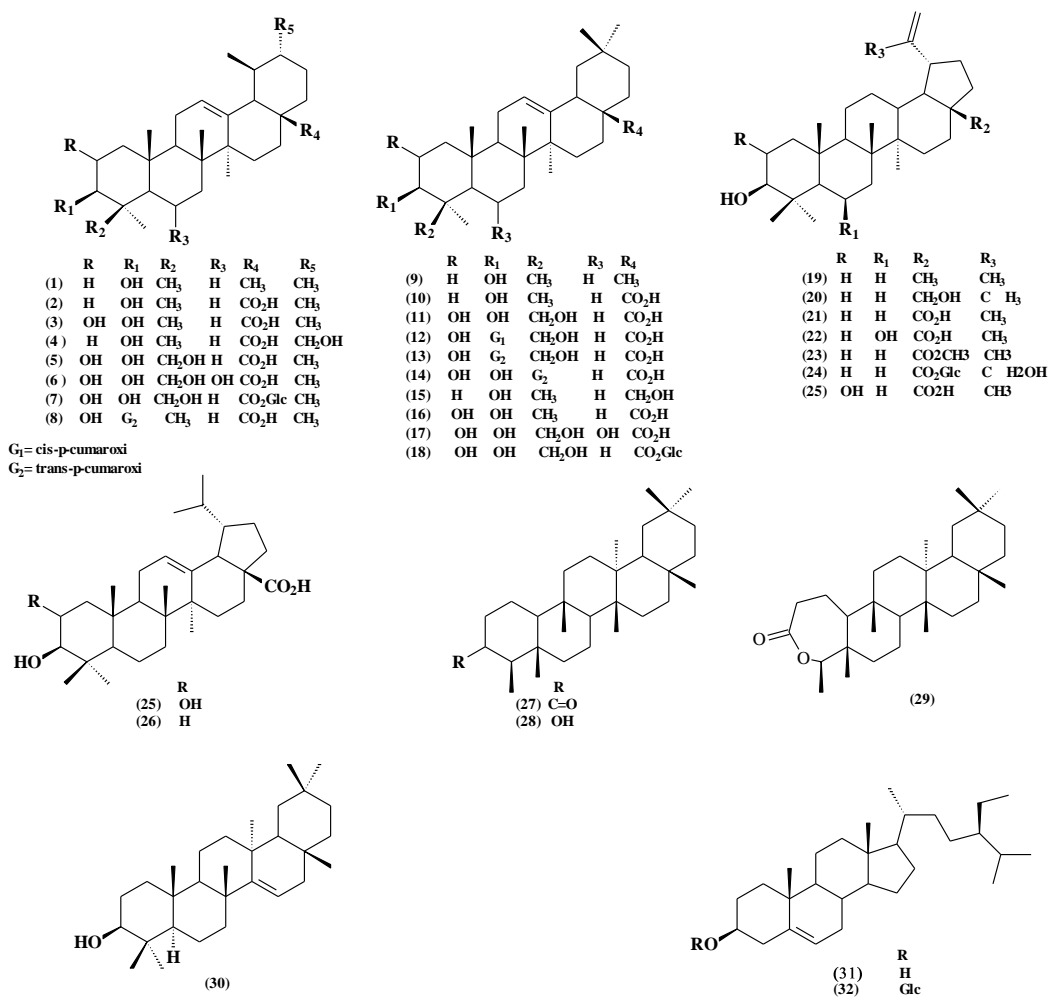


Figura 2. Alguns triterpenos e esteroides isolados do gênero *Eugenia*

2.5.2 Flavonoides

O perfil de flavonoides encontrado no gênero (**Tabela 4**) inclui a presença de chalconas, flavonois, flavonas, flavanonas, antocianinas e catequinas com ampla variedade no padrão de hidroxilações, *O*- e *C*-metilações e glicosilações.

Chalconas compreendem um grupo de compostos polifenólicos que são intermediários na biossíntese de flavonoides e são associados a várias atividades biológicas, incluindo antiviral (KIAT *et al.*, 2006), antifúngica (SVETAZ *et al.*, 2004) e anti-inflamatória (LESPAGNOL *et al.*, 1972). As chalconas e dihidrochalconas (Figure 1) isoladas de *Eugenia* apresentam um padrão de substituição C-3' e/ou C-5'-Me que é relativamente raro, tendo potencial como marcador taxonômico. Segundo *The Dictionary of Natural Products* (2004), as chalconas e dihidrochalconas C-metiladas são compostos de ocorrência restrita e em 2004 representavam menos de 5% do total de chalconas de ocorrência natural descritas. Das doze

chalcones e dihydrochalcones (**76-81**) descritas para o gênero *Eugenia*, cerca de 70% apresentam o padrão de substituição C-3' e/ou C-5'-Me.

A presença de flavonóis já foi descrita em várias espécies de *Eugenia* (**Tabela 4**), sendo formados principalmente pelas agliconas miricetina (**41**) e quercetina (**35**) e seus derivados metilados e glicosilados (**Figure 2**). Outras agliconas e derivados também podem ser encontrados, como o caemferol (**33**), mearnsetina (**47**) e gossypetina *O*-metil glicosilada (**40**). A glicose, a ramnose e a galactose aparecem como os carboidratos mais frequentes, podendo-se considerar a arabinose e a xilose como de ocorrência mais rara. A ocorrência de flavonas no gênero *Eugenia* é mais restrita. Duas novas 3-*C*-metil flavonas glicosiladas foram isoladas das partes aéreas de *E. kurzii*, a 3-*C*-metil-apigenina-5-*O*-ramnosídeo (**57**) e a 3-*C*-metil-luteolina-5-*O*-ramnosídeo (**58**) (Painuly & Tandon, 1983). Já das folhas de *E. biflora* foi isolada uma 6',8'-*C*-metil flavona denominada eucaliptina (**59**) (GOTTILIEB *et al.*, 1972). HARON *et al.* (1992) investigaram a ocorrência de flavonóis and proanthocyanidins em 17 espécies deste gênero, a miricetina (**41**), a quercetina (**35**) e o kaempferol (**33**) foram identificados em 100, 71 e 24% das espécies investigadas, respectivamente.

Outra subclasse de flavonoides de ocorrência frequente na família Myrtaceae são as antocianinas, responsáveis pelo processo de pigmentação de flores e frutos e com importantes propriedades farmacológicas descritas, dentre estas, destacam-se como bons agentes antioxidantes (EINBOND *et al.* 2004). Dentre as antocianinas identificadas no gênero *Eugenia*, podem ser citadas a delphinidina (**70**), malvinidinas (**71**) e pentunidinas 3,5-diglicosiladas (**75**). A **Tabela 4** mostra uma lista com os flavonoides isolados no gênero e a **Figura 3** apresenta suas respectivas estruturas.

Tabela 4. Alguns flavonoides isolados do gênero *Eugenia*

Composto	Espécie	Referência
Canferol (33)	<i>E. jambolana</i>	SUBRAMANIAN & NAIR, 1972 BHARGAVA <i>et al.</i> , 1974 MAHMOUD <i>et al.</i> , 2001
	<i>E. edulis</i>	HUSSEIN <i>et al.</i> , 2003
	<i>E. castanea</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. doubledayi</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. hirta</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. virens</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
Caferol-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -galoil- β -D-glucopiranosídeo) (34)	<i>E. hyemaslis</i>	BOKESCH <i>et al.</i> , 2008
Quercetina (35)	<i>E. jambolana</i>	SUBRAMANIAN & NAIR, 1972 BHARGAVA <i>et al.</i> , 1974 TIMBOLA <i>et al.</i> , 2002
	<i>E. javanica</i>	KUO <i>et al.</i> , 2004 SIMIRGIOTIS <i>et al.</i> , 2008

	<i>E. edulis</i>	HUSSEIN <i>et al.</i> , 2003
	<i>E. luschnathiana</i>	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008
	<i>E. reinwardtiana</i>	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008
	<i>E. choapamensis</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. castanea</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. doubledayi</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. glomerata</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. grandis</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. hirta</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. leucoxydon</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. mugiensis</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. prasina</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. spicata</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. uniflora</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. virens</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. brasiliensis</i>	MAGINA <i>et al.</i> , 2012
<hr/>		
7-metil-quercetina (36)		
Quercetina-3-D-glucosido (37)	<i>E. jabolana</i>	SUBRAMANIAN & NAIR, 1972
Quercetina-4''-O-acetato (38)	<i>E. jabolana</i>	MAHMOUD <i>et al.</i> , 2001
Rutina (39)	<i>E. brasiliensis</i>	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008
Gossypetina-3,5-dimetil-5-O- β -glucosido (40)	<i>E. edulis</i>	HUSSEIN <i>et al.</i> , 2003
<hr/>		
Miricetina (41)	<i>E. jabolana</i>	SUBRAMANIAN & NAIR, 1972 TIMBOLA <i>et al.</i> , 2002 MAHMOUD <i>et al.</i> , 2001
	<i>E. javanica</i>	KUO <i>et al.</i> , 2004
	<i>E. malaccensis</i>	DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2006
	<i>E. luschnathiana</i>	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008
	<i>E. reinwardtiana</i>	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008
	<i>E. axillaris</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. choapamensis</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. cariophylus</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. castanea</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. doubledayi</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. fastigiata</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. glomerata</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. grandis</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. hirta</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. jambos</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. leucoxydon</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. mugiensis</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. papillosa</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. prasina</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. spicata</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. uniflora</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
	<i>E. virens</i>	HARON <i>et al.</i> , 1992
<hr/>		
Miricetina-3,5,3'-trimetil eter (42)	<i>E. edulis</i>	HUSSEIN <i>et al.</i> , 2003
<hr/>		
Miricetina-3-O-(4''-O-acetil)- α -L-rhamnopirasideo (43)	<i>E. jabolana</i>	MAHMOUD <i>et al.</i> , 2001
<hr/>		
Miricetina-4'-metil ether 3-O- α -L-rhamnopirasideo (44)	<i>E. jabolana</i>	MAHMOUD <i>et al.</i> , 2001
<hr/>		
Miricetina-3-L-arabinosideo (45)	<i>E. jabolana</i>	SUBRAMANIN & NAIR, 1972
Miricetrina (46)	<i>E. jabolana</i>	MAHMOUD <i>et al.</i> , 2001
Mearnsetina (47)	<i>E. malaccensis</i>	DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2006
Mearnsetina-3-O-(4''-O-acetil)- α -L-rhamnopiranosideo (48)	<i>E. jabolana</i>	MAHMOUD <i>et al.</i> , 2001
<hr/>		
Mearnsitrina (49)	<i>E. javanica</i>	NAIR <i>et al.</i> , 1999
Afzelina 2''-O-galato (50)	<i>E. hyemalis</i>	BOKESCH <i>et al.</i> , 2008

Afzelina 3''-O-galato (51)	<i>E. hyemalis</i>	BOKESCH <i>et al.</i> , 2008
Catequina (52)	<i>E. pollicina</i> <i>E. brasiliensis</i>	RAMFUL <i>et al.</i> , 2011 MAGINA <i>et al.</i> , 2012
Epicatequina (53)	<i>E. pollicina</i>	RAMFUL <i>et al.</i> , 2011
Epicatequina gallato (54)	<i>E. pollicina</i>	RAMFUL <i>et al.</i> , 2011
Dihidromiricetina (55)	<i>E. jambolana</i>	SUBRAMANIAN & NAIR, 1972
(2S)-8-formil-5-hidroxi-7-metoksi-6-metil-flavanona (56)	<i>E. uperculata</i>	YE <i>et al.</i> , 2004
3-C-metilapigenina-5-O-rhamnosideo (57)	<i>E. Kurzii</i>	PAINULY & TANDON, 1983
3-C-metilluteolina-5-O-rhamnosideo (58)	<i>E. Kurzii</i>	PAINULY & TANDON, 1983
Eucaliptina (59)	<i>E. biflora</i>	GOTTLIEB <i>et al.</i> , 1971
2'-C-metil-5'-O-galoilmiricetina-3-O-rhamnopyranoside (60)	<i>E. javanica</i>	NAIR <i>et al.</i> , 1999
Sizalterina (61)	<i>E. Johnsonii FMuell</i>	HARRIS <i>et al.</i> , 2007
Cianidina (62)	<i>E. brasiliensis</i>	FLORES <i>et al.</i> , 2012
Cianidina-3-arabinosideo (63)	<i>E. brasiliensis</i>	FLORES <i>et al.</i> , 2012
Cianidina-3-glucosideo (64)	<i>E. agregata</i> <i>E. brasiliensis</i> <i>E. javanica</i> <i>E. brasiliensis</i> <i>E. umbelliflora</i>	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008 REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008 REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008 FLORES <i>et al.</i> , 2012 KUSKOSKI <i>et al.</i> , 2003
Cianidina-3-xylosideo (65)	<i>E. brasiliensis</i>	FLORES <i>et al.</i> , 2012
Cianidina-3-galactosideo (66)	<i>E. brasiliensis</i>	FLORE <i>et al.</i> , 2012
Delfinidina (67)	<i>E. brasiliensis</i>	FLORES <i>et al.</i> , 2012
Delfinidina-3-pentosideo (68)	<i>E. brasiliensis</i>	FLORES <i>et al.</i> , 2012
Delfinidina-3-glucosideo (69)	<i>E. agregata</i> <i>E. brasiliensis</i> <i>E. umbelliflora</i>	REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008 REYNERTSON <i>et al.</i> , 2008 KUSKOSKI <i>et al.</i> , 2003
Delfinidina-diglucosideo (70)	<i>E. jambolana</i>	VEIGAS <i>et al.</i> , 2007
Malvidina-3,5-diglucosideo (71)	<i>E. myrtifolia</i> <i>E. jambolana</i>	LONGO <i>et al.</i> , 2007 VEIGAS <i>et al.</i> , 2007
Malvidina-3-glucosideo (72)	<i>E. brasiliensis</i> <i>E. umbelliflora</i>	FLORES <i>et al.</i> , 2012 KUSKOSKI <i>et al.</i> , 2003
Pelargonidina-3-glucosideo (73)	<i>E. umbelliflora</i>	KUSKOSKI <i>et al.</i> , 2003
Peonidina-3-glucosideo (74)	<i>E. umbelliflora</i>	KUSKOSKI <i>et al.</i> , 2003
Pentunidina diglicosideo (75)	<i>E. jambolana</i> <i>E. umbelliflora</i>	VEIGAS <i>et al.</i> , 2007 KUSKOSKI <i>et al.</i> , 2003
3'-formil-4'-6'-dihidroxi-2'-metoksi-5'-metil chalcona (76)	<i>E. uperculata</i>	YE <i>et al.</i> , 2004
Pinostrobin chalcona (77)	<i>E. singampattiana</i>	KALA <i>et al.</i> , 2011
Aurentiacina (78)	<i>E. javanica</i>	KIM <i>et al.</i> , 2012
Mirigalona (79)	<i>E. jambos</i>	JAYASINGHE <i>et al.</i> , 2007
Mirigalona G (80)	<i>E. jambos</i>	JAYASINGHE <i>et al.</i> , 2007
2',6'-dihidroxi-4-metoksi dihidrochalcona (81)	<i>E. jambos</i>	JAYASINGHE <i>et al.</i> , 2007

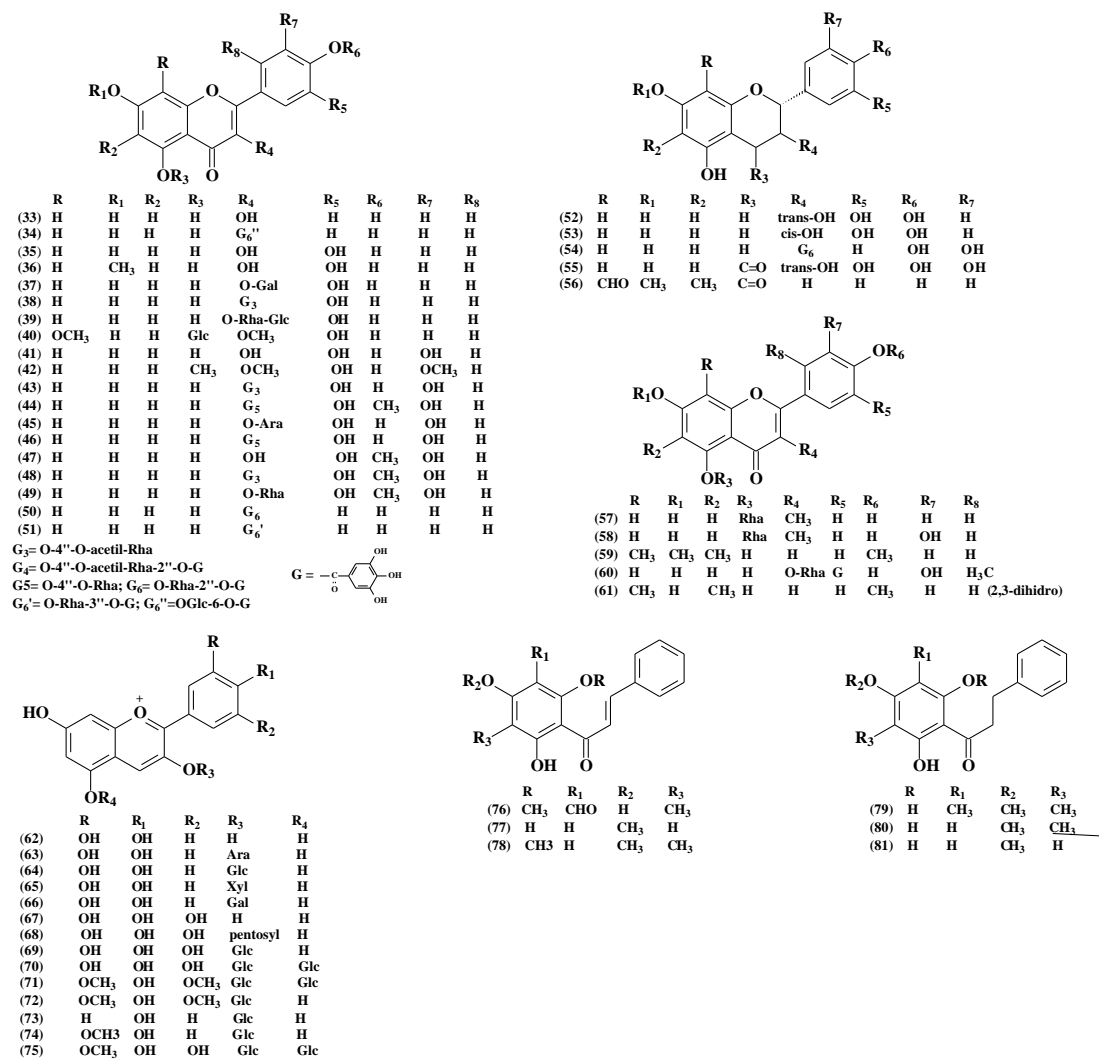


Figura 3. Alguns flavonoides isolados de espécies do gênero *Eugenia*

2.5.3 Taninos

Segundo a estrutura química, os taninos são usualmente classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis, biossintetizados a partir do chiquimato, são constituídos de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, onde os grupos hidroxilas são esterificados com os ácidos fenólicos. Já os taninos condensados, ou proantocianidinas, são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Considerando os estudos fitoquímicos relatados até então, observou-se que no gênero *Eugenia* a ocorrência de taninos elágicos e gálicos (hidrolisáveis) é muito mais frequente entre as espécies citadas quando em comparação as proantocianidinas (taninos condensados).

Das folhas de *E. uniflora* foram isolados dois novos taninos hidrolisáveis macrocíclicos denominados Eugeniflorinas D₁ (**123**) e D₂ (**125**). Eugeniflorina D₂ (**125**) foi o primeiro composto a possuir um grupo dehidrovaloneoil na molécula (LEE *et al.*, 1997).

Das folhas de *E javanica* (sinonímia *Syzygium samarangense*) e *E aquea* foram isoladas duas novas proantocianidinas denominadas samarageninas A (**82**) B (**83**), respectivamente. Este foi o primeiro relato de isolamento de proantocianidinas que apresentam ligação do tipo éter, formada por um acoplamento oxidativo pirogalol-pirogalo (NONAKA *et al.*, 1992). HARON e colaboradores (1992) investigaram a presença de procyanidina e prodelfinidina em 17 espécies de *Eugenia* e observaram essas duas proantocianidinas em 82% das espécies investigadas. A **Tabela 5** e a **Figura 4** mostram alguns dos taninos isolados no gênero.

Tabela 5. Alguns taninos isolados do gênero *Eugenia*

Composto	Espécie	Referência
Samaragenina A (82)	<i>E. javanica</i>	NONAKA <i>et al.</i> , 1992
samaragenina B (83)	<i>E. javanica</i>	NONAKA <i>et al.</i> , 1992
Prodelfinidin B-2,3 ^{''} -O-gallate (84)	<i>E. javanica</i>	NONAKA <i>et al.</i> , 1992
Galoil prodelfinidina B-3.3 ^{''} -O-galato (85)	<i>E. javanica</i>	NONAKA <i>et al.</i> , 1992
Vescalagina (86)	<i>E. grandis</i>	NONAKA <i>et al.</i> , 1987
Castalagina (87)	<i>E. grandis</i>	NONAKA <i>et al.</i> , 1987
Casuarina (88)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1983
Pterocarina A (89)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1993
2,3-di-O-galoil-b-D-glucose (90)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1993
1,2,3,6-tetra-O-galoil-β-D-glucose (91)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1993
1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-b-D-glucose (92)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1993
Strictinina (93)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1993
1-desgaloileugeniina (94)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1993
1-(β)-O-galoilpendunculagina (95)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1993
Rugosina A (96)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1993
Rugosina D (97)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1993
Rugosina E (98)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1993
Terflavina (99)	<i>E. grandis</i>	NONAKA <i>et al.</i> , 1987
1-O-galoil castalagina (100)	<i>E. grandis</i> <i>E. jambos</i>	NONAKA <i>et al.</i> , 1987 YANG <i>et al.</i> , 2000
Casuarina (101)	<i>Jambos</i>	YANG <i>et al.</i> , 2000
Jamutannina A (102)	<i>E. jambolana</i>	OMAR <i>et al.</i> , 2012
Jamutannina B (103)	<i>E. jambolana</i>	OMAR <i>et al.</i> , 2012
Cornussina B (104)	<i>E. jambolana</i>	OMAR <i>et al.</i> , 2012

Oenotheina B (105)	<i>E. uniflora</i>	LEE <i>et al.</i> , 1997
Oenotheina C (106)	<i>jambolana</i>	OMAR <i>et al.</i> , 2012
Ácido 3,3',4-tri-O-metil elágico (107)	<i>E. maire</i>	BRIGGS <i>et al.</i> , 1961
Syzyginina A (108)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1996
Syzyginina B (109)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1996
Gemina D (110)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1996
Eugenina (111)	<i>E. cariofilata</i>	KIM <i>et al.</i> , 2001 TANAKA <i>et al.</i> , 1993 NONAKA <i>et al.</i> , 1980 MAHMOUD <i>et al.</i> , 2001
ácido 3-O-β-D-(6'-galoil)-glucopiranosil gálico (112)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1993
2-O-galoil arbutina (113)	<i>E. hyemalis</i>	BOKESCH <i>et al.</i> , 2008
4-O-galoil arbutina (114)	<i>E. hyemalis</i>	BOKESCH <i>et al.</i> , 2008
2,6-di-O-galoil arbutina (115)	<i>E. hyemalis</i>	BOKESCH <i>et al.</i> , 2008
2,4,6-tri-O-galoil arbutina (116)	<i>E. hyemalis</i>	BOKESCH <i>et al.</i> , 2008
Hyemalósideo A (117)	<i>E. hyemalis</i>	BOKESCH <i>et al.</i> , 2008
Hyemalósideo B (118)	<i>E. hyemalis</i>	BOKESCH <i>et al.</i> , 2008
Hyemalósideo C (119)	<i>E. hyemalis</i>	BOKESCH <i>et al.</i> , 2008
4-hydroxy-3-metoxi-fenol 1-O-β-D-(6'-O-galloil)-glucopiranosídeo (120)	<i>E. cariofilata</i>	TANAKA <i>et al.</i> , 1993
Metil 2-O-(6'-O-galloil)-D-glucopiranosídeo (121)	<i>E. cariofilata</i>	CHUN <i>et al.</i> , 2010
Nilocitin (122)	<i>E. jambolana</i>	MAHMOUD <i>et al.</i> , 2001
Eugeniflorina D ₁ (123)	<i>E. uniflora</i>	LEE <i>et al.</i> , 1997
Oenotheina B (124)	<i>E. jambos</i>	YANG <i>et al.</i> , 2000
Eugeniflorina D ₂ (125)	<i>E. uniflora</i>	LEE <i>et al.</i> , 1997

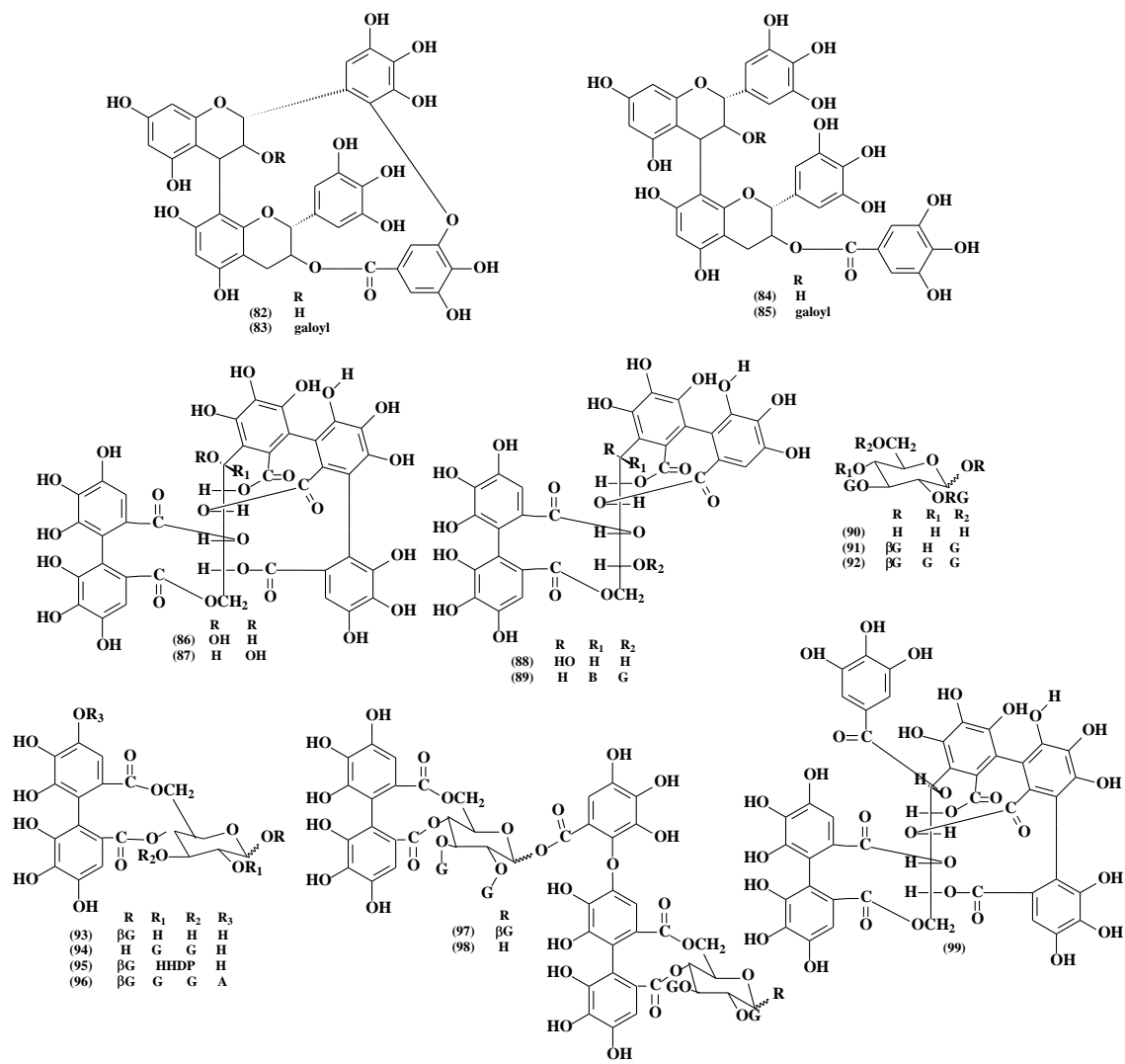


Figura 4. Alguns taninos isolados do gênero *Eugenia*

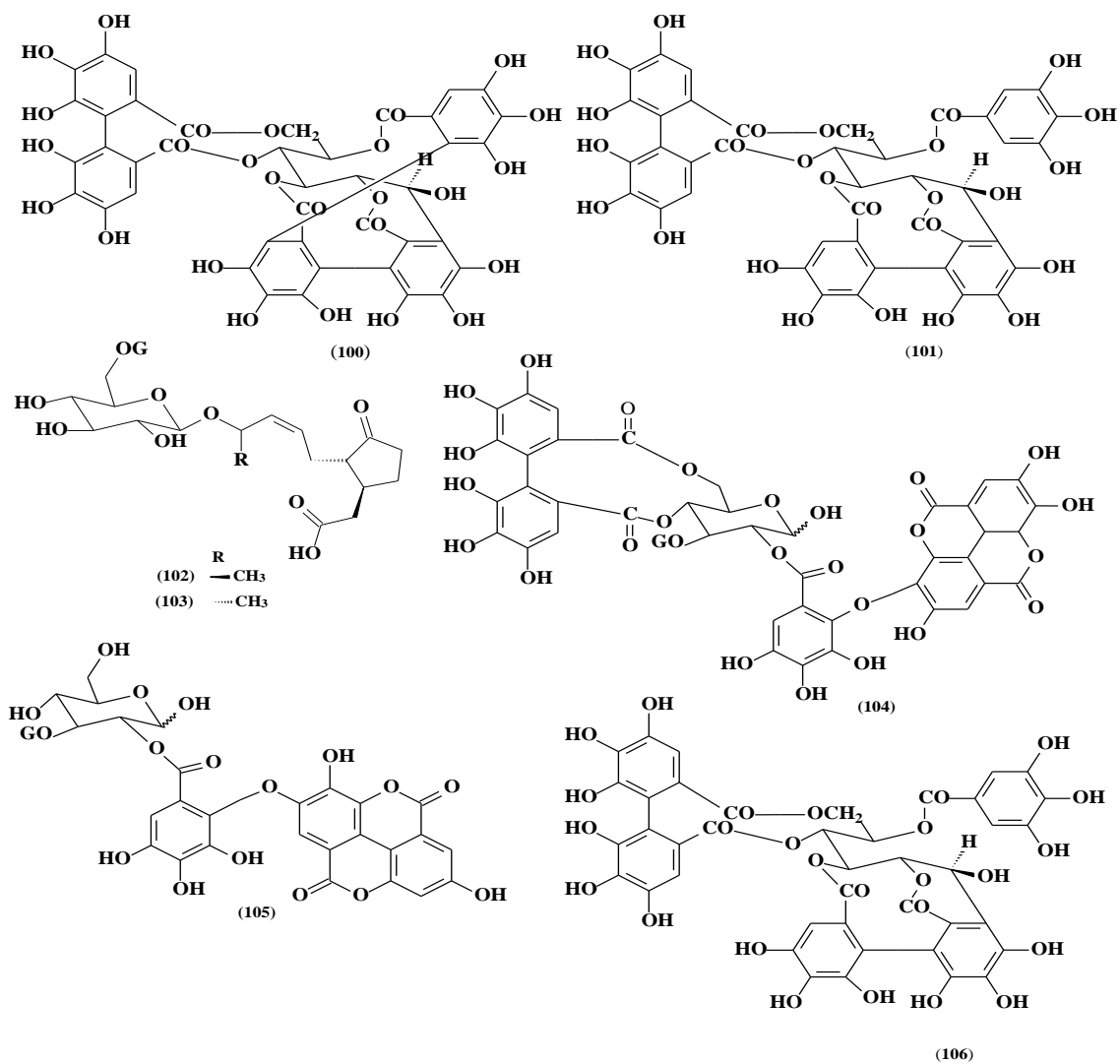


Figura 4. Continuação 1

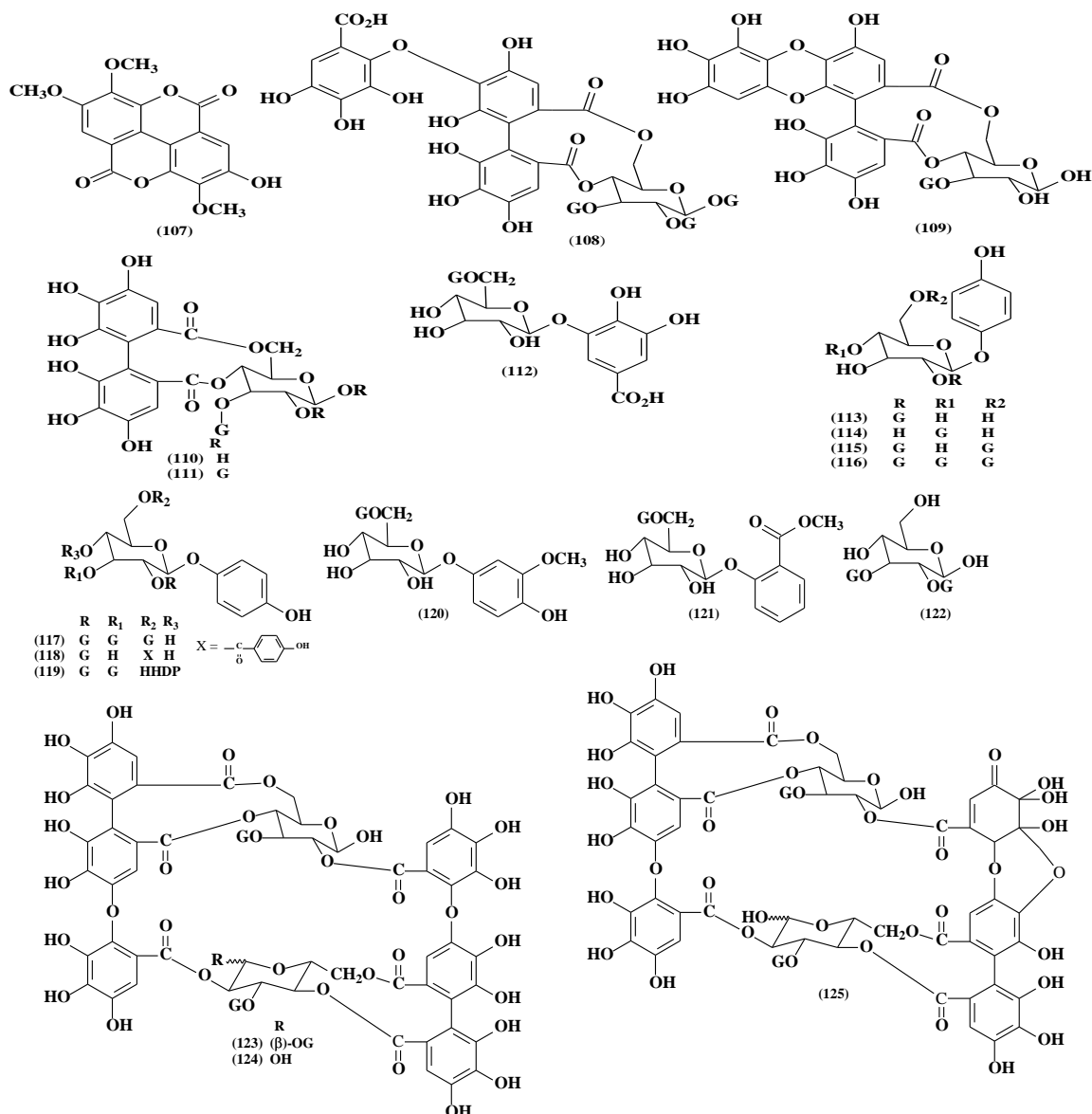


Figura 4. Continuação 2

2.6 Algumas informações sobre a espécie *Eugenia copacabanensis*

Eugenia copacabanensis Kiaersk (Figura 5), popularmente conhecida como princesinha de copacabana, é uma espécie encontrada na forma de arbusto com até 6 m de altura, que ocorre, principalmente, em restingas localizadas no Rio de Janeiro (SOUZA & MORIN, 2008). Suas folhas, quando novas, são de coloração avermelhada, contrastando com as folhas maduras, de coloração verde brilhante, por isso esta espécie costuma ser cultivada para fins de ornamentação. Seus frutos, em forma de pera, são muito apreciados como sucos.



Figura 5. Folhas, flores e frutos de *Eugenia copacabanensis*.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivos Gerais*

Fazer o estudo químico da espécie *Eugenia copacabanensis*, aplicando técnicas cromatográficas para isolamento dos metabólitos presentes na espécie, utilizando-se de técnicas espectroscópicas para elucidação estrutural dos mesmos e realizar ensaios biológicos de extratos, frações e substâncias isoladas desta espécie.

3.2 *Objetivos Específicos*

- Buscar informações na literatura relacionadas a aspectos químicos e farmacológicos de espécies do gênero, visando aquisição de conhecimento relacionado ao gênero;
- Fazer a coleta do material vegetal;
- Preparar os extratos das folhas e galhos da planta, utilizando a maceração como método de extração;
- Isolar, purificar e identificar metabólitos especiais dessa espécie;
- Preparar derivados, quando necessário, com o propósito de facilitar a identificação dos compostos isolados e potencializar alguma atividade biológica pré-existente;

- Avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos, e frações de *E. copacabanensis*.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e equipamentos

Utilizou-se evaporador rotatório Fisaton 801 para concentração dos extratos brutos e frações.

As análises em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio 20x20 cm com sílica gel 60 F₂₅₄, da Merck. As substâncias foram visualizadas através de irradiação com lâmpada ultravioleta com comprimentos de onda de 254 e 365nm e/ou reveladas com os reagentes vanilina sulfúrica (vanilina: 1,0 g, 45 mL de água, 45 mL de EtOH e 10 mL de H₂SO₄) e vapores de iodo.

Para cromatografia em coluna foi usada como fase estacionária sílica gel 70–230 mesh, e para cromatografia em coluna rápida (flash) foi usada sílica gel 230-400, ambas da marca Vetec. Os solventes e reagentes utilizados foram de grau P.A.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Mel–Temp II do Laboratory devices U.S.A., utilizando-se capilar sem correção dos valores.

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram registrados em um espectrofotômetro VERTEX-70 com transformada de Fourier, em pastilhas de KBr ou em filmes sobre cela de NaCl.

As técnicas fotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis da marca Shimadzu, modelo UV-mini 1240, em cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm.

Os cromatogramas e espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas computadorizado com analisador quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV, acoplado em cromatógrafo com fase gasosa, CG/EM-QP2010 Plus da Shimadzu.

Nas análises realizadas em CLAE utilizou o aparelho Shimadzu LC DAD com detector de fotodiodo, com coluna Shimadzu C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) e CLAE Shimadzu LC-20AT, detector UV.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono-13 (RMN ¹³C), incluindo experimentos em 2D, foram obtidos em aparelhos Brücker, modelos Advance II com frequências de 400 MHz e 500 MHz para ¹H e 125 MHz e 100 MHz para

¹³C. Os solventes usados foram clorofórmio deuterado (CDCl₃), metanol deuterado (D₃COH) acetona deuterada (D₃CCOCD₃) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆). Como padrão interno foi usado tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram expressos em Hertz (Hz).

4.2 Material vegetal

As folhas e galho de *E. copacabanensis* foram coletados no dia 03/06/2010 em arraial do cabo, restinga do salgado, próximo ao condomínio caiçara, aproximadamente às 11:30 h.

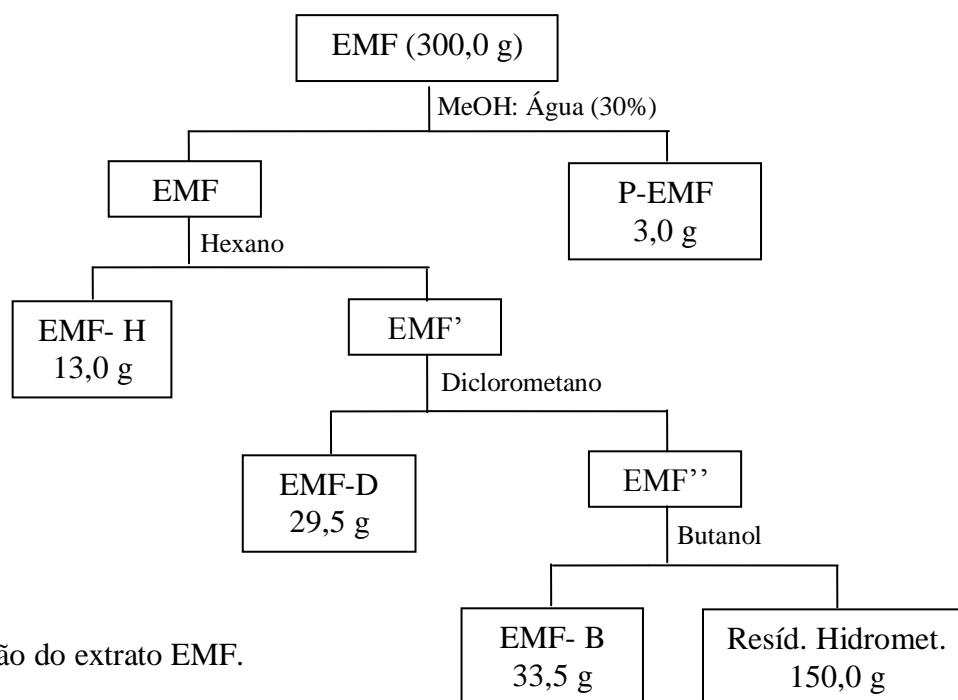
A ratificação taxonômica foi realizada pelo botânico Marcelo Souza (Museu Nacional-UFRJ) e há uma exsicata, de nº 34535, depositada no Herbário RBR, IB-UFRRJ.

4.3 Obtenção dos extratos brutos

Após secagem de todo material botânico, folhas (501,0 g) e galhos (888,5 g) foram triturados e submetidos, separadamente, à extração, por maceração exaustiva em metanol. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório a 40°C, sobre pressão reduzida. Obtendo-se 382,43g de extrato metanólico de folhas de *E. copacabanensis* (EMF, 76,3 %) e 133,33g do extrato metanólico de galhos da mesma (EMG, 15 %).

4.4 Fracionamento do extrato EMF

O extrato EMF (300g) foi solubilizado em uma solução metanol: água (30%) e a fração solúvel foi vertida em um funil de decantação e fracionado por sucessivas partições com os solventes hexano, diclorometano e butanol. Desse fracionamento foram obtidas quatro frações: a fração em hexano (EMF-H, 13 g), fração em diclorometano (EMF-D, 29,5 g), fração em álcool butílico (EMF-B 33,5 g) e o resíduo hidrometanólico. Já a fração insolúvel (P-EMF) foi armazenada na geladeira para ser estudada futuramente. Abaixo, encontra-se o **Esquema 1** que resume esta etapa.

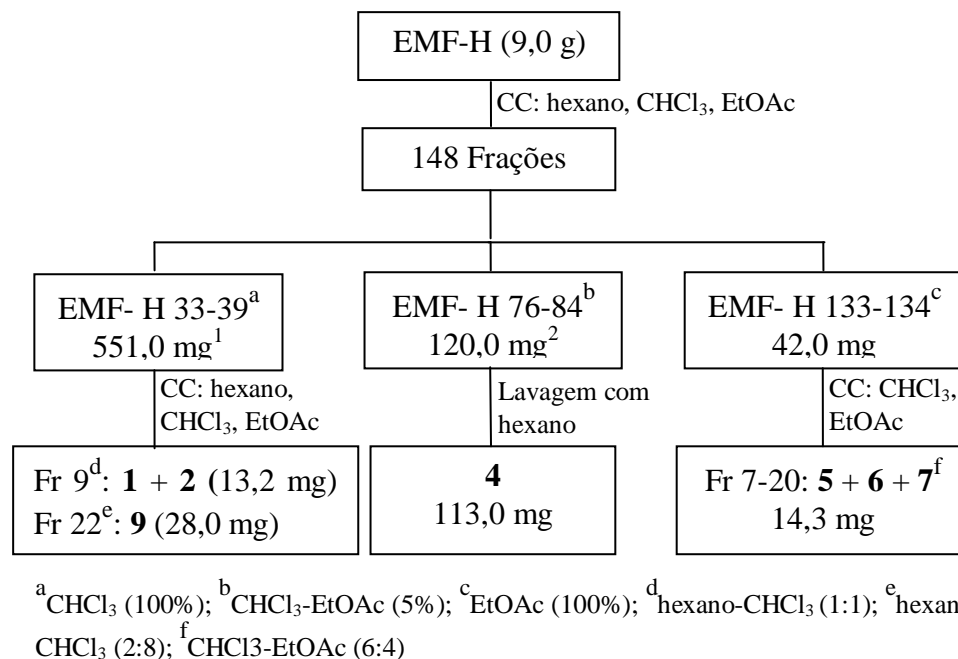


Esquema 1. Partição do extrato EMF.

4.4.1 Fração EMF-H

Parte da fração EMF-H (9g) foi submetida à cromatografia em coluna (CC), eluída com n-hexano, n-hexano-CHCl₃ e CHCl₃-AcOEt, fornecendo 148 frações, recolhidas em erlenmeyer de 125 mL. O grupo de frações 33-39 (551,0 mg) foi recromatografada em coluna produzindo 30 frações sendo a de número 9, sólido branco, identificada como uma mistura de dois triterpenos conhecidos como α e β -amirina (**1 + 2**, 13,2 mg) e a fração 22 identificada como β -sitosterol (**9**, pf = 138-141° C , 28,0 mg).

O grupo de frações de 76 a 84 forneceu um sólido amorfo branco. Este foi lavado com hexano, submetido a análises de RMN ¹H, RMN de ¹³C e CG-MS e identificado como betulina (**4**, pf = 254-257° C, 113 mg). A fração 133-134 foi recromatografada e a fração FM-H 7-20, óleo amarelado, submetida às técnicas de RMN uni e bidimensionais e CG-MS. As análises dos dados espectrais permitiram identificá-la como uma mistura dos sesquiterpenos clovanodiol, globulol e viridiflorol (**5 + 6 + 7**, 14,3 mg). O **Esquema 2**, abaixo, ilustra, de forma resumida, esta etapa.

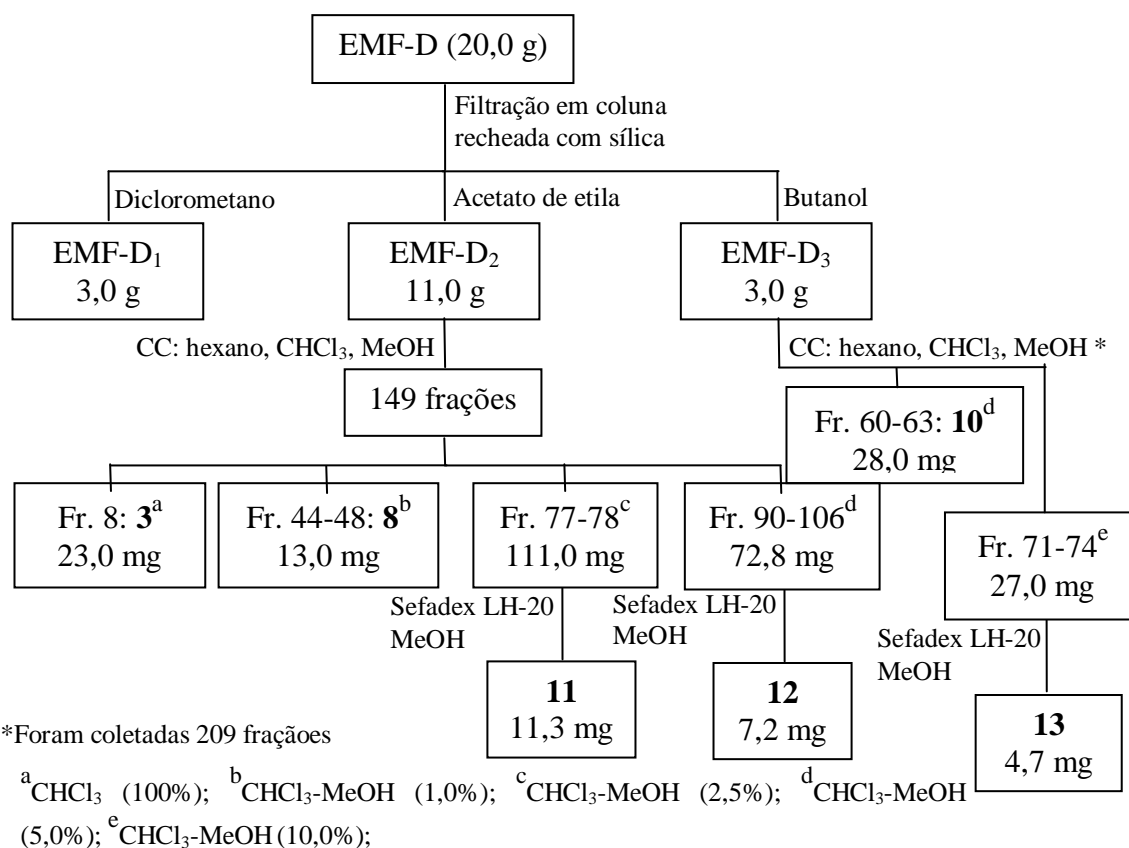


Esquema 2. Fracionamento cromatográfico de EMF-H.

4.4.2.1 Fração EMF-D

A partir de EMF-D (20,0 g), através de uma coluna filtrante contendo gel de sílica, foram obtidas três novas frações. Os solventes utilizados neste processo foram diclorometano (EMF-D₁, 3,2 g), acetato de etila (EMF-D₂, 11,0 g), e butanol (EMF-D₁, 3,0 g).

EMF-D₂ foi submetida a CC, eluída com CHCl₃ 100 %, aumentando a polaridade até CHCl₃-MeOH (1:1). Neste caso, foram obtidas 149 frações. A frações 8 e 44-48 foram identificadas como ácido ursólico (**3**, pf = 275-279° C, 23,0 mg) e ácido 30-hidroxi-ursólico (**8**, pf = 282-285° C, 13,0 mg), respectivamente. As frações EMF-D₂ 77-78 e 90-106 foram purificadas em coluna contendo Sephadex LH-20, eluídas com MeOH, produzindo, respectivamente, caemferol-3-O-rhamnosideo (**11**, 11.3 mg) e quercetina-3-O-rhamnosideo (**12**, 7.2 mg). A fração EMF-D₃ foi, também, cromatografado em coluna com gel de sílica, eluída com sistema análogo ao empregado para a fração EMF-D₁ e forneceu 209 frações. A fração 60-63 foi lavada com acetona e identificada como b-sitosterol glicosilado (**10**, 28 mg). A fração 96-114 (27,0 mg) foi purificada em coluna Sephadex LH-20 e identificada como quercetina-3-O-xyloside (**13**, 4,7 mg). Abaixo, encontra-se o **Esquema 3**, que ilustra este procedimento.



Esquema 3. Fracionamento cromatográfico de EMF-D.

4.4.2.2 Acetilação da substância 8

Em um balão de 50 mL foram misturados 10 mg do composto 8 (0,021 mmol), 1 mL de piridina e 0,2 mL de anidrido acético (0,21 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação durante o período de 24 horas. Posteriormente, o mesmo foi vertido em um funil de decantação, onde ocorreram três extrações com clorofórmio (BANDEIRA *et al.*, 2007). A última etapa deste processo consistiu na purificação do produto obtido através de CC, tendo CHCl₃ como eluente. Obteve-se 9,44 mg do produto acetilado, portanto, o rendimento da reação foi de aproximadamente 80%. A **Figura 6**, abaixo, mostra reação de acetilação do composto 8.

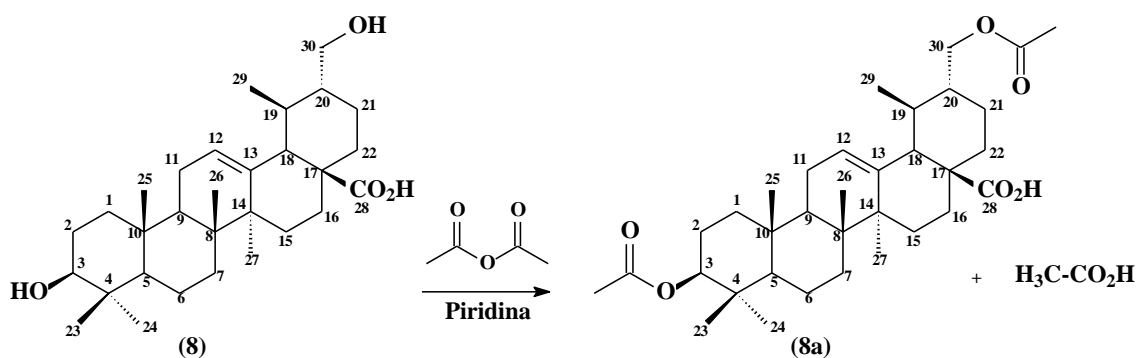


Figura 6. Reação de acetilação do composto **8**: obtenção do paroduto **8a**.

4.4.2.3 Metilação do produto **8a**

A preparação do diazometano foi realizada adicionando-se 2,14 g de n-metil-n-nitroso-sulfonamida (Diazald) em um balão em banho de gelo. Em seguida, acrescentou-se 30,0 mL de éter etílico para solubilização do reagente. Posteriormente, foram acrescentados, gota a gota, 10,0 mL de uma solução 4,0% de KOH em etanol. Tampou-se o balão em agitação magnética leve até homogeneização. Adaptou-se o balão ao kit de destilação Diazald com aquecimento brando. Após destilação, o diazometano foi condensado em solução etérea resfriada em banho de gelo. O produto foi mantido em geladeira até a utilização do mesmo (CARVALHO, et al, 2006).

A reação de metilação do composto **8a** foi realizada adicionando-se 9,44 mg do composto **8a** e 10 mL de solução etérea de diazometano, em um recipiente de 30 mL, observando-se desprendimento gasoso (N_2), que é um indício de reação. Ao final do procedimento, obteve-se 9,29 mg (96%) do composto **8b**, segundo a reação abaixo (**Figura 7**).

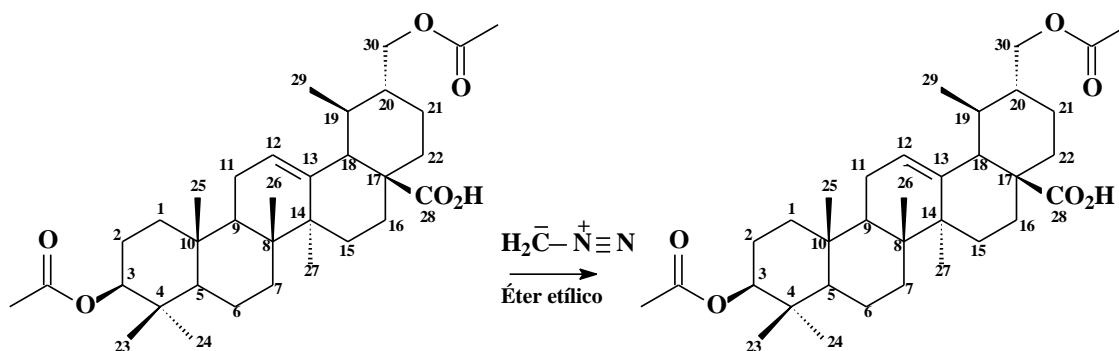
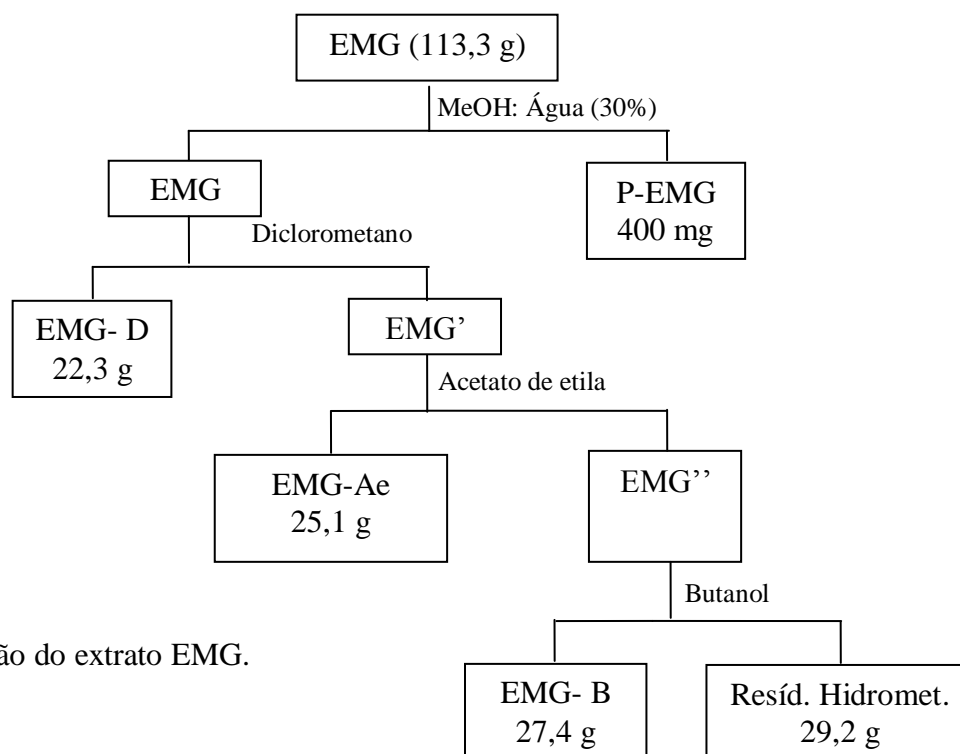


Figura 7. Reação de metilação do composto **8a**: obtenção do composto **8b**.

4.5 Particionamento do Extrato EMG

O processo de partição deste extrato (EMG) foi realizado de forma análoga ao do extrato EMF e neste também foi obtido um precipitado (P-EMG) na etapa de solubilização do extrato. Os solventes utilizados na partição foram: diclorometano, acetato de etila e butanol. Obtiveram-se, com isso, quatro frações: EMG- D, EMG-AE, EMG-B e o resíduo hidrometanólico, de acordo com o **Esquema 4**, abaixo.

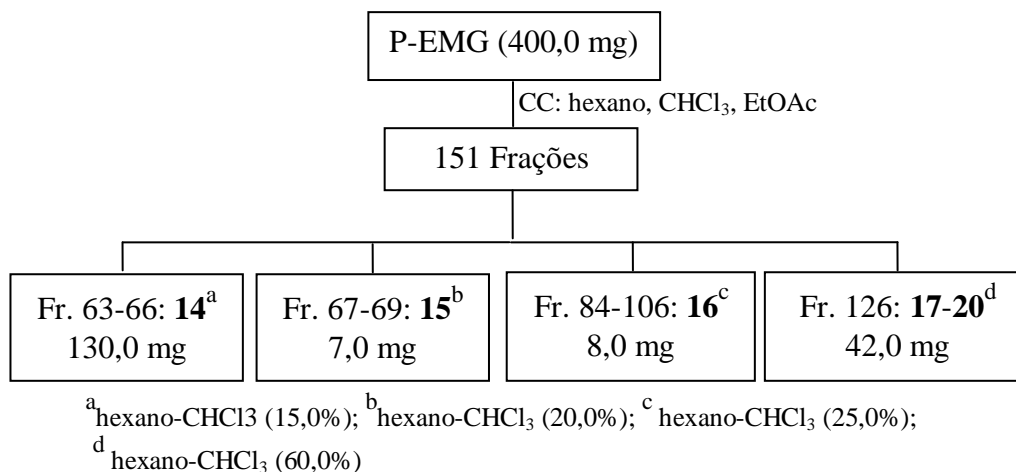


Esquema 4. Partição do extrato EMG.

4.5.1 Fração P-EMG

O sólido P-EMG (400mg), de coloração amarelada, foi submetido a CC, eluída com hexano, clorofórmio e acetato de etila, produzindo 151 frações. O monitoramento através de CCDA conduziu a reunião das frações P-EMG 63-66 (130mg), 67-69 (7,0 mg) e 84-103 (8,0 mg). Estas frações foram, então, submetidas às análises de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e CG-MS, gerando espectros que foram analisados e comparados com dados da literatura. Este conjunto de informações permitiu identificar as substâncias como friedelina (**14**, pf =, 103.0 mg), friedelan-3,4-lactona (**15**, pf =, 6.2 mg) e taraxerol (**16**, pf =, 8,0 mg), respectivamente.

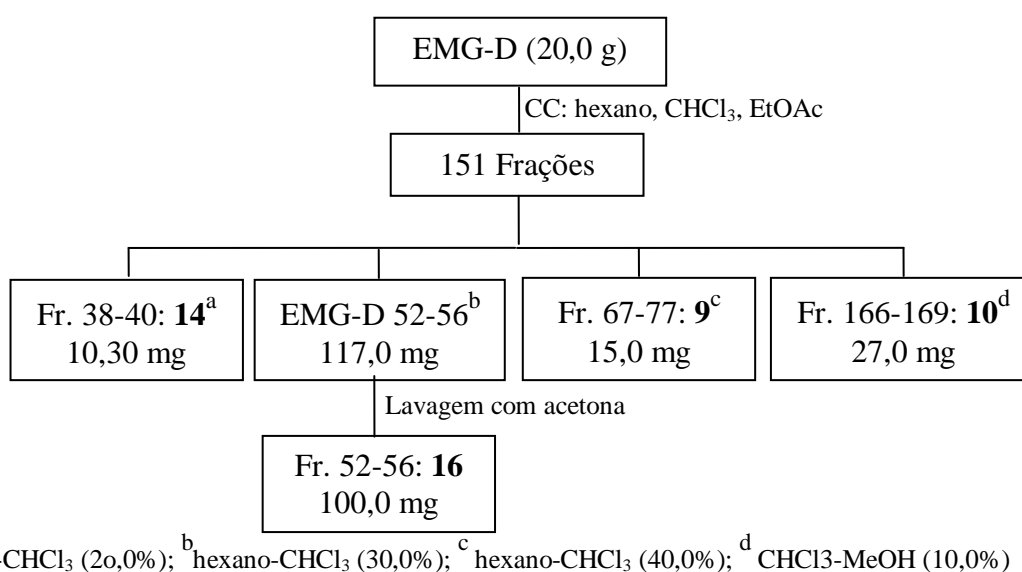
A fração P-EMG 126 (33,0 mg) foi submetida às análises mencionadas acima e os dados obtidos levaram à identificação de quatro derivados do ácido cumárico: cumarato de octacosanila (**17**), cumarato de heptacosanila (**18**), cumarato de hexacosanila (**19**) e cumarato de tetracosanila (**20**) respectivamente. Abaixo, encontra-se o **Esquema 5**, que ilustra esta etapa.



Esquema 5. Fracionamento cromatográfico de P-EMG.

4.5.2 Fração EMG-D

Parte da fração EMG-D (20,0 g) foi submetida à separação através de cromatografia coluna, utilizando-se hexano, clorofórmio e metanol como eluentes. Este procedimento (**Esquema 6**) resultou na coleta de 182 frações que foram monitoradas por CCDA e reunidas de acordo com os perfis cromatográficos. EMG-D 38-40, sólido branco, foi identificado como friedelina (**14**, 10,3 mg). A fração 52-56 apresentou a formação de um sólido branco que foi lavado com acetona e identificado como taraxerol (**16**, 100 mg). As frações EMG-D 67-77 e EMG-D 166-169 foram identificadas como β -sitosterol (**9**, 15,0 mg) e β -sitosterol glicosilado (**10**), respectivamente.



Esquema 6. Fracionamento cromatográfico de EMG-D.

4.6 Determinação do teor de flavonoides totais dos extratos e frações de *E. copacabanensis*

Este ensaio foi realizado através de uma adaptação da metodologia descrita por MEDA *et al.*, (2005) e AHN *et al.*, (2007) que utiliza como reagente o cloreto de alumínio (AlCl₃). Neste experimento, foram utilizadas soluções dos extratos e partições (triplicatas) das folhas e galhos de *E. copacabanensis* com concentrações iguais a 0,4 mg/mL. A 2,0 mL destas soluções foram adicionados 2,0 mL de solução metanólica de AlCl₃ 2% (m/v) e as misturas foram deixadas em repouso. Após 30 minutos, as leituras foram feitas a 415 nm. O teor de flavonoides (mg Qc/g de extrato) foi obtido através da curva analítica, elaborada a partir de soluções de concentrações conhecidas de quercetina padrão.

Para a confecção da curva analítica foi preparada uma solução de quercetina em metanol de concentração 1,78 mg/mL da qual foram retiradas alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, e 40 mL as quais foram misturadas a 2,0 mL da solução de AlCl₃ (2,%). Após 30 minutos, foram realizadas as leituras, novamente em triplicata, espectrofotométricas em 415 nm e metanol foi usado como branco.

4.7 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos e frações de *E. copacabanensis* pelo método DPPH

Este ensaio foi realizado seguindo metodologia descrita na literatura, com algumas modificações relacionadas ao tempo às concentrações, monitorando-se o decréscimo de concentração do DPPH, promovido pelas amostras, em diferentes concentrações, através de medidas fotométricas (PÉREZ *et al.*, 2007). As leituras de absorvância foram feitas espectrofotômetro ELISA no comprimento de onda de 520 nm.

Para a determinação da antioxidante (%AA), utilizou-se uma solução metanólica de DPPH (0,3 mM). Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, onde foram pipetados 71 µL e 29 µL de DPPH. O controle negativo consistiu em 71µL de metanol e 29 µL DPPH. Como branco, misturou-se 71 µL de amostra com 29 µL de metanol. A %AA foi obtida através da expressão:

$$\%AA = 100 - \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}}$$

Os valores de IC₅₀ (concentração necessária para reduzir a concentração de DPPH a 50 %) foram obtidos através das curvas que foram confeccionadas plotando os valores de concentração na abscissa e %AA na ordenada.

4.8 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos e frações de *E. copacabanensis* pelo método *b*-caroteno-ácido linoleico

Este ensaio foi conduzido de acordo com a metodologia descrita por A. LUÍZ *et al* (2009). Foram adicionados 20 µL de uma solução clorofórmica de β-caroteno (20 mg/mL) a 40 µL de ácido linoleico e 400 mg de Tween 20. Esta mistura foi imediatamente diluída com 100 mL de água destilada saturada com oxigênio. A água foi adicionada lentamente sob agitação, para formar a emulsão. Posteriormente, 5 mL da emulsão foram transferidos para tubos de ensaio contendo 300 µL dos extratos testados (0,5 mg/mL). Como controle, usou-se 5 mL da emulsão com 300 µL de metanol. Um padrão Trolox (0,1 mg/mL) foi utilizado como referência. Todos os tubos de ensaio foram mantidos em banho Maria a 50° C por duas horas. As absorvâncias dos extratos, padrão e referência foram lidas em espectrofotômetro a 470 nm. As leituras foram realizadas no tempo inicial (t = 0) e no tempo final (t = 2h). Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A atividade antioxidante foi mensurada em termos da porcentagem de inibição da oxidação do β-caroteno, através da expressão:

$$\% \text{Inibição} = \frac{(\text{Abs}^{t=2}_{\text{amostra}} - \text{Abs}^{t=2}_{\text{controle}}) \times 100}{(\text{Abs}^{t=0}_{\text{controle}} - \text{Abs}^{t=2}_{\text{controle}})}$$

4.9 Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos e frações de *E. copacabanensis*

Os ensaios que serão descritos a seguir foram realizados pela aluna de iniciação científica Paula Monteiro, sob a orientação da professora Dra. Daniela Sales Alviano, no Laboratório de Estrutura de Superfície de Microorganismo, Instituto de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ.

Os micro-organismos e condições de cultivo empregados nos ensaios foram:

- (a) bactéria Gram-positiva - *Staphylococcus aureus* MRSA (BMB 9393), cepa clínica isolada no Hospital Clementino Fraga Filho, UFRJ e cultivada em ágar infusão de cérebro e coração bovinos (BHI) e crescido por 24 h a 37°C;
- (b) fungos leveduriformes - *Candida albicans* ATCC 10231, *Cryptococcus neoformans* T₁-444 Sorotipo A – formas clínicas obtidas da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP-SP. Todos foram cultivados em ágar Sabouraud e crescidos por 48 h em temperatura ambiente;
- (c) Fungo filamentoso – *Rhizopus oryzae* sedido pela Universidade Católica de Pernambuco (UCP 1506), foi cultivado em ágar batata dextrose (PDA) e crescido por 5 dias em temperatura ambiente.

As soluções dos extratos e frações foram preparados dissolvendo-se 10 mg de cada amostra em 100 μL de DMSO (concentração final igual a 100 mg/mL).

A determinação da concentração mínima inibitória dos extratos e das frações capaz de inibir 100% do crescimento microbiano, , foi realizada com base na metodologia internacional padrão do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI, 2008*) descrita para cada um dos micro-organismos listados para serem testados (CLSI Normas M27-A3 para leveduras, M38-A2 para fungo filamentosos, M11-A6 e M7-A4 para bactérias). Anfotericina B (AMB) e Ciprofloxacina (CIP) foram utilizadas como padrões de agentes antifúngico e antibacteriano, respectivamente.

Para observação da CIM, foram adicionados inicialmente 5 μL dos extratos e frações em placas de 96 poços, foram feitas microdiluições seriadas das substâncias em meio de cultivo RPMI-MOPS (pH 7.2) para fungos e Mueller-Hinton para bactérias.

A cepa de MRSA foi crescida em ágar BHI por 24 horas à 37°C. O inóculo inicial foi obtido através de suspensão em água para determinar uma D.O. entre 0,08– 0,1 em 625 nm (1×10^8 UFC). Foram feitas diluições desta suspensão (1:20 de meio) para obtenção do inóculo final de 5×10^6 UFC/mL. Foi adicionado em cada poço 10 μL do inóculo em um volume final de 110 μL de meio adicionado com amostra teste em suas respectivas diluições, obtendo-se uma suspensão de 5×10^5 UFC/mL.

Os fungos leveduriformes foram crescidos em ágar Sabouraud por 24 horas à 37°C e o filamentosos por 3 dias, em ágar dextrose batata (PDA), em temperatura ambiente. O inóculo inicial foi obtido através de suspensão em água para determinar uma D.O. entre 0.8 – 0.1 em 530 nm. Foram feitas diluições do inóculo 1:50 (10 μL em 500 μL de meio) e, deste, 1:20 (100 μL em 2000 μL de meio). Foi adicionado em cada poço 100 μL do inóculo, em um volume final de 200 μL de meio adicionado com amostra teste em suas respectivas diluições, obtendo uma suspensão de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL para os fungos leveduriformes e $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 para fungos filamentosos.

A CIM, tanto para os fungos como para a bactéria, foi determinada, após incubação, visualmente pela turvação e pela adição do corante de viabilidade resazurina (0,005% em PBS pH 7,2), que quando metabolizado pelas células, é reduzido a rezorufina mudando a cor de roxa para rosa (*Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI, 2008*).

A atividade microbiostática e microbicida foi avaliada após a determinação da CIM. Os micro-organismos foram incubados com os extratos ou suas respectivas frações em concentrações correspondentes a CIM, o dobro e o quádruplo da CIM. Posteriormente, 100

μL de cada sistema foi inoculado em meio de cultivo sólido e incubado para avaliação das unidades formadoras de colônia (UFC) de acordo com o micro-organismo avaliado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processamento cromatográfico de extratos desta planta resultou no isolamento e identificação de 20 substâncias, abaixo enumeradas (**Figura 8**). A elucidação estrutural das mesmas foi realizada através de análises espectrais, comparação com dados da literatura, além de considerações relacionadas à biossíntese de metabólitos secundários.

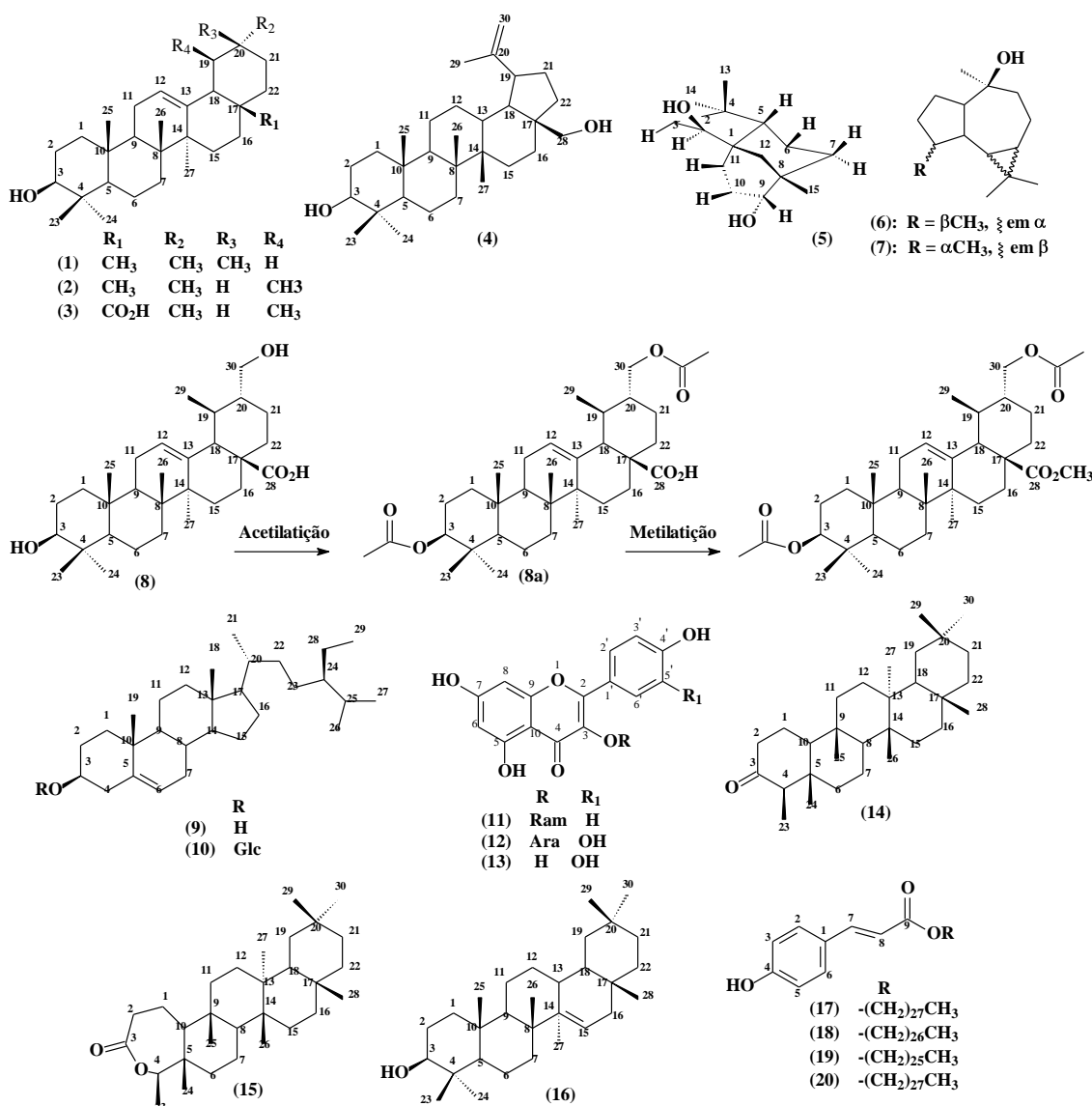


Figura 8. Estruturas das substâncias isoladas de folhas e galhos de *E. copacabanensis*.

5.1. Determinação estrutural das substâncias isoladas de folhas de *E. copacanensis*

5.1.1. Substâncias 1 e 2

O precipitado correspondente à mistura de **1** e **2** foi obtido do fracionamento cromatográfico de EMF-H (Item 4.4.1) e foi solúvel em clorofórmio, solvente no qual foram obtidos os espectros de RMN ^1H e DEPTQ.

No espectro de RMN ^1H (Figura 9) é possível observar uma grande quantidade de sinais na região entre δ_{H} 0,5 e 1,5. Isto é característico de espectros de triterpenos. Na região entre 0,75 e 1,15 ppm foram contabilizadas, através de integração dos sinais, dezesseis metilas. Os sinais em δ_{H} 3,19 (m, 1H) e 3,22 (m, 1H) são característicos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados (C-3). Os sinais em δ_{H} 5,11 (m, 1H) e 5,17 (m, 1H) são comuns em triterpenos das classes dos ursanos e oleananos e são atribuídos aos hidrogênios olefinicos (H-12).

As informações mais importantes extraídas do espectro de DEPTQ (Figura 12) da mistura foram observadas em δ_{C} 124,6 (H-12 de **1**), 121,4 (H-12 de **2**), típicos de carbonos olefinicos, e em δ_{C} 79,3, comum em casos de carbonos metínicos oxigenados (C-3).

As informações observadas acima (Tabela 6) aliadas à comparação com dados da literatura (DIAS, *et al.*, 2011) indicaram que a amostra se tratava de um mistura de triterpenos conhecidos como α e β -amirina.

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CDCl_3) de **1** e **2**.

C	Composto1		Literatura*		Composto2		Literatura*	
	δ_{H}	DEPTQ	δ_{C}	δ_{H}	DEPTQ	δ_{C}		
1		38,7	38,7		38,5	38,7		
2		29,5	28,7		27,4	27,2		
3	3,22 (m, 1H)	79,0	79,6	3,20 (m, 1H)	79,0	79,3		
4		38,7	38,7		38,5	38,5		
5		55,1	55,1		55,1	55,1		
6		18,4	18,4		18,4	18,6		
7		32,6	32,2		32,9	32,4		
8		40,0	40,0		39,8	39,8		
9		47,7	47,7		47,6	47,6		
10		37,1	36,9		37,1	36,9		
11		23,3	23,3		23,5	23,6		
12	5,16 (m, 1H)	124,4	124,4	5,11 (m, 1H)	121,7	121,7		
13		139,7	139,5		145,2	145,2		
14		41,5	42,0		41,5	41,7		
15		27,2	27,2		26,1	26,2		
16		26,6	26,6		26,1	26,1		
17		34,1	33,7		32,8	32,6		

18		59,0	59,0		47,6	47,2
19		39,8	39,6		47,2	46,8
20		39,8	39,6		31,2	31,0
21		31,2	31,2		34,7	34,7
22		41,5	41,5		37,1	37,1
23	0,98 (s)	28,1	28,1	0,79 (s)	28,0	28,0
24	0,78 (m)	15,7	15,6	0,78 (m)	15,5	15,4
25	0,78 (m)	15,7	15,6	0,78 (m)	15,5	15,4
26	0,90 (s)	16,8	16,8	0,98 (s)	16,9	16,8
27	0,99 (s)	23,2	23,2	1,12 (s)	26,0	25,9
28	0,96 (s)	28,4	28,1	1,06 (s)	28,7	28,4
29	0,86 (m)	17,5	17,4	0,86 (m)	33,3	33,8
30	0,78 (m)	21,4	21,4	0,82 (s)	23,7	23,7

*(DIAS et al., 2011). Espectro obtido em CDCl₃.

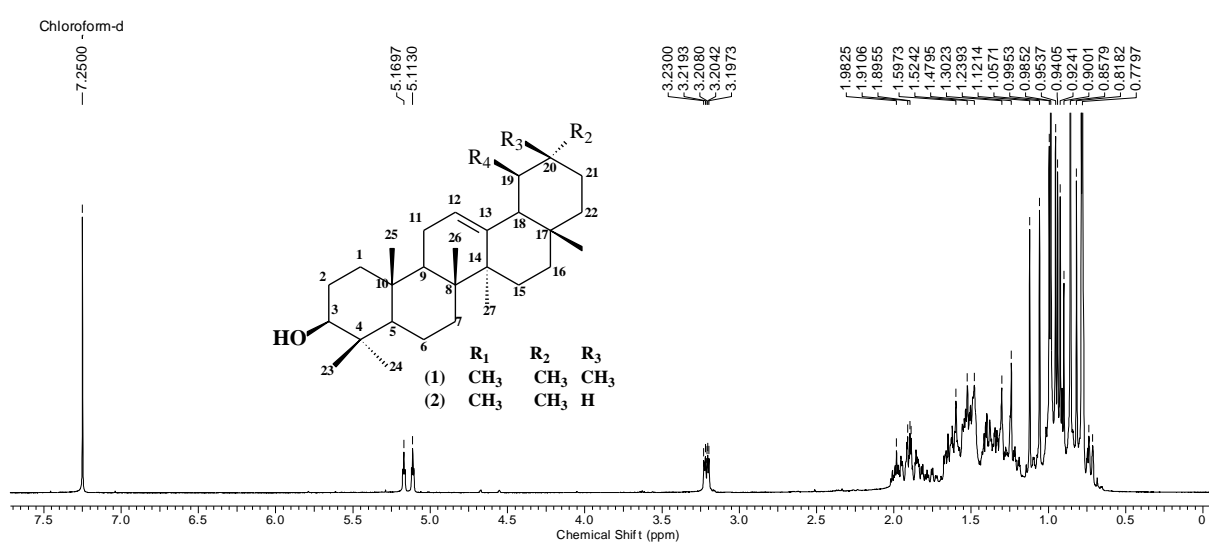


Figura 9. Espectro de RMN (500 MHz, CDCl₃) de 1 e 2.

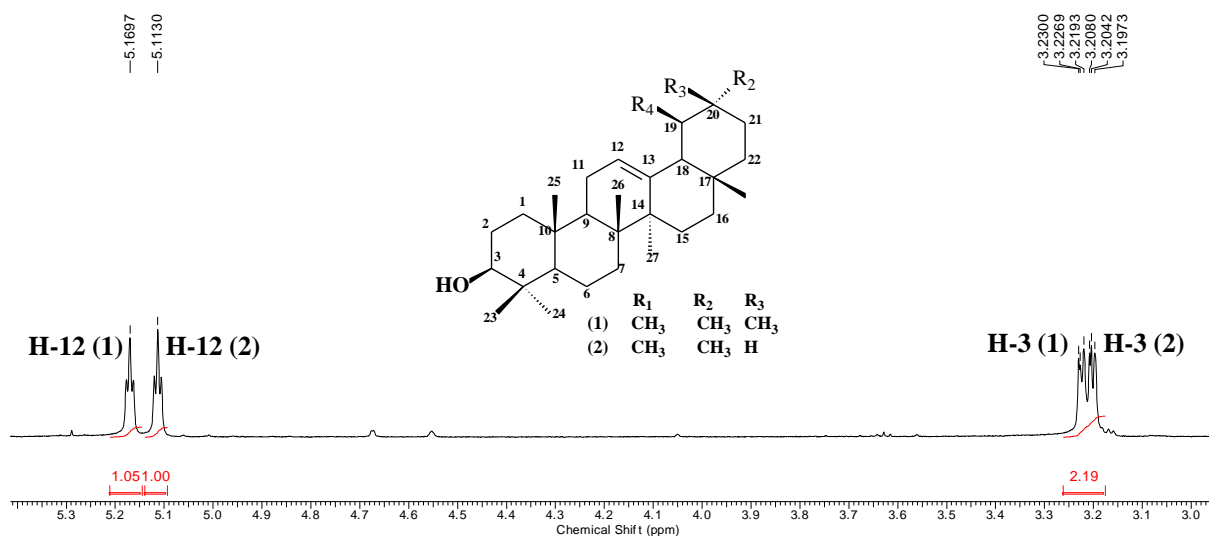


Figura 10. Expansão do espectro de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) de 1 e 2 (2,0 a 5,3 ppm).

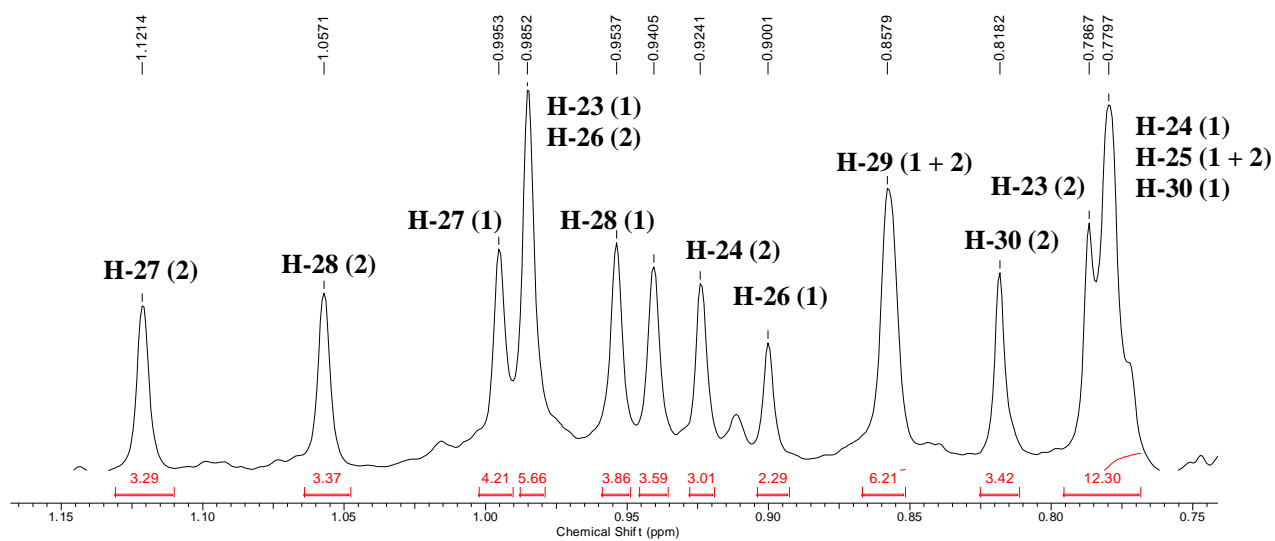


Figura 11. Expansão do espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de **1** e **2** (0,75 a 1,15 ppm).

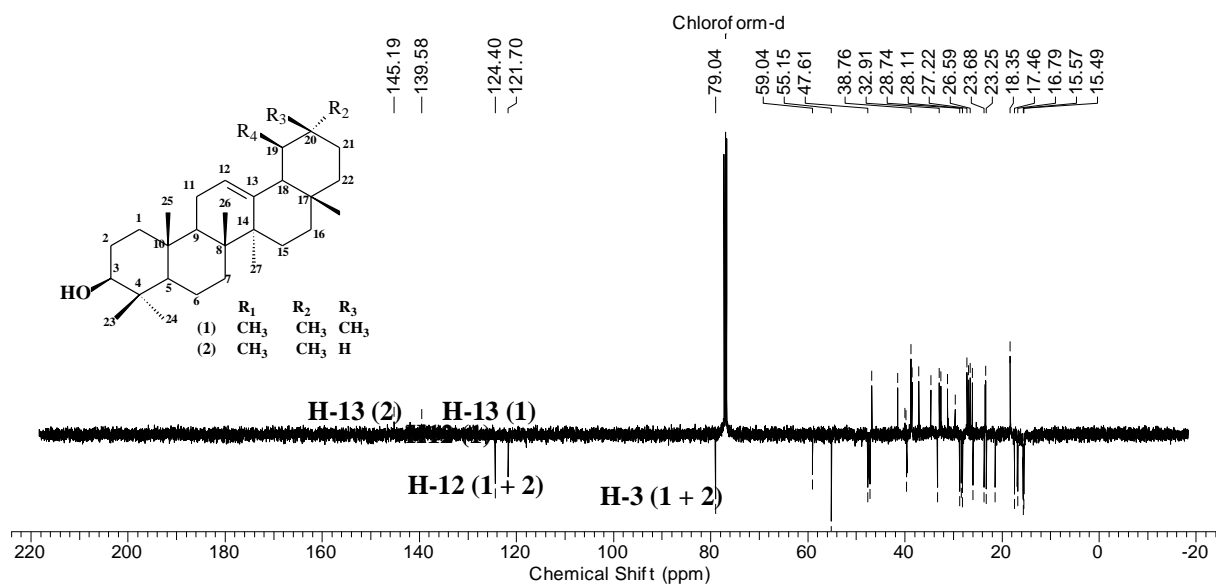


Figura 12. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **1** e **2**.

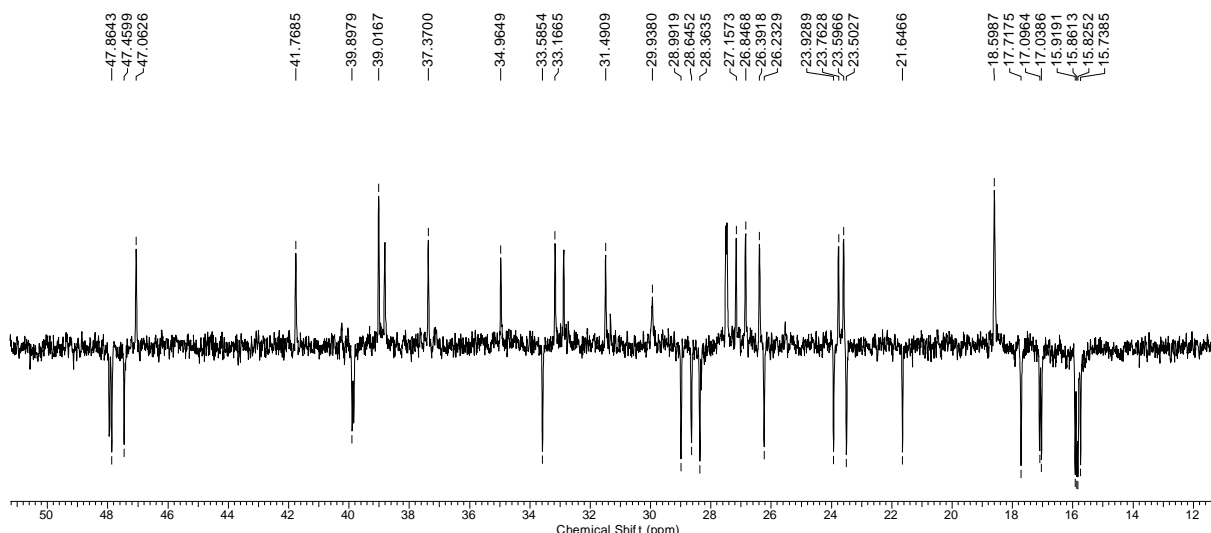


Figura 13. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **1** e **2** (12,0 a 50,0 ppm).

5.1.2 Substância 3

A substância **3**, sólido branco com ponto de fusão na faixa de 275-279, foi obtido como resultado do processo de EMF-H (Item 4.4.1). A identificação desta substância foi realizada a partir de dados de RMN ^1H e ^{13}C .

O espectro de RMN ^1H (Figura 14) deste composto apresentou um simpleto largo em δ_{H} 5,11, referente ao hidrogênio olefínico H-12, um simpleto largo em δ_{H} 3,10 que foi atribuído ao H-3 e um duplete em δ_{H} 2,10 ($J = 11,0$ Hz) característico do H-18 de triterpeno com esqueleto ursano. Foi possível observar, também, sinais entre 0,60 e 1,20 ppm que foram atribuídos aos hidrogênio dos grupos metila presentes no composto.

No espectro de DEPTQ (Figura 16) foi constatada a presença de 30 sinais, sendo 7C, 7CH, 9CH₂ e 7CH₃, o que é esperado em caso de triterpenos. Os sinais característicos das metilas foram observados em δ_{H} 15,2 (C-24), 16,1 (C-25), 16,9 (C-26), 17,0 (C-29), 21,1 (C-30), 23,8 (C-27) e 28,3 (C-23). O carbono oximetínico (C-3) foi confirmado com a presença do sinal em 76,8 ppm. Além dos sinais em δ_{H} 124,6 (C-12) e 138,2 (C-13) foi possível perceber um sinal em δ_{H} 178,3 que confirmou o grupo carboxil na molécula (C-28).

As informações mencionadas acima (Tabela 7), conceitos de biossíntese e comparação com dados da literatura (JORGE, 2005) tornaram possível identificar a substância **3** como o ácido ursólico.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de **3**

Composo 3		Composo 3	Ác. Ursólico*
C	δ ^1H	DEPTQ	δ_c
1		38,7	38,1
2		27,5	27,8
3	2,98 (s, 1H); 3,51 (s, 1H)	77,3	79,1
4		40,0	39,8
5		55,3	56,7
6		18,7	19,4
7		33,8	34,3
8		40,1	39,9
9		47,5	48,0
10		38,6	38,1
11		24,3	24,3
12	5,11 (s, 1H)	125,1	127,0
13		138,7	139,8
14		43,9	43,2
15		29,5	29,1
16		24,7	25,2
17		48,9	48,0
18	2,09 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H)	53,5	54,4
19		40,9	40,7
20		40,2	40,4
21		30,9	31,7
22		40,7	40,4
23	0,86 (s, 3H)	28,7	28,7
24	0,73 (s, 3H)	15,7	15,9
25	0,65 (s, 3H)	16,6	16,3
26	0,80 (s, 3H)	17,4	17,5
27	1,02 (s, 3H)	24,3	24,0
28	-	178,4	181,9
29	0,88 (d, $J = 6,1$ Hz, 1H)	17,0	17,7
30	0,88 (d, $J = 6,1$ Hz, 1H)	21,6	21,5

*(JORGE, 2005). Espectro obtido em CD_3OD .

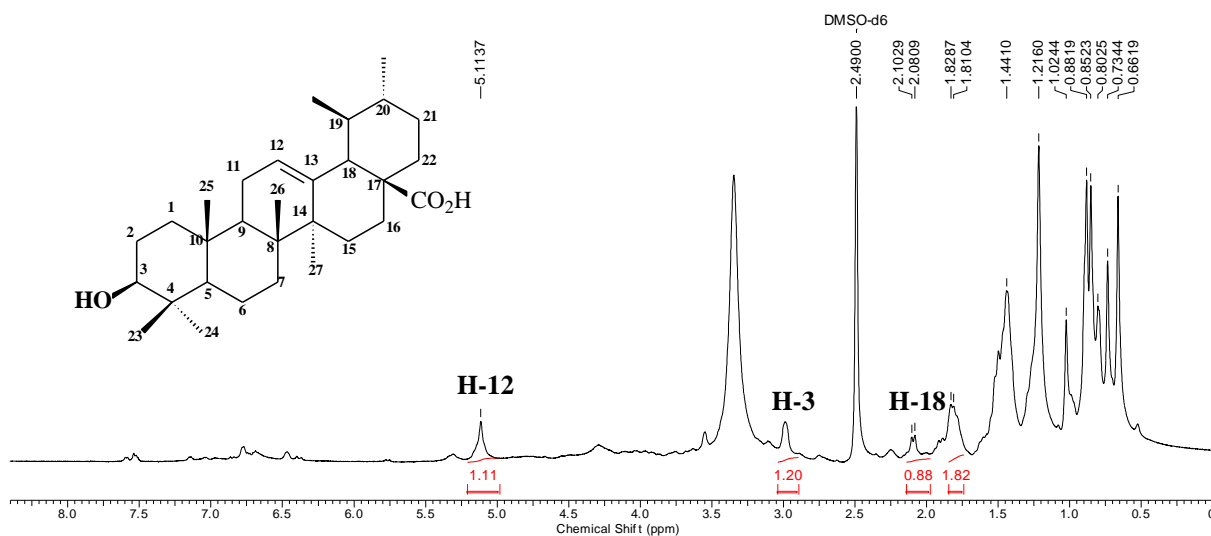


Figura 14. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de **3**.

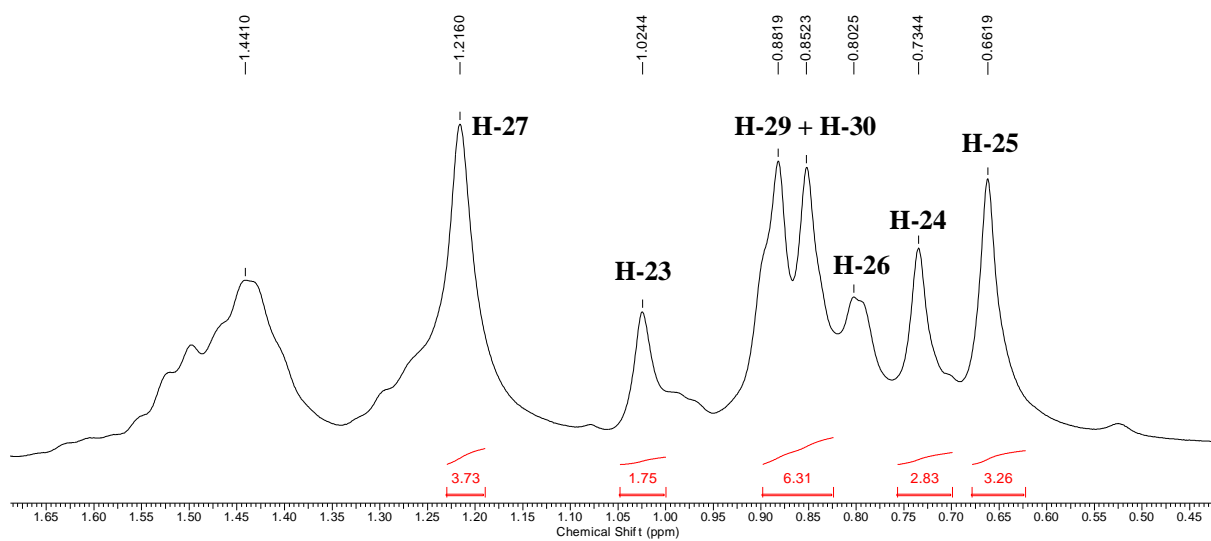


Figura 15. Expansão do espectro de ^1H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) de **3** (0,45 a 1,65 ppm).

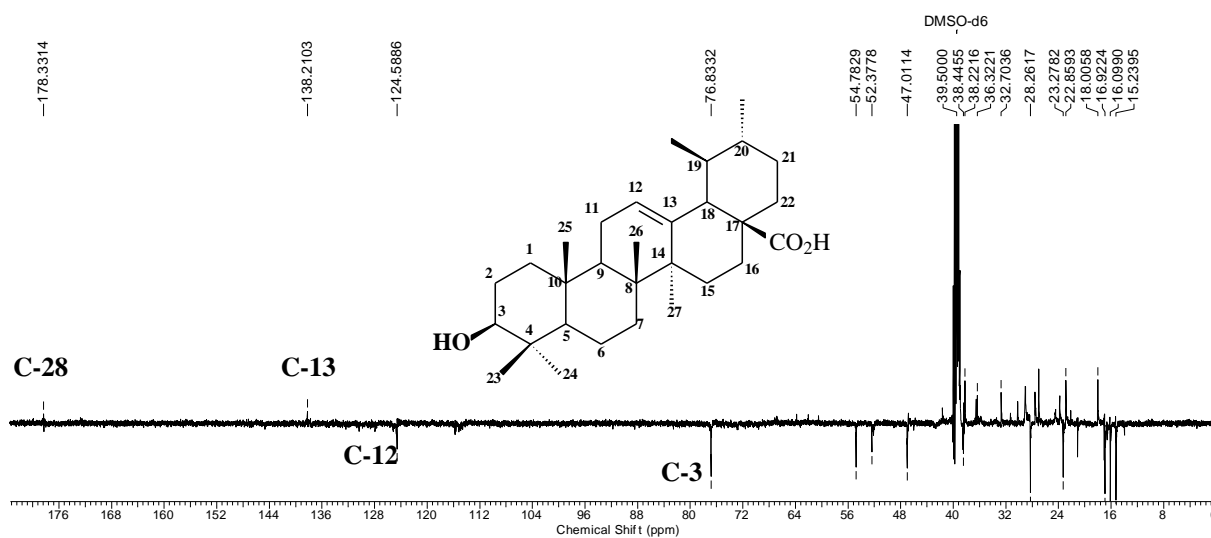


Figura 16. Espectro de DEPTQ (125 MHz, DMSO-d_6) de **3**.

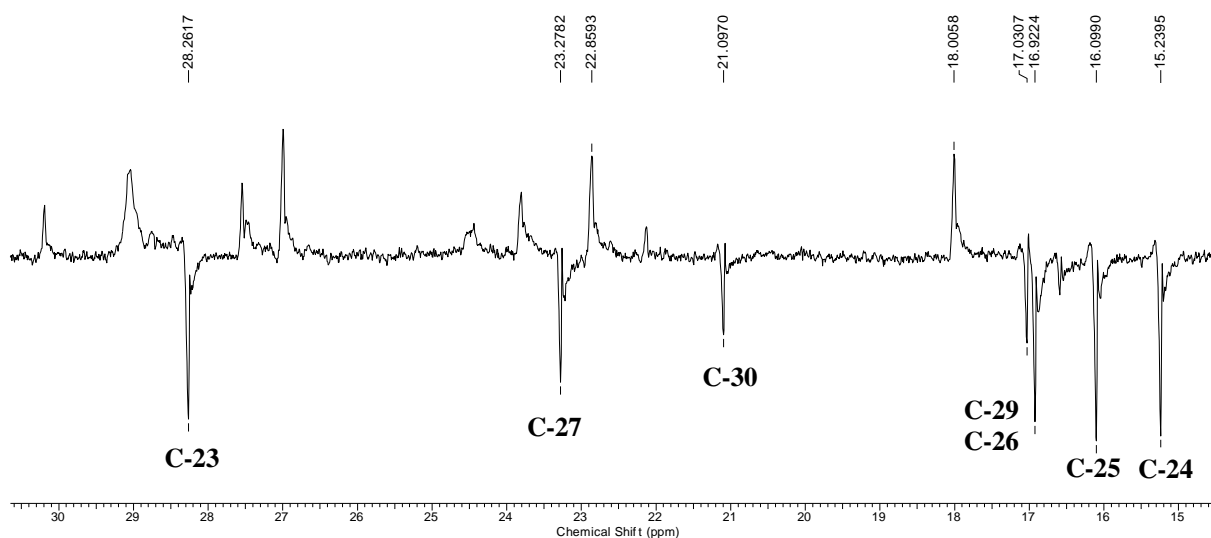


Figura 17. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, DMSO-d₆) de **3** (15 a 30 ppm).

São diversos os estudos referentes a isolamentos e atividades biológicas do ácido ursólico. Dentre as propriedades biológicas relatadas, destacam-se atividades anti-inflamatória, antirreumática, antiviral, antioxidante, e antitumoral (BERTÉ, 2009).

5.1.3 Substância 4

A **substância 4** (113 mg), sólido branco com ponto de fusão na faixa de 254-257° C, também foi obtida da fração EMF-H (**Item 4.4.1**). Análise em CCDA desta amostra utilizando-se hexano-clorofórmio (1:1) como eluente resultou em uma mancha de coloração azulada, quando revelada com vanilina sulfúrica.

O espectro de RMN ¹H da do composto **4** (**Figura 18**) permite sugerir que a substancia em questão se trata de um triterpeno da série dos lupanos com uma função diol. Isto se dá pela presença de cinco simpletos de δ 1,47 a 0,77 ppm, referentes a cinco metilas presentes na molécula, dois dupletos em δ 4,7 e 4,6 ppm ($J = 2\text{Hz}$), atribuídos aos H-29a e H-29b. Os dois dupletos em δ 3,82 e 3,35 ppm ($J = 10,8\text{ Hz}$) foram atribuídos aos H-28a e H-28b. Também foi possível observar um duplo duplete em δ 3,20 e um simpleto em 1,7 relacionados aos H-3 e H-30, respectivamente.

No espectro de DEPTQ (**Figura 21**) do composto **4** (**Figura 6**) foi possível observa 11 sinais referentes a CH e CH₃, assim como 19 sinais correspondentes a C e CH₂. Os sinais em δ 150,4 e 109,7 ppm foram atribuídos aos carbonos 20 e 29, respectivamente. Os sinais em δ 78,9 e 60,5 ppm são característicos de CH e CH₂ oxigenados e foram atribuídos aos carbonos 3 e 28, respectivamente.

A análise dos desses dados (**Tabela 8**) aliados a conhecimentos biossintéticos e à comparação com dados relatados na literatura (MARINHO, 2008) conduziu à identificação da substância como o terpeno betulina.

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CDCl_3) de **4**.

	Composto 4	Literatura*	Composto 4	Literatura*
C	δC	δC	δH	Δh
1	38,69	38,70		
2	27,38	27,38		
3	78,99	79,00	3,20 (dd, $J_1 = 5 \text{ Hz}$, $J_2 = 11,2 \text{ Hz}$, 1H)	3,18
4	38,86	38,88		
5	55,27	55,29		
6	18,30	18,33		
7	34,21	34,23		
8	40,91	40,94		
9	50,38	50,42		
10	37,15	37,18		
11	20,82	20,85		
12	25,19	25,24		
13	37,29	37,34		
14	42,71	42,73		
15	27,03	27,07		
16	29,15	29,19		
17	47,29	47,00		
18	48,76	48,81		
19	47,83	47,80		
20	150,49	150,47		
21	29,73	29,77		
22	33,97	33,98		
23	27,98	28,00	0,96 (s, 3H)	0,96
24	15,37	15,37	0,74 (s, 3H)	0,76
25	15,97	16,11	0,80 (s, 3H)	0,82
26	16,03	16,00	1,00 (s, 3H)	1,02
27	14,76	14,75	0,95 (s, 3H)	0,98
28	60,55	60,58	3,35/3,78 (d) (d, $J = 10,8 \text{ Hz}$, 1H, cada)	3,31/ 3,77
29	109,71	109,69	4,66/4,56 (d, $J = 2,0 \text{ Hz}$, 1H, cada)	4,58/4,68

30

19,08

19,11

1,67 (s, 3H)

1,68

*(MARINHO, 2008). Espectro obtido em CDCl_3 .

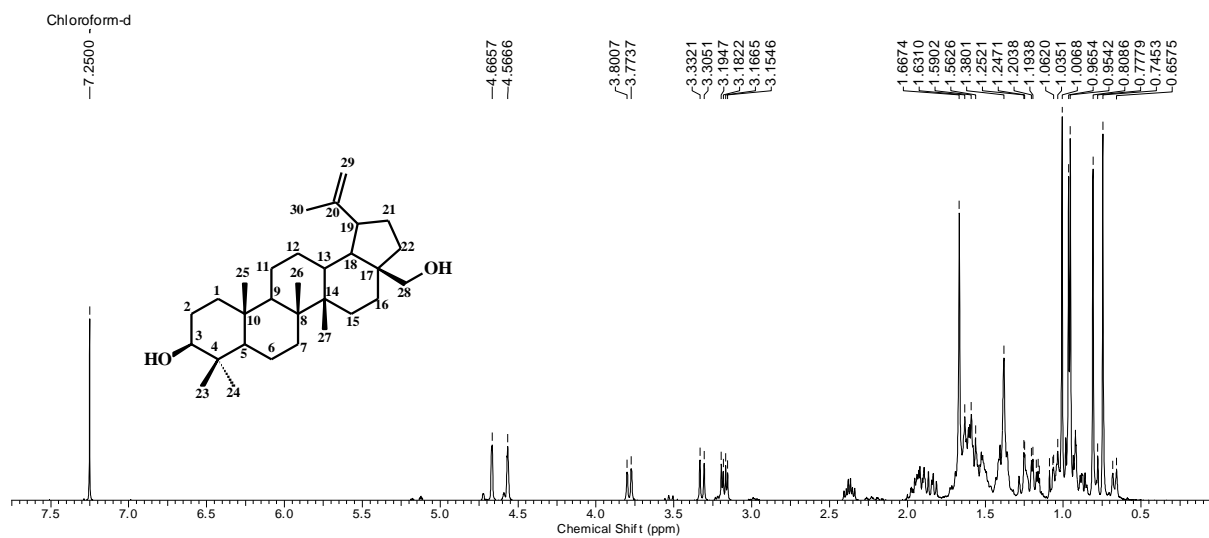


Figura 18. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **4**.

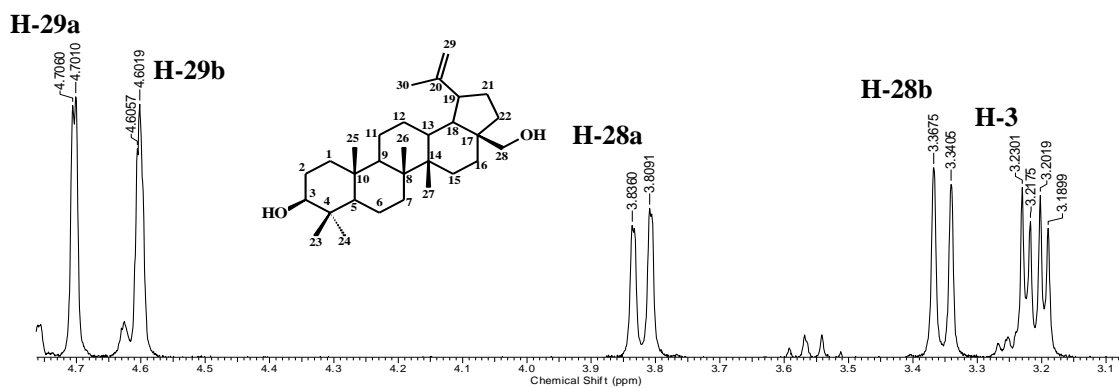


Figura 19. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **4** (3,1 a 4,7 ppm).

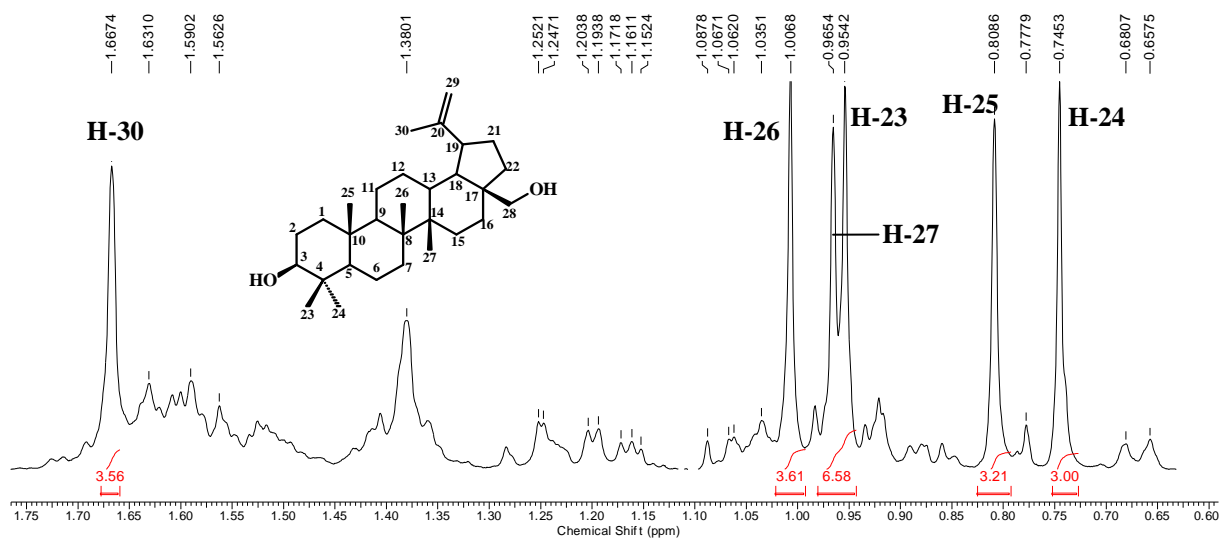


Figura 20. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **4**, de (0,6a 1,75 ppm).

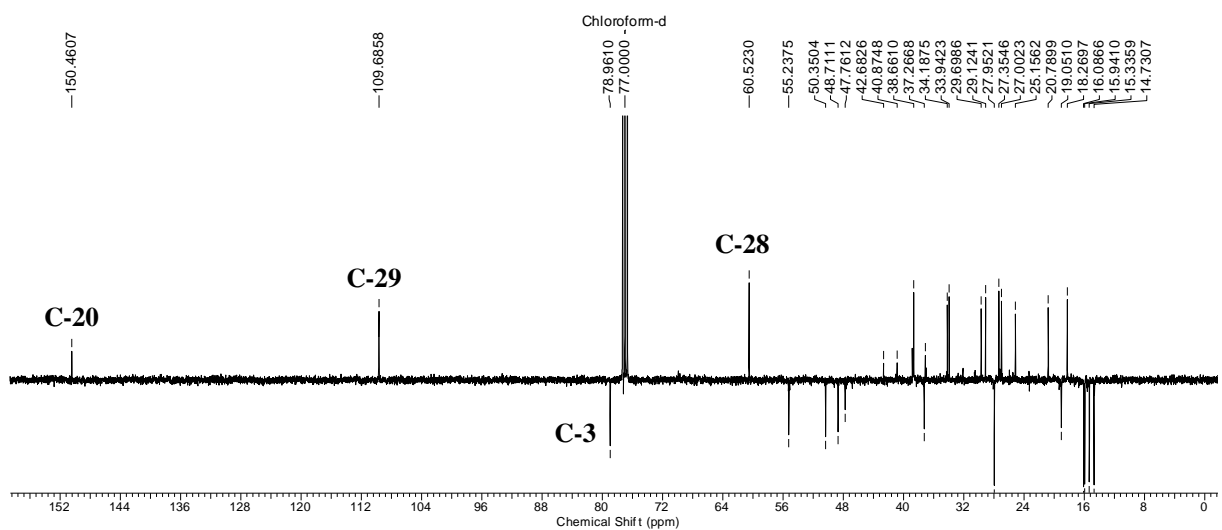


Figura 21. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **4**.

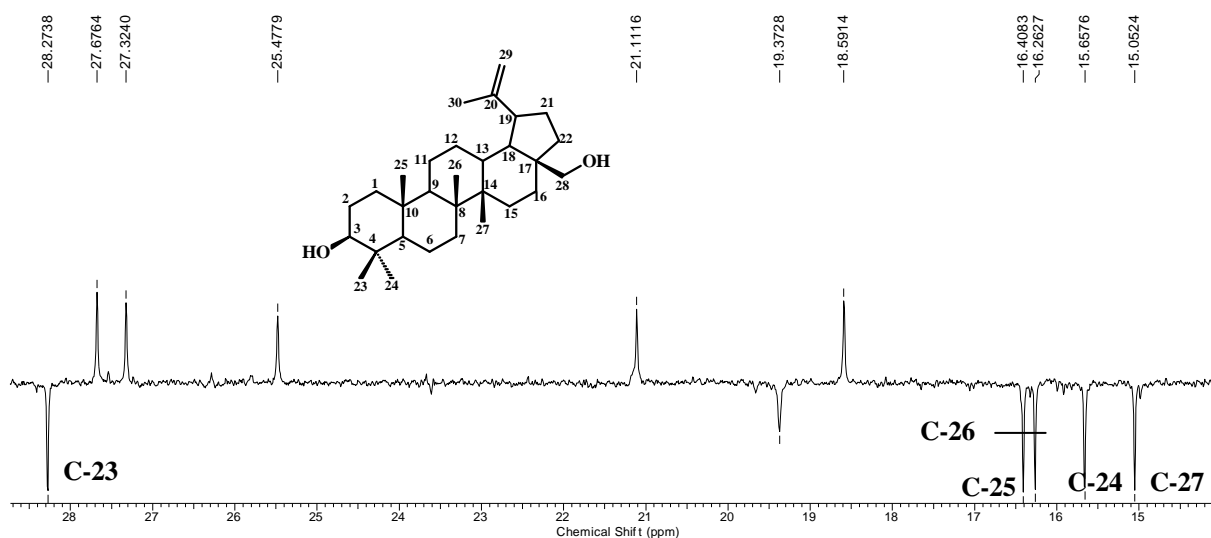


Figura 22. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **4** (15 a 28 ppm).

No cromatograma (**Figura 23**), referente à análise CG-EM do composto **4**, observa-se um pico com tempo de retenção 37,35 min forneceu um espectro de massas (**Figura 8**), onde foi possível observar o íon molecular com $m/z = 442$ e fragmentos compatíveis com a proposta estrutural. O **esquema 7** mostra uma proposta de fragmentação de massas do composto **4**.

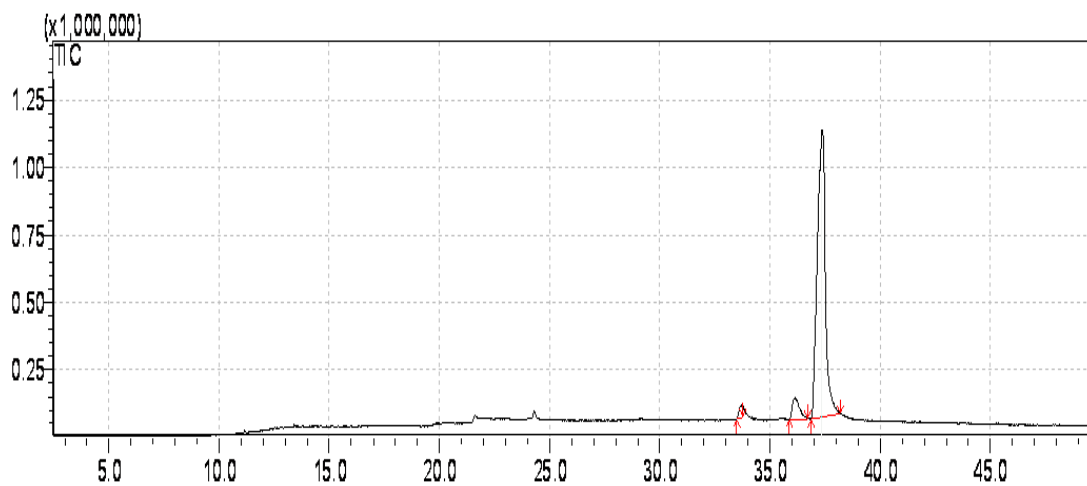


Figura 23. Cromatograma de **4**.

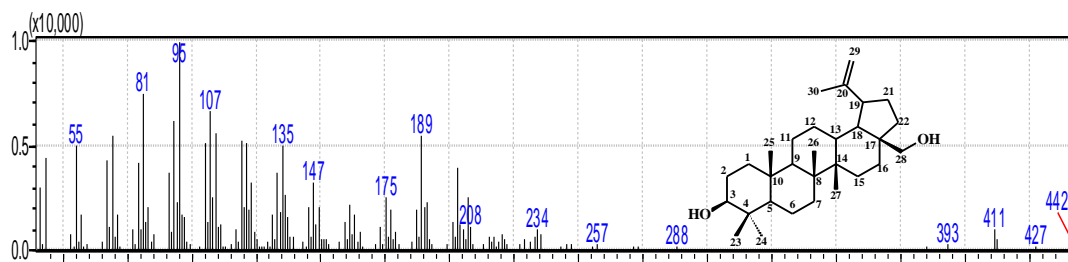
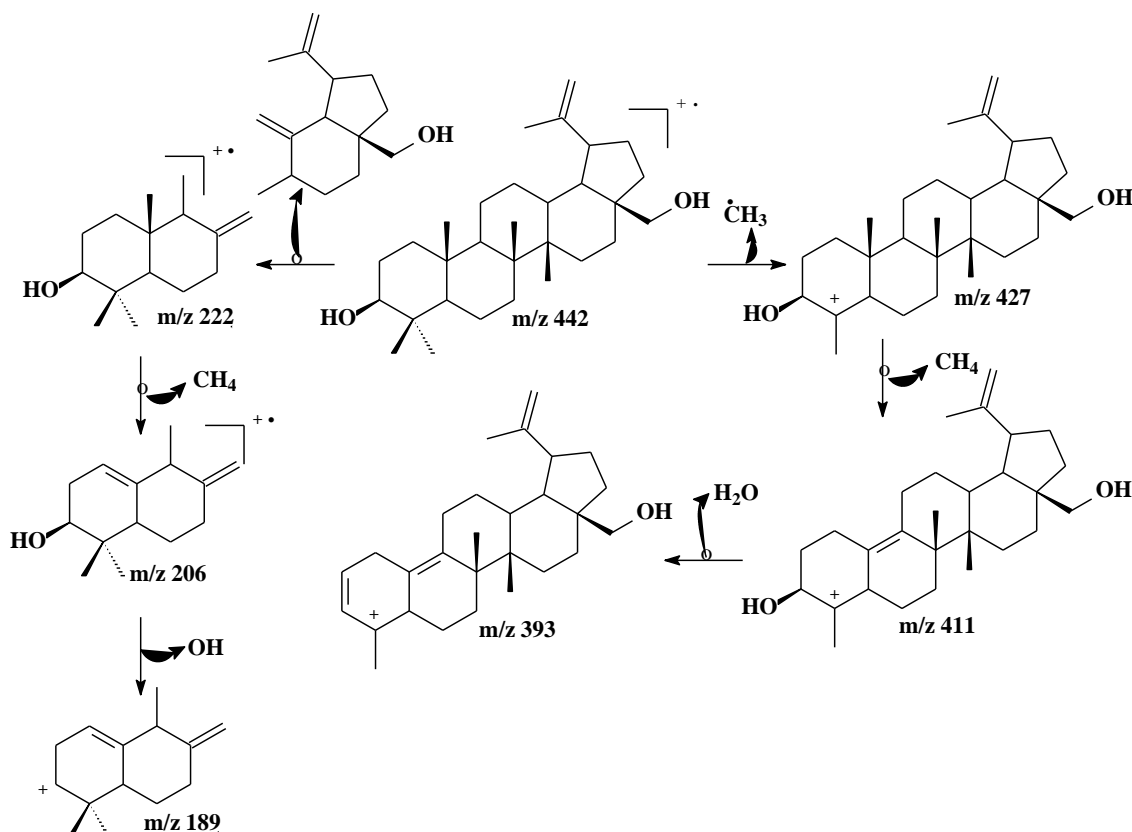


Figura 24. Espectro de massas de **4**.



Esquema 7. Proposta de fragmentação de massas de **4**.

5.1.4 Substâncias 5, 6 e 7

Esta mistura de compostos (14,3 mg de **5** + **6** + **7**) foi obtida como um óleo amarelado, resultado do procedimento cromatográfico (CC) da fração EMF-H 133-134.

5.1.4.1 Composto 5

No espectro de RMN ^1H (**Figura 25**) da fração EMF-H (133-134) 7-20 foi possível observar dois sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados em δ 3,82 (dd, $J_1 = 10,2$ Hz, $J_2 = 5,8$ Hz, 1H) e 3,35 (sl, 1H) atribuídos aos hidrogênios 2 e 9, respectivamente. Os sinais em δ 0,97 (s, 3H), 1,05 (s, 3H) e 0,87 (s, 3H) foram atribuídos às metilas 13, 14 e 15 respectivamente.

No espectro de DEPTQ (**Figura 28**) observaram-se quinze sinais, sendo seis de CH₂, três de C, três de CH e três de CH₃. Os sinais em δ_H 80,8 e 75,1 são referentes aos carbonos 3 e 10, assim com os sinais em δ 31,6, 28,4, 25,5 às metilas 13, 14 e 15, respectivamente.

A partir de dados dos espectros de NOEDIF (Figura) foi possível propor a configuração relativa para esta estrutura. Estes resultados se encontram resumidamente discutidos, assim como as correlações $^1J_{CH}$ do espectro de HMQC e $^nJ_{CH}$ HMBC, nas **Figuras 25-38** e na **tabela 9**.

Tabela 9. Dados de RMN 1H e DEPTQ (500 e 125 MHz) de **5**.

C	HMQC ($^1J_{HC}$)		HMBC		NOE	Literatura*
	δ_H de 5	δ_C de 5	$^2J_{HC}$	$^3J_{HC}$		
1	-	37,9				37,4
2	3,82 (dd, $J_1=10,2$ Hz, $J_2=5,8$ Hz, 1H)	80,8		C-12;9;3	H-15;	81,0
3	1,72 (dd, $J_1=5,7$ Hz, $J_2=12,0$ Hz, 1H) 1,52 (d, $J=1,5$ Hz, 1H)	47,5		C-15;1;5	H-15	47,9
4	-	43,9				44,6
5	1,45(dd, $J_1=3,2$ Hz, $J_2=7,8$ Hz, 1H)	50,5		C-14;12;4	H-14	50,7
6	1,3 (m) 1,05 (m)	26,6			H-14	26,4
7	0,95 (sl, 1H) 1,55 (t, $J=13,1$ Hz, 1H)	35,5				35,8
8	-	34,7				34,9
9	3,35 (sl)	75,1		C-9;12		75,2
10	1,05 (m) 2,05 (m)	25,9	C-12		H-13	26,6
11	1,1 (m)	20,6	C-1			20,8
12	1,4 (m)	33,1		C-5;1;8		33,4
13	0,87(s, 3H)	25,4		C-14;4;3;5	H-3	25,5
14	1,05 (s, 3H)	31,4*		C-15;4;3;5	H-5;H-6	28,4
15	0,97 (s, 3H)	28,3*		C-7;9;10	H-11	31,6

*(DELGADO *et al.*, 1984). Espectro obtido em CDCl₃.

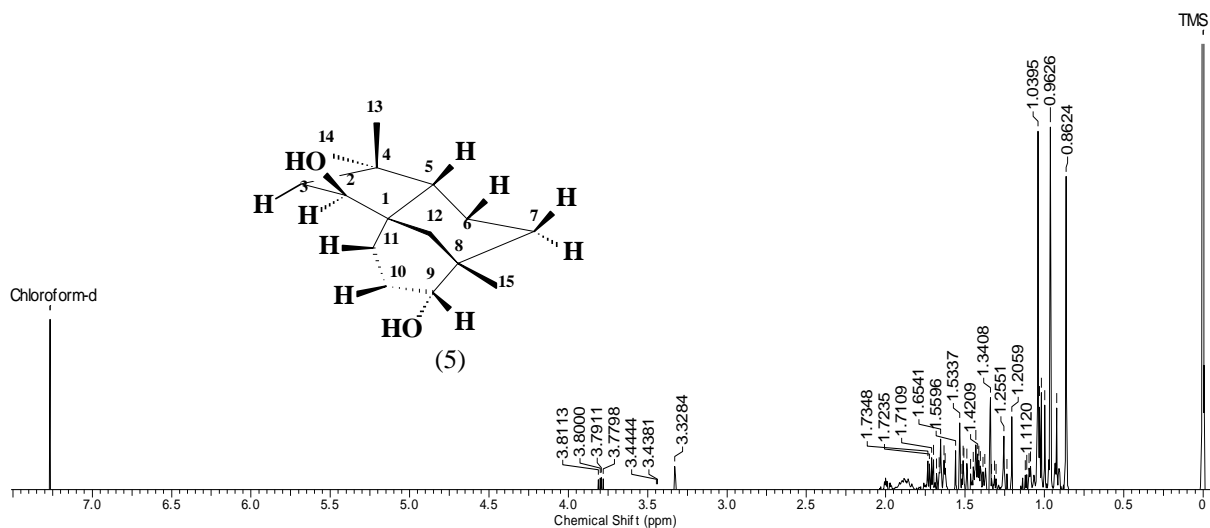


Figura 25. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **5**.

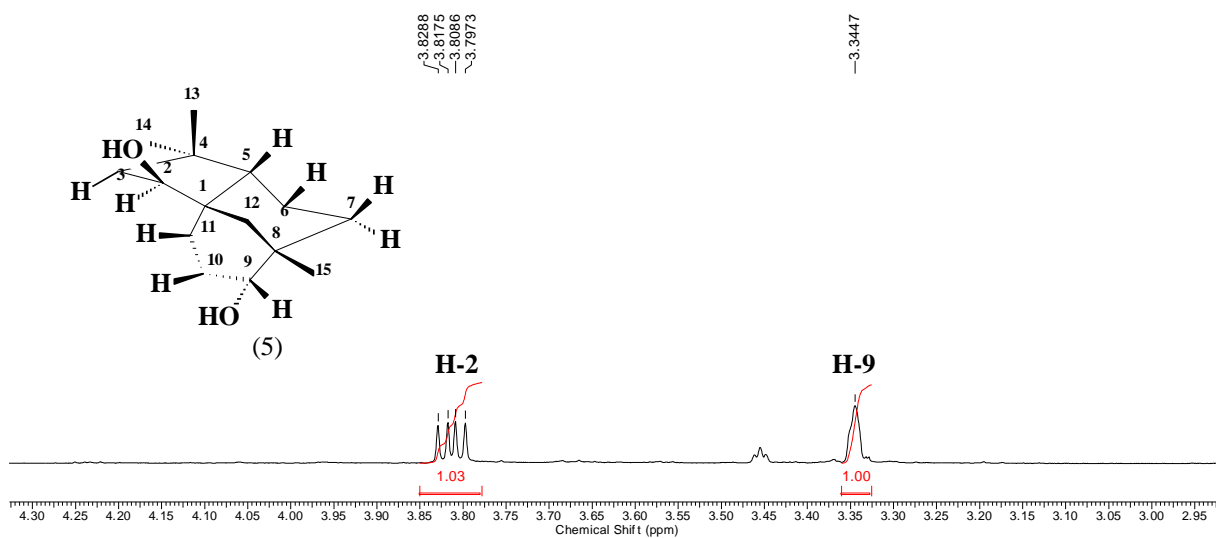


Figura 26. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **5** (2,95 a 4,20 ppm).

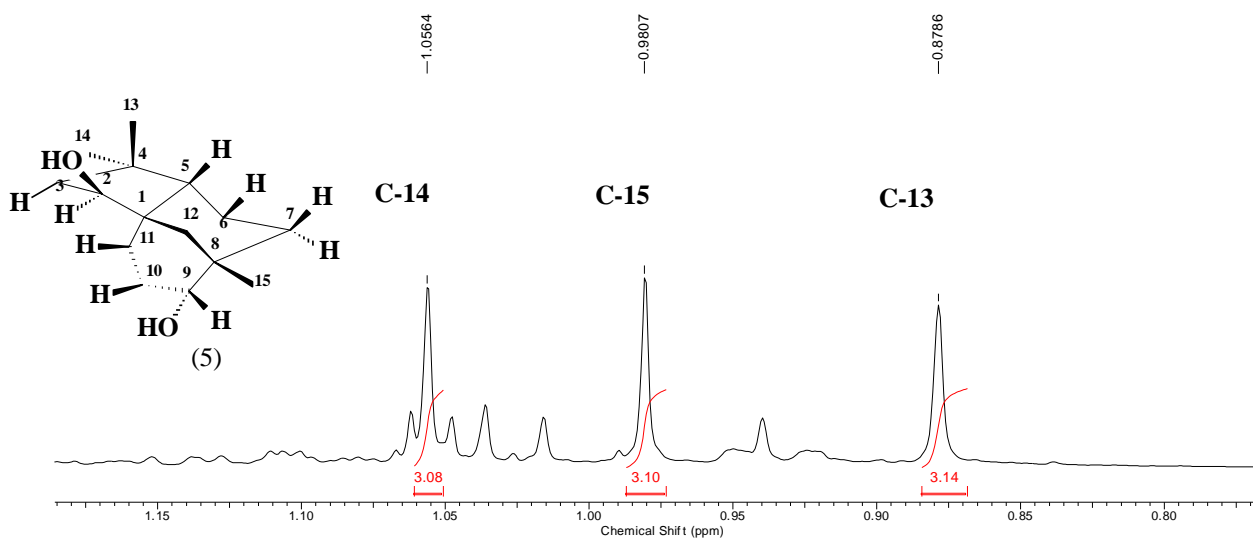


Figura 27. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **5** (0,80 a 1,15 ppm).

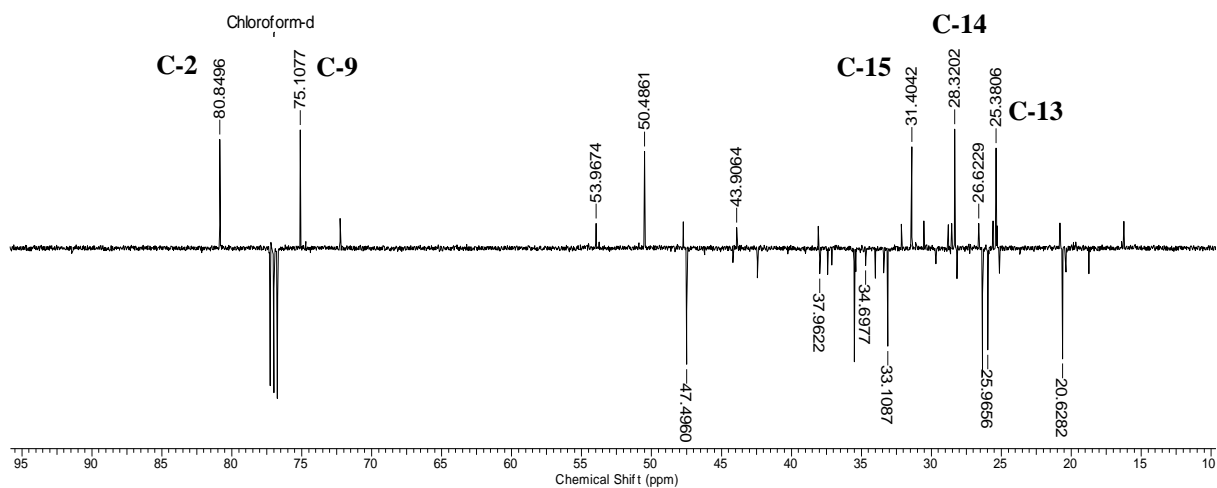


Figura 28. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **5**.

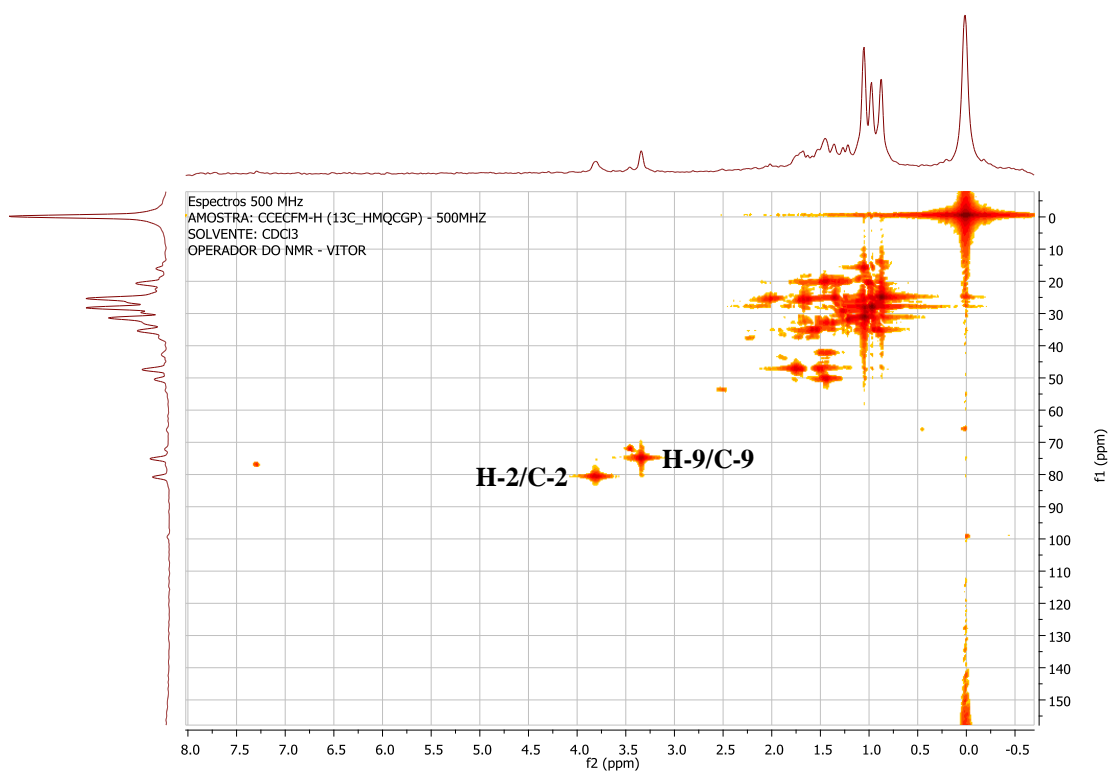


Figura 29. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **5**.

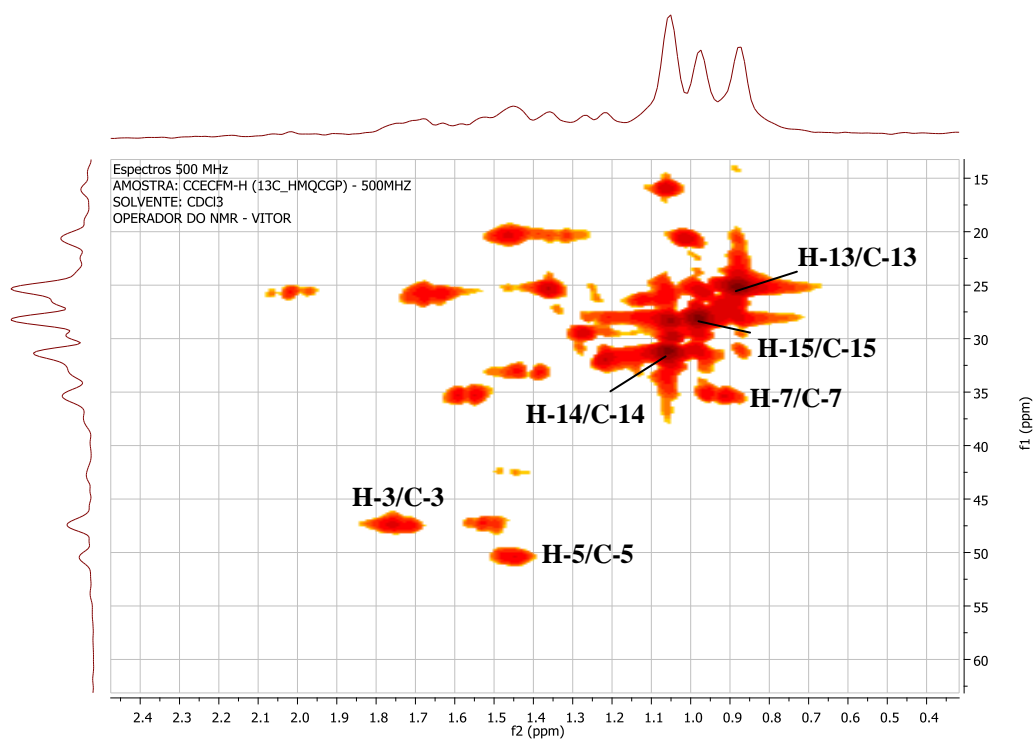


Figura 30. Expansão do espectro de HMQC (500 MHz, CDCl_3) de **5** (0,4 a 2,4 ppm).

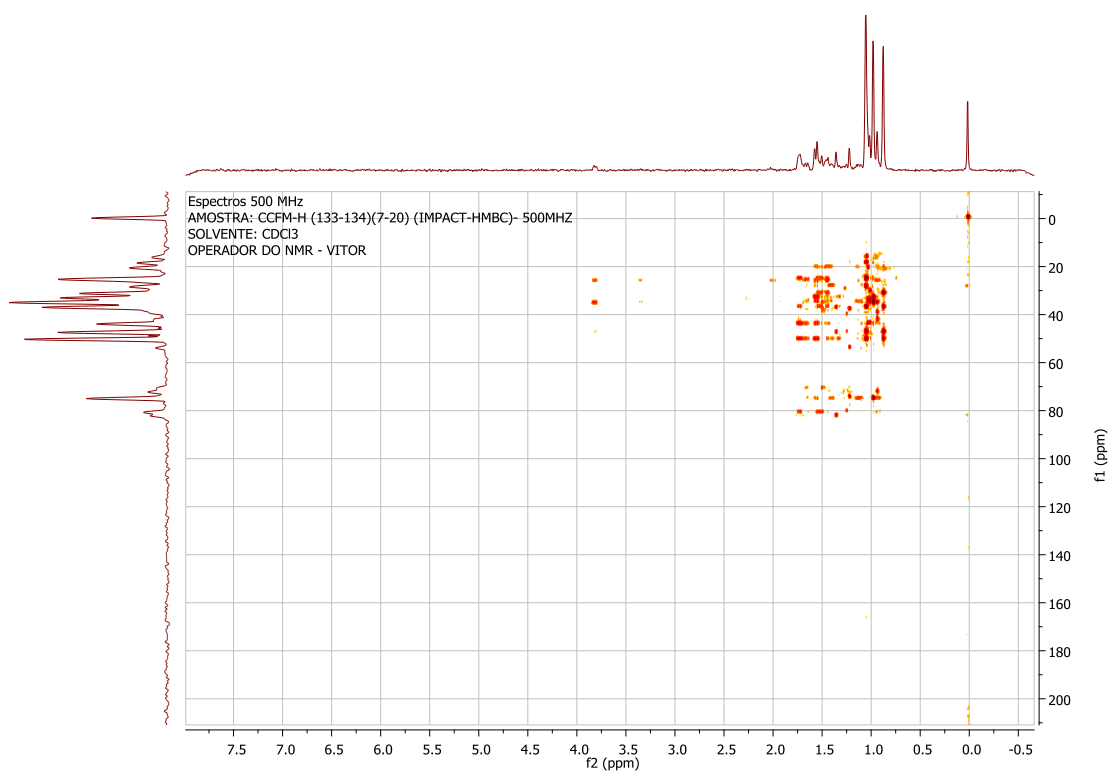


Figura 31. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **5**.

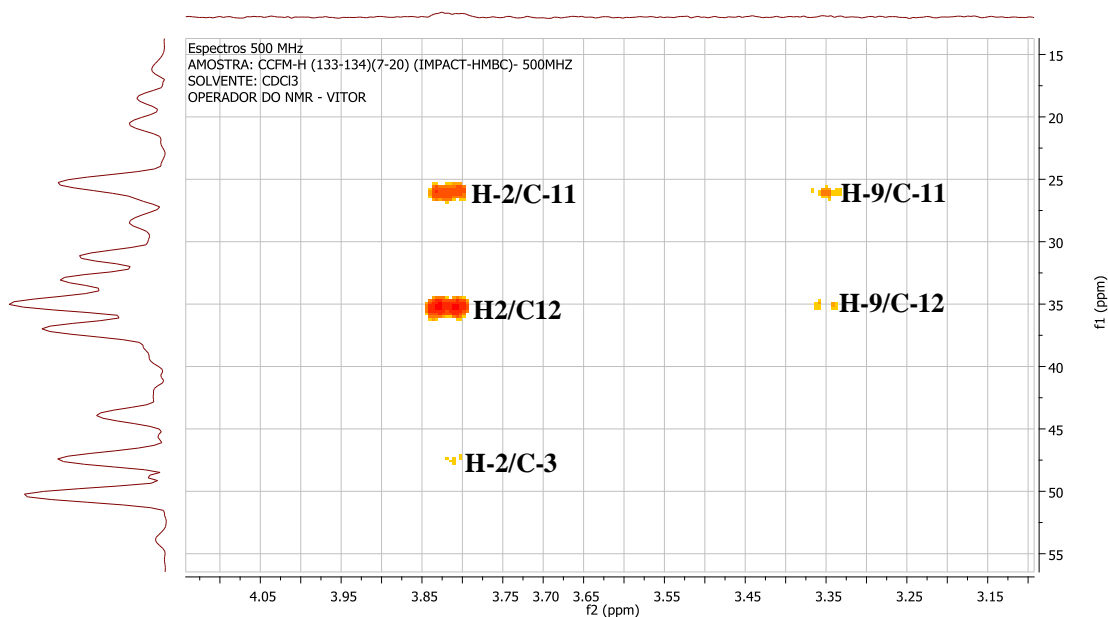


Figura 32. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) de **5** (3,15 a 4,05).

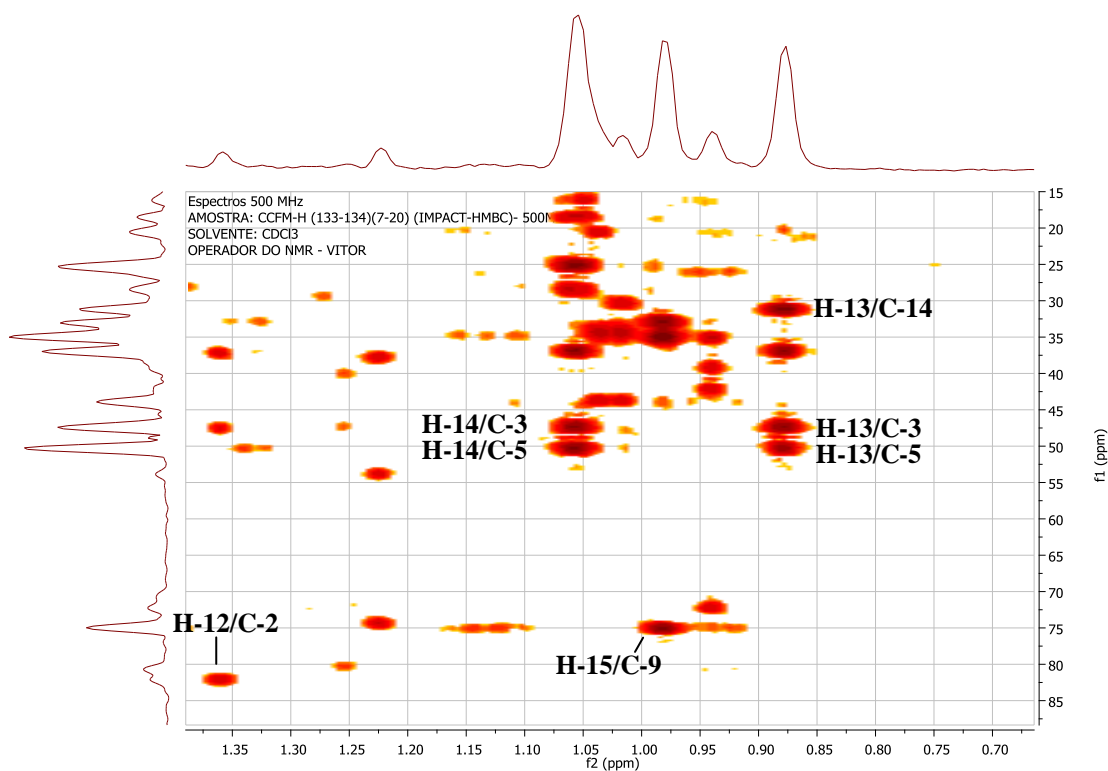


Figura 33. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) de **5**.

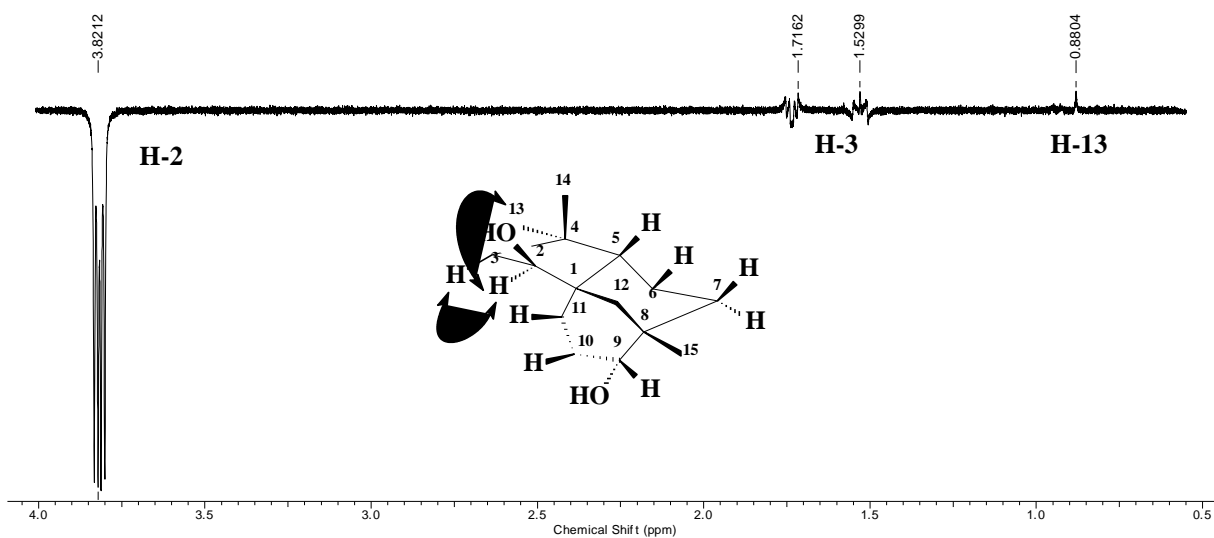


Figura 34. Espectro de NOE-1D (500 MHz, CDCl_3) de **5**, irradiação na frequência do H-2.

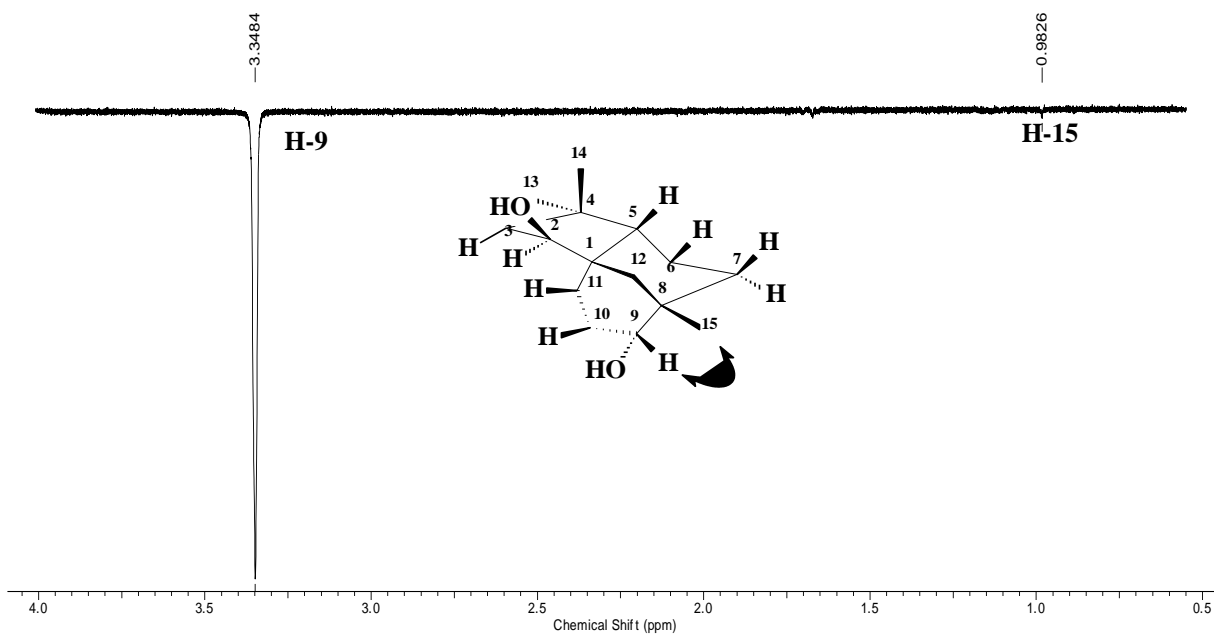


Figura 35. Espectro de NOE-1D (500 MHz, CDCl_3) de **5**, irradiação na frequência do H-9.

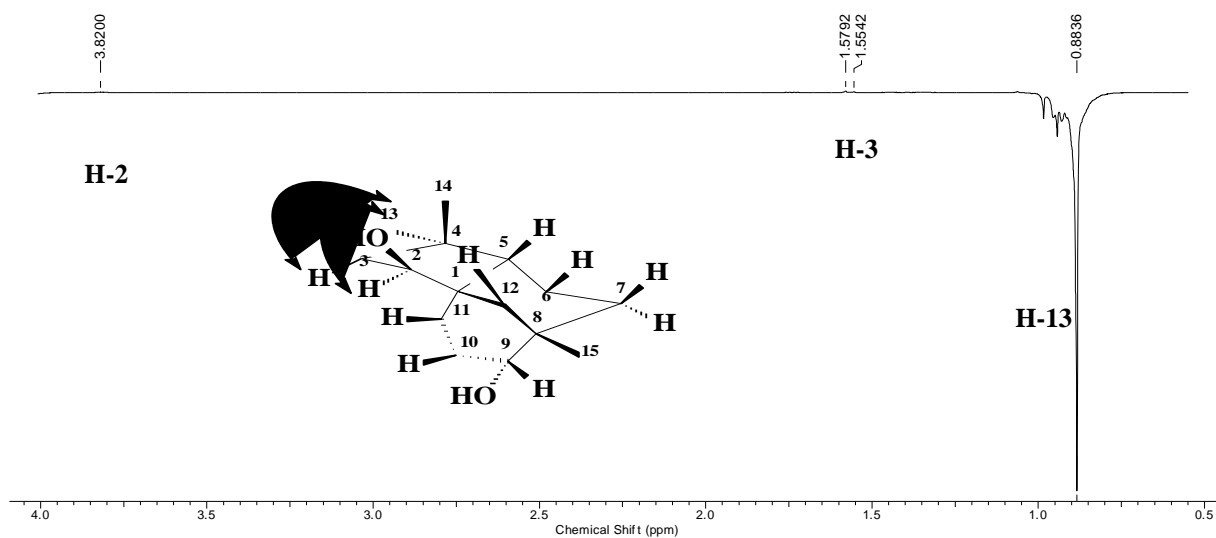


Figura 36. Espectro de NOE-1D (500 MHz, CDCl_3) de **5**, irradiação na frequência do H-13.

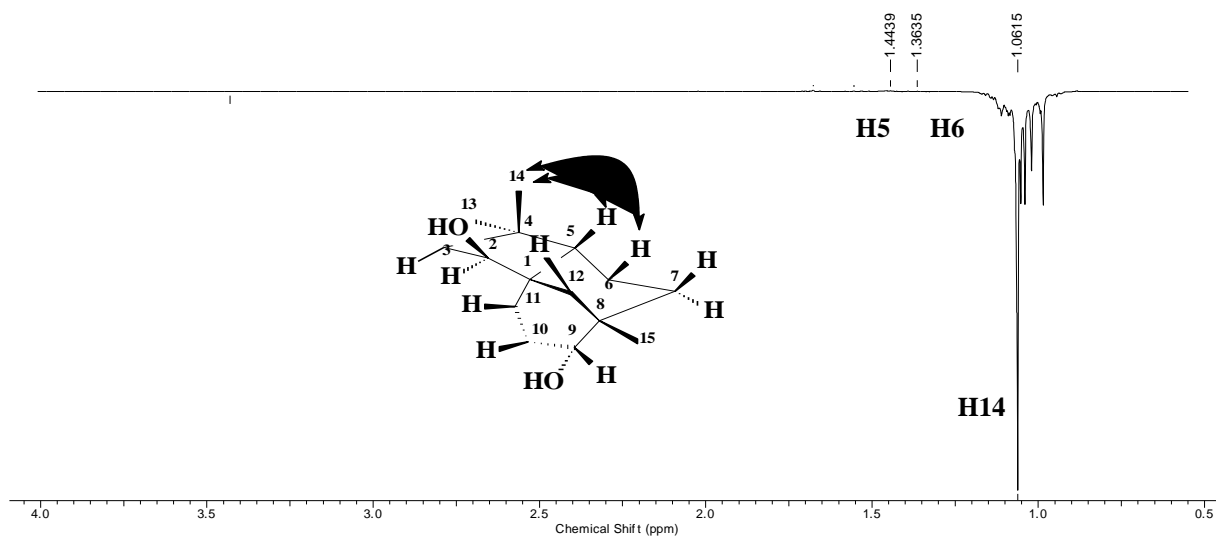


Figura 37. Espectro de NOE-1D (500 MHz, CDCl_3) de **5**, irradiação na frequência do H-14.

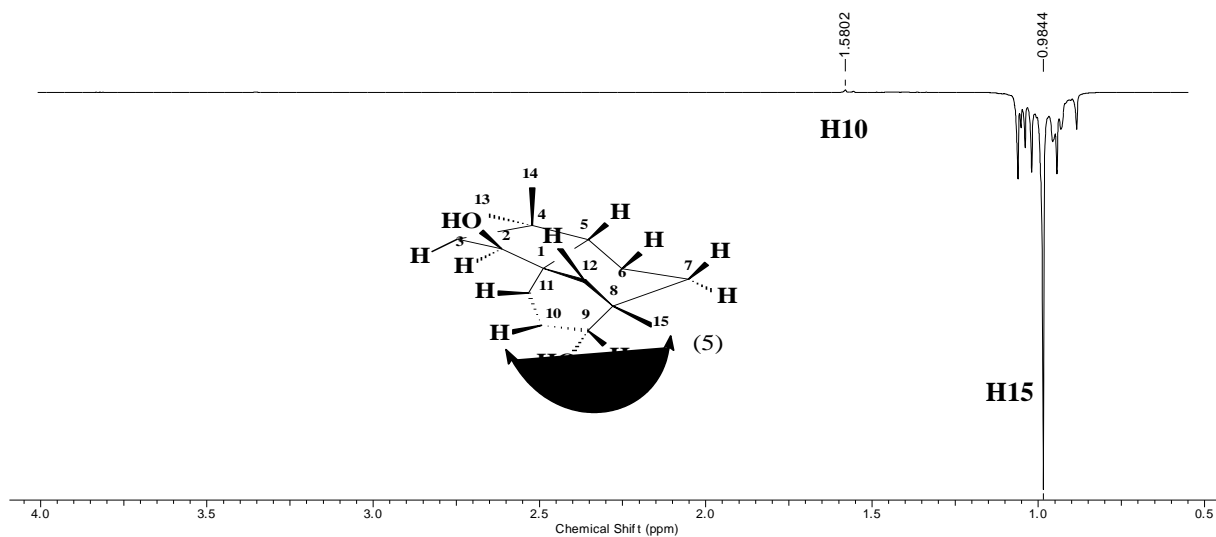


Figura 38. Espectro de NOE-1D (500 MHz, CDCl_3) de **5**, irradiação na frequência do H-15.

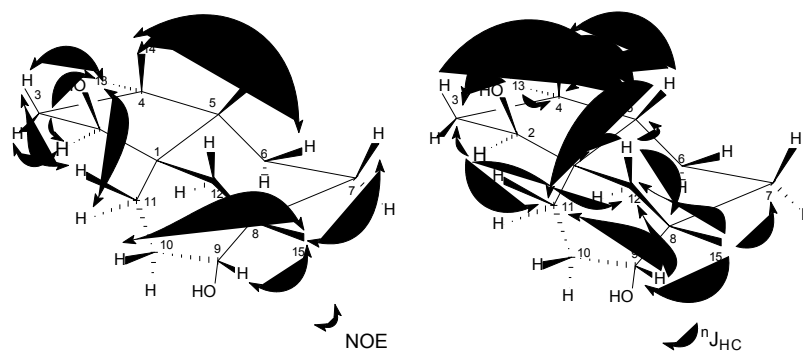


Figura 39. Correlações observadas através dos experimentos de NOE e HMBC.

O cromatograma (**Figura 40**), obtido com a análise CG-EM, forneceu um pico com tempo de retenção em 16.140 min, composto majoritário, que forneceu um espectro de massas (**Figura 30**) com m/z 238 (M^+), que está em acordo com proposta estrutural.

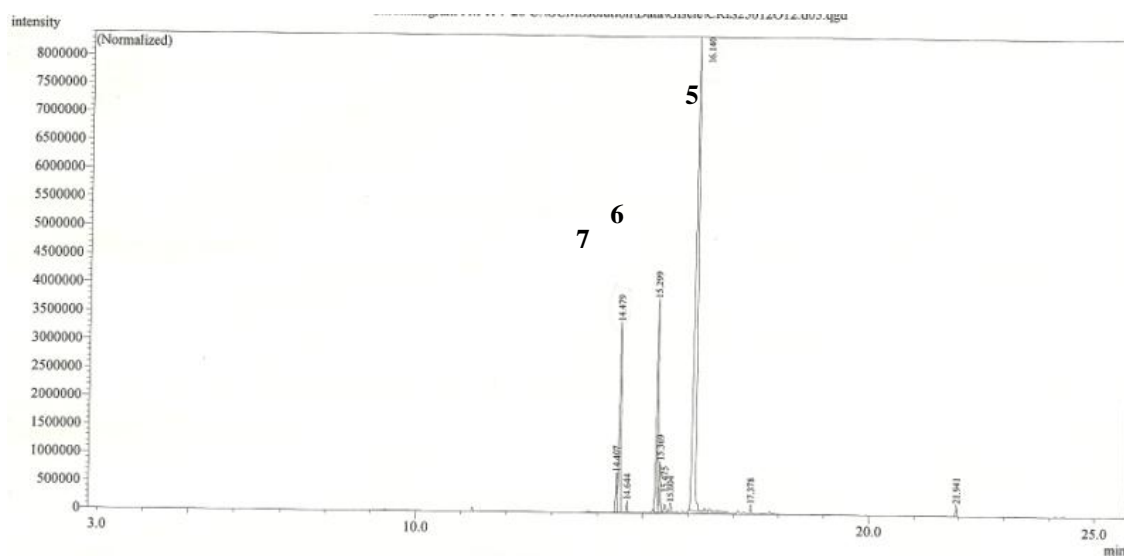


Figura 40. Cromatograma da mistura das substâncias 5, 6 e 7.

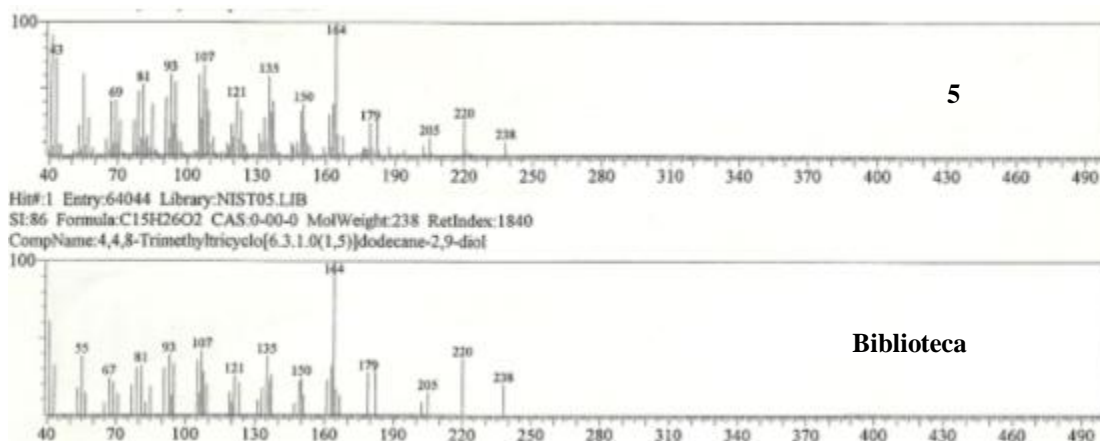
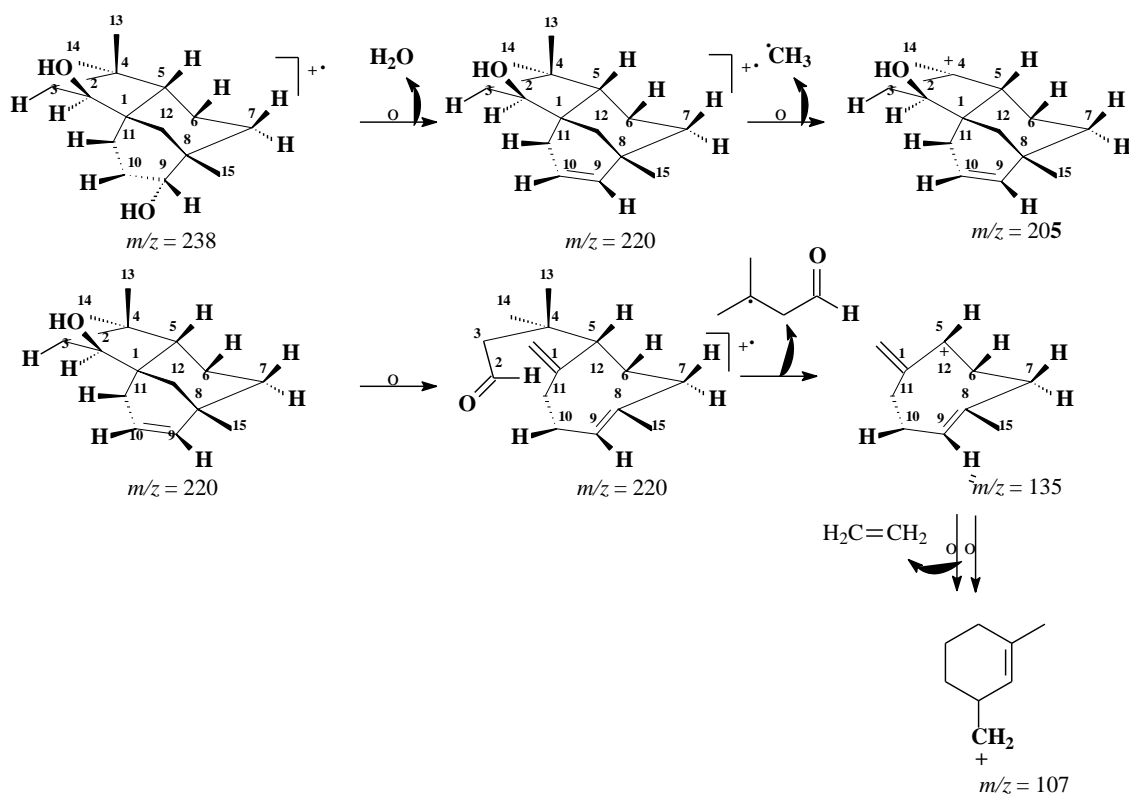


Figura 41. Espectro de Massas de 5.



Esquema 8. Proposta de fragmentação de **5**.

5.1.4.2. Substâncias 6 e 7.

No cromatograma (**Figura 40**) da fração FM-H (133-134) 7-20 foi possível observar, também, dois picos com tempos de retenção 14,480 min e 15,300 min. O composto com tempo de retenção 15,300 forneceu um espectro de massas (**Figura 42**) que foi comparado com o espectro sugerido pela biblioteca do aparelho, sendo identificada como globulol (**6**). De forma análoga a anterior, a substância com TR 14,480 min, e espectro de massas (**Figura 43**) foi identificada como viridiflorol (**7**). Com a análise do espectro de DEPTQ (**Figura 44**) e comparação com dados de deslocamentos químicos disponíveis na literatura (**Tabela 10**) chegou-se a conclusão de que as propostas estruturais eram plausíveis.

Tabela 10. Dados de DEPTQ (125 MHz) das substâncias **6** e **7**.

	Globulol*	Composto 6	Viridiflorol*	Composto 7
C	δC	δC	δC	δC
1	39,6	39,0	37,5	38,1
2	28,3	28,1	28,7	28,8
3	19,3	18,8	20,5	20,4
4	26,7	26,6	27,0	27,3
5	20,1	20,2	19,1	18,7
6	44,6	44,2	42,8	42,5
7	75,3	74,7	72,2	72,3
8	57,0	57,1	55,9	57,2
9	26,1	26,3	26,5	26,4
10	34,6	34,0	34,6	34,7
11	36,3	35,4	35,7	35,5
12	16,0	16,2	16,6	16,4
13	15,8	16,2	15,8	16,2
14	28,6	28,6	28,8	28,8
15	20,2	20,2	31,1	31,1

* (HANSON *et al.*, 1994). Espectro obtido em $CDCl_3$.

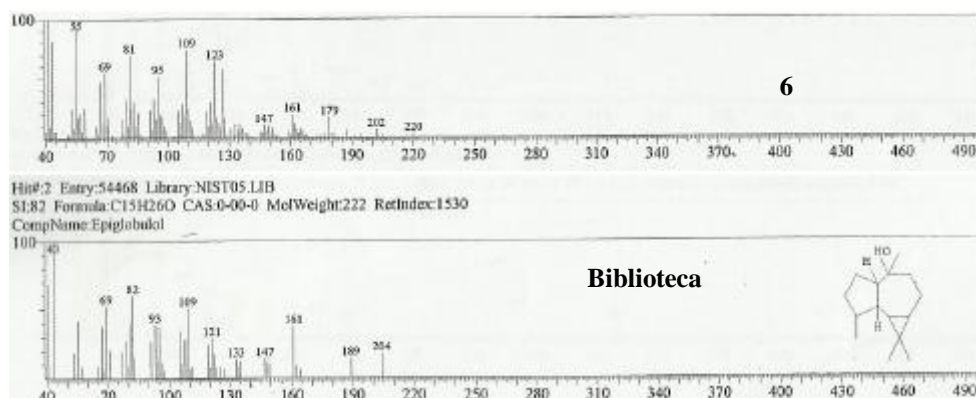


Figura 42. Espectro de massas de **6** e comparação com a biblioteca do aparelho.

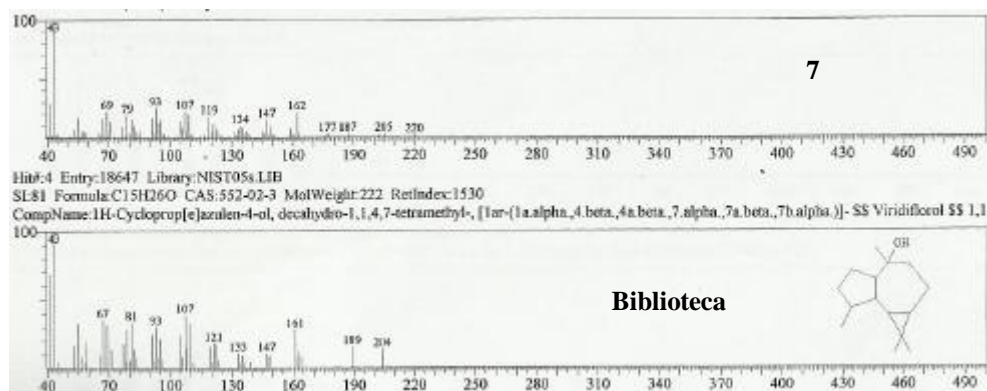


Figura 43. Espectro de massas de **7** e comparação com a biblioteca do aparelho.

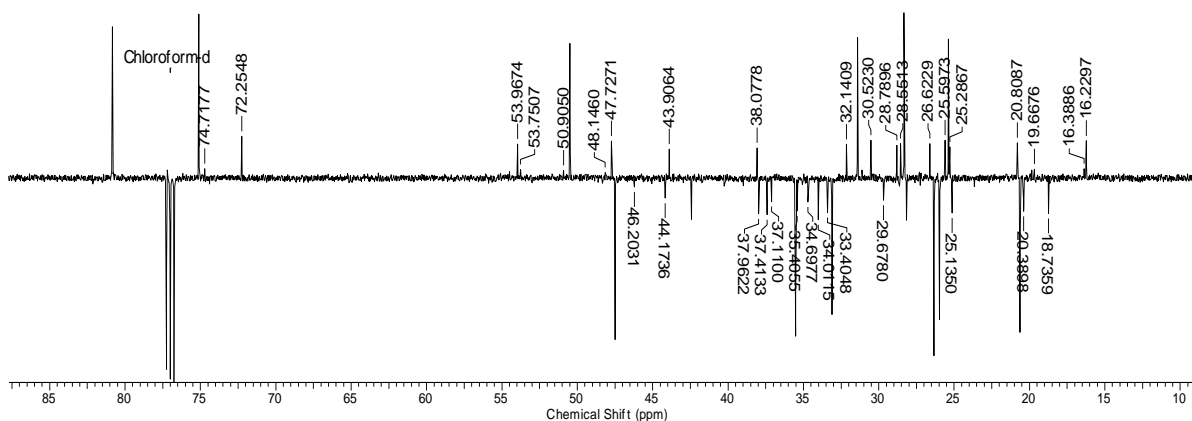


Figura 44. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **6** e **7**.

5.1.5.1. Substância 8

Dentre as frações obtidas a partir fracionamento cromatográfico de EMF-D₂ (Item 4.4.2.1), merece destaque a 44-48 que forneceu um sólido branco, com ponto de fusão na faixa de 282-285°C e solúvel em DMSO.

No espectro de RMN de ¹H (Figura 45) desta substância é possível observar um sinal em δ_{H} 5,11, típico de hidrogênio olefínico (C-12), geralmente presente em triterpenos com esqueleto ursano. O sinal em δ_{H} 3,44 é característico de hidrogênio ligado a carbono oxigenado, assim como o sinal em δ_{H} 2,98 (H3). O duplete em δ_{H} 2,10 é característico de hidrogênio ligado ao carbono 18 de triterpenos com esqueleto ursano. Isto indica possibilidade de o composto ser um derivado oxidado do ácido ursólico. Na região entre δ_{H} 0,60 e 1,15 há sinais referentes a seis metilas. Comparando-se com o ácido ursólico, que têm

sete metilas, pode-se chegar à conclusão de que há uma metila que a oxidação ocorreu em uma das metilas.

A análise do espectro de DEPTQ (**Figura 48**) confirmou que a substância se tratava de um derivado hidroxilado do ácido ursólico. Os sinais em δ_C 178,4 (C-28), 138,0 (C-13) e 124,7 (C-12) são característicos do ácido. Além do sinal em δ_C 76,8 (C-3) há um em δ_C 63,8 (carbono metilênico oxigenado). Também nesse espectro foi possível observar apenas seis sinais de metilas entre δ_C 15,0 e 29. Comparando-se estes dados com os de deslocamento químico disponíveis na literatura para ácido ursólico, percebeu-se a ausência de um sinal em torno 21,0 ppm, que, no caso do ácido ursólico, trata-se da metila 30.

As informações mencionadas acima (**Tabela 11**) e as correlações observadas nos espectros de HMQC e HMBC serviram como base para identificar a substância **8** como o ácido 30-hidroxi-ursólico. Esta substância foi isolada da espécie *Rubia cordifolia*, (TALAPATRA *et al.*, 1981). Porém neste relato, não foram discutidos dados espectroscópicos de **8**.

Tabela 11. Dados de RMN ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) de **8**.

Composo 8		Composo 8	Composo 8	Ác. Ursólico*
C	δ ^1H	DEPTQ	HMBC ^nJ	δ_C
1		37,9		38,1
2		27,8		27,8
3	2,98	80,8	23, 24	79,9
4		39,7		39,8
5		55,2		56,7
6		17,1		19,4
7		32,6		34,3
8		38,2		39,9
9		47,6		48,0
10		37,1		38,1
11		23,5		24,3
12	5,11 (s, 1H)	126,5	14, 18	127,0
13		137,3		139,8
14		42,1		43,2
15		28,1		29,1
16		25,2		25,2
17		47,4		48,0
18	2,09 (d, $J = 11,3$ Hz, 1H)	52,2	12, 13, 14, 17, 28	54,4
19		34,1		40,7
20		43,3		40,4
21		33,0		31,7
22				40,4
23	0,86 (s, 3H)	28,3	3, 5, 24	28,7
24	0,83 (s, 3H)	15,2	3, 4, 23	15,9
25	0,94 (s, 3H)	16,1	5	16,3
26	0,75 (s, 3H)	16,7	14	17,5
27	1,04 (s, 3H)	23,3	13, 14	24,0

28	-	178,4		181,9
29	0,88 (d, $J = 6,1$ Hz)	16,9	18	17,7
30	3,43 (m, 1H), Hb sobreposto	67,6	20	21,5

*JORGE, 2005. Espectro obtido em CD₃OD.

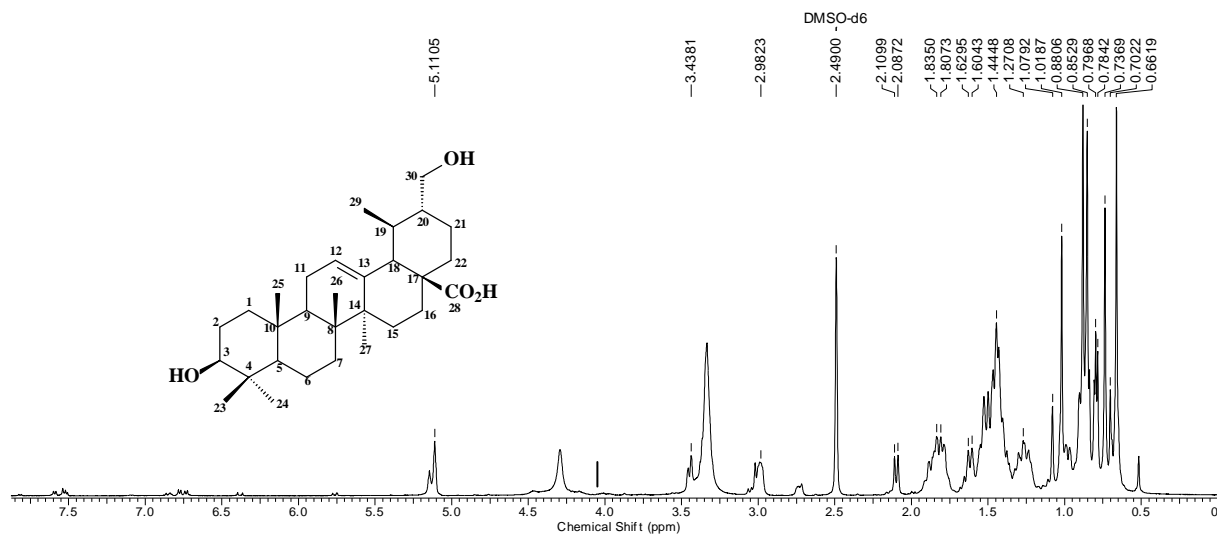


Figura 45. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) de **8**.

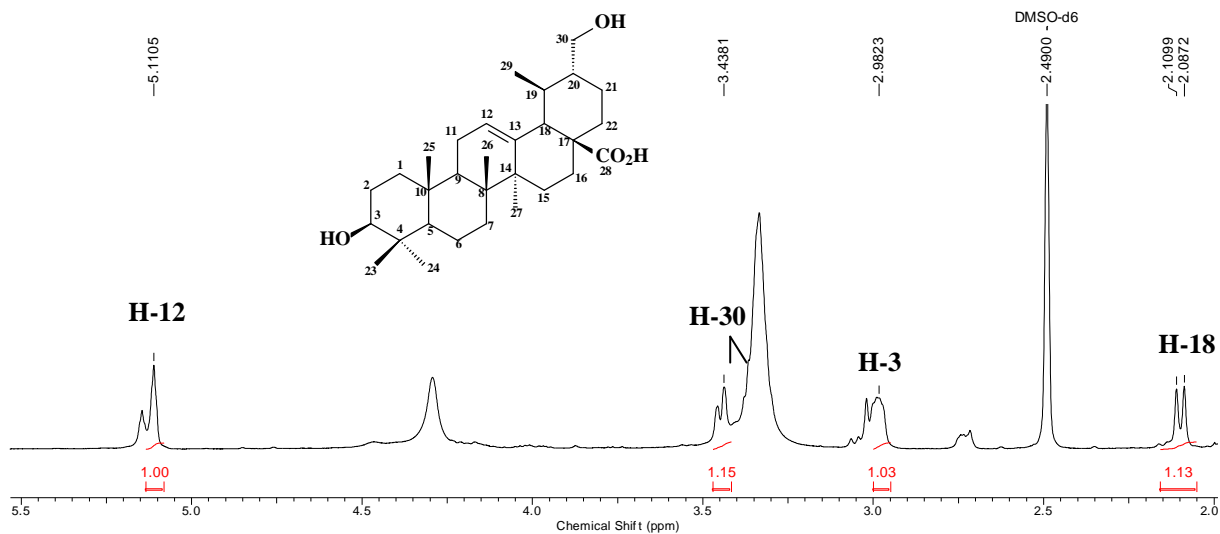


Figura 46. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) de **8** (2,0 a 5,5 ppm).

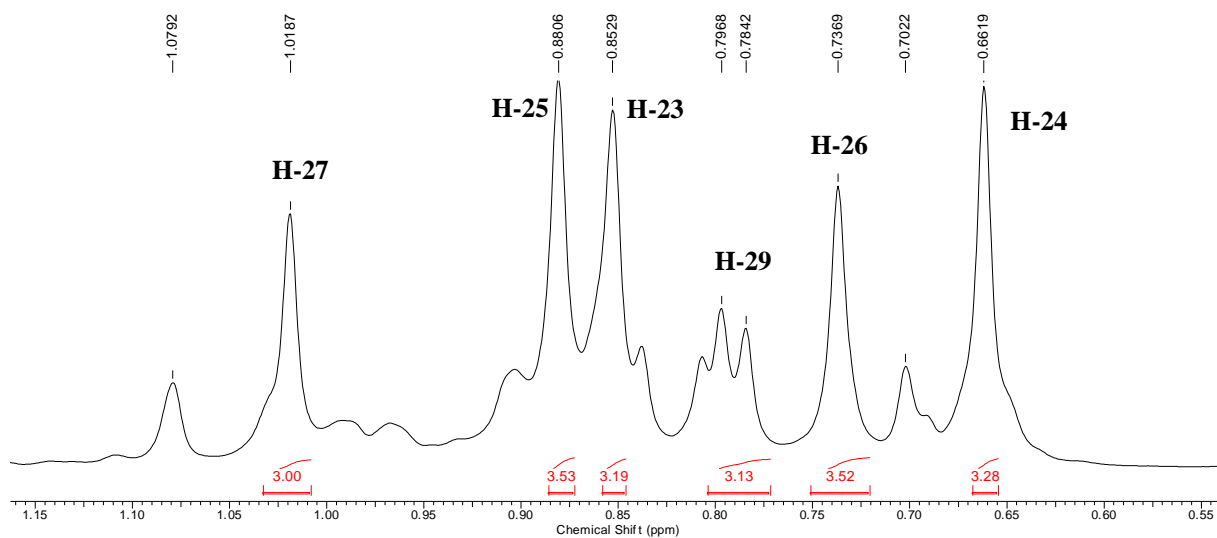


Figura 47. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de **8** (0,55 a 1,15 ppm).

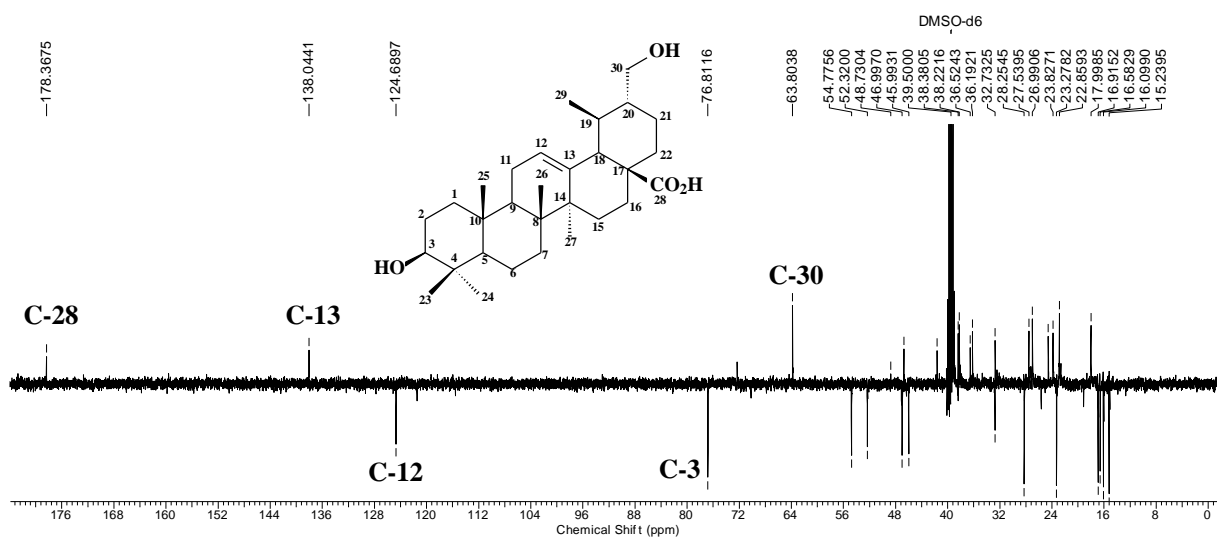


Figura 48. Espectro de DPTQ (125 MHz, DMSO-d_6) de **8**.

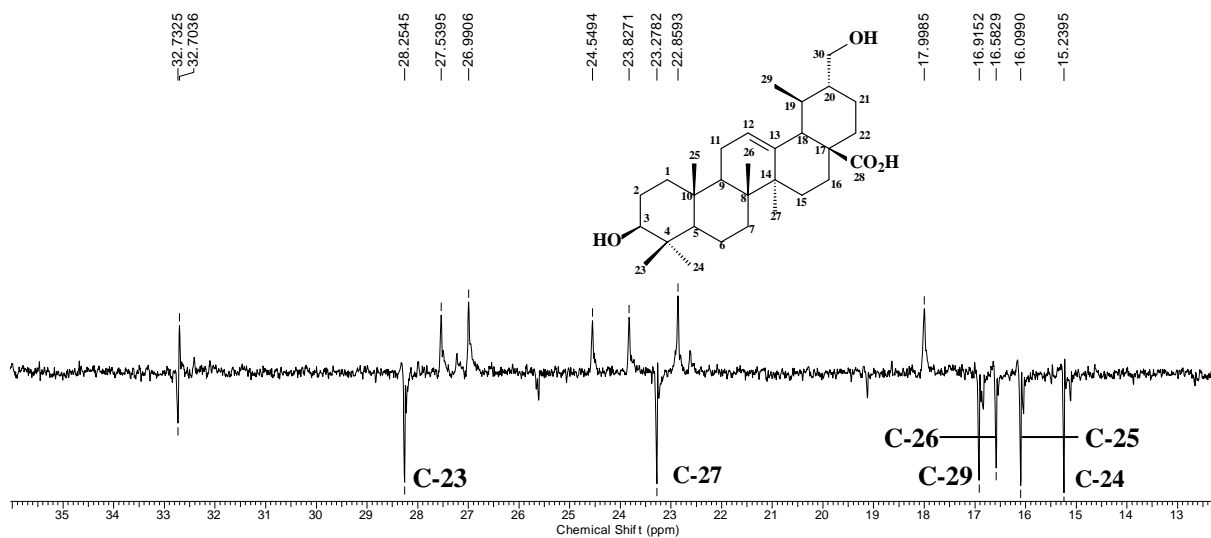


Figura 49. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, DMSO-d₆) de **8** (13,0 a 35,0 ppm).

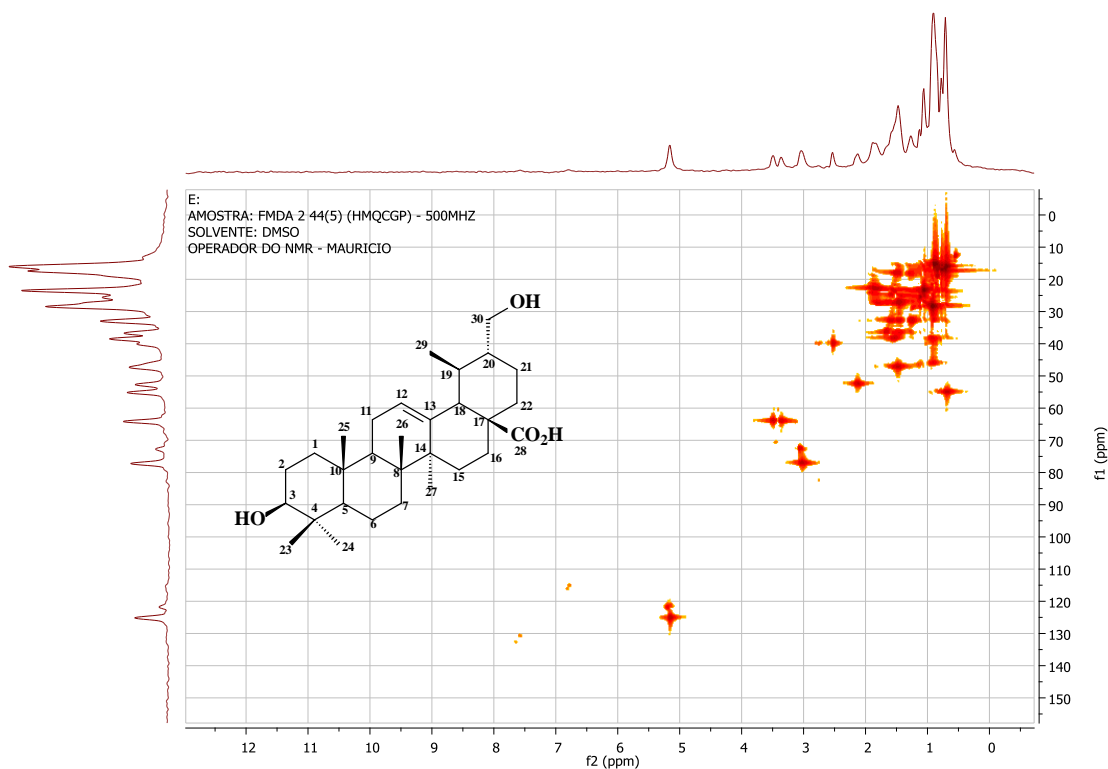


Figura 50. Espectro de HMQC (500 MHz, DMSO-d₆) de **8**.

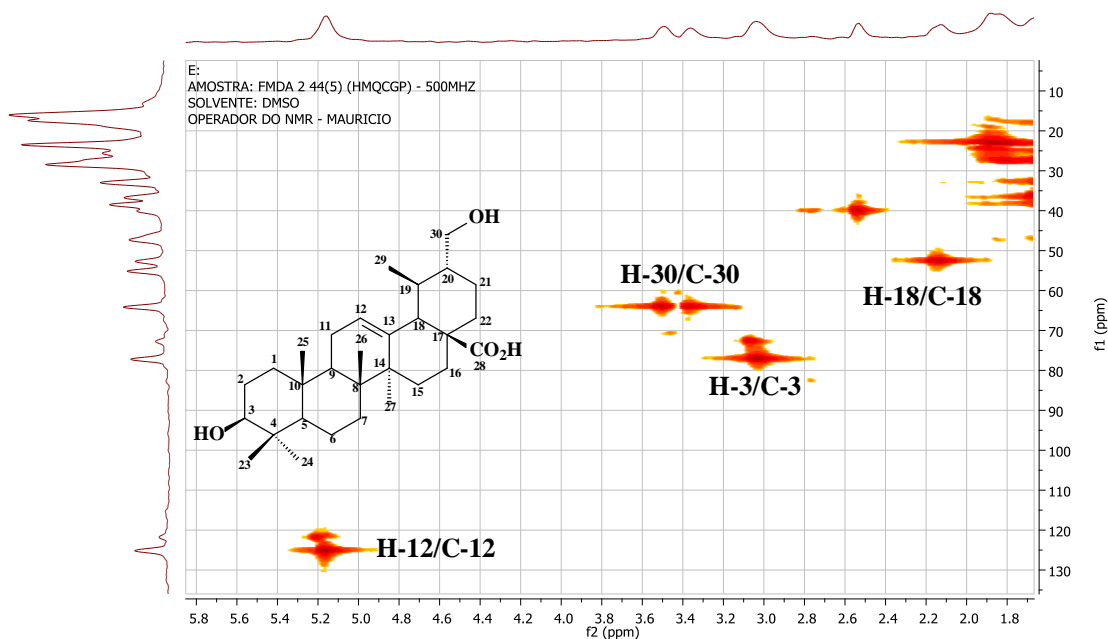


Figura 51. Expansão do espectro de HMQC (500 MHz, DMSO-d₆) de **8** (1,80 a 5,80 ppm).

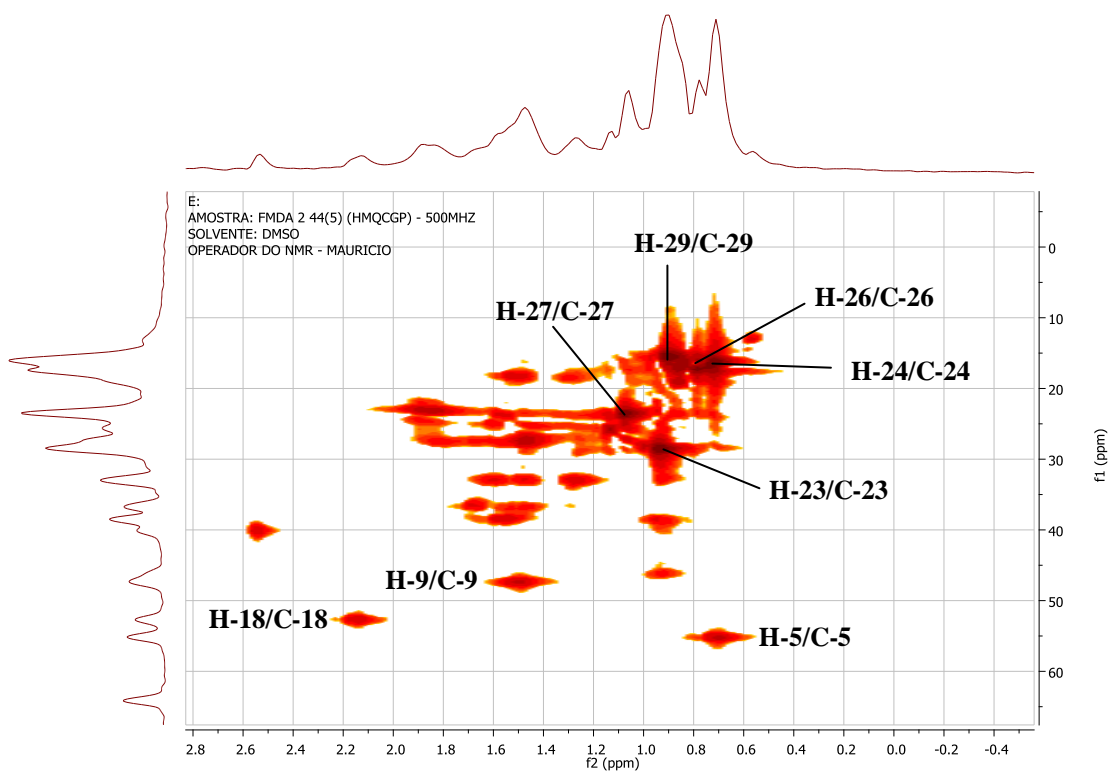


Figura 52. Expansão do espectro de HMQC (500 MHz, DMSO-d₆) de **8** (0,40 a 2,80 ppm).

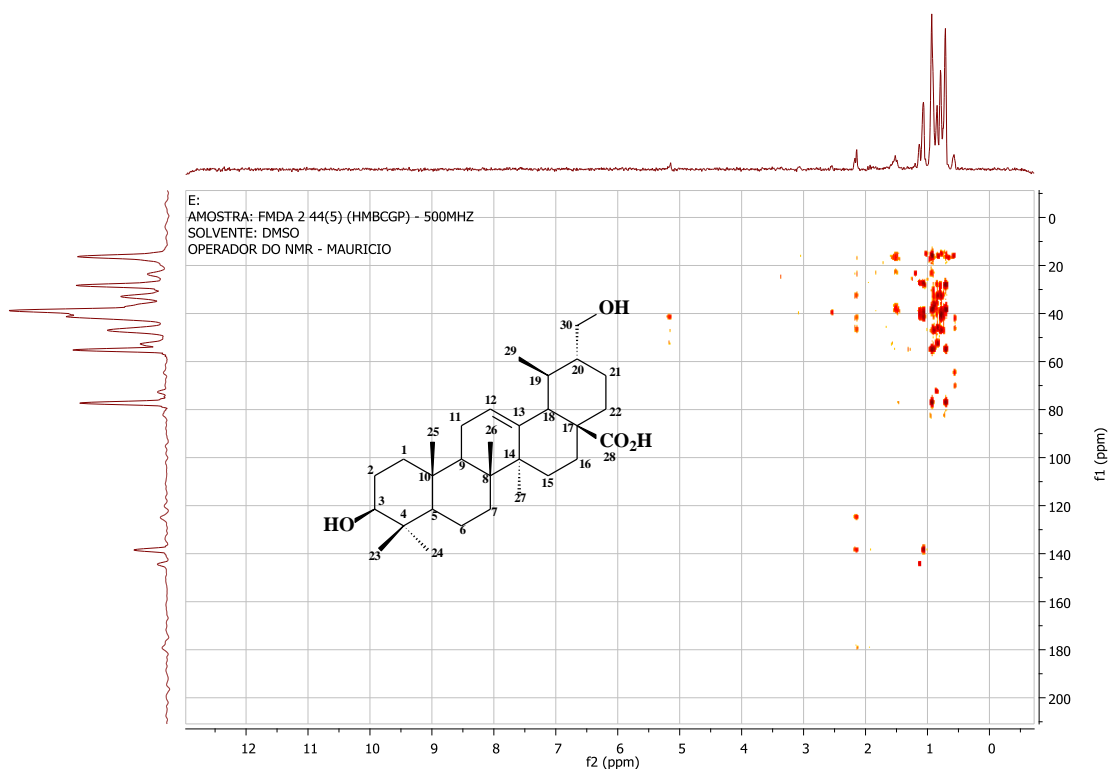


Figura 53. Espectro de HMBC (500 MHz, DMSO-d₆) de 8.

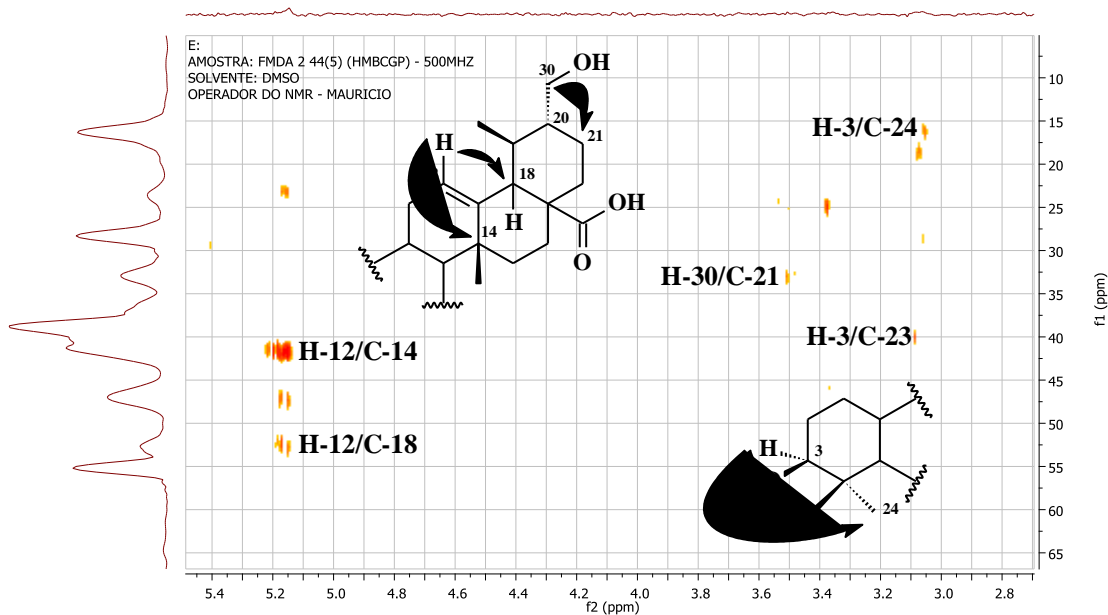


Figura 54. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, DMSO-d₆) de 8 (2,80 a 5,40 ppm).

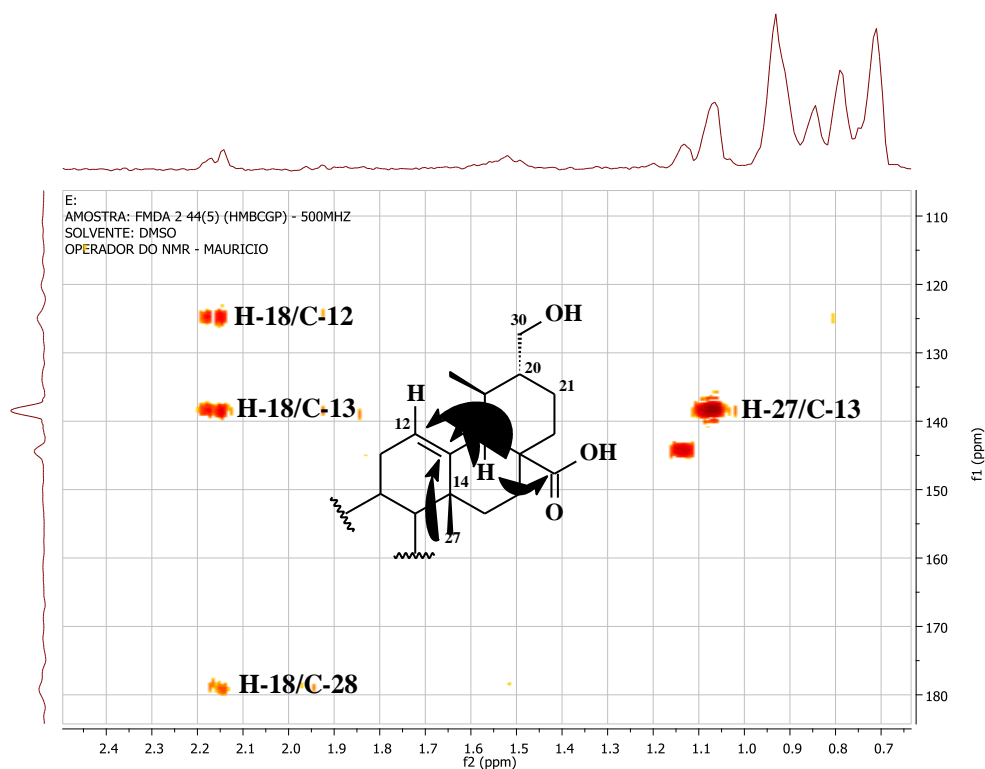


Figura 55. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, DMSO-d₆) de **8** (0,70 a 2,4 ppm).

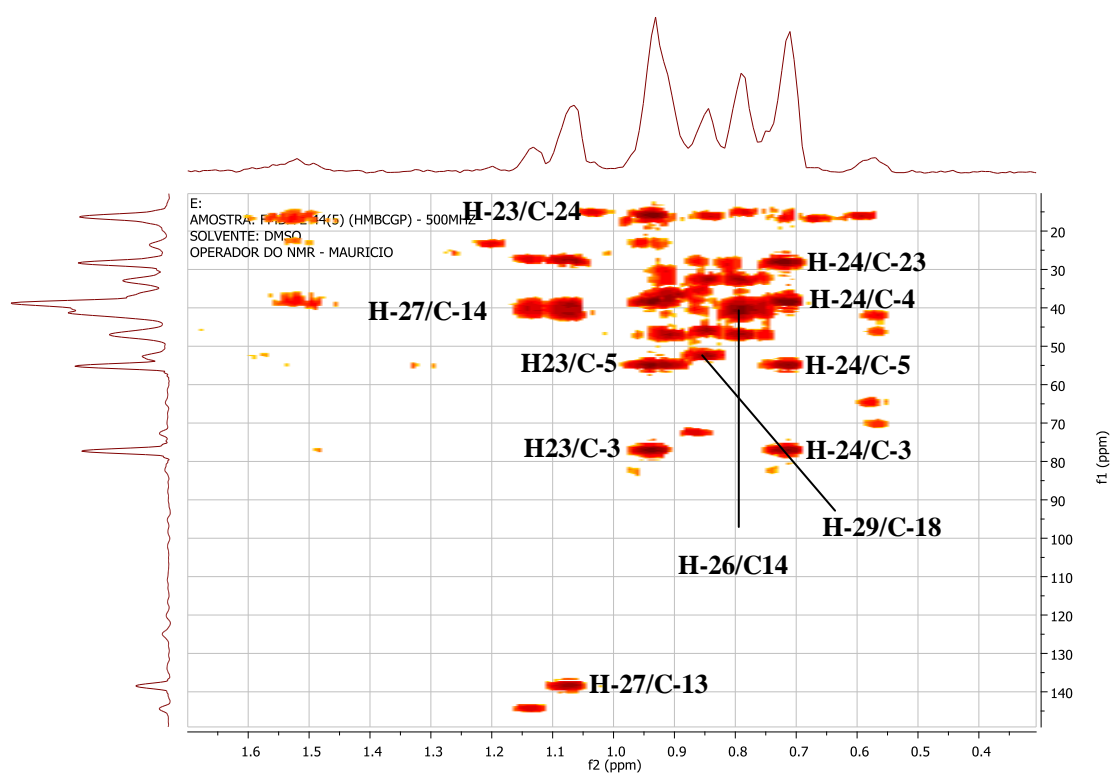
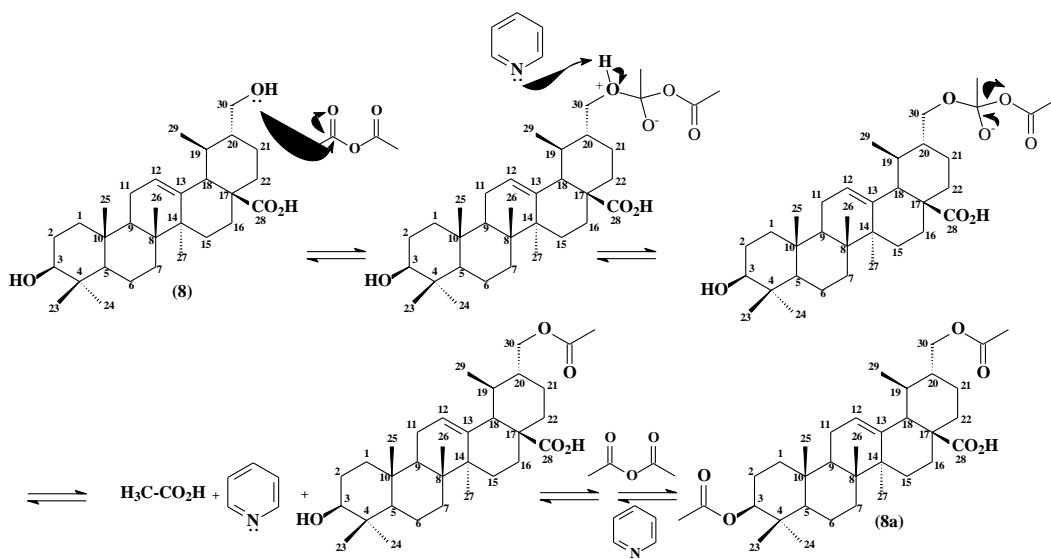


Figura 56. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, DMSO-d₆) de **8** (0,40 a 1,60 ppm).

5.1.5.2 Substância 8a

Com o objetivo de confirmar a proposta estrutural da estrutura de **8**, foi realizada a reação de acetilação (**Esquema 10**), que consistiu em misturar a amostra com anidrido acético em piridina (**Item 4.4.2.2**), sob agitação durante 24 horas. Os resultados confirmaram a previsão da presença de dois grupos acetilas na molécula, um em C-3 e o outro em C-30. As modificações espectrais esperadas (RMN ^1H) confirmaram a proposta com o surgimento de dois sinais próximos a 2,0 ppm, característicos das metilas dos grupos acetilas. Além disso, houve alteração dos valores de δ_{H} dos hidrogênios ligados aos C-3 e C-30 para maiores valores de deslocamento químico, devido ao efeito indutivo retirador de elétrons da carbonila do grupo acetila. Observaram-se a presença de dois sinais próximos a 170,0 ppm no espectro de DEPTQ, confirmando as duas carbonilas adicionais. Os espectros de RMN ^1H (**Figura 57**) e de DEPTQ (**Figura 60**) do produto formado apresentaram todas essas características, o que ratificou a proposta estrutural estabelecida para o composto **8**. Estes dados se encontram listados na **Tabela 12**.



Esquema 9. Mecanismo proposto para reação de acetilação de **8**.

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CDCl_3) do derivado **8a**

C	δ ^1H	DEPTQ	HMBC
1		37,9	
2		27,8	
3	4,51 (m, 1H)	80,8	23, 24,
4	-	39,7	
5		55,2	
6		17,1	
7		32,6	
8	-	38,2	
9	1,62 (d, $J = 14,0$ Hz, 1H)	47,6	
10	-	37,1	
11		23,5	
12	5,28 (s, 1H)	126,5	14, 18
13	-	137,3	
14	-	42,1	
15		28,1	
16		25,2	
17	-	47,4	
18	2,28 (d, $J = 11,2$ Hz, 1H)	52,2	12, 13, 14, 17
19		34,1	
20		43,3	
21		33,0	
23	0,86 (s, 3H)	28,3	3, 5, 24
24	0,83 (s, 3H)	15,8	5, 23
25	0,94 (s, 3H)	16,8	9, 5
26	0,75 (s, 3H)	16,9	9
27	1,04 (s, 3H)	23,8	13
28	-	183,2	
29	0,88 (d, $J = 6,1$ Hz)	17,3	18
30	4,19 (d, $J = 8,1$ Hz 1H); 3,97 (dd, $J_1 = 7,0$ Hz, $J_2 = 10,7$ Hz, 1H)	67,6	1''
1'	-	171,3	
1''		171,1	
2'	2,05	21,3	
2''	2,03	20,9	

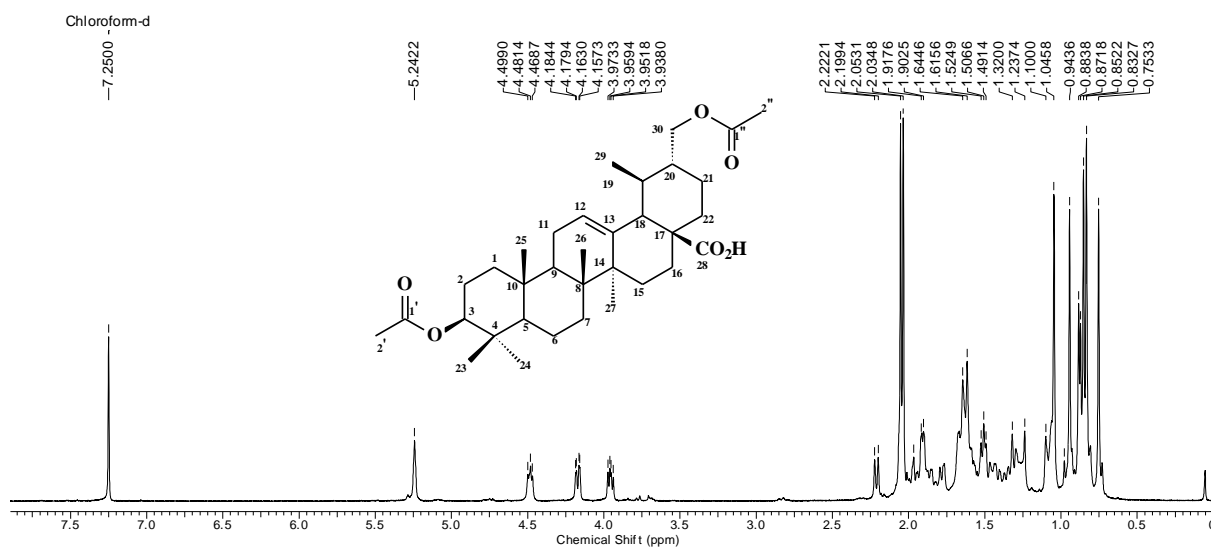


Figura 57. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **8a**.

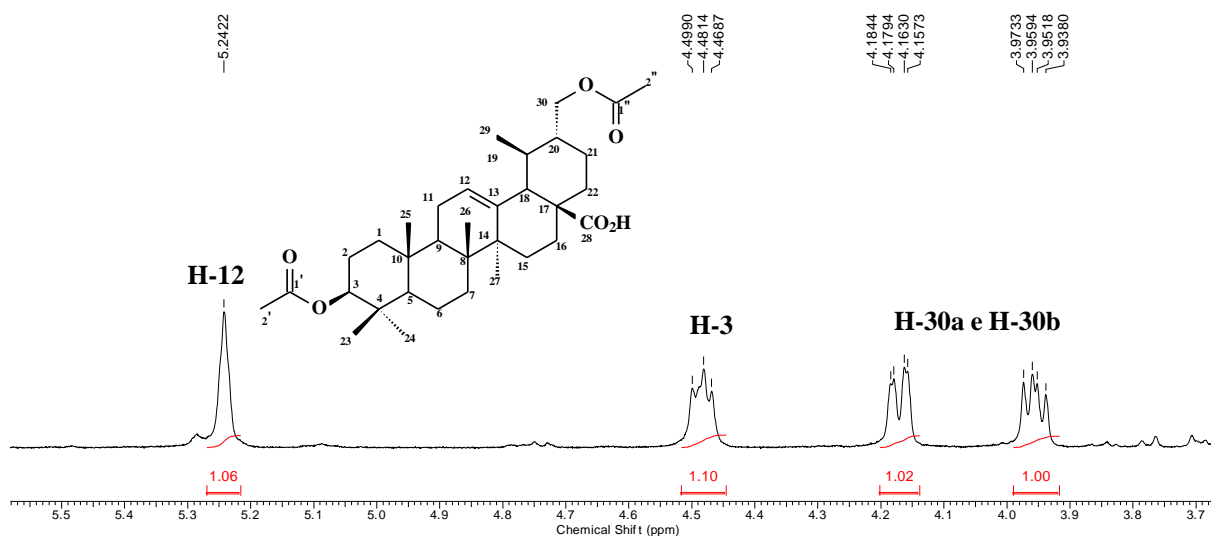


Figura 58. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **8a** (3,70 a 5,50 ppm).

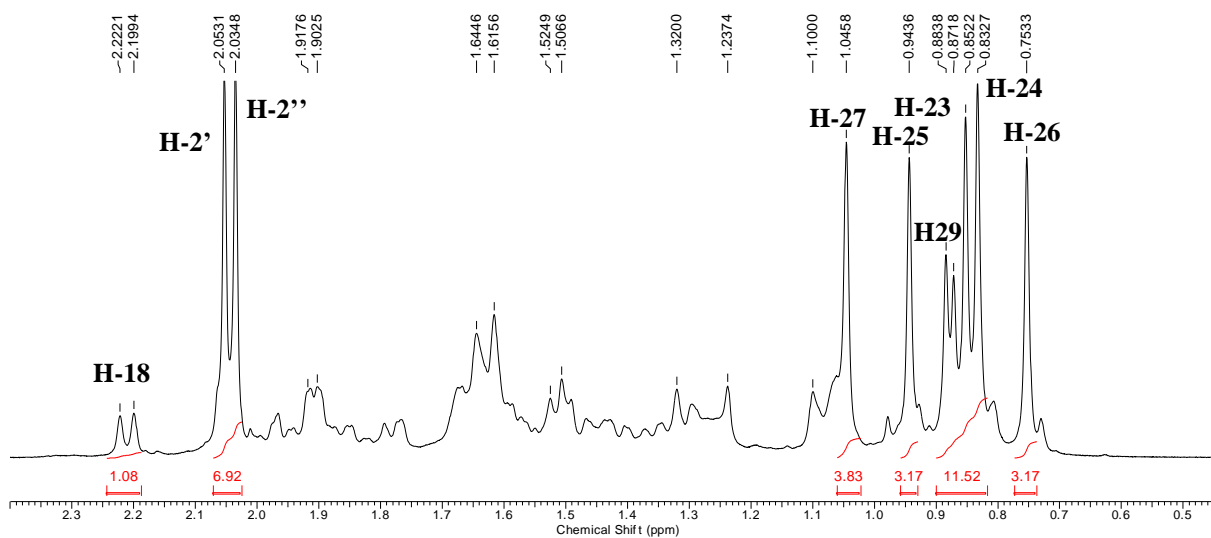


Figura 59. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **8a** (0,50 a 2,20 ppm).

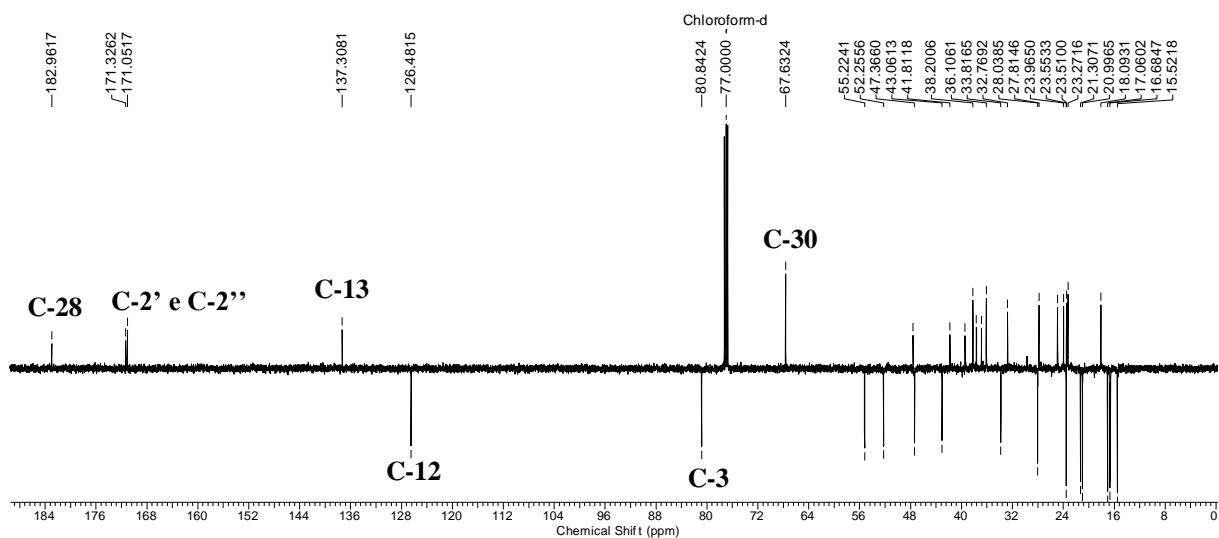


Figura 60. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **8a**.

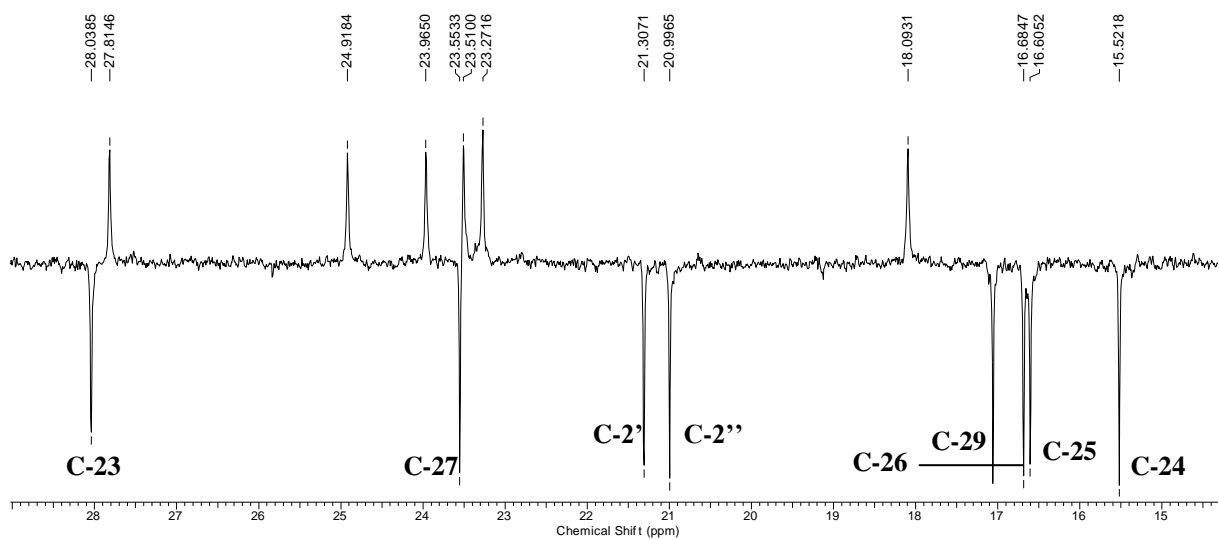


Figura 61. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **8a** (15,0 a 28,0 ppm).

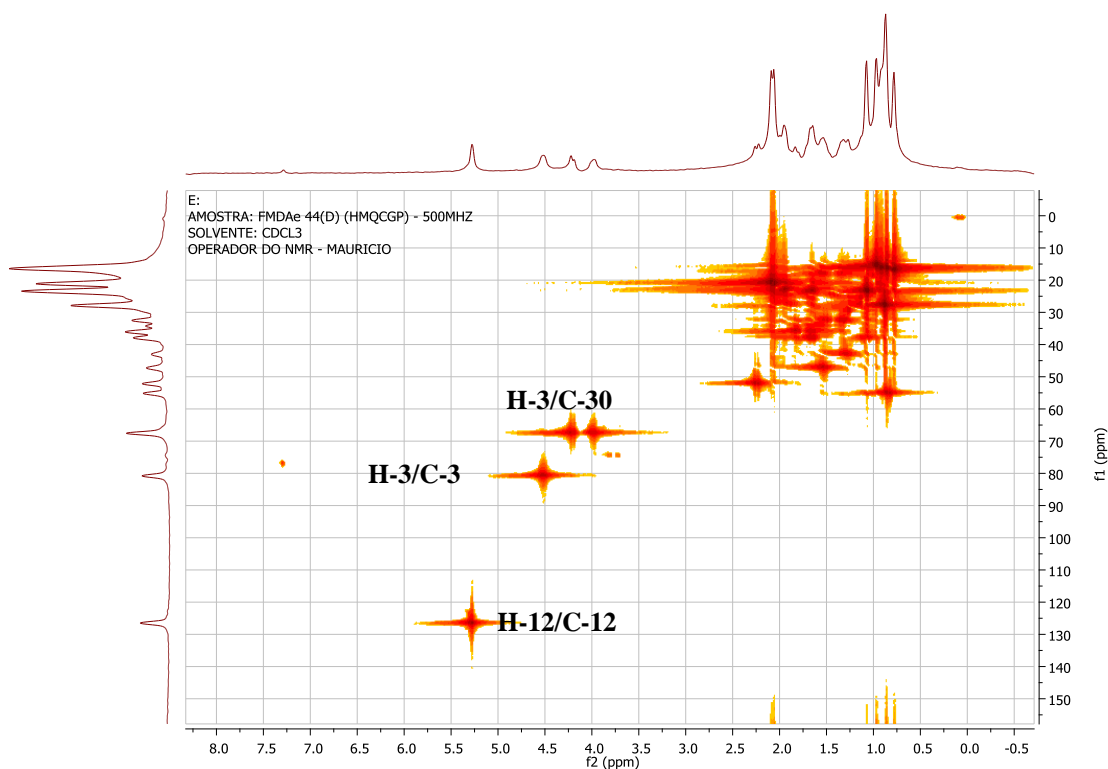


Figura 62. Espectro de HMQC (500 MHz, CDCl_3) de **8a**.

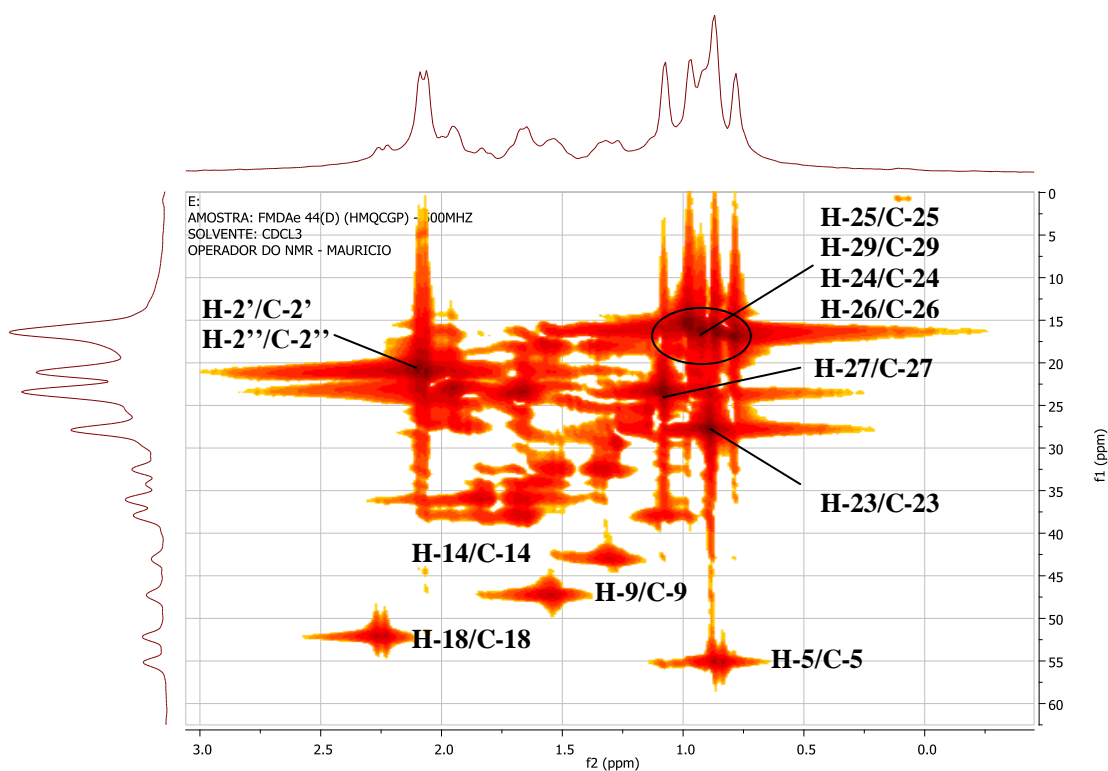


Figura 63. Expansão do espectro de HMQC (500 MHz, CDCl_3) de **8a** (0,0 a 3,0 ppm).

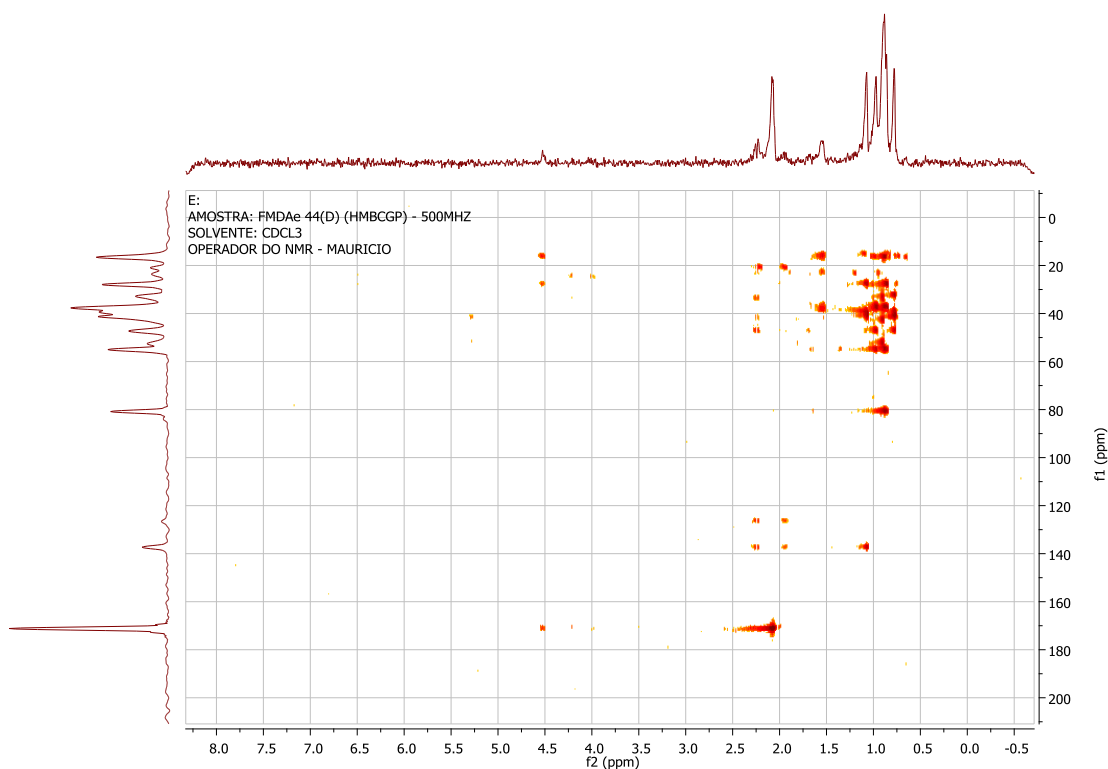


Figura 64. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **8a**.

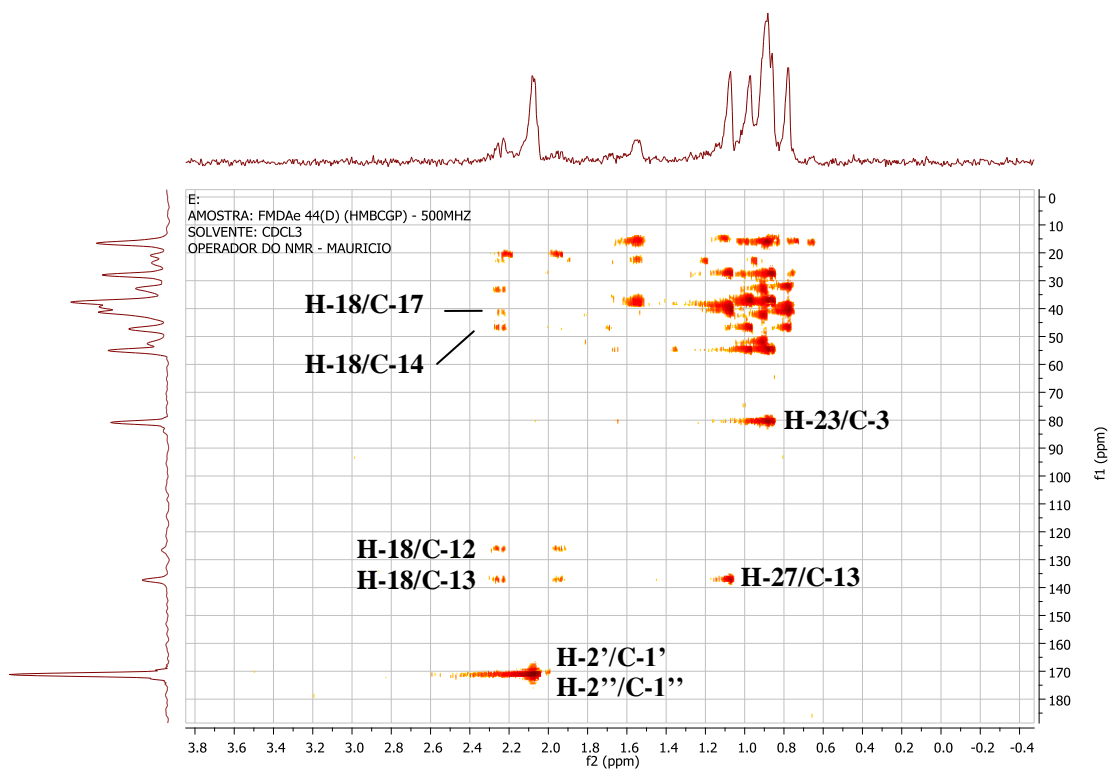


Figura 65. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **8a** (0,40 a 3,80 ppm).

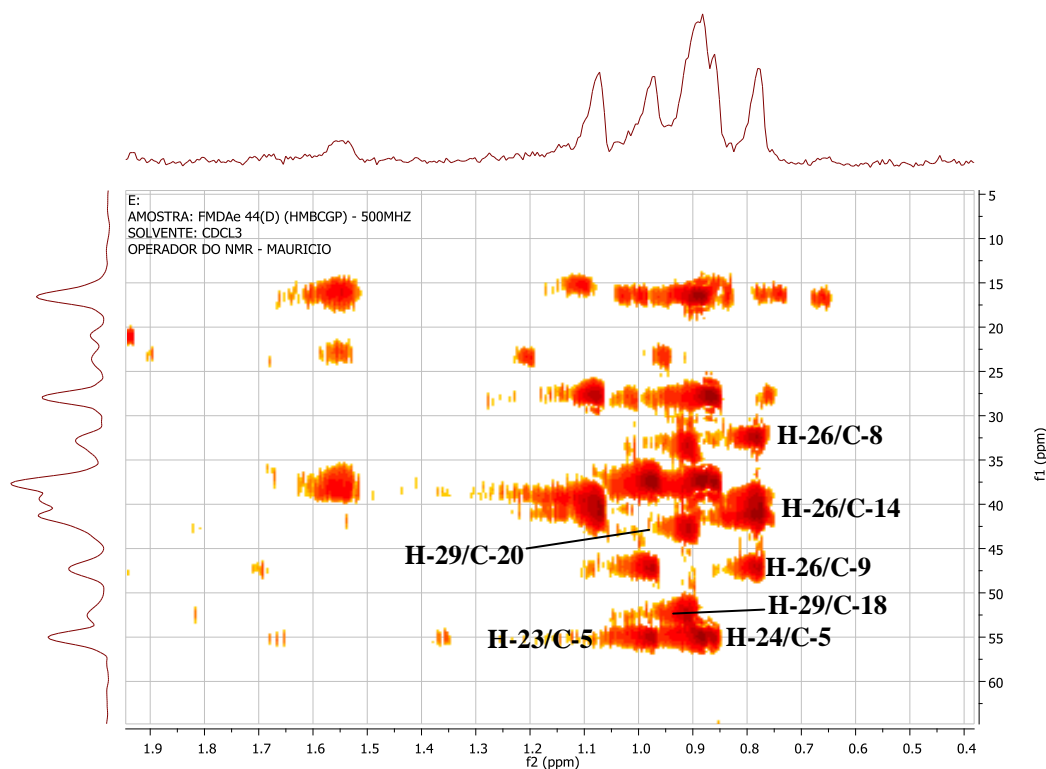


Figura 66. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **8a** (0,40 a 1,90 ppm).

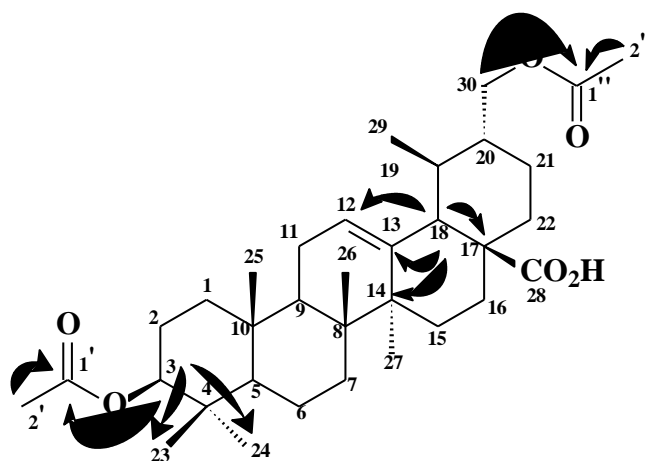


Figura 67. Correlações observadas no espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **8a**.

5.1.5.3 Derivado **8b**

Na busca de mais informações que ratifiquem a proposta estrutural do composto **8**, inclusive a configuração relativa, o derivado **8a** foi metilado (**Esquema 11**), através de reação com diazometano em éter etílico (**Item 4.4.2.3**).

O sinal em δ_H 3,60 (s, 3H), presente no espectro de RMN 1H (**Figura 68**) do composto **8b**, é característico de grupo metoxil, indicou que a reação ocorreu. No espectro de DEPTQ do composto **8b**, observou-se sinal em δ_H 51,5 foi atribuído ao grupo metoxil.

Através de análise dos espectros dos experimentos de NOE-1D (**Figura 72**) foi possível estabelecer a configuração relativa de **8**. Foi observada a relação espacial entre hidrogênios dos carbonos 18, 28, 29 e 30. Nesta análise foram escolhidas frequências correspondentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 18 e 30, observando-se NOE entre os hidrogênios H-18/H-12, H-18/H-29, H-30a/H-29, H-30a/H-30b, H-30b/H-29. Com isso, concluiu-se que os grupos correspondentes aos carbonos 29 e 30 apresentam configuração trans entre si. Os dados de deslocamentos químicos de carbono-13 e demais sinais observados nos espectros de NOE permitiu propor a estrutura abaixo com a estereoquímica relativa de **8**.

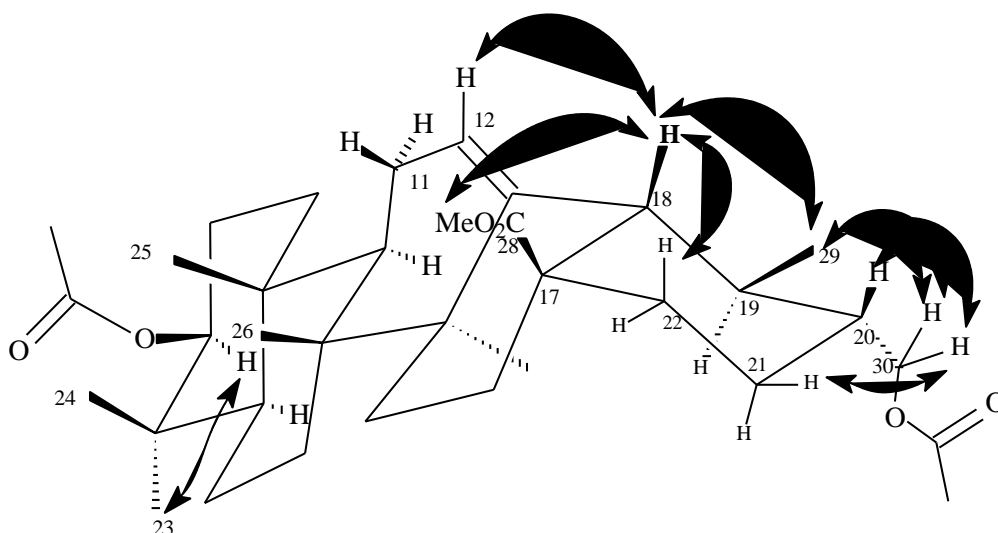
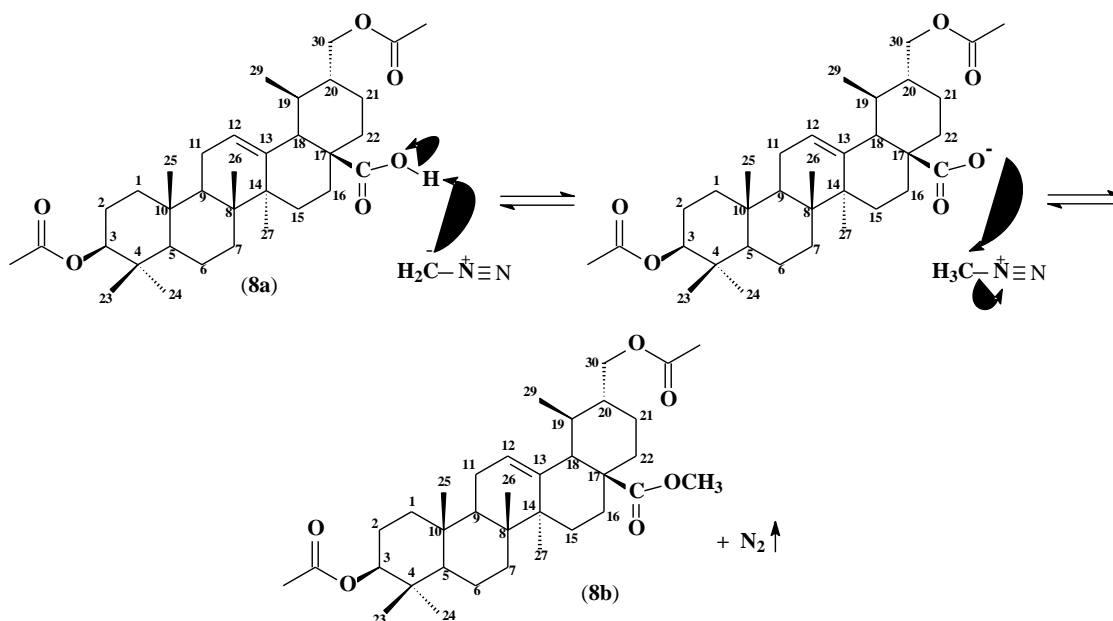


Figura 67a 1. Representação da configuração relativa do derivado **8b** correspondente a substância natural **8**.



Esquema 10. Mecanismo proposto para a reação de metilação de **8a**.

Tabela 13. Dados de RMN ^1H e DEPTQ (400 e 100 MHz, CDCl_3) de **8b**.

C	δ ^1H	DEPTQ	NOE-1D
1		36,8	
2		27,6	
3	4,48 (m, 1H)	80,9	
4	-	39,5	
5		55,2	
6		16,9	
7		32,8	
8	-	38,2	
9	1,90 (dd, $J_1 = 4$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, 1H)	47,7	
10	-	36,8	
11		23,5	
12	5,25 (sl, 1H)	126,2	
13	-	137,5	
14	-	43,1	
15		28,1	
16		25,2	
17	-	47,4	
18	2,26 (d, $J = 11,2$ Hz, 1H)	52,2	12, 22, 29, CH_3
19		33,8	
20		43,1	
21		33,8	
23	0,85 (s, 3H)	28,0	
24	0,84 (s, 3H)	15,5	
25	0,93 (s, 3H)	16,9	
26	0,73 (s, 3H)	16,6	
27	1,04 (s, 3H)	23,6	
28	-	177,7	
29	0,88 (d, $J = 6,1$ Hz)	18,1	
30	4,17 (d, $J = 8,1$ Hz 1H); 3,96 (dd, $J_1 = 7,0$ Hz, $J_2 = 10,7$ Hz, 1H)	67,7	20, 21, 29
1'	-	171,3	

1''	171,0
2''	21,3
2''	20,9
CH ₃	51,5

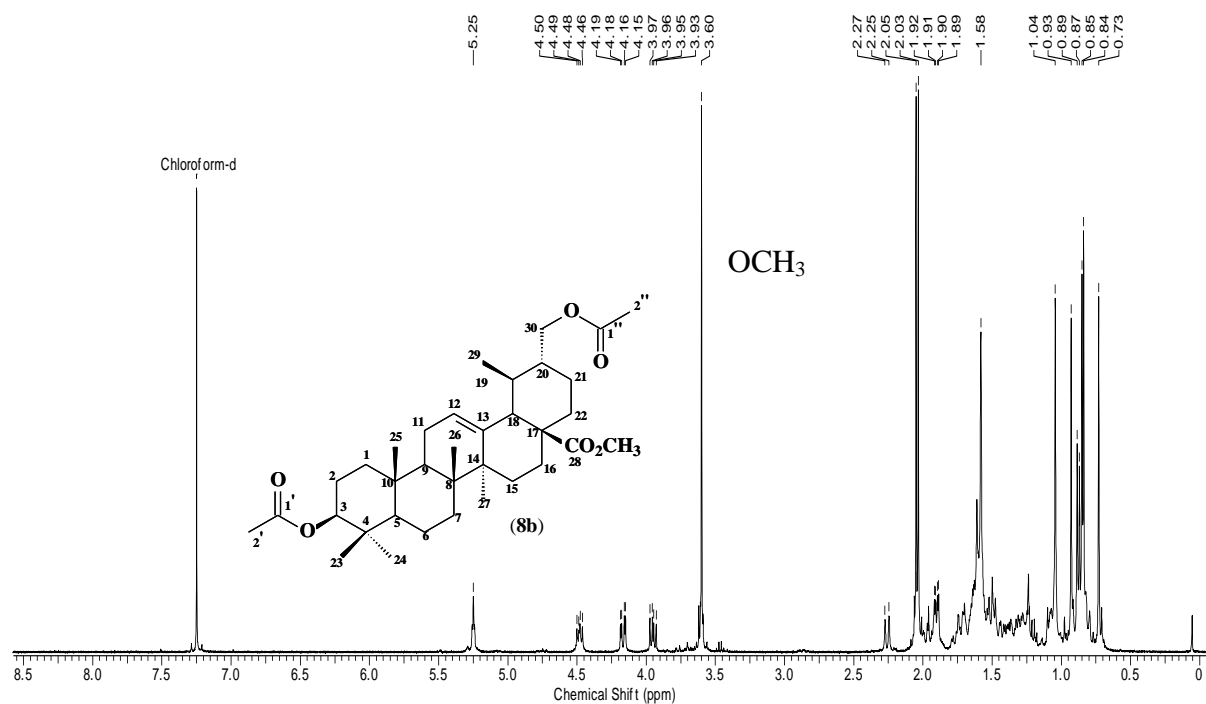


Figura 68. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **8b**.

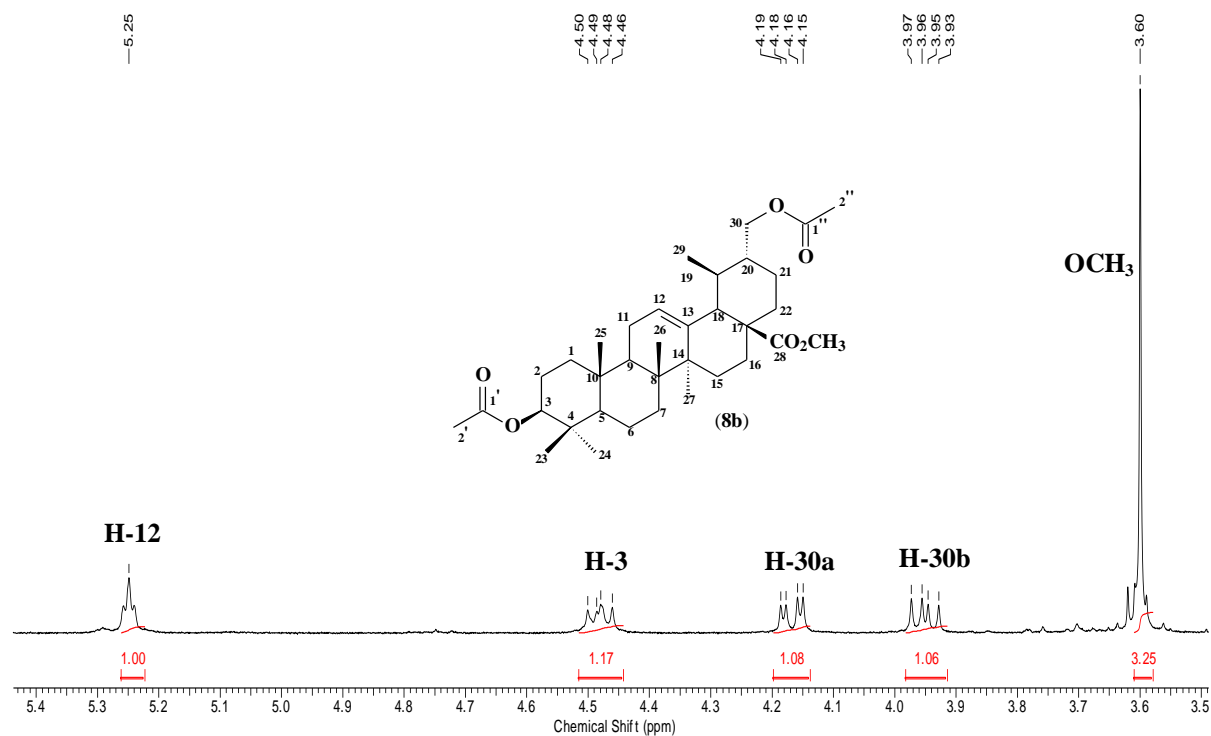


Figura 69. Expansão do espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **8b** (3,5 a 5,4 ppm).

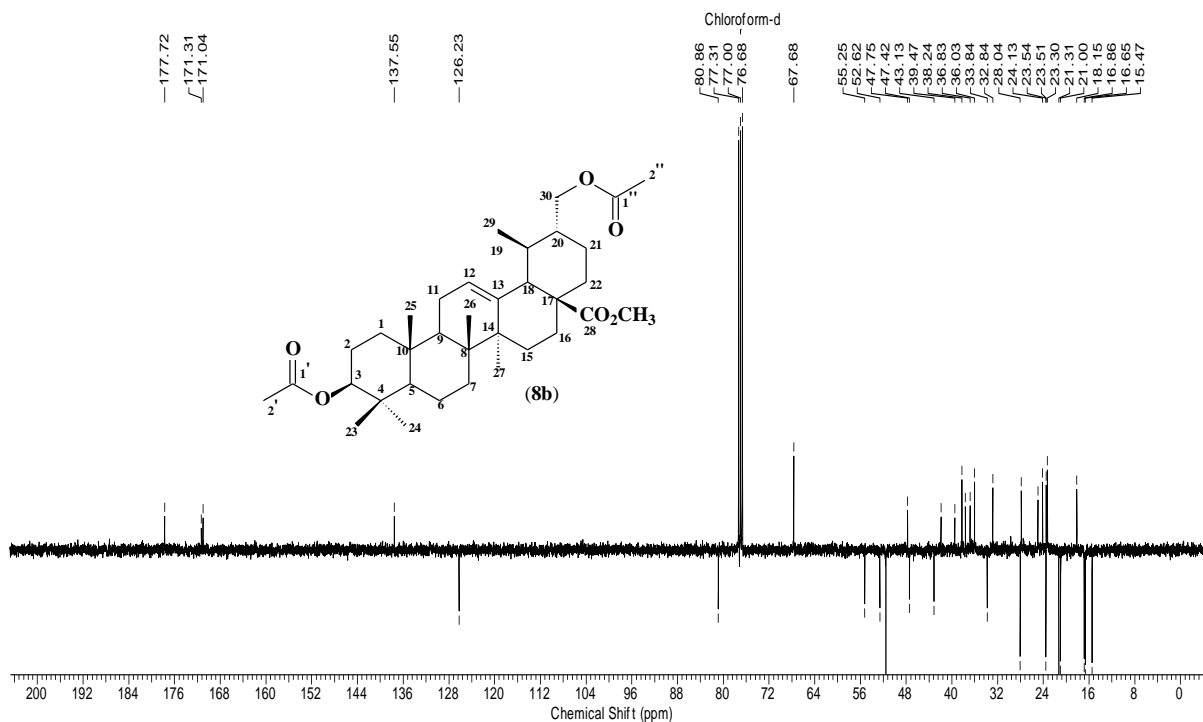


Figura 70. Espectro de DEPTQ (100 MHz, CDCl_3) de **8b**.

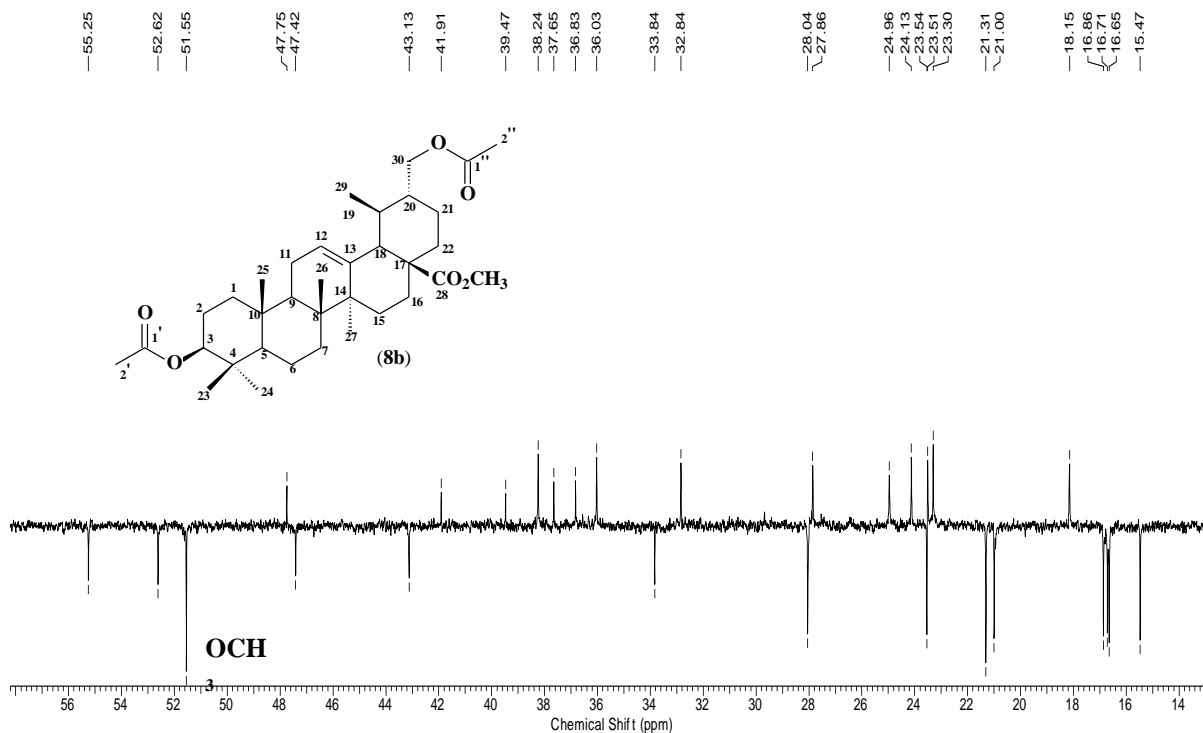


Figura 71. Expansão do espectro de DEPTQ (100 MHz, CDCl_3) de **8b** (14,0 a 56,0 ppm).

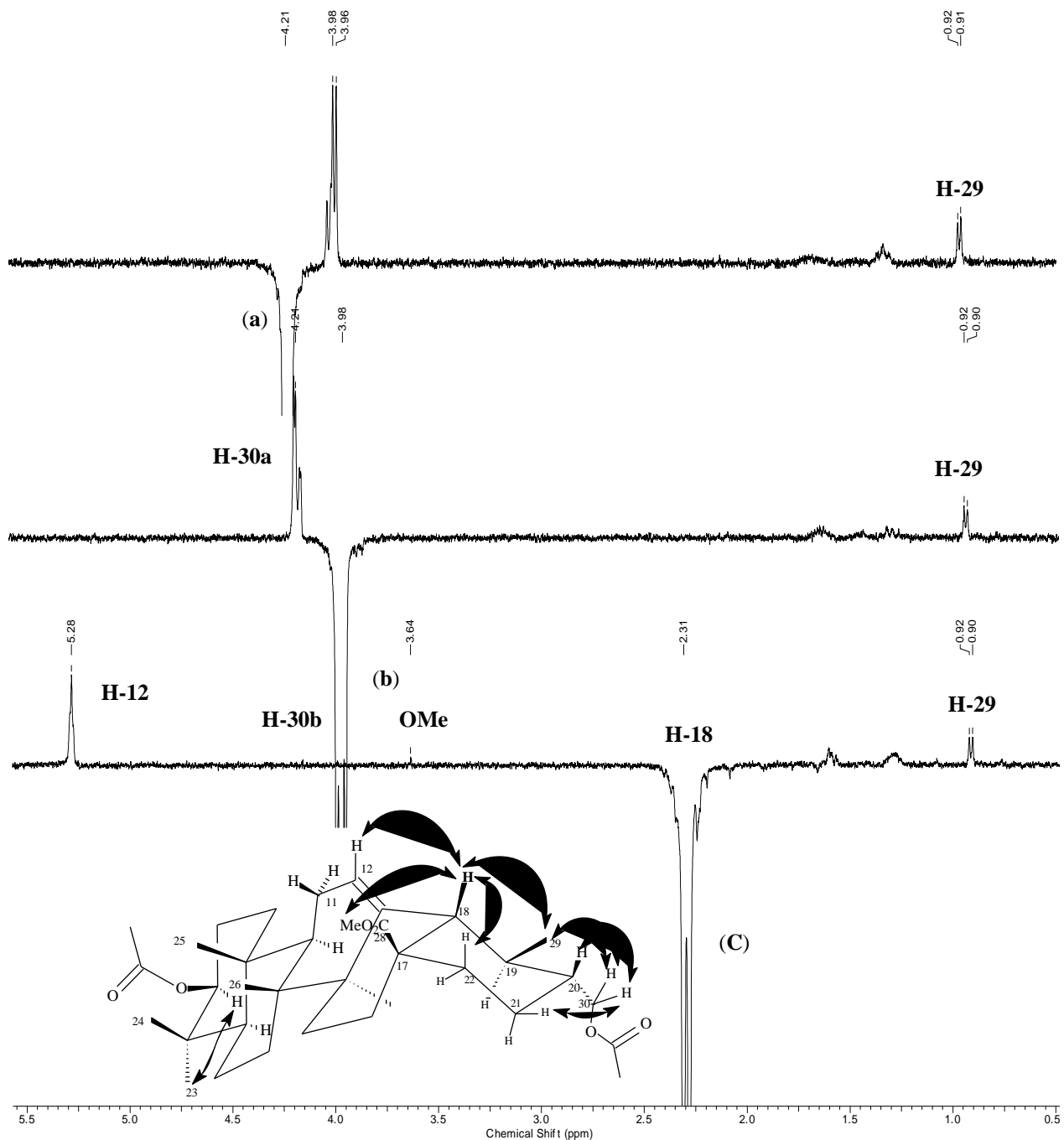


Figura 72. Espectro de NOE-1D (400 MHz, CDCl_3) de **8b**, irradiação na frequência do H30a (a), H30b (b) e H18 (c).

5.1.6. Substância 9

A partir da CC realizada para purificação de EMF-H, foi obtido um pó branco com ponto de fusão na faixa de 138-141° C e solúvel em clorofórmio.

Análise do espectro de RMN ^1H (**Figura 73**) revela sinais em δ_{H} 5,33 (sl) correspondente ao hidrogênio olefínico H6, δ_{H} 3,52 (m) atribuído ao H-3 e sinais em δ_{H} 0,65

(s, 3H, H-18), 0,80 (d, 3H, H-27), 0,81 (d, 3H, H-26), 0,83 (d, 3H, H-21), 0,90 (d, 3H, H-29) e 0,99 (s, 3H, H-19) atribuídos às metilas.

O espectro de DEPTQ (**Figura 76**) mostra sinais em δ_C 140,9 e 121,9, característicos de carbonos olefínicos de dupla ligação trissubstituída, os quais foram atribuídos aos carbonos 5 e 6, respectivamente. Também é possível observar os sinais em δ_C 72,0 (C-3), 20,0 (C-27), 19,6 (C-19), 19,2 (C-26), 19,0 (C-21), 12,2 (C-29) e 12,0 (C-18).

As informações mencionadas acima (**Tabela 14**), juntamente com conceitos de biossíntese e comparação com dados da literatura (Gomes, 2002), indicaram que a substância 8 em questão é o β -sitosterol.

Tabela 14. Dados de RMN ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz) de **9**.

	Composto 9	β -sitosterol*	Composto 9	β -sitosterol*
C	δ_C	δ_C	δ_H	δ_H
1	37,5	37,2		
2	31,6	31,5		
3	72,0	71,6	3,52 (m)	3,50 (m)
4	42,5	42,2		
5	140,9	140,7		
6	121,9	121,6	5,33 (sl)	5,34 (sl)
7	32,1	31,8		
8	32,2	31,8		
9	50,3	50,0		
10	36,4	36,4		
11	21,3	21,0		
12	39,9	39,7		
13	39,9	41,2		
14	56,9	56,7		
15	24,5	24,2		
16	28,5	28,2		
17	56,4	55,9		
18	12,0	11,8	0,65 (s, 3H)	0,65 (s)
19	19,6	19,8	0,99 (s, 3H)	0,98 (s)
20	36,4	36,1		
21	19,0	18,7	0,90 (s, 3H)	0,91 (s)
22	34,2	33,8		
23	26,2	25,9		
24	46,3	45,7		
25	29,3	29,0		
26	19,2	18,9	0,81 (d, 3H)	0,82 (d)
27	20,0	19,8	0,80 (d, 3H)	0,80 (d)

28	23,3	22,9		
29	12,2	11,9	0,90 (d, 3H)	0,88 (d)

* (Gomes, 2002). Espectro obtido em CDCl_3 .

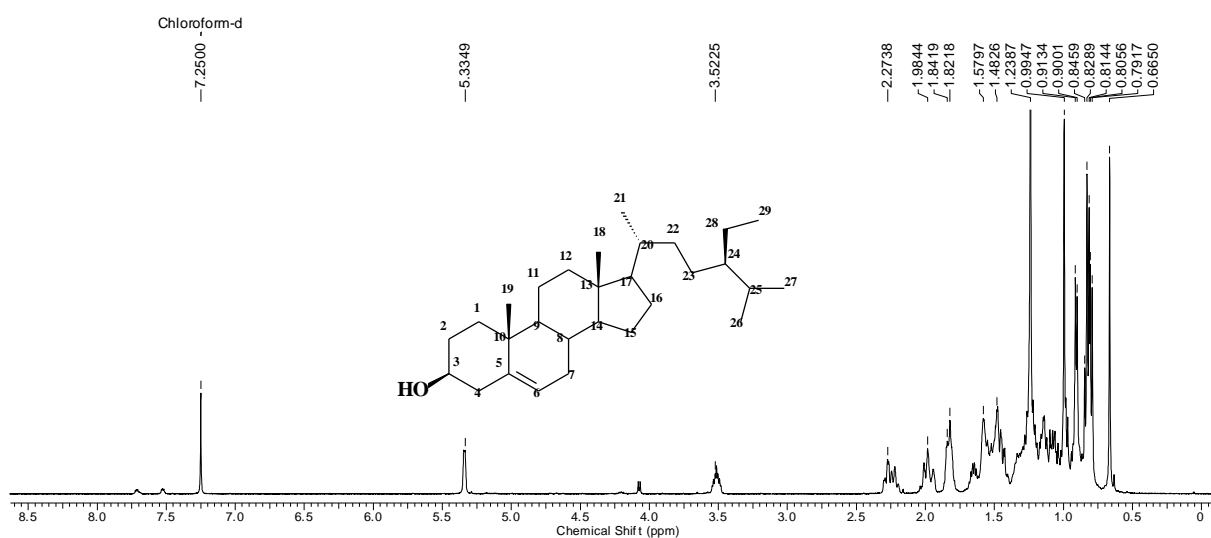


Figura 73. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **9**.

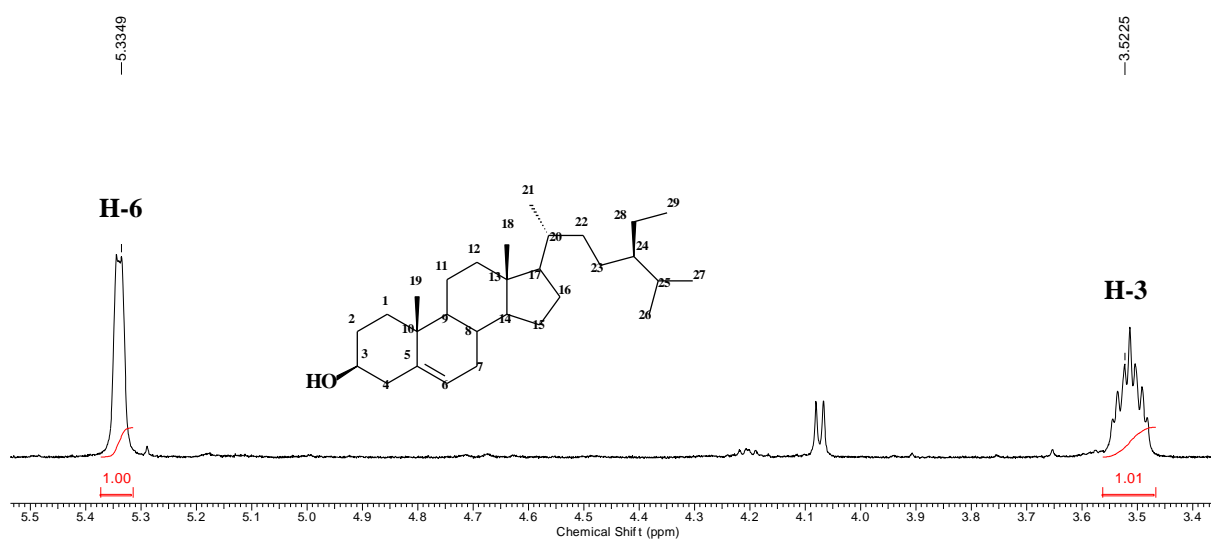


Figura 74. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **9** (3,4 a 5,5 ppm).

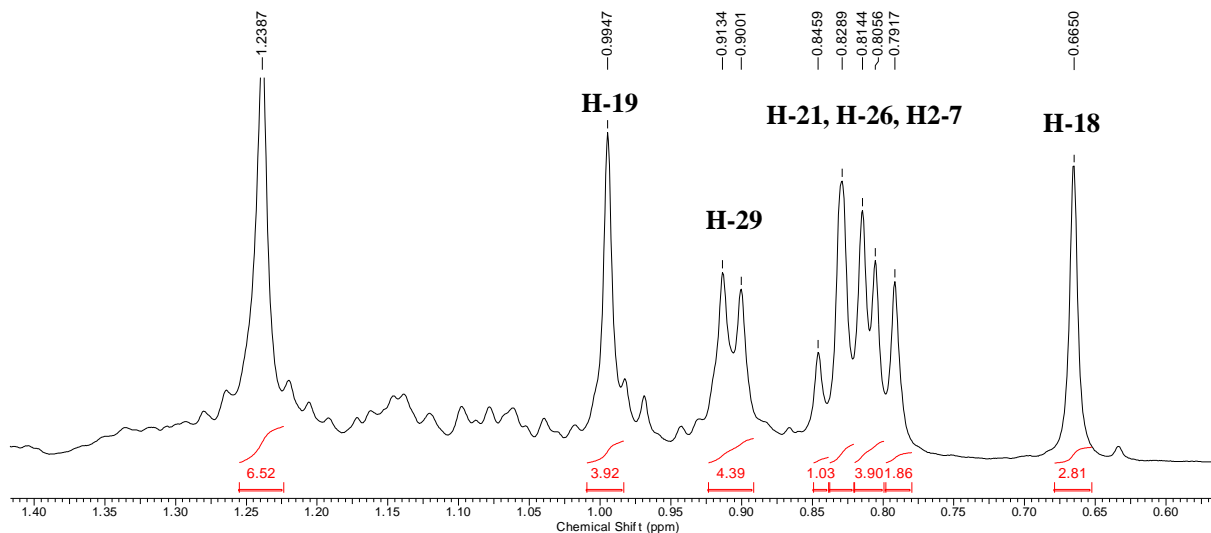


Figura 75. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **9** (0,60 a 1,40 ppm).

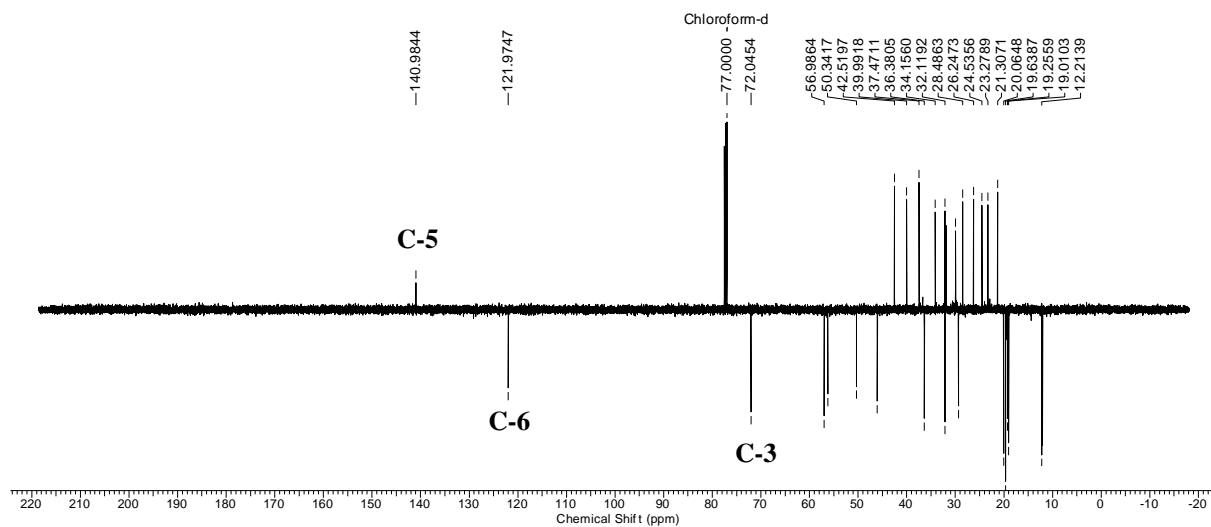


Figura 76. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **9**.

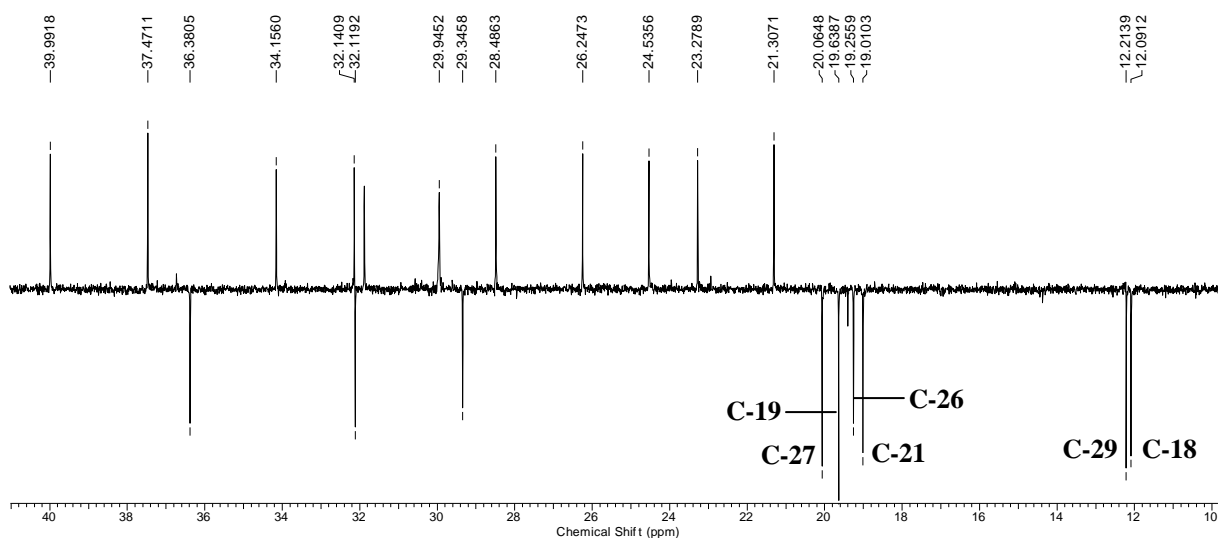


Figura 77. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **9** (10,0 a 40,0 ppm).

5.1.7 Substância 10

O composto **10** apresentou-se como um sólido branco amorfo ($\text{pf} = 284\text{-}285^\circ \text{C}$), solúvel em piridina e foi obtido através do processo cromatográfico da fração EMF-H.

No espectro de RMN ^1H desta substância é possível observar sinais em δ_{H} 5,33 (sl, 1H), típico de hidrogênios olefínicos, atribuído ao H-6 e 5,05 (d, $J = 10 \text{ Hz}$, 1H), atribuído ao hidrogênio anomérico da unidade de açúcar, identificado como glicose. Além dos sinais entre δ_{H} 4,6 e 3,9, típicos da unidade de açúcar, podem ser observados, também, sinais entre 1,0 e 0,6 que correspondem às seis metilas do composto.

As informações mais relevantes extraídas do espectro de DEPTQ estão relacionadas aos sinais em δ_{C} 141,1 (C-5), 122,1 (C-6), 102 (C-1'), carbono anomérico, e sinais entre δ_{C} 79,0 e 63, característicos de carbonos oxigenados presentes na unidade de glicose.

Os dados acima foram comparados com dados disponíveis na literatura e indicaram que a substância em questão se tratava do β -sitoserol glicosilado.

Tabela 15. Dados de RMN ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CD_3OD) de **10**.

	Composto 10		Literatura*	Composto 10
C	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}
1	37,6	37,2		
2	29,6	29,3		
3	78,7	78,5		3,90 (m)
4	39,5	39,1		
5	141,1	140,9		
6	122,1	121,9		5,33 (sl)
7	32,4	31,8		
8	32,2	31,9		
9	50,5	50,2		
10	36,6	36,7		
11	21,5	21,1		
12	40,1	39,8		
13	42,6	42,3		
14	56,4	56,7		
15	24,7	24,3		
16	28,7	28,3		
17	57,0	56,9		
18	12,1	11,7		0,64 (s, 3H)
19	19,4	19,2		0,92 (s, 3H)
20	36,5	36,2		
21	19,2	18,8		0,98 (d, 3H)
22	34,4	34,0		
23	26,5	26,2		
24	46,2	45,8		
25	30,4	30,1		
26	19,4	18,9		0,88 (d, 3H)
27	19,6	19,7		0,86 (d, 3H)
28	23,5	23,2		
29	12,3	11,9		0,84 (d, 3H)
1'	102,8	102,5		
2'	75,5	75,2		
3'	78,2	77,9		
4'	71,9	71,5		
5'	78,7	78,4		
6'	63,0	62,7		

* (Gomes, 2002). Espectro obtido em CDCl_3 .

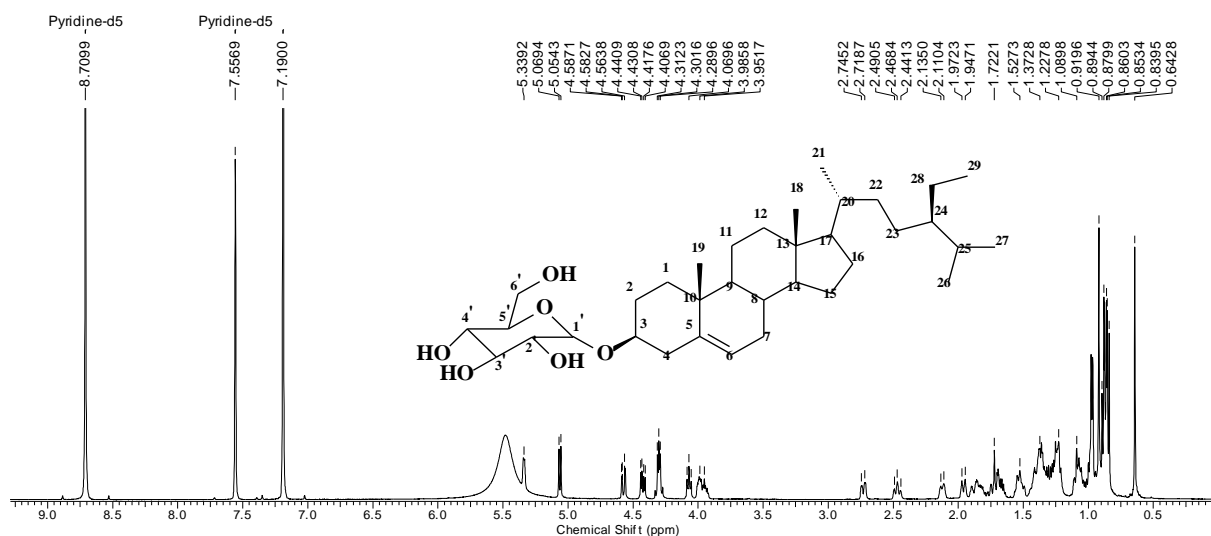


Figura 78. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, Py- d_5) de **10**.

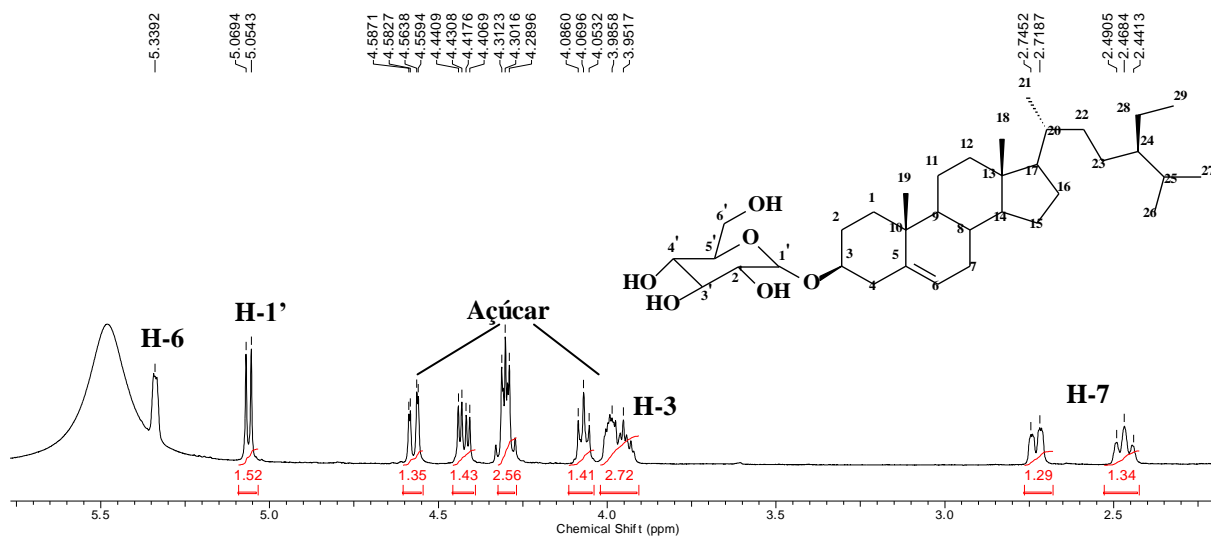


Figura 79. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, Py- d_5) de **10** (2,5 a 5,5 ppm).

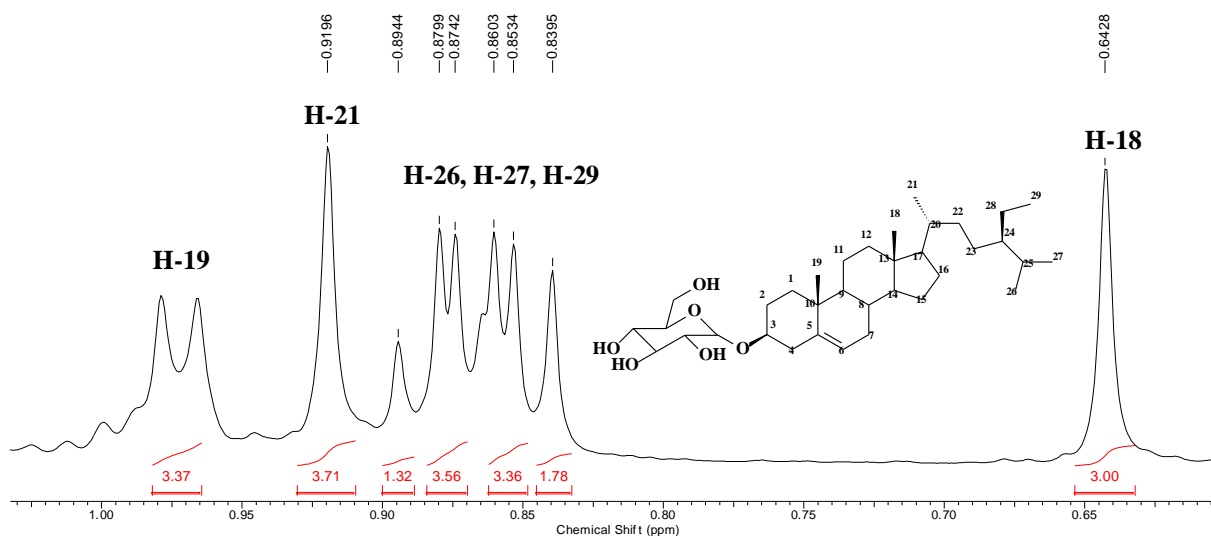


Figura 80. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, Py-d_5) do composto **10** (0,65 a 1,00 ppm).

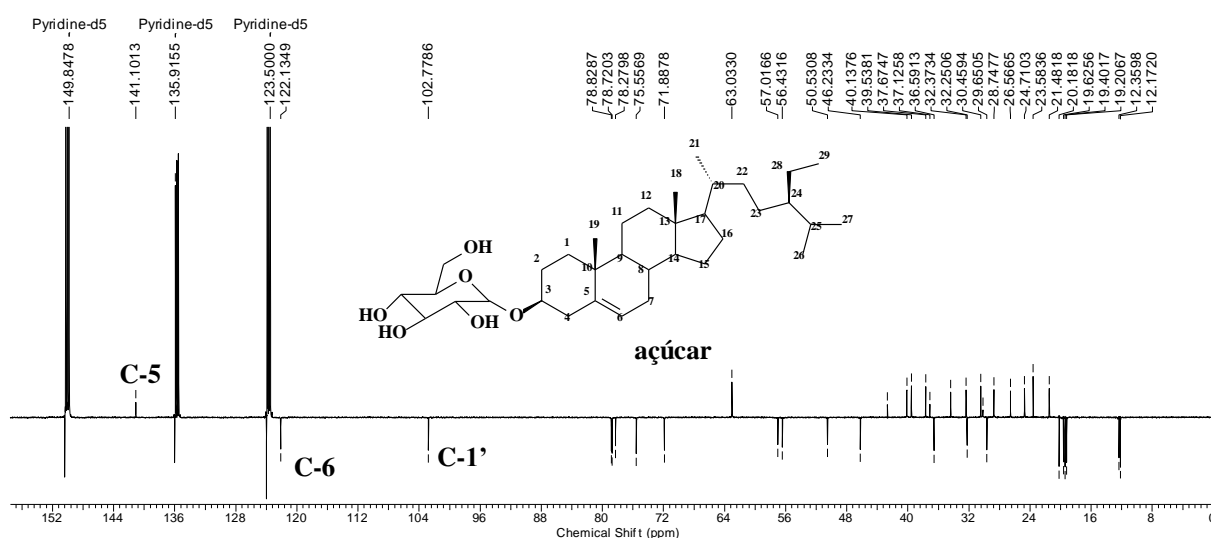


Figura 81. Espectro de DEPTQ (500 MHz, Py-d_5) de **10**.

5.1.8 Substância 11

A substância **11**, sólido de coloração castanho escura, foi obtido de EMF- D_2 e quando analisado por CCDA apresentou uma única mancha, de cor amarelada (vanilina sulfúrica), característica de flavonoides.

No espectro de RMN ^1H (**Figura 82**) observam-se sinais na região entre δ_{H} 8,0 e 6,0 que são característicos de hidrogênios de sistemas aromáticos. Os sinais em δ_{H} 7,75 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H) e 6,92 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H) caracterizam um sistema para substituído no anel B, como é o caso de flavonoides derivados do canferol. Este espectro revela também a presença de

sinais em δ_H 6,18 (sl, 1H) e 6,36 (sl, 1H) que foram atribuídos aos hidrogênios 6 e 8, respectivamente. A região entre δ_H 5,4 e 3,4 e características de hidrogênios presentes em unidades de açúcar e o sinal em 5,37 foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico da raminose.

Com a análise do espectro de DEPTQ dessa amostra foi possível constatar a presença de carbonila conjugada, que absorve em torno de 178,2 ppm, além confirmar o padrão de substituição do anel: sinais em 127,4 e 113,6, com intensidade de 2C cada (sistema AA'BB'). Os sinais característicos do açúcar foram observados em 102,1 e na região entre 72,0 e 70,0 ppm, cujos deslocamentos estão em acordo com os esperados para a raminose (BELTRAME, *et al.*, 2001).

As informações mencionadas acima, juntamente com comparação dos dados da literatura (BELTRAME, *et al.*, 2001) permitiram identificar a substância **11** como o flavonoide derivado do canferol, conhecido como canferol 3-O- β D-raminosídeo, cujos dados de RMN de 1H e ^{13}C se encontram na **Tabela 16**.

Tabela 16. Dados de RMN 1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CD₃OD) de **11**.

	Composto 10	Literatura*	Composto 10	Literatura*
C	δ_C	δ_C	δ_H	δ_H
1		-	-	-
2	160,1	159,5	-	-
3	134,7	136,4	-	-
4	178,2	179,0	-	-
5	164,0	162,2	-	-
6	98,5	99,9	6,18 (sl)	6,19 (d, $J = 2,1$ Hz)
7	164,4	163,5	-	-
8	93,4	94,8	6,36 (sl)	6,37 (d, $J = 2,1$ Hz)
9	157,9	158,8	-	-
10	104,5	106,0	-	-
1'	121,6	122,8	-	-
2'	127,4	129,0	7,75 (d, $J = 8,4$ Hz)	7,76 (d, $J = 9,0$ Hz)
3'	113,7	115,4	6,92 (d, $J = 8,4$ Hz)	6,93 (d, $J = 9,0$ Hz)
4'	161,7	161,8	-	-
5'	113,7	115,4	6,92 (d, $J = 8,4$ Hz)	6,93 (d, $J = 9,0$ Hz)
6'	127,4	129,0	7,75 (d, $J = 8,4$ Hz)	7,76 (d, $J = 9,0$ Hz)
1''	104,5	103,6	5,36 (sl)	5,36 (d, $J = 1,8$ Hz)
2''	70,5	72,1	4,20 (sl)	4,20 (dd, $J_1 = 1,8$ Hz, $J_2 = 3,3$ Hz)
3''	70,6	72,2	3,68 (m)	3,69 (m)
4''	71,7	73,2	3,41 (m)	3,36 (m)

5''	70,7	71,9	3,41 (m)	3,36 (m)
6''	16,6	17,3	0,90 (d, J = 4,2 Hz)	0,91 (d, J = 5,7 Hz)

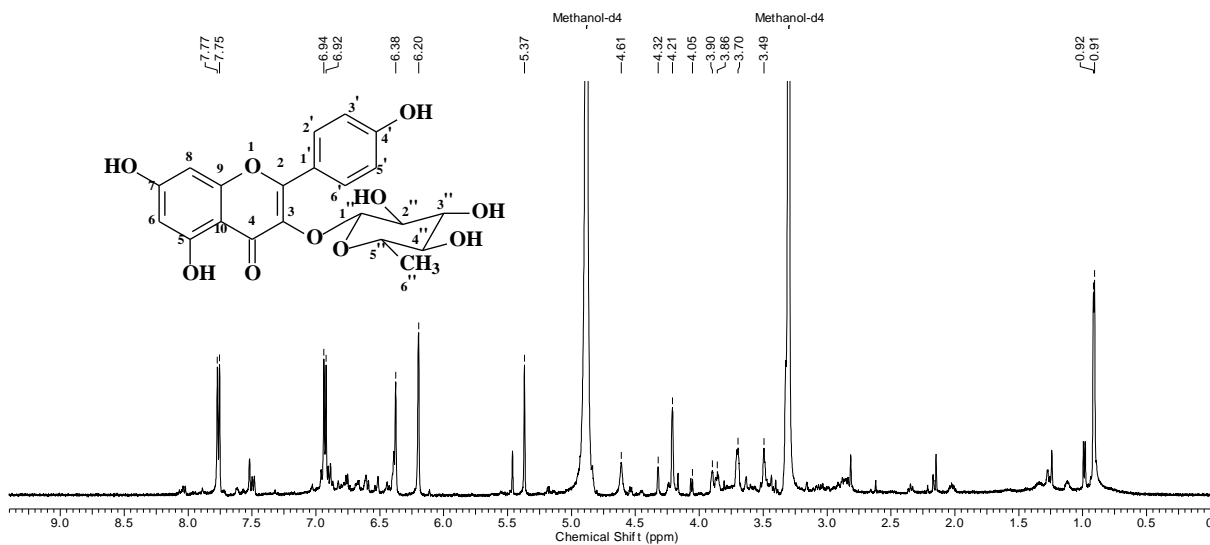


Figura 82. Espectro de RMN ^1H (500MHz, Metanol- CD_3OD) de **11**.

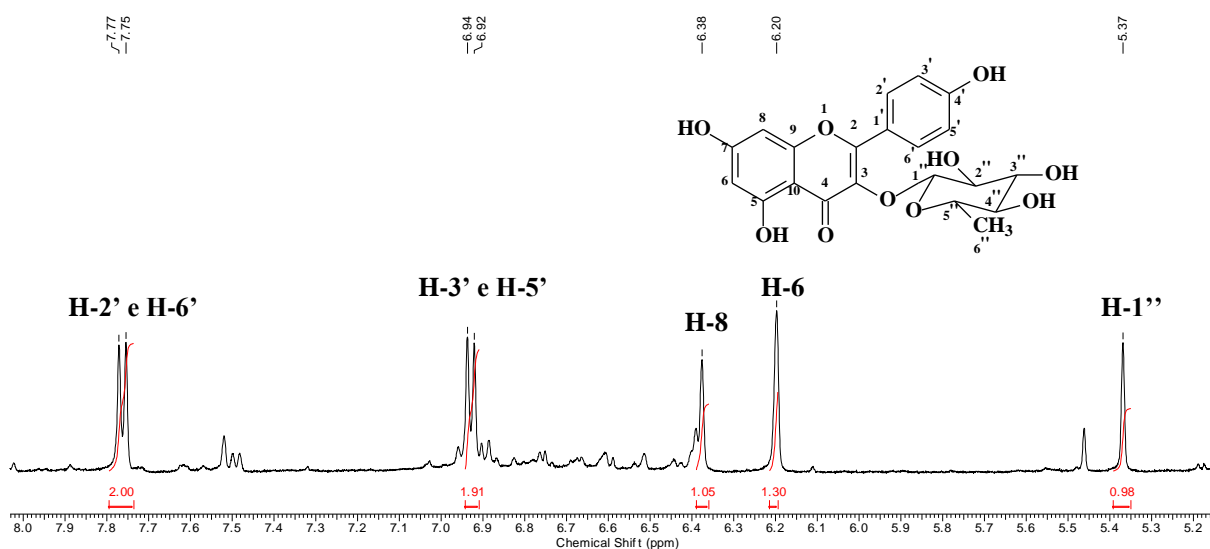


Figura 83. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **11** (5,2 a 8,0 ppm).

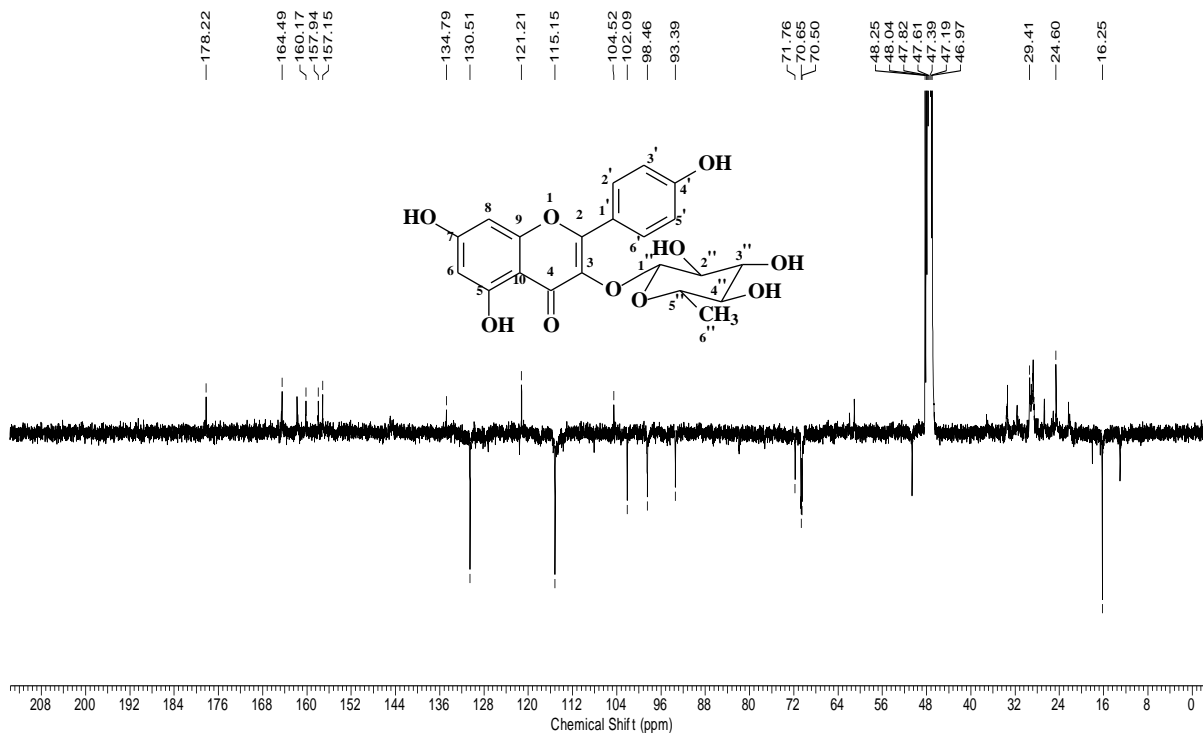


Figura 84. Espectro de DEPTQ (500 MHz, CD₃OD) de **11**.

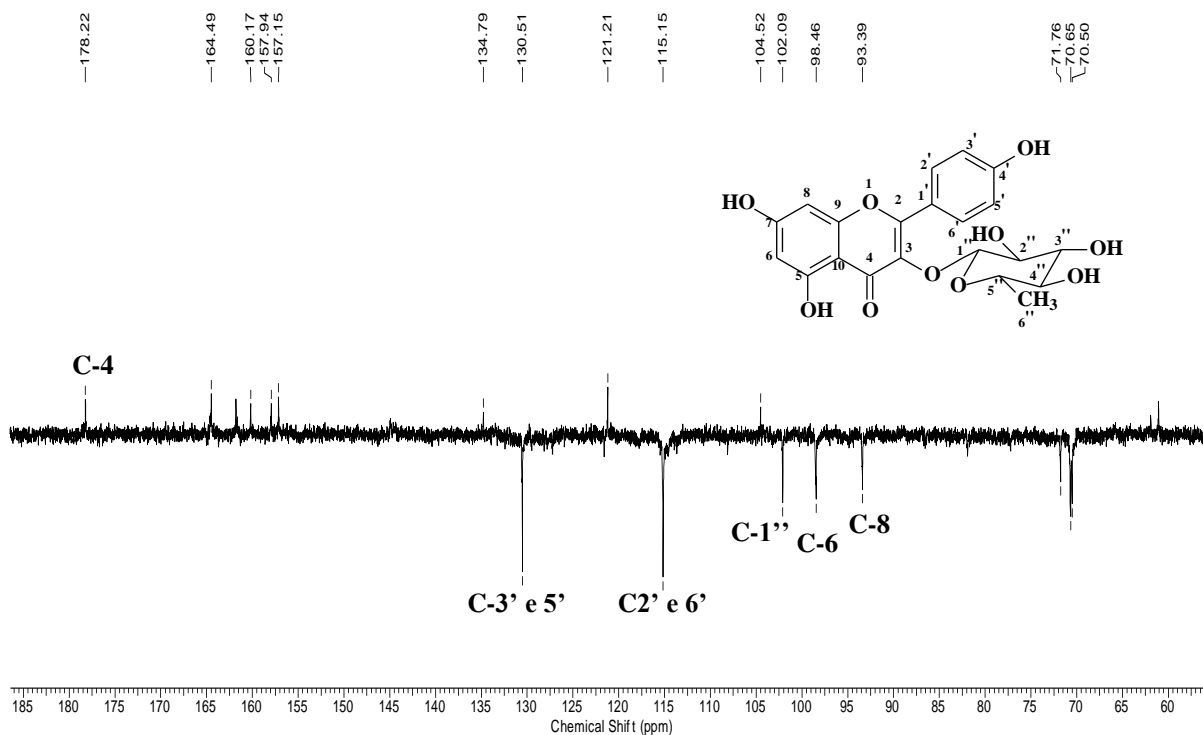


Figura 85. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CD₃OD) de **11** (60,0 a 185,0 ppm).

5.1.9 Substância 12

A substância **12**, sólido castanho escuro, foi obtido de EMF-D₂. A análise em CCDA deste composto, utilizando-se como eluente CHCl₃:MeOH (10%), apresentou uma única mancha de coloração amarelada, quando revelada com vanilina sulfúrica. Esta coloração é característica de flavonóis.

O espectro de RMN ¹H (**Figura 86**) revelou sinais entre δ_H 7,50 e 6,00 que são típicos de sistemas aromáticos. Os sinais em δ_H 7,40 (sl), 7,37 (d, $J = 8,4$) e 6,68 (d, $J = 8,4$) são compatíveis com anel B trissubstituídos de flavonoides, como é o caso de flavonoides derivados da quercetina. Os sinais em δ_H 6,27 (sl) e 6,08 (sl) foram atribuídos aos hidrogênios 6 e 8, respectivamente. Os sinais entre δ_H 5,50 e 3,20 permitem sugerir a presença de açúcar na molécula, cujo hidrogênio ligado ao carbono anomérico absorve em 5,35 ppm, o qual, segundo LIU *et al.*, (2008) pode indicar a presença de arabinose. Esta proposta foi confirmada com base no número de CH e do CH-2 identificados no espectros de DEPTQ de **12**.

No espectro de DEPTQ da amostra foram contabilizados 21 sinais, o que reforça a hipótese de flavonoide glicosilado. Estes sinais apresentaram deslocamentos químicos em δ_C 179,9 (C4), 158,6 (C2), 134,8 (C3), 123,0 (C6'), 116,7 (C5'), 116,4 (C2'), 109,4 (1''), além dos demais sinais do açúcar (88,0 a 62,0 ppm) que foram comparados com dados da literatura, **Tabela 17**, a seguir.

Os dados espectroscópicos observados e comparação com literatura (LIU, *et al.*, 2008) permitiram identificar o composto **12** como o flavonoide querceina-3-O- α -L-arabinosideo.

Tabela 17. Dados de RMN ¹H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CD₃OD) de **12**.

	Composto 10	Literatura*	Composto 10	Literatura*
C	δ_C	δ_C	δ_H	δ_H
2	158,3	156,4	-	-
3	133,4	133,4	-	-
4	179,9	177,7	-	-
5	163,1	161,2	-	-
6	99,9	98,7	6,10 (sl)	6,20 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)
7	164,9	164,2	-	-
8	94,8	93,6	6,27 (sl)	6,40 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H)
9	158,6	157,0	-	-
10	104,1	104,0	-	-
1'	122,9	121,0	-	-
2'	116,4	115,5	7,40 (sl)	7,58 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H)

3'	146,4	145,1	-	-
4'	149,8	148,5	-	-
5'	116,7	116,4	6,78 (d, J = 8,4 Hz)	6,84 (d, J = 8,5 Hz, 1H)
6'	123,0	121,7	7,38 (d, J = 8,4 Hz)	7,53 (dd, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz)
1''	109,4	107,8	5,35 (sl)	5,59 (d, J = 1,5 Hz)
2''	83,3	82,1		
3''	78,6	76,9		
4''	87,9	85,8		
5''	62,5	60,6		

*(LIU *et al.*, 2008). Espectro obtido em DMSO-d₆.

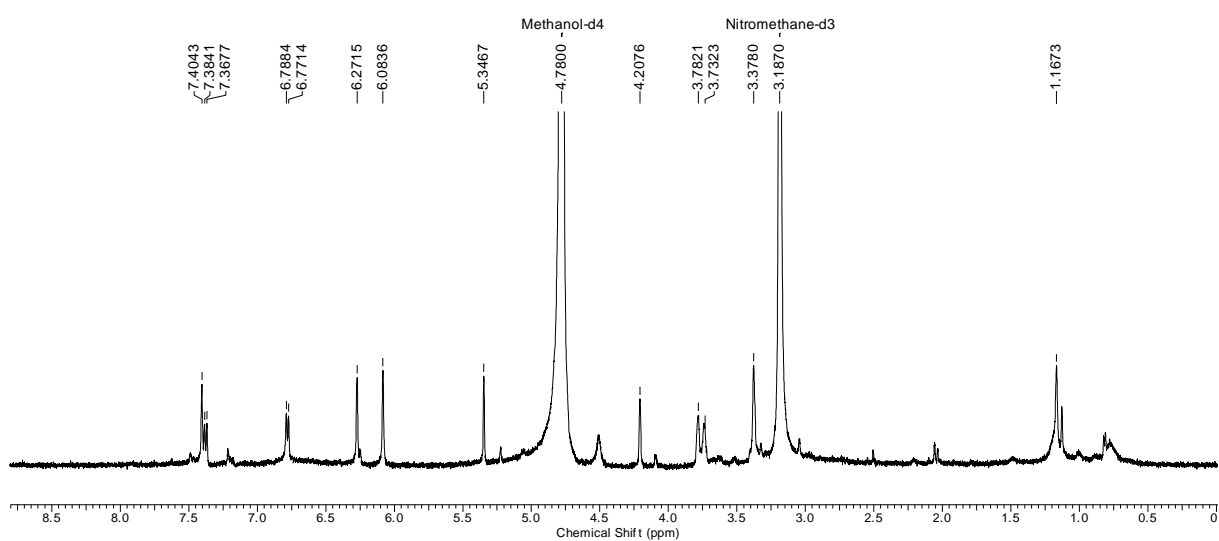


Figura 86. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) de 12.

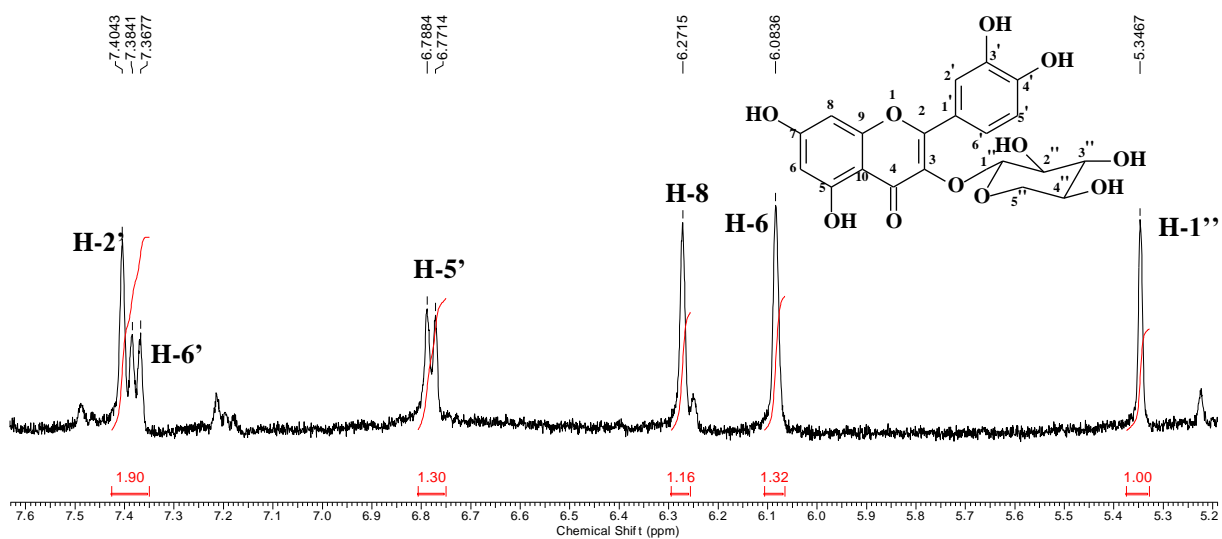


Figura 87. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) de 12 (5,2 a 7,8 ppm).

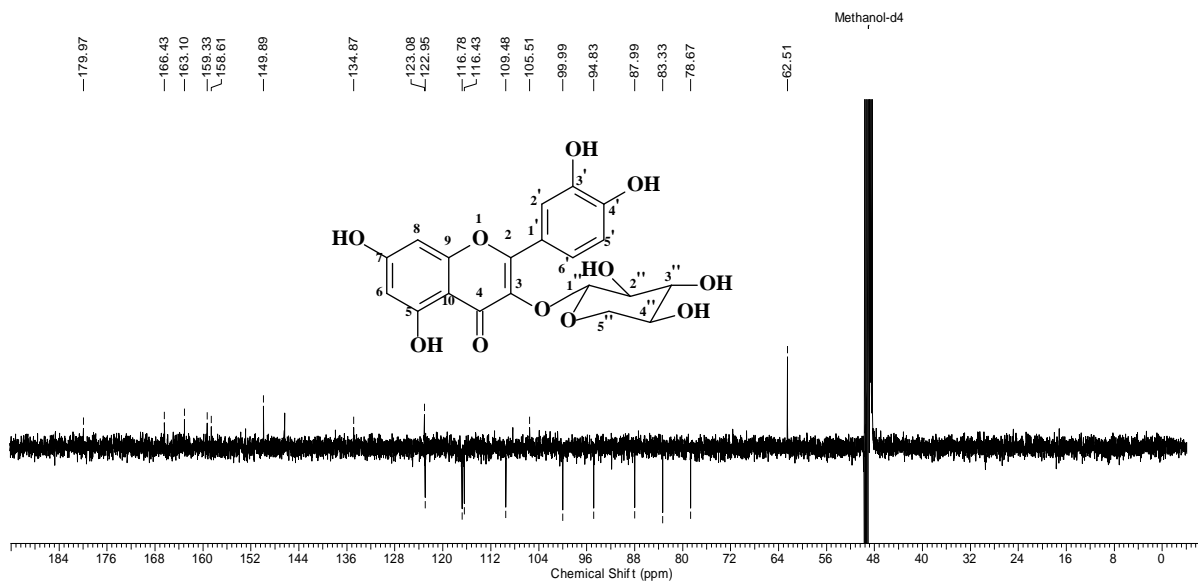


Figura 88. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CD₃OD) de **12**.

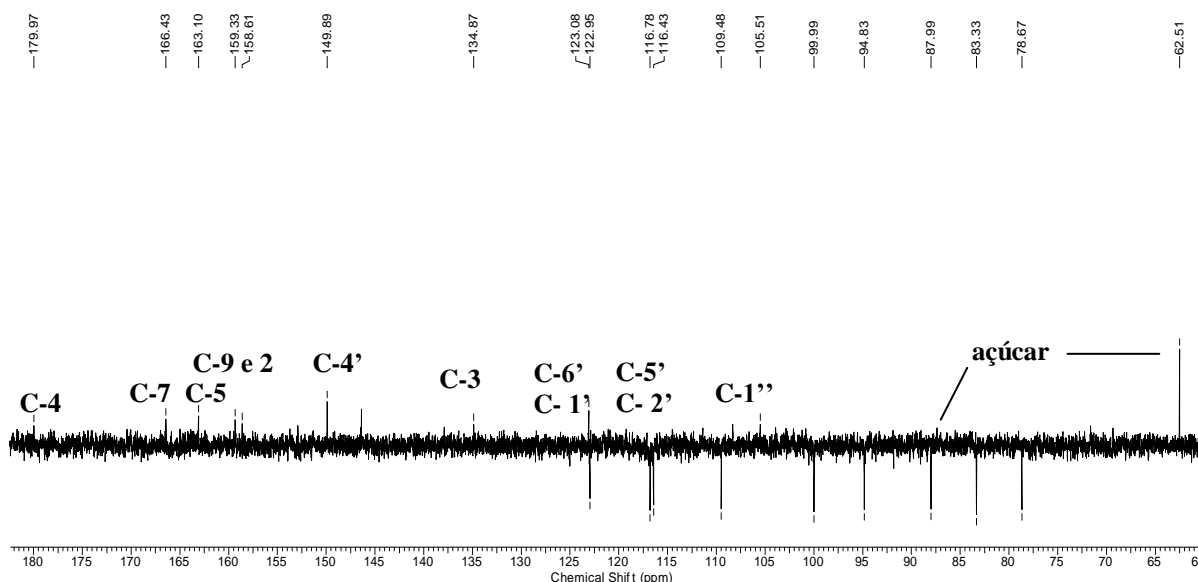


Figura 89. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CD₃OD) de **12** (60 a 180 ppm).

5.1.10 Substância 13

A substância **13** (4,7 mg), sólido de coloração castanho escura, foi obtido como resultado de diversas etapas cromatográficas realizadas na purificação da fração EMF-D₃. Esta amostra, juntamente com outras, foi analisada através de CLAE e verificou-se no cromatograma (**Figura 90**) a presença de apenas um pico com tempo de retenção (TR) igual a 14,835 min. Este pico forneceu um espectro de absorção na região do ultravioleta (UV) com máximos de absorção em 255 e 370 nm, típico de flavonoides. Estes perfis de tempo de

retenção (nas condições de operação) e curva UV foram observados, anteriormente, para a quercetina. Então, ejetou-se um padrão de quercetina nas mesmas condições operacionais ajustadas para a amostra, observando-se TR (14,900) e curva UV similares aos de **13**. Isto permitiu identificá-lo como o flavonol conhecido como quercetina, que já foi identificado em pelo menos 18 espécies do gênero *Eugenia* (**Tabela 4**, pg 11).

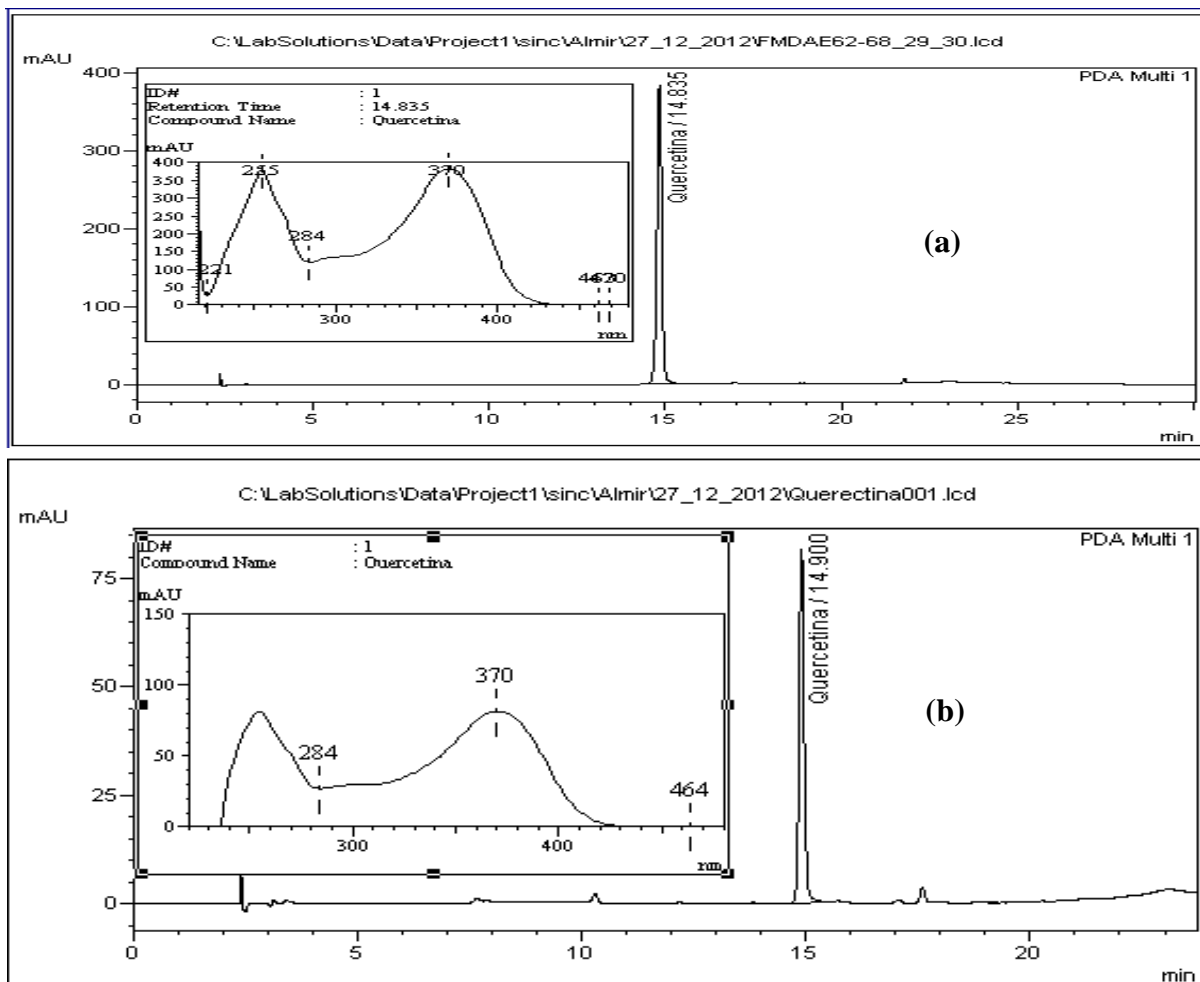


Figura 90. Cromatogramas e curvas UV obtidos com a análise CLAE-UV de **13** (a) e padrão quercetina (b).

5.2 Metabólitos especiais isolados de galhos de *E. copacabanensis*

5.2.1 Substância 14

Um sólido branco (103 mg), com ponto de fusão na faixa de 260-262° C, foi obtido no processo cromatográfico da fração P-EMG. Este foi solúvel em clorofórmio, solvente no qual foram obtidos seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

O espectro de RMN de ^1H da fração contendo a substância **14** (**Figura 91**) mostra oito sinais característicos de metilas de esqueleto terpênico em δ 0,75 (s), 0,90 (s), 0,91 (d), 0,98 (s), 1,02 (s), 1,03 (s) 1,07 (s) e 1,20 (s). É possível observar, também, sinais de δ 1,95, a 2,37 ppm, correspondentes a hidrogênios em posição alfa a carbonila (H-2).

O espectro de DEPTQ (**Figura 93**) dessa substância apresentou oito sinais em δ 6,83, 14,66, 17,95, 18,66, 20,26, 31,79, 32,09, 35,03 que são atribuídos às 8 metilas presentes na molécula, e um sinal em δ 213,22, característico de carbonila de cetona (C3). Esse conjunto de informações aliado a comparação com dados da literatura (**Tabela 18**) possibilitou identificar a substância **14** como o triterpeno conhecido como friedelina (ALMEIDA *et al.*; 2011).

Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CDCl_3) de **14**.

Composto 14		Literatura*	Composto 14		Literatura*
C	DEPTQ	δC	δH	δH	δH
1	22,3	22,3			
2	41,5	41,5	2,33 (ddd; $J_1 = 13,8$ Hz, $J_2 = 5,0$ Hz, $J_3 = 1,9$ Hz, 1H)	2,39 (ddd; $J_1 = 13,7$, $J_2 = 5,1$, $J_3 = 1,9$ Hz, 1H)	
3	213,2	213,2			
4	58,2	58,2	2,26 (q; $J = 6,0$ Hz, 1H)	2,24 (q; $J = 6,5$ Hz, 1H)	
5	42,1	42,1			
6	41,3	41,3			
7	18,2	18,2			
8	53,1	53,3			
9	37,4	37,5			
10	59,5	59,5			
11	35,6	35,6			
12	30,5	30,5			
13	39,7	39,7			
14	38,3	38,3			
15	32,4	32,8			
16	36,0	36,0			
17	30,0	30,0			
18	42,8	42,8			
19	35,6	35,4			
20	28,1	28,2			

21	32,8	32,4		
22	39,2	39,3		
23	6,8	6,8	0,89 (d $J = 6$ Hz, 3H)	0,87 ($J = 6,5$, 3H)
24	14,7	14,7	0,74 (s, 3H)	0,73 (s, 3H)
25	17,9	17,9	0,89 (s, 3H)	0,88 (s, 3H)
26	20,2	20,3	1,03 (s, 3H)	1,01 (s, 3H)
27	18,7	18,7	1,07 (s, 3H)	1,05 (s, 3H)
28	32,1	32,1	1,20 (s, 3H)	1,18 (s, 3H)
29	31,8	31,8	1,02 (s, 3H)	1,00 (s, 3H)
30	35,0	35,0	0,97 (s, 3H)	0,95 (s, 3H)

* (ALMEIDA *et al.*; 2011). Espectro obtido em $CDCl_3$.

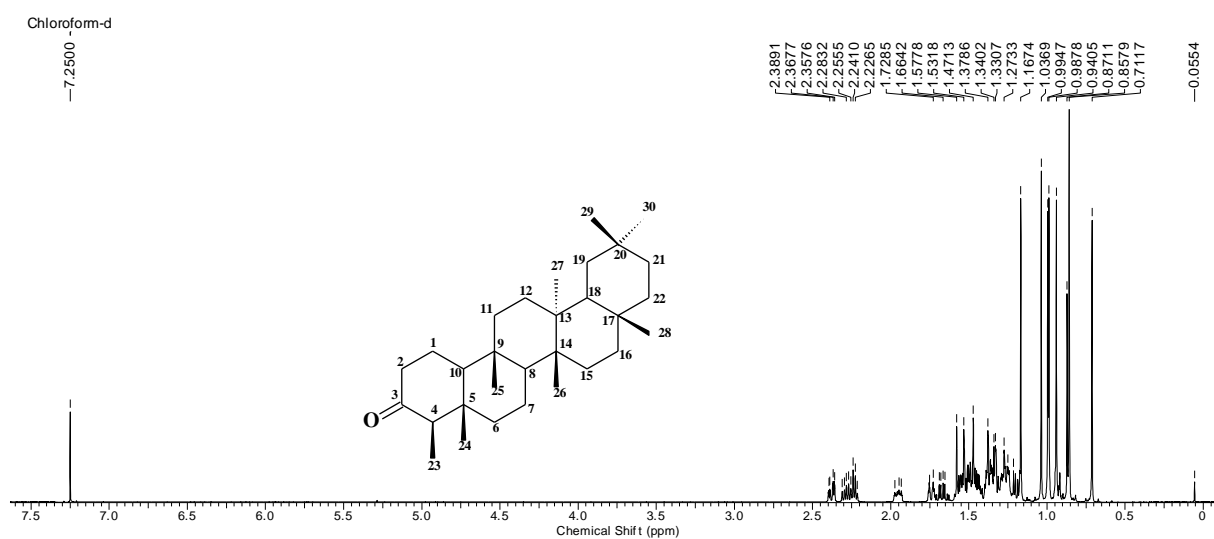


Figura 91. Espectro de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) de **14**.

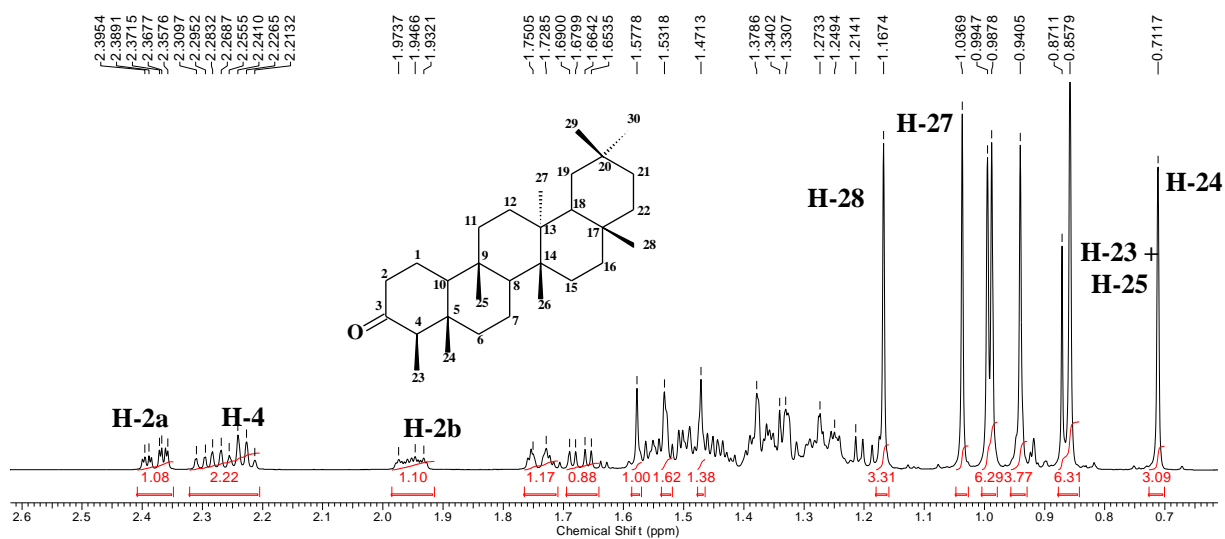


Figura 92. Expansão do espectro de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$) de **14** (0,7 a 2,6 ppm).

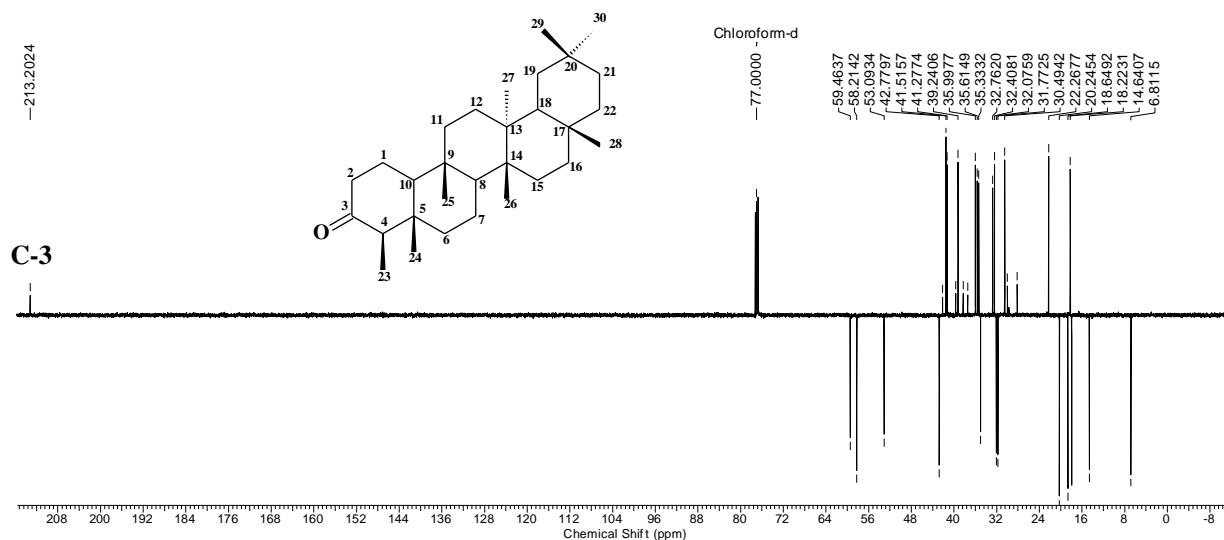


Figura 93. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **14**.

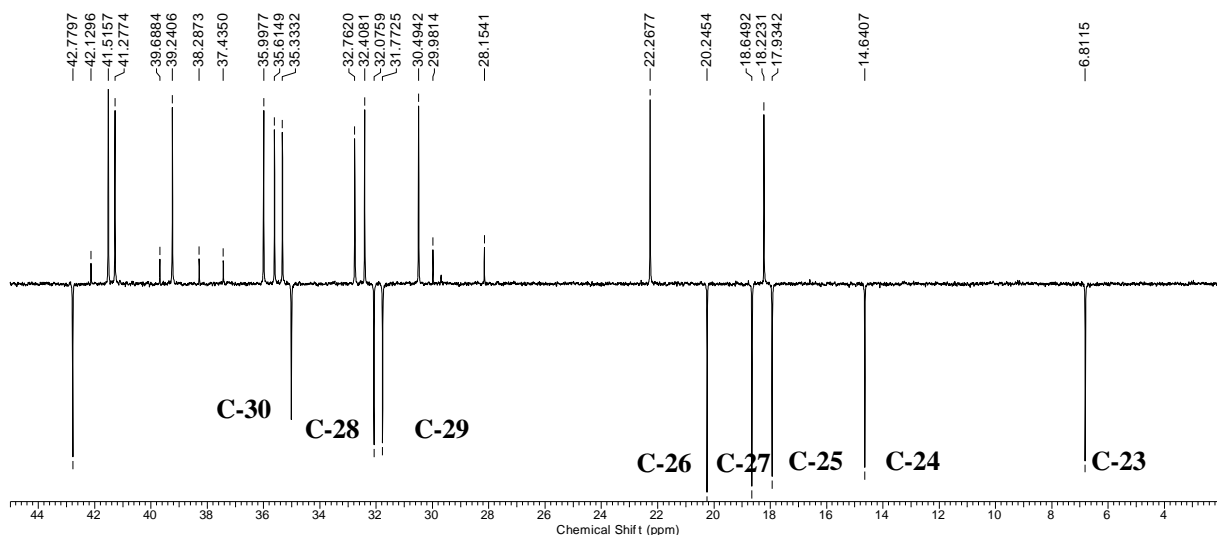


Figura 94. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **14** (4 a 44 ppm).

A **Figura 95** mostra o cromatograma resultante da análise CG-EM, nele é possível observar apenas um pico, com tempo de retenção 39,51 min. Este pico forneceu um espectro de massas (**Figura 96**), onde se puderam observar o íon molecular (m/z 426) e fragmentos (**Esquema 12 4**) de massas compatíveis com a proposta estrutural (VELANDIA, 1997).

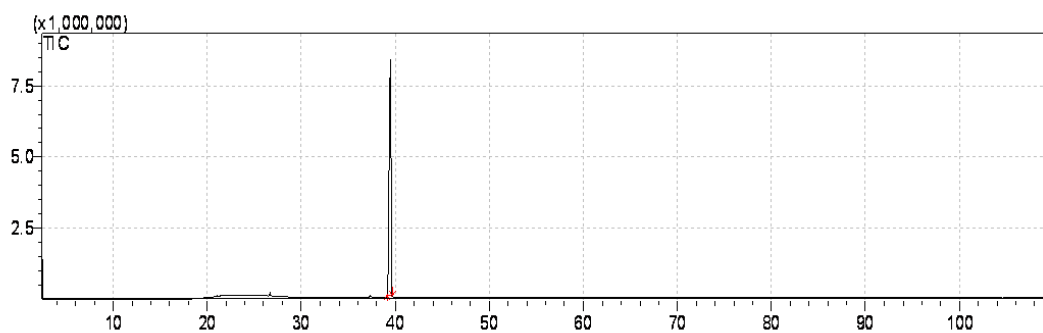


Figura 95. Cromatograma CG de **14**.

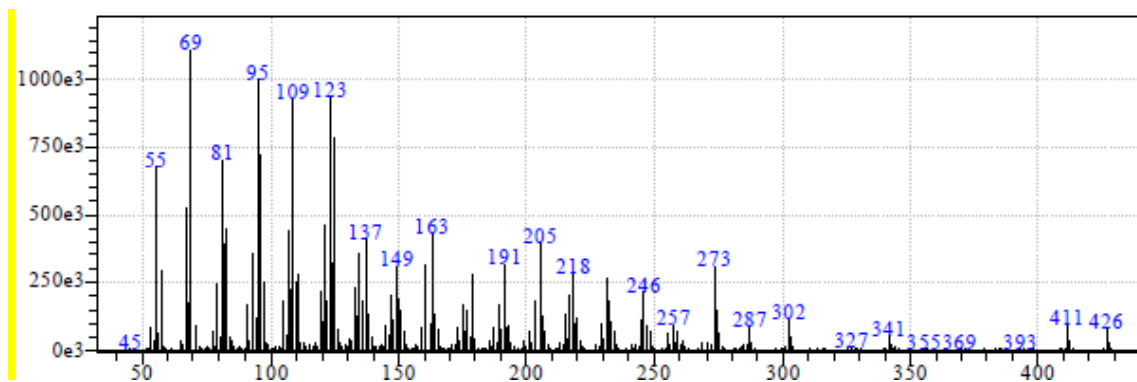
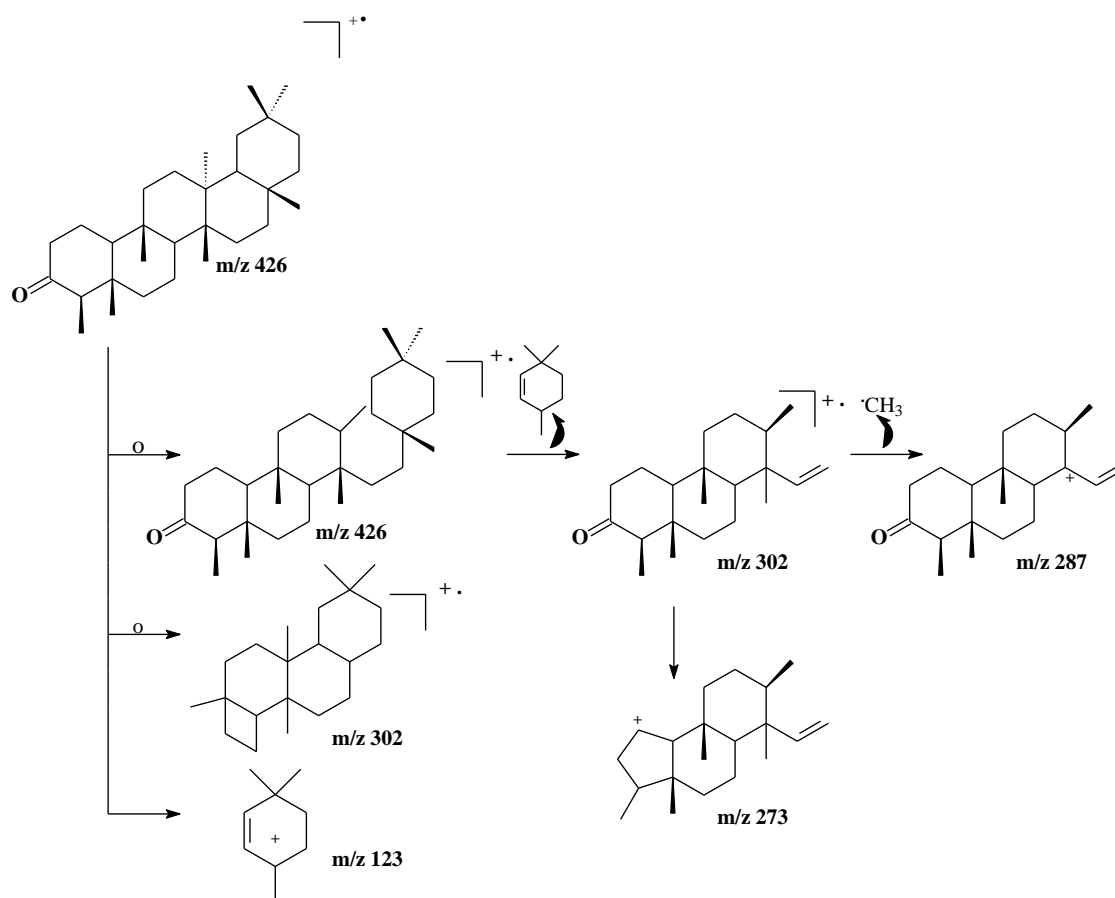


Figura 96. Espectro de massas de **14**.



Esquema 11. Proposta de fragmentação de massas de **14**.

5.2.2 Substância 15

O espectro de RMN ^1H (**Figura 97**) desta substância continha sinais característicos de triterpenos com esqueleto friedelano. O mesmo apresentou sinais em δ 0,82 (s, 3H), 0,87 (s, 3H), 0,93 (s, 3H), 0,97 (s, 3H), 0,98 (s, 3H), 0,99 (s, 3H), 1,16 (s, 3H) e 1,19 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H), atribuídos às metilas presentes na molécula. O sinal em δ 1,9 ppm (dd $J_1 = 7,5$, J_2 , 14,8, Hz, 1H) foi atribuído ao H-1a, assim como os em 2,50 (t, $J = 14,5$ Hz, 1H) e 2,60 (dd, $J_1 = 7$ Hz, J_2 , 15,0 Hz, 1H) foram atribuídos aos H-2a e H-2b. O quarteto observado em δ 4,19 ppm ($J = 6,3$ Hz, 1H) foi atribuído ao H-4. No espectro de DEPTQ (**Figura 9**) observaram-se sinais em δ 175,9 ppm, característico de carbonila de lactona, (C-3), em δ 85,2 ppm, comum em casos de metinos oxigenados (C-4). No espectro de ^1H - ^1H COSY foi possível observar os acoplamentos, H-1a-H-1b, H-2a-H-2b e H-4-CH₃-23. Os dados espectroscópicos desta amostra estão em acordo com os descritos por Li *et al.*, 2012 e se encontram resumidos na **Tabela 19**.

No espectro de HMQC (Figura) foi possível observar as correlações entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos, destacando as correlações entre H-1/C-1, H-2/C-2, H-4/C-4, H-8/C-8, H-10/C-10, H-23/C-23, H-25-C-25, H-30-C-30. A **Figura 104** mostra o espectro de COSY ^1H - ^1H onde foi possível observar os principais acoplamentos J_3 , que são informações muito importantes na proposta estrutural do composto, destacando as correlações entre H4-C23, H2a-H2b, H2b-H1a e H1a-H1b.

Tabela 19. Dados de RMN de DEPTQ (500 e 125 MHz, CDCl_3) do composto 15.

Literatura**		Composto 15		Literatura*	HMBC	HMBC	COSY
C	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	^2J	^3J	
1		1,53 (dd, $J = 7,5$ 14,8 Hz); 1,22 (m)	18,6	18,5			2
2	2,57 (m)	2,50 (t, $J = 12,9$ Hz, 1H); 6,65 (dd, $J_1 = 6,95$, J_2 13,9 Hz)	34,3	34,3	C3	C4	1
3		-	175,8	176,0			23
4	4,21 (m)	4,24 (q, $J = 6,45$ Hz, 1H)	84,9	84,8	C3 e C23		
5			40,7	40,8			
6			38,4	38,4			
7			18,0	18,0			
8			52,7	52,1			
9			38,2	38,2			
10		1,15 (dd, $J_1 = 2,5$, J_2 , 12 Hz, 1H)	63,9	64,1		C25	

11		34,3	34,4			
12		30,6	30,1			
13		39,3	39,0			
14	-	38,1	38,2			
15		31,7	31,3			
16		30,6	29,0			
17		35,3	35,1			
18		42,7	39,3			
19		35,4	35,2			
20		28,2	28,0			
21		30,6	31,4			
22		32,7	33,3			
23	1,22 (d J = 6,3 Hz, 3H)	16,2	16,0	C4	C5	3
24		13,4	13,3	C5	C4 e 10	
25		17,9	17,9	C9	C4 e C8	
26		20,0	19,0			
27		18,6	18,9			
28		31,2	68,0			
29		35,0	34,2			
30		32,1	32,7			

* (DHAMARATNE, *et al.*, 1984); ** (PATRA, *et al.*, 1990).

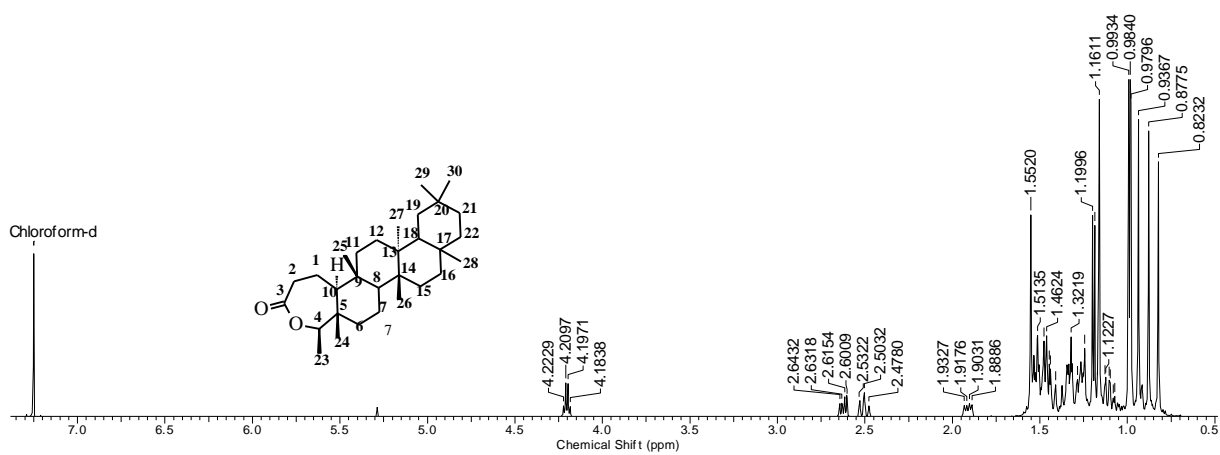


Figura 97. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **15**.

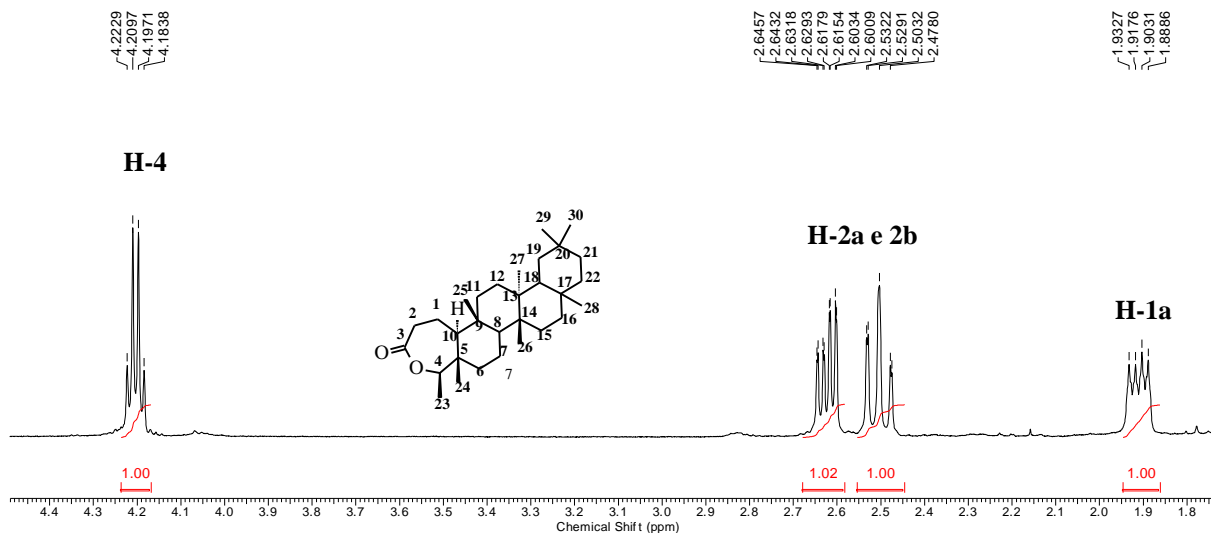


Figura 98. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **15** (1,8 a 4,4 ppm).

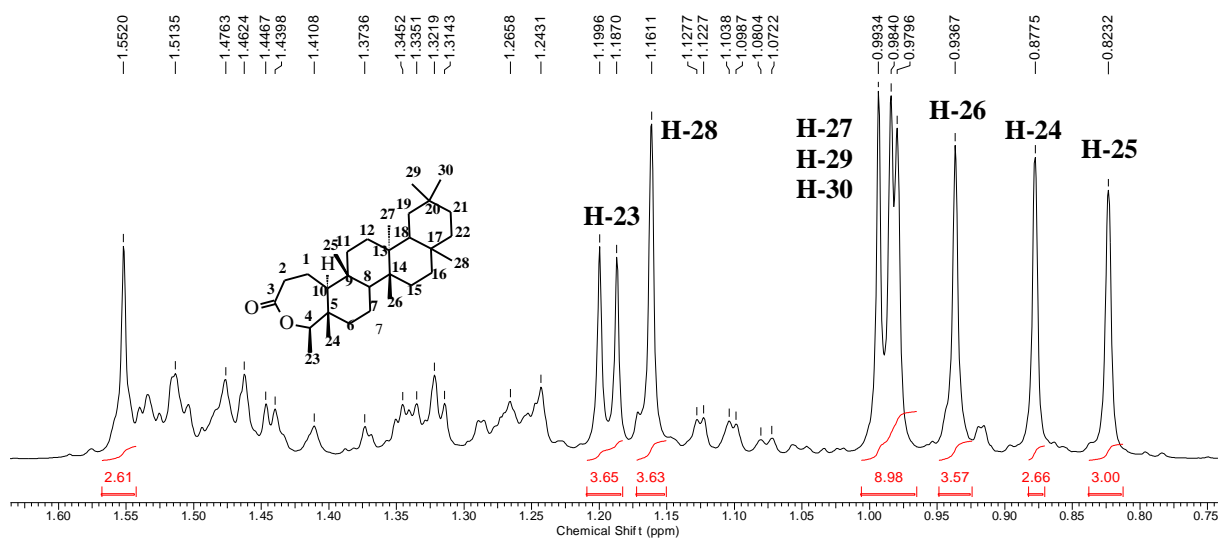


Figura 99. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **15** (0,75 a 1,60 ppm).

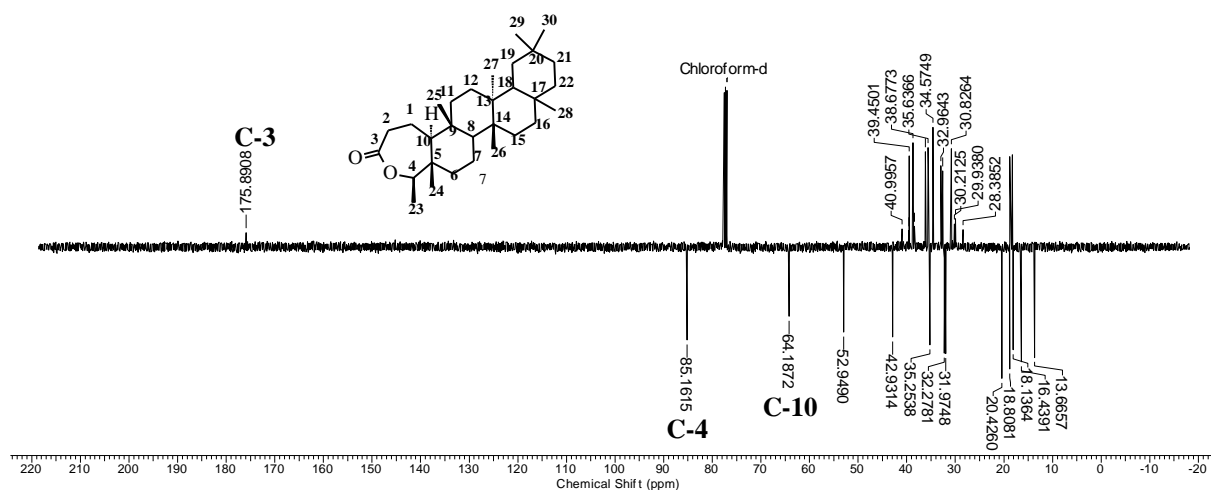


Figura 100. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **15**.

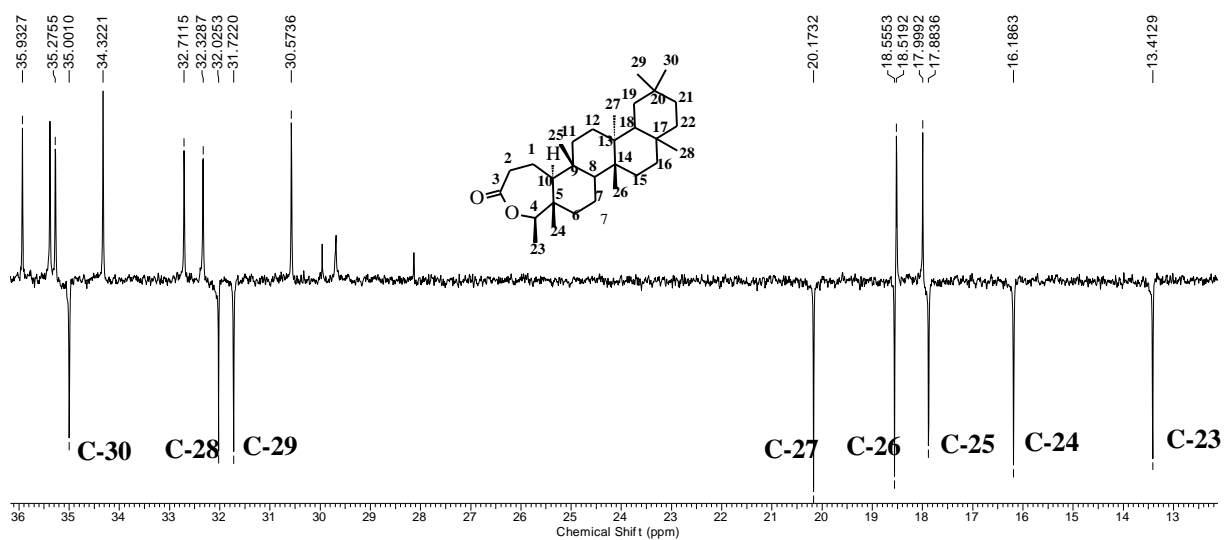


Figura 101. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl₃) de **15** (13 a 36 ppm).

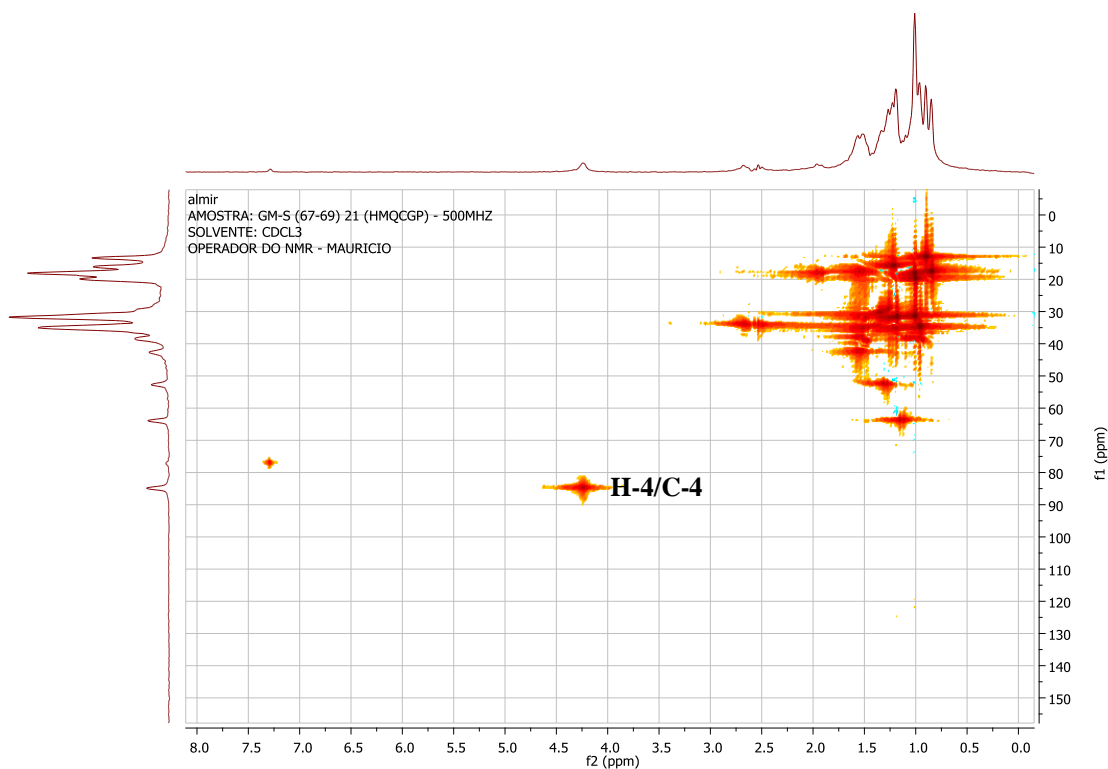


Figura 102. Espectro de HMQC (500 MHz, CDCl₃) de **15**.

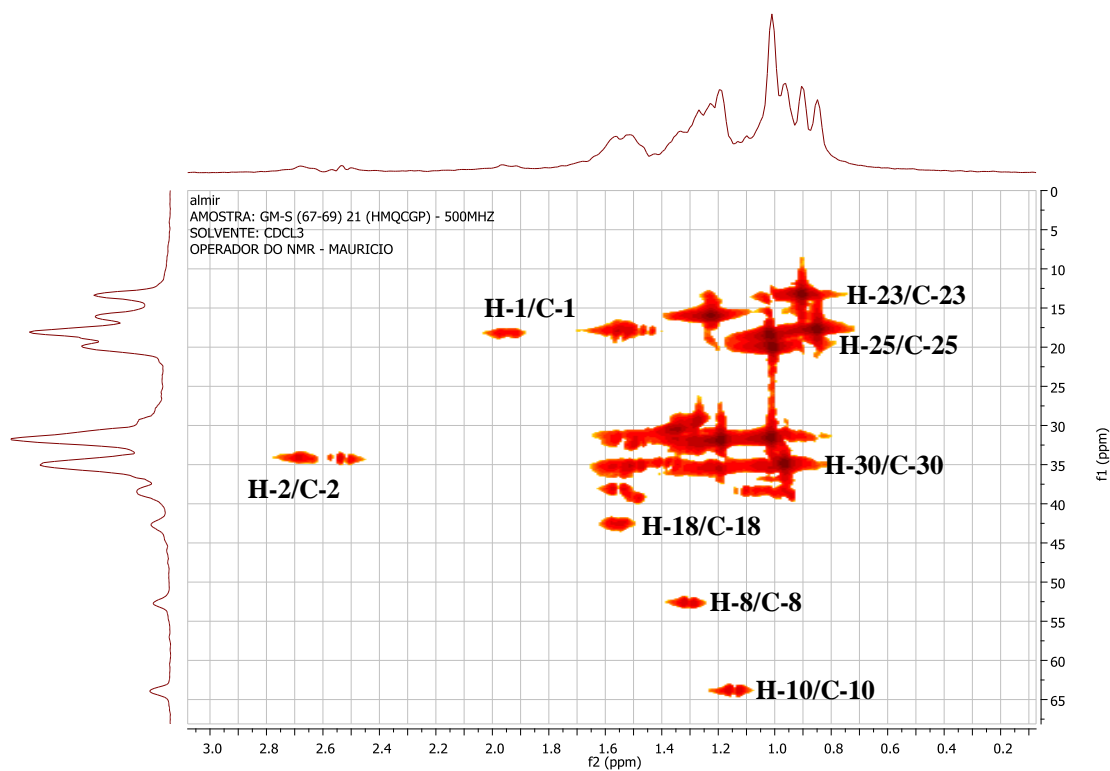


Figura 103. Expansão do espectro de HMQC (500 MHz, CDCl_3) de **15** (0,2 a 3,0 ppm).

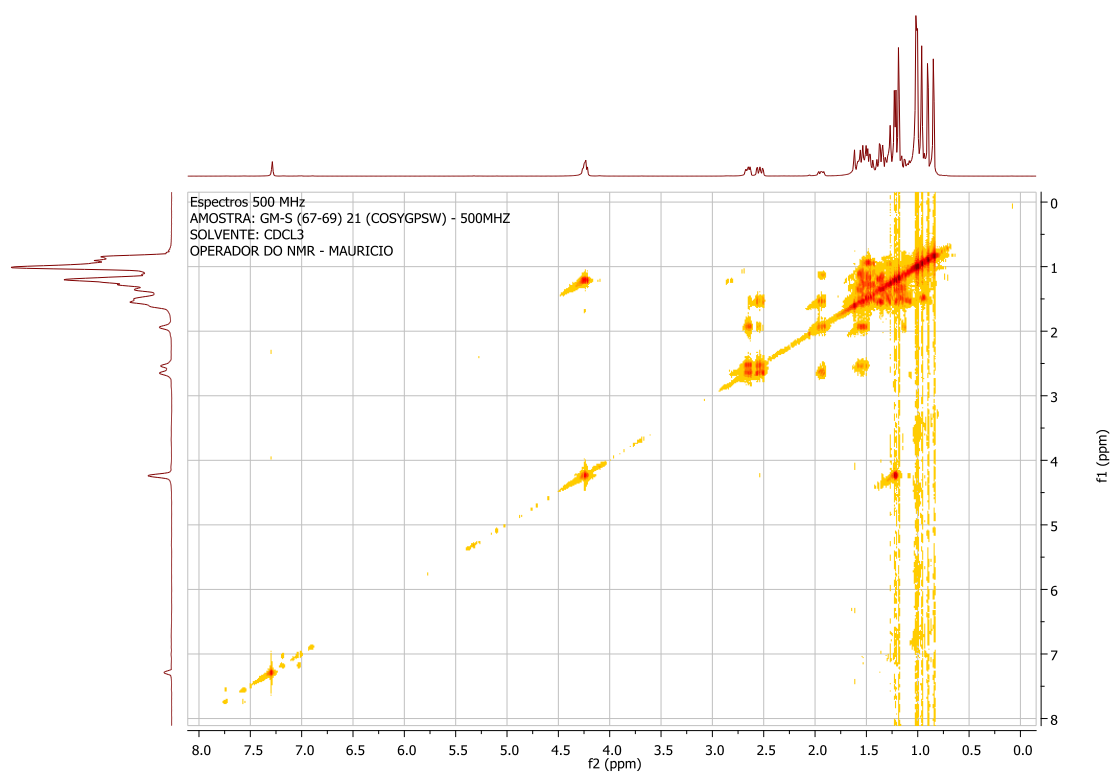


Figura 104. Espectro de ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CDCl_3) de **15**.

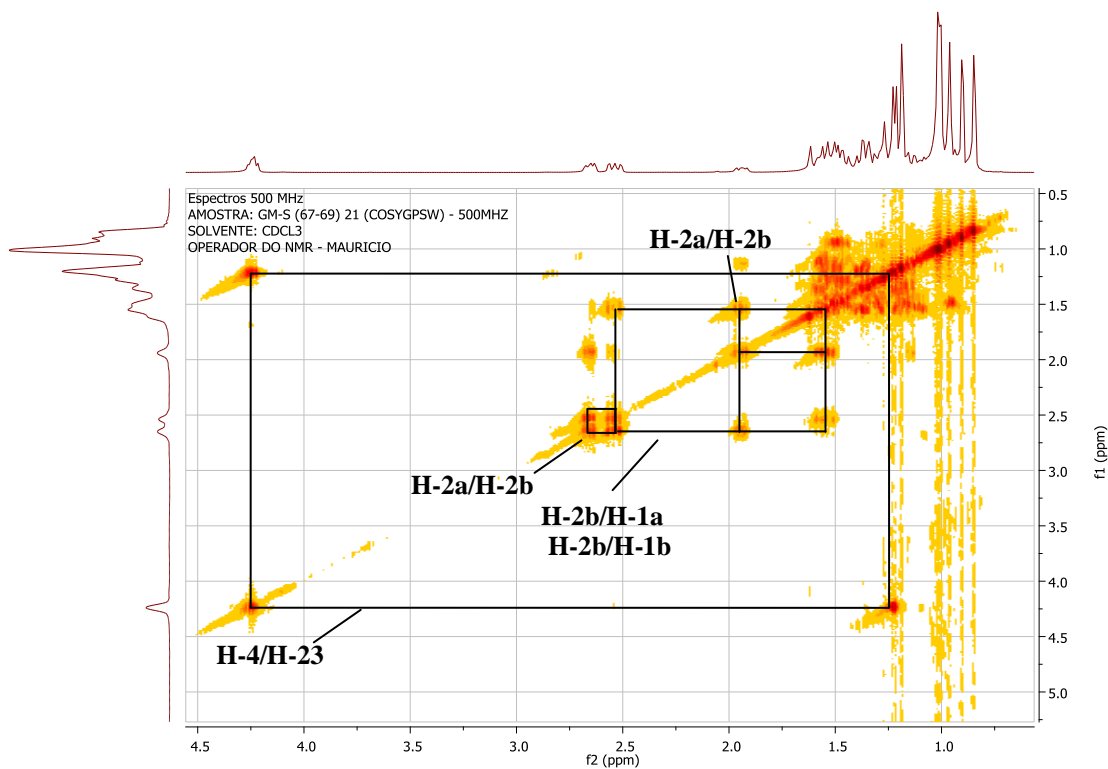


Figura 105. Expansão do espectro de ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CDCl_3) de **15** (1,0 a 4,5 ppm).

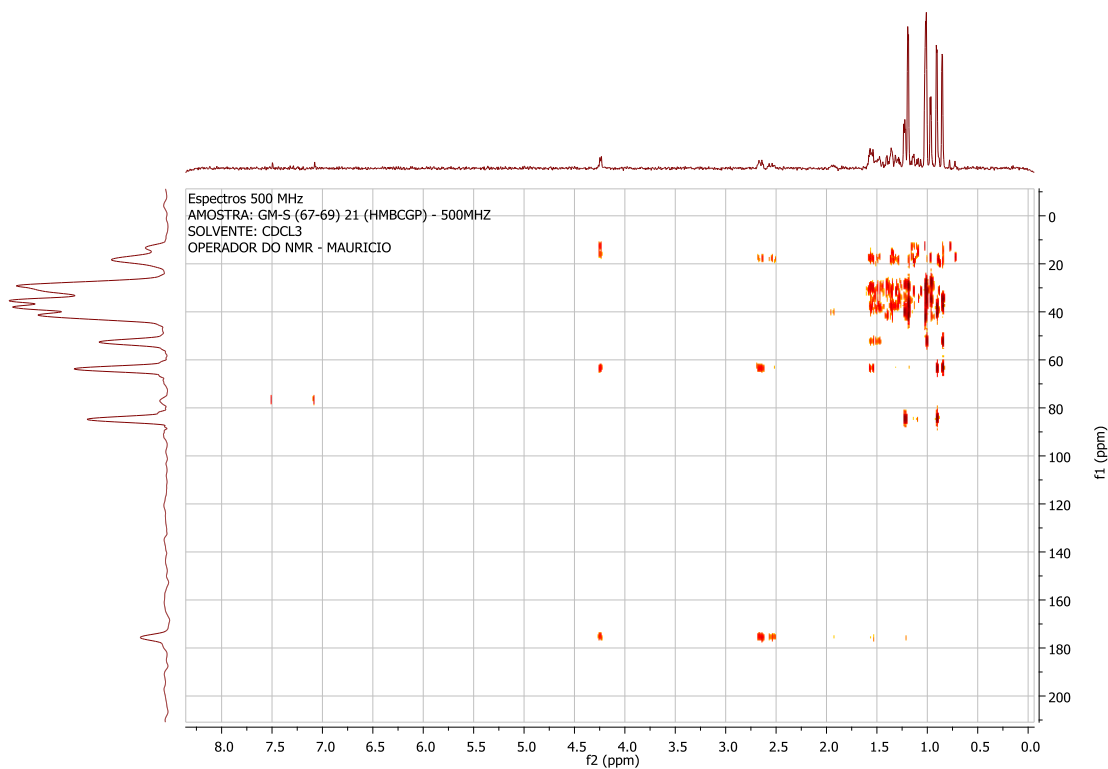


Figura 106. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **15**.

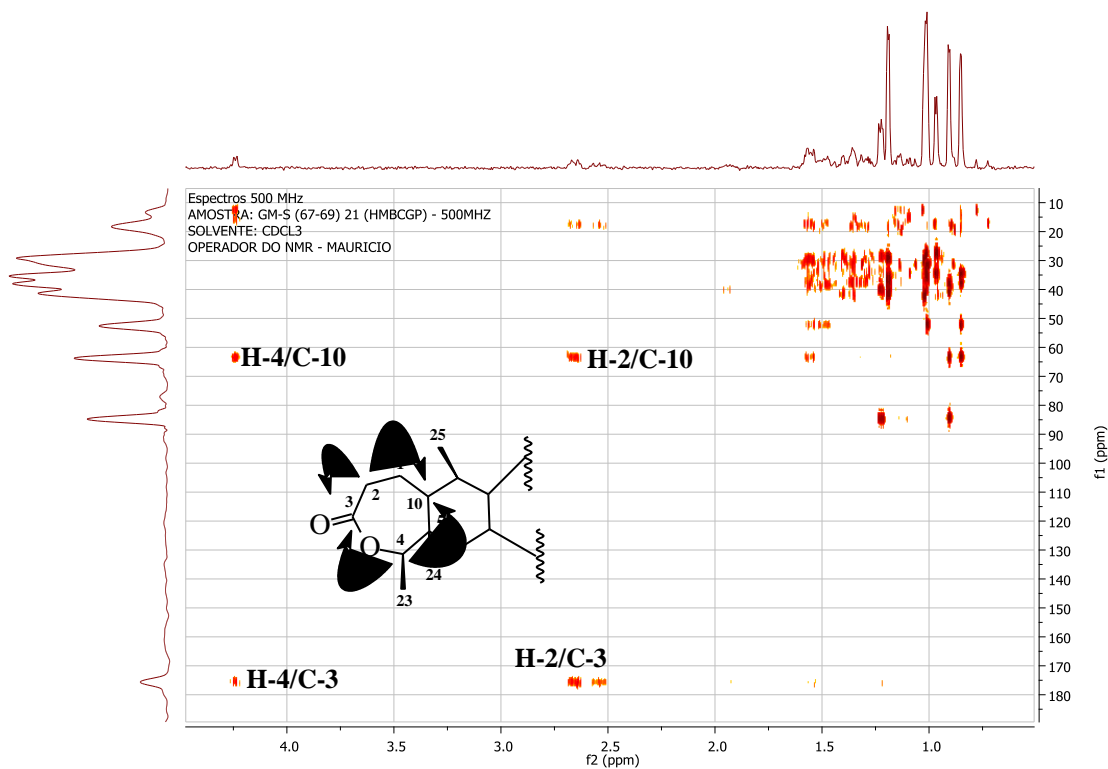


Figura 107. Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **15** (1,0 a 4,0 ppm).

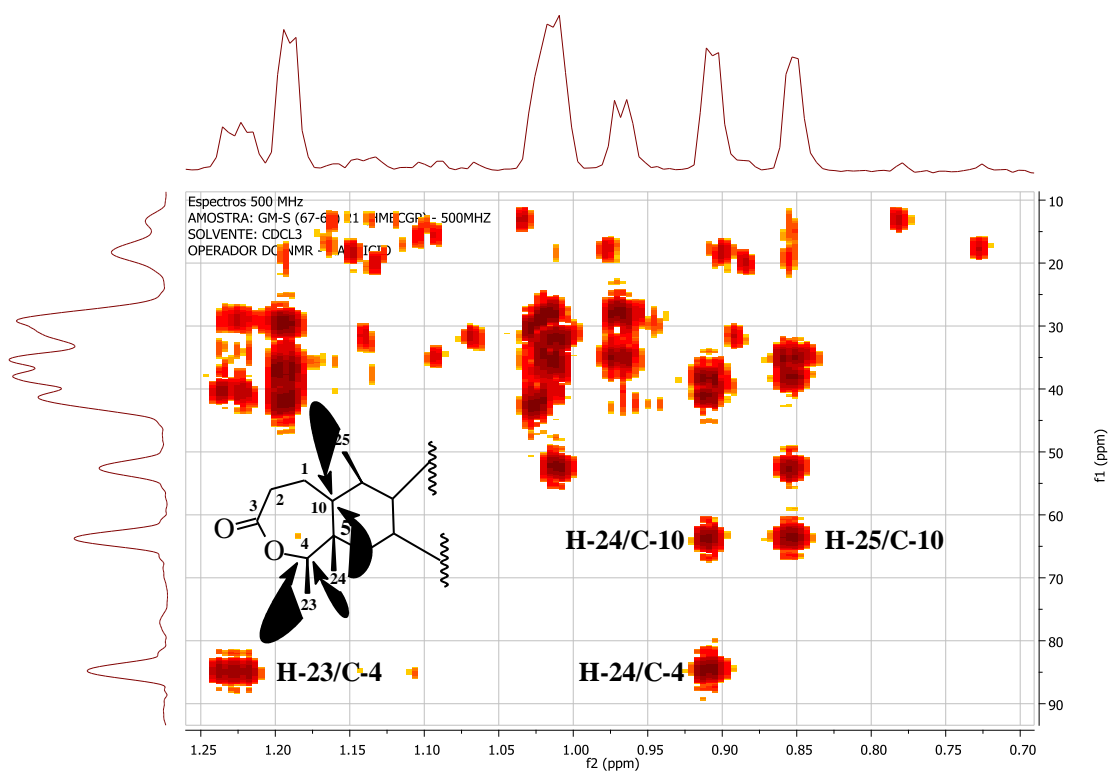


Figura 108. Expansão do Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **15** (0,70 a 1,25 ppm).

5.2.3 Substância 16

No espectro de RMN ^1H (**figura 109**) desta substância, sólido branco (pf = 281-283° C) obtido do processo de purificação de P-EMG (**Item 4.5.1**), observam-se dois duplo-dupletos em δ_{H} 5,61 referente ao hidrogênio olefínico H15 e em δ_{H} 3,22 relativo ao H3. Na região de δ_{H} 1,11 a 0,82 observam-se oito simpletos correspondentes as metilas 23 a 30.

No espectro de DEPTQ (**Figura 15**) podem ser evidenciados 17 sinais relativos aos CH e CH₃ e 17 sinais correspondentes aos C e CH₂. Os sinais em δ_{C} 158,08 e 116,90 são atribuídos aos carbonos olefínicos C-14 e C-15, respectivamente. O sinal em δ_{C} 79,10 é característico de carbono oxigenado, C-3. Podem ser observados também oito sinais atribuídos às oito metilas entre δ_{C} 15,49 e δ 33,38 ppm.

O conjunto de dados mencionados acima e comparação destes com dados da literatura permitiu identificar este composto como o triterpeno taraxerol. As atribuições dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura encontram-se dispostas na **Tabela 20**.

O primeiro relato de isolamento do taraxerol ocorreu em 1963, quando BANERJEE & CHAKRAVART investigaram a composição química de *Clitoria ternatea*. Dentre as propriedades biológicas relatadas para o taraxerol, destacam-se atividades anti-inflamatória e anticolinesterásica (BERTÉ, 2009).

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DEPTQ), (500 e 125 MHz, CDCl_3) de **16**.

C	Composto 16 DEPTQ	Lieraurea* δ_{C}	Composto 16 δ_{H}	Literatura** δ_{H}
1	38,0	38,1		
2	27,1	27,3		
3	79,1	79,2	3,22 (dd, $J_1 = 4,5$ Hz, $J_2 = 11,3$ Hz, 1H)	3,19 (dd, 1H)
4	38,9	39,1		
5	55,5	55,7		
6	18,8	19,0		
7	35,1	35,3		
8	38,7	38,9		
9	48,7	48,9		
10	37,7	37,9		
11	17,5	17,7		
12	35,8	35,9		
13	37,9	37,9		
14	158,1	158,1		
15	116,8	117,0	5,61 (dd, $J_1 = 3,2$ Hz,	5,53 (dd, 1H)

$J_2 = 8,2 \text{ Hz, 1H}$

16	36,7	36,9		
17	37,6	38,1		
18	49,3	49,4		
19	41,3	41,4		
20	28,8	29,0	-	
21	33,7	33,9		
22	33,1	33,2		
23	28,0	28,1	0,93 (s, 3H)	0,91 (s, 3H)
24	15,5	15,6	0,95 (s, 3H)	0,93 (s, 3H)
25	15,4	15,6	0,97 (s, 3H)	0,98 (s, 3H)
26	29,9	30,1	1,11 (s, 3H)	1,09 (s, 3H)
27	25,9	26,0	0,84 (s, 3H)	0,82 (s, 3H)
28	29,9	30,1	0,82 (s, 3H)	0,80 (s, 3H)
29	33,4	33,5	0,97 (s, 3H)	0,95 (s, 3H)
30	21,3	21,3	0,93 (s, 3H)	0,91 (s, 3H)

* LEE *et al.*, 2004; ** LAPHOOKHIEO *et al.*, 2004

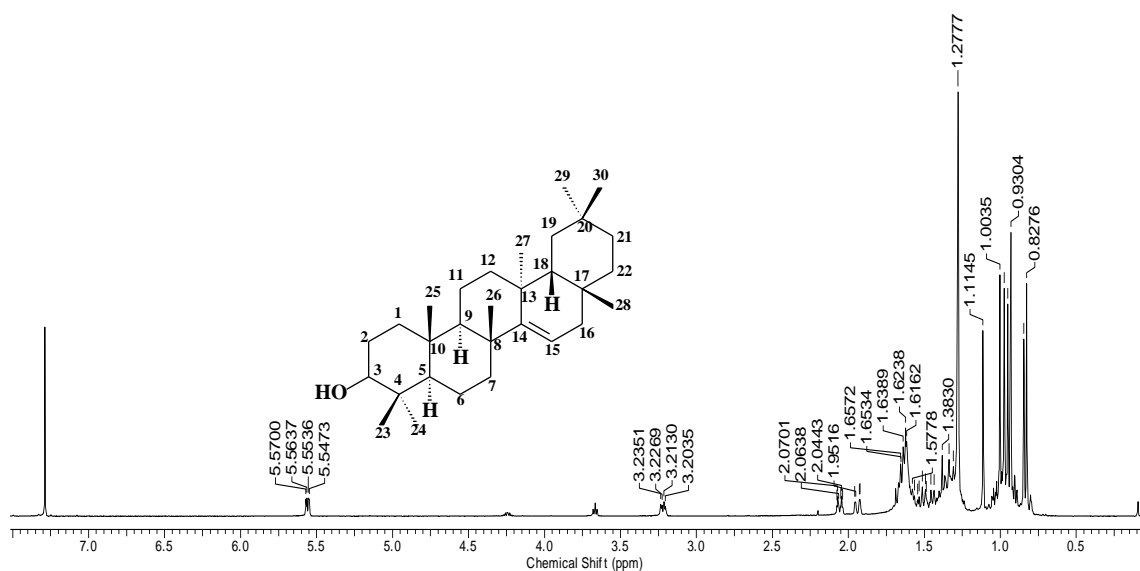


Figura 109. Espectro de RMN 1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **15**.

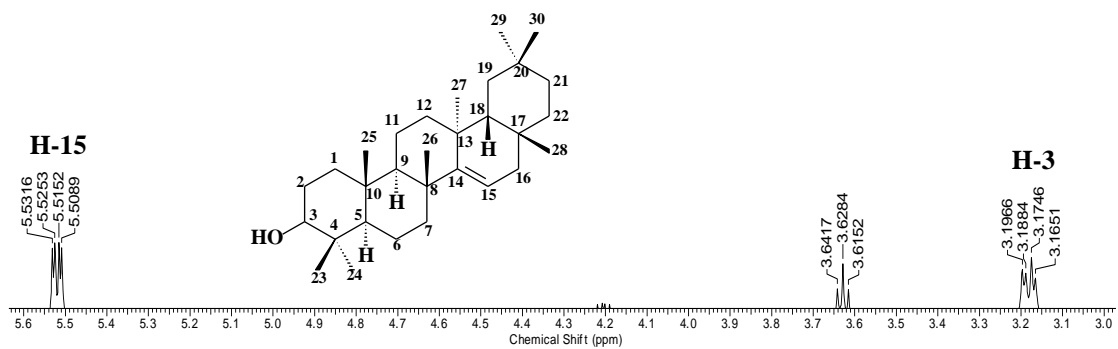


Figura 110. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **16** (3,0 a 5,6 ppm).

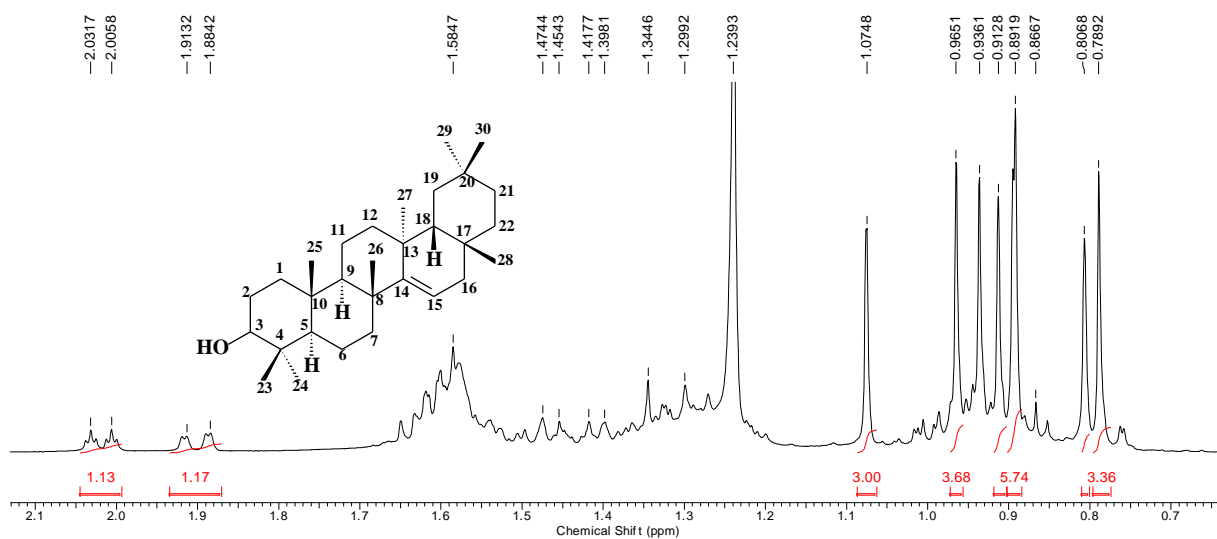


Figura 111. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **16** (0,7 a 2,1 ppm).

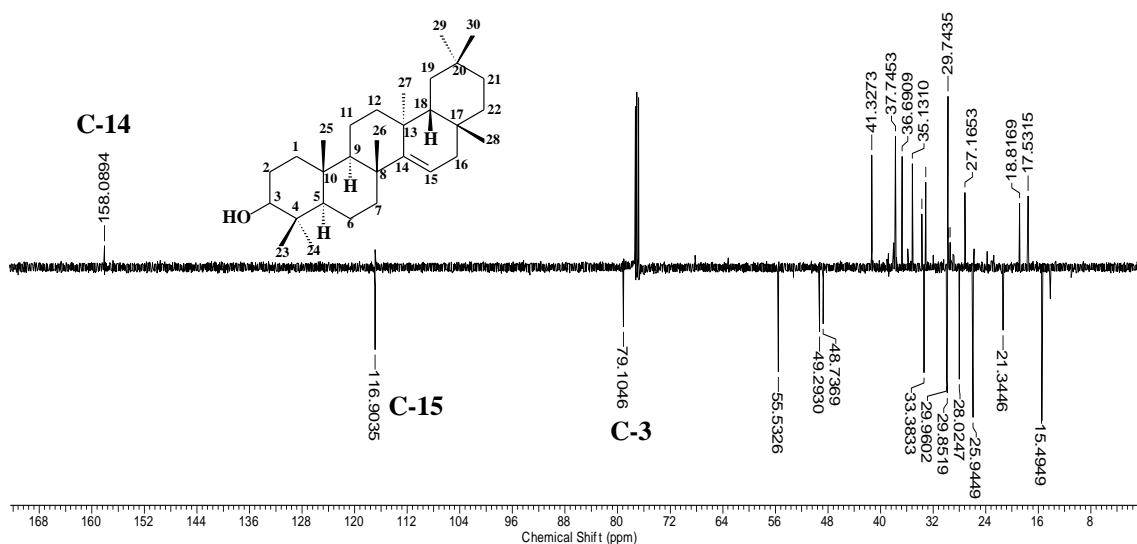


Figura 112. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **16**.

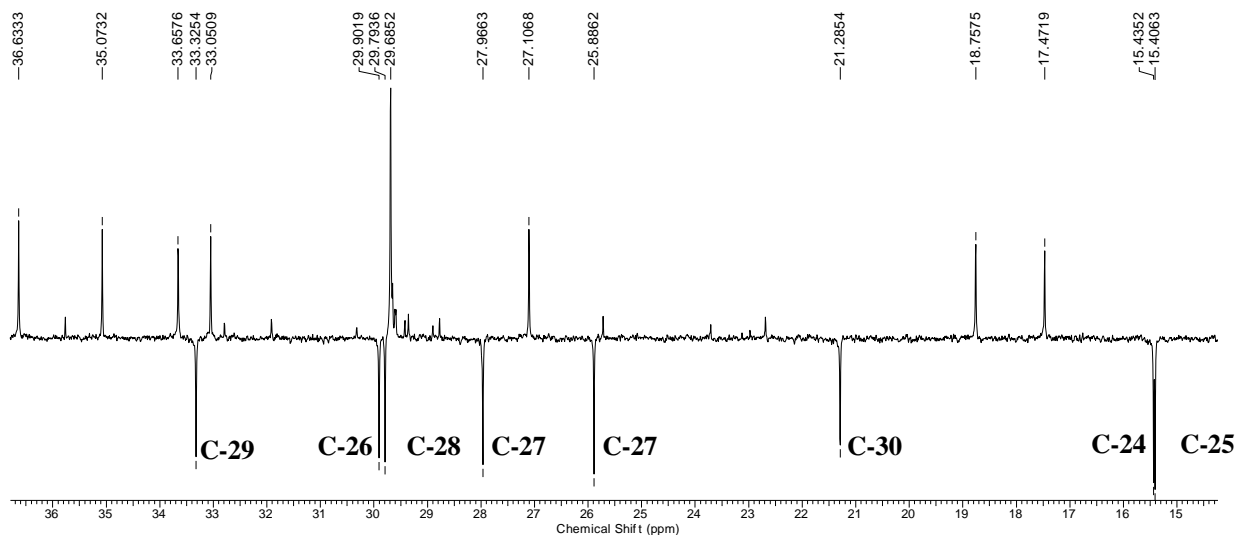


Figura 113. Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de **16** (15 a 36 ppm).

O cromatograma CG (**Figura 114**) apresentou um pico com tempo de retenção 33,7 min, que forneceu um espectro de massas (**Figura 115**) com íon molecular em m/z 426, além de outros picos, cujos fragmentos propostos no **esquema 5** são coerentes com a proposta estrutural.

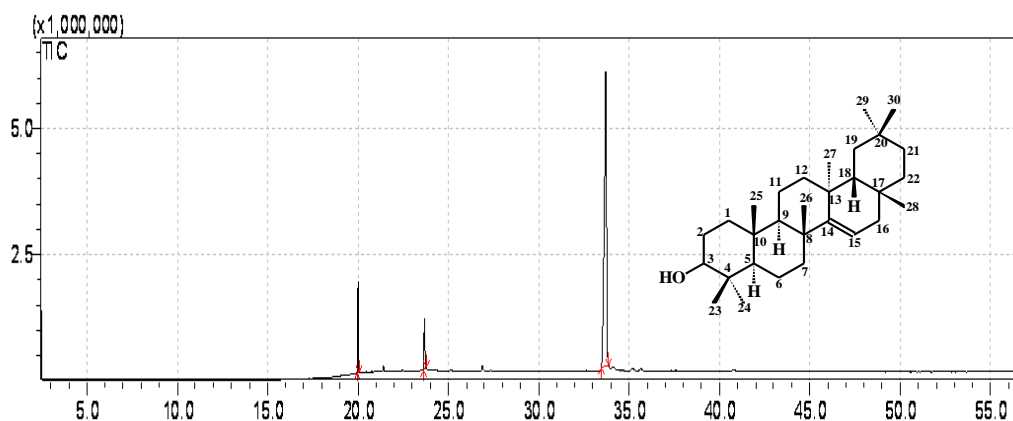


Figura 114. Cromatograma CG do composto **16**.

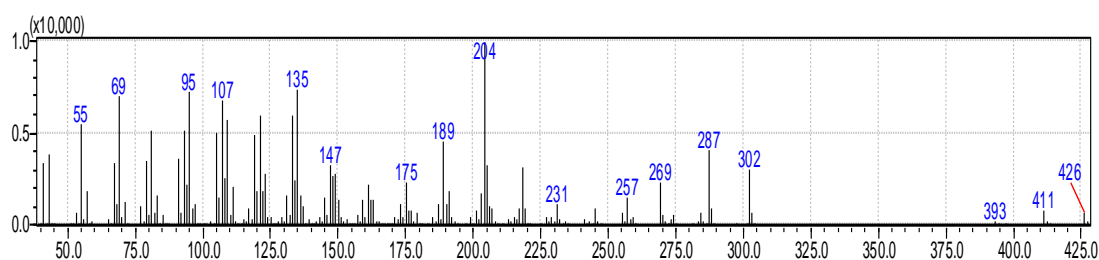
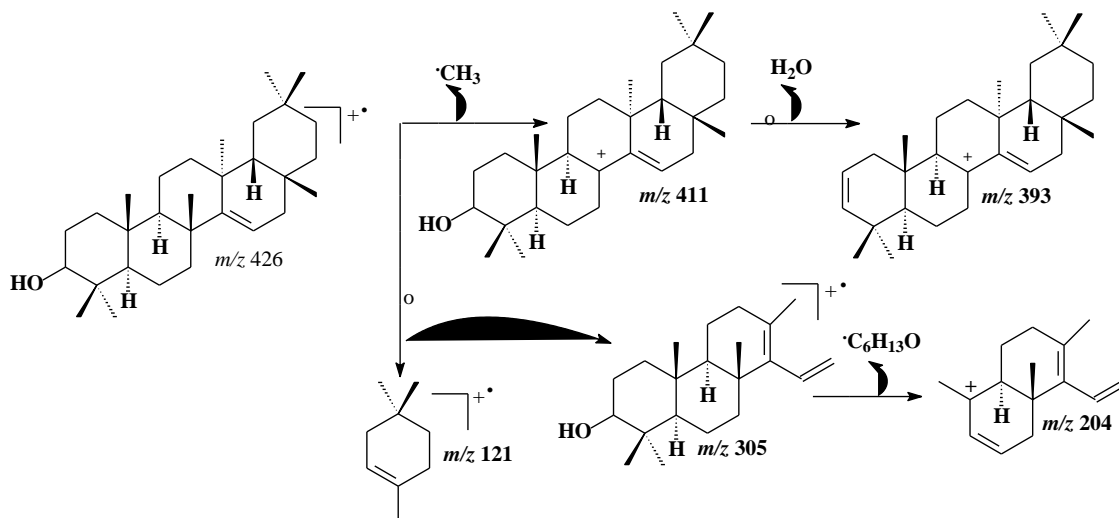


Figura 115. Espectro de massas de **16**.



Esquema 12. Proposta de fragmentação de massas de **16**.

5.2.4 Substâncias 17, 18, 19 e 20

No espectro de RMN ^1H desta substância (**Figura 116**) foram observados dois dupletos em δ 7,45 (2H) e 6,82 (2H) ppm, com constantes de acoplamento iguais a 8 Hz, característicos de sistema aromático para substituído. Os dupletos em δ 7,61 e 7,28 ppm ($J = 16,0$ Hz) sugerem hidrogênios olefínicos com configuração *E*, típicos de derivados do ácido

trans-cumárico. É possível observar, também, o tripleto em δ 4,21 ppm característico de hidrogênio ligado a carbono oxigenado (-CH₂-O-).

O espectro de DEPTQ desta mistura (**Figura 118**) revelou sinais em δ_C 167, 67, que pode ser atribuído ao carbono carbonílico de éster conjugado, e 157,72 ppm, típico de carbono oxigenado de sistema aromático (C-4). Já os sinais com deslocamentos químicos em 129,94 e 114,95 ppm foram atribuídos aos carbonos olefínicos, C-7 e C-8, respectivamente. Foi possível, ainda, atribuir os sinais do CH₂ ligado ao oxigênio da função ester ($\delta_C = a$ 64,72 ppm) e o da metila ($\delta_C = a$ 13,84 ppm). Estes dados permitiram propor a presença de mistura de cumarato de alquila, cuja atribuição dos dados de RMN esta relacionada na **Tabela 21**. Para definir o tamanho da cadeia alquílica foi feito a análise de massas.

O espectro de massas de alta resolução desta amostra (**Figura 119**), obtido com ionização eletron spray e detectdo em modo negativo, foi possível observar quatro picos principais identificados em m/z 555,4988, 541,4695, 527,4483 e 499,4314 que foram atribuídos aos íons quase moleculares (M⁻, M-H⁻) das substâncias **17-20**, além de outros não identificados. Sendo os valores do íon molecular 556, 542, 528 e 450, respectivamente para **17, 18, 19 e 20**.

Através da expressão [(M-H)-163]/14=n, onde 163 é a mssa da porção C₆C₃, 14 é a massa de uma unidade CH₂ e n é o número de carbonos do grupo R. Os valores de n calculados foram 28, 27, 26 e 24. Assim, foi possível identificar a mistura de substâncias os cumaratos de octaeicosila, heptaeicosila, hexaeicosila e tetraeicosila, respectivamente. Os espectros MS-2 dos picos mencionados acima (**Figuras 121 a 123**) estão em acordo com as estruturas propostas.

Tabela 21. Dados de RMN de ¹H e DEPTQ (500 e 125 MHz, CDCl₃) de **17-20**.

C	δ_C	δ_H
1	127,3	-
2	129,9	7,45 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H)
3	115,9	6,87 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H)
4	157,7	-
5	115,9	6,87 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H)
6	129,9	7,45 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H)
7	144,3	7,65 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H)
8	115,9	6,63 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H)
9	167,7	-
-CH ₂ -O-	64,7	4,21 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H)

<u>CH</u> 2CH2-O	25,5	1,8
(CH2)n	28,7-29,6	
<u>CH</u> 2CH2CH3	31	1,24(m)
<u>CH</u> 2CH3	22	
CH3-	14,2	0,90 (t, <i>J</i> = 6,7 Hz, 3H)

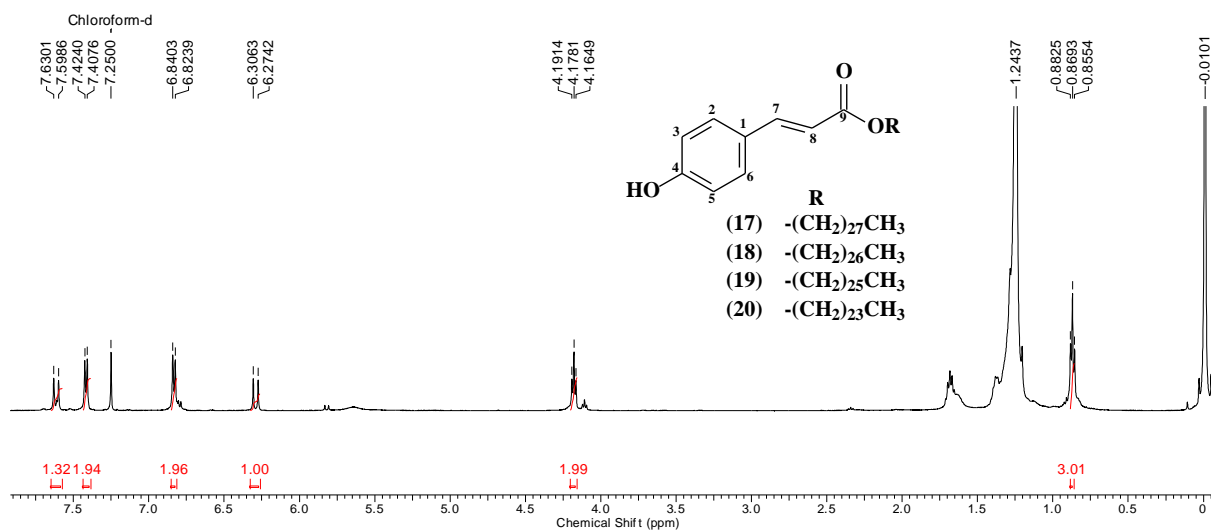


Figura 116. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **17-20**.

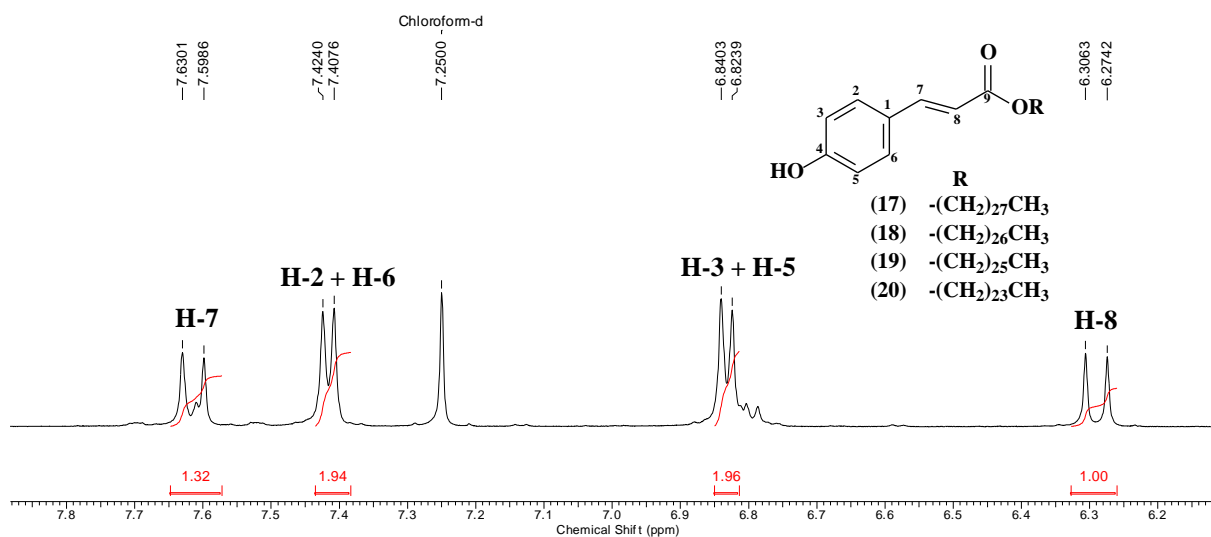


Figura 117. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **17-20** (6,2 a 7,8 ppm).

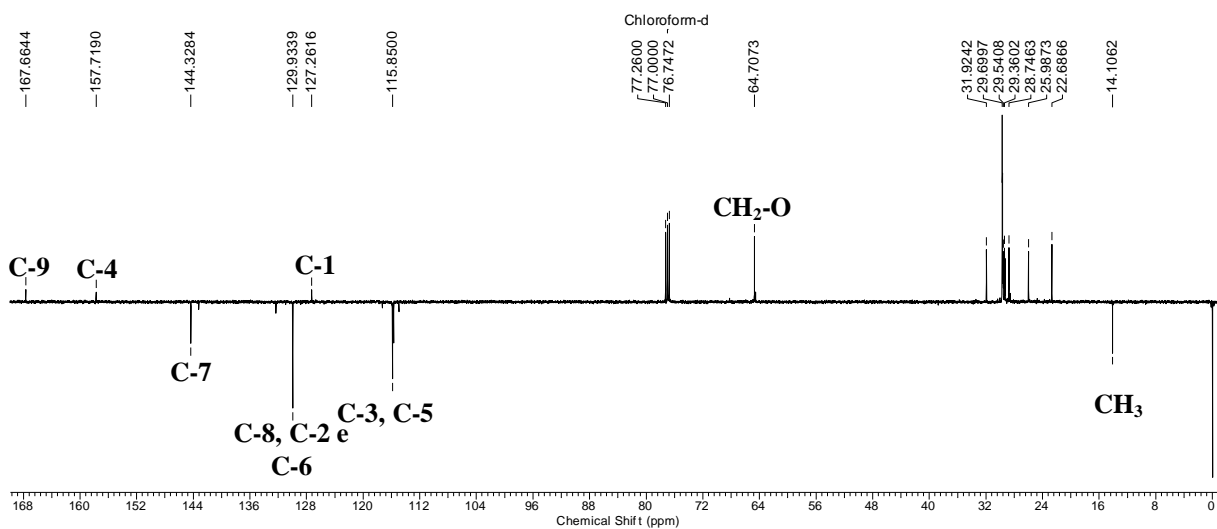


Figura 118. Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de 17-20.

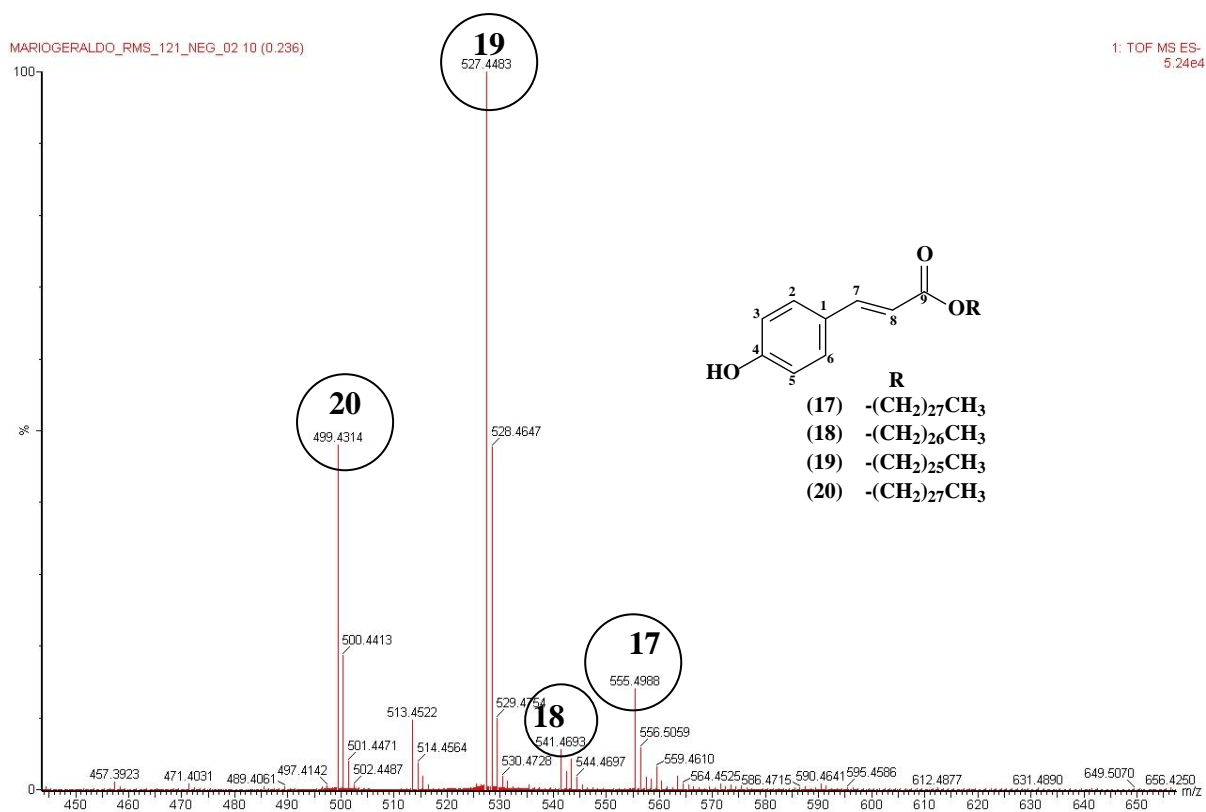


Figura 119. Espectro de massas da fração dos compostos 17-20.

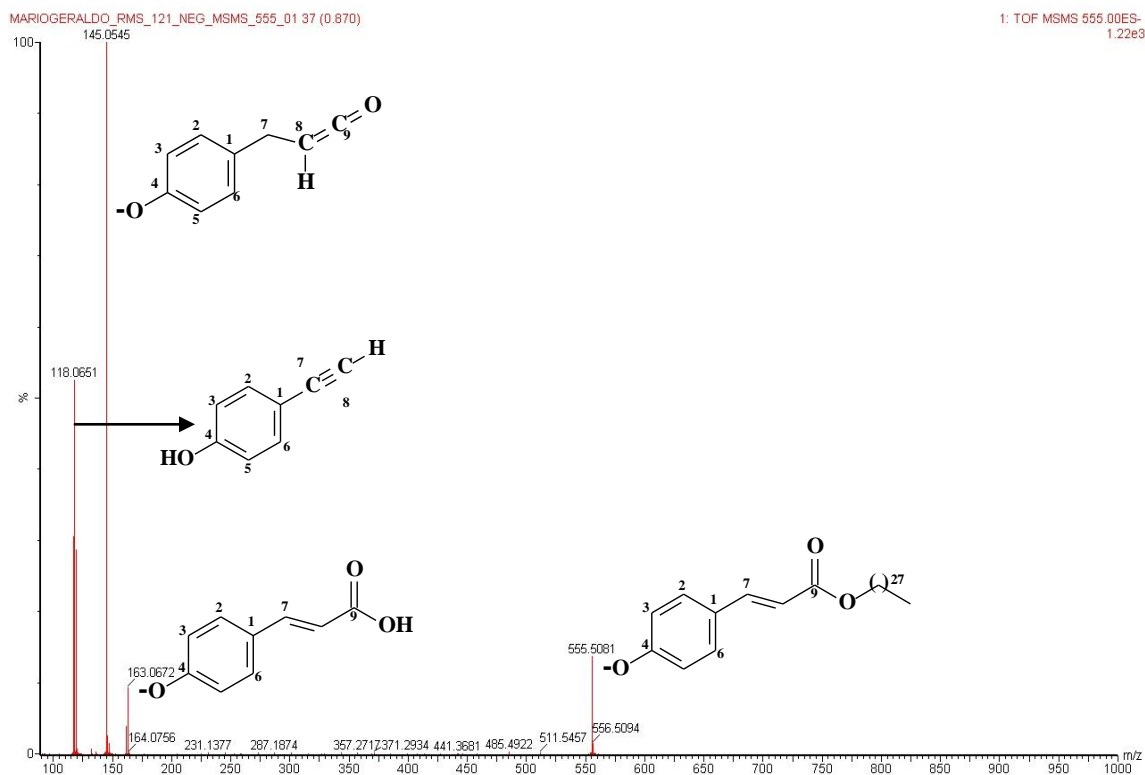


Figura 120. Espectro EM2 do composto 17.

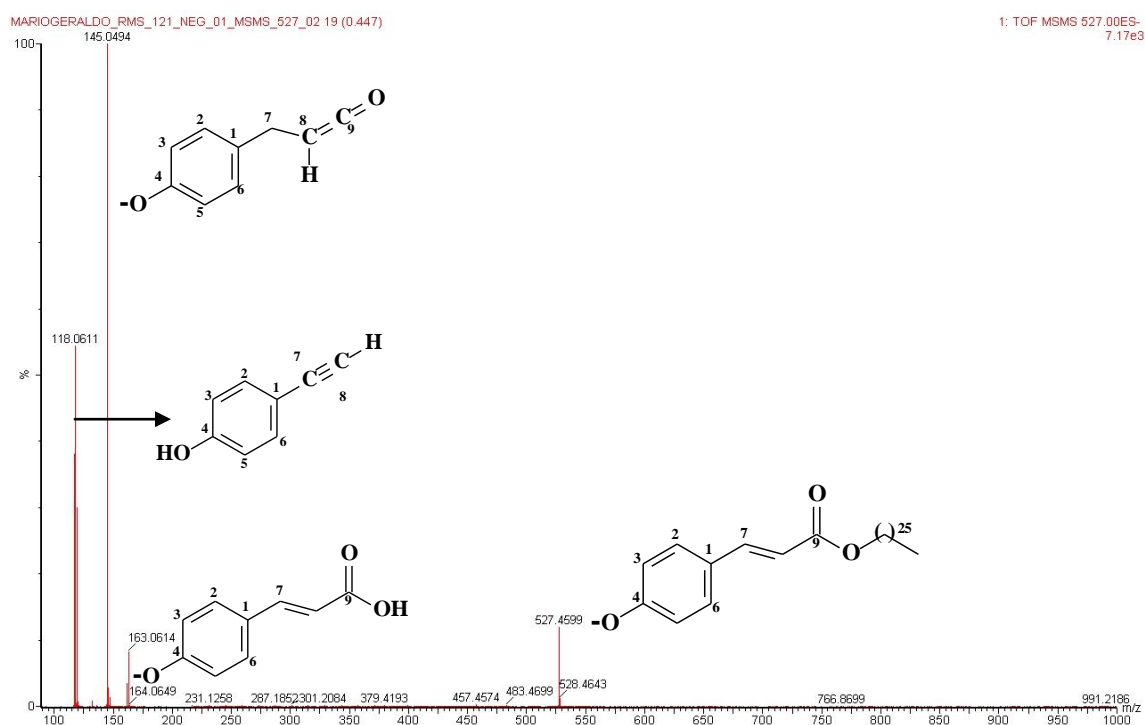


Figura 121. Espectro EM2 da do composto 19.

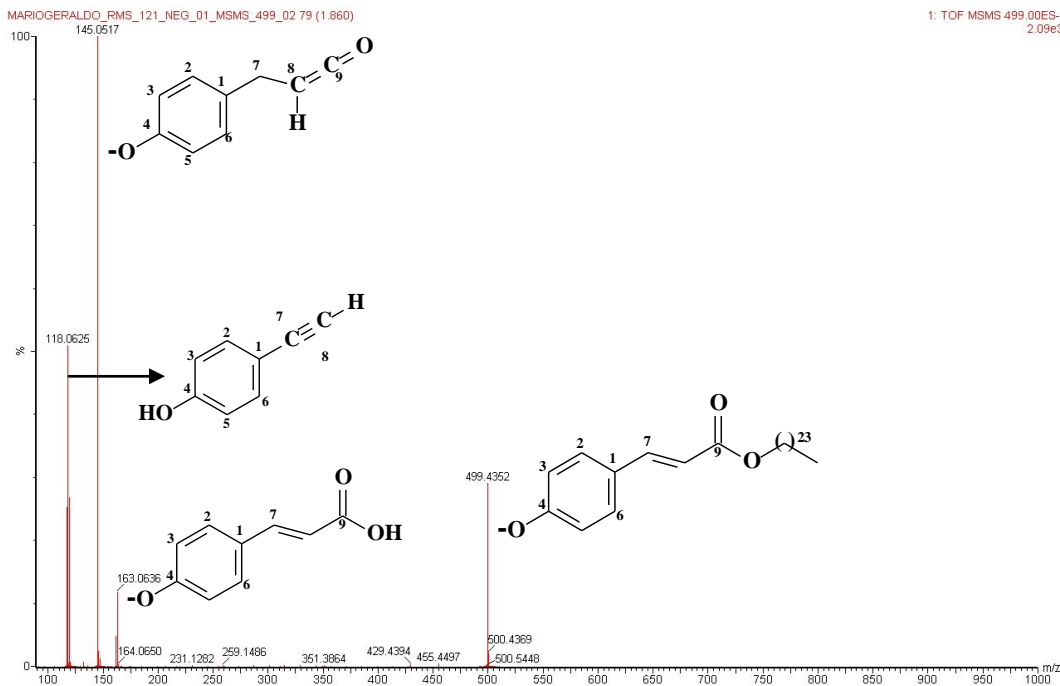
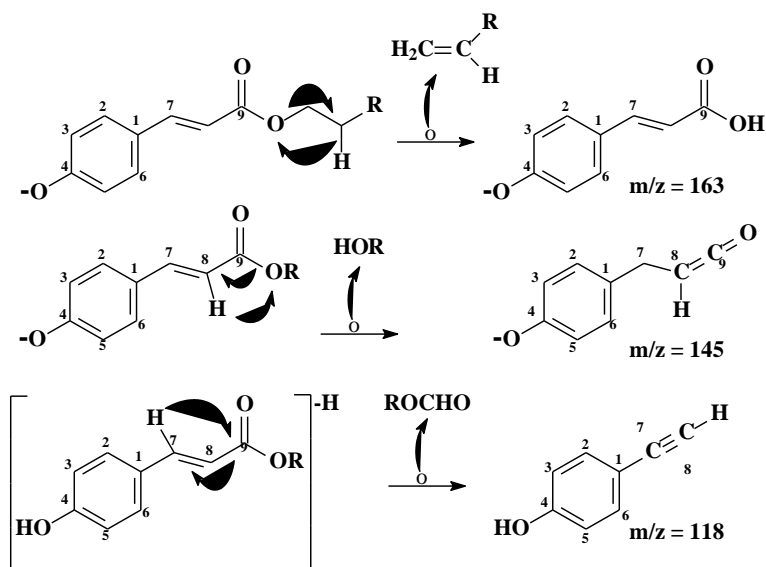


Figura 122. Espectro EM2 do derivado cumárico 20.



Esquema 13. Proposta de fragmentação de massas dos derivados 17-20.

5.3 Teor de flavonoides e atividade antioxidante

5.3.1 Determinação do teor de flavonóides totais

A metodologia empregada na determinação de flavonóides totais baseia-se na formação de complexos estáveis entre o cátion alumínio com os flavonóides em meio metanólico (Figura 124). A formação do complexo promove um desvio para maiores comprimentos de onda (efeito batocrômico) e uma intensificação da absorção na análise espectrofotométrica. A leitura é feita em espectrofotômetro a 415 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 2% em metanol (WOISKY & SALATINO, 1998).

O teor de flavonóides totais nos extratos e frações de *E. copacabanensis* variou de 10,6±0,1 a 38,7±0,5 mg EQ/g de extrato (Figura 125). Conforme esperado, os maiores teores foram encontrados nos extratos em metanol e nas frações mais polares, com destaque para a fração em butanol das folhas que apresentou o maior teor de flavonoides (38,7±0,5 mg EQ/g) ($P < 0.05$). Os flavonoides são uns dos grupos de metabólitos de ocorrência mais freqüente em espécies de *Eugenia*, sendo indicados como potenciais marcadores quimiosistemáticos deste gênero. Estes resultados sugerem que as folhas e galhos de *E. copacabanensis* são ricos em teores de flavonoides quando comparados a outras espécies de *Eugenia* (MAGINA *et al.*, 2010; DONATINI *et al.*, 2009).

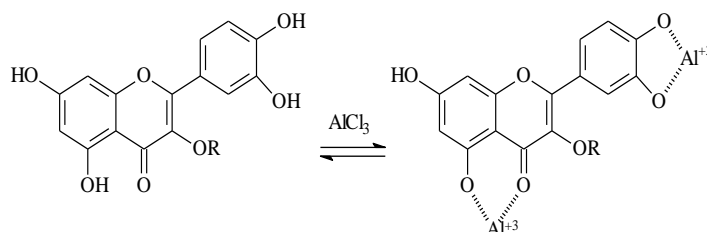


Figura 123. Formação do complexo flavonoide-alumínio em solução de AlCl₃.

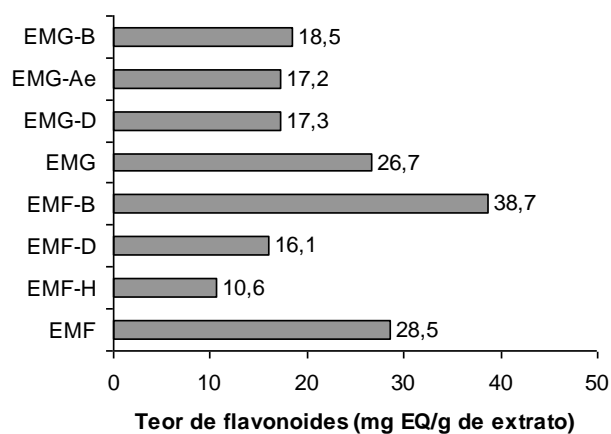


Figura 124. Teor de flavonóides dos extratos e frações das folhas e galhos de *E. copacabanensis*.

5.3.2 Atividade sequestradora do radical livre DPPH

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos vegetais. Dentre estes, um dos mais empregados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura que apresenta um pico de absorção em 517 nm (ALVES *et al.*, 2010). Por ação de um antioxidante ou espécie radicalar, o radical DPPH é reduzido formando DPPH-H (2,2-difenil-1-picril-hidrazina), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (HUANG *et al.*, 2005).

Os extratos e frações das folhas e galhos de *E. copacabanensis* apresentaram atividade sequestradora de radical livre com CE_{50} variando de $0,92 \pm 0,04$ a $40,7 \pm 1,0$ $\mu\text{g/mL}$, considerando-se que os extratos vegetais são considerados ativos quando apresentam valores de $CE_{50} < 500$ $\mu\text{g/mL}$ (CAMPOS *et al.*, 2003), podemos afirmar que todas as amostras analisadas apresentaram promissora atividade antioxidante. O extrato em metanol dos galhos (EMG) de *E. copacabanensis* apresentou a maior atividade antioxidante dentre as amostras analisadas, sendo mais ativo que o padrão quercetina (Teste de Tukey, $P < 0,05$). O extrato em metanol das folhas (EMF) e a fração em butanol dos galhos (EMG-B) apresentaram atividade antioxidante comparável ao padrão quercetina ($P < 0,05$). Em relação à fração em diclorometano das folhas (EMF-D), pode-se atribuir parte da atividade antioxidante observada aos flavonoides quercetina, quercetina-3-*O*-arabinosídeo e canferol-3-*O*-ramnosídeo isolados desta fração. Os valores de CE_{50} dos extratos, frações e o padrão estão representados na Figura 126. A atividade antioxidante de outras espécies do gênero *Eugenia* encontram-se descritas na **Tabela 2** (página 5).

O coeficiente de correlação de Pearson foi igual a $r = 0,997$ entre o teor de flavonoides e os valores de $1/CE_{50}$ do extrato e frações dos galhos de *E. copacabanensis* (**Figura 127**). Na análise de regressão foi observado que houve um aumento linear na capacidade de sequestrar o radical DPPH em função do teor de flavonoides. Esta análise sugere que a atividade sequestradora radicalar deve-se em grande parte ao teor de flavonoides presentes nos galhos de *E. copacabanensis*. Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre o teor de flavonoides e a atividade antiradicalar do extrato e frações das folhas de *E. copacabanensis*.

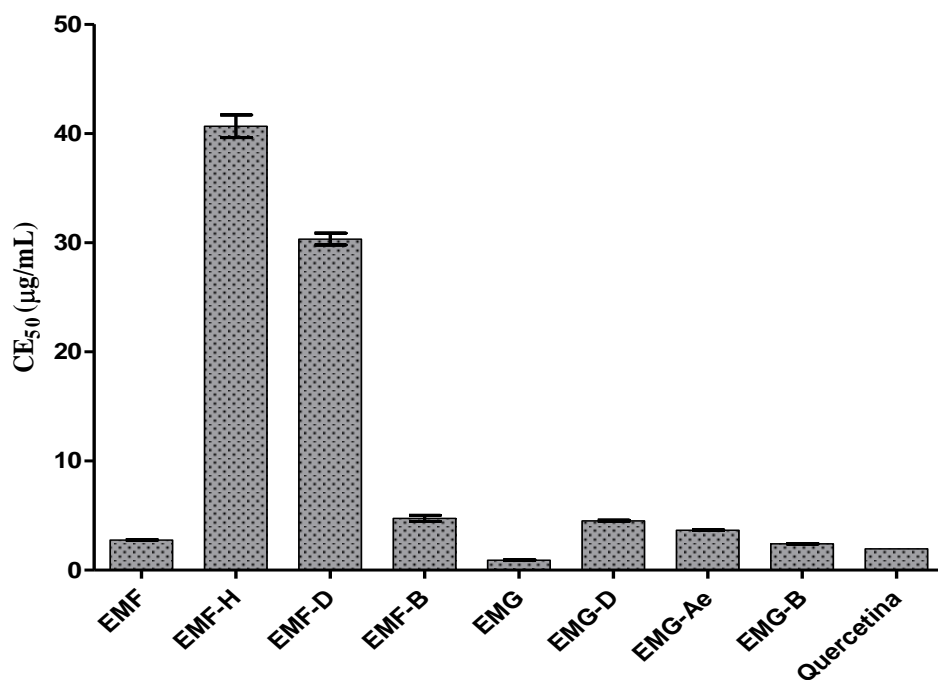


Figura 125. Atividade sequestradora do radical DPPH do extrato e frações das folhas e galhos de *E. copacabanensis*.

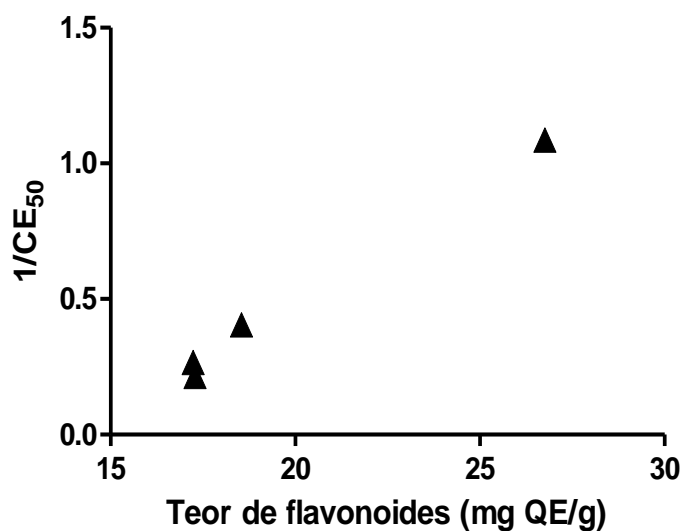


Figura 126. Correlação de Pearson ($r = 0,997$, $P < 0,05$ e $R = 0,993$) entre os valores de $1/CE_{50}$ do ensaio do DPPH e o teor de flavonoides presentes no extrato e frações dos galhos de *E. copacabanensis*.

5.3.3 Atividade antioxidante utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoleico

A avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais pelo ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoleico baseia-se na descoloração do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico, em emulsão aquosa saturada em oxigênio. A adição de uma amostra contendo antioxidantes contribui para retardar a queda de absorvância do β -caroteno (SOKMEN *et al.*, 2004).

Os extratos e frações das folhas e galhos de *E. copacabanensis* apresentaram atividades de inibição da descoloração do β -caroteno em $t=120$ min. variando de $28,7\pm 7,9$ a $90,0\pm 0,1\%$ (Figura 128). O extrato em metanol dos galhos (EMG) de *E. copacabanensis* foi o mais ativo neste ensaio em comparação as demais amostras analisadas, incluindo o padrão Trolox. Com exceção das frações em hexano e em diclorometano das folhas (EMF-H e EMF-D, respectivamente) de *E. copacabanensis* que foram as menos ativas nas concentrações analisadas, as demais amostras apresentaram atividades antioxidantes no sistema β -caroteno/ácido linoleico comparáveis estatisticamente ao padrão Trolox (Teste de Tukey, $P<0,05$). Estes resultados sugerem que as folhas e galhos desta espécie representam uma potencial fonte de novos antioxidantes naturais.

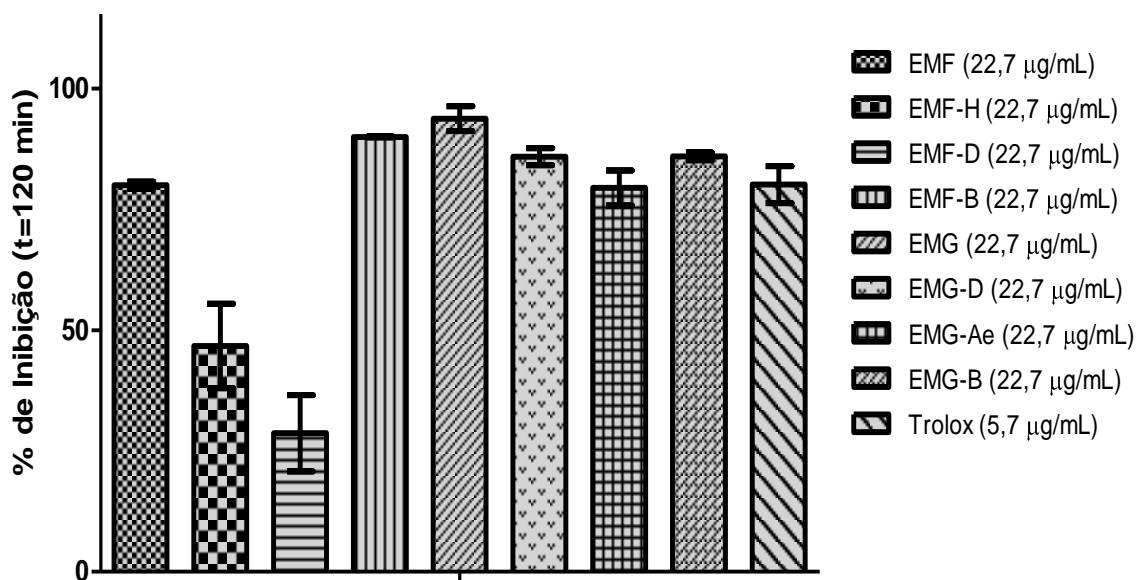


Figura 127. Atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoleico dos extratos e frações das folhas e galhos de *E. copacabanensis*.

5.4 Ensaios antimicrobiano de extratos e frações de *E. copacabanensis*

A Tabela 22 mostra que os extratos e frações de *E. copacabanensis* não foram capazes de inibir o crescimento de MRSA, *C. albicans*, *E.coli*, *C. neoformans* e *R. oryzae*, em concentrações diferentes até 2,5mg/mL.

Tabela 22. Resultado do ensaio antimicrobiano extratos e frações de *E. copacabanensis*.

Extratos e frações	Concentração Inibitória Mínima (em µg/mL)				
	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>R. oryzae</i>
EMF	∅	∅	∅	∅	∅
EMF-H	∅	∅	∅	∅	∅
EMF-D	∅	∅	∅	∅	∅
EMG	∅	∅	∅	∅	∅
EMG-D	∅	∅	∅	∅	∅
EMG-Ae ₂	∅	∅	∅	∅	∅
EMG-B	∅	∅	∅	∅	∅
AMB	-	-	1,56	1,56	0,68
CIP	5	5	-	-	-

6 CONCLUSÕES

A revisão realizada sobre os apéctos químicos e farmacológicos do gênero *Eugenia* gerou informações viáveis a publicação.

Este é o primeiro estudo relacionado á química de compostos fixos da espécie *E. copacabanensis*. Neste trabalho foi possível identificar 20 substâncias, o que contribui para o conhecimento químico da espécie, além da preparação de dois derivados, que auxiliaram na identificação de uma delas. O perfil químico da espécie em estudo está em acordo o relatado na literatura para o gênero. Dentre as substâncias isoladas, destacam-se os triterpenos friedelan-3,4-lactona e ácido 30-hidroxi-ursólico que, possivelmente, estão sendo relatados pela primeira vez na família Myrtaceae. Além disso, convém ressaltar que, segundo HARON *et al* (1992), flavonóis como a quercetina e seus derivados glicosilados, relatados neste trabalho, são possíveis marcadores taxonômicos do gênero.

Os extratos e frações de *E. copacabanensis* mostraram elevado potencial antioxidante, nos dois ensaios realizados, destacando-se as frações mais polares. O que indica possível presença de flavonoides, que serão investigados futuramente.

Em relação aos ensaios antimicrobianos, os extratos e frações não se mostraram ativos frente aos micro-organismos testados. O que não descarta a possibilidade de testes com outros micro-organismos.

Os resultados obtidos neste estudo foram divulgados nos eventos científicos abaixo:

- ❖ 35ª RASBQ (2012): Metabólitos especiais isolados de *Eugenia copacabanensis* (Myrtaceae);
- ❖ Fórum da Pós-graduação-UFRRJ (2012): Estudo químico de *Eugenia Copacabanensis* (Myrtaceae);
- ❖ III SIPMN (2012): Triterpenes and Flavonol Glycoside from *Eugenia copacabanensis* and DPPH Scavenging Activity.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in variou áreas of china. *Food Chem*, 101, 1383-1392, 2007.

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

AMORIM, A. C. L.; LIMA, C. K. F.; HOVELL, A. M.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. Antinociceptive and hipothermic avaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* (Brazilian Pitanga). *Phytomedicine* 16, 923-928, 2009.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem*. 89 (1), 27-36, 2005.

BAHIA, M. V. Ocorrência de biflavonoides e derivado de ácido benzoico do cerne e folhas de *Caesalpinia pyramidalis* e *Peltophorum dubium* (Leguminosae). Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, 2007.

BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; COSTA, S. M. O.; DOS SANTOS, H. S. Obtenção de derivados da mistura triterpenoidica a e b-amirina. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17 (2), 204-208, 2007.

BANNON, C. D.; RONALD, A.; SIMES, J. J. H. Extractives of Australian timbers. XVI The constituents of the wood of *Eugenia crebrinervis* (syn *Syzygium crebrinerve*) and *Eugenia gustavinoides* (syn *Syzygium gustavinoides*). *Aust. J. Chem.* 29, 1135-1141, 1976.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova* 29 (1), 113-123, 2006.

- BENAVENT-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J.; ORTUNO, A.; DELRIO, J. A. Antioxidant activity of phenolic extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem-Review* 72, 145-171, 2001.
- BERTÉ, T. E. Estudo da atividade anticolinesterásica dos compostos taraxerol e ácido ursólico: implicações sobre processo da memória. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, 2009.
- BHARGAVA, K. K.; DAYAL, R.; SESHADRI, T. R. Chemical components of *Eugenia jambolana* stem bark. *Current Science* 43 (20), 645-646, 1974.
- BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLO, V. R.; MATOS, D. S.; GERMANO, A. M.; JAMAL, C.M Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. *Rev. Bras. Cienc. Farma.* 44 (4), 629-636, 2008.
- BRIGGS, L. H.; CAMBIE, R. C.; LOWRY, J. B.; SEELVE, R. N. Constituents of *Eugenia maire* A. Cunn. Part I. A trimethyl ether acid and mairin, a new triterpene. *J. Chem. Soc.* 642-645, 1961.
- CALA, A. R. S.; MACHADO, D. G.; BRITTO, L. E. B.; COLLA, G.; MAGINA, M. D. A.; BRIGHENTE, I. M .C.; RODRIGUES, A. L. S. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effects of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. *J. Ethnopharmacol.* 143, 720-731, 2012.
- CAMPOS, M. G.; WEBBY, R. F.; MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; DA CUBHA, A. P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chem* 51 (3), 742-745, 2003.
- CANDY, H. A.; MACGARRY, E. J.; PEGEL, K. H. Constituents of *Syzygium cordatum*. *Phytochemistry* 7 (5), 889-890, 1968.
- CARDOSO, C. M. V.; SAJO, M. G. Nervação em espécies brasileira de Myrtaceae Adans. *Acta bot. Brás.* 20 (3), 657-669, 2006.
- CARVALHO JR, A. R.; GOMES, G. A.; CORDEIRO, G. M.; CARVALHO, M. G. Triterpenes and Flavonoid from *Eugenia copacabanensis* and DPPH Scavenging Activity. III International Symposium Medicinal and Nutraceutical Plants, Aracaju-SE, 2012.
- CARVALHO JR, A. R.; GOMES, G. A.; GOMES, T. R. C.; CARVALHO, M. G. Metabolitos especiais isolados de *Eugenia copacabanensis* (Myrtaceae). 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, 2011.

CARVALHO, M.G. DE, ROCHA JUNIOR, G. G.; CAVATTI, L.C.; SUZART, L.R.; CORNELIUS, M.T.F.; SILVA, V.C. DA; CARDOSO, M.A.R.; Determinação Estrutural de Flavonóides com Análise de Espectros de RMN de ¹H e Incorporação de Diazometano. *Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Exatas e da Terra. Seropédica, RJ, EDUR*, v. 25, n. 1-2., 46-60, 2006.

CASSANITI, C.; LEONARD, C.; FLOWERS, T. The effect of sodium chloride on ornamental shrubs. *Sci Horticulture-Amsterdam* 122, 586-593, 2009.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *J. Ethnopharmacol.* 91, 105-108, 2004.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *J. Ethnopharmacol.* 91, 105-108, 2004.

CHUN, D.; JIAN, L.; BAIS, B.-R.; PENG, S.-L.; DING, L.-S. A new glucoside gallate from the flower buds of *Eugenia caryophyllata*. *Chinese Journal of Natural Medicine* 8 (3), 180-182, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTES (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests.** 4th ed. Wayne (PA),. Approved Standard, Normas M27-A3, M38-A2, M11-A6 e M7-A4 2008.

COLE, R. A.; BANSAL, A.; MORIARTY, D. M.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Eugenia zuchowskiae* from Monteverde, Costa Rica. *J. Nat. Med.* 61, 414-417, 2007.

COSTA, D. P.; FILHO, E. G. A.; SILVA, L. M. A.; SANTOS, S. C.; PASSOS, X. S.; SILVA, M. R. R.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (5), 851-858, 2010

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. *Floresta e Ambiente* 11, 47-52, 2004.

DE OLIVEIRA, A. M.; HUMBERTO, M. M. S.; DA SILVA, J. M.; DE ALMEIDA ROCHA, R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos de casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 16 (supl), 618-624, 2006.

DE OLIVEIRA, A., M.; HUMBERTO, M. M. S.; DA SILVA, J. M.; DE ALMEIDA ROCHA, R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades

moluscida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 16 (supl), 618-624, 2006.

DE OLIVEIRA, R. N.; DIAS, I. J. M.; CÂMARA, C. A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. De diferentes localidades de Pernambuco. *Rev. Bras. Farmacogn.* 15 (1), 39-43, 2005.

DEFAVERI, A. C. A.; SATO, A.; BONÉ, L. B.; AGUIAR, D. L. M.; SAN GIL, R. A. S.; ARRUDA, R. C. O.; RIEHL, C. A. A. *Eugenia neotida* and *Eugenia rotundifolia* Casar. (Myrtaceae) essential oils: composition, seasonality influence, antioxidant activity and leaf histochemistry. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 1531-1538, 2011.

DELGADO, G.; CÁRDENAS, H.; PELÁEZ, G.; VIVAR, A. R. Terpenoids from *Vigueira oaxacana*. *J. Nat. Prod.*, 47, 6, 1042-1045, 1984.

DEWIR, Y. H.; SINGH, N.; MNGOMEZULU, S.; OMAR, A. M. K. Micropropagation and detection of important triterpenes in vitro and Field grown plants of *Syzygium cordatum*. *J. Med. Plants Res.* 5 (14), 3078-3083, 2011.

DHAMARATNE, H. R. W.; SOTHEESWARAN, S.; BALASUBRAMANIAM, S. Triterpenes and Neoflavonoids of *Calophyllum lankaensis* and *Calophyllum thwaitesii*. *Phytochemistry*, 23, 2601-2603, 1984.

DIAS, M. O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A. C. Separação semipreparativa de α e β -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim. Nova* 34 (4), S1-S6, 2011.

DJOUKENG, J. D.; ABOU-MANSOUR, E.; TABACCHI, R.; TAPONDJOU, A. L.; BOUDA, H.; LMAONTSI, D. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.* 101, 283-286, 2005.

DONATINI, R. S.; ISHIKAWA, T.; BARROS, S. B. M.; BAECHI, E. M. Atividade antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 19 (1A), 89-94, 2009.

FLORES, G.; DASTMALCHI, K.; PAULINO, S.; WHALEN, K.; DABO, A. J.; REYNERTSON, K. A.; FORONJY, R. F.; AMIENTO, J. M. D.; KENNELLY, E. J. Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. *Food Chem.* 134, 1256-1262, 2012.

- FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R. M.; DA SILVA, A. M. P.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Purification of betulinic acid from *Eugenia florida* (Myrtaceae) by high-speed counter current chromatography. *Phytochem. Anal.* 16, 411-414, 2005.
- GOMES DA SILVA, A. L.; PINHEIRO, M. C. B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Acta bot. bras.* 21 (1), 235-247, 2007.
- GOMES, M. S. R. Constituintes químicos isolados da raiz de *Piptadenia rigida* (Leguminosae-Mimosoideae). Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Química Orgânica, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002.
- GOPAN, R.; VARUGHESE, G.; NEDIYAPARAMBIL, P.; MATHUR, S. Volatile constituents and antibacterial activity of *Eugenia rottleriana* Wight et Arn. Leaf oil. *J. Essent. Oil Res.* 19 (6), 588-590, 2007.
- GOTTLIEB, O. R.; DA SILVA, L.; MARIA, J. G. S. Eucalyptin from *Eugenia* and *Myrcia* species. *Phytochemistry* 11, 1185-1186, 1972.
- GRANGEIRO, M. S.; CALHEIROS-LIMA, A. P.; MARTINS, M. K.; ARRUDA, L. F.; GARCEZ-DO-CARMO, Ç.; SANTOS, W. C. Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae) in cholinergic neurotransmission. *J. Ethnopharmacol.* 108 (1) 26-30, 2006.
- GU, J.-Q.; PARK, E. J.; LUYENGI, L.; HAWTHORNE, M.; KINGHORN, A. D. Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventive activity. *Phytochemistry* 58, 121-127, 2001.
- GUIMARÃES, A. G.; MELO, M. S.; BONFIM, R. R.; PASSOS, L. O.; MACHADO, S. M. F.; RIBEIRO, A. DE S.; SOBRAL, M.; THOMAZZI, S. M.; QINTANS-JÚNIOR, L. J. Antinoceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. *Rev. Bras. Farmacog.* 19 (4), 883-887, 2009.
- GUPTA, G. S.; SHARMA, D. P. Triterpenoids and other constituents of *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry* 13 (9), 2013-2014, 1974.
- HANSON, J. T.; HITCHCOCK, P. B.; MANICKAVASAGAR, R. The Hydroxilation of Globulol and 7-Epiglobulol by *Cephalosporium Aphidicola*. *Phytochemistry* 37, 1023-1025, 1994.
- HARON, N. W.; MOORE, D. M.; HARBORNE, J. B. Distribution and taxonomic significance of flavonoids in the genus *Eugenia* (Myrtaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 20 (3), 265-268, 1992.

- HARRIS, S.M.; MCFEETERS, H.; OGUNGBE, I.; CRUZ, V. L.; SELTZER, W. N.; WILLIAN, N.; JAKES, B. R.; MCFEETERS, R. L. Peptidyl-tRNA hydrolase screening with molecular docking reveals the antibiotic potential of *Syzygium johnsonii* bark extract. *Nat. Prod. Commun.* 6 (10), 1421-1424, 2011.
- HENRIQUES, A. T.; SOBRAL, M.; CAUDURO, A. D.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L.; LOMATY, G.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Aromatic plants from Brazil. II. The chemical composition of some *Eugenia* essential oils. *J. Essent. Oil. Res.* 5, 501-505, 1993.
- HUSSEIN, S. A. M.; HASHEM, A. N. M.; SALIEM, M. A.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M. A. M. Polyoxynated flavonoids from *Eugenia edulis*. *Phytochemistry* 64, 883-889, 2003.
- HUSSEIN, S. A. M.; HASHEN, A. N. M.; SALIEM, M. A.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M. A. M. Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. *Phytochemistry* 64, 883-889, 2003.
- JAYASINGHE, U. L. B.; RATNAYAKE, R. M. S.; MEDAWALA, M. M. W. S.; FUJIMOTO, Y. *Nat. Prod. Res.* 21 (6), 551-554, 2007.
- JORGE, T. C. M. Estudo químico e farmacológico de duas espécies da família Rubiaceae: *Cephalanthus glabratus* e *Palicourea crocea*. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Química, CCE, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 2005.
- JOTHI, G. J.; BENNIAMIN, A.; MARIDASS, M.; RAJU, G. Identification of essential oils composition and antifungal activity of *Eugenia singampattiana* fruits. *Pharmacologyonline* (2, News Letters), 727-733, 2009.
- JUNGES, M. J.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; FILHO, E. R. The use of ^{13}C and ^1H -NMR in the structural elucidation of a new nor-lupane triterpene. *J. Braz. Chem. Soc.* 10 (4), 317-320, 1999.
- KALA, S. M. J.; BALASUBRAMANIAN, T.; SORIS, P. T.; MOHAN, V. R. GC-MS determination of bioactive components of *Eugenia singampattiana* Bedd. *Int. J. Chem Tec Res.* 3 (3), 1534-1537, 2011.
- KIM, H. J.; LEE, J. S.; WOO, E.-R.; KIM, M. K.; YANG, B. S.; YU, Y. G.; PARK, H.; LEE, Y. S. Isolation of virus-cell fusion inhibitory components from *Eugenia caryophyllate*. *Planta Med.* 67, 277-279, 2001.

- KIM, Y.-J.; KIM, H.-C.; KO, H.; AMOR, E.-C.; LEE, J. W. Inhibitory effects of aurentiacin from *Syzygium samarangense* on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mouse macrophages. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1027-1035, 2012.
- KOUIDHI, B.; ZMANTAR, T.; BAKHROUT, A. Anticariogenic and cytotoxic activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*) against a large number of oral pathogens. *Ann. Microbiol.* 60, 599-604, 2010.
- KUIATE, J.-R.; MOUOKEU, S.; WABO, H. K.; TANE, P. Antidermatophytic triterpenoids from *Syzygium jambos* (L) Aston (Myrtaceae). *Phytother. Res.* 21, 149-152, 2007.
- KUO, Y.-C.; YANG, L.-M.; LIN, L.-C. Isolation and immunomodulatory effect of flavonoids from *Syzygium samarangense*. *Planta Med.* 70, 1237-1239, 2004.
- KUSKOSKI, E. M.; VEJA, J. M.; RIOS, J. J.; FETT, R.; TRONCOSO, A. M.; AURERO, A. G. Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). *J. Agric. Food Chem.* 51, 5450-5454, 2003
- LAPHOOKIEO, S.; KARALAI, C.; PONGLIMANONT, C. New sesquiterpenoid and triterpenoids from the fruit of *Rhizophora mucronata*. *Chem Pharm Bull.* 52, 883-885, 2004.
- LEE, J. H.; LEE, K. T.; YANG, J. H.; BAEK, N. I.; KIM, D. K. Acetylcholinesterase inhibitors from the Twings of *Vaccinium Oldhami* Miquel. *Arch. Pharm. Res.*, v. 27, n. 1, p. 53-56, 2004.
- LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; OLIVEIRA, J. T. A.; VASCONCELOS, I. M.; SCALOBRIN, F. B.; ROCHA, T. L.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; SILVA, L. P.; GUADONIN, R. V.; QUIRINO, B. F.; CASTRO, C. F. S.; LEONARDECZ, E.; FRANCO, O. L. Identification on *Eugenia dysenterica* laxative peptide: A novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. *Peptides* 31, 1426-1433, 2010.
- LIU, J.-X.; DI, D.-L.; SHI, Y.-P. Diversity of chemical constituents from *Saxifraga Montana* H. J. *Chin. Chem. Soc.* 55 (4), 863-870, 2008.
- LOCHER, C. P.; BURCH, M. T.; MOWER, H. R.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; POIL, B.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. S. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 49, 23-32, 1995.
- LUNARD, I.; PEIXOTO, J. L. B.; DA SILVA, C. C.; SHUQUEL, I. T. A.; BASSO, E. A.; VIDOTTI, G. J. *J. Braz. Chem. Soc.* 12 (2), 180-183, 2001.

- MACEDO, A. F.; OSHIIWA, M.; GUARIDO, C. F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de bairro do município de Marília-SP. *Rev. Cienc. Farm. Apl.* 28 (1), 123-128, 2007.
- MACHADO, K. E.; FILHO, V. C.; CRUZ, R. C. B.; MEYRE-SILVA, C.; CRUZ, A. B. Antifungal activity of *Eugenia umbelliflora* against dermatophytes. *Nat. Prod. Commun.* 4 (9), 1181-1184, 2009.
- MAGINA, M. A.; GILIOLI, A.; MORESCO, H. H.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). *Lat. J. Am. J. Pharm.* 29 (3), 376-382, 2010.
- MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; DALMARCO, J. B. Bioactive triterpenes and phenolics of leave of *Eugenia brasiliensis*. *Quim. Nova* 35 (6), 1184-1188, 2012.
- MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. *J. Nat. Med.* 63, 345-350, 2009.
- MAGINA, M. D. A.; PIETROVSKI, E. F.; GOMIG, F.; FALKENBERG, D. B.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F.; PIZZOLATI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Topical antiinflammatory activity and chemical composition of the epicuticular wax from the leaves of *Eugenia meurepaireana* (Myrtaceae). *Braz. J. Pharm. Sci.* 45, 171-, 2009.
- MAHMOUD, I. I.; MARZOUK, M. S. A.; MOHARRAM, F. A.; EL-GIND, M. R.; HASSAN, A. M. K. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry* 58, 1239-1244, 2001.
- MAJUMDAR, S. G.; THAKUR, S. Chemical investigation of the leaves of *Eugenia formosa*. *J. Indian Chem. Soc.* 47 (2), 181-182, 1970.
- MANOHARAN, K. P.; SONG, F. J.; BENNY, T. K. H.; YANG, D. Triterpenoids from *Eugenia grandis*: structure elucidation by NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem* 45, 279-281, 2007.
- MARIDASS, M. Composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Therapeutics* 2 (4), 163-166, 2008.
- MEDA, A.; LAMIEM, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem*, 91, 571-577, 2005.

- MELENDÉZ, P.A., CAPRILES, V.A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine*. v.13 p. 272-276, 2006.
- MORA, F. D.; AVILA, J. L.; ROJAS, L. B.; RAMIREZ, R.; USUBILLAGA, A.; SEGNINNI, S.; CARMONA, J.; SILVA, B. Chemical composition and larvicidal activity of *Eugenia triquetra* essential oil from venezuelan Andes. *Nat. Prod. Commun.* 5 (6), 965-968, 2010.
- NAIR, A. G. R.; KRISHNAN, S.; RAVIKRISHNA, L.; MADHUSUDANAN, K. P. New and rare flavonol glycosides from leaves of *Syzygium samarangense*. *Fitoterapia* 70, 148-151, 1999.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66, 1022-1037, 2003.
- NONAKA, G.-I.; HARADA, M.; NISHIOKA, I. Eugeniin, a new ellagitannin from cloves. *Chem. Pharm. Bull.* 28 (2), 685-687, 1980.
- NONAKA, G.-I.; ISHIMARU, K.; WATANABE, M.; NISHIOKA, I.; YAMAUCHI, T.; WAN, A. S. C. Tannins and related compounds. LI. Elucidation of the stereochemistry of the triphenoyl moiety in castalagin and vescalagin, and isolation of 1-O-galloyl castalagin from *Eugenia grnadis*. *Chem. Pharm. Bull.* 35 (1), 217-220, 1987.
- OLIVEIRA, M. E. S.; PANTOJA, L.; DUARTE, W. F.; COLLELA, C. F.; VALARELLI, L. T.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R. Fruit wine produced from caigata (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and imonobilised yeast cell fermentation. *Food Res. Int.* 44, 2391-2400, 2011.
- OMAR, R.; LI, L.; YUAN, T.; SERAM, N. a-glucosidase inhibitory hydrolyzable tannins from *Eugenia jambolana* seeds. *J. Nat. Prod.* 75, 1505-1509, 2012.
- PAINULY, P.; TANDON, J. S. Two 3-C-methylflavone glycosides from *Eugenia Kurzii*. *Phytochemistry* 22 (1), 243-245, 1983.
- PATRA, A.; CHAUDHURI, S. K.; ACHRYYA, A. K. Applications of two-dimensional NMR in spectral assignments of some friedelanes and secofriedelanes. *Magn. Reson. Chem.* 28, 85-89, 1990.
- PÉREZ, R. A. Amino acid composition na antioxidant capacity of Spanish honeys. *J. Agric. Food Chem.* 55, 360-365, 2007.
- PIETA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63, 1035-1042, 2000.

- RAJASEKARA, M.; BAPNA, J. S.; LAKSHMANAN, S.; NAIR, A. G. R.; VELRATH, A. J.; PANCHANADAN, M. Antifertility effect in male rats of oleanolic acid, a triterpene from *Eugenia jambolana* flowers. *J. Ethnopharmacol.* 24, 115-121, 1988.
- RAMFUL, D.; AUMJAUD, B.; NEERGUEEN, V. S.; SOOBRAATTEE, M. A.; GOOGOLYE, K.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract in vitro and in model emulsion system. *Food Res. Int.* 44, 1190-1196, 2011.
- REVILLA, J. Plantas úteis da bacia amazônica. Impa, Rio de Janeiro, 2002.
- 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 Chem.* 109, 883-890, 2008
- ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Parana, Brasil. *Acta bot. brás.* 20 (3), 529-548, **2006**.
- SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E. S.; BRAGA, M. F. B. M.; GUEDES, G. M. M.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; ARIAS, A. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M. Anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Exp. Parasitol.* 131, 130-132, **2012**.
- SETZER, W. N.; SCHMIDT, J. M.; NOLETTO, J. A.; VOGLER, B. Leaf oil composition and bioactivities of abaco bush medicines. *Pharmacology on line* 3, 794-802, 2006.
- SIMIRGIOTIS, M. J.; ADACHI, S. A.; TO, S.; YANG, H.; REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; GIL, R. R.; WEINTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Cytotoxic, chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). *Food Chem.* 107, 813-819, 2008.
- SLOWING, K.; SÖLLHUBER, M.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Flavonoid glycosides from *Eugenia jambos*. *Phytochemistry* 37, 255-258, 1994.
- SOOD, R.; SWARUP, D.; BHATIA, S.; KULKARNI, D. D.; DEY, S.; SAINI, M.; DUBEY, S. C. Antiviral activity of crude extracts of *Eugenia jambolana* Lam. Against highly pathogenic avian influenza (H5N1) virus. *Indian J. Exp. Biol.* 50, 179-186, 2012.
- SRIVASTAVA, R.; SHAW, A. K.; KULSHRESHTHA, D. K. Triterpenoids and chalcone from *Syzygium samarangense*. *Phytochemistry* 38 (3), 687-689, 1995.

- STEFANELLO, M. E. A.; CURVI, A. C.; ITO, I. Y.; SALVADOR, H. J.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. L. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae) *J. Essent. Oil. Res.* 20, 75-78, 2008.
- SUBRAMANIAN, S.; NAIR, A. G. R. Flavonoids of the flowers of *Eugenia jambolana*. *Curr Sci India* 41 (19), 703-704, 1972.
- SULTAMA, B.; ANWAR, F.; PRIZYBYLSKI, R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Termina arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. Trees. *Food Chem.* 104, 1106-1114, 2007.
- TALAPATRA, S. K.; SARKAR, A. C.; TALAPATRA, B. Two pentacyclic triterpenes from *Rubia Cordifolia*. *Phytochemistry* 20 (8), 1923-1927, 1981.
- TANAKA, T.; ORII, Y.; NONAKA, G.-I.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. CXXIII. Chromone, acetophenone and phenylpropanoid glycosides and their galloyl and/or hexahydroxydiphenoyl esters from the leaves of *Syzygium aromaticum* Meer. et Perry. *Chem. Pharm. Bull.* 41 (7), 1232-1237, 1993.
- TANAKA, T.; ORII, Y.; NONAKA, G.-I.; NISHIOKA, I.; KOUNO, I. Syzyginins A and B, two ellagitannins from *Syzygium aromaticum*. *Phytochemistry* 43 (6), 1345-1348, 1996.
- THORNHILL, A. H.; POPPLE, L. W.; CARTER, R. J.; HO, S. Y. W.; CRISP, M. D. Are pollen fossils usefull for calibrating relaxed molecular clock dating of phylogenies? A comparative study using Myrtaceae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 63, 15-27, 2012.
- TIMBOLA, A. K.; SZPONICZ, B.; BRANCO, A.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. *Fitgoterapia* 73, 174-176, 2002.
- VAN DER MERWE, M. M.; VAN WYK, A. E.; BOTHA, A. M. Molecular phytogetic of *Eugenia* L. (Myrtaceae), with emphasis on southern African taxa. *Plant Syst. Evol.* 251, 21-34, 2005.
- VELANDIA, J. R. Constituintes químicos de *Ouratea semiserrata* e transformações químicas da neolignana aureina. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Química, Instituto de Ciencias Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997.
- VEIGAS, J. M.; NARAYAN, M. S.; LAXMAN, P. M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit pell of *Syzygium cumini* Skeels. *Food. Chem.* 105, 619-627, 2007.

- VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; DA SILVA, W. P.; DA MOTTA, A. S.; NASCENTE, P. S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidante and antimicrobial properties. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2668-2674, 2012.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim. Nova* 29 (2), 326-337, 2006.
- VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A. Constituintes Químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). *Quim. Nova* 27 (4), 536-539, 2004.
- WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analisis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* 37, 99-105, 1998.
- YANG, L. L.; LEE, C. Y.; YEN, K. Y. Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer Lett.* 157, 65-75, **2000**.
- YANG, L.-L.; LEE, C.-Y.; YEN, K.-Y. Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer Lett.* 157, 65-75, 2000.
- YE, C.-L.; LU, Y.-H.; WEI, D.-Z. Flavonoids from *Cleistocalyx operculatus*. *Phytochemistry* 65, 445-447, 2004.
- YOO, C.-B.; HAN, K.-T.; CHO, K.-S.; HA, J.; PARK, H.-S.; NAM, S.-H.; KIL, U.-H.; LEE, K.-T. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett.* 225, 41-52, 2005.