

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Eugenia myrcianthes* – BUSCA DE
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

JAQUELINE RAQUEL BATALHÃO *

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, na área de concentração QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

*Bolsista CNPq

São Carlos – SP

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B328ef Batalhão, Jaqueline Raquel.
Estudo fitoquímico de *Eugenia myrcianthes* : busca de substâncias bioativas / Jaqueline Raquel Batalhão. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
143 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Produtos naturais. 2. *Eugenia myrcianthes*. 3. Flavonoides. 4. Antioxidantes. I. Título.

CDD: 547.3 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata
Jaqueline Raquel Batalhão, realizada em 04 de abril de 2014:

João Batista Fernandes

Prof. Dr. João Batista Fernandes

Paulete Romoff

Profa. Dra. Paulete Romoff

Ana Helena Januário

Profa. Dra. Ana Helena Januário

Dedico esta dissertação a meus pais, Edson e Eliana, e à minha irmã Isabela por todo amor, incentivo, dedicação e por sempre estarem ao meu lado fazendo meus dias mais felizes. Meu amor por vocês é eterno!

Ao meu namorado João Paulo, pelo companheirismo, compreensão, amizade, atenção, carinho e amor em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por todas oportunidades a mim concedidas, pela proteção e sabedoria em todos os momentos.

Aos meus pais Edson e Eliana, por muitas vezes abriram mão de seus sonhos para a realização dos meus.

A minha irmã Isabela, pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu namorado João Paulo, pelo companheirismo e amor.

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes pelo apoio, confiança, ensinamentos, paciência e pela orientação.

As professoras da banca, Profa. Dra. Paulete Ramoff e Profa. Dra. Ana Helena Januário pela disponibilidade e contribuição na conclusão deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, Dr. Moacir Rossi Forim, Dr. Paulo César Vieira e Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva pelos ensinamentos e contribuição para a conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. Odair Corrêa Bueno e a aluna Marcela Ceccato, do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP Rio Claro- SP, pela colaboração na realização dos ensaios biológicos com as formigas cortadeiras.

Ao professor Dr. Valdecir Farias Ximenes e o aluno Maicon Segalla Petrônio, do Laboratório de Eletroanalítica – UNESP Bauru – SP, pelo ensinamento e colaboração na realização dos ensaios de atividade antioxidante.

À Dra. Ana Paula Terezan, pelo ensinamento, paciência e amizade para a realização dos ensaios antimicrobianos.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, pelas análises realizadas e pela utilização dos equipamentos, principalmente o de Ressonância Magnética Nuclear 600 MHz.

À técnica Luciana Vizotto, do Laboratório de RMN, pela grande colaboração e paciência durante a realização deste trabalho e por estar sempre disposta a ajudar.

À Karlinha pela contribuição nas análises no CG-EM e pela amizade conquistada com o tempo.

Ao Bruno Perlatti pela contribuição nas análises no LC-MS.

Ao Marcondy pela contribuição dada no trabalho e boa convivência.

Aos técnicos Waldir e Júlia pelo grande apoio e colaboração para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Sérgio Sartori por ceder o material vegetal estudado.

À minha amiga mais que querida, a doutoranda Vanessa de Cássia Domingues, amiga de todas as horas e para todas as horas, pelo companheirismo, paciência, compreensão, conselhos, ajuda e carinho.

Aos meus amigos do laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, pelos momentos de descontração e contribuição direta ou indireta na conclusão deste trabalho, pelo apoio, conselhos, conversas, amizade e pelos bons momentos vividos ao longo desses anos, deixando o ambiente mais alegre. Vou sentir saudades de todos!!

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ_H	Deslocamento químico de hidrogênio em ppm
δ_C	Deslocamento químico de carbono em ppm
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
\emptyset	Diâmetro
λ	Comprimento de onda
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AlCl_3	Cloreto de Alumínio
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APG	Angiosperm Phylogeny Group
ATCC	American Type Culture Collection
atm	Atmosferas
CC	Coluna Cromatográfica
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CD_3OD	Metanol deuterado
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CI	Concentração Inibitória em 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlated Spectroscopy
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo-dubleto
DPPH	2-difenil-1-picrilhidrazila

DMSO-<i>d</i>₆	Dimetil sulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Electrospray Ionization
e.V.	Eletron volts
g	Gramas
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
H₂O	Água
h	Altura
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
IE	Ionização por Impacto Eletrônico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
Md	Sobrevivência mediana das operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>
MeOH	Metanol
mg	Miligramas
MHz	Mega hertz
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
sin.	Sinônimo
<i>t</i>	Triplete
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV-Vis	Ultravioleta-visível
v/v	Proporção volume/volume

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Extratos obtidos pela extração com etanol de folhas e galhos de <i>Eugenia myrcianthes</i>	23
TABELA 3.2 - Massas das partições dos extratos etanólicos das folhas de <i>Eugenia myrcianthes</i>	27
TABELA 4.1 - Configurações e constante de acoplamento J (Hz) dos glicosídeos (HARBONE & MABRY, 1982).....	48
TABELA 4.2 - Deslocamentos químicos de hidrogênios anoméricos de glicosídeos de flavonoides C -glicosilados (DMSO- d_6) (HARBONE & MABRY, 1982).....	49
TABELA 4.3 - Deslocamentos químicos de hidrogênios anoméricos de açúcares glicosídeos de flavonoides $3-O$ -glicosilados (DMSO- d_6) (HARBONE & MABRY, 1982).....	50
TABELA 4.4 - Deslocamentos químicos de hidrogênios anoméricos de açúcares glicosídeos de flavonoides em posições diferentes da posição $3-O$ -glicosilados (DMSO- d_6) (HARBONE & MABRY, 1982).....	51
TABELA 4.5 - Dados de RMN 1H (CD $_3$ OD, 400 MHz) e de RMN ^{13}C (CD $_3$ OD, 100 MHz) da substância I e comparação com a Miricetina- $3-O-\alpha$ -L-ramnosídeo (ISIDORO et al., 2012, CD $_3$ OD, RMN 1H 400 MHz e RMN ^{13}C 100 MHz) ...	54
TABELA 4.6 - Dados de RMN 1H (CD $_3$ OD, 400 MHz) e de RMN ^{13}C (CD $_3$ OD, 100 MHz) da substância II e comparação com a Miricetina- $3-O-\alpha$ -L-arabinopiranosídeo (MADIKIZELA et al., 2013, CD $_3$ OD, RMN 1H 500 MHz e RMN ^{13}C 125 MHz).....	60
TABELA 4.7 - Dados de RMN 1H (CD $_3$ OD, 400 MHz) e de RMN ^{13}C (CD $_3$ OD, 100 MHz) da substância III e comparação com a Miricetina- $3-O-\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (SHEN et al., 2009, CD $_3$ OD, RMN 1H 400 MHz e RMN ^{13}C 100 MHz).....	66

TABELA 4.8 - Dados de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHz) da substância IV e comparação com a Miricetina-3- <i>O</i> -β-D-galactosídeo (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009, CD ₃ OD, 400 MHz) e RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHz) da substância V e comparação com a Miricetina-3- <i>O</i> -β-D-glicosídeo (KAZUMA et al., 2003, CD ₃ OD, 400 MHz).....	72
TABELA 4.9 - Dados de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) da substância VI e comparação com a Quercetina-3- <i>O</i> -α-L-arabinopiranosídeo (FRAISSE et al., 2000, DMSO- <i>d</i> ₆ , RMN ¹ H 300 MHz e RMN ¹³ C 75 MHz)	76
TABELA 4.10 - Dados de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) e de RMN ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz) da substância VII e comparação com a Quercetina-3- <i>O</i> -α-L-arabinopiranosídeo (RODRIGUES et al., 2009, DMSO- <i>d</i> ₆ , RMN ¹ H 400 MHz e RMN ¹³ C 100 MHz)	82
TABELA 4.11 - Dados de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) da substância VIII e comparação com a Quercetina-3- <i>O</i> -β-L-xilosídeo (KALEGARI et al., 2011, CD ₃ OD, RMN ¹ H 300 MHz e RMN ¹³ C 75 MHz).....	89
TABELA 4.12 - Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância IX e comparação com a Xantiletina (CAZAL et al., 2009, CDCl ₃ , 400 MHz).....	94
TABELA 4.13 - Dados de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHz) e de RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 150 MHz) da substância X e comparação com 3-(<i>E</i>)-coumaroyl α-amirina (JUTIVIBOONSUK et al., 2007, CDCl ₃ , RMN ¹ H 400 MHz e RMN ¹³ C 100 MHz).....	99
TABELA 4.14 - Dados de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) e de RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 150 MHz) da substância XI e comparação com 3-(<i>Z</i>)-coumaroyl α-amirina (JUTIVIBOONSUK et al., 2007, CDCl ₃ , RMN ¹ H 400 MHz e RMN ¹³ C 100 MHz).....	100
TABELA 4.15 - Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) e de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) da substância XII e nonacosanoato de 2-(4'-hidroxifenil)etila (KUMAR et al., 2005, CDCl ₃ , RMN ¹ H 400 MHz e RMN ¹³ C 100 MHz).....	109

TABELA 4.16 - Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) e de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) da substância XIII e comparação com 1-octacosanol (FIRDOUS et al., 2014, CDCl ₃ , RMN ¹ H 300 MHz e RMN ¹³ C 75,0 MHz)	109
TABELA 4.17 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com o extrato bruto etanólico das folhas e galhos de <i>E. myrcianthes</i>	118
TABELA 4.18 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com as frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato EMF	120
TABELA 4.19 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com o flavonoide glicosilado miricetrina (substância I)	122
TABELA 4.20 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL, para o extrato bruto e suas frações de <i>Eugenia myrcianthes</i> frente aos microrganismos	127
TABELA 4.21 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL, das substâncias obtidas de <i>Eugenia myrcianthes</i> frente aos microrganismos	129
TABELA 4.22 - Valores da média e desvios padrões do CI ₅₀ para o DPPH com extratos e partições de <i>Eugenia myrcianthes</i>	130
TABELA 4.23 - Valores da média e desvios padrões do CI ₅₀ para o DPPH das substâncias obtidas de <i>Eugenia myrcianthes</i>	132

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1–Árvore jovem cheia de flores e frutos de <i>Eugenia myrcianthes</i> (Fonte: http://www.colecionandofrutas.org/eugeniamyrcianthes.htm).....	4
FIGURA 1.2 - Alguns constituintes químicos identificados dos óleos essenciais de <i>Eugenia myrcianthes</i> (APEL et al., 2005).....	5
FIGURA 1.3 - Substâncias isoladas de <i>Eugenia myrcianthes</i> (SCHMEDA-HIRSCHMANN & ZUNIGA, 1996).....	6
FIGURA 1.4 - Formigas cortadeiras (Fonte: MARINHO et al., 2006).	7
FIGURA 1.5 - Relação de simbiose entre as formigas e seu fungo simbiote (<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>) nos ninhos de formigas cortadeiras (BOULOGNE et al., 2012).....	11
FIGURA 1.6 - Estrutura química dos inseticidas aldrin, dodecacloro e sulfluramida.	13
FIGURA 1.7 - Antioxidantes sintéticos: butilhidróxitolueno (BHT), o butilhidróxianisol (BHA) e o <i>terc</i> -butilhidroquinona (TBHQ).....	15
FIGURA 3.1 - Espectro de RMN ¹ H do extrato EMF (CD ₃ OD, 400 MHz).	24
FIGURA 3.2 - Espectro de RMN ¹ H do extrato EMG (CD ₃ OD, 400 MHz).	25
FIGURA 3.3 – Reação do Radical DPPH.....	38
FIGURA 4.1 - Classificação dos flavonoides por subclasses.....	44
FIGURA 4.2 - Estrutura básica de um flavonoide (designação dos anéis e numeração dos átomos de carbono).....	44
FIGURA 4.3 - Biossíntese dos flavonoides (DEWICK, 2009).	46
FIGURA 4.4 - Estruturas dos glicosídeos.....	48
FIGURA 4.5 - Espectro de RMN ¹ H da substância I (CD ₃ OD, 400 MHz).....	55
FIGURA 4.6 - Mapa de contornos COSY da substância I (CD ₃ OD, 400 MHz).	56
FIGURA 4.7 - Mapa de correlações HSQC da substância I (CD ₃ OD, 400 MHz).	56

FIGURA 4.8 - Mapa de correlações HMBC da substância I (CD ₃ OD, 400 MHz).	57
FIGURA 4.9 - Espectro de RMN ¹ H da substância II (CD ₃ OD, 400 MHz).....	61
FIGURA 4.10 - Mapa de contornos COSY da substância II (CD ₃ OD, 400 MHz).	62
FIGURA 4.11 - Mapa de correlações HSQC da substância II (CD ₃ OD, 400 MHz).....	62
FIGURA 4.12 - Mapa de correlações HMBC da substância II (CD ₃ OD, 400 MHz).....	63
FIGURA 4.13 - Espectro de RMN ¹ H da substância III (CD ₃ OD, 400 MHz). ..	67
FIGURA 4.14 - Mapa de contornos COSY da substância III (CD ₃ OD, 400 MHz).....	68
FIGURA 4.15 - Mapa de correlações HSQC da substância III (CD ₃ OD, 400 MHz).....	68
FIGURA 4.16 - Mapa de correlações HMBC da substância III (CD ₃ OD, 400 MHz).....	69
FIGURA 4.17 - Espectro de massas no modo positivo da substância IV.	71
FIGURA 4.18 - Espectro de massas no modo positivo da substância V.	72
FIGURA 4.19 - Espectro de RMN ¹ H da substância IV e V (CD ₃ OD, 400 MHz).	73
FIGURA 4.20 - Espectro de RMN ¹ H da substância VI (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).	77
FIGURA 4.21 - Mapa de contornos COSY da substância VI (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	78
FIGURA 4.22 - Mapa de correlações HSQC da substância VI (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	78
FIGURA 4.23 - Mapa de correlações HMBC da substância VI (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	79

FIGURA 4.24 - Espectro de RMN ^1H da substância VII (DMSO- d_6 , 400 MHz).	83
FIGURA 4.25 - Mapa de contornos COSY da substância VII (DMSO- d_6 , 400 MHz).	84
FIGURA 4.26 - Mapa de correlações HSQC da substância VII (DMSO- d_6 , 400 MHz).	84
FIGURA 4.27 - Mapa de correlações HMBC da substância VII (DMSO- d_6 , 400 MHz).	85
FIGURA 4.28 - Espectro de RMN ^1H da substância VIII (CD $_3$ OD, 600 MHz).	90
FIGURA 4.29 - Mapa de contornos COSY da substância VIII (CD $_3$ OD, 600 MHz).	91
FIGURA 4.30 - Mapa de correlações HSQC da substância VIII (CD $_3$ OD, 600 MHz).	91
FIGURA 4.31 - Mapa de correlações HMBC da substância VIII (CD $_3$ OD, 600 MHz).	92
FIGURA 4.32 - Espectro de RMN ^1H da substância IX (400 MHz, CDCl $_3$).	95
FIGURA 4.33 - Espectro de RMN ^1H da substância X e XI (CD $_3$ OD, 400 MHz).	101
FIGURA 4.34 - Mapa de contornos COSY da substância X e XI (CD $_3$ OD, 600 MHz).	102
FIGURA 4.35 - Mapa de correlações HSQC da substância X e XI (CD $_3$ OD, 600 MHz).	102
FIGURA 4.36 - Mapa de correlações HMBC da substância X e XI (CD $_3$ OD, 600 MHz).	103
FIGURA 4.37 - Cromatograma obtido no CG-EM para a substância XIV. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 100 °C; tempo inicial de 5,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 15 °C/min. até 310 °C, permanecendo na temperatura de 310 °C por 19,0 min.	106
FIGURA 4.38 – Espectro de massas da substância XII.	106

FIGURA 4.39 - Espectro de massas da substância XIII.....	106
FIGURA 4.40 - Proposta de fragmentação para a substância XII.	107
FIGURA 4.41 - Proposta de fragmentação para a substância XIII.....	108
FIGURA 4.42 - Espectro de RMN ¹ H das substâncias XII e XIII (CDCl ₃ 400 MHz).....	110
FIGURA 4.43 - Mapa de contornos COSY das substâncias XII e XIII (CDCl ₃ 400 MHz).....	111
FIGURA 4.44 - Mapa de correlações HSQC das substâncias XII e XIII (CDCl ₃ 400 MHz).....	111
FIGURA 4.45 - Mapa de correlações HMBC das substâncias XII e XIII (CDCl ₃ 400 MHz).....	112
FIGURA 4.46 - Espectro de RMN ¹ H da substância XIV (CDCl ₃ , 400 MHz).114	
FIGURA 4.47 - Cromatograma obtido no GC-EM para a substância XIV. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 150 °C; tempo inicial de 5,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 6 °C/min. até 280 °C, permanecendo na temperatura de 280 °C por 20,0 min.	115
FIGURA 4.48 - Espectro de massas do β-sitosterol.....	115
FIGURA 4.49 - Proposta de fragmentação do β-sitosterol.....	116

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 3.1 – Metodologia utilizada na partição líquido-líquido para o extrato das folhas de <i>Eugenia myrcianthes</i>	24
FLUXOGRAMA 3.2 – Fracionamento de EMFa.....	25
FLUXOGRAMA 3.3 – Fracionamento de S1-2.....	26
FLUXOGRAMA 3.4 – Fracionamento de S1-3.....	26
FLUXOGRAMA 3.5 – Fracionamento de S2-5.....	27
FLUXOGRAMA 3.6 – Fracionamento de S3-4.....	28
FLUXOGRAMA 3.7 – Fracionamento de S3-5.....	29
FLUXOGRAMA 3.8 – Fracionamento de S3-6.....	30
FLUXOGRAMA 3.9 – Fracionamento de EMFh.....	31

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 4.1 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com o extrato bruto etanólico das folhas e galhos de <i>E. myrcianthes</i>	118
GRÁFICO 4.2 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com as frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato EMF.	120
GRÁFICO 4.3 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com o flavonoide glicosilado miricetrina (substância I).	122
GRÁFICO 4.4 - Efeito dos extratos brutos etanólicos das folhas (EMF) e dos galhos (EMG) no crescimento micelial do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	124
GRÁFICO 4.5 - Efeito dos extratos brutos etanólicos das folhas (EMF) e dos galhos (EMG) no crescimento micelial do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	125
GRÁFICO 4.6 - Efeito da substância I no crescimento micelial do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	126
GRÁFICO 4.7 - Potencial de supressão do radical DPPH pelos extratos e partições obtidos de <i>Eugenia myrcianthes</i> , expresso em CI_{50} (média \pm desvio padrão, n=3).	130
GRÁFICO 4.8 - Potencial de supressão do radical DPPH das substâncias obtidas de <i>Eugenia myrcianthes</i> , expresso em CI_{50} (média \pm desvio padrão, n=3).	131

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Eugenia myrcianthes* – BUSCA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

A busca de novas substâncias com potencial bioativo é alvo de inúmeros estudos inseridos na química de produtos naturais, que envolve desde a elucidação estrutural até o mecanismo de ação das mesmas. Algumas espécies de *Eugenia* foram amplamente estudadas e apresentaram uma grande diversidade de metabólitos secundários, associados às diferentes atividades biológicas dos constituintes, o que tem justificado o interesse no estudo de espécies desta família para a busca de compostos ativos. A espécie *Eugenia myrcianthes* tem seu potencial químico e biológico pouco conhecido. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico de *E. myrcianthes* buscando isolamento e caracterização de seus constituintes químicos, assim como a avaliação do efeito dos extratos, frações e substâncias puras isoladas, realizando ensaios antifungo, antibacteriano, antioxidante e inseticida. Foram isolados e/ou identificados neste trabalho oito flavonoides glicosilados: miricetina-3-*O*- α -L-raminosídeo (Miricetrina), miricetina-3-*O*- α -L-arabnopiranosídeo, miricetina-3-*O*- α -L-arabnofuranosídeo, miricetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, miricetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, quercetina-3-*O*- α -L-arabnopiranosídeo (Guajavarina), quercetina-3-*O*- α -L-arabnofuranosídeo (Avicularina) e quercetina-3-*O*- β -L-xilosídeo, uma cumarina: xantiletina, dois triterpenos: 3 β -*O*-*trans*-p-cumaroil- α -amirina e 3 β -*O*-*cis*-p-cumaroil- α -amirina, um derivado do tirosol: Tricosanoato de 2-(4'-hidroxifenil)etila, um álcool de cadeia alifática saturada longa: 1-octacosanol e um esteroide: β -sitosterol. Os extratos das folhas, galhos, e as frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica das folhas de *E. myrcianthes* e algumas substâncias puras foram ensaiados frente às formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela técnica de microdiluição, frente aos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Também foi avaliada a atividade antioxidante utilizando a técnica de supressão de espécies radicalares, DPPH (2-difenil-1-picrilhidrazila).

ABSTRACT

PHYTOCHEMISTRY STUDY OF *Eugenia myrcianthes* - SEARCH FOR BIOACTIVE SUBSTANCES

The search for new substances with bioactive potential is the target of numerous studies inserted in the chemistry of natural products, since it involves the isolation, the structural elucidation, as well as the action mechanism of the compounds. Some species of *Eugenia* were widely studied showing a great diversity of secondary metabolites associated with different biological activities of their constituents, which have justified the interest in the study of species of this family in the search for active compounds. The *Eugenia myrcianthes* specie has its chemical and biological potential little known. In this context, the aim of this study was the phytochemistry study of *E. myrcianthes* seeking isolation and characterization of their chemical constituents, as well as evaluation of the effect of crude extracts, fractions and isolated substances, performing antifungal, antimicrobial, antioxidant and insecticidal assays. This study allowed the isolation and/or identification of eight flavonoid glycosides: myricetin-3-O- α -L-rhamnoside (Myricetrin), myricetin-3-O- α -L-arabnopyranoside, myricetin-3-O- α -L-arabnofuranoside, myricetin-3-O- β -D-glucopyranoside, myricetin-3-O- β -D-galactopyranoside, quercetin-3-O- α -L-arabnopyranoside (Guajavarin), quercetin-3-O- α -L-arabnofuranoside (Avicularin) and quercetin-3-O- β -L-xyloside, one coumarin: xanthyletin, two triterpenes: 3 β -*O*-*cis*-*p*-coumaroil- α -amyrin and 3 β -*O*-*trans*-*p*-coumaroil- α -amyrin, one tyrosol derivative: 2-(4'-hydroxyphenyl)ethyl tricosanoate, one alcohol of long chain: 1-octacosanol and one sterol: β -sitosterol. The crude extracts from the leaves, twigs, and the fractions hexane, ethyl acetate and hydroalcoholic of the leaves of *E. myrcianhtes* and some pure substances were tested against leaf cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*; its symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*; for antimicrobial activity by microdilution technique, against the microorganisms *Pseudomonas aeuroginosas*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* and *Candinda tropicalis*. They were also evaluated for antioxidant activity using the technique of suppression of radical species, DPPH (2-diphenyl-1-picrylhydrazile).

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Ordem Myrtales	1
1.2 - Família Myrtaceae	1
1.3 - Gênero <i>Eugenia</i>	3
1.3.1 - <i>Eugenia myrcianthes</i>	4
1.4 - Formigas Cortadeiras	7
1.4.1 - Simbiose	10
1.4.2 - Métodos de Controle	12
1.5 - Microrganismos	14
1.6 - Antioxidantes	15
2 - OBJETIVOS	17
3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	19
3.1 - Materiais e Métodos	19
3.2 - Equipamentos	20
3.3 - Material Botânico	22
3.4 - Obtenção dos Extratos de <i>Eugenia myrcianthes</i>	22
3.5 - Fracionamento dos Extratos de <i>Eugenia myrcianthes</i>	26
3.5.1 - Partição Líquido-Líquido do Extrato Etanólico das Folhas <i>Eugenia myrcianthes</i>	26
3.5.2 - Fracionamento da Fração EMFa	27
3.5.3 - Fracionamento da Fração EMFh	33
3.5.4 - Metodologia dos Ensaiois	33

3.5.4.1 - Ensaio por Ingestão com as Operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	33
3.5.4.2 – Ensaio Biológico com o Fungo Simbionte <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	35
3.5.4.3 – Ensaio Antimicrobiano	36
3.5.4.4 – Ensaio de Atividade Antioxidante.....	37
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 – Substâncias Isoladas/ Identificadas.....	39
4.1.1 – Flavonoides.....	43
4.1.1.1 – Identificação Estrutural da Substância I	52
4.1.1.2 – Identificação Estrutural da Substância II	58
4.1.1.3 – Identificação Estrutural da Substância III.....	64
4.1.1.4 – Identificação Estrutural das Substâncias IV e V	70
4.1.1.5 – Identificação Estrutural da Substância VI	74
4.1.1.6 – Identificação Estrutural da Substância VII	80
4.1.1.7 – Identificação Estrutural da Substância VIII.....	86
4.1.2 – Cumarina	93
4.1.2.1 – Identificação Estrutural da Substância IX	93
4.1.3 – Triterpenos.....	96
4.1.3.1 – Identificação Estrutural das Substâncias X e XI.....	96
4.1.4 – Derivados do Tirosol (<i>p</i> -hidroxifeniletanol).....	104
4.1.4.1 – Identificação Estrutural das Substâncias XII e XIII.....	104
4.1.5 – Esteróide	113
4.1.5.1 – Identificação Estrutural da Substância XIV.....	113
4.2 – Ensaio.....	117

4.2.1 – Ensaio por Ingestão com as Operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	117
4.2.1.1 – Efeito dos Extratos Brutos Etanólico de <i>Eugenia myrcianthes</i> Frente às Operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	117
4.2.1.2 – Efeito das Frações das Folhas de <i>Eugenia myrcianthes</i> Frente às Operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	119
4.2.1.3 – Efeito da Substância Obtida de <i>Eugenia myrcianthes</i> Frente às Operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	120
4.2.2 – Ensaio com o Fungo Simbionte <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	123
4.2.2.1 – Atividades Inibitórias dos Extratos Brutos Etanólico de <i>Eugenia myrcianthes</i> sobre o Fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	123
4.2.2.2 – Atividades Inibitórias das Frações de <i>Eugenia myrcianthes</i> sobre o Fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	124
4.2.2.3 – Atividades Inibitórias da Substância Obtida de <i>Eugenia myrcianthes</i> sobre o Fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	125
4.2.3 – Ensaio Antimicrobiano	126
4.2.3.1 – Ensaio Antimicrobiano do Extrato Bruto Etanólico e das Frações de <i>Eugenia myrcianthes</i>	126
4.2.3.2 – Ensaio Antimicrobiano das Substâncias Obtidas de <i>Eugenia myrcianthes</i>	128
4.2.4 – Ensaio de Atividade Antioxidante	129
4.2.4.1 - Atividade Antioxidante do Extrato Bruto Etanólico e das Frações de <i>Eugenia myrcianthes</i>	129
4.2.4.2 – Atividade Antioxidante das Substâncias Obtidas de <i>Eugenia myrcianthes</i>	131
5 – CONCLUSÕES	133

6	– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
----------	---	------------

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Ordem Myrtales

A ordem Myrtales pertence ao grupo das angiospermas, divisão Spwematophyta, subdivisão Magnoliophytina (Angiospermae), classe Magnoliopsida e subclasse Rosidae (Jardim Botânico UTAD - Ordem Myrtales <http://jb.utad.pt/ordem/myrtales>, 21/12/2013). Segundo Angiosperm Phylogeny (2013), esta ordem é constituída por 380 gêneros e 11.077 espécies e são reconhecidas nove famílias: Alzateaceae, Combretaceae, Crypteroniaceae, Peneaceae, Lythraceae, Onagraceae, Melastomataceae, Vochysiaceae e Myrtaceae (Angiosperm Phylogeny Website <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, 21/12/2013).

Plantas da ordem Myrtales são conhecidas por apresentarem cascas esfoliantes, folhas opostas com coléter, e em sua maioria com a presença de pequenas estípulas e nervação intramarginal fortemente marcadas; flores com pétalas que podem ser muito estreitas na base, ovário frequentemente ínfero e usualmente hipanto nectarífero; sépalas geralmente valvadas e estames curvos no botão (Angiosperm Phylogeny Website <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, 21/12/2013).

1.2 – Família Myrtaceae

A família Myrtaceae é constituída de aproximadamente 140 gêneros e 5600 espécies (GOVAERTS et al., 2005), pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae e à ordem Myrtales (CRONQUIST, 1988 *apud* CONCEIÇÃO & ARAGÃO, 2010).

É tradicionalmente organizada em duas subfamílias, a primeira Leptospermoideae de ocorrência na Austrália e Polinésia, representada por frutos secos (do tipo baga) e folhas alternadas; a segunda, Myrtoideae distribui-se principalmente na América do Sul e Central, compreende espécies com frutos

carneiros e folhas opostas (CONCEIÇÃO & ARAGÃO, 2010), exceto a espécie *Tepualia stipulares* (Hook) Griseb, encontrada na Argentina e no Chile (VALLILO et al., 2006; AURICCHIO & BACCHI, 2003).

No Brasil, está representada por apenas uma tribo Myrtae e três subtribos: Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae, com aproximadamente 1000 espécies, incluídas em 23 gêneros (LANDRUM & KAWASAKI, 1997).

Essa família é de grande importância nos ecossistemas brasileiros, está entre as famílias mais comuns na maioria das formações vegetais, com destaque para a floresta Atlântica e as restingas. As mirtáceas são encontradas como arbustos ou árvores, frequentemente com cascas esfoliantes e apresentam numerosos canais olíferos, presentes na forma de glândulas translúcidas nas folhas, flores, frutos e sementes (LANDRUM & KAWASAKI, 1997; ARAGÃO & CONCEIÇÃO, 2008; CONCEIÇÃO & ARAGÃO, 2010).

As mirtáceas brasileiras normalmente não produzem madeiras valiosas, restringindo-se apenas ao fornecimento de lenha, à utilização em pequenas peças e objetos, e outras formas de uso local. Por outro lado, muitas espécies fornecem frutos comestíveis, algumas exploradas comercialmente (GRESSLER et al., 2006).

Alguns estudos mostram que diversas substâncias foram isoladas de plantas dessa família como óleos essenciais, flavonoides, taninos, entre outras (FERREIRA et al., 2011). Dentre essas espécies estudadas algumas têm sido usadas para tratamento de diarreias (SANTOS et al., 2011; BRANDELLI et al., 2009), propriedades terapêuticas (GUTIÉRREZ et al., 2008), fabricação de cosméticos, em indústrias farmacêuticas (FERREIRA et al., 2011), atividades citotóxicas (MAHMOUND et al., 2011), antifúngica (JAVOID & REHMAN, 2011) entre outras utilidades.

Esta diversidade de metabólitos secundários, associada às diferentes atividades biológicas dos constituintes tem justificado o interesse no estudo de espécies desta família para a busca de compostos ativos.

1.3 – Gênero *Eugenia*

Eugenia L. (inclui os gêneros *Hexachlamys* e *Calycorectes*) é o maior gênero da família das Myrtaceas, com cerca de 1000 espécies, estimadas 350 espécies para o Brasil, onde se encontra representado nas diversas formações vegetais (GOVAERTS et al., 2008; LANDRUM & KAWASAKI, 1997; ROMAGNOLO & SOUZA, 2007). O gênero ocorre desde o México até o norte e nordeste da Argentina, Uruguai e Paraguai, sendo originário do oeste ou sudeste da América do Sul, migrando desde as regiões andinas para o norte ou nordeste da América do Sul (LUCAS et al., 2007). Plantas desse gênero consistem em árvores ou arbustos verdes durante o ano todo. O fruto é esférico, geralmente comestível, uma baga de até 3 centímetros de diâmetro, coroado pelo cálice e achatado nas extremidades (AURICCHIO & BACCHI, 2003). Os frutos comestíveis de muitas espécies desse gênero são apreciados pelos homens e pelos animais silvestres, como a pitanga (*Eugenia uniflora* Lam.), jaboricada (*Eugenia edulis*), jambolão (*Eugenia jambolana*) entre outras.

O estudo fitoquímico deste gênero levou ao isolamento de diversos metabólitos secundários como taninos, flavonoides, antocianinas, chalcona, triterpenos e óleos essenciais (KUSKOSKI et al., 2006; JUNG et al., 2013; DOMINGUES et al., 2010; COUTINHO et al., 2010; YANG et al., 2000; FERREIRA et al., 2011). Devido ao alto teor de compostos fenólicos, espécies do gênero *Eugenia* são caracterizadas por apresentarem alta atividade antioxidante (EINBOND et al., 2004).

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

Dentre as espécies do gênero *Eugenia* poucas foram amplamente estudadas do ponto de vista farmacológico, como atividade antimicrobiana, atividade antiepilética, atividade citotóxica, antitumoral e antifúngica, atividade inseticida e "antifeedant", antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, ação

hipoglicemiante, anti-hipertensiva, inibidora da enzima xantina oxidase e atividade antiviral (OUSSALAH et al., 2007; POURGHOLAMI et al., 1999; GAYOSO et al., 2005; YOO et al., 2005; HAN et al., 2006; HONG et al., 2003; PEPATO et al., 2005; SHARMA et al., 2006; SHARMA et al., 2008; LORCA et al., 1995; THEODULOZ et al., 1988).

1.3.1 – *Eugenia myrcianthes*

Eugenia myrcianthes (sin. *Hexachlamys edulis*) (Figura 1.1), conhecida popularmente como ivaí, pêssego-do-mato, ubájai, ibája ou uvaião, produz frutos comestíveis que são utilizados para a produção de geléias e sucos. Possui ampla dispersão pelo território brasileiro ocorrendo no sul, sudeste e centroeste chegando até o Paraguai, norte e nordeste da Argentina e Uruguai (ROMAGNOLO & SOUZA, 2007).



FIGURA 1.1–Árvore jovem cheia de flores e frutos de *Eugenia myrcianthes* (Fonte: <http://www.colecionandofrutas.org/eugeniamyrcianthes.htm>).

Na medicina popular, o chá das folhas tem sido utilizado para tratamento de diabetes (LORCA et al., 1995) e mostrou ser ativa frente a enzima xantina oxidase (THEODULOZ et. al, 1988). Essa espécie é ainda pouco conhecida sobre seu potencial químico e biológico, mas há relatos na literatura de isolamentos de óleos essenciais (Figura 1.2), flavonoides e taninos (Figura 1.3) (APEL et al., 2005; SCHMEDA-HIRSCHMANN & ZUNIGA, 1996).

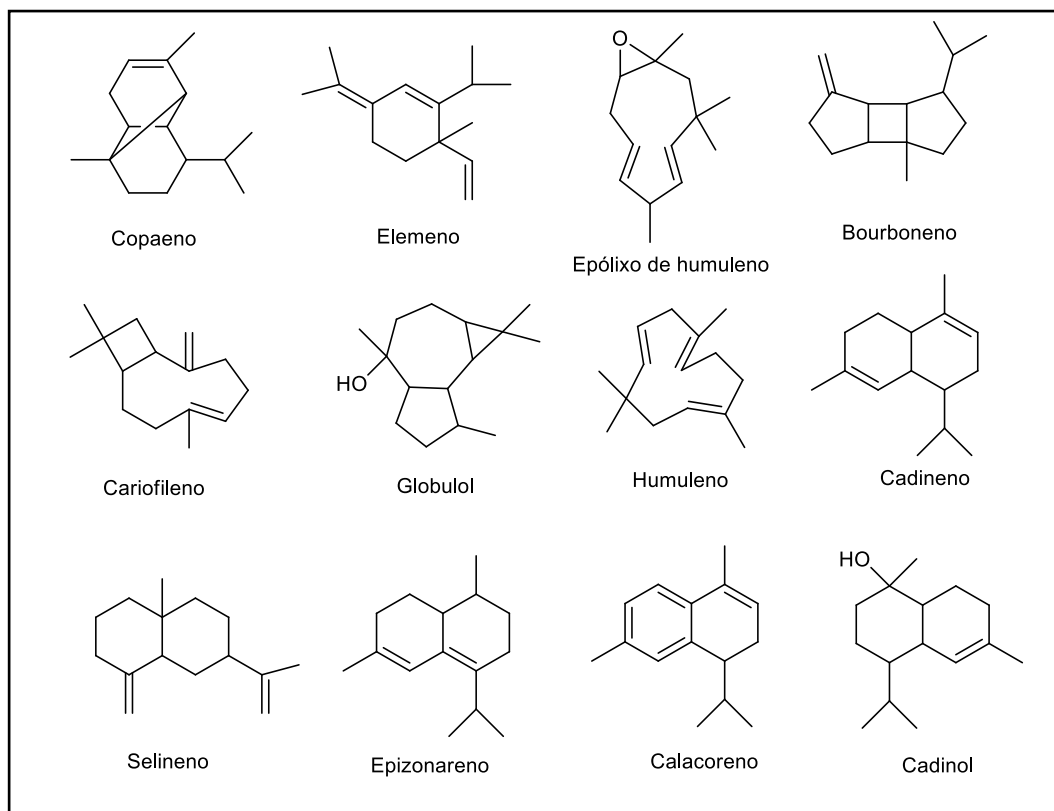


FIGURA 1.2 - Alguns constituintes químicos identificados dos óleos essenciais de *Eugenia myrcianthes* (APEL et al., 2005).

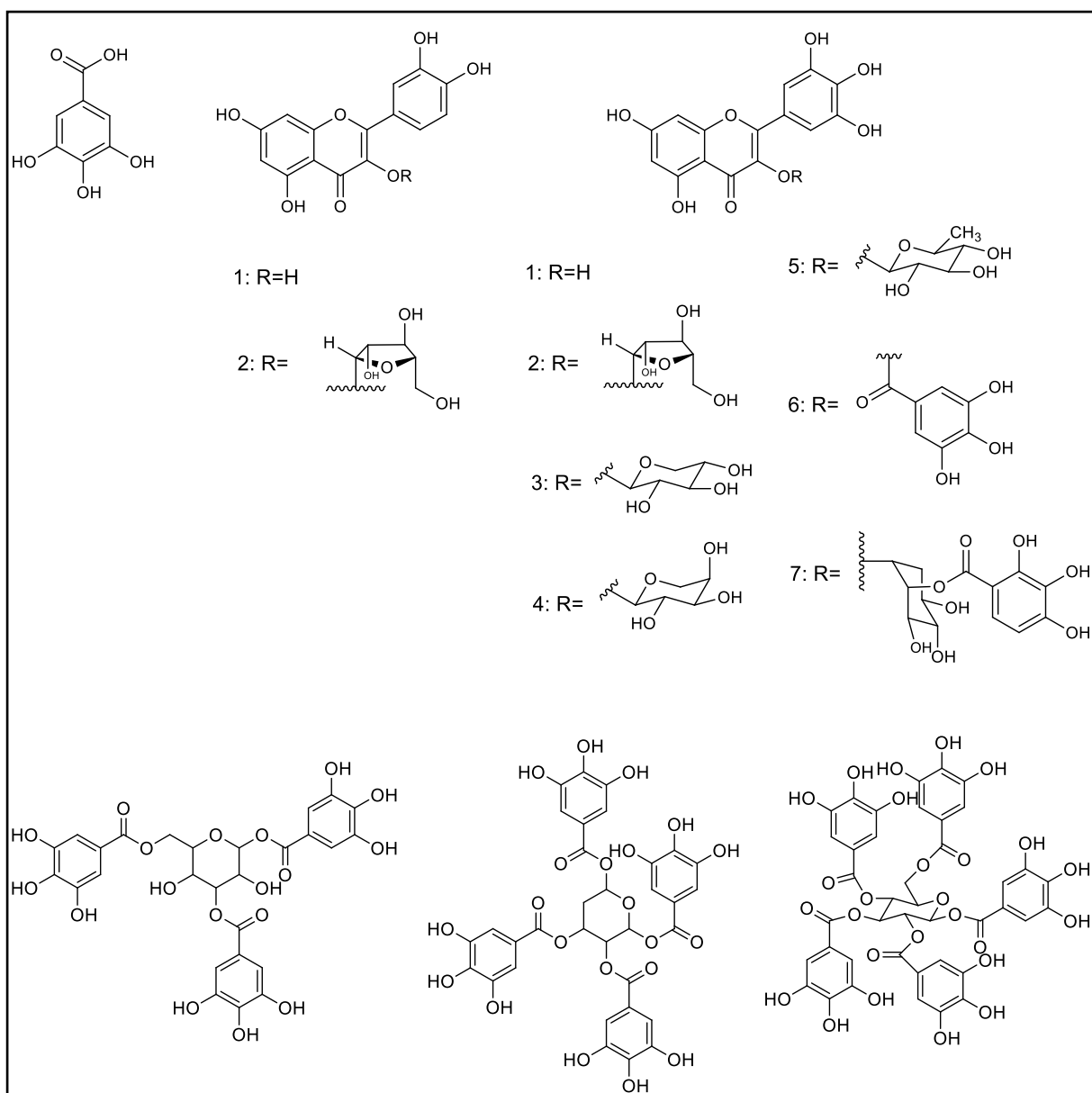


FIGURA 1.3 - Substâncias isoladas de *Eugenia myrcianthes* (SCHMEDA-HIRSCHMANN & ZUNIGA, 1996).

O grupo de pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos tem como uma das principais linhas de pesquisa a buscas de substâncias bioativas para o controle de insetos-pragas. Com este propósito foi realizado o ensaio frente à formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*.

Porém, o trabalho realizado não se limitou apenas a estes ensaios. Foram feitos levantamentos bibliográficos onde se conclui que várias plantas

pertencentes à família das Myrtaceae apresentam atividade antimicrobiana e atividade antioxidante. Portanto, foi realizado o ensaio antimicrobiano que é outra vertente da linha de pesquisa do grupo e também foi implementado no laboratório o ensaio antioxidante.

1.4 – Formigas Cortadeiras

As formigas cortadeiras (Figura 1.4) constituem um dos grupos de insetos mais abundantes na biosfera. Pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera, família Formicidae, subfamília Myracinae e tribo Attini. São consideradas formigas cortadeiras todas as espécies dos gêneros *Atta*, popularmente conhecidas como saúvas e *Acromyrmex*, conhecidas como quenquéns, nos quais são os gêneros de maior importância (REIS FILHO et al., 2007; ERTHAL Jr. et al., 2007).



FIGURA 1.4 - Formigas cortadeiras (Fonte: MARINHO et al., 2006).

As formigas cortadeiras são insetos sociais porque elas exibem características sociais, como cuidados e cooperação entre companheiras de ninho; divisão de tarefas em que cada casta realiza sua função e ainda a sobreposição de gerações (MARINHO et al., 2006).

As formigas vivem em formigueiros subterrâneos constituídos de câmaras e galerias, são caracterizadas por possuírem o hábito de cortar e

transportar material vegetal para os seus ninhos. No exterior dos ninhos das saúvas são encontrados montes de terras granuladas resultantes das escavações que geram diversas galerias que interligam as câmaras, também denominadas painelas, responsáveis por acomodar a rainha, o jardim de fungo e até mesmo o lixo (JACCOUD, 2000).

A população de um sauveiro é composta de indivíduos que se diferenciam morfológicamente de acordo com as funções que desempenham na colônia, são divididas em castas de trabalhadores (DELLA LUCIA & VILELA, 1993). As formigas maiores, as soldados, são responsáveis por cortar as folhas e carregar para o ninho, e por serem as mais fortes a principal função é cuidar da defesa do formigueiro. As de médio porte, são denominadas operárias, têm a função de cortar o material vegetal em pedaços menores. As menores, conhecidas como jardineiras, têm a função de cuidar do crescimento do jardim de fungo, alimentando os ovos, larvas e pupas (JACCOUD, 2000; BOULOGNE et al., 2012).

Ocorrem amplamente distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina, incluindo várias ilhas do Caribe e algumas ilhas das Antilhas, não ocorrendo no Chile e nas regiões transandinas da América do Sul (REIS FILHO et al., 2007; GODOY et al., 2005; BACCI et al., 2009). O Brasil é o país que possui o maior número de espécies de saúvas na América do Sul, são 10 espécies de um total de 15 espécies do gênero, sendo a maior ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais das Américas, seguido da Argentina e do Paraguai (NORTH et al., 1997). Destas, cinco espécies possuem grande importância econômica: *Atta laevigata*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex disciger*, *Acromyrmex niger* e *Acromyrmex crassipinus*, nas quais se destacam como sendo as principais pragas (BOARETTO & FORTI, 1997). As saúvas da espécie *Atta sexdens rubropilosa*, popularmente conhecidas como saúva limão, são encontradas principalmente nos estados de São Paulo, Minas

Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Goiás e Paraná (MIYASHIRA et al., 2012).

Várias formigas são benéficas ao meio ambiente, quando encontradas em ambientes ecologicamente equilibrados, dispersam sementes, fazem a poda de algumas plantas, exercem papel importante na aeração do solo, incorpora material orgânico a terra, é predadora de diversos artrópodes, entre outras utilidades (MOUTINHO et al., 2003; PETERNELLI et al., 2004).

Porém, as formigas cortadeiras são mais comumente conhecidas como pragas devido seu alto poder de destruição de um grande número de espécies vegetais e pelo prejuízo econômico causado à agricultura, silvicultura brasileira (ALMEIDA, 2007; BOULOGNE et al., 2012; SOUZA et al., 2011) e aos programas de reflorestamento que são bastante consideráveis, devido sua voracidade de cortar e carregar as folhas e flores para dentro do formigueiro.

As *Atta sexdens rubropilosa*, são consideradas uma praga de grande importância, pois vem causando sérios prejuízos às espécies de *Eucalyptus* e *Pinus*, principalmente nas fases de pré-corte e imediatamente após o plantio (BOARETTO & FORTI, 1997; FILHO et al., 2011; MIYASHIRA et al., 2012; SOUZA et al., 2011). Quando o formigueiro não é controlado, as ações por parte das formigas cortadeiras podem levar a perda de até 30% do plantio em um período de um ano das árvores do gênero *Eucalyptus* (ALMADO, 2007), sendo que os ataques intensos e constantes levam a perda de até 100% das plantações (FILHO et al., 2011). Apesar de não haver dados conclusivos sobre as perdas para outras culturas, pode-se dizer que quando as plantas são novas, os prejuízos podem chegar a 100% (BOARETTO & FORTI, 1997).

Todas as espécies da tribo Attini caracterizam-se por manterem uma relação obrigatória de simbiose com fungo (MIYASHIRA et al., 2012). Estes gêneros, *Atta* e *Acromyrmex*, cortam partes vegetais e as utilizam para cultivar seu fungo, *Leucoagaricus gongylophorus*, o que as tornam conhecidas como formigas cortadeiras (FERNANDES, 2002).

1.4.1 – Simbiose

Existe uma relação de simbiose entre as formigas pertencente à tribo *Attini*, incluindo os gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Figura 1.5) (AYLWARD et al., 2012; BOULOGNE et al., 2012). Nesta relação, o fungo cresce dentro do ninho, onde é cultivado em substrato de origem vegetal (constituído por polímeros complexos e em sua maioria polissacarídeos que representam 70 a 90% do seu peso seco) coletado pelas formigas. Ele produz hifas e gongilídeos que constituem a única fonte de alimentos para as larvas, ninfas, machos e rainha, e metaboliza polissacarídeos derivados das plantas em nutrientes ingeríveis pelas formigas para alimentar as operárias adultas, em troca às formigas fornecem o material vegetal para seu crescimento e protegem o fungo de parasitas e potenciais competidores (MEHDIABADI & SCHULTZ, 2009).

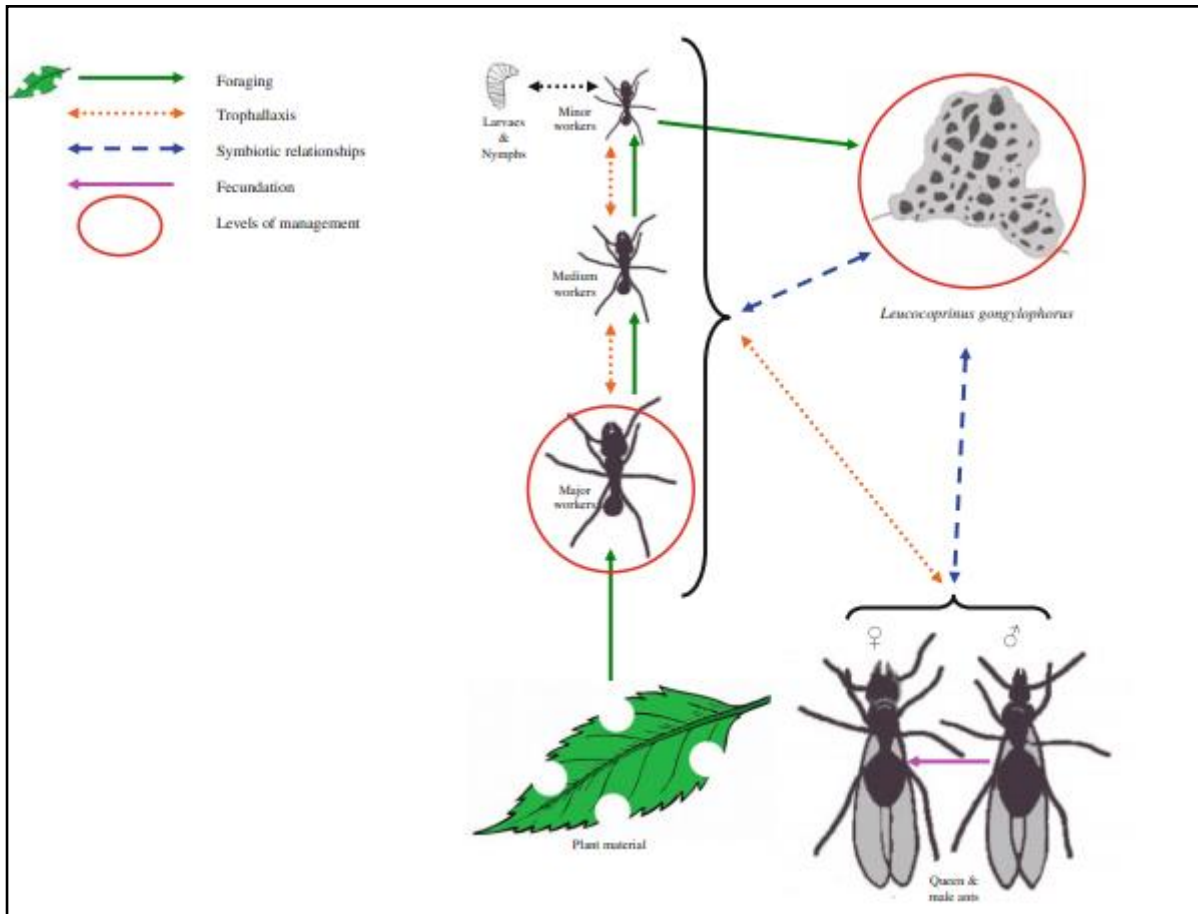


FIGURA 1.5 - Relação de simbiose entre as formigas e seu fungo simbiote (*Leucoagaricus gongylophorus*) nos ninhos de formigas cortadeiras (BOULOGNE et al., 2012).

O fungo simbiote constitui a base alimentar da colônia, mas não é a única fonte alimentar, pois as operárias adultas ingerem seivas diretamente das plantas no momento do seu corte e complementam sua alimentação com produtos de degradação do material vegetal pelo fungo, enquanto que as larvas e as rainhas são alimentadas com o fungo, que é rico em carboidratos, proteínas e pobre em lipídios (RICHARD et al., 2005; SILVA et al., 2003). Ele também apresenta atividade de polissacaridases, fornecendo às formigas enzimas que digerem celulose, xilana, amido, pectina e proteínas como pectinase, amilase, xilanase, β -glicosidase e manosidase (FEBVAY & KERMARREC, 1981 *apud* RICHARD et al., 2005).

A atividade das formigas traz benefícios aos fungos, uma vez que estas produzem compostos antimicrobianos que reduzem o crescimento de outros fungos e bactérias contaminantes dos ninhos (NICKELE et al., 2013).

A simbiose existente entre as formigas e o fungo, possibilita que as operárias se alimentem de diferentes plantas assim facilitando uma maior adaptação, onde é refletido nos seus ninhos que são extremamente complexos e populosos, além de sua grande importância ecológica, uma vez que são considerados herbívoros dominantes em vários ecossistemas (HOLLDOBLER & WILSON, 1990).

Desse modo, torna-se necessário o controle do formigueiro, seja diretamente pelas formigas utilizando inseticidas ou pelo fungo simbiote com base nesta simbiose fazendo o uso de fungicidas, assim utilizando produtos naturais para combatê-los.

1.4.2 – Métodos de Controle

O controle destas formigas cortadeiras pode ser realizado por vários métodos, porém os mais conhecidos são os métodos mecânicos, biológicos e químicos. O controle mecânico consiste na destruição dos ninhos, através da escavação do formigueiro até que a rainha seja localizada e morta. Este método não é comumente utilizado, uma vez que apresenta viabilidade restrita a pequenas áreas e somente para ninhos com até quatro meses de idade (BOARETTO & FORTI, 1997). O controle biológico é baseado no emprego de predadores, parasitoides e microrganismos (fungos, bactérias e vírus) que utilizam a formiga como hospedeira. No entanto, são necessárias pesquisas mais avançada sobre esta técnica para que possa ser aplicada com segurança, principalmente em relação ao meio ambiente.

O controle químico é o único que apresenta tecnologia disponível para utilização prática no controle de formigas cortadeiras, sendo assim, é o método mais utilizado, pois oferece maior segurança ao operador, dispensa mão-

de-obra e equipamentos especializados e permite o tratamento de formigueiros em locais de difícil acesso (PETERNELLI et al., 2008). Este controle pode ser efetuado por meio de formulações contendo produtos químicos tóxicos aplicados diretamente nos ninhos, como formulações em pós secos, nebulização de líquidos e gases, e iscas granuladas (JUSTI-JUNIOR et al., 1996). O uso das iscas tem sido muito utilizado devido sua eficiência, facilidade de aplicação, baixo custo, por não apresentar perigos de intoxicação durante o manejo e equipamentos especializados permite o tratamento de formigueiros em locais de difícil acesso. Estas iscas contêm óleo de soja como veículo, polpa cítrica como atraente e um ingrediente ativo como princípio tóxico.

As primeiras iscas tóxicas continham como princípio ativo o aldrin que posteriormente foi substituído por dodecacloro por ser mais eficiente. Devido aos seus efeitos prejudiciais ao meio ambiente, houve conseqüentemente a proibição por lei a partir de 1992 (LEI FEDERAL 7802/89) de inseticidas clorados e o dodecacloro foi então substituído pela sulfluramida (N-etilperfluroctano-sulfonamida), pertencente ao grupo das sulfonas fluoroalifáticas (BOARETTO & FORTI, 1997). A Figura 1.6 mostras as estruturas químicas desses inseticidas.

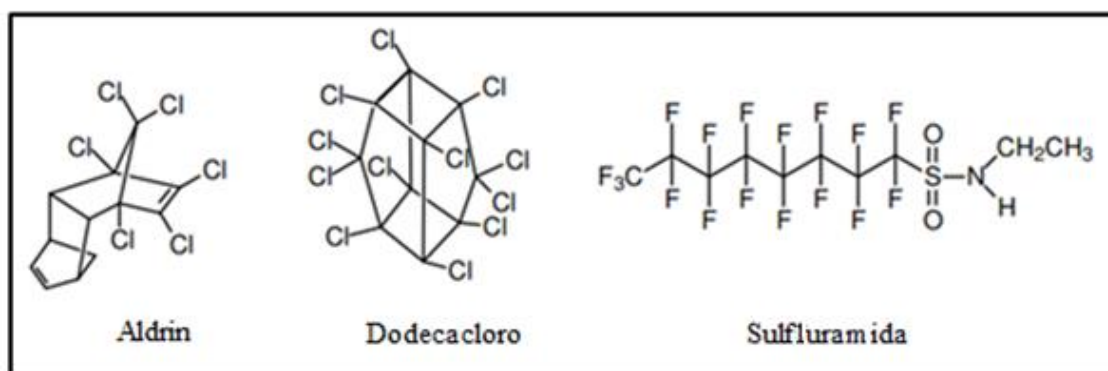


FIGURA 1.6 - Estrutura química dos inseticidas aldrin, dodecacloro e sulfluramida.

A busca de métodos alternativos no controle de formigas cortadeiras tem crescido consideravelmente. Neste contexto, visando à busca de

inseticidas mais seletivas e menos prejudiciais ao meio ambiente, o Grupo de Produtos Naturais do DQ/UFSCar, juntamente com o Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP de Rio Claro-SP tem estudado o efeito de plantas potencialmente tóxicas para *Atta sexdens rubropilosa* e o seu fungo simbionte, *Leucoagaricus gongylophorus*.

1.5 – Microrganismos

As pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal tiveram início na década de 1940 (OSBORN, 1943). São conhecidas como substâncias que, em baixas concentrações, apresentam atividade letal ou inibitória contra microrganismos, sem causar efeitos colaterais ao paciente (COWAN, 1999).

Relatos na literatura afirmam que doenças infecciosas, causadas por microrganismos patógenos, ainda são uma das mais importantes causas de morte nos seres humanos e sendo uma das principais causas de morte em crianças (KRAUS, 2008).

Os antimicrobianos, conhecidos como antibióticos e antifúngicos, são essenciais para o tratamento de infecções causadas por microrganismos patógenos (ALLEN et al., 2010). Antibióticos, são utilizados para o combate de bactérias, mas o uso inadequado tem selecionado cepas resistentes aos antibióticos convencionais. Os antifúngicos têm função de inibir os fungos, porém os fármacos disponíveis no mercado não estão satisfazendo as necessidades médicas por completo.

Devido a estes fatos, novas estratégias vêm sendo desenvolvidas em busca de compostos biologicamente ativos, tendo como origem de produtos naturais e seus derivados sintéticos, para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos para o combate de microrganismos (MISHIRA & TIWARI, 2011).

1.6 – Antioxidantes

A busca de antioxidantes provenientes de produtos naturais tem aumentado nos últimos anos, com o intuito de substituir os antioxidantes sintéticos, tais como: o butilhidróxitolueno (BHT), o butilhidróxianisol (BHA) e o *terc*-butilhidroquinona (TBHQ) (Figura 1.7) comumente utilizados pela indústria alimentícia. No entanto, há evidências que o consumo excessivo destes antioxidantes levou a desenvolvimentos de tumores de fígado, pâncreas e glândulas (HIROSE et al., 1986).

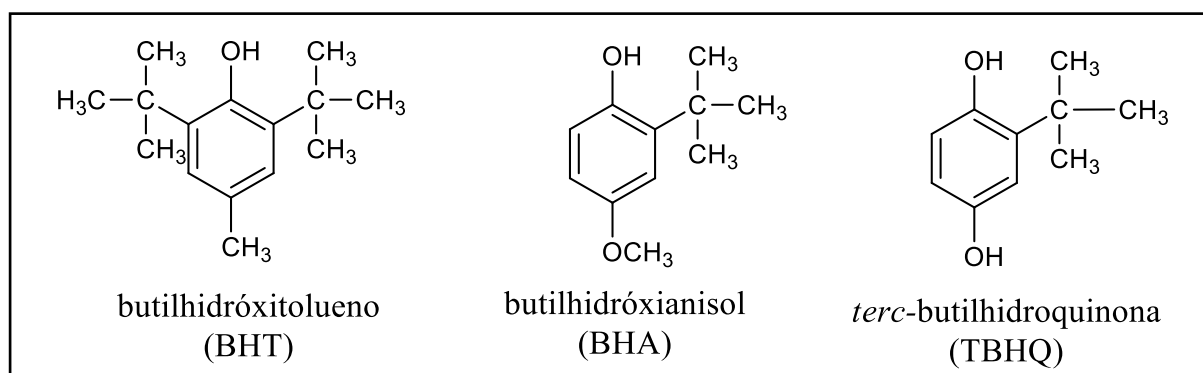


FIGURA 1.7 - Antioxidantes sintéticos: butilhidróxitolueno (BHT), o butilhidróxianisol (BHA) e o *terc*-butilhidroquinona (TBHQ).

Os antioxidantes são amplamente definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz, ou seja, retardando e/ou prevenindo a oxidação de biomoléculas (SIES, 1993).

A importância de estudar substâncias com potencial antioxidante é com o objetivo de impedir a reação de propagação de radicais livres e assim combater doenças crônicas e degenerativas que são causados pelo estresse oxidativo (ROESLER et al., 2007).

Entre os compostos que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonoides, tocoferóis, fosfolipídeos, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico e esteróis, que são

normalmente encontrados em cereais, frutas e vegetais (ROESLER et al., 2007; CHANWITHEESUK et al., 2004; AL-MAMARY et al., 2002).

2 – OBJETIVOS

- Realizar o estudo fitoquímico de *Eugenia myrcianthes* (Myrtaceae) visando isolamento e identificação estrutural de seus constituintes químicos, contribuindo com informações sobre a quimiosistemática da espécie estudada;
- Avaliar o efeito dos extratos, frações e substâncias puras isoladas frente às operárias de formigas cortadeiras (*A. sexdens rubropilosa*), ensaio antifúngico (*L. gongylophorus*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*), ensaio antibacteriano (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Micrococcus luteus*) e atividade anti-radicalar pelo método de DPPH.

3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais e Métodos

Solventes:

- Solventes comerciais BRENTAGLA, SINTH, VETEC, LABSYNTH e outros destilados na sala de destilação do Departamento de Química da UFSCar para obtenção de extratos e fracionamentos dos mesmos.
- Solvente de grau CLAE da J.T. BAKER, TEDIA e VETEC.
- Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milli-Q®).
- Solventes deuterados da ALDRICH CHEMICAL COMPANY, ACROS ORGANICS para a obtenção de espectros de RMN.

Material Cromatográfico:

- ❖ Fases estacionárias utilizadas para cromatografia em coluna (CC)
 - Sílica gel 60 (230-400 da Mesh) da ACROS ORGANICS.
 - Sephadex® LH-20 da Amersham Pharmacia Biotech AB.

Foram utilizadas colunas de tamanhos variados, dependendo das quantidades a serem aplicadas.

- ❖ Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

- Cromatoplaça de sílica gel 60 UV₂₅₄, AITLC 20 x 20 cm e 0,2 mm de espessura em alumínio da MERCK.

Utilizada para monitoração dos fracionamentos.

Reveladores

- Câmara de luz UV, com radiação na região do UV ($\lambda = 254$ e 363 nm).
- Vanilina em ácido sulfúrico - A vanilina (3,0 g) foi dissolvida em uma solução contendo: 135 mL de H₂O destilada, 135 mL de MeOH e 30 mL

de H₂SO₄ (concentrado). A solução foi estocada em frasco âmbar e a baixa temperatura (aproximadamente 10 °C).

- Solução etanólica de AlCl₃ 1%.
- Solução etanólica de DPPH (0,2 mg/mL).

3.2 - Equipamentos

Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear:

➤ BRUKER, modelo DRX 400 e Avance III operando a 400 MHz para núcleo de ¹H e 100 MHz para ¹³C (9,4 Tesla); BRUKER, modelo Avance III *Ultrashield Plus* operando a 600 MHz para núcleo de ¹H e 150 MHz para ¹³C (14,1 Tesla) com crio-sonda de 5 mm, o que propicia o aumento da sensibilidade comparável a um equipamento de 21,1 Tesla (900 MHz para frequência de hidrogênio).

As técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C, COSY, HMBC e HSQC foram realizadas no equipamento do DQ/UFSCar.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

➤ Cromatógrafo: Agilent Technologies modelo 1200 (analítico), equipado com: bomba quaternária G1211A, degaseificador G1422A, auto injetor G1329A, forno para coluna G1316A e detector de Ultravioleta G1314B. O equipamento está acoplado a uma interface G1369A e os cromatogramas foram registrados através do software Agilent EZChrom SI.

➤ Cromatógrafo: Shimadzu SCL-10Avp (analítico e preparativo), equipado com válvula de reciclo, válvula de injeção Rheodyne 7725i, alça de amostragem (*loop*) de 200 µL, bombas Shimadzu e detector: UV-VIS, Shimadzu SPD-10Avp.

Cromatógrafo a Gás Acoplado ao Espectrômetro de Massa (CG-EM):

➤ Espectrômetro Shimadzu GC/MS (Gas Chromatography Mass Spectrometer), equipado com coluna DB-5, modelo Optima-5 (30 m x 0,25 mm com filme de 0,25 µm), operando com ionização por impacto eletrônico (IE) a 70 e.V.

Sistema de CL-EM:

➤ APITM 2000, munido de analisador triplo quadrupolo – Fonte de ionização: ionização por *electrospray* (fonte TurbolonSpray[®]) (ESI-MS), modo positivo. Acoplado a cromatografia líquida foi realizada em um equipamento da marca Agilent 1200 series, mas mesmas configurações já mencionadas para o mesmo modelo.

As análises foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais – DQ/UFSCar.

Espectrofotômetro:

➤ FEMTO, espectrofotômetro 700 PLUS.

Fluxo laminar:

➤ ESCO Laminar Flow Cabinet – Opti.MAIR.

Balança analítica:

➤ Bel Engineering Mod. Mark 210A.

➤ Sartorius modelo BP210S.

Evaporadores Rotativos:

➤ BÜCHI, modelo rotavaporador R-114, R-200 e R-205, equipado com banho BÜCHI B-480 e B-490, recirculador de água refrigerado Thermo

Scientific, modelos Neslab CFT-25 e Neslab Thermo Felx 900, mantidos a 5 °C e acoplados às bombas de vácuo Sibata Scientific Technologies.

Vortex:

- Vortex PHOENIX AP56.

Banho de ultrassom:

- Unique Ind. Com. Prod. Elet. Ltda. Mod. Maxiclean 1450.

3.3 – Material Botânico

A espécie estudada *Eugenia myrcianthes* foi coletada na Estância das Frutas na região de Rio Claro-SP em 11 de outubro de 2011 e identificada pelo Engenheiro Agrônomo MSc. Harri Lorenzi (Instituto Plantarum, Nova Odessa-SP) e consta no livro Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas (de consumo *in natura*) (LORENZI et al., 2006).

3.4 - Obtenção dos Extratos de *Eugenia myrcianthes*

O material vegetal obtido de *Eugenia myrcianthes* foi seco em estufa de circulação a 40 °C e posteriormente triturados em moinhos. Os materiais secos e moídos foram extraídos à temperatura ambiente e em repouso com etanol durante 72 horas por três vezes. Após este tempo os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo.

Na Tabela 3.1, estão descritos os extratos obtidos de cada parte vegetal da planta em estudo.

TABELA 3.1 - Extratos obtidos pela extração com etanol de folhas e galhos de *Eugenia myrcianthes*.

Código	Extrato bruto	Massa (g)
EMF	<i>Eugenia myrcianthes</i> folhas	9,57
EMG	<i>Eugenia myrcianthes</i> galhos	8,35

Analisado o espectro de RMN ^1H do extrato EMF (Figura 3.1) apresentou-se sinais mais resolvidos na região de hidrogênios ligados a anéis aromáticos que o extrato EMG (Figura 3.2), assim foi escolhido o extrato EMF para realizar a partição líquido-líquido dando início aos estudos.

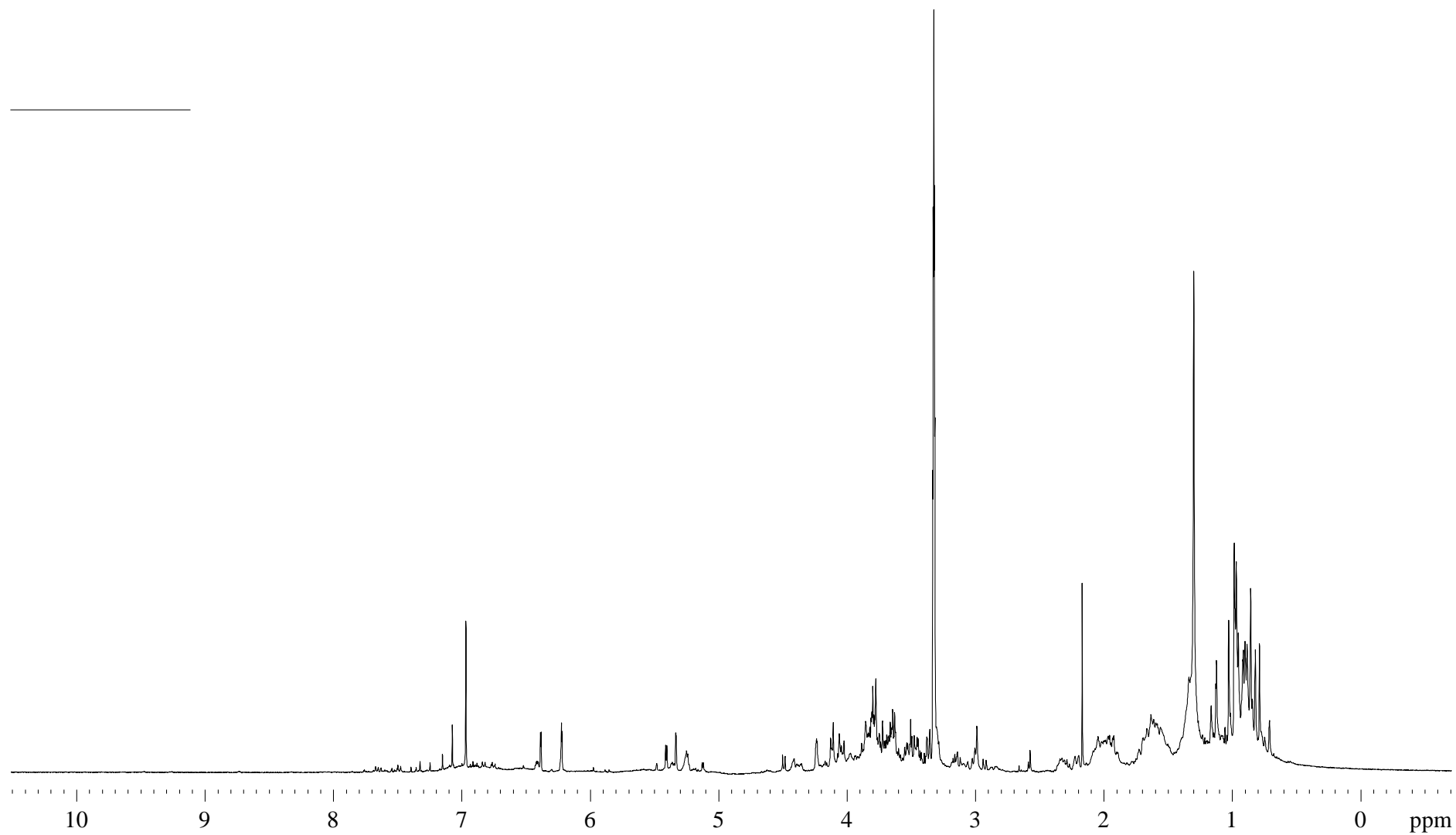


FIGURA 3.1 - Espectro de RMN ^1H do extrato EMF (CD_3OD , 400 MHz).

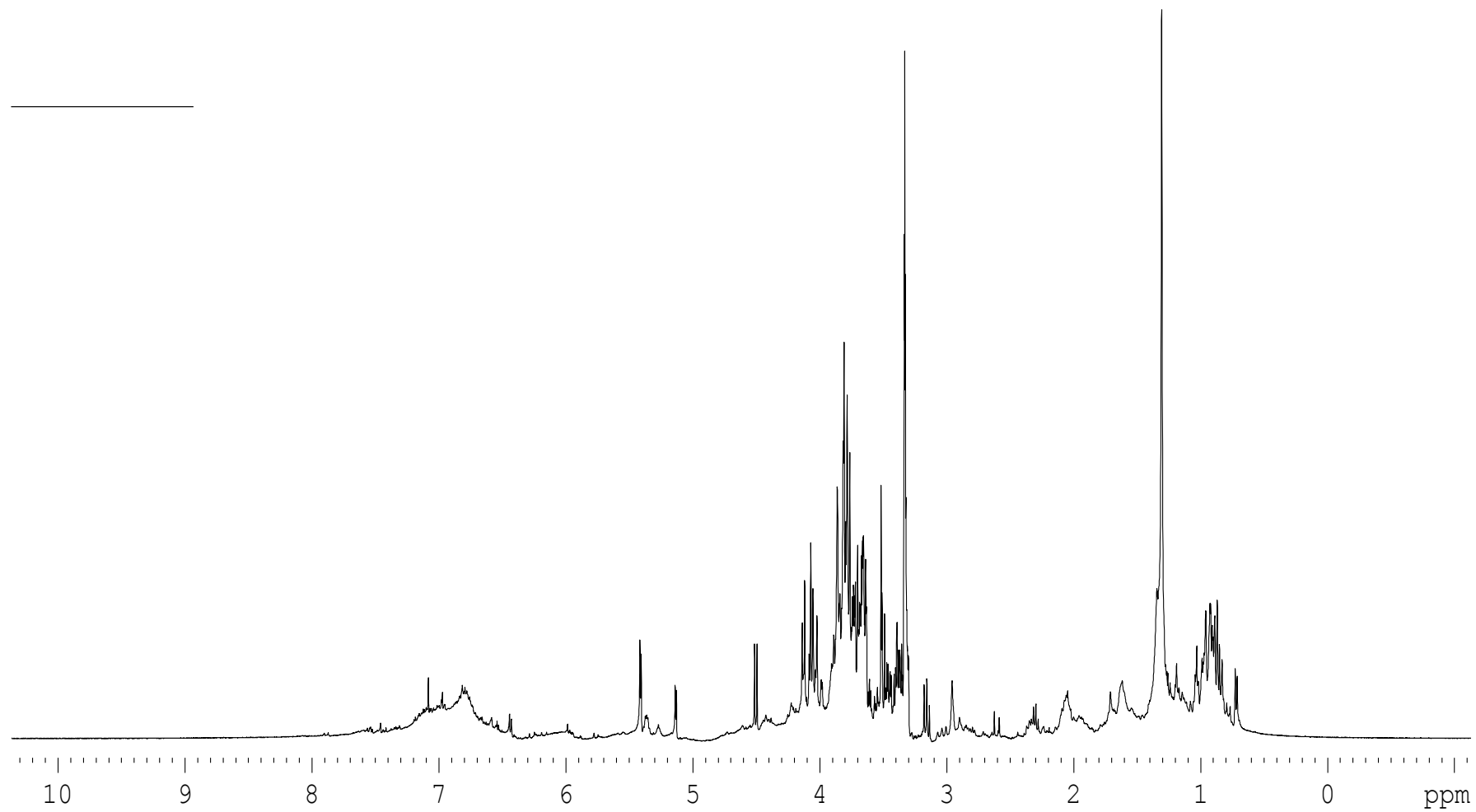


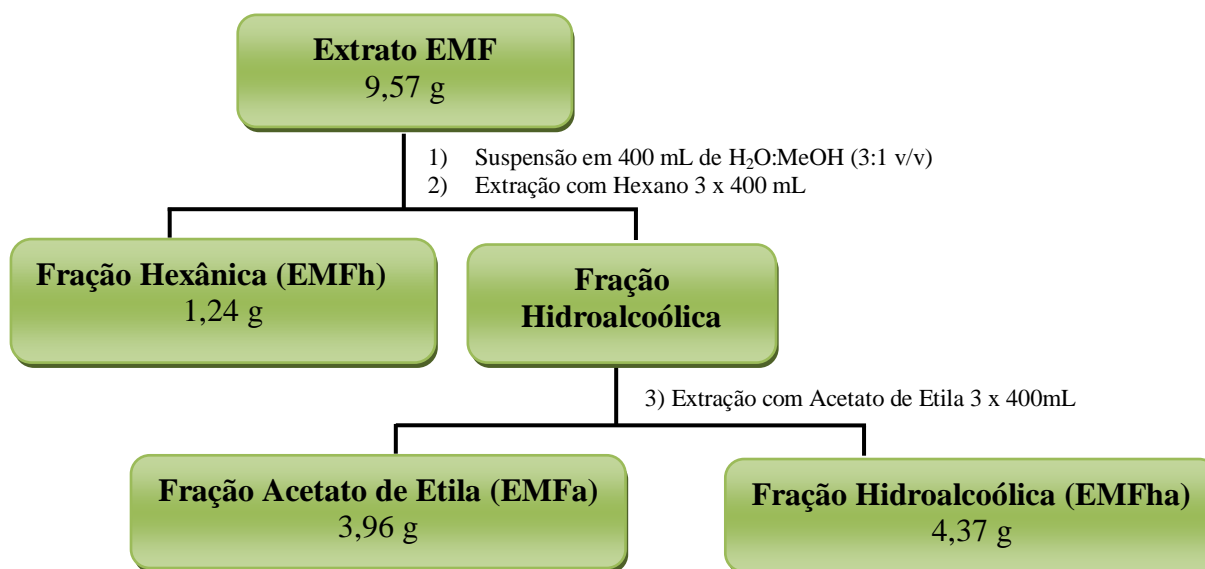
FIGURA 3.2 - Espectro de RMN ^1H do extrato EMG (CD_3OD , 400 MHz).

3.5 - Fracionamento dos Extratos de *Eugenia myrcianthes*

O extrato das folhas de *Eugenia myrcianthes* foi submetido ao fracionamento, onde se deu início ao trabalho.

3.5.1 – Partição Líquido-Líquido do Extrato Etanólico das Folhas *Eugenia myrcianthes*

O extrato bruto etanólico das folhas de *Eugenia myrcianthes* foi fracionado através de uma partição líquido-líquido utilizando uma solução de H₂O/MeOH (3:1 v/v) para solubilizar o extrato. Em seguida, o extrato foi submetido às extrações com solventes hexano e acetato de etila, nesta ordem de polaridade, obtendo-se três frações. As frações foram concentradas em evaporador rotativo. O Fluxograma 3.1 representa a partição líquido-líquido realizada com os extratos das folhas de *Eugenia myrcianthes*.



FLUXOGRAMA 3.1 –Metodologia utilizada na partição líquido-líquido para o extrato das folhas de *Eugenia myrcianthes*.

Posteriormente, as frações obtidas (EMFh, EMFa e EMFha) foram analisadas via ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e através de placas de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e assim, foi escolhida a fração EMFa para dar início aos estudos, seguida da EMFh.

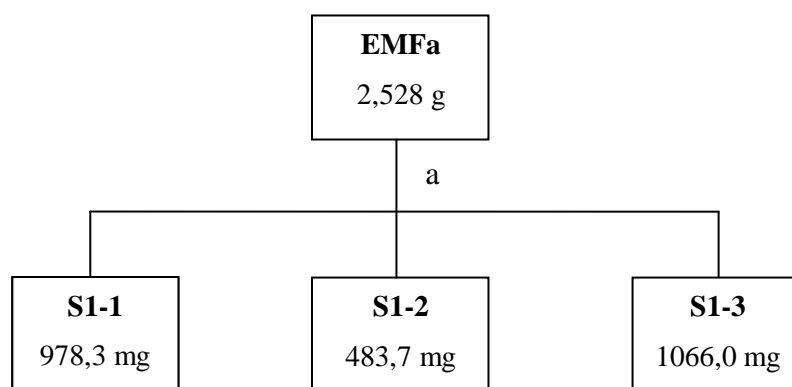
Na Tabela 3.2, estão descritas as frações obtidas a partir da partição líquido-líquido, assim como as massas obtidas para cada uma.

TABELA 3.2 - Massas das partições dos extratos etanólicos das folhas de *Eugenia myrcianthes*.

Massa Material Vegetal seco	Código	Massa dos Extratos (g)
<i>Eugenia myrcianthes</i> (9,57 g)	EMFh	1,24
	EMFa	3,96
	EMFha	4,37

3.5.2 – Fracionamento da Fração EMFa

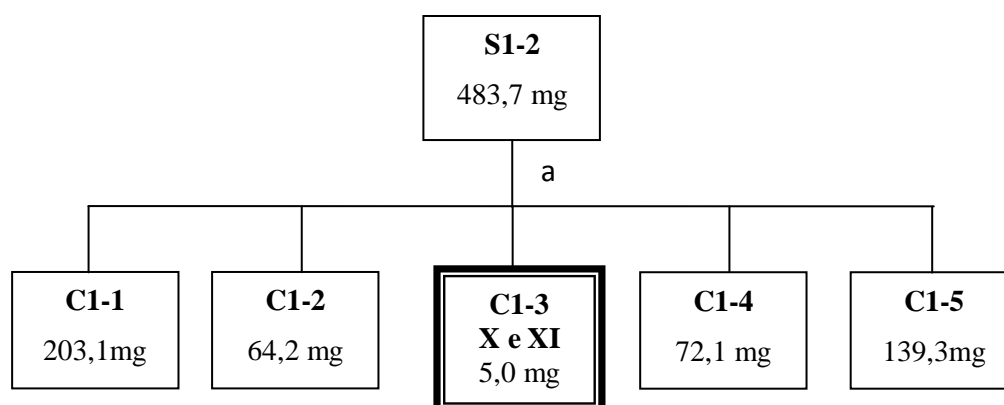
A fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *Eugenia myrcianthes* (EMFa) foi submetida a sucessivas aplicações em cromatografia por exclusão de tamanho e adsorção utilizando sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel. Obteve-se 3 frações como mostra o Fluxograma 3.2.



FLUXOGRAMA 3.2 – Fracionamento de EMFa.

a) Cromatografia por exclusão de tamanho/adsorção; coluna de vidro (diâmetro (\emptyset) = 3,0 cm, altura (h) = 98,0 cm), fase estacionária sephadex LH-20, fase móvel eluição isocrática MeOH 100%.

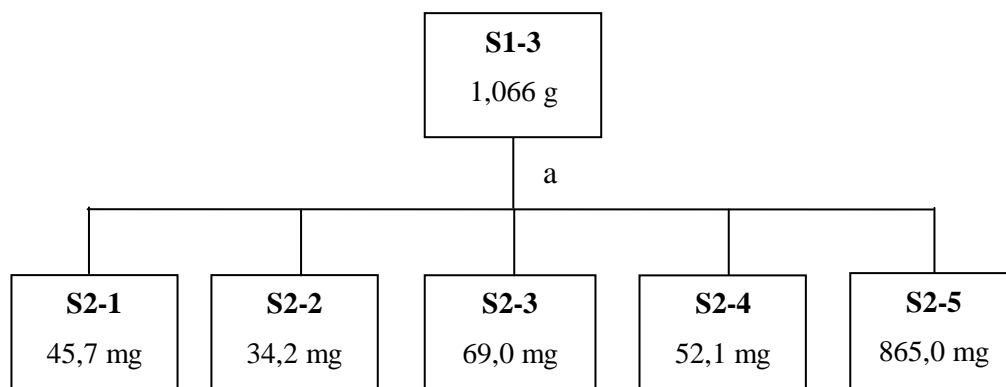
Todas as frações obtidas foram analisadas por CCDA e RMN ^1H , onde foi feita primeiramente o fracionamento da amostra S1-2, utilizando-se sílica gel 230-400 mesh como fase estacionária e como fase móvel diclorometano:metanol (9:1 v/v) (eluição isocrática). Foram obtidas 20 frações de 10 mL cada, as quais foram reunidas devido à semelhança apresentadas na análise por CCDA e por fim obteve-se 5 frações como mostra o Fluxograma 3.3. Todas foram analisadas por RMN ^1H , onde confirmou o isolamento da mistura de substâncias X e XI.



FLUXOGRAMA 3.3 – Fracionamento de S1-2.

a) Cromatografia por adsorção: coluna de vidro (\emptyset = 3,0 cm, h = 30,0 cm), fase estacionária sílica flash (230-400 mesh), fase móvel eluição isocrática CH_2Cl_2 :MeOH (9:1 v/v).

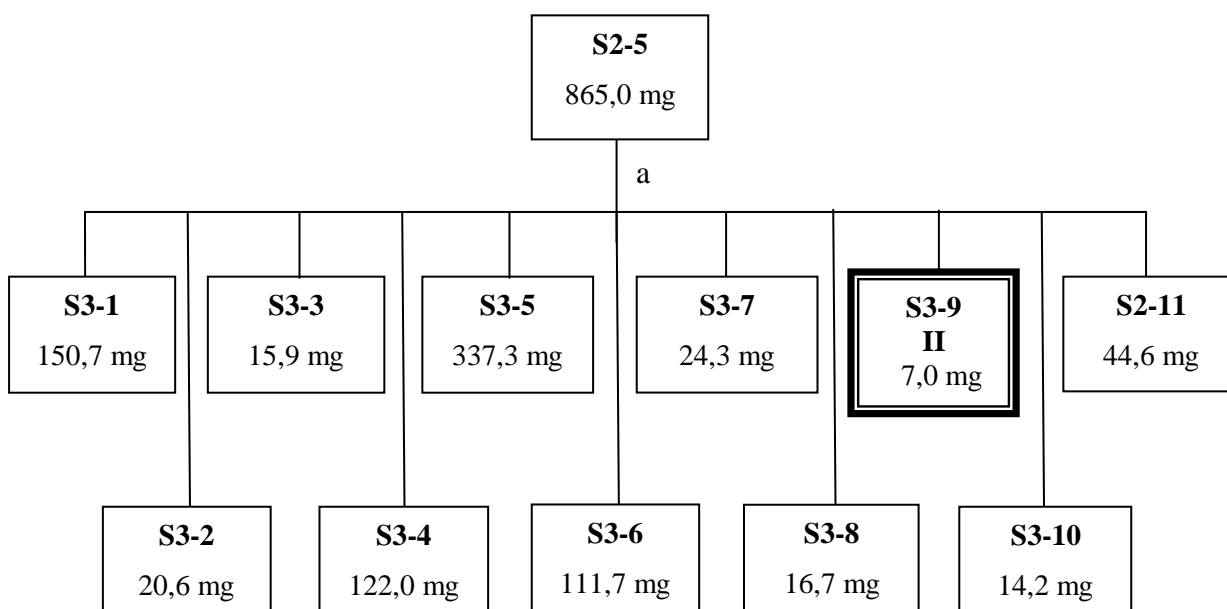
A fração S1-3 apresentou uma coloração amarela, e foi analisada por RMN ^1H apresentando ser uma fração rica em flavonoides, portanto foi novamente fracionada por cromatografia por exclusão de tamanho/adsorção utilizando sephadex LH-20 como fase estacionária onde se obtiveram 5 frações (Fluxograma 3.4).



FLUXOGRAMA 3.4 – Fracionamento de S1-3.

a) Cromatografia por exclusão de tamanho/adsorção; coluna de vidro ($\varnothing = 3,0$ cm, $h = 98,0$ cm), fase estacionária sephadex LH-20, fase móvel eluição isocrática MeOH 100%.

As frações obtidas do fracionamento de S1-3 foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e RMN ^1H , e a fração escolhida para ser trabalhada foi a S2-5, na qual foi feita outra coluna cromatográfica por exclusão de tamanho/adsorção utilizando como fase estacionária sephadex LH-20 (Fluxograma 3.5).

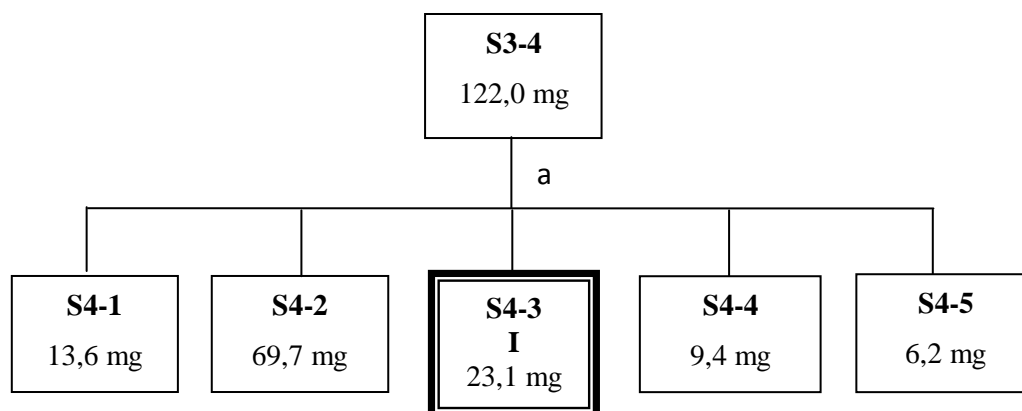


FLUXOGRAMA 3.5 – Fracionamento de S2-5.

a) Cromatografia por exclusão de tamanho/adsorção; coluna de vidro ($\varnothing = 3,0$ cm, $h = 98,0$ cm), fase estacionária sephadex LH-20, fase móvel eluição isocrática MeOH 100%.

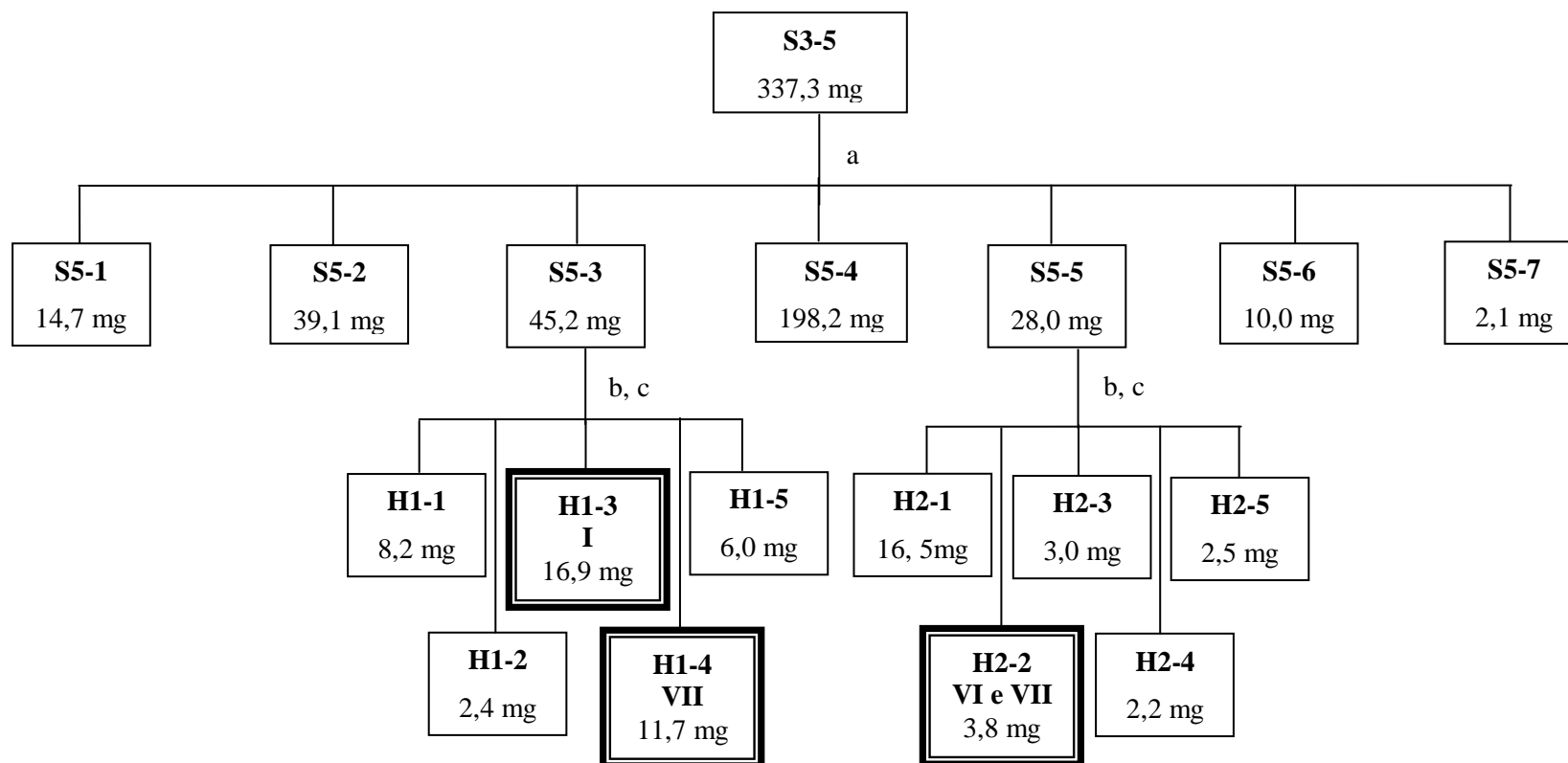
Todas as frações obtidas foram analisadas por CCDA e RMN ^1H , onde identificou a presença de flavonoides em misturas nas frações S3-3, S3-4, S3-5, S3-6, S3-7, S3-8 e S3-10, e flavonoide puro na fração S3-9 que foi codificada como substância II. As frações S3-1, S3-2 e S3-11 só continham pigmentos e/ou impurezas.

As amostras S3-4, S3-5 e S3-6 foram submetidas separadamente a um novo fracionamento por cromatografia por exclusão de tamanho/adsorção utilizando como fase estacionária sephadex LH-20 e estão representadas nos Fluxograma 3.6, Fluxograma 3.7 e Fluxograma 3.8, respectivamente.



FLUXOGRAMA 3.6 – Fracionamento de S3-4.

a) Cromatografia por exclusão de tamanho/adsorção; coluna de vidro ($\varnothing = 1,2$ cm, $h = 140,0$ cm), fase estacionária sephadex LH-20, fase móvel eluição isocrática MeOH 100%.

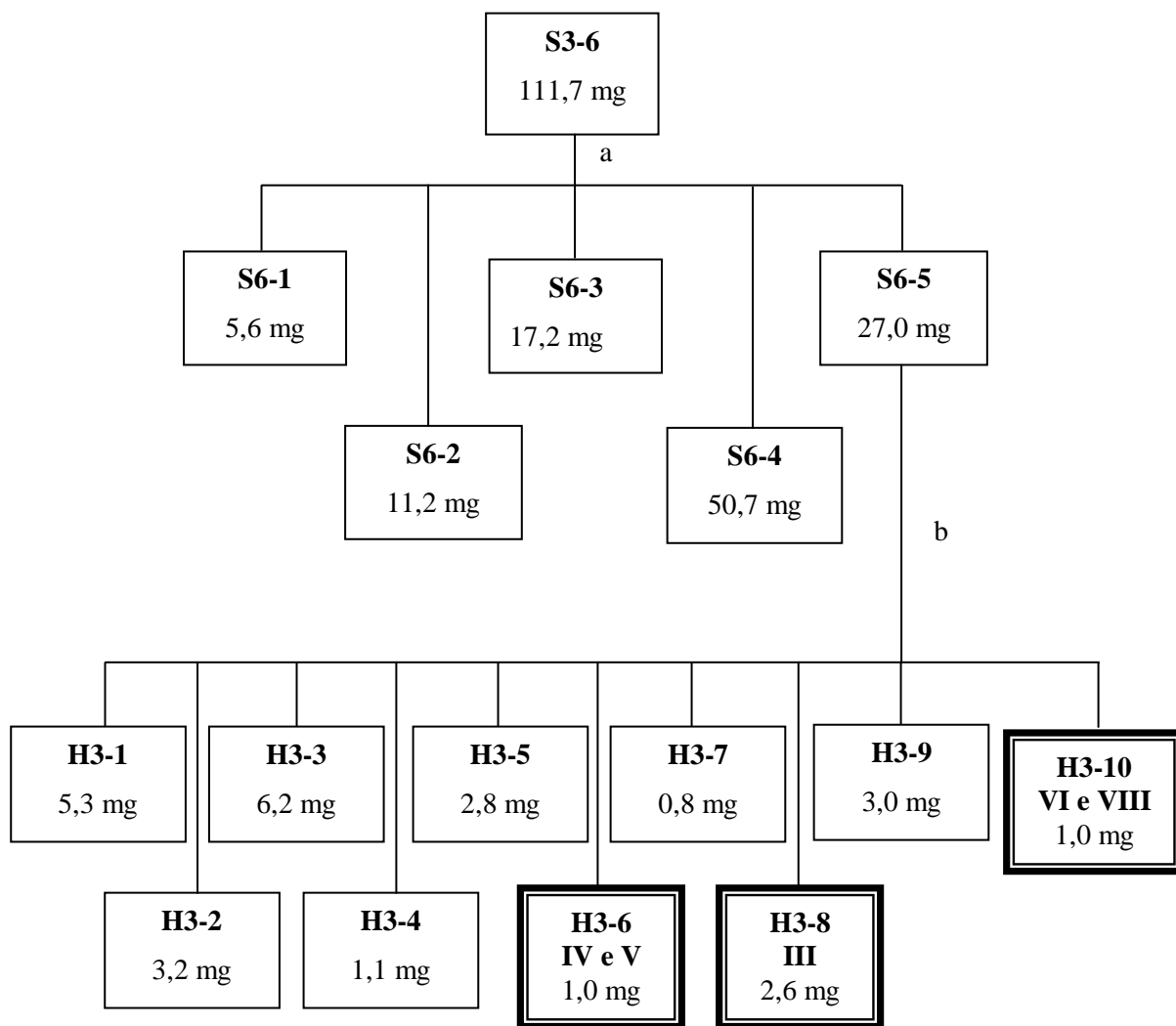


FLUXOGRAMA 3.7 – Fracionamento de S3-5.

a) Cromatografia por exclusão de tamanho/adsorção; coluna de vidro ($\varnothing = 3,0$ cm, $h = 98,0$ cm), fase estacionária sephadex LH-20, fase móvel eluição isocrática MeOH 100%.

b) CLAE analítico: coluna C-18 Phenomenex Luna $10 \mu\text{m}$ ($\varnothing = 0,46$ cm, $h = 25,0$ cm), eluição gradiente MeOH:H₂O 10-100% por 55 minutos, volume de injeção 20 μL , fluxo: 1,0 mL/min, $\lambda = 254$ nm.

c) CLAE preparativo: coluna C-18 Phenomenex Luna $10 \mu\text{m}$ ($\varnothing = 1,0$ cm, $h = 25,0$ cm), eluição isocrática MeOH:H₂O 20:80 v/v, loop de 200 μL , fluxo: 4,5 mL/min, $\lambda = 254$ nm.



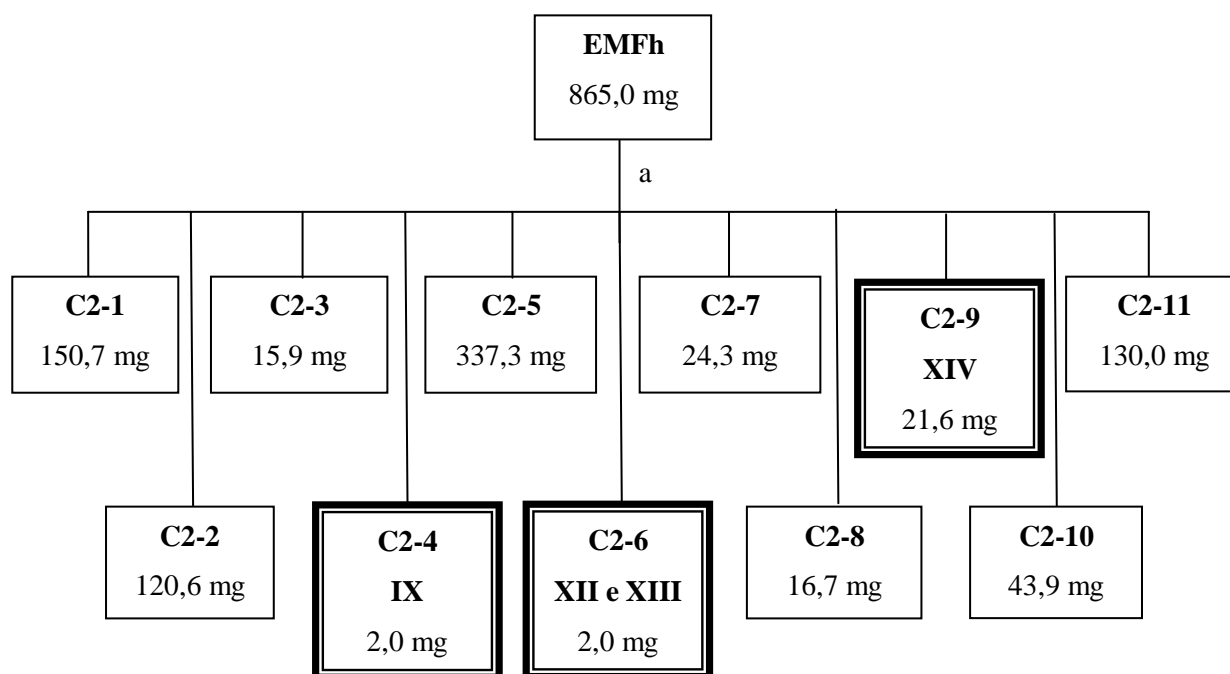
FLUXOGRAMA 3.8 – Fracionamento de S3-6

a) Cromatografia por exclusão de tamanho/adsorção; coluna de vidro ($\varnothing = 3,0$ cm, h = 98,0 cm), fase estacionária sephadex LH-20, fase móvel eluição isocrática MeOH 100%.

b) CLAE analítico: coluna C-18 Phenomenex Luna 5 μm ($\varnothing = 0,46$ cm, h = 15,0 cm), eluição gradiente $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{MeOH}$ 70:6:14 v/v/v até 55:8,5:36,5 v/v/v por 35 minutos, volume de injeção 20 μL , fluxo: 1,0 mL/min, $\lambda = 254$ nm.

3.5.3 – Fracionamento da Fração EMFh

A fração hexânica do extrato etanólico das folhas de *Eugenia myrcianthes* (EMFh) foi fracionada utilizando-se sílica gel 230-400 mesh como fase estacionária e como fase móvel hexano:metanol (9:1 v/v) (eluição isocrática). Foram obtidas 40 frações de 50 mL cada, as quais foram reunidas devido à semelhança apresentadas na análise por CCDC, e por fim obteve-se 11 frações como mostra o Fluxograma 3.9. Todas foram analisadas por RMN ¹H.



FLUXOGRAMA 3.9 – Fracionamento de EMFh.

a) Cromatografia por adsorção: coluna de vidro ($\varnothing = 3,0$ cm, h = 98,0 cm), fase estacionária sílica flash (230-400 mesh), fase móvel eluição isocrática Hex:MeOH (9:1 v/v).

3.5.4 – Metodologia dos Ensaio

3.5.4.1 - Ensaio por Ingestão com as Operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Os ensaios por ingestão com as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS)

UNESP – Rio Claro/SP, pela aluna Marcela Ceccato sob orientação do Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno.

Nesse ensaio, as formigas operárias foram retiradas aleatoriamente de formigueiros mantidos em laboratório. Para manutenção das formigas isoladas do formigueiro foi utilizada dieta sólida artificial constituída por: 5,0% glicose, 1,0% peptona bacteriológica, 0,1% extrato de levedura e 1,5% ágar bacteriológico dissolvidos em 100 mL de água destilada. A duração do experimento à base desta dieta é de 25 dias, que é o tempo de vida médio de uma formiga.

As amostras submetidas ao ensaio com as operárias foram incorporadas na dieta na concentração de 2,0 mg/mL (extrato bruto), 1,0 mg/mL (partição) e 0,1 mg/mL (substância pura). Em seguida, essa mistura foi levada ao forno de micro-ondas por 4 minutos e então autoclavada por 15 minutos a uma temperatura de 120 °C e 1,0 atm. A dieta ainda líquida foi transferida para placas de Petri de 10 cm de diâmetro, que após resfriamento e solidificação foram embrulhadas em papel filme e mantidas em geladeira, sendo utilizadas nos dias subseqüentes durante o período do experimento. Foi estipulado um período máximo de 25 dias para a realização do experimento de toxicidade. A dieta para manutenção das formigas (controle) ou a dieta acrescida do substrato a ser testado (tratamentos) foi colocada em papel alumínio na quantidade de 0,4 a 0,5 g/placa. A cada 24 horas a dieta era renovada.

As formigas foram distribuídas em lotes de 50 operárias para cada tratamento, divididas em grupos de 10 formigas e mantidas em 5 placas de Petri.

Essas placas foram colocadas em estufa com temperatura de 25 ± 1 °C e umidade relativa acima de 70% e examinadas diariamente para retirada e anotação do número de formigas mortas. A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico log-rank ($p < 0,05$), utilizando-se o software Graph-Pad Prism 3.0.

3.5.4.2 – Ensaio Biológico com o Fungo Simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*

Os ensaios com o fungo simbionte *L. gongylophorus* foram realizados no Laboratório de Bioensaios do grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela técnica Dorai Periotto Zandoniai, sob orientação da Dr^a Ana Paula Terezan.

O fungo foi isolado de um ninho de formigas cortadeiras *A. sexdens rubropilosa* e mantido em condições de laboratório por passagens mensais no meio de cultura constituído por extrato de malte (20,0 g/L), peptona (5,0 g/L) extrato de levedura (2,0 g/L) e ágar (20,0 g/L).

As amostras submetidas ao ensaio com o fungo simbionte foram incorporadas ao meio de cultura e dissolvidos em água destilada, obtendo concentração final igual a 1000 µg/mL (extrato bruto), 500 µg/mL (partição) e 100 µg/mL (substância pura). Em seguida, em cada tubo de ensaio foram adicionados 10 mL de meio de cultura/extrato. Os tubos de ensaio com o meio de cultura/extrato e placas de Petri (80x15 mm) foram autoclavados nas condições 120 °C, 1,0 atm por 20 minutos. Após a esterilização do material, os meios de cultura foram vertidos nas placas de Petri dentro da capela com fluxo laminar, previamente esterilizada durante 30 minutos por luz ultravioleta. Após a solidificação do meio de cultura, cada placa de Petri foi inoculada na posição central com um disco de ágar de 8 mm de diâmetro, previamente colonizado pelo fungo simbionte *L. gongylophorus*. As amostras foram preparadas em quintuplicata.

Após o tempo de incubação de 30 dias, a 25 °C (± 2) foram realizadas as medidas do diâmetro médio final e calculado a área do crescimento micelial para cada placa, em cada amostra. As porcentagens de inibição foram calculadas a partir da comparação da área do crescimento micelial do fungo simbionte dos controles com a área do crescimento micelial nas placas com amostra. O controle foi considerado como 0% de inibição do fungo simbionte. A

análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e teste comparativo de Tukey, ao nível 5% de probabilidade, para verificar se houve diferença significativa entre as médias. O software utilizado foi o Graph-Pad Prism 5.0.

3.5.4.3 – Ensaio Antimicrobiano

Os ensaios antimicrobianos foram realizados utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M7-A6 e adaptação do M27-A2, para determinação o CIM (menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo avaliado). As determinações de CIM foram realizadas em triplicata em microplacas com 96 poços. Os microrganismos utilizados da *American Type Culture Colletion* foram *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 15442), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida tropicalis* (ATCC 28707). As soluções-estoque das amostras testadas foram preparadas em frasco tipo Eppendorf, solubilizando-se 2 mg para extratos brutos e frações, e 1 mg para substâncias puras em 40 µL de DMSO. Essas soluções foram diluídas em 960 µL do caldo Mueller-Hinton para bactérias ou caldo Sabouraud para o ensaio com a levedura. A partir dessa solução as concentrações finais variaram de 7,81 a 500 µg/mL para substâncias puras e 15,62 a 1000 µg/mL para extratos e partições. Os inóculos foram padronizadas utilizando-se a escala de 0,5 de Mc Farland de turbidez padrão (10^8 UFC/mL) e diluídos na razão 1:10 no caldo para o procedimento de microdiluição. Após a micropipetagem, as microplacas foram tampadas e incubadas a 37 °C por 18-24 h sem agitação. Terminado o período de incubação, os resultados foram visualizados e os poços que não apresentaram crescimento aparente foram selecionados para determinar a atividade microbicida (capacidade de matar o microrganismo) ou microbiostática (capacidade de inibir o crescimento do microrganismo) das amostras. Essa determinação foi realizada através de

subculturas em placas de Petri que foram incubadas a 37 °C por 48 h e verificou-se a presença/ausência de colônias microbianas. Após o preparo das subculturas foram adicionados em cada orifício das placas 15 µL de resazurina a 0,01% em solução aquosa esterilizada onde, após 4 h de reincubação, a leitura foi realizada. A resazurina (azul) é um revelador que avalia a viabilidade da célula microbiana, através da mudança de coloração de azul para pink (PALOMINO et al., 2002).

3.5.4.4 – Ensaio de Atividade Antioxidante

3.5.4.4.1 - Determinação da Atividade Antioxidante Total pela Captura do Radical Livre DPPH

O método mais utilizado para determinar atividade antioxidante, consiste em avaliar a atividade supressora do radical livre, 2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH[•]), de coloração roxa e que absorve no comprimento de onda de 515 nm. Por ação de um antioxidante, o radical DPPH é reduzido formando difenilpicrilhidrazina (DPPH₂), de coloração amarela (Figura 3.3) (BONDET et al., 1997).

Para este ensaio, preparou-se uma solução etanólica de DPPH 100 µM. A solução foi agitada vigorosamente e adicionada em um Eppendorf: 950 µL de solução de DPPH (100 µM) e 50 µL da amostra a ser testada nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56 µg/mL. As amostras preparadas foram encubadas em temperatura ambiente por 30 minutos no escuro e a densidade óptica foi medida em um espectrofotômetro a 515 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão referência e álcool etílico como branco (LUQMAN et al., 2012).

A partir dos resultados obtidos, calculou-se a porcentagem de inibição (%) da atividade supressora do radical DPPH, ou seja, a porcentagem que não foi consumida pelo antioxidante supostamente presente na amostra, utilizando a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{absorbância do controle} - \text{absorbância da amostra})}{\text{absorbância do controle}}$$

Normalmente, os resultados são apresentados como IC₅₀, que expressa a concentração da amostra antioxidante ou padrão, necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH, que é calculada a partir da curva cinética (HUANG et al., 2005; NILE et al., 2012).

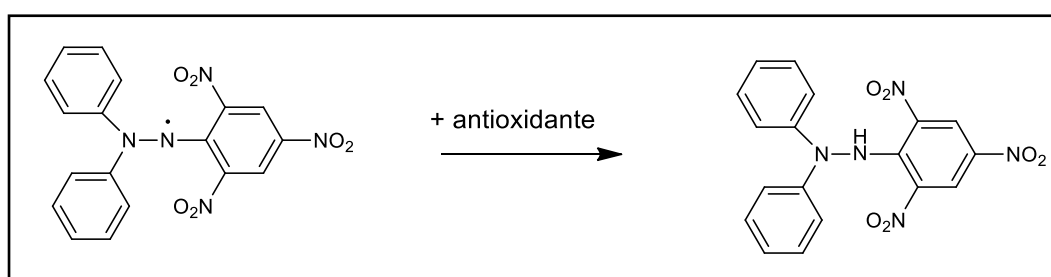


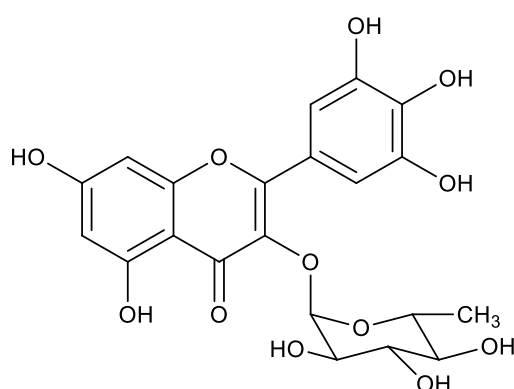
FIGURA 3.3 – Reação do Radical DPPH.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

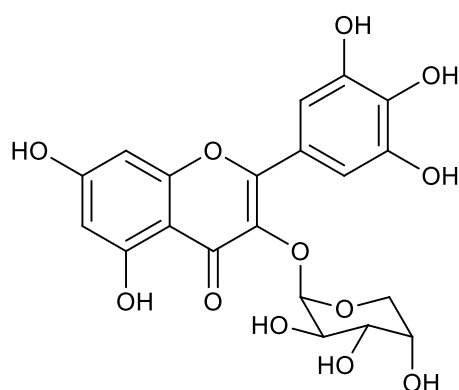
4.1 – Substâncias Isoladas/ Identificadas

O estudo fitoquímico da planta *Eugenia myrcianthes* possibilitou o isolamento e identificação de metabólitos secundários pertencente a diferentes classes de substâncias.

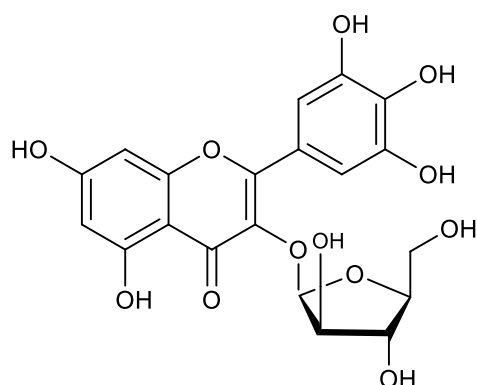
Flavonoides



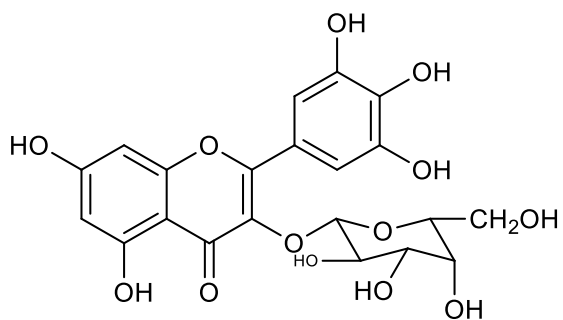
Miricetina-3-*O*- α -L-raminosídeo (I)
Massa: 40,0 mg
Isolamento: p. 28 e 29
Identificação: p. 50



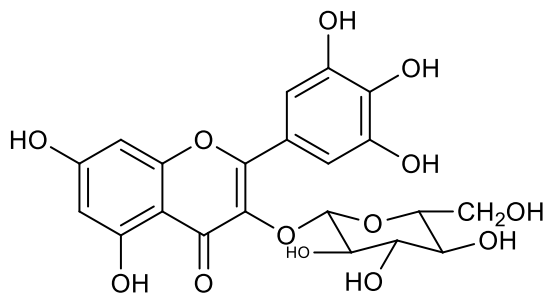
Miricetina-3-*O*- α -L-arabnopiranosídeo (II)
Massa: 7,0 mg
Isolamento: p. 27
Identificação: p. 56



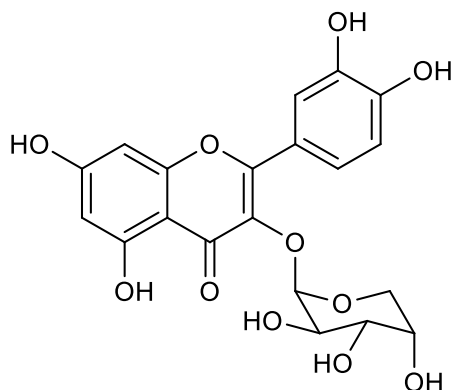
Miricetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo (III)
Massa: 2,6 mg
Isolamento: p. 30
Identificação: p. 62



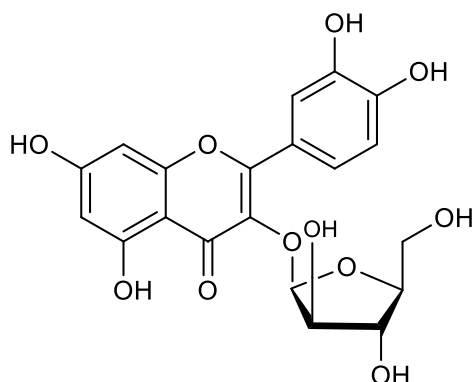
Miricetina-3-*O*- β -D-galactosídeo (IV)
 Massa: 1,0 mg (mistura)
 Isolamento: p. 30
 Identificação: p. 68



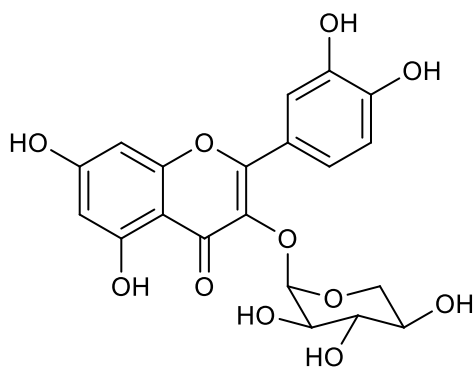
Miricetina-3-*O*- β -D-glicosídeo (V)
 Massa: 1,0 mg (mistura)
 Isolamento: p. 30
 Identificação: p. 68



Quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo (VI)
 Massa: 3,8 mg (mistura)
 Isolamento: p. 29
 Identificação: p. 72



Quercetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo (VII)
 Massa: 11,7 mg
 Isolamento: p. 29
 Identificação: p. 78



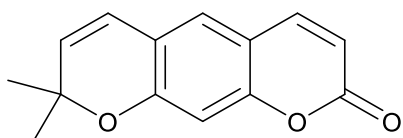
Quercetina-3-*O*- β -L-xilosídeo (VIII)

Massa: 1,0 mg (mistura)

Isolamento: p. 30

Identificação: p. 84

Cumarina



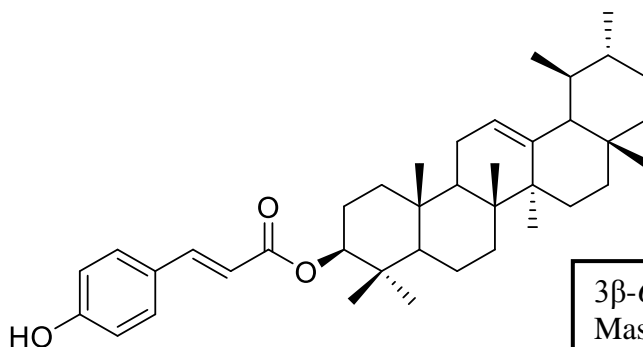
Xantiletina (IX)

Massa: 2,0 mg

Isolamento: p. 31

Identificação: p. 91

Triterpenos

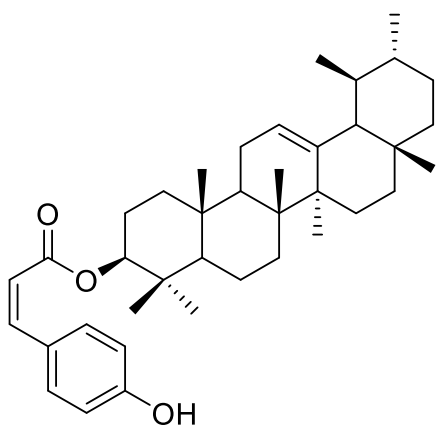


3 β -*O*-*trans*-p-cumaroil- α -amirina (X)

Massa: 5,0 mg (mistura)

Isolamento: p. 25

Identificação: p. 94



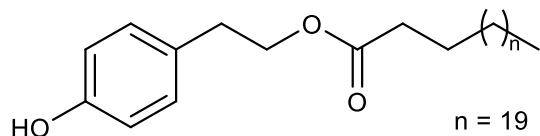
3 β -*O*-*cis*-p-cumaroil- α -amirina (XI)

Massa: 5,0 (mistura)

Isolamento: p. 25

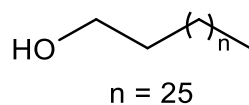
Identificação: p. 94

Derivado do tirosol



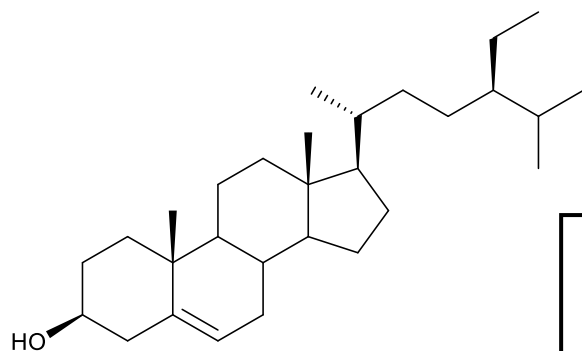
2-(4'-hidroxifenil)etil tricosanoato (XII)
Massa: 2,0 mg (mistura)
Isolamento: p. 31
Identificação: p. 102

Álcool



1-octacosanol (XIII)
Massa: 2,0 mg (mistura)
Isolamento: p. 31
Identificação: p. 102

Esteróide



β -sitosterol (XIV)
Massa: 21,6 mg
Isolamento: p. 31
Identificação: p. 111

4.1.1 – Flavonoides

Flavonoide (o termo é derivado da palavra em Latin “flavus”, que significa amarelo) é um grande grupo de compostos fenólicos que apresenta diversidade entre si, na sua estrutura química e nas características (HIDALGO et al., 2010). Constitui um grupo de metabólitos secundários de ampla ocorrência na natureza. São encontrados naturalmente em plantas, frutas, vegetais e cereais. Têm sido atribuídas a esta classe de substâncias várias propriedades biológicas e farmacológicas, tais como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, entre outras (HIDALGO et al., 2010; ZHANG et al., 2008). Por apresentar estas múltiplas atividades biológicas, os flavonoides têm atraído à atenção de pesquisadores e consumidores.

Os flavonoides são divididos em seis subclasses majoritárias, de acordo com grau de oxidação do heterocíclico, em: flavonois, flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas e flavan-3-ols (flavana) (Figura 4.1) (BRAVO, 1998; WANG & HUANG, 2004; VUKICS & GUTTMAN, 2010; HUI et al., 2013; PETERSON & DWYER, 1998). A combinação das subclasses com glicosilações em diferentes posições e a grande variedade de açúcares produz um enorme número de diferentes compostos para esta classe de substâncias naturais.

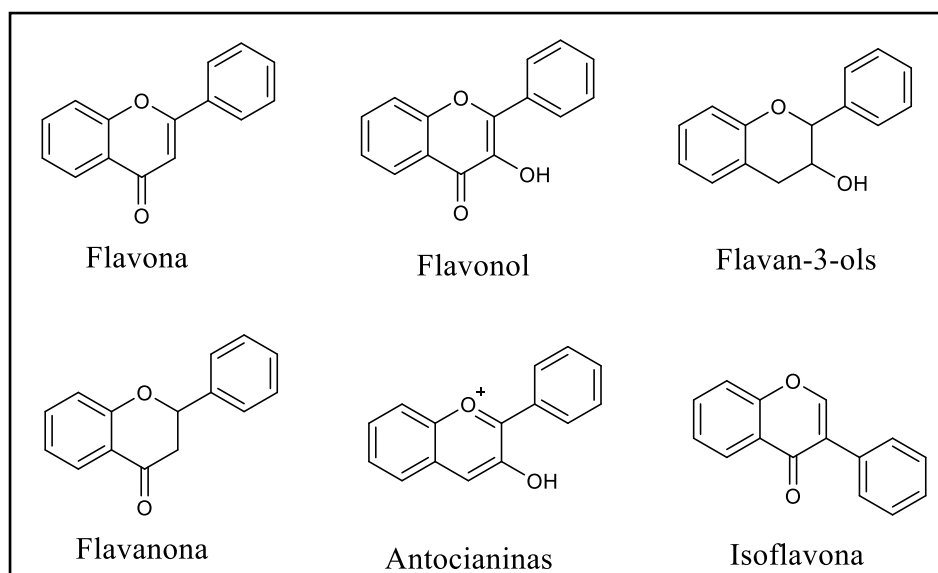


FIGURA 4.1 - Classificação dos flavonoides por subclasses.

O esqueleto base dos flavonoides consiste em um esqueleto de difenilpropano (C6-C3-C6) com dois anéis benzênicos (anel A e B) ligados a um anel pirano (C) (Figura 4.2) (BRAVO, 1998; HICHRI et al., 2011). A numeração da estrutura dos flavonoides é iniciada pelo sistema benzopirânico, sendo os átomos de carbonos individuais numerados com algarismos arábicos para os anéis A e C e números marcados com linha (') para o anel B e a numeração 9 e 10 podem ser substituídas por 8a e 4a, na seqüência os substituintes recebem numeração de acordo com a posição e a subclasse flavonoídica é então especificada.

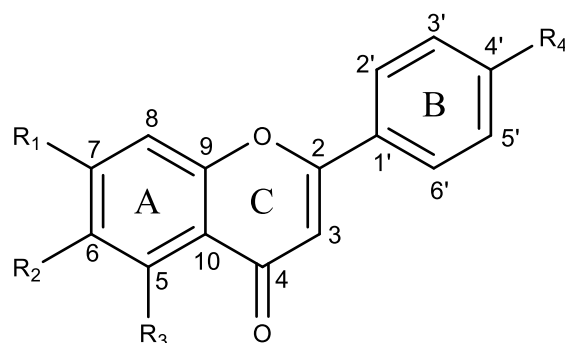


FIGURA 4.2 - Estrutura básica de um flavonoide (designação dos anéis e numeração dos átomos de carbono).

A biossíntese dos flavonoides ocorre por uma via mista, a via do ácido chiquímico e a do acetato, assim conhecida como via dos fenilpropanoides (sintetizado a partir do ácido chiquímico) que age como precursor na síntese de um intermediário ao qual são adicionados três resíduos de acetato com posterior ciclização da estrutura (Figura 4.3). As subsequentes condensações produzem diferentes formas de flavonoides, que diferem no nível de oxidação e no modelo de substituição da cadeia heterocíclica C (DEWICK, 2009; FERREYRA et al., 2012).

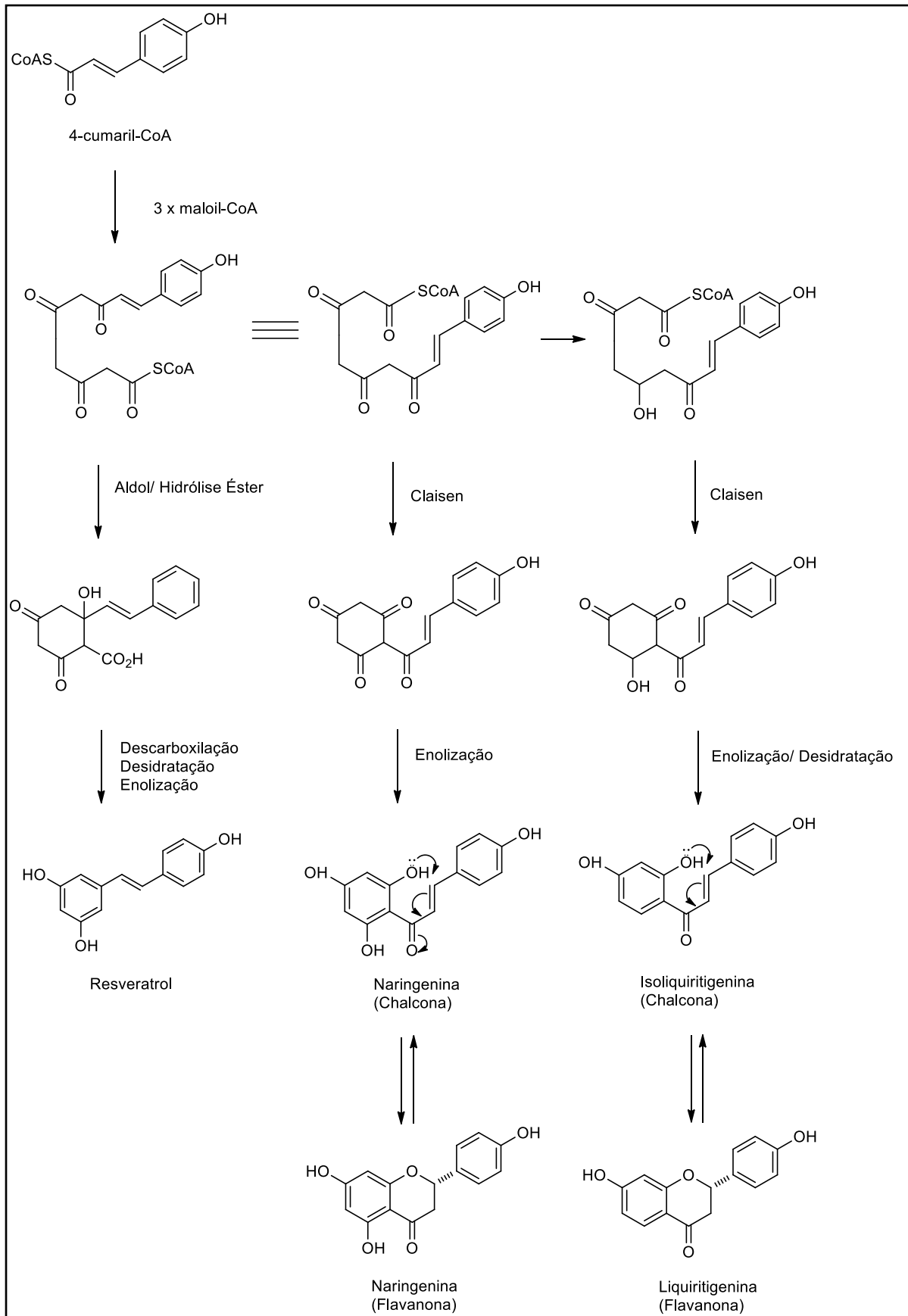


FIGURA 4.3 - Biossíntese dos flavonoides (DEWICK, 2009).

Os flavonoides ocasionalmente ocorrem nas plantas como aglicona (a estrutura do flavonoide sem a unidade de açúcar), embora eles sejam mais comumente encontrados como derivados de glicosídeos (glicona - a estrutura do flavonoide com a unidade de açúcar), *O*-glicosídeo tem o substituinte açúcar ligado ao grupo hidroxila da aglicona, já no caso do *C*-glicosídeo, o açúcar está ligado a aglicona através da ligação C-C. Os monossacarídeos mais frequentemente encontrados na combinação glicosídica são glucose e ramnose, e menos frequentemente arabinose, xilose e ácido glucurônico (JAY et al., 2006; WILLIAMS, 2006; HICHRI et al., 2011; ERLUND et al., 2004).

A confirmação da presença de glicosídeos como substituinte e a identificação dos glicosídeos pode ser obtida através de experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional. O sinal em torno de δ_{H} 5,0 ppm é característico de hidrogênio anomérico e, sinais na faixa de δ_{H} 4,0 e 3,0 ppm são característicos dos demais hidrogênios da unidade glicosídica. A presença de um dubleto com deslocamento químico de aproximadamente δ_{H} 1,0 ppm ($J = 6,0$ Hz) é referente ao sinal de uma metila, indicando a uma unidade de ramnose (HARBONE & MABRY, 1982 e 1994). Nos espectros de RMN ^{13}C observam-se os sinais com deslocamentos químicos em torno de δ_{C} 100,0 ppm característico de carbono anomérico para uma ligação C-O glicosídica e em torno de δ_{C} 73,0 ppm para carbono de ligação C-C glicosídica. Sinais na faixa de δ_{C} 61,0-70,0 ppm são característicos dos demais carbonos de unidade de glicosídeos. O sinal de carbono de metila em δ_{C} 17,0 ppm confirma a presença de uma unidade de ramnose (AGRAWAL, 1989). O valor da constante de acoplamento dos sinais do hidrogênio anomérico indica a configuração do glicosídeo ligado à aglicona. A Tabela 4.1 mostra a relação entre as constantes de acoplamento e as estereoquímicas relativas das ligações entre os glicosídeos e a aglicona, que também estão indicados na Figura 4.4 (HARBONE & MABRY, 1982).

TABELA 4.1 - Configurações e constante de acoplamento J (Hz) dos glicosídeos (HARBONE & MABRY, 1982)

Grupo	Glicosídeo	Configuração	J (Hz)
Piranosídeo	D – glicose, galactose, xilose	- β -	7 – 8
	D – glicose, galactose, xilose	- α -	3- 4
	L – ramnose	- β -	1
	L – ramnose	- α -	2
	L – arabinose	- β -	2,5
	L – arabinose	- α -	8
Furanosídeo	D – glicose, galactose, xilose	- β -	0-2
	D – glicose, galactose, xilose	- α -	4 – 4,5
	L – arabinose	- β -	4
	L – arabinose	- α -	1

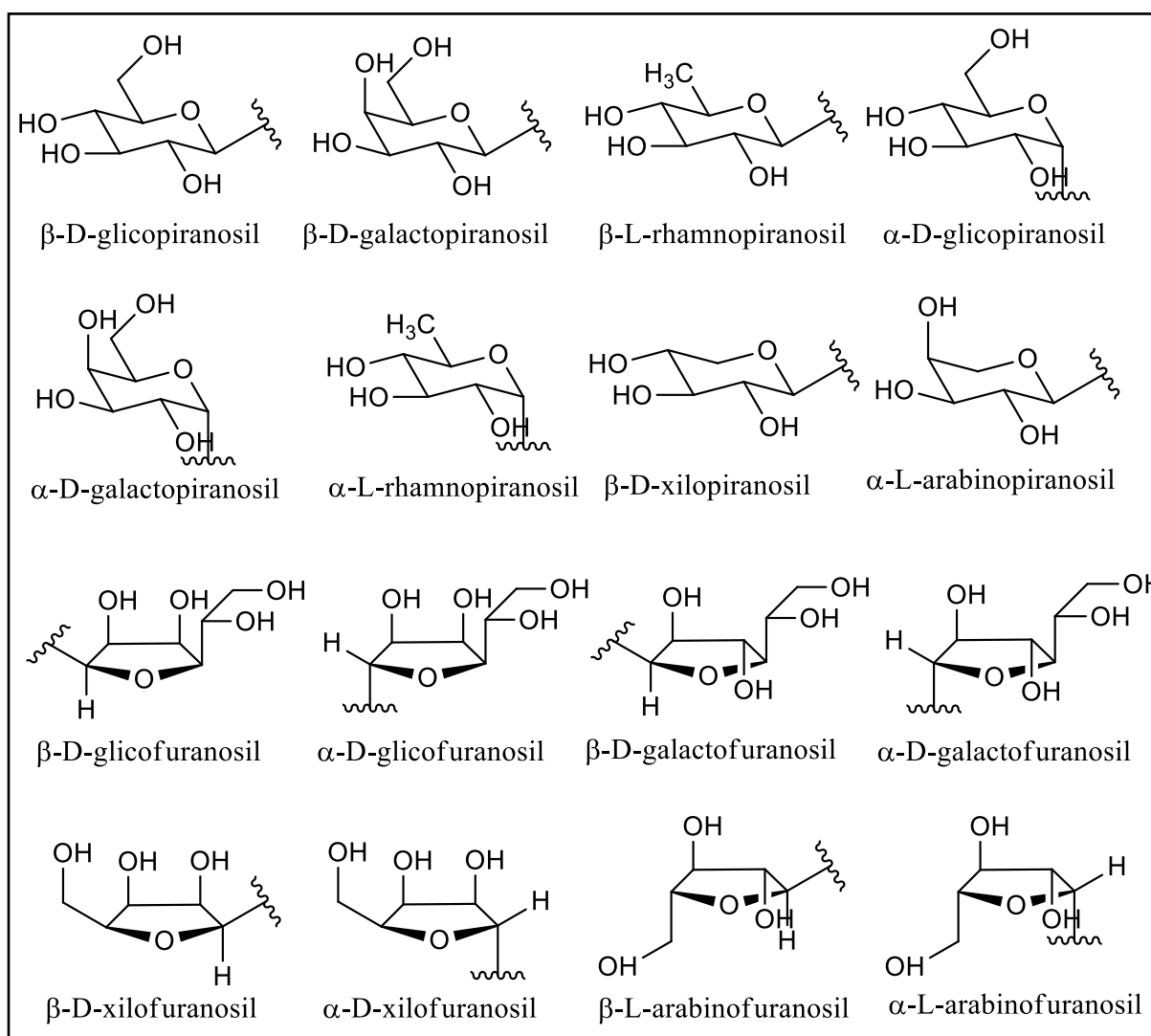


FIGURA 4.4 - Estruturas dos glicosídeos.

Para distinguir a posição na qual o glicosídeo esta ligado pode-se utilizar o deslocamento químico do sinal do hidrogênio anomérico. As Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4 mostra alguns destes deslocamentos químicos para C- e O-glicosídeos, respectivamente.

TABELA 4.2 - Deslocamentos químicos de hidrogênios anoméricos de glicosídeos de flavonoides C-glicosilados (DMSO- d_6) (HARBONE & MABRY, 1982)

Glicosídeo Primário	δ (ppm), J (Hz)	Glicosídeo Terminal	δ (ppm), J (Hz)
6-C- β -D-Glucosídeo	4,58 – 4,90 (10)		
	4,70	2 ^G -O- α -L-Mannosil	4,30 (2)
	4,77 – 4,81	(2 ^G -O-Acetilado)	
6-C- α -L-Ramnosídeo	4,85 – 5,26		
6-C- α -L-Arabinosídeo	4,67 (8,2)		
6-C- β -D-Oliosídeo	5,01 (11,7, 3,2)		
6-C- β -L-Boivinosídeo	5,33 (12,3, 3,1)		
8-C- β -D-Glucosídeo	4,64-4,88 (10)		
	4,69	2 ^G -O-Apiofuranosil	4,98 (1,8)
	4,89	2 ^G -O- α -L-Ramnosil	5,00 (<i>s</i>)
	4,76	6 ^G -O-Apiofuranosil	4,79 (3)
	4,88 – 4,92	(2 ^G -O-Acetilado)	
8-C- β -D-Xilose	5,04 (8)		
8-C- β -L-Arabinosídeo	5,51 (<i>s</i>)		
8-C- α -L-Arabinosídeo	4,78 – 4,89 (9)		
6,8-Di-C- β -D-Glucosídeo	4,84 <i>sl</i>		
6,8-Di-C- β -D-Allosídeo	4,93 (9,9)		
6,8-Di-C- α -L Arabinosídeo	4,70 – 4,83 (9,5)		
	4,53 – 4,66 (9,5)		

Na coluna glicosídeo terminal, o número indica a posição onde está ligado o glicosídeo terminal e a letra indica o glicosídeo que ele se liga. Por exemplo: 2^G-O- α -L-Ramnosil, indica que o resíduo de ramnose está ligado na posição 2 de um resíduo de glicose, sendo que esta ligação se dá por meio do oxigênio desta posição. Os valores entre parêntesis correspondem às constantes de acoplamentos.

TABELA 4.3 - Deslocamentos químicos de hidrogênios anoméricos de açúcares glicosídeos de flavonoides 3-*O*-glicosilados (DMSO-*d*₆) (HARBONE & MABRY, 1982)

Glicosídeo primário	δ (ppm)	Glicosídeo Terminal	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)
3- <i>O</i> -β-D-Glucosídeo	5,25 – 5,26		
	5,72 – 5,75	2 ^G - <i>O</i> -β-D-Glucosil	4,63 – 4,65
	5,40 – 5,66	2 ^G - <i>O</i> -α-L-Ramnosil	4,90 – 5,10
	5,65 – 5,72	2 ^G - <i>O</i> -β-D-Xilosil	4,58 – 4,62
	5,28 – 5,46	6 ^G - <i>O</i> -β-D-Glucosil	3,96 – 4,02
	5,28	6 ^G - <i>O</i> -α-L-Ramnosil	4,37 – 4,39
3- <i>O</i> -α-L-Glucosídeo	5,63 <i>sl</i>		
3- <i>O</i> -β-D-Galactosídeo	5,33 – 5,52	2 ^G - <i>O</i> -β-D-Glucosil	4,56 – 4,58
	5,64 – 5,68	2 ^G - <i>O</i> -α-L-Ramnosil	5,02 – 5,12
	5,59 – 5,71	2 ^G - <i>O</i> -β-D- Apiofuranosil	5,31 (1,4)
	5,60		
3- <i>O</i> -β-D-Glucuronídeo	5,30 – 5,32	6 ^G - <i>O</i> -β-D-Glucosil	4,04 – 4,08
	5,42 – 5,47	6 ^G - <i>O</i> -α-L-Ramnosil	4,37 – 4,46
	5,48		
3- <i>O</i> -α-L-Ramnosídeo	4,96 – 5,36	(2 ^R - <i>O</i> -Acetilado)	
	5,56	2 ^R - <i>O</i> -β-D-Glucosil	4,10 – 4,23
	5,39 – 5,56	2 ^R - <i>O</i> -β-D-Xilosil	4,17 – 4,73
	5,21 – 5,50	3 ^R - <i>O</i> -β-D-Glucosil	4,32 – 4,48
	5,33 – 5,44	3 ^R - <i>O</i> -β-D-Galactosil	4,25
	5,31	2 ^R - <i>O</i> -α-L-Ramnosil	4,81
	5,31		
3- <i>O</i> -β-D-Allosídeo	5,67 – 5,68		
3- <i>O</i> -β-Xilosídeo	5,37		
3- <i>O</i> -α-D-Arabinofuranosídeo	5,27 – 5,55		
	5,59	(2 ^A - <i>O</i> -Acetilado)	
3- <i>O</i> -α-L-Arabinofuranosídeo	5,60 <i>s</i>		
3- <i>O</i> -α-L-Arabinopiranosídeo	5,25 <i>d</i>		

Na coluna glicosídeo terminal, o número indica a posição onde está ligado o glicosídeo terminal e a letra indica o glicosídeo que ele se liga. Por exemplo: 2^G-*O*-α-L-Ramnosil, indica que o resíduo de ramnose está ligado na posição 2 de um resíduo de glicose, sendo que esta ligação se dá por meio do oxigênio desta posição.

TABELA 4.4 - Deslocamentos químicos de hidrogênios anoméricos de açúcares glicosídeos de flavonoides em posições diferentes da posição 3-*O*-glicosilados (DMSO-*d*₆) (HARBONE & MABRY, 1982)

Glicosídeo primário	δ (ppm)	Glicosídeo Terminal	δ (ppm)
5- <i>O</i> -β-D-Glucosídeo	4,56 – 4,79 4,90 (diidroflavonol)		
6- <i>O</i> -α-L-Ramnosídeo	5,53		
7- <i>O</i> -β-D-Glucosídeo	4,90 – 5,25 5,05 – 5,56 5,56 4,95 4,80 – 5,10 5,40 (aurona)	2 ^G - <i>O</i> -β-D-Glucosil 2 ^G - <i>O</i> -α-L-Ramnosil 2 ^G - <i>O</i> -β-D-Apiofuranosil 6 ^G - <i>O</i> -α-L-Ramnosil	4,43 – 4,68 5,56 5,38 – 5,40 4,48 – 4,60
7- <i>O</i> -β-D-Glucuronídeo	5,10 – 5,30 5,40	Metoxilado em 8	
7- <i>O</i> -α-L-Ramnosídeo	5,22 – 5,75		
7- <i>O</i> -β-D-Xilosídeo	4,98		
7- <i>O</i> -α-L-Arabinofuranosídeo	5,61		
8- <i>O</i> -β-D-Glucosídeo	4,65		
8- <i>O</i> -β-D-Glucuronídeo	4,82		
2'- <i>O</i> -β-D-Glucosídeo	5,13	(2 ^G - <i>O</i> -Acetilado)	
2'- <i>O</i> -β-D-Glucoronídeo	5,00 – 5,11		
2'- <i>O</i> -β-D-Xilosídeo	4,87		
3'- <i>O</i> -β-D-Glucosídeo	4,92 – 5,00		
3'- <i>O</i> -α-L-Ramnosídeo	5,37 – 5,43		
3'- <i>O</i> -β-D-Xilosídeo	4,80 – 4,90		
4'- <i>O</i> -β-D-Glucosídeo	4,80 – 5,04 5,35	(2 ^G - <i>O</i> -Acetilado)	
4'- <i>O</i> -β-D-Glactosídeo	5,00		

Na coluna glicosídeo terminal, o número indica a posição onde está ligado o glicosídeo terminal e a letra indica o glicosídeo que ele se liga. Por exemplo: 2^G-*O*-α-L-Ramnosil, indica que o resíduo de ramnose está ligado na posição 2 de um resíduo de glicose, sendo que esta ligação se dá por meio do oxigênio desta posição.

4.1.1.1 – Identificação Estrutural da Substância I

A substância I foi isolada da fração S4-3 e H1-3 a partir da fração acetato de etila das folhas (Fluxograma 3.6 e 3.7, p. 26 e 27). Esta substância apresentou-se como um sólido amorfo amarelo e como sendo a substância majoritária na fração acetato de etila (EMFa), pois obteve-se 40,0 mg. A identificação dessa substância foi realizada através de experimentos de RMN ^1H (Figura 4.5), COSY (Figura 4.6), HSQC (Figura 4.7) e HMBC (Figura 4.8). Os dados obtidos foram comparados com dados da literatura (Tabela 4.5) (ISIDORO et al., 2012).

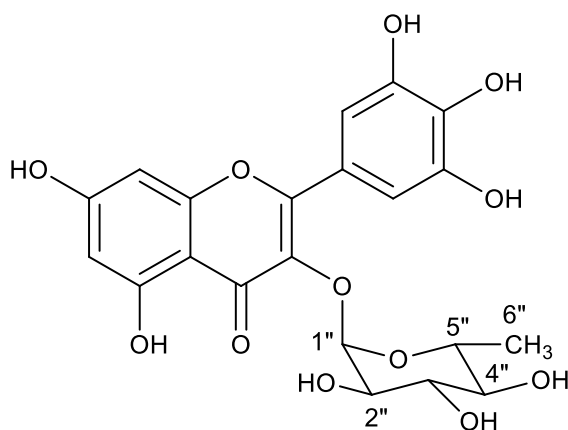
A análise do espectro de RMN ^1H mostrou sinais característicos da aglicona miricetina. Foram observados sinais referentes a um sistema de substituição 3', 4', 5' no anel B com sinal em δ_{H} 6,94 (*s*, 2H) que foi atribuído aos hidrogênios na posição H-2' e H-6', os quais devido a livre rotação do anel B são equivalentes em deslocamento químico. O mapa de correlações HSQC apresentou a correlação dos sinais dos hidrogênios em δ_{H} 6,94 com o carbono em δ_{C} 109,7 (C-2' e C-6'). A análise do mapa de correlações HMBC indicou a correlação do sinal em δ_{H} 6,94 com os dos carbonos em δ_{C} 109,7, atribuído ao C-2' e C-6', δ_{C} 147,0 atribuído ao C-3' e C-5', δ_{C} 138,0 atribuído ao C-4', δ_{C} 122,0 atribuído ao C-1' e δ_{C} 159,6 atribuído ao C-2, este deslocamento é característico do carbono β , confirmando seu posicionamento.

Observou-se ainda, dois dubletos correspondentes a dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,35 (*d*, $J = 2,0$, 2H, H-8) e δ_{H} 6,19 (*d*, $J = 2,0$, 2H, H-6) típicos de um sistema de acoplamento AX neste anel. O mapa de correlações HSCQ apresenta a correlação dos sinais dos hidrogênios em δ_{H} 6,35 e δ_{H} 6,19 com os carbonos em δ_{C} 94,8 (C-8) e δ_{C} 100,0 (C-6), respectivamente. A análise do mapa de correlações HMBC apresentou a correlação do sinal do dubleto em δ_{H} 6,35 com os dos carbonos em δ_{C} 100,0 (C-6), δ_{C} 166,0 (C-7), δ_{C} 158,6 (C-9), δ_{C} 106,0 (C-10) e δ_{C} 179,8 (C-4), e o dubleto em δ_{H} 6,19 com os dos carbonos em δ_{C} 94,8 (C-8), δ_{C} 163,3 (C-5), δ_{C} 166,0 (C-7) e δ_{C} 106,0 (C-

10). Com a observação destas correlações pode-se atribuir estes sinais aos hidrogênios 6 e 8 do anel A de flavona.

A observação do duplo dubleto em δ_H 4,21 (*dd*, $J = 3,0$ e $1,6$, H-2'') e δ_H 3,79 (*dd*, $J = 9,5$ e $3,5$ Hz, H-3''), do multiplete em δ_H 3,49-3,54 (*m*, H-5''), e do dubleto em δ_H 3,35 (*d*, $J = 9,5$ Hz, H-4'') sugerem a presença de unidade glicosídica. Portanto, o sinal em δ_H 5,30 (*d*, $J = 1,0$ Hz, H-1') refere-se ao hidrogênio anomérico e este valor de constante de acoplamento é característico de α -L-raminosídeo, confirmado pelo sinal de deslocamento químico característico de metila de raminose δ_H 0,96 (*d*, $J = 6,0$ Hz, 3H, H-6''), assim indicando ter um glicosídeo como substituinte no esqueleto flavonoídico. O espectro de correlação COSY foi usado para confirmação das interações spin-spin dos átomos de hidrogênios presentes no anel da raminose. Para se determinar a posição na qual o glicosídeo esta ligado na aglicona utilizou-se a correlação no mapa de correlações HMBC do hidrogênio anomérico com um carbono em δ_C 136,4 que foi atribuído ao C-3 do anel C do flavonol, pois era o único que faltava ser atribuído.

Analisando os dados dos espectros descritos acima foi o suficiente para confirmar que a substância I foi identificada como o flavonol Miricetina-3-*O*- α -L-raminosídeo.



Miricetina-3-*O*- α -L-raminosídeo (Miricetrina) (I)

TABELA 4.5 - Dados de RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) e de RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz) da substância I e comparação com a Miricetina-3-*O*- α -L-ramnosídeo (ISIDORO et al., 2012, CD₃OD, RMN ¹H 400 MHz e RMN ¹³C 100 MHz)

H/C	δ_H (ppm), <i>J</i> (Hz)		δ_C (ppm), <i>J</i> (Hz)	
	Substância I	ISIDORO et al., 2012	Substância I	ISIDORO et al., 2012
2	-	-	159,6	159,6
3	-	-	136,4	136,5
4	-	-	179,8	179,4
5	-	-	163,3	163,4
6	6,19 (<i>d</i> , 2,0)	6,20 (<i>d</i> , 2,0)	100,0	100,0
7	-	-	166,0	166,3
8	6,35 (<i>d</i> , 2,0)	6,42 (<i>d</i> , 2,0)	94,8	94,9
9	-	-	158,6	158,7
10	-	-	106,0	106,0
1'	-	-	122,0	122,1
2'	6,94 (<i>s</i>)	6,95 (<i>s</i>)	109,7	109,7
3'	-	-	147,0	147,0
4'	-	-	138,0	138,1
5'	-	-	147,0	147,0
6'	6,94 (<i>s</i>)	6,95 (<i>s</i>)	109,7	108,5
1''	5,30 (<i>d</i> , 2,0)	5,31 (<i>d</i> , 2,0)	103,7	103,8
2''	4,21 (<i>dd</i> , 3,0 e 1,6)	4,21 (<i>dd</i> , 3,2 e 1,8)	72,0	71,8
3''	3,79(<i>dd</i> , 9,5 e 3,5)	3,78 (<i>dd</i> , 9,2 e 3,2)	72,2	72,2
4''	3,35 (<i>d</i> , 9,5)	3,33 (<i>t</i> , 9,2)	73,4	72,3
5''	3,49-3,54 (<i>m</i>)	3,51 (<i>m</i>)	72,1	72,0
6''	0,96 (<i>d</i> , 6,0)	0,94 (<i>d</i> , 5,6)	17,8	17,8

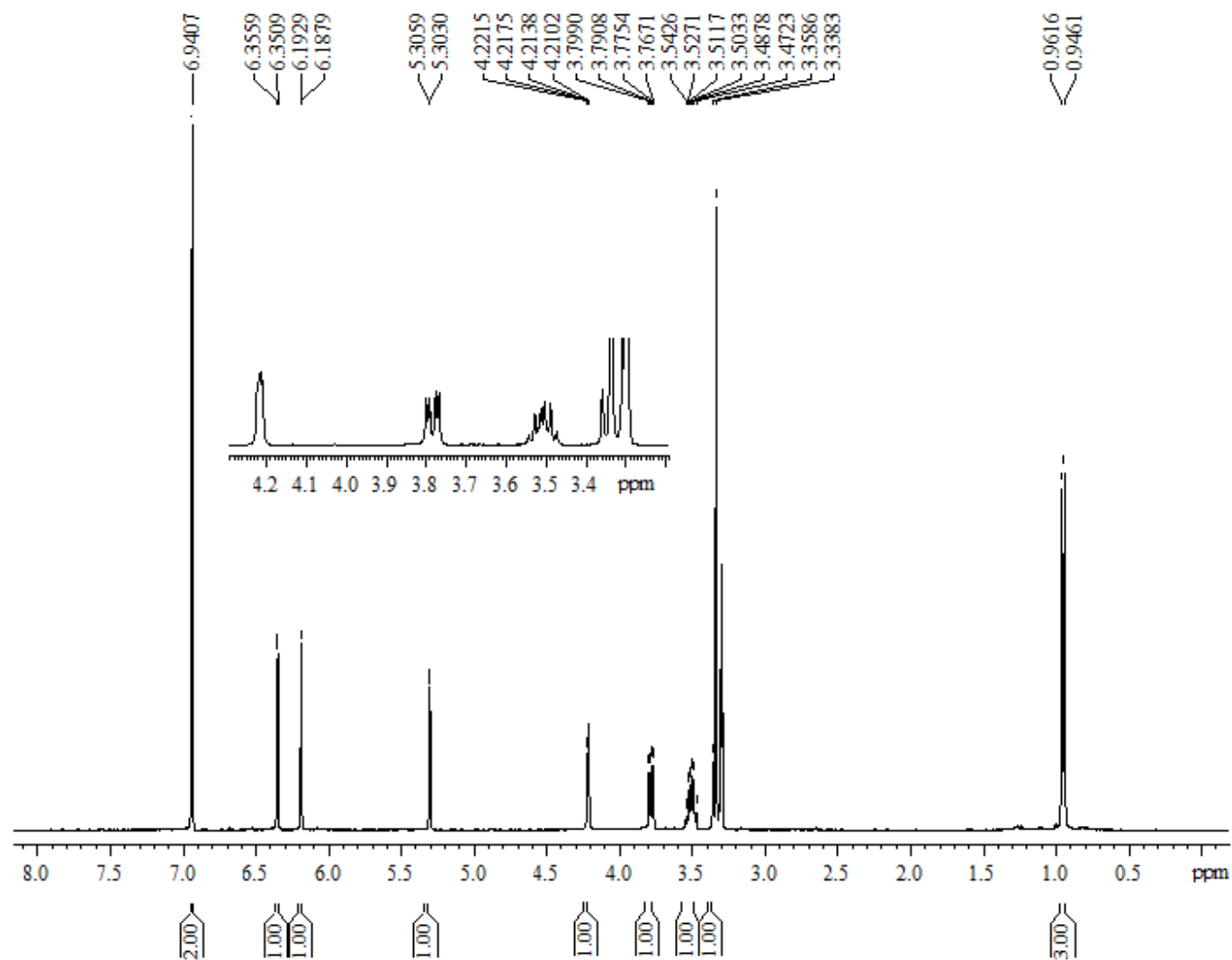


FIGURA 4.5 - Espectro de RMN ^1H da substância I (CD_3OD , 400 MHz).

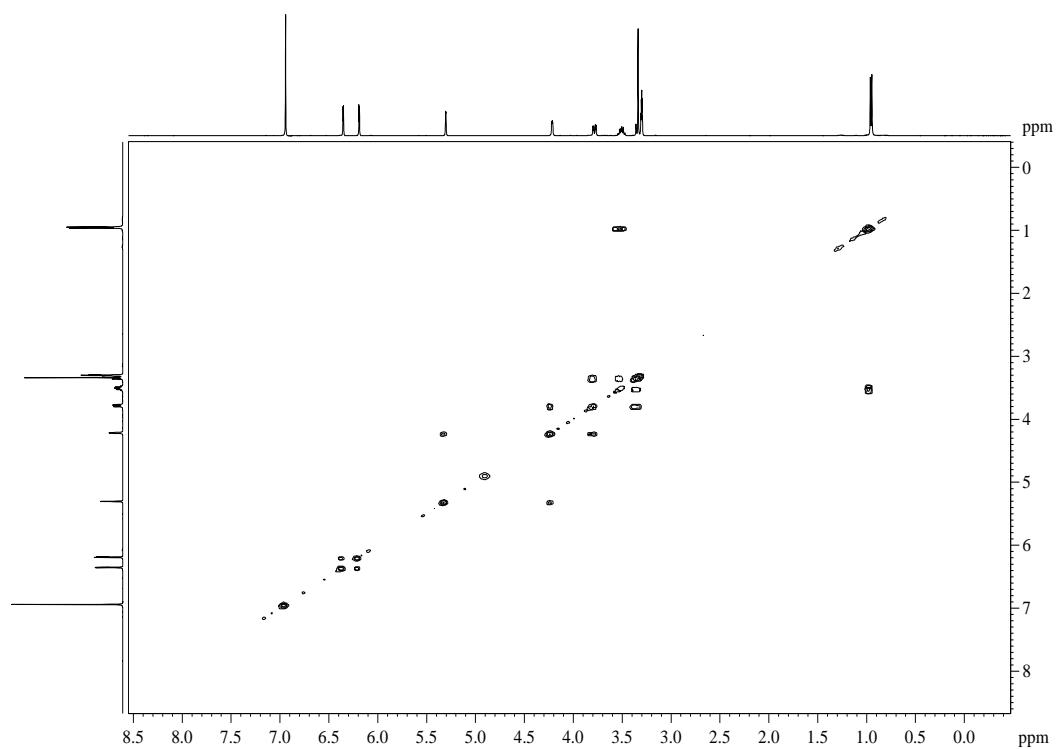


FIGURA 4.6 - Mapa de contornos COSY da substância I (CD₃OD, 400 MHz).

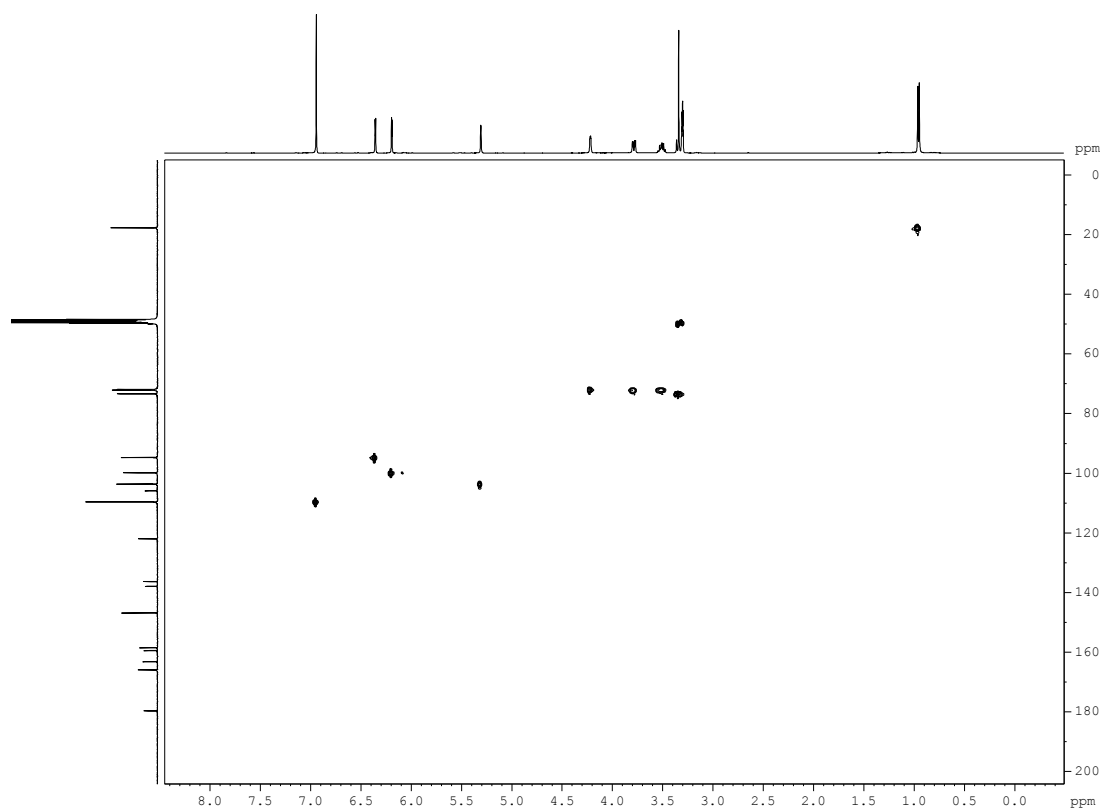


FIGURA 4.7 - Mapa de correlações HSQC da substância I (CD₃OD, 400 MHz).

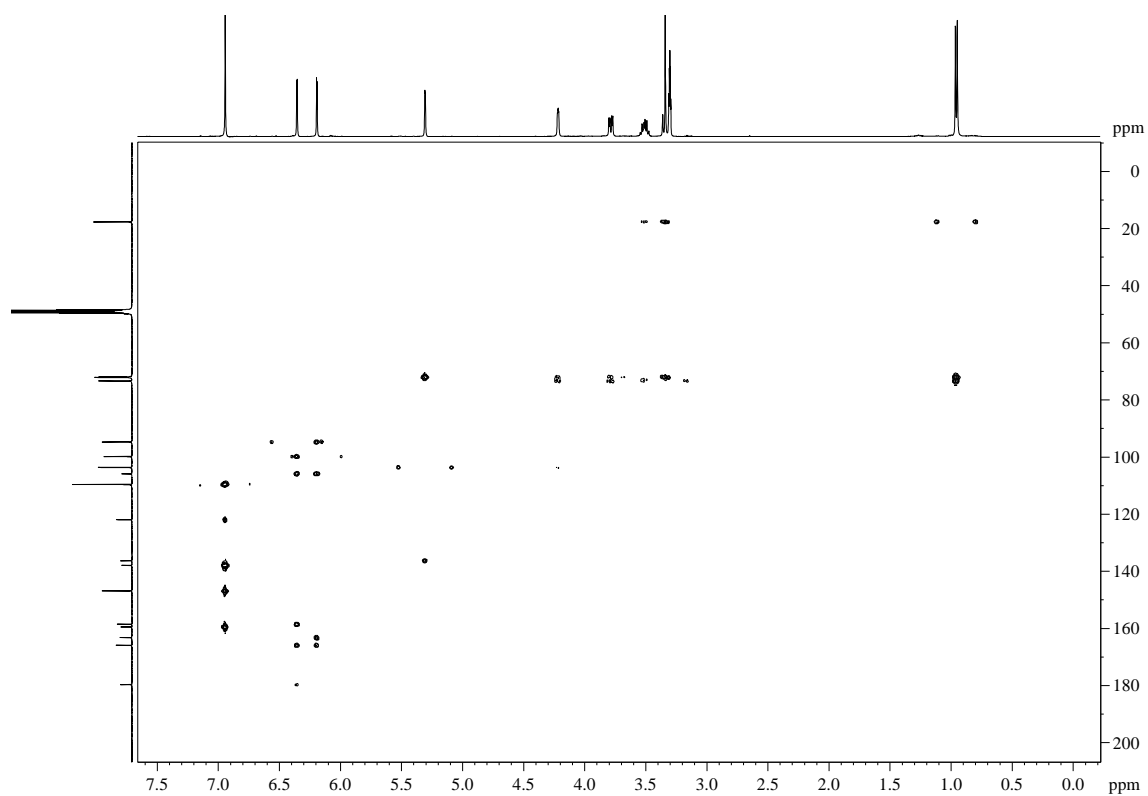


FIGURA 4.8 - Mapa de correlações HMBC da substância I (CD₃OD, 400 MHz).

4.1.1.2 – Identificação Estrutural da Substância II

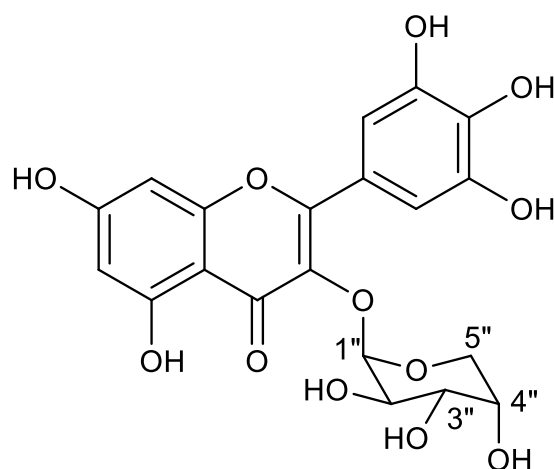
A substância II foi isolada da fração S3-9 a partir da fração acetato de etila das folhas (Fluxograma 3.5, p. 27), como um sólido amorfo amarelo e sua identificação foi realizada através de dados dos espectros de RMN ^1H (Figura 4.9), COSY (Figura 4.10), HSQC (Figura 4.11) e HMBC (Figura 4.12). Os dados obtidos foram comparados com dados da literatura (Tabela 4.6) (MADIKIZELA et al., 2013).

No espectro de RMN ^1H foram observados sinais característicos da aglicona miricetina, apresentando um singlete bem intenso em δ_{H} 7,30 integrando para dois hidrogênios, característicos dos sinais dos hidrogênios H-2' e H-6' do anel B de um flavonoide substituído nas posições 3', 4' e 5' e a equivalência dos mesmos é ocasionada pela rotação livre do anel, assim mostrando terem equivalência de deslocamento químico. Através do mapa de correlações HSQC foi confirmada a correlação dos sinais dos hidrogênios em δ_{H} 7,30 com o do carbono δ_{C} 110,0 (C-2' e C-6'). A análise do mapa de correlação HMBC confirma a correlação do sinal em δ_{H} 7,30 com os dos carbonos em δ_{C} 110,0, atribuído aos carbonos C-2' e C-6', δ_{C} 146,6 atribuído aos carbonos C-3' e C-5', δ_{C} 138,2 atribuído ao carbono C-4', δ_{C} 121,9 atribuído ao carbono C-1' e δ_{C} 158,8 atribuído ao carbono C-2.

Ainda no espectro de RMN ^1H , observou-se dois dubletos correspondentes a dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,19 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ_{H} 6,38 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-8) que são típicos de um sistema de acoplamento AX neste anel, característicos do anel A presente no esqueleto básico dos flavonoides. No mapa de contornos COSY confirma os acoplamentos entre os hidrogênios do anel A, H-6 e H-8. Através do mapa de correlações HSQC os sinais dos hidrogênios em δ_{H} 6,19 e δ_{H} 6,38 estão diretamente ligados aos carbonos δ_{C} 100,0 (C-6) e δ_{C} 94,8 (C-8), respectivamente. O mapa de correlações HMBC apresentou a correlação dos sinais dos hidrogênios em δ_{H} 6,19 com os carbonos em δ_{C} 94,8 (C-8), δ_{C} 105,7 (C-10), δ_{C} 163,2 (C-5) e δ_{C} 166,3 (C-7), e δ_{H} 6,38

com os carbonos em δ_C 100,0 (C-6), δ_C 105,7 (C-10), δ_C 158,5 (C-9) e δ_C 166,3 (C-7).

A presença de um dubleto em δ_H 5,18 com constante de acoplamento de 6,5 Hz caracterizou-se sendo o hidrogênio anomérico (H-1'') de α -arabnopiranosídeo, integrando para um hidrogênio. A correlação entre o sinal δ_H 5,18 e o sinal de carbono em δ_C 135,9 (C-3) no mapa de correlações HMBC confirmou a substituição do glicosídeo no carbono C-3 e, pelo mapa de correlações HSCQ, mostrou-se que H-1'' está diretamente ligado ao carbono δ_C 104,9. Os sinais entre δ_H 3,48-4,21 presentes no espectro de RMN 1H são referentes aos hidrogênios da unidade glicosídica, e os respectivos carbonos representados por sinais na faixa de δ_C 67,2-74,3. O mapa de contornos COSY confirma o acoplamento entre o hidrogênio anomérico H-1'' e o hidrogênio δ_H 4,21 (*dd*, $J = 8,5$ e $7,0$ Hz, H-2'') e este se correlaciona com o hidrogênio δ_H 3,65 (*dd*, $J = 8,5$ e $3,0$ Hz, H-3'') e este se correlaciona com o hidrogênio δ_H 3,83 (*m*, H-4''). O hidrogênio H-4'' se correlaciona com o dubleto em δ_H 3,48 (*d*, $J = 10,7$ Hz, H-5''a), com o dubleto em δ_H 3,87 (*d*, $J = 3,5$ Hz, H-5''b) e com o hidrogênio H-3''. Assim, analisando os dados dos espectros descritos acima foi o suficiente para confirmar que a substância II foi identificada como o flavonol Miricetina-3-*O*- α -L-arabnopiranosídeo.



Miricetina-3-*O*- α -L-arabnopiranosídeo (II)

TABELA 4.6 - Dados de RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) e de RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz) da substância II e comparação com a Miricetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo (MADIKIZELA et al., 2013, CD₃OD, RMN ¹H 500 MHz e RMN ¹³C 125 MHz)

H/C	δ_H (ppm), <i>J</i> (Hz)		δ_C (ppm), <i>J</i> (Hz)	
	Substância II	MADIKIZELA et al., 2013	Substância II	MADIKIZELA et al., 2013
2	-	-	158,8	158,7
3	-	-	135,9	135,9
4	-	-	179,5	179,4
5	-	-	163,2	163,0
6	6,19 (<i>d</i> , 2,0)	6,20 (<i>d</i> , 2,1)	100,0	100,0
7	-	-	166,3	166,0
8	6,38 (<i>d</i> , 2,0)	6,38 (<i>d</i> , 2,1)	94,8	94,8
9	-	-	158,5	158,4
10	-	-	105,7	105,7
1'	-	-	121,9	121,8
2'	7,30 (<i>s</i>)	7,32 (<i>s</i>)	110,0	110,0
3'	-	-	146,6	146,5
4'	-	-	138,2	138,2
5'	-	-	146,6	146,5
6'	7,30 (<i>s</i>)	7,32 (<i>s</i>)	110,0	110,0
1''	5,18 (<i>d</i> , 6,5)	5,17 (<i>d</i> , 6,8)	104,9	104,9
2''	3,91 (<i>dd</i> , 8,5 e 7,0)	3,91 (<i>dd</i> , 8,5 e 6,7)	73,1	72,8
3''	3,65 (<i>dd</i> , 8,5 e 3,0)	3,67 (<i>dd</i> , 8,5 e 3,3)	74,3	74,0
4''	3,83 (<i>m</i>)	3,83 (<i>d</i> , 1,2)	69,3	69,0
5'' a	3,48 (<i>d</i> , 10,7)	3,48 (<i>d</i> , 10,8)	67,2	66,9
5'' b	3,87 (<i>d</i> , 3,5)	3,87 (<i>d</i> , 3,5)	67,2	66,9

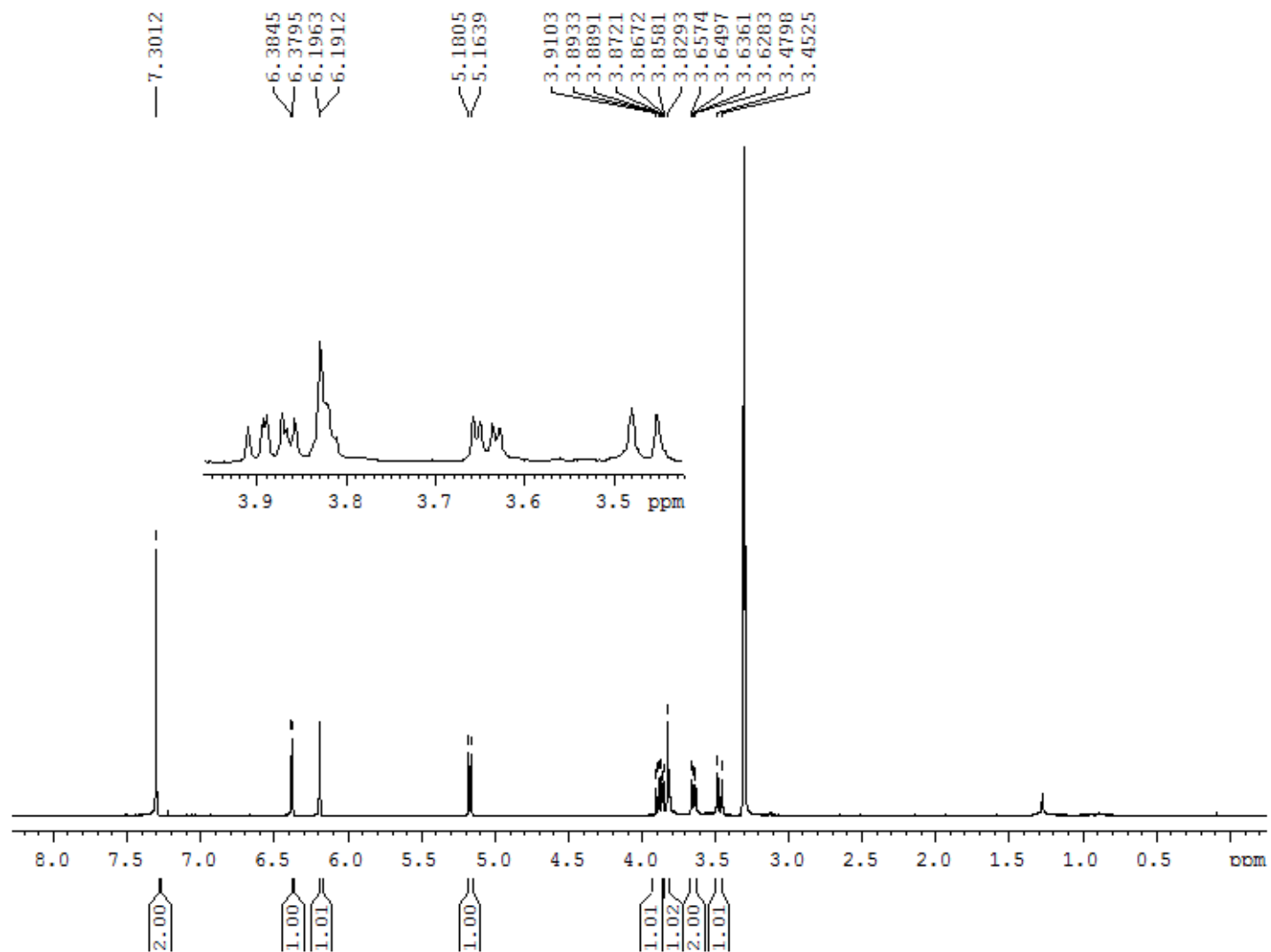


FIGURA 4.9 - Espectro de RMN ^1H da substância II (CD_3OD , 400 MHz).

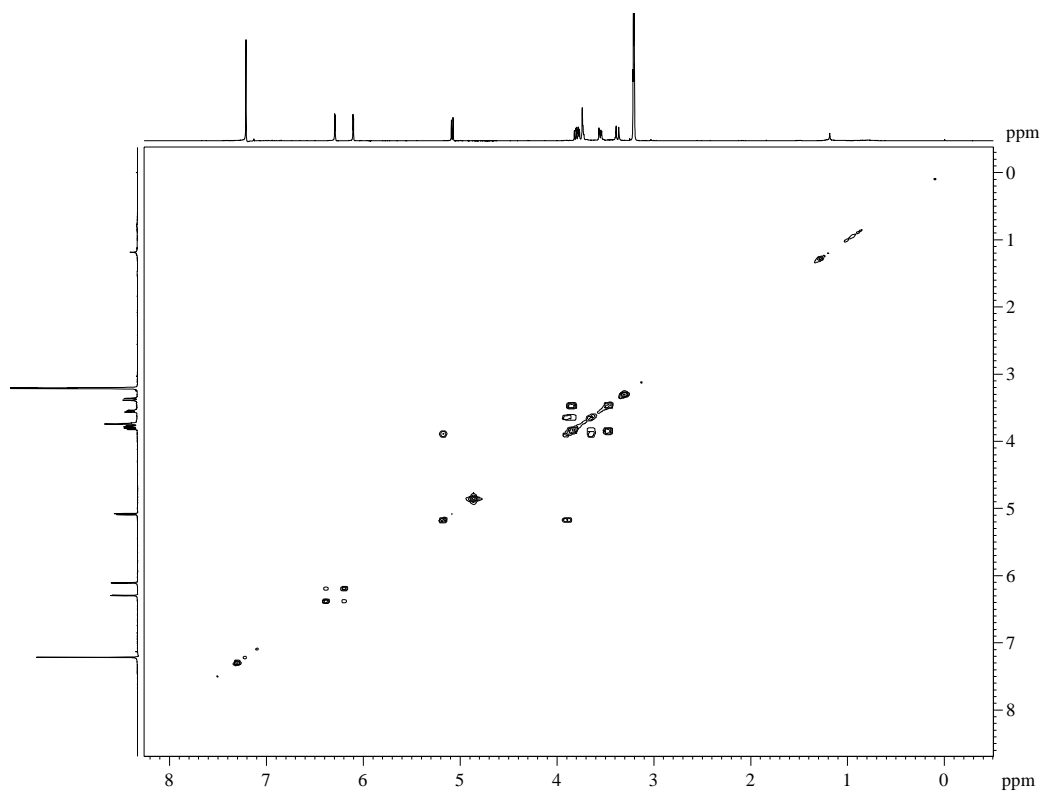


FIGURA 4.10 - Mapa de contornos COSY da substância II (CD₃OD, 400 MHz).

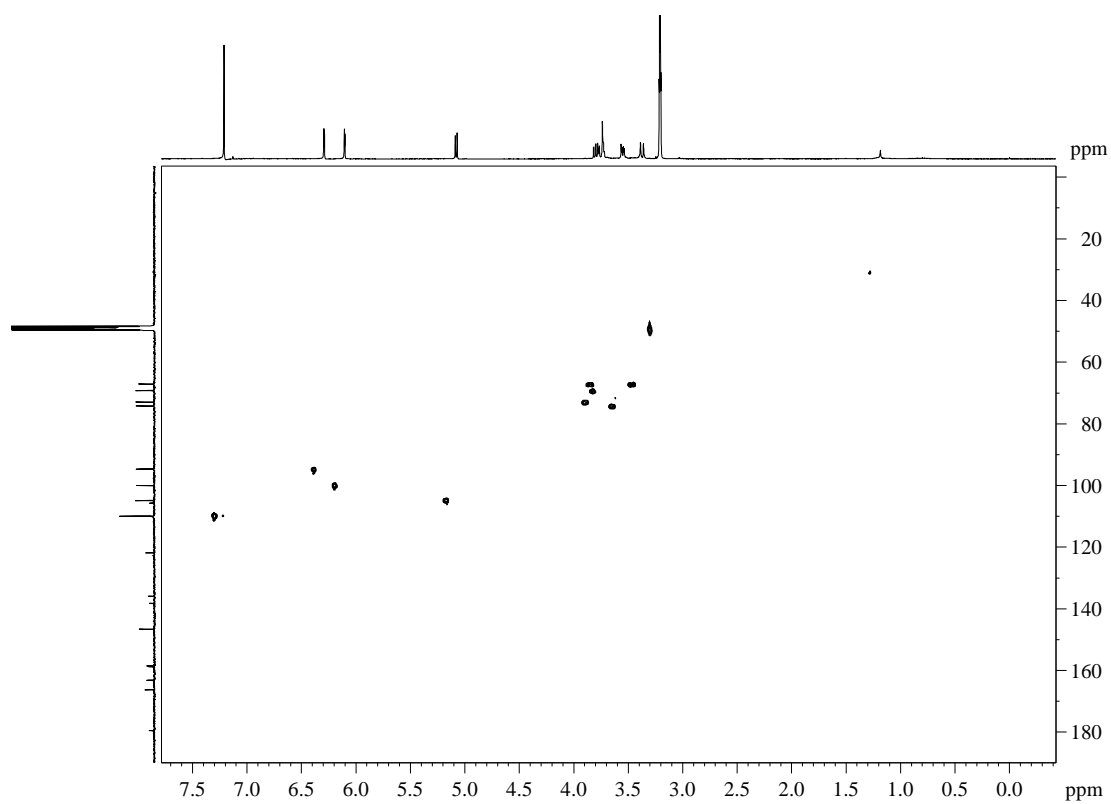


FIGURA 4.11 - Mapa de correlações HSQC da substância II (CD₃OD, 400 MHz).

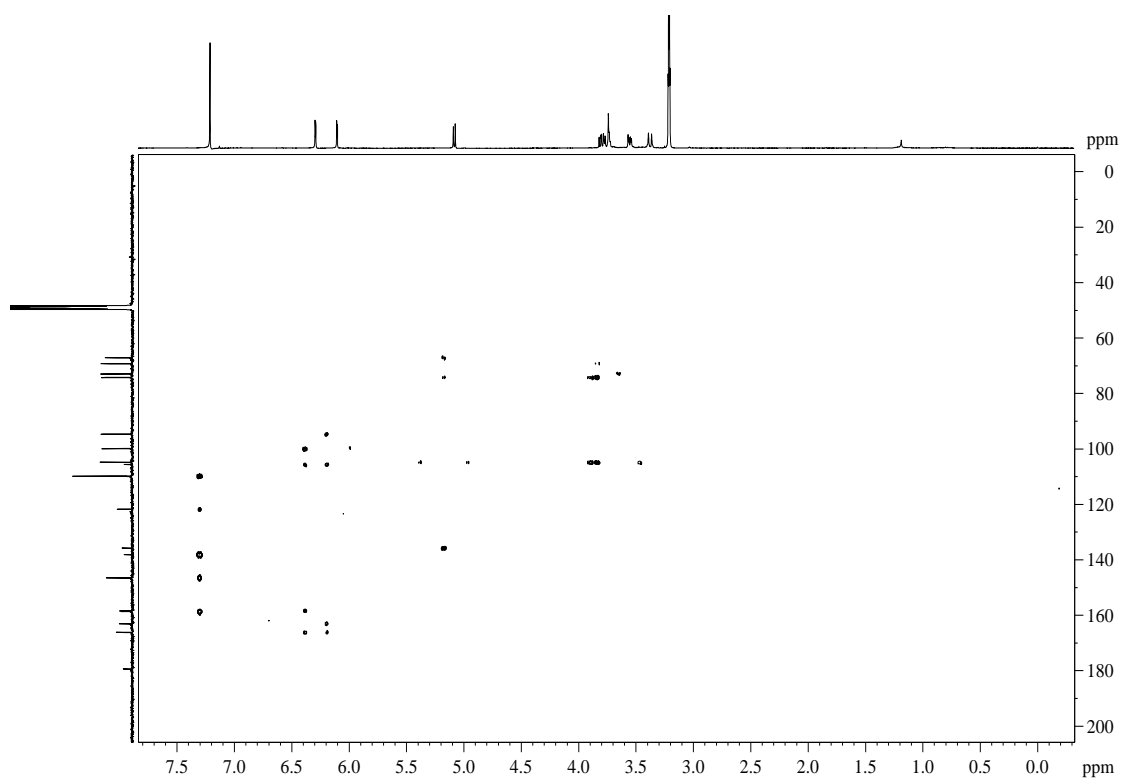


FIGURA 4.12 - Mapa de correlações HMBC da substância II (CD₃OD, 400 MHz).

4.1.1.3 – Identificação Estrutural da Substância III

A substância III foi isolada da fração H3-8 a partir da fração acetato de etila das folhas (Fluxograma 3.8, p. 28), como um sólido amorfo amarelo. A sua identificação foi realizada através de dados dos espectros de RMN ^1H (Figura 4.13), COSY (Figura 4.14), HSQC (Figura 4.15) e HMBC (Figura 4.16). Os dados obtidos foram comparados com dados da literatura (Tabela 4.7) (SHEN et al., 2009).

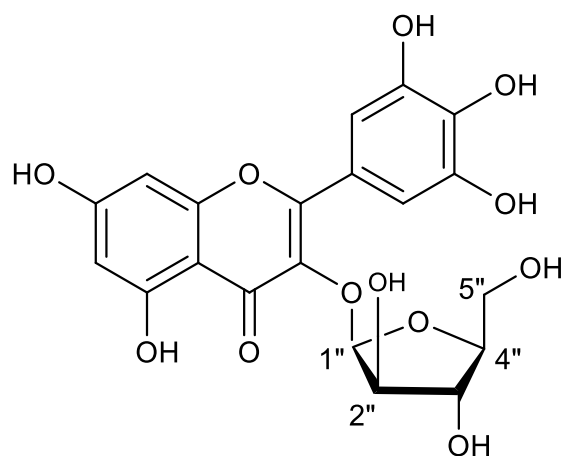
A análise dos dados do espectro de RMN ^1H mostrou sinais característicos da aglicona miricetina, que consiste de um sistema de substituição 3', 4', 5' no anel B; com singlete intenso em δ_{H} 7,12 referente aos hidrogênios H-2' e H-6'. Através do mapa de correlações HSQC confirma a correlação dos sinais dos hidrogênios em δ_{H} 7,12 com o do carbono δ_{C} 109,5 (C-2' e C-6'). A análise do mapa de correlação HMBC confirma que o sinal em δ_{H} 7,12 com os dos carbonos em δ_{C} 109,5 atribuído aos carbonos C-2' e C-6', δ_{C} 147,0 atribuído aos carbonos C-3' e C-5', δ_{C} 138,1 atribuído ao carbono C-4', δ_{C} 122,1 atribuído carbono ao C-1' e δ_{C} 159,5 atribuído ao carbono C-2.

Os dois dubletos correspondentes a dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,19 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ_{H} 6,38 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-8), mantêm uma relação meta entre si. No mapa de contornos COSY confirma os acoplamentos entre os hidrogênios do anel A, H-6 e H-8. Através do mapa de correlações HSQC os sinais dos hidrogênios em δ_{H} 6,19 e δ_{H} 6,38 estão diretamente ligados aos carbonos δ_{C} 100,1 (C-6) e δ_{C} 94,9 (C-8), respectivamente. O mapa de correlações HMBC apresentou a correlação dos sinais dos hidrogênios em δ_{H} 6,19 com os carbonos em δ_{C} 94,9 (C-8), δ_{C} 105,6 (C-10), δ_{C} 163,2 (C-5) e δ_{C} 166,4 (C-7), e δ_{H} 6,38 com os carbonos em δ_{C} 100,1 (C-6), δ_{C} 105,6 (C-10), δ_{C} 158,7 (C-9) e δ_{C} 166,4 (C-7).

A presença dos sinais entre δ_{H} 3,47-4,33 presentes no espectro de RMN ^1H são referentes aos hidrogênios da unidade glicosídica e os respectivos carbonos representados por sinais na faixa de δ_{C} 62,7-83,4. O mapa de contornos

COSY confirma o acoplamento entre o hidrogênio anomérico em δ_H 5,45 (*sl*, H-1''), e o hidrogênio δ_H 4,33 (*d*, $J = 1,5$ Hz, H-2'') e este se correlaciona com o hidrogênio δ_H 3,89-3,93 (*m*, H-3'') e este se correlaciona com o hidrogênio δ_H 3,89-3,93 (*m*, H-4''). O hidrogênio H-4'' se correlaciona com o multipeto em δ_H 3,47-3,54 (*m*, H-5''a e H-5''b) integrando para dois hidrogênios que se refere aos hidrogênios na posição 5'' e com o hidrogênio H-3''.

A correlação do hidrogênio anomérico (H-1'') de α -arabinofuranosídeo, em δ_H 5,45 e o sinal de carbono em δ_C 135,0 (C-3) no mapa de correlações HMBC confirmou a substituição do glicosídeo no carbono C-3 e, pelo mapa de correlações HSCQ, mostrou-se que H-1'' está diretamente ligado ao carbono δ_C 109,5. Assim, analisando os dados dos espectros descritos acima foi o suficiente para confirmar que a substância III foi identificada como o flavonol Miricetina-3-O- α -L-arabinofuranosídeo.



Miricetina-3-O- α -L-arabinofuranosídeo (III)

TABELA 4.7 - Dados de RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) e de RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) da substância III e comparação com a Miricetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo (SHEN et al., 2009, CD_3OD , RMN ^1H 400 MHz e RMN ^{13}C 100 MHz)

H/C	δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz)		δ_{C} (ppm), <i>J</i> (Hz)	
	Substância III	SHENet al., 2009	Substância III	SHENet al., 2009
2	-	-	159,5	159,3
3	-	-	135,0	134,8
4	-	-	180,1	179,9
5	-	-	163,2	163,0
6	6,19 (<i>d</i> , 2,0)	6,18 (<i>d</i> , 2,0)	100,1	99,9
7	-	-	166,4	166,1
8	6,38 (<i>d</i> , 2,0)	6,36 (<i>d</i> , 2,0)	94,9	94,8
9	-	-	158,7	158,5
10	-	-	105,6	105,5
1'	-	-	122,1	122,0
2'	7,12 (<i>s</i>)	7,12 (<i>s</i>)	109,5	109,4
3'	-	-	147,0	146,8
4'	-	-	138,1	137,9
5'	-	-	147,0	146,8
6'	7,12 (<i>s</i>)	7,12 (<i>s</i>)	109,5	109,4
1''	5,45 (<i>sl</i>)	5,46 (<i>d</i> , 1,6)	109,5	109,4
2''	4,33 (<i>d</i> , 1,5)	4,32 (<i>dd</i> , 4,4 e 1,6)	83,4	83,2
3''	3,89-3,93 (<i>m</i>)	3,91 (<i>m</i>)	78,9	78,7
4''	3,89-3,93 (<i>m</i>)	3,91 (<i>m</i>)	88,1	88,0
5'' a	3,47-3,54 (<i>m</i>)	3,51 (<i>m</i>)	62,7	62,5 (<i>t</i>)
5'' b	3,47-3,54 (<i>m</i>)	3,51 (<i>m</i>)	62,7	62,5 (<i>t</i>)

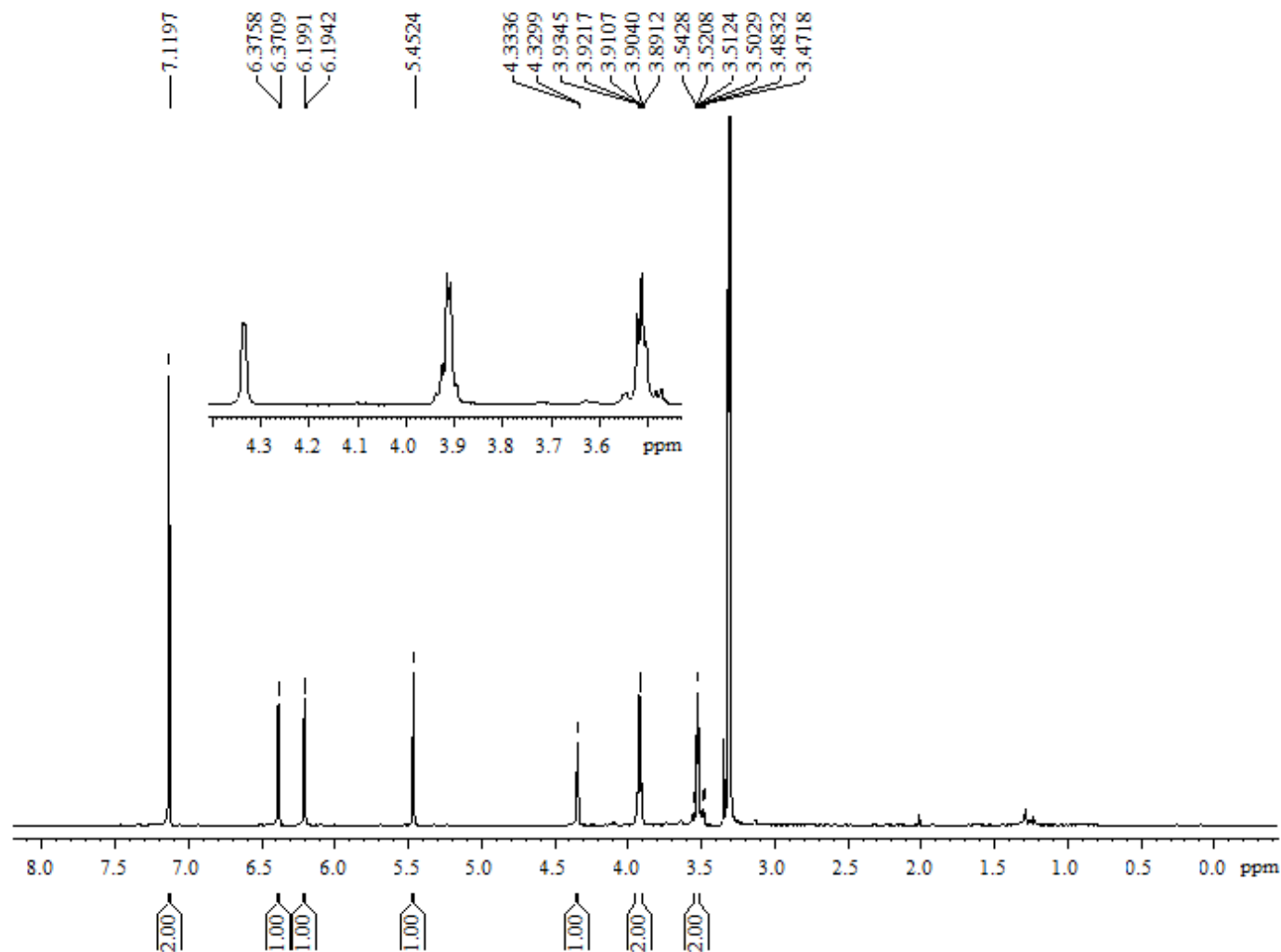


FIGURA 4.13 - Espectro de RMN ^1H da substância III (CD_3OD , 400 MHz).

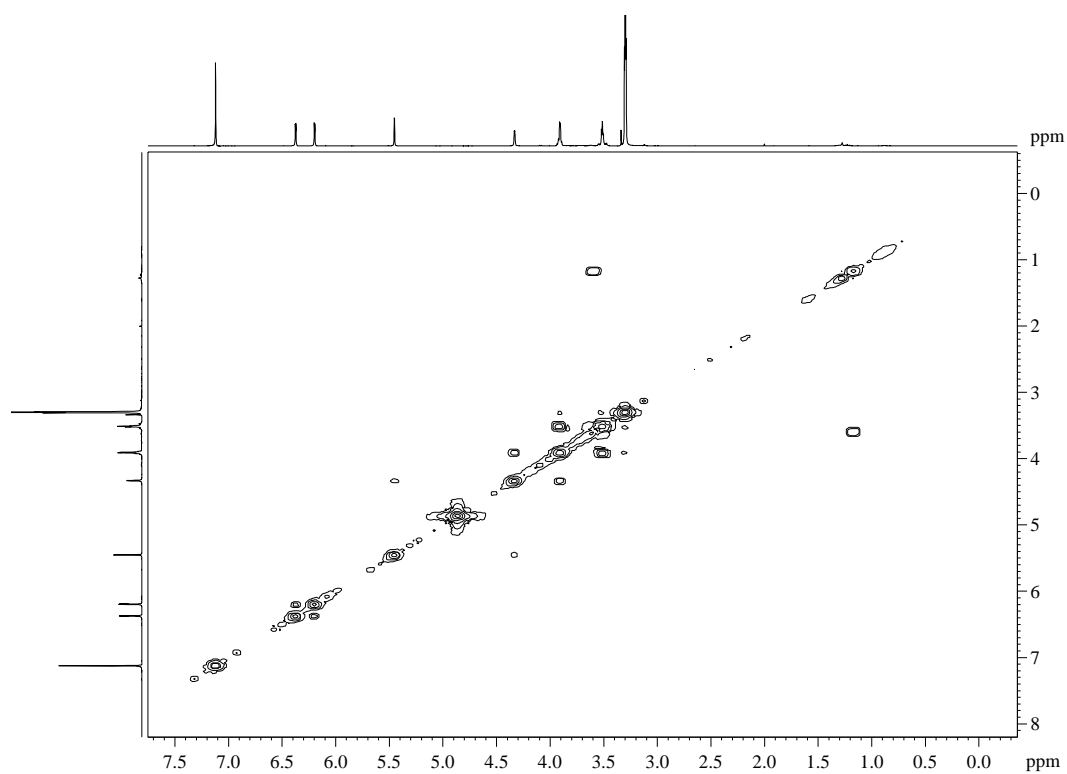


FIGURA 4.14 - Mapa de contornos COSY da substância III (CD_3OD , 400 MHz).

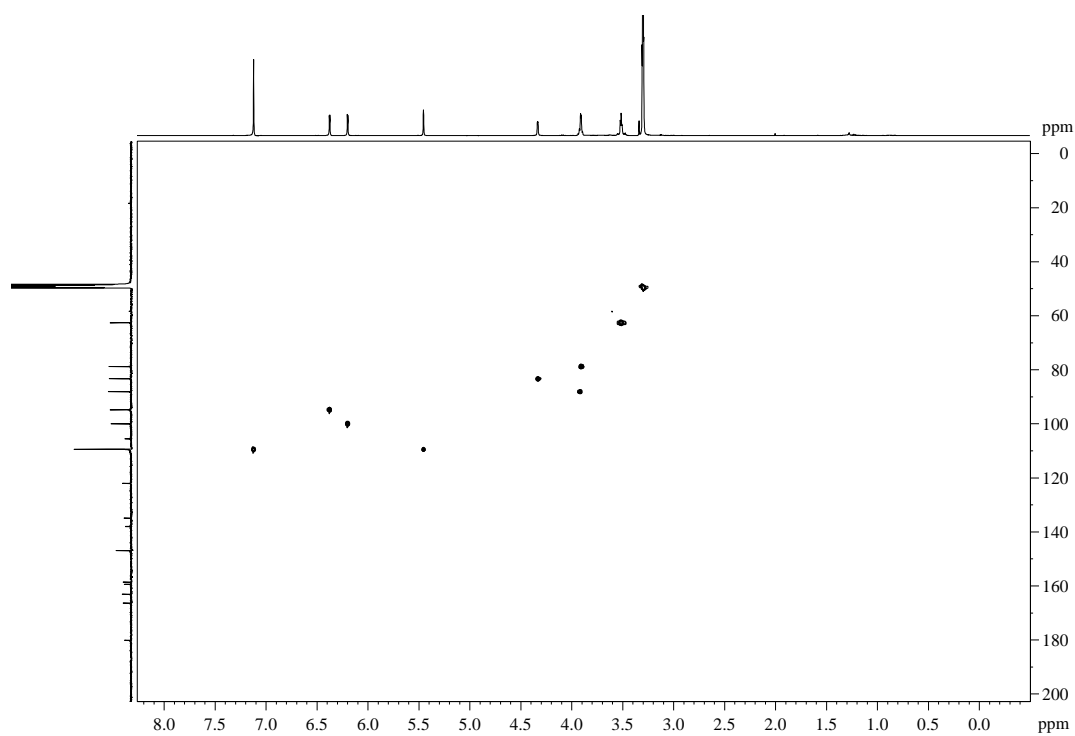


FIGURA 4.15 - Mapa de correlações HSQC da substância III (CD_3OD , 400 MHz).

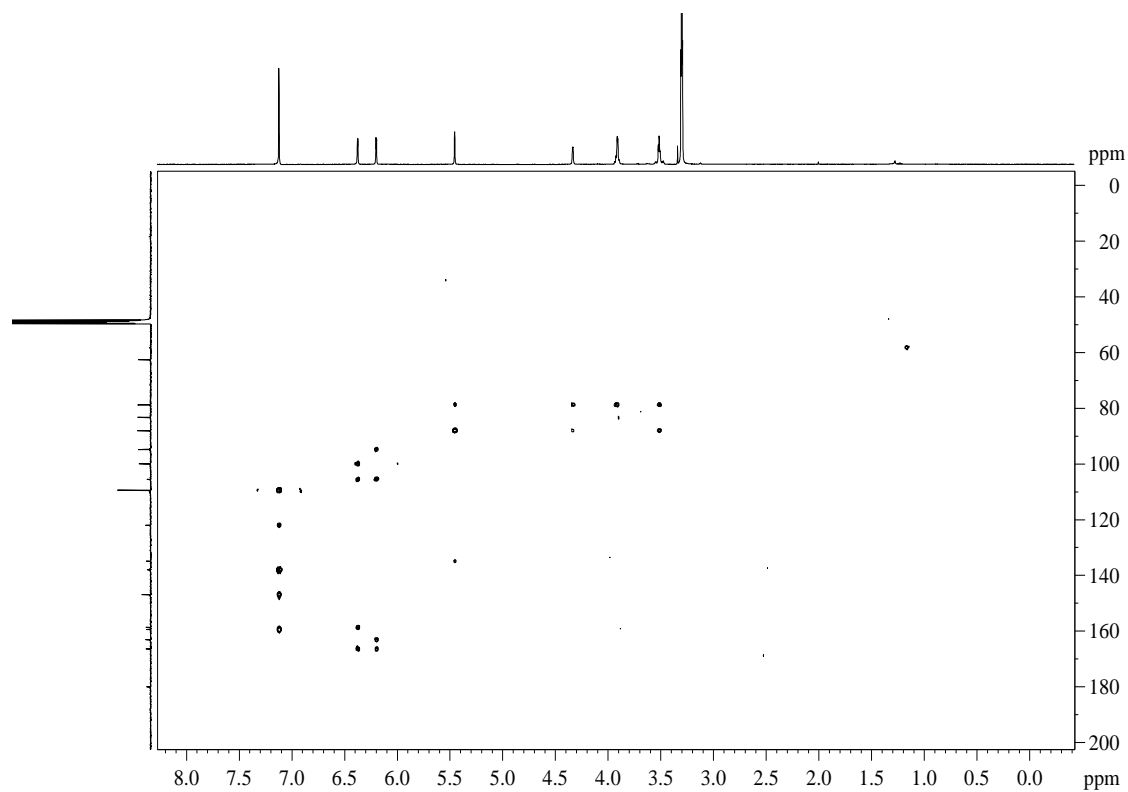


FIGURA 4.16 - Mapa de correlações HMBC da substância III (CD₃OD, 400 MHz).

4.1.1.4 – Identificação Estrutural das Substâncias IV e V

A fração H3-6 isolada a partir da fração acetato de etila das folhas contém a substância IV (majoritária) em mistura com a substância V (minoritária) (Fluxograma 3.8, p. 30). Estas substâncias foram identificadas através de RMN de ^1H (Figura 4.19) e espectrometria de massas (Figura 4.17 e Figura 4.18). Os dados obtidos foram comparados com dados da literatura (Tabela 4.8) (CASTILLO-MUÑOZ et al., 1996; KAZUMA et al., 2003).

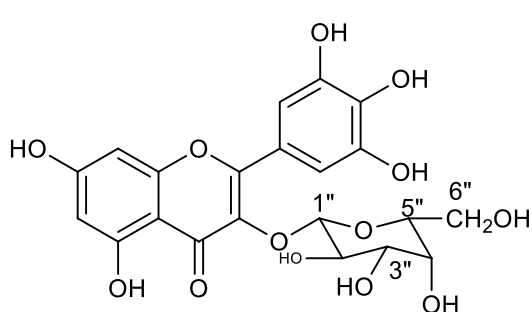
Analisando o espectro de RMN ^1H das duas substâncias mostrou sinais na região de hidrogênio aromático com integração característica da aglicona miricetina. Onde, para o composto majoritário, foi observado um singlete intenso em δ_{H} 7,12 referente aos hidrogênios H-2' e H-6' e dois dubletos correspondentes aos dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,18 (d , $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ_{H} 6,36 (d , $J = 2,0$ Hz, H-8). Já para o composto minoritário, foi observado um singlete intenso em δ_{H} 7,37 referente aos hidrogênios H-2' e H-6' e dois dubletos correspondentes aos dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,18 (d , $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ_{H} 6,37 (d , $J = 2,0$ Hz, H-8), que mantêm uma relação meta entre si.

Os sinais entre δ_{H} 3,06-3,86 presentes no espectro de RMN ^1H são referentes aos hidrogênios da unidade glicosídica referentes às duas substâncias. Foram também observados dois sinais de hidrogênios anoméricos em δ_{H} 5,16 (d , $J = 7,0$ Hz, H-1'') e δ_{H} 5,17 (d , $J = 8,0$ Hz, H-1''), respectivamente.

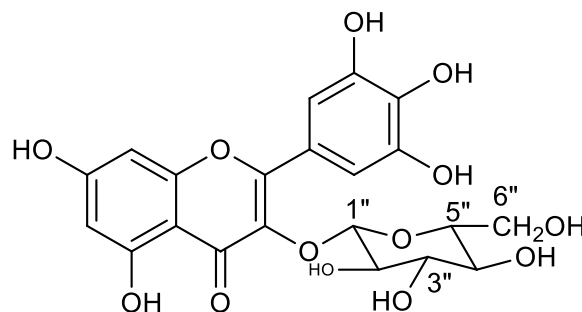
No espectro de massas, os picos m/z no valor de 481 correspondem ao $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Figuras 4.17 e 4.18), assim pode-se propor a massa molecular das substâncias IV e V, respectivamente, como sendo 480 Dalton (g/mol). Também pode-se observar para os dois espectros de massas a perda de $[\text{M}+\text{H}-162]^+$, onde foi proposto que seja a perda de uma unidade glicosídica, mais especificamente uma hexose, podendo ser uma unidade de glicose e uma unidade de galactose. Quando se compara esses dados com a literatura (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009), tem-se que para o espectro de massas realizado no modo positivo para

Miricetina-3-*O*-β-D-galactosídeo os íons produtos e íons molecular é m/z 481 e 319, e para Miricetina-3-*O*- β-D-glicosídeo os íons produtos e íons molecular é m/z 481 e 319.

Analisando o espectro de RMN ^1H juntamente com o espectro de massas e comparando com dados da literatura, foi proposto que a substância majoritária é o flavonol Miricetina-3-*O*-β-D-glicosídeo e a substância minoritária a Miricetina-3-*O*-β-D-galactosídeo, pela primeira vez relatada para a espécie *Eugenia myrcianthes*.



Miricetina-3-*O*- β-D-galactosídeo (IV)



Miricetina-3-*O*- β-D-glicosídeo (V)

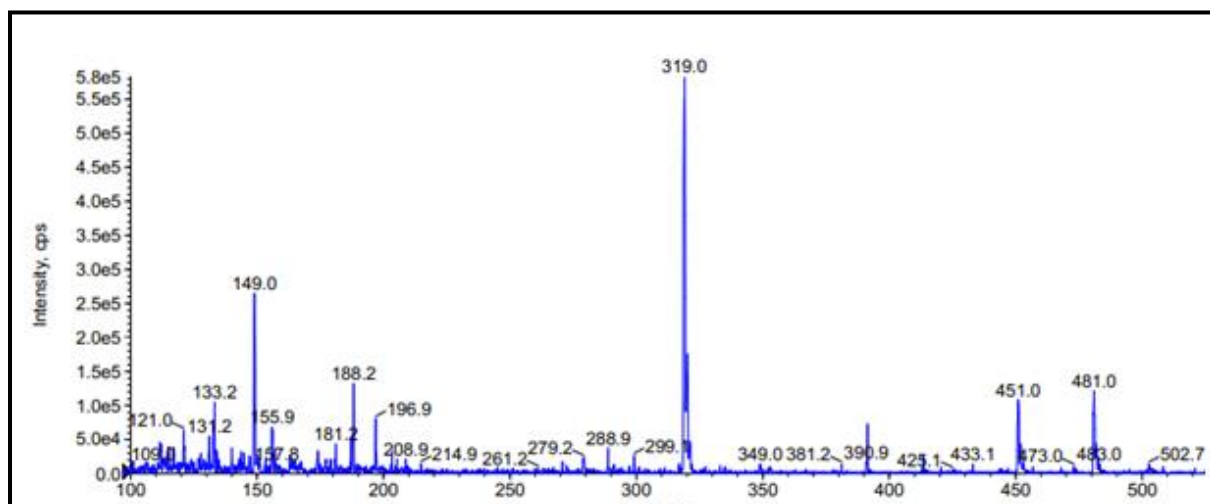


FIGURA 4.17 - Espectro de massas no modo positivo da substância IV.

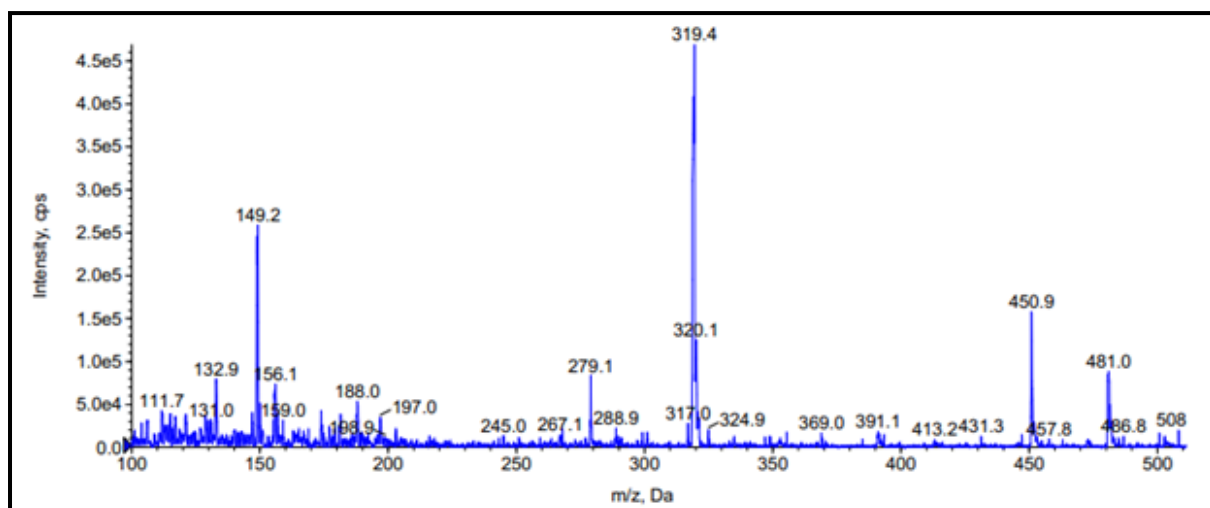


FIGURA 4.18 - Espectro de massas no modo positivo da substância V.

TABELA 4.8 - Dados de RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) da substância IV e comparação com a Miricetina-3-*O*- β -D-galactosídeo (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009, CD_3OD , 400 MHz) e RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) da substância V e comparação com a Miricetina-3-*O*- β -D-glicosídeo (KAZUMA et al., 2003, CD_3OD , 400 MHz)

H	δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz)		δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz)	
	Substância IV	CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009	Substância V	KAZUMA et al., 2003
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	6,18 (<i>d</i> , 2,0)	6,23(<i>d</i> , 2,0)	6,18 (<i>d</i> , 2,0)	6,21 (<i>d</i> , 2,1)
7	-	-	-	-
8	6,37 (<i>d</i> , 2,0)	6,42 (<i>d</i> , 2,0)	6,36 (<i>d</i> , 2,0)	6,39 (<i>d</i> , 2,1)
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
1'	-	-	-	-
2'	7,37 (<i>s</i>)	7,40 (<i>s</i>)	7,12 (<i>s</i>)	7,29 (<i>s</i>)
3'	-	-	-	-
4'	-	-	-	-
5'	-	-	-	-
6'	7,37 (<i>s</i>)	7,40 (<i>s</i>)	7,12 (<i>s</i>)	7,29 (<i>s</i>)
1''	5,17 (<i>d</i> , 8,0)	5,23 (<i>d</i> , 8,0)	5,16 (<i>d</i> , 8,0)	5,16 (<i>d</i> , 7,0)
2'' – 5''b	3,06-3,86 (<i>m</i>)	3,51-3,89 (<i>m</i>)	3,06-3,86 (<i>m</i>)	3,23-3,72 (<i>m</i>)

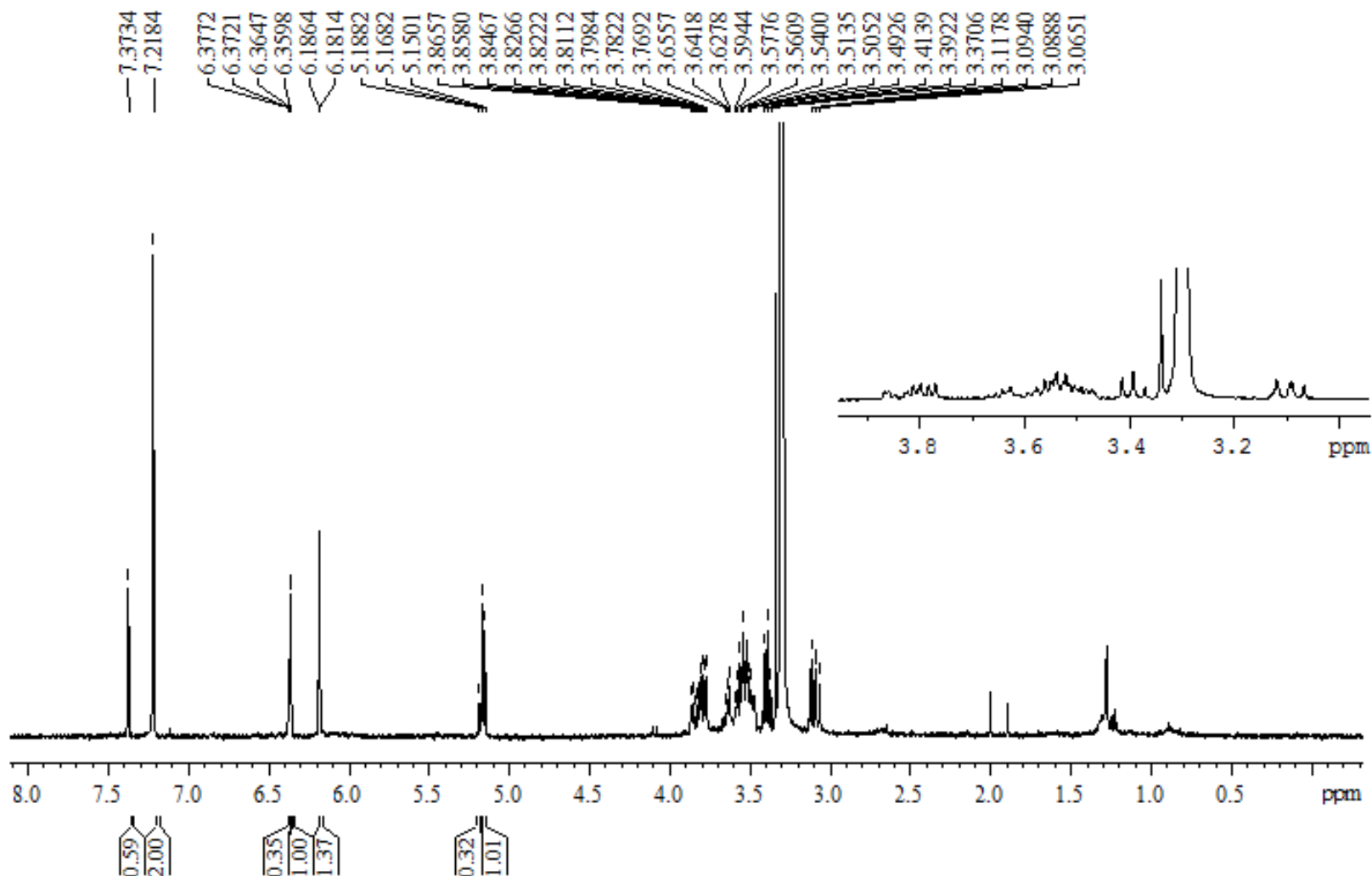


FIGURA 4.19 - Espectro de RMN ¹H da substância IV e V (CD₃OD, 400 MHz).

4.1.1.5 – Identificação Estrutural da Substância VI

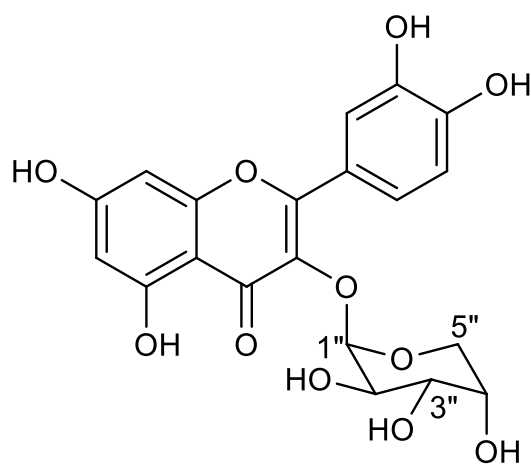
A substância VI foi identificada da fração H2-2 em mistura com a substância VIII (Fluxograma 3.7, p. 29) e se apresentou como um sólido amarelo. A identificação foi realizada apenas para a substância majoritária através de experimentos de RMN ^1H (Figura 4.20), COSY (Figura 4.21), HSQC (Figura 4.22) e HMBC (Figura 4.23). Os dados obtidos foram comparados com dados da literatura (Tabela 4.9) (FRAISSE et al., 2000).

A análise do espectro de RMN ^1H mostrou sinais característicos da aglicona quercetina. Foram observados dois dubletos e um duplo dubleto bastantes intensos na região dos hidrogênios ligados a anéis aromáticos, que indicaram o padrão de substituição do anel B do flavonoide. Os sinais em δ_{H} 7,49 (*d*, $J = 2,3$ Hz, H-2'), δ_{H} 7,65 (*dd*, $J = 8,4$ e $2,3$ Hz, H-6') e δ_{H} 6,82 (*d*, $J = 8,4$ Hz, H-5'), confirmando o sistema de substituição 3' e 4' no anel B. O mapa de correlações HSQC mostra a correlação dos hidrogênios H-2', H-6' e H-5' com os carbonos em δ_{C} 117,0 (C-2'), δ_{C} 122,5 (C-6'), δ_{C} 115,9 (C-5'). Na análise do mapa de correlações HMBC foram observadas que o hidrogênio H-2' correlaciona com os carbonos em δ_{C} 124,0 (C-1'), δ_{C} 146,5 (C-3') e δ_{C} 150,8 (C-4'), os sinais de hidrogênios H-2' e H-6' também apresentaram correlação com o carbono em δ_{C} 158,2 que foi atribuído ao carbono C-2, que permitiram concluir assim, as atribuições do anel B.

Foram observados, ainda, dois sinais correspondentes a dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,38 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-8) e δ_{H} 6,18 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-6) esses sinais são típicos de um sistema de acoplamento AX neste anel. Pela análise do mapa de correlações HSQC foi possível atribuir todos os carbonos aos quais esses hidrogênios estão ligados. São eles, H-6 (δ_{H} 6,18) e H-8 (δ_{H} 6,38) com os sinais de carbonos em δ_{C} 100,8 (C-6) e δ_{C} 95,8 (C-8), respectivamente. Através do mapa de correlações HMBC foi possível atribuir os demais carbonos do anel A, pois observou-se correlações entre o sinal do hidrogênio H-8 (δ_{H} 6,38) e os sinais de carbonos com deslocamento químicos em δ_{C} 100,8(C-6), δ_{C}

105,7 (C-10), δ_C 158,8 (C-9) e δ_C 166,9 (C-7); e entre sinal do hidrogênio H-6 (δ_H 6,18) e os sinais de carbonos em δ_C 95,8 (C-8), δ_C 105,7 (C-10), δ_C 163,5 (C-5) e δ_C 166,9 (C-7), concluindo assim, as atribuições de hidrogênios e carbonos do anel A.

No espectro de RMN 1H foram observados sinais característicos de unidades glicosídicas, sugerindo a presença de um resíduo de açúcar como substituinte no esqueleto flavonoídico. Foi observado um sinal do hidrogênio anomérico, dubleto em δ_H 5,26 (H-1'') que está de acordo com a literatura para o α -L-arabinopiranosídeo. No mapa de correlações COSY, a correlação entre o hidrogênio anomérico δ_H 5,26 (H-1'') com o duplo dubleto em δ_H 3,76 permite atribuir este último sinal ao hidrogênio glicosídico H-2''. Os demais hidrogênios do glicosídeo estão na faixa de δ_H 3,20-3,71 e as correlações no mapa de correlações HSQC permitiram atribuir os sinais na faixa δ_C 64,2-72,0 aos carbonos do glicosídeo, e os sinais em δ_C 64,2 e δ_C 101,4, aos carbonos C-5'' e C-1'', respectivamente. A posição de substituição da unidade de açúcar no flavonoide em questão foi determinada com base na correlação observada no mapa de correlações HMBC entre o hidrogênio anomérico H-1'' e o carbono C-3 (δ_C 133,6). Assim, a substância VI foi identificada como quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo, pela primeira vez relatada para a espécie *Eugenia myrcianthes*.



Quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (VI)

TABELA 4.9 - Dados de RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) da substância VI e comparação com a Quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo (FRAISSE et al., 2000, DMSO-*d*₆, RMN ¹H 300 MHz e RMN ¹³C 75 MHz)

H/C	δ_H (ppm), <i>J</i> (Hz)		δ_C (ppm), <i>J</i> (Hz)	
	Substância VI	FRAISSE et al., 2000	Substância VI *	FRAISSE et al., 2000
2	-	-	158,2	156,3
3	-	-	133,6	133,6
4	-	-	**	177,4
5	-	-	**	161,1
6	6,18 (<i>d</i> , 2,0)	6,18(<i>d</i> , 1,7)	100,8	98,7
7	-	-	166,7	164,6
8	6,38 (<i>d</i> , 2,0)	6,38(<i>d</i> , 1,7)	95,8	93,5
9	-	-	158,8	156,1
10	-	-	105,7	103,7
1'	-	-	124,0	120,1
2'	7,49(<i>d</i> , 2,3)	7,50(<i>d</i> , 2,2)	117,0	115,6
3'	-	-	146,5	144,9
4'	-	-	150,8	148,6
5'	6,82 (<i>d</i> , 8,4)	6,83(<i>d</i> , 8,5)	115,9	115,3
6'	7,65(<i>dd</i> , 8,4 e 2,3)	7,65(<i>dd</i> , 8,5 e 2,2)	122,5	122,0
1''	5,26 (<i>d</i> , 5,2)	5,27 (<i>d</i> , 5,1)	101,4	101,4
2''	3,76 (<i>dd</i> , 7,0 e 5,2)	3,76 (<i>dd</i> , 7,1 e 5,1)	71,0	70,7
3''	3,53 (<i>dd</i> , 9,5 e 5,0)	3,52 (<i>dd</i> , 7,1 e 3,2)	72,0	71,6
4''	3,71 (<i>dd</i> , 6,2 e 3,9)	3,66 (<i>ddd</i> , 5,2, 3,2 e 2,0)	66,0	66,0
5'' a	3,20 (<i>dd</i> , 11,5 e 2,3)	3,22 (<i>dd</i> , 11,2 e 2,0)	64,2	64,3
5'' b	3,60 (<i>dd</i> , 11,5 e 5,2)	3,60 (<i>dd</i> , 11,2 e 5,2)	64,2	64,2

*Os valores do deslocamento químico para o RMN ¹³C, são os valores do deslocamento químico de ¹³C da projeção do carbono do mapa de correlação do HSQC./ ** não foram observados.

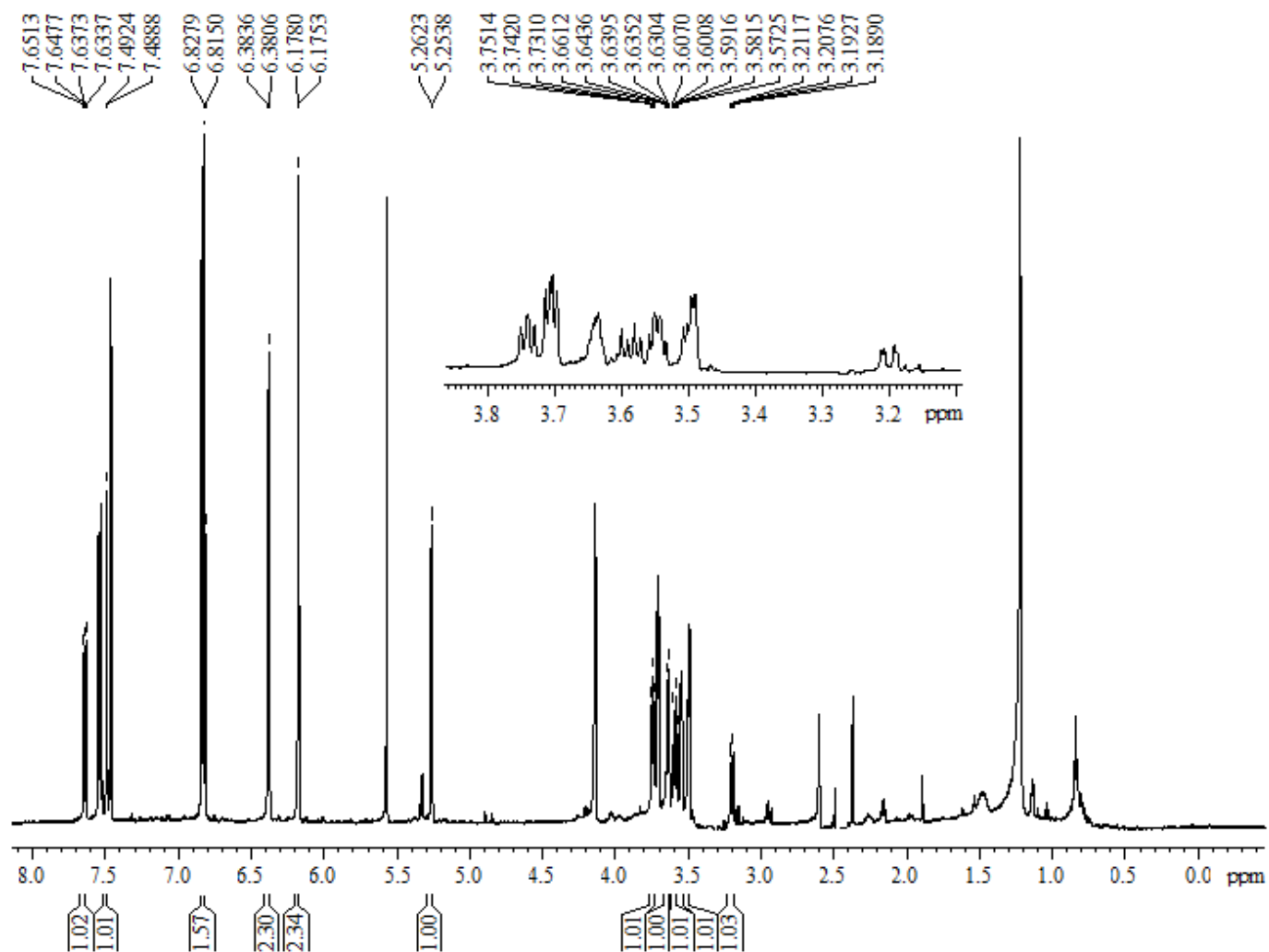


FIGURA 4.20 - Espectro de RMN ^1H da substância VI ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz).

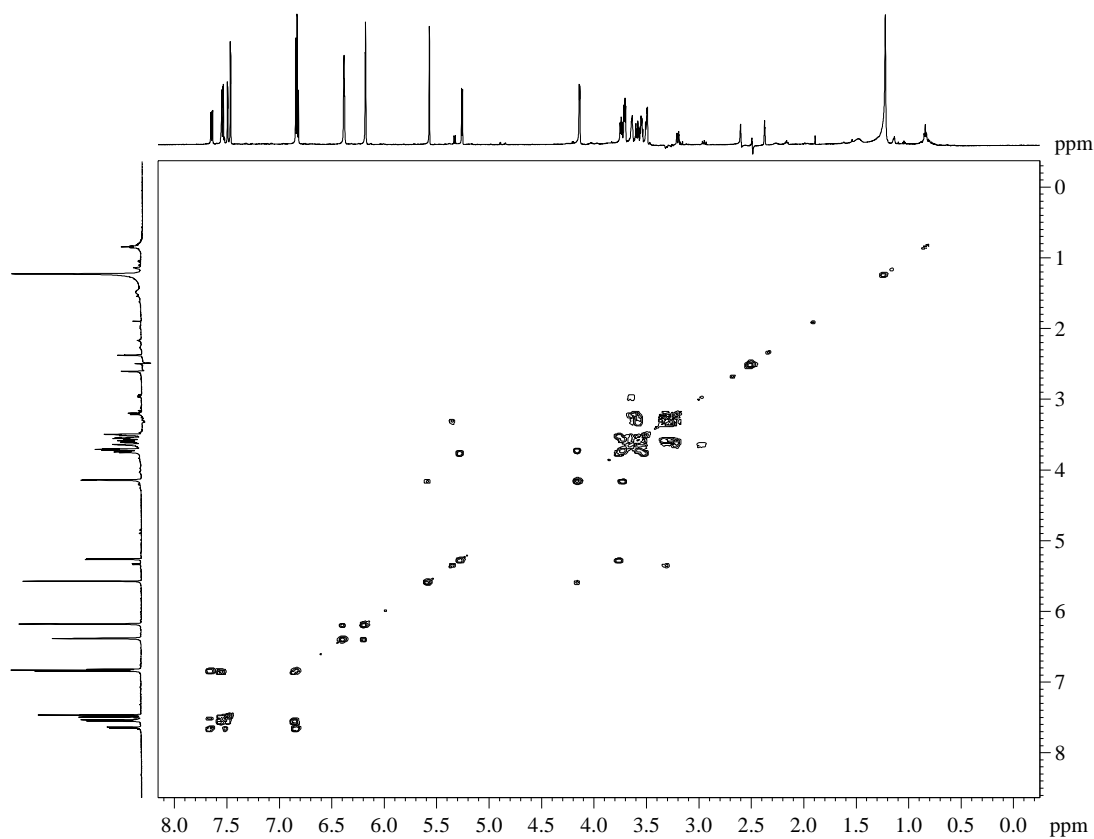


FIGURA 4.21 - Mapa de contornos COSY da substância VI (DMSO- d_6 , 400 MHz).

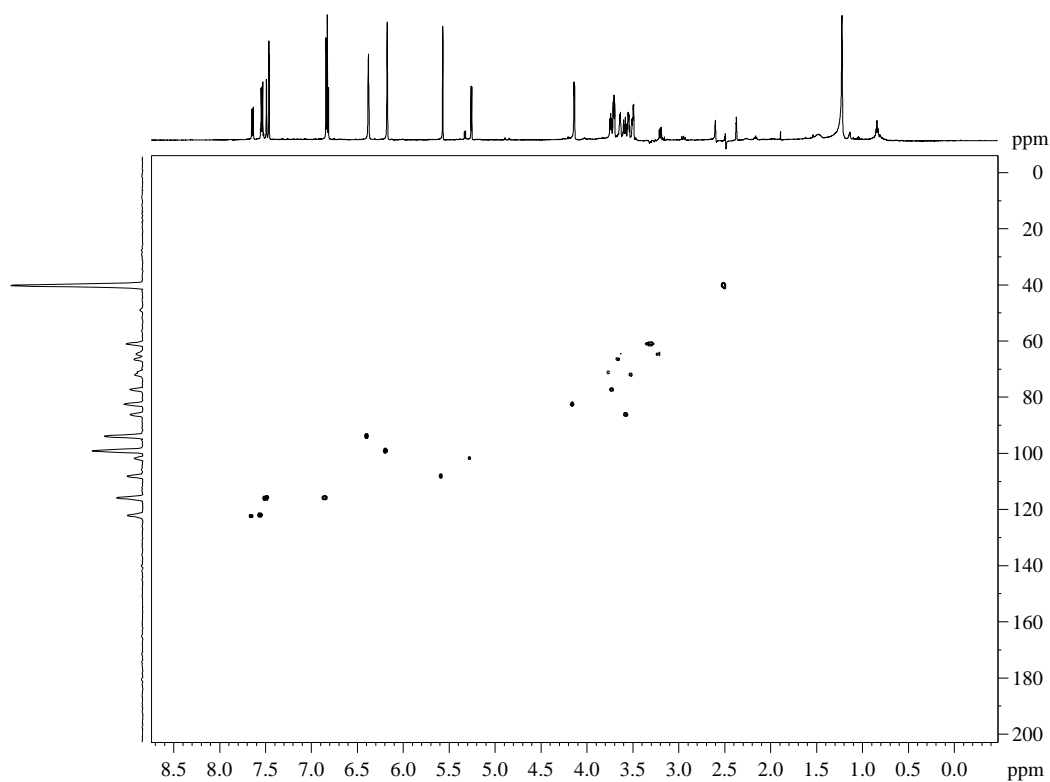


FIGURA 4.22 - Mapa de correlações HSQC da substância VI (DMSO- d_6 , 400 MHz).

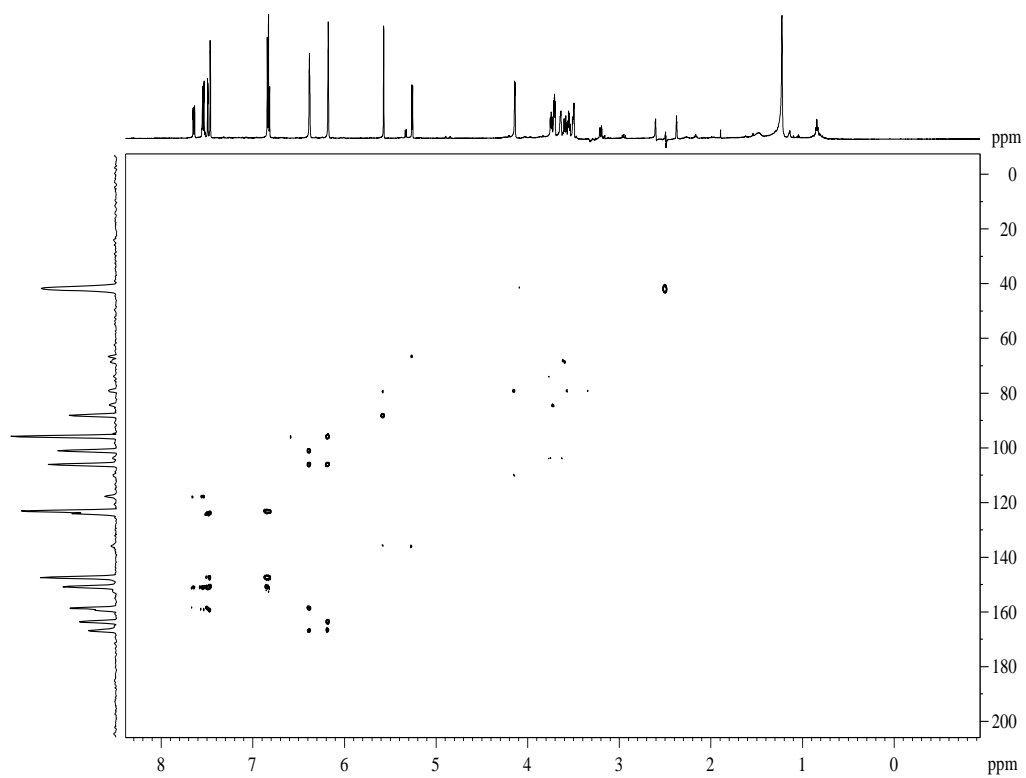


FIGURA 4.23 - Mapa de correlações HMBC da substância VI (DMSO- d_6 , 400 MHz).

4.1.1.6 – Identificação Estrutural da Substância VII

A substância VII foi isolada das frações H1-4 e H2-2 do extrato de acetato de etila das folhas (Fluxograma 3.7, p. 29). Esta substância apresentou-se como um sólido amorfo amarelo e sua identificação foi realizada através de dados dos espectros de RMN ^1H (Figura 4.24), COSY (Figura 4.25), HSQC (Figura 4.26), HMBC (Figura 4.27). Os dados obtidos foram comparados com dados da literatura (Tabela 4.10) (RODRIGUES et al., 2009).

O espectro de RMN ^1H apresentou sinais característicos da aglicona quercetina. Foram observados sinais referentes a um sistema de substituição 3', 4', 5' no anel B com sinais em δ_{H} 7,48 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'), δ_{H} 7,53 (*dd*, $J = 8,5$ e 2,0 Hz, H-6') e δ_{H} 6,85 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-5'). Os valores das constantes estão de acordo com o acoplamento em orto ($J = 8,5$ Hz) entre H-6' e H-5' e acoplamento em meta ($J = 2,0$ Hz) entre os hidrogênios H-6' e H-2'. Foram observados, ainda, dois sinais correspondentes a dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,40 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-8) e δ_{H} 6,20 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-6) e esses sinais são típicos de um sistema de acoplamento AX neste anel, característicos do anel A dos flavonoides.

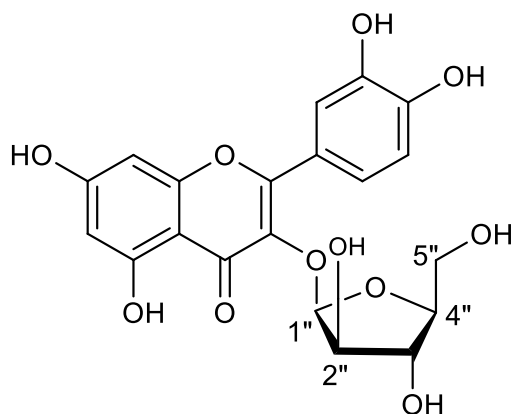
O espectro de correlação homonuclear de COSY foi usado para confirmar as correlações entre os átomos de hidrogênio. No anel A, confirma o acoplamento entre os hidrogênios H-6 e H-8 e no mapa de correlações HSQC que esses hidrogênios estão diretamente ligados aos carbonos δ_{C} 98,8 (C-6) e δ_{C} 93,6 (C-8), respectivamente. Através do mapa de correlações HMBC podem ser atribuídos os demais carbonos onde pode-se observar que o hidrogênio H-6 se correlaciona com os carbonos δ_{C} 93,6 (C-8), δ_{C} 103,8 (C-10), δ_{C} 161,1 (C-5) e δ_{C} 164,6 (C-7) e o do hidrogênio H-8 se correlaciona com os carbonos δ_{C} 98,8 (C-6), δ_{C} 103,8 (C-10), δ_{C} 156,3 (C-9) e δ_{C} 164,6 (C-7).

Para o anel B, no mapa de contornos COSY os acoplamentos entre os hidrogênios são confirmados onde se observa que o hidrogênio δ_{H} 7,53 (H-6') se correlaciona com o hidrogênio em δ_{H} 6,85 (H-5'). Através do mapa de

correlações HSQC os sinais de hidrogênio H-2', H-6' e H-5' indicam que estão diretamente ligados aos carbonos δ_C 115,3 (C-2'), δ_C 121,7 (C-6') e δ_C 115,5 (C-5'), respectivamente. No mapa de correlações HMBC o hidrogênio H-2' correlaciona com os carbonos δ_C 115,5 (C-5'), δ_C 145,1 (C-3'), δ_C 148,5 (C-4') e δ_C 156,9 (C-2), o do hidrogênio H-6' se correlaciona com os carbonos δ_C 115,5 (C-5'), δ_C 148,5 (C-4') e δ_C 156,9 (C-2) e do hidrogênio H-5' se correlaciona com os carbonos δ_C 121,7 (C-6'), δ_C 145,1 (C-3'), δ_C 148,5 (C-4').

No espectro de RMN 1H , observou-se sinais entre δ_H 3,28-4,16 nos quais são característicos de glicosídeo como substituinte no esqueleto do flavonoide, devido à presença de sinais de hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos de glicosídeo. O sinal em δ_H 5,60 (*d*, $J = 1,0$ Hz, H-1'') refere-se ao hidrogênio anomérico e este valor de deslocamento químico é característico de α -L-arabinofuranosídeo, quando comparado com a literatura (HARBORNE & MABRY, 1994). No mapa de correlações HMBC confirma a posição na qual o glicosídeo esta ligado na aglicona, o sinal do hidrogênio H-1'' se correlaciona com o do carbono δ_C 133,3 (C-3). O mapa de contornos COSY confirma o acoplamento entre o hidrogênio anomérico H-1'' e o hidrogênio δ_H 4,16 (*dd*, $J = 3,8$ e $1,0$ Hz, H-2'') e este se correlaciona com o hidrogênio δ_H 3,71 (*m*, H-3'') e δ_H 3,55 (*m*, H-4''). O hidrogênio H-4'' se correlaciona com o duplo dubleto em δ_H 3,33 (*dd*, $J = 12,0$ e $3,8$ Hz, H-5''a) e δ_H 3,28 (*dd*, $J = 12,0$ e $5,0$ Hz, H-5''b) que se refere aos hidrogênios na posição 5''. Através do mapa de correlações HSQC os hidrogênios H-1'', H-2'', H-3'', H-4'' e H-5'', estão diretamente ligados aos carbonos δ_C 107,8 (C-1''), δ_C 82,1 (C-2''), δ_C 76,9 (C-3''), δ_C 85,8 (C-4'') e δ_C 60,6 (C-5''), respectivamente.

Baseando-se nos dados descritos e comparando com a literatura a substância VII foi identificada como o flavonol Quercetina-3-O- α -L-arabinofuranosídeo.



Quercetina-3-O- α -L-arabinofuranosídeo (VII)

TABELA 4.10 - Dados de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) e de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) da substância VII e comparação com a Quercetina-3-O- α -L-arabinofuranosídeo (RODRIGUES et al., 2009, DMSO- d_6 , RMN ^1H 400 MHz e RMN ^{13}C 100 MHz)

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)		δ_{C} (ppm), J (Hz)	
	Substância VII	RODRIGUES et al., 2009	Substância VII	RODRIGUES et al., 2009
2	-	-	156,9	157,4
3	-	-	133,3	133,8
4	-	-	177,6	178,0
5	-	-	161,1	161,3
6	6,20 (<i>d</i> , 2,0)	6,11 (<i>d</i> , 1,5)	98,8	99,1
7	-	-	164,6	164,5
8	6,40 (<i>d</i> , 2,0)	6,38(<i>d</i> , 1,5)	93,6	94,1
9	-	-	156,3	156,8
10	-	-	103,8	104,3
1'	-	-	120,9	121,4
2'	7,48 (<i>d</i> , 2,0)	7,48 (<i>d</i> , 2,0)	115,3	115,8
3'	-	-	145,1	145,3
4'	-	-	148,5	148,7
5'	6,85 (<i>d</i> , 8,5)	6,84 (<i>d</i> , 8,5)	115,5	115,9
6'	7,53 (<i>dd</i> , 8,5, 2,0)	7,53 (<i>dd</i> , 8,5, 2,0)	121,7	122,2
1''	5,60 (<i>d</i> , 1,0)	5,57 (<i>sl</i>)	107,8	108,2
2''	4,16 (<i>dd</i> , 3,8, 1,0)	4,16 (<i>dd</i> , 3,1, 0,8)	82,1	82,3
3''	3,71 (<i>m</i>)	3,71 (<i>m</i>)	76,9	77,2
4''	3,55 (<i>m</i>)	3,55 (<i>m</i>)	85,8	86,6
5'' a	3,33 (<i>dd</i> , 12,0, 3,8)	3,33 (<i>dd</i> , 12,0, 3,9)	60,6	60,9
5'' b	3,28 (<i>dd</i> , 12,0, 5,0)	3,28 (<i>dd</i> , 12,0, 5,0)	60,6	60,9

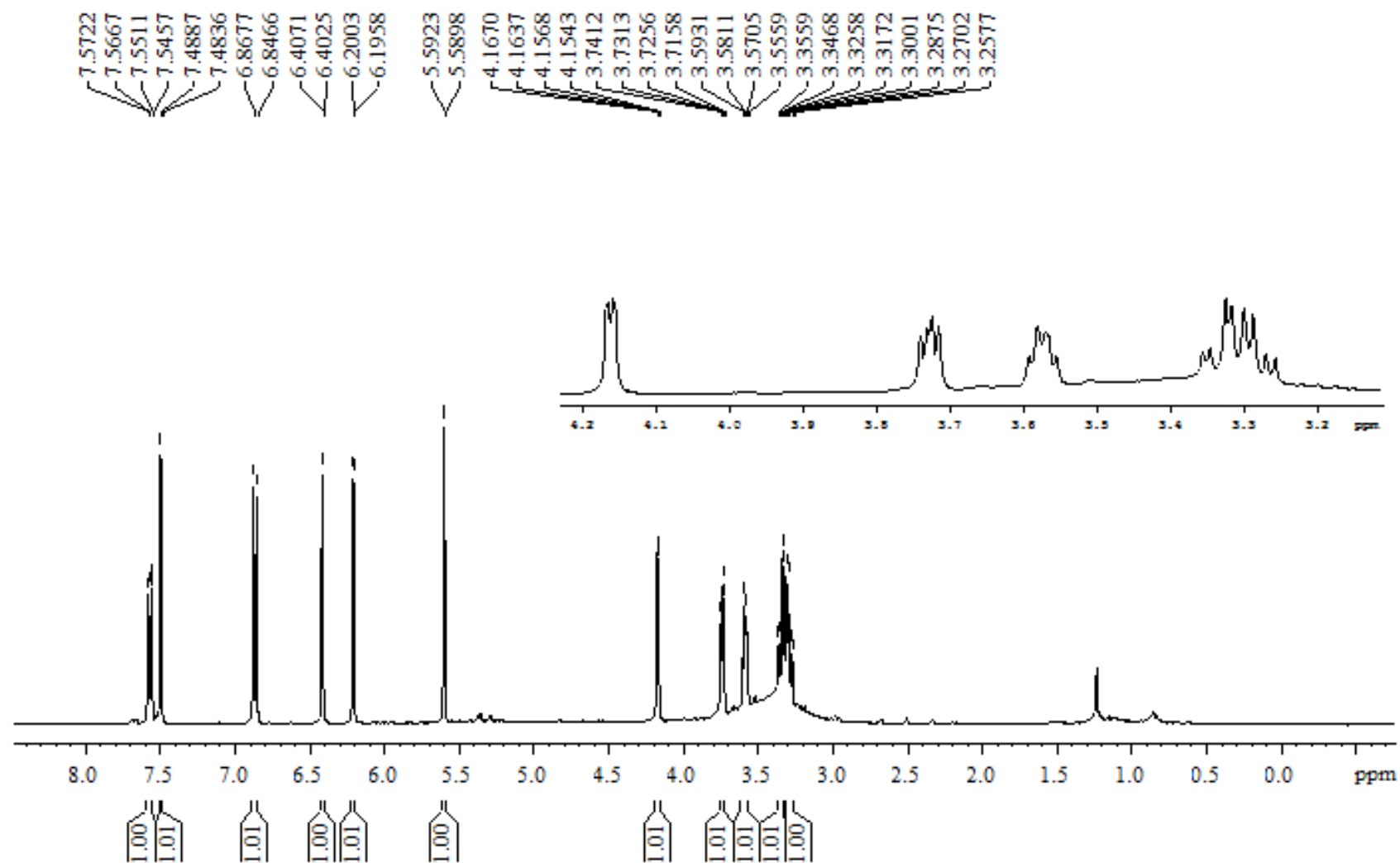


FIGURA 4.24 - Espectro de RMN ^1H da substância VII ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz).

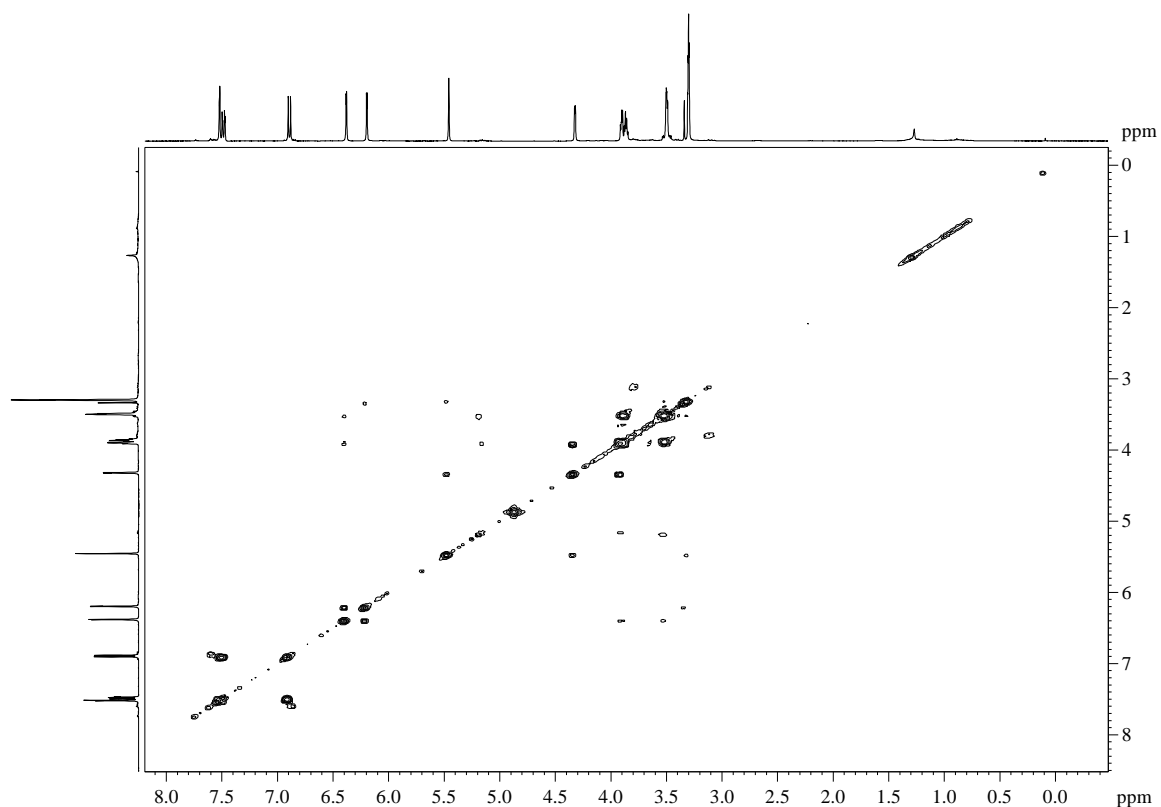


FIGURA 4.25 - Mapa de contornos COSY da substância VII (DMSO- d_6 , 400 MHz).

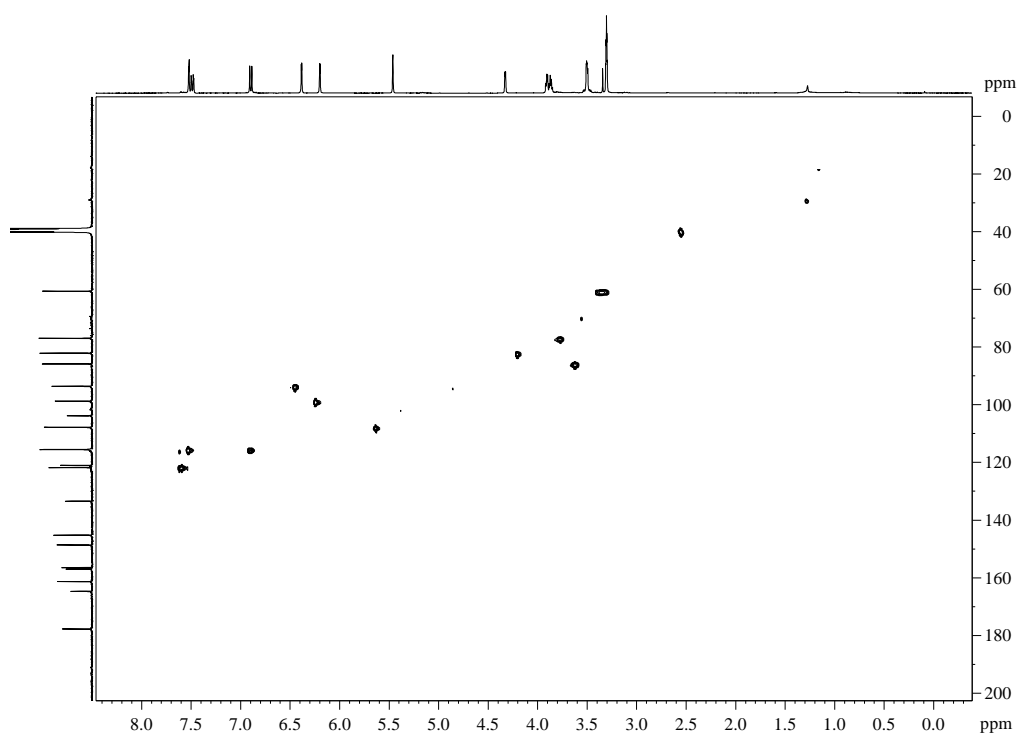


FIGURA 4.26 - Mapa de correlações HSQC da substância VII (DMSO- d_6 , 400 MHz).

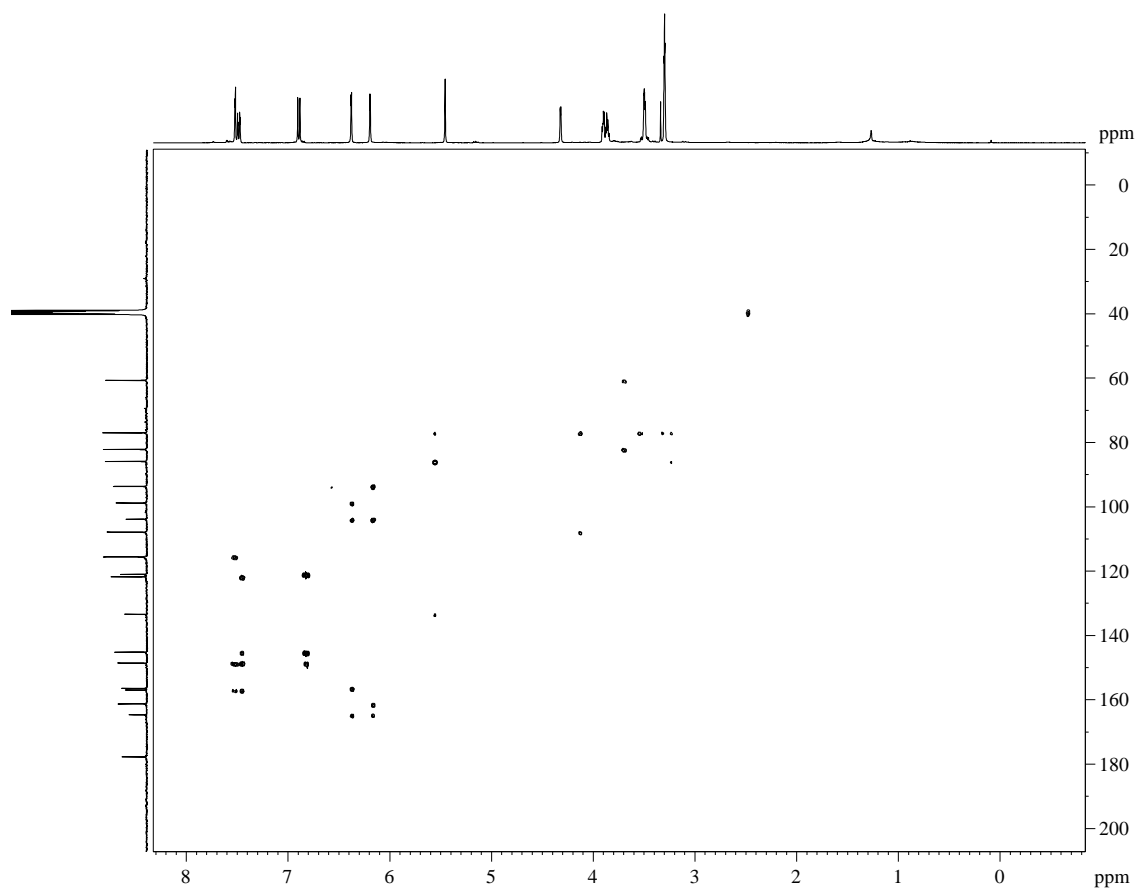


FIGURA 4.27 - Mapa de correlações HMBC da substância VII (DMSO- d_6 , 400 MHz).

4.1.1.7 – Identificação Estrutural da Substância VIII

A substância VIII foi identificada em mistura com a substância VI, da fração H3-10 a partir da fração acetato de etila das folhas (Fluxograma 3,8, p. 30), onde a amostra se apresentou como um sólido amorfo amarelo. Esta substância foi identificada através de RMN ^1H (Figura 4.28), COSY (Figura 4.29), HSQC (Figura 4.30) e HMBC (Figura 4.31). Os dados obtidos foram comparados com dados da literatura (Tabela 4.11) (KALEGARI et al., 2011).

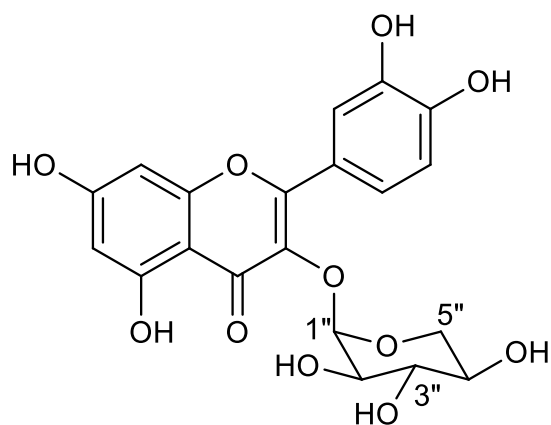
Através da análise do espectro de RMN ^1H foram observados dois sinais de hidrogênios anoméricos δ_{H} 5,12 (*d*, $J = 6,5$ Hz, H-1'') e δ_{H} 5,14 (*d*, $J = 7,5$ Hz, H-1'') na proporção de 2:1, respectivamente. O primeiro sinal de hidrogênio anomérico, integrando para um hidrogênio refere-se ao hidrogênio anomérico de uma unidade de açúcar conhecida como arabinopiranosídeo e o sinal de hidrogênio ligado a anéis aromáticos mostram sinais com integração correspondente ao composto majoritário, característico da aglicona quercetina, confirmando assim, que a substância majoritária é a Quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo. Como a identificação da substância VI já foi discutida anteriormente, a discussão detalhada dos dados espectroscópicos será apenas em relação à substância minoritária.

Para o composto minoritário, a análise do espectro de RMN ^1H , indicou tratar-se da aglicona quercetina. Foram observados sinais referentes a um sistema de substituição 3', 4' no anel B, em δ_{H} 7,60 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'), δ_{H} 7,57 (*dd*, $J = 8,5$ e $2,0$ Hz, H-6') e δ_{H} 6,85 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-5'), todos integrando para um hidrogênio. Os valores das constantes de acoplamento estão de acordo com acoplamentos orto e meta, característicos do sistema de substituição 3', 4'. Foram observados, ainda, dois sinais correspondentes aos dois hidrogênios do anel A δ_{H} 6,33 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-8) e δ_{H} 6,15 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-6). Esses sinais são típicos de um sistema de acoplamento AX neste anel. Pela análise do mapa de correlações HSQC foi possível atribuir todos os carbonos aos quais esses hidrogênios estão ligados. São eles, δ_{C} 115,9 (C-2'), δ_{C} 122,9 (C-

6'), δ_C 116,8 (C-5'), δ_C 95,5 (C-8) e δ_C 100,8 (C-6). Através das correlações observadas no mapa de correlações HMBC foi possível atribuir os demais carbonos do esqueleto flavonoídico. Foram observadas correlações entre o sinal do hidrogênio H-2' e os do carbono δ_C 116,8 (C-5'), δ_C 149,6(C-3') e δ_C 146,0 (C-4'), esses sinais de hidrogênio H-2' e H-6' também apresentaram correlação com o do carbono de deslocamento δ_C 158,5 que foi atribuído ao carbono C-2.

Foi observado para o anel A, no mapa de correlações HSCQ, correlações dos sinais dos hidrogênios H-6 (δ_H 6,15) e H-8 (δ_H 6,33) com os sinais de carbonos em δ_C 100,8 (C-6) e δ_C 95,5 (C-8), respectivamente. Através do mapa de correlações HMBC foi possível atribuir os demais carbonos do anel A, pois observou-se correlações entre o sinal do hidrogênio H-8 e os sinais de carbonos com deslocamento químicos em δ_C 100,8 (C-6), δ_C 104,2 (C-10), δ_C 158,3 (C-9) e δ_C 166,0 (C-7), e entre sinal do hidrogênio H-6 e os sinais de carbonos δ_C 95,5 (C-8), δ_C 104,2 (C-10), δ_C 163,1 (C-5) e δ_C 166,0 (C-7), concluindo assim, as atribuições de hidrogênios e carbonos do anel A.

A presença de um dubleto em δ_H 5,14 com constante de acoplamento de 7,5 Hz caracterizou o hidrogênio anomérico (H-1'') de β -L-xilosídeo e a integração deste sinal para um hidrogênio, confirma ser esta, uma unidade glicosídica substituinte no flavonoide quercetina, para a substância minoritária. Uma correlação entre este sinal do hidrogênio anomérico e o sinal de carbono δ_C 135,3 (C-3) no mapa de correlações HMBC confirmou a posição de substituição desta glicose no carbono C-3 e, através do mapa de correlações HSQC, determinou-se que H-1'' está diretamente ligado ao carbono δ_C 104,5. Os demais sinais representados no RMN de 1H na faixa de δ_H 3,12-3,79 são característicos da presença de unidade de açúcar, conhecida como xilosídeo, ligado ao flavonoide, e os respectivos carbonos estão representados por sinais na faixa de δ_C 66,7-77,7. Assim, a estrutura VIII foi identificada como o flavonol Quercetina-3-*O*- β -L-xilosídeo, pela primeira vez relatada para a espécie *E. myrcianthes*.



Quercetina-3-*O*- β -L-xilosídeo (VIII)

TABELA 4.11 - Dados de RMN ¹H (CD₃OD, 600 MHz) da substância VIII e comparação com a Quercetina-3-*O*-β-L-xilosídeo (KALEGARI et al., 2011, CD₃OD , RMN ¹H 300 MHz e RMN ¹³C 75 MHz)

H/C	δ _H (ppm), <i>J</i> (Hz)		δ _C (ppm), <i>J</i> (Hz)	
	Substância VIII	KALEGARI et al., 2011	Substância VIII*	KALEGARI et al., 2011
2	-	-	158,5	158,5
3	-	-	135,3	135,4
4	-	-	**	179,4
5	-	-	**	163,1
6	6,15 (<i>d</i> , 2,0)	6,16 (<i>d</i> , 2,1)	100,8	99,8
7	-	-	166,0	166,0
8	6,33 (<i>d</i> , 2,0)	6,39 (<i>d</i> , 1,8)	95,5	94,7
9	-	-	158,3	158,5
10	-	-	104,2	105,6
1'	-	-	**	123,0
2'	7,60 (<i>d</i> , 2,0)	7,60 (<i>s</i>)	115,9	115,9
3'	-	-	149,6	149,8
4'	-	-	146,0	146,1
5'	6,85 (<i>d</i> , 8,5)	6,84 (<i>s</i>)	116,8	117,2
6'	7,57 (<i>dd</i> , 8,5, 2,0)	7,57 (<i>d</i> , 2,1)	122,9	123,3
1''	5,14 (<i>d</i> , 7,5)	5,17 (<i>d</i> , 7,2)	104,5	104,5
2''	3,39 (<i>m</i>)	3,39 (<i>m</i>)	77,7	75,3
3''	3,44-3,50 (<i>m</i>)	3,46-3,54 (<i>m</i>)	66,7-75,2	77,5
4''	3,44-3,50 (<i>m</i>)	3,46-3,54 (<i>m</i>)	66,7-75,2	71,0
5'' a	3,12 (<i>m</i>)	3,10 (<i>dd</i> , 11,5, 9,5)	66,9	67,2
5'' b	3,79 (<i>m</i>)	3,78 (<i>dd</i> , 11,4, 5,0)	68,9	67,2

*Os valores do deslocamento químico para o RMN ¹³C, são os valores do deslocamento químico de ¹³C da projeção do carbono do mapa de correlação do HSQC./ **não foram observados.

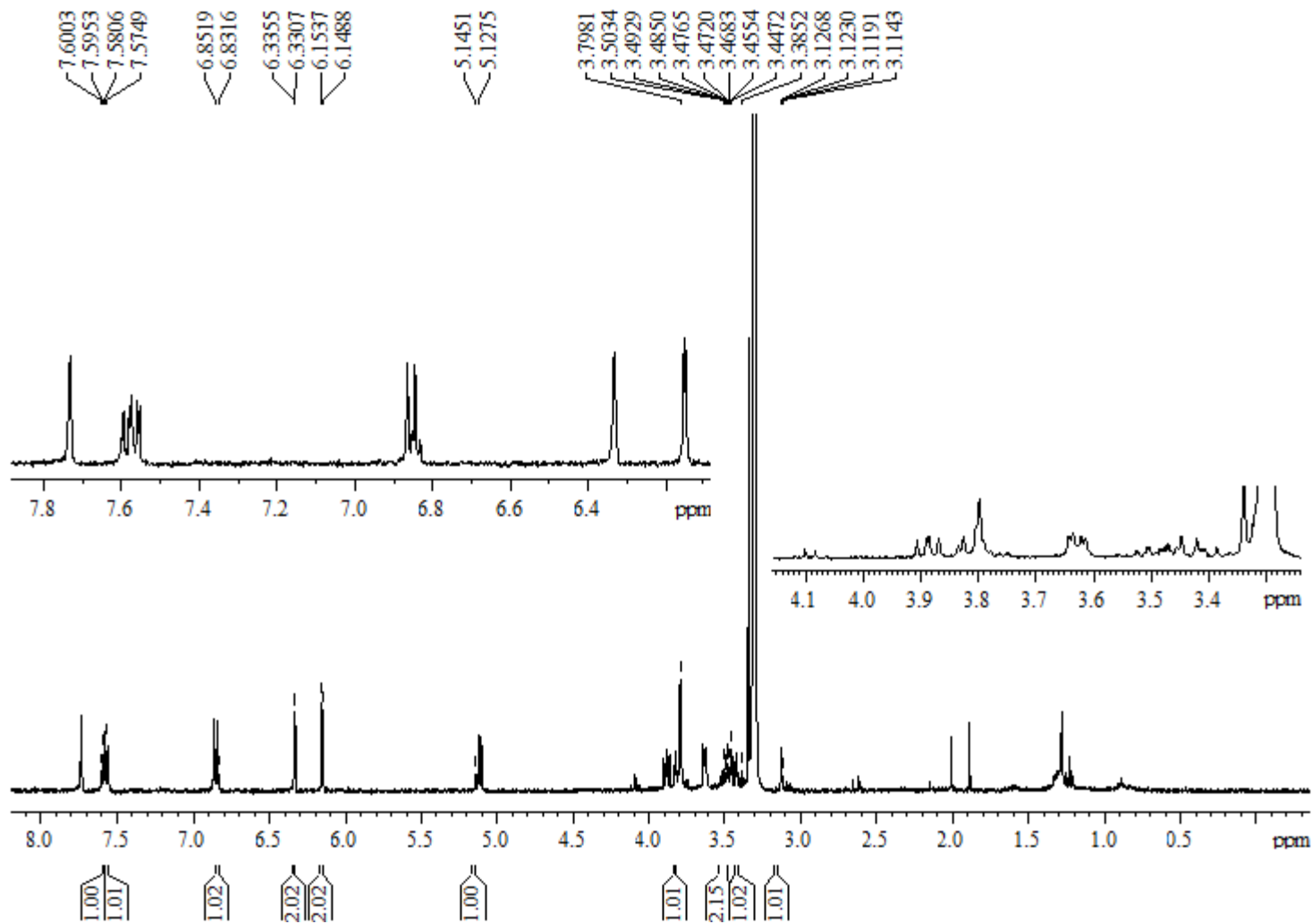


FIGURA 4.28 - Espectro de RMN ^1H da substância VIII (CD_3OD , 600 MHz).

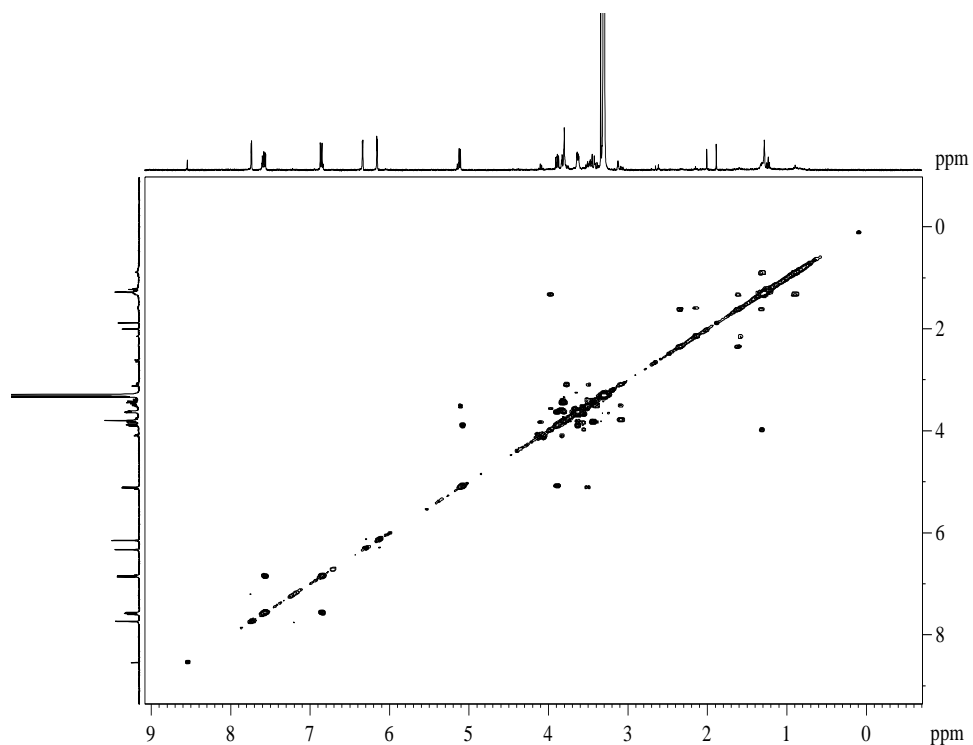


FIGURA 4.29 - Mapa de contornos COSY da substância VIII (CD_3OD , 600 MHz).

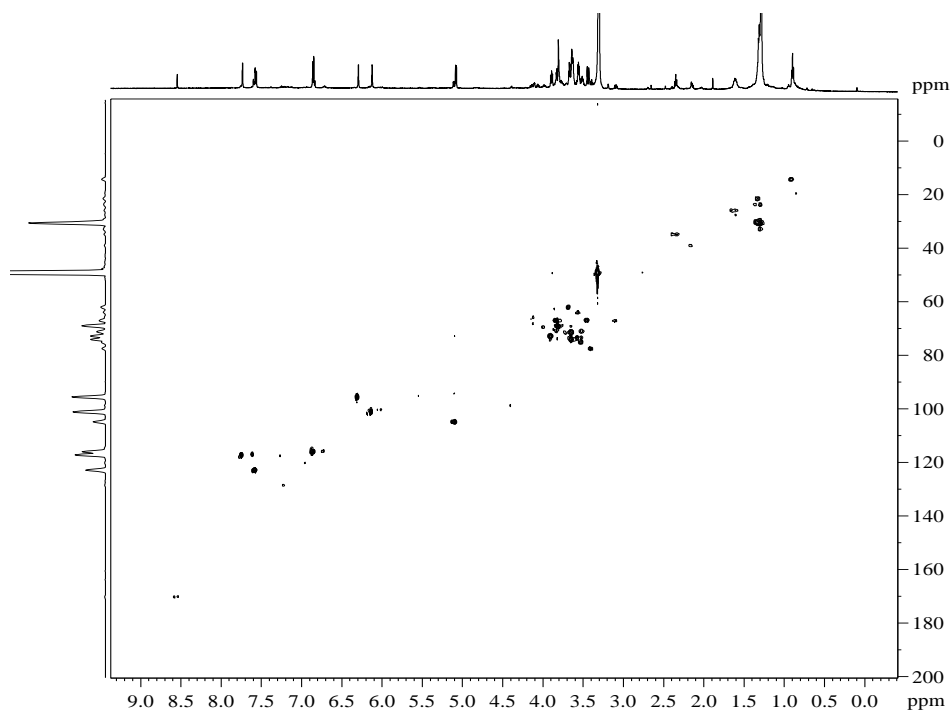


FIGURA 4.30 - Mapa de correlações HSQC da substância VIII (CD_3OD , 600 MHz).

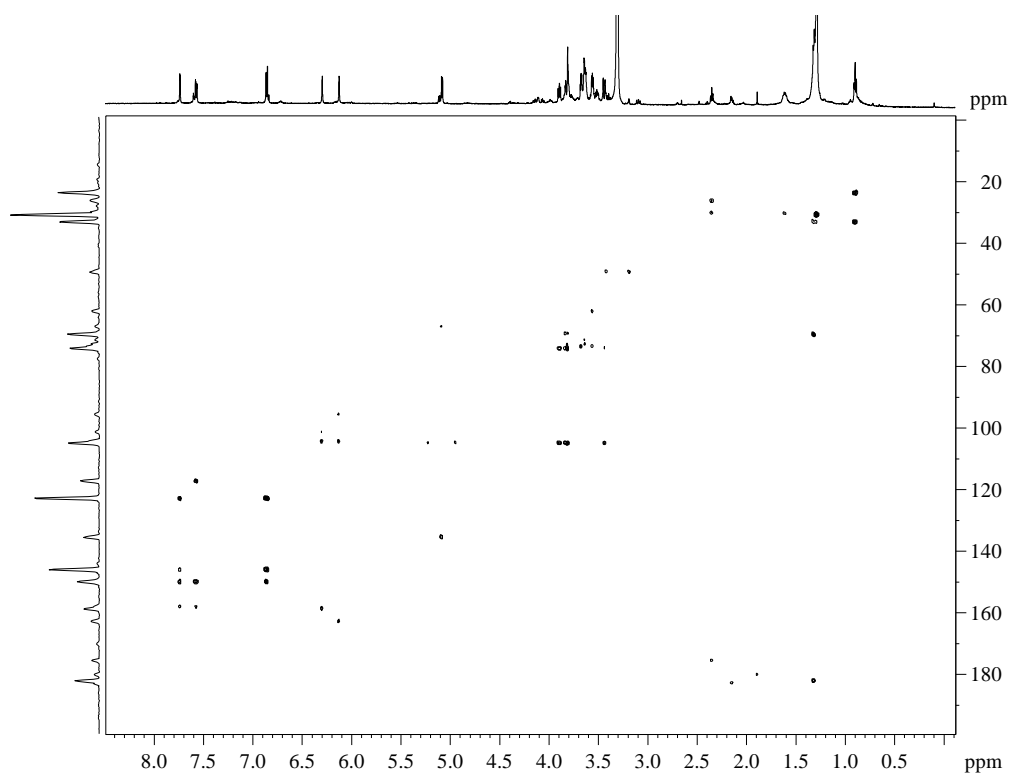


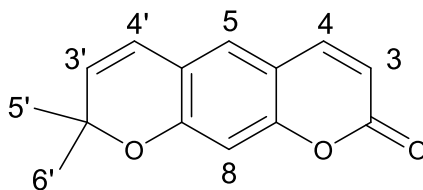
FIGURA 4.31 - Mapa de correlações HMBC da substância VIII (CD_3OD , 600 MHz).

4.1.2 – Cumarina

4.1.2.1 – Identificação Estrutural da Substância IX

Foi isolada a substância IX da fração C2-4 (Fluxograma 3.9, p. 31), como um pó branco. A identificação desta substância foi realizada através do espectro de RMN ^1H (Figura 4.32). Os dados obtidos foram comparados com dados da literatura (Tabela 4.12) (CAZAL et. al, 2009).

No espectro de RMN ^1H , foram observados sinais característicos de cumarinas, como a presença de quatro dubletos na região de hidrogênios olefínicos, com deslocamentos químicos δ_{H} 7,59 ($J = 9,6$ Hz) e 6,23 ($J = 9,6$ Hz) referentes aos sinais dos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente. O sinal referente ao hidrogênio na posição 4 encontra-se menos blindado, devido à conjugação da ligação dupla com a carboxila da lactona. Os outros dois dubletos são encontrados em δ_{H} 6,35 ($J = 9,9$ Hz, H-4') e 5,70 ($J = 9,9$ Hz, H-3'), que junto com um singleto em δ_{H} 1,47 (6H, H-5' e H-6'), são característicos de um anel pirano. O sinal do H-3' (δ_{H} 5,70) apresenta-se mais blindado, pois há conjugação dos pares de elétrons do sistema aromático com a ligação dupla do anel pirano. Á presença de dois singletos com δ_{H} 6,72 e δ_{H} 7,04, referentes aos hidrogênios na posição 8 e 5, respectivamente. Portanto, pode-se confirmar que este anel encontra-se nas posições 6 e 7. O sinal do hidrogênio na posição 8 é o mais blindado, pois encontra-se vizinho a dois carbonos contendo oxigênio como substituinte. Os sinais observados no espectro de hidrogênio foram comparados com a literatura (CAZAL et al., 2009). A análise do espectro de RMN ^1H foi suficiente para confirmar que a substância IX identificada trata-se da cumarina xantiletina, pela primeira vez relatada para a espécie *Eugenia myrcianthes*.



Xantiletina (IX)

TABELA 4.12 - Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância IX e comparação com a Xantiletina (CAZAL et al., 2009, CDCl_3 , 400 MHz)

H	δ_{H} (ppm), J (Hz)	
	Substância IX	CAZAL et al., 2009
2	-	-
3	6,23 (<i>d</i> , 9,6)	6,24 (<i>d</i> , 9,2)
4	7,59 (<i>d</i> , 9,6)	7,60 (<i>d</i> , 9,2)
4 ^a	-	-
5	7,04 (<i>s</i>)	7,04 (<i>s</i>)
6	-	-
7	-	-
8	6,72 (<i>s</i>)	6,72 (<i>s</i>)
8 ^a	-	-
2'	-	-
3'	5,70 (<i>d</i> , 9,9)	5,71 (<i>d</i> , 9,6)
4'	6,35 (<i>d</i> , 9,9)	6,36 (<i>d</i> , 9,6)
5'-6'	1,47 (<i>s</i>)	1,43 (<i>s</i>)

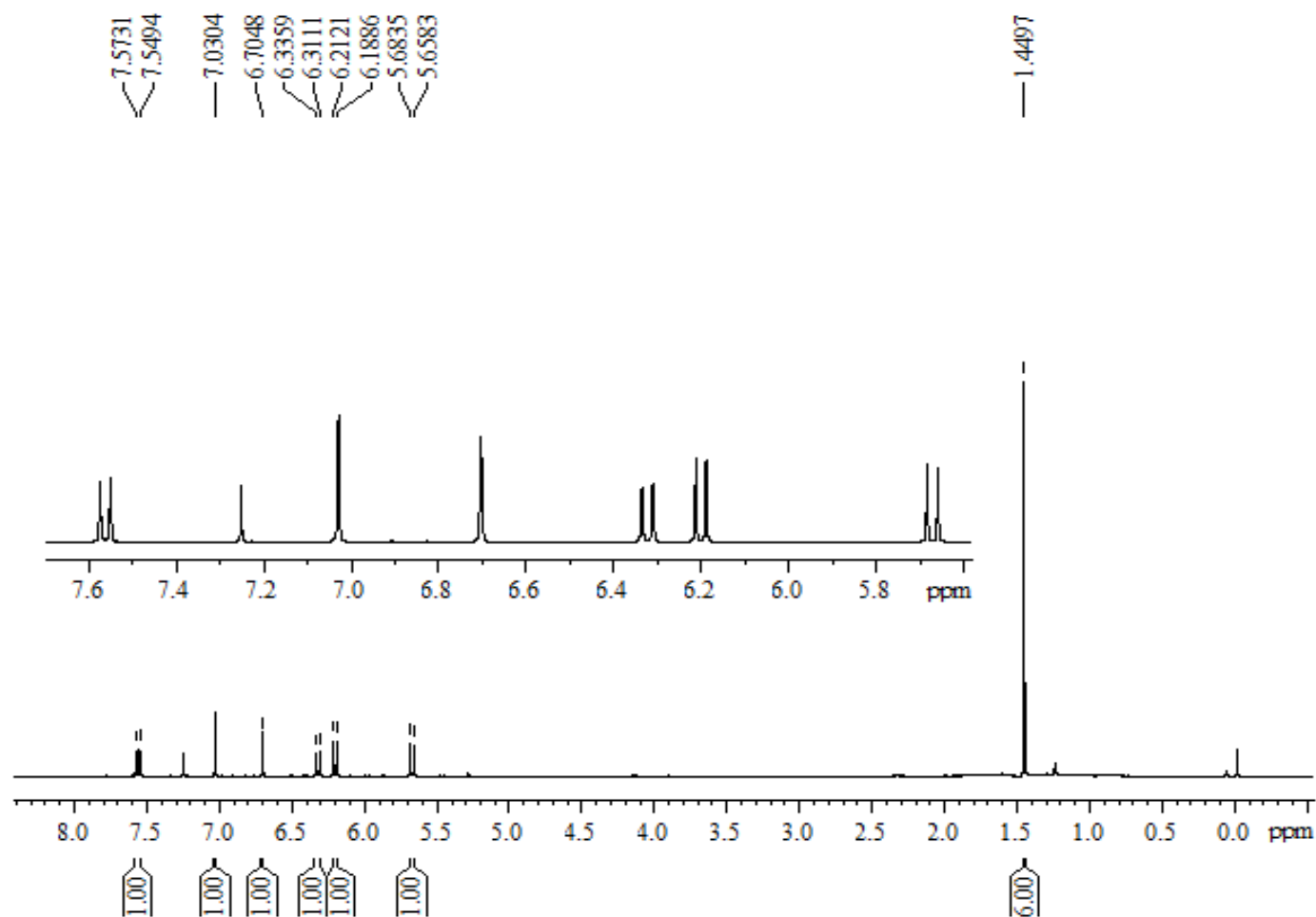


FIGURA 4.32 - Espectro de RMN ^1H da substância IX (400 MHz, CDCl_3).

4.1.3 – Triterpenos

4.1.3.1 – Identificação Estrutural das Substâncias X e XI

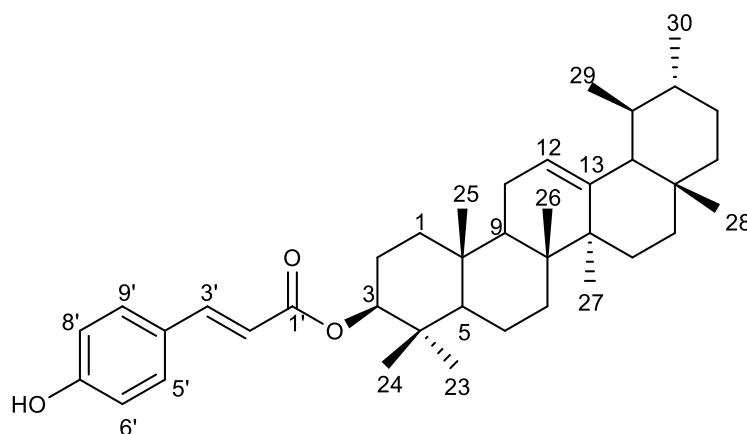
A fração C1-3 foi obtida a partir da fração acetato de etila das folhas (Fluxograma 3.3, p. 26) e trata-se de uma mistura das substâncias X e XI, onde a amostra se apresentou como um sólido branco amorfo. Estas substâncias foram identificadas através da análise de seus dados de RMN ^1H (Figura 4.33), COSY (Figura 4.34), HSQC (Figura 4.35) e HMBC (Figura 4.36). Os dados obtidos foram comparados com dados da literatura (Tabela 4.13 e Tabela 4.14) (JUTIVIBOONSUK et al., 2007).

Analisando o espectro de RMN ^1H da mistura das substâncias X e XI, pode-se observar o perfil característico de triterpenos, confirmado pela presença de vários singletos na região de δ_{H} 0,79 a 1,09. Também apresentou um duplo duplete em δ_{H} 4,64 ($J = 9,5$ e $8,1$) característico de H-3 em triterpenoides do tipo $3\beta\text{-O-acil}$ e um mutipletto em δ_{H} 5,23 correspondente aos hidrogênios H-12 e H-13 da olefina. No espectro de RMN ^{13}C foram observados dois pares de sinais mais intensos na região das olefinas, referentes ao triterpeno, dos quais δ_{C} 140,0 (C-13) e δ_{C} 123,2 (C-12), que caracterizam a α -amirina.

A comparação dos resultados obtidos com os relatos da literatura (JUTIVIBOONSUK *et al.*, 2007) permitiu confirmar a presença do triterpenoide α -amirina.

A presença dos sinais no espectro de RMN ^1H na região de δ_{H} 6,40 a 7,67, confirma a presença de outra substância ligada ao triterpeno. Foram observados dubletos em δ_{H} 7,67 ($J = 16,0$ Hz, H-3') e δ_{H} 6,40 ($J = 16,0$ Hz, H-2'), indicando acoplamento *trans* entre os hidrogênios na posição 2' e 3'. Os dois dubletos em δ_{H} 7,47 ($J = 8,5$ Hz, H-5' e H-9') e δ_{H} 6,73 ($J = 8,5$ Hz, H-6' e H-8'), são característicos de acoplamento em orto. Pela análise do mapa de correlações HSQC foi possível atribuir todos os carbonos aos quais esses hidrogênios estão ligados. São eles, δ_{C} 117,1 (C-2'), δ_{C} 145,0 (C-3'), δ_{C} 127,9 (C-5' e C-9') e δ_{C} 115,9 (C-6' e C-8'), estão ligados diretamente aos hidrogênios

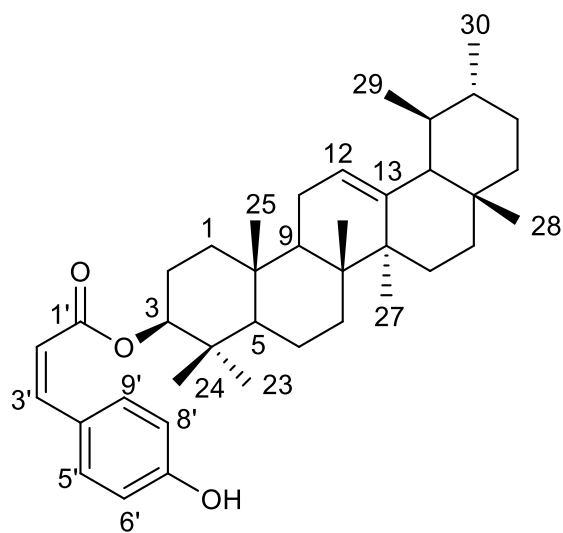
na posição H-2', H-3', H-5'/H-9' e H-6'/H-8', respectivamente. Através das correlações observadas no mapa de correlações HMBC foi possível atribuir os demais carbonos. Foram observadas correlações entre o sinal do hidrogênio H-2' e os carbonos em δ_C 168,8 (C-1') e δ_C 126,8 (C-4'), H-3' e os dos carbonos em δ_C 168,8 (C-1') e δ_C 127,9 (C-5'/C-9'), os hidrogênios H-5' e H-9' e os carbonos em δ_C 145,0 (C-3') e δ_C 160,0 (C-7'), e os hidrogênios H-6' e H-8' com os carbonos em δ_C 126,8 (C-4') e δ_C 127,9 (C-5'/C-9'). Assim, confirmando com os dados da literatura a substância X foi identificada como sendo 3 β -O-*trans*-p-cumaroil- α -amirina, pela primeira vez relatada para a espécie *E. myrcianthes*.



3 β -O-*trans*-p-cumaroil- α -amirina (X)

A presença dos outros sinais no espectro de RMN ^1H na região de δ_H 5,85 a 7,65, confirma a presença de outra substância ligada ao triterpeno. Foram observados dubletos em δ_H 6,88 ($J = 13,0$ Hz, H-3') e δ_H 5,85 ($J = 13,0$ Hz, H-2'), indicando acoplamento *cis* entre os hidrogênios na posição 3' e 2'. Os dois dubletos em δ_H 7,65 ($J = 8,5$ Hz, H-5' e H-9') e δ_H 6,81 ($J = 8,5$ Hz, H-6' e H-8'), são característicos de acoplamento em orto. Pela análise do mapa de correlações HSQC foi possível atribuir todos os carbonos aos quais esses hidrogênios estão ligados. São eles, δ_C 117,1 (C-2'), δ_C 145,0 (C-3'), δ_C 127,9 (C-5' e C-9') e δ_C 115,9 (C-6' e C-8'), estão ligados diretamente aos hidrogênios

na posição H-2', H-3', H-5'/H-9' e H-6'/H-8', respectivamente. Através das correlações observadas no mapa de correlações HMBC foi possível atribuir os demais carbonos. Foram observadas correlações entre o sinal do hidrogênio H-2' e os carbonos em δ_C 168,8 (C-1') e δ_C 126,8 (C-4'), H-3' e os dos carbonos em δ_C 168,8 (C-1') e δ_C 127,9 (C-5'/C-9'), os hidrogênios H-5' e H-9' e os carbonos em δ_C 145,0 (C-3') e δ_C 160,0 (C-7'), e os hidrogênios H-6' e H-8' com os carbonos em δ_C 126,8 (C-4') e δ_C 127,9 (C-5'/C-9'). Assim, confirmando com os dados da literatura a substância XI foi identificada como sendo 3 β -*O*-*cis*-*p*-cumaroil- α -amirina, pela primeira vez relatada para a espécie *E. myrcianthes*.



3 β -*O*-*cis*-*p*-cumaroil- α -amirina (XI)

TABELA 4.13 - Dados de RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) e de RMN ^{13}C (CD_3OD , 150 MHz) da substância X e comparação com 3-(*E*)-coumaroyl α -amirina (JUTIVIBOONSUK et al., 2007, CDCl_3 , RMN ^1H 400 MHz e RMN ^{13}C 100 MHz)

H/C	δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz)		δ_{C} (ppm), <i>J</i> (Hz)	
	Substância X	JUTIVIBOONSUK et al., 2007	Substância X	JUTIVIBOONSUK et al., 2007
1	1,14 (<i>m</i>) 1,67 (<i>m</i>)	1,12 (<i>m</i>) 1,71 (<i>m</i>)	38,4	38,5
2	1,66 (<i>m</i>)	1,70 (<i>m</i>)	23,9	23,5
3	4,64 (<i>dd</i> , 9,5, 8,1)	4,64 (<i>dd</i> , 8,1, 7,7)	80,0	80,8
4	-	-	38,3	37,9
5	1,32 (<i>m</i>)	1,32 (<i>m</i>)	54,7	55,3
6	1,44 (<i>m</i>) 1,52 (<i>m</i>)	1,41 (<i>m</i>) 1,52 (<i>m</i>)	18,1	18,3
7	1,37 (<i>m</i>) 1,57 (<i>m</i>)	1,36 (<i>m</i>) 1,57 (<i>m</i>)	32,1	32,9
8	-	-	40,1	40,1
9	1,57 (<i>m</i>)	1,57 (<i>m</i>)	47,7	47,6
10	-	-	352	36,8
11	1,93 (<i>m</i>)	1,93 (<i>m</i>)	24,2	23,7
12	5,23 (<i>m</i>)	5,13 (<i>m</i>)	123,2	124,3
13	-	-	140,0	139,6
14	-	-	40,7	42,1
15	1,91 (<i>m</i>)	1,83 (<i>brt</i>) (13,4)	26,5	26,6
16	2,00 (<i>m</i>)	2,00 (<i>brt</i>) (13,4)	28,0	28,1
17	-	-	33,8	33,8
18	1,35 (<i>m</i>)	1,33 (<i>m</i>)	56,9	59,1
19	0,95 (<i>m</i>)	0,93 (<i>m</i>)	39,4	39,6
20	1,32 (<i>m</i>)	1,32 (<i>m</i>)	39,9	39,7
21	1,29 (<i>m</i>) 1,44 (<i>m</i>)	1,29 (<i>m</i>) 1,41 (<i>m</i>)	31,8	31,3
22	1,32 (<i>m</i>) 1,47 (<i>m</i>)	1,30 (<i>m</i>) 1,45 (<i>m</i>)	41,0	41,5
23	0,88 (<i>s</i>)	0,88 (<i>s</i>)	28,0	28,1
24	0,96 (<i>s</i>)	0,94 (<i>s</i>)	16,5	16,9
25	1,01 (<i>s</i>)	1,01 (<i>s</i>)	14,6	15,8
26	1,02 (<i>s</i>)	1,02 (<i>s</i>)	16,5	16,9
27	1,09 (<i>s</i>)	1,08 (<i>s</i>)	24,3	23,3
28	0,79 (<i>s</i>)	0,79 (<i>s</i>)	28,8	28,8
29	0,80 (<i>m</i>)	0,80 (<i>d</i> , 6,0)	17,6	17,5
30	0,95(<i>m</i>)	0,92(<i>d</i> , 5,0)	21,7	21,4
1'	-	-	168,8	167,2
2'	6,40 (<i>d</i> , 16,0)	6,30 (<i>d</i> , 16,0)	117,1	116,5
3'	7,67 (<i>d</i> , 16,0)	7,61 (<i>d</i> , 16,0)	145,0	143,8
4'	-	-	126,8	127,6
5'	7,47 (<i>d</i> , 8,5)	7,44 (<i>d</i> , 8,5)	127,9	129,9
6'	6,73 (<i>d</i> , 8,5)	6,83 (<i>d</i> , 8,5)	115,9	115,8
7'	-	-	160,0	157,3
8'	6,73 (<i>d</i> , 8,5)	6,83 (<i>d</i> , 8,5)	115,9	115,8
9'	7,47 (<i>d</i> , 8,5)	7,44 (<i>d</i> , 8,5)	127,9	129,9

TABELA 4.14 - Dados de RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) e de RMN ^{13}C (CD_3OD , 150 MHz) da substância XI e comparação com 3-(Z)-coumaroyl α -amirina (JUTIVIBOONSUK et al., 2007, CDCl_3 , RMN ^1H 400 MHz e RMN ^{13}C 100 MHz)

H/C	δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz)		δ_{C} (ppm), <i>J</i> (Hz)	
	Substância XI	JUTIVIBOONSUK et al., 2007	Substância XI	JUTIVIBOONSUK et al., 2007
1	1,14 (<i>m</i>) 1,67 (<i>m</i>)	1,12 (<i>m</i>) 1,71 (<i>m</i>)	38,4	38,5
2	1,66 (<i>m</i>)	1,70 (<i>m</i>)	23,9	23,5
3	4,64 (<i>dd</i> , 9,5, 8,1)	4,64 (<i>dd</i> , 4,7, 10,6)	80,0	80,9
4	-	-	38,3	37,8
5	1,32 (<i>m</i>)	1,32 (<i>m</i>)	54,7	55,3
6	1,44 (<i>m</i>) 1,52 (<i>m</i>)	1,41 (<i>m</i>) 1,52 (<i>m</i>)	18,1	18,3
7	1,37 (<i>m</i>) 1,57 (<i>m</i>)	1,36 (<i>m</i>) 1,57 (<i>m</i>)	32,1	32,9
8	-	-	40,1	40,1
9	1,57 (<i>m</i>)	1,57 (<i>m</i>)	47,7	47,6
10	--	-	352	36,8
11	1,93 (<i>m</i>)	1,93 (<i>m</i>)	24,2	23,6
12	5,23 (<i>m</i>)	5,13 (<i>m</i>)	123,2	124,3
13	-	-	140,0	139,6
14	-	-	40,7	42,1
15	1,91 (<i>m</i>)	1,83 (<i>brt</i>) (13,4)	26,5	26,6
16	2,00 (<i>m</i>)	2,00 (<i>brt</i>) (13,4)	28,0	28,1
17	-	-	33,8	33,8
18	1,35 (<i>m</i>)	1,33 (<i>m</i>)	56,9	59,1
19	0,95 (<i>m</i>)	0,93 (<i>m</i>)	39,4	39,6
20	1,32 (<i>m</i>)	1,32 (<i>m</i>)	39,9	39,7
21	1,29 (<i>m</i>) 1,44 (<i>m</i>)	1,29 (<i>m</i>) 1,41 (<i>m</i>)	31,8	31,3
22	1,32 (<i>m</i>) 1,47 (<i>m</i>)	1,30 (<i>m</i>) 1,45 (<i>m</i>)	41,0	41,5
23	0,88 (<i>s</i>)	0,91 (<i>s</i>)	28,0	28,1
24	0,96 (<i>s</i>)	0,82 (<i>s</i>)	16,5	16,8
25	1,01 (<i>s</i>)	0,97 (<i>s</i>)	14,6	15,8
26	1,02 (<i>s</i>)	1,00 (<i>s</i>)	16,5	16,9
27	1,09 (<i>s</i>)	1,06 (<i>s</i>)	24,3	23,3
28	0,79 (<i>s</i>)	0,79 (<i>s</i>)	28,8	28,8
29	0,80 (<i>m</i>)	0,80 (<i>d</i> , 6,0)	17,6	17,5
30	0,95(<i>m</i>)	0,92(<i>d</i> , 5,0)	21,7	21,4
1'	-	-	168,8	166,4
2'	5,85 (<i>d</i> , 13,0)	5,84 (<i>d</i> , 12,6)	117,1	117,9
3'	6,88 (<i>d</i> , 13,0)	6,82 (<i>d</i> , 12,6)	145,0	142,9
4'	-	-	126,8	127,8
5'	7,65 (<i>d</i> , 8,5)	7,64 (<i>d</i> , 8,4)	127,9	132,4
6'	6,81 (<i>d</i> , 8,5)	6,79 (<i>d</i> , 8,4)	115,9	114,9
7'	-	-	160,0	156,4
8'	6,81 (<i>d</i> , 8,5)	6,79 (<i>d</i> , 8,4)	115,9	114,9
9'	7,65 (<i>d</i> , 8,5)	7,64 (<i>d</i> , 8,4)	127,9	132,4

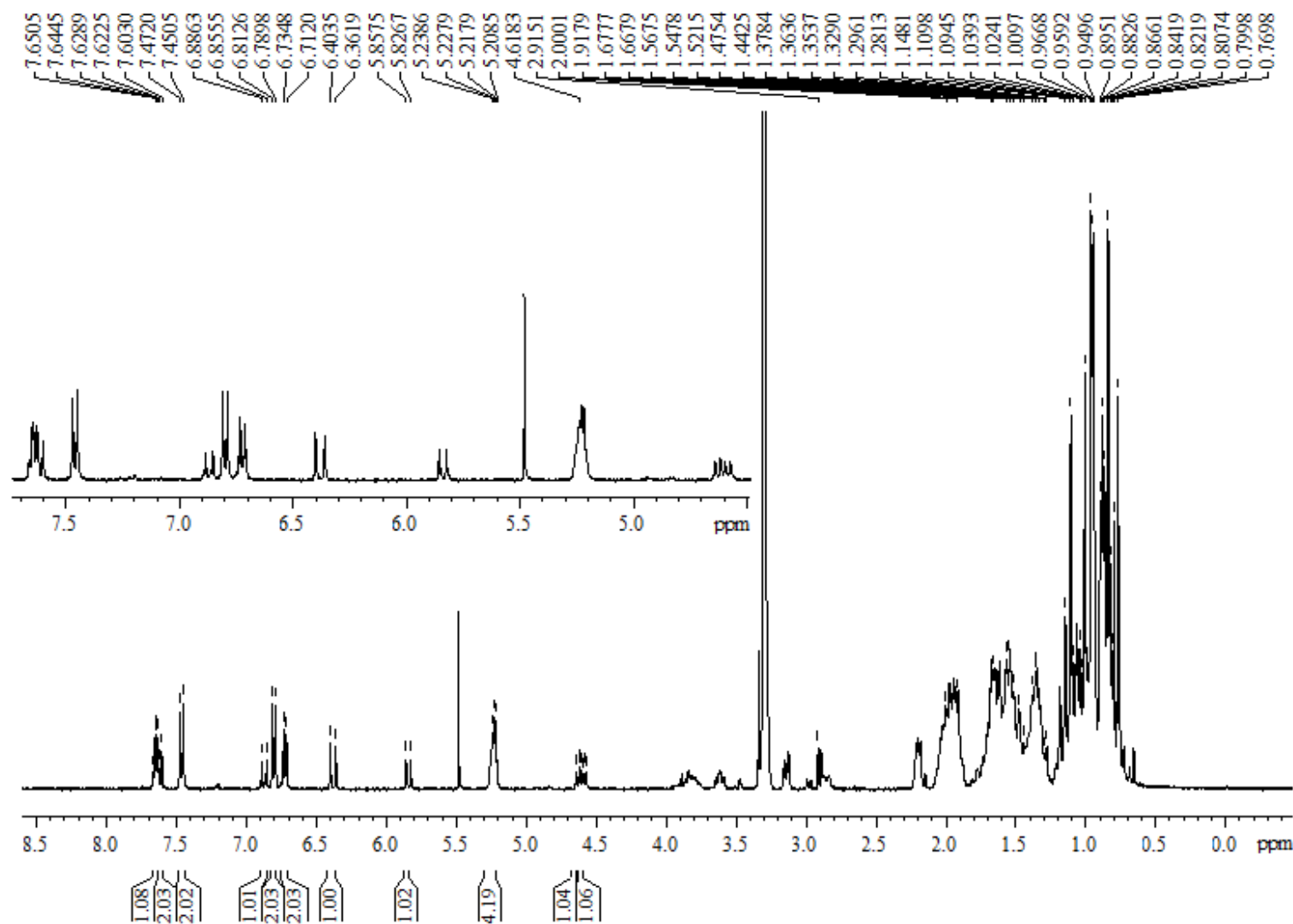


FIGURA 4.33 - Espectro de RMN ¹H da substância X e XI (CD₃OD, 400 MHz).

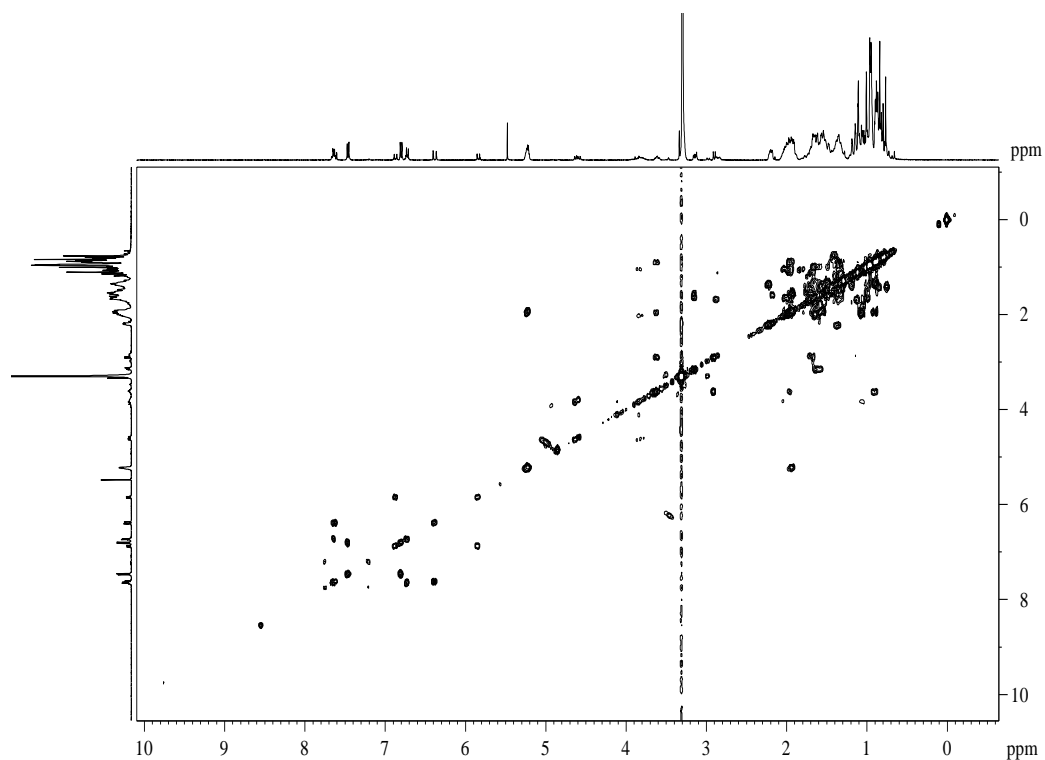


FIGURA 4.34 - Mapa de contornos COSY da substância X e XI (CD_3OD , 600 MHz).

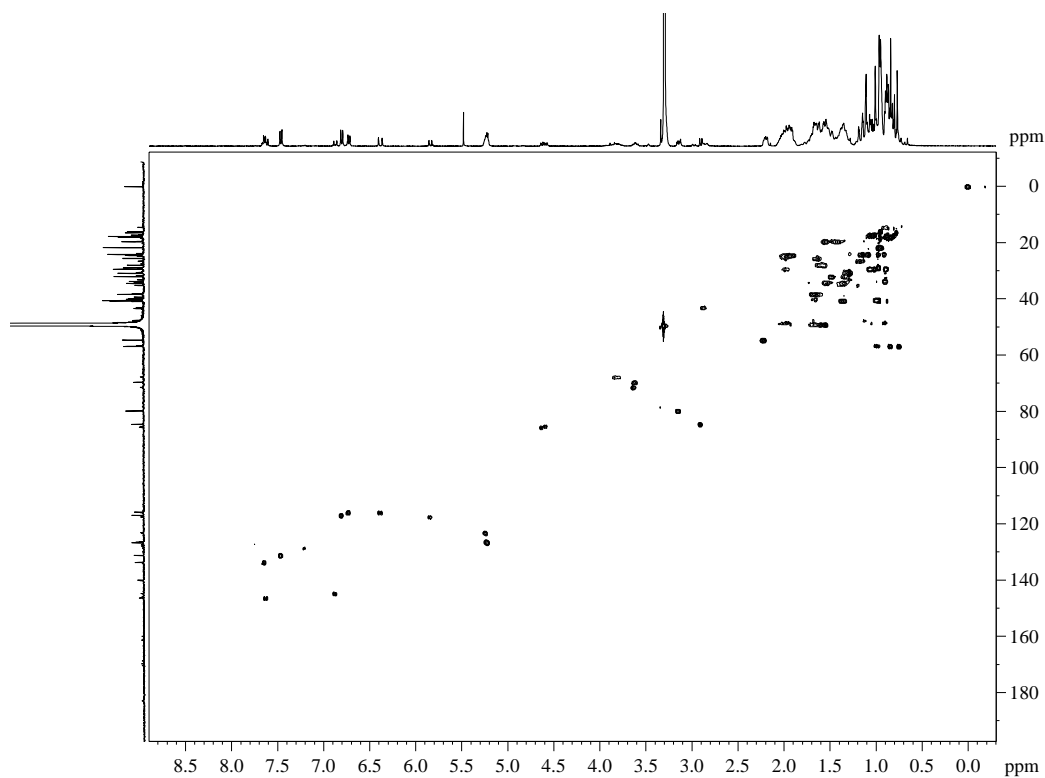


FIGURA 4.35 - Mapa de correlações HSQC da substância X e XI (CD_3OD , 600 MHz).

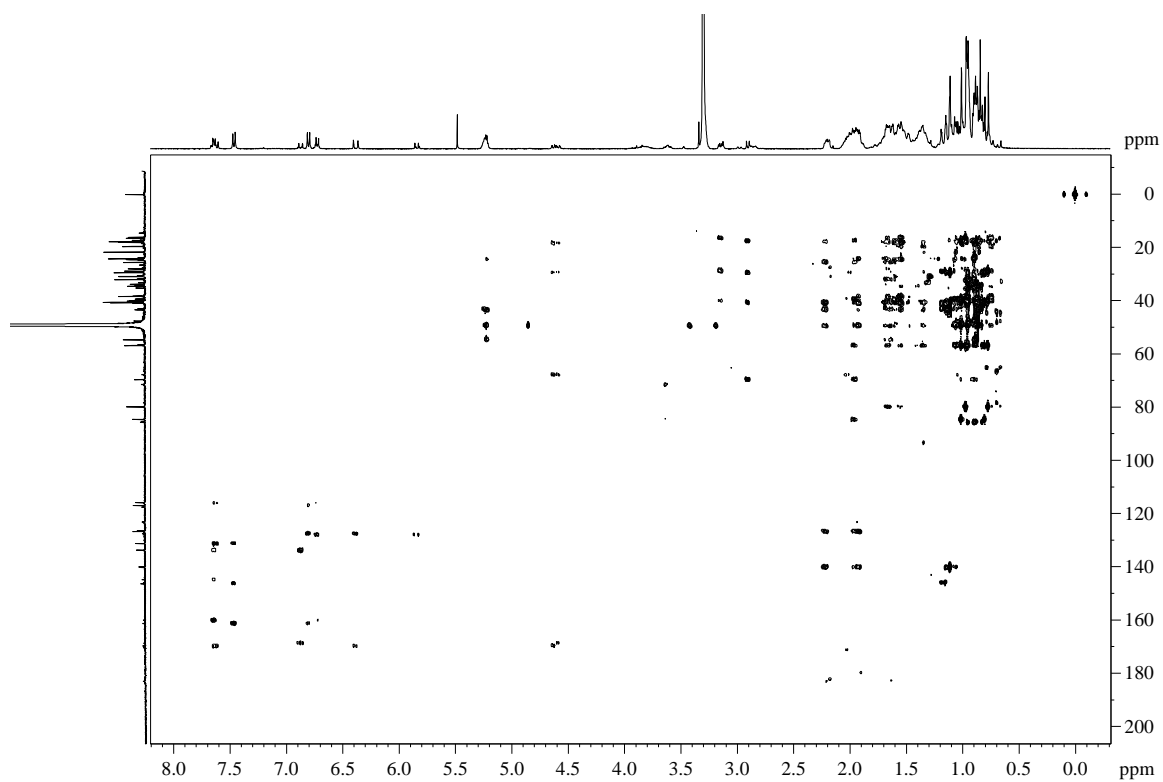


FIGURA 4.36 - Mapa de correlações HMBC da substância X e XI (CD₃OD, 600 MHz).

4.1.4 – Derivados do Tirosol (*p*-hidroxifeniletanol)

4.1.4.1 – Identificação Estrutural das Substâncias XII e XIII

A mistura das substâncias XII e XIII foi isolada da fração C2-6 a partir da fração hexânica das folhas (Fluxograma 3.9, p. 31). Esta mistura foi isolada como sólido amorfo branco. A identificação foi realizada através de experimentos de RMN ^1H (Figura 4.42), COSY (Figura 4.43), HSQC (Figura 4.44), HMBC (Figura 4.45) e espectrometria de massas. Os dados obtidos foram comparados com dados da literatura (Tabela 4.15 e Tabela 4.16) (KUMAR et al., 2005; FIRDOUS et al., 2014).

Analisando o espectro de RMN ^1H pode-se observar sinais característicos de hidrogênios aromáticos, referentes à substância XII, dois dubletos em δ_{H} 6,77 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-3' e H-5') e δ_{H} 7,10 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-2' e H-6'), assim sugerindo a presença de um anel aromático 1,4-dissubstituído.

O espectro de RMN ^1H mostrou também quatro tripletos em δ_{H} 0,88 (*t*, $J = 6,2$ Hz, H-23'') característico de grupo metila terminal de uma cadeia alifática, δ_{H} 2,27 (*t*, $J = 7,0$ Hz, H-2'') no qual é característico de grupo metilênico vizinho ao grupo carbonila, δ_{H} 2,85 (*t*, $J = 7,0$ Hz, H-2) referente ao grupo metilênico ligado ao anel aromático e δ_{H} 4,23 (*t*, $J = 7,0$ Hz, H-1) característico de grupo metilênico de um éster. Apresentou um multipletto em δ_{H} 1,58 (H-3'') referente a um grupo metilênico ligado a posição beta à carbonila e um singleto largo intenso em δ_{H} 1,25 (H-4'' a H-22'') referente a 38 hidrogênios confirmando assim a presença de uma cadeia alifática contendo 19 grupos metilênicos. No mapa de contornos COSY foi confirmado os acoplamentos existentes entre os hidrogênios da substância XII, como mostrado na Figura 4.43.

Através do mapa de correlações HSQC os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,10 e δ_{H} 6,77 estão diretamente ligados aos carbonos δ_{C} 130,0 (C-2' e C-6') e δ_{C} 115,5 (C-3' e C-5'), respectivamente. Ainda no mapa de correlações HSQC os hidrogênios em δ_{H} 4,23, δ_{H} 2,85, δ_{H} 2,27, δ_{H} 1,58, δ_{H} 1,25,

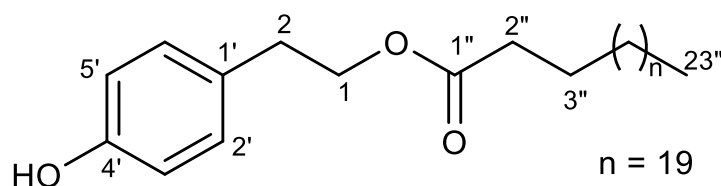
δ_H 0,89 estão diretamente ligados aos carbonos δ_C 65,0 (C-1), δ_C 34,3 (C-2), δ_C 34,4 (C-2''), δ_C 25,1 (C-3''), δ_C 24,9-30,1 (C-4'' a C-22'') e δ_C 14,1 (C-23''), respectivamente.

Através do mapa de correlações HMBC, pode-se confirmar a ligação do hidrogênio H-2 com o carbono C-1', onde apresenta a correlação do sinal do hidrogênio em δ_H 2,85 com o do carbono em δ_C 130,0.

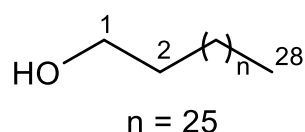
O espectro de RMN 1H apresentou, também, um tripleto em δ_H 3,64 (*t*, *J* = 6,6 Hz, H-1) que foi atribuído ao grupo metilênico de álcool de cadeia longa, a presença dos multipletos em δ_H 1,58 (H-2) e δ_H 1,25 (H-3 a H-25) e do tripleto em δ_H 0,89 (H-28) também são referentes à substância XIII.

Foi realizado o experimento de CG-EM para a mistura destas substâncias, onde pela proposta de fragmentação foi possível à confirmação da estrutura das substâncias XII (Figura 4.40) e XIII (Figura 4.41).

A análise dos experimentos realizados para essa mistura e a comparação destes com a literatura levou a identificação destas substâncias como sendo uma mistura das substâncias Tricosanoato de 2-(4'-hidroxifenil)etila (KUMAR et al., 2005) e 1-octacosanol (FIRDOUS et al., 2014), pela primeira vez relatada para a espécie *E. myrcianthes*.



Tricosanoato de 2-(4'-hidroxifenil)etila (XII)



1-octacosanol (XIII)

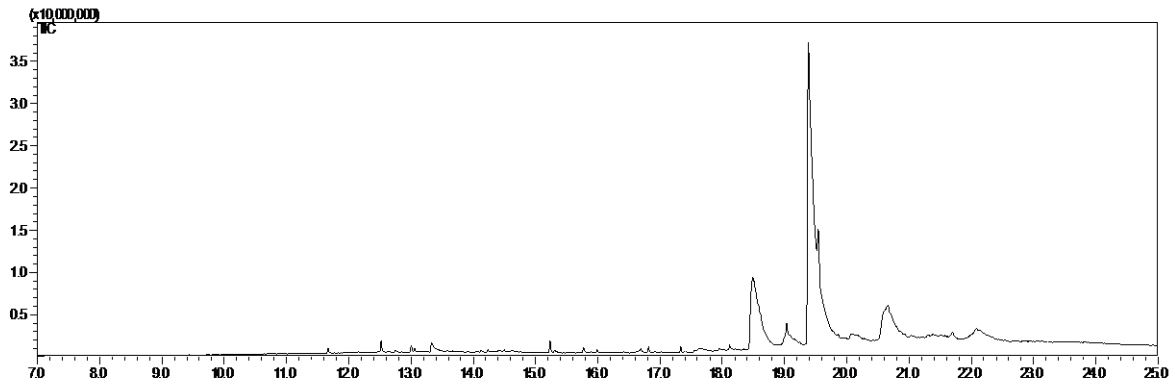


FIGURA 4.37 - Cromatograma obtido no CG-EM para a substância XIV. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 100 °C; tempo inicial de 5,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 15 °C/min. até 310 °C, permanecendo na temperatura de 310 °C por 19,0 min.

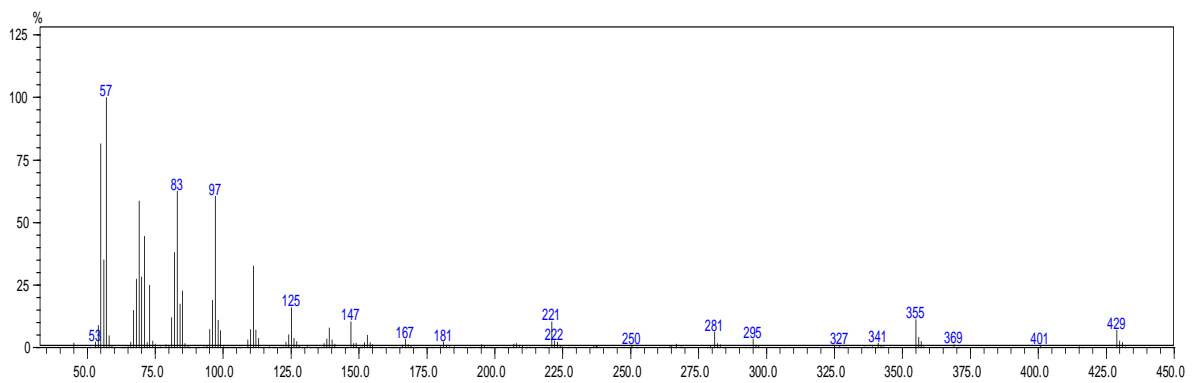


FIGURA 4.38 – Espectro de massas da substância XII.

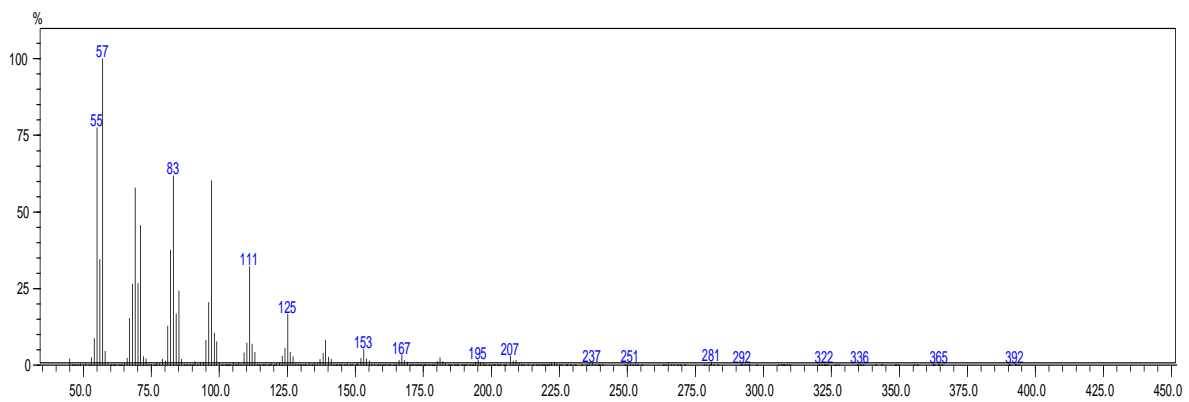


FIGURA 4.39 - Espectro de massas da substância XIII.

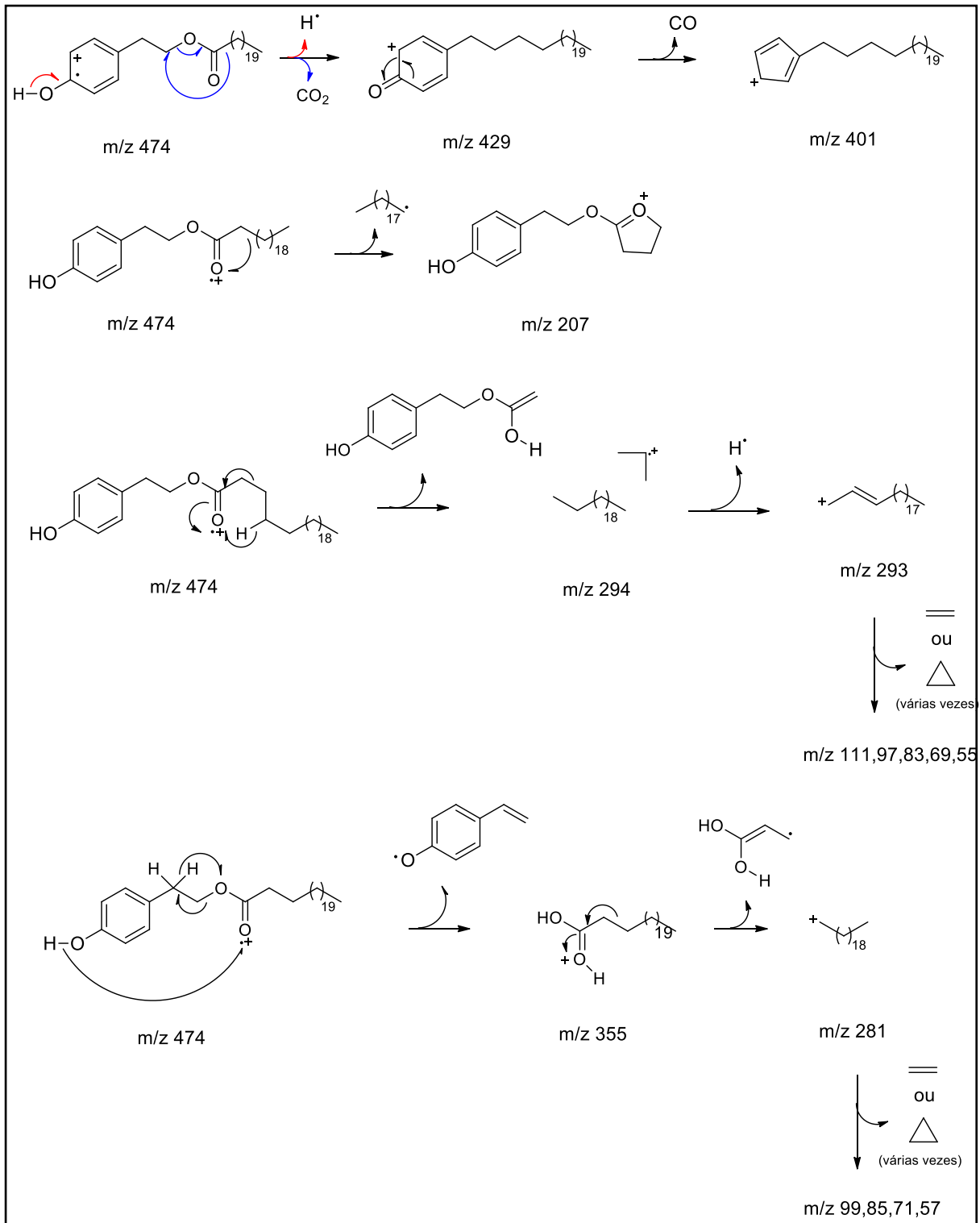


FIGURA 4.40 - Proposta de fragmentação para a substância XII.

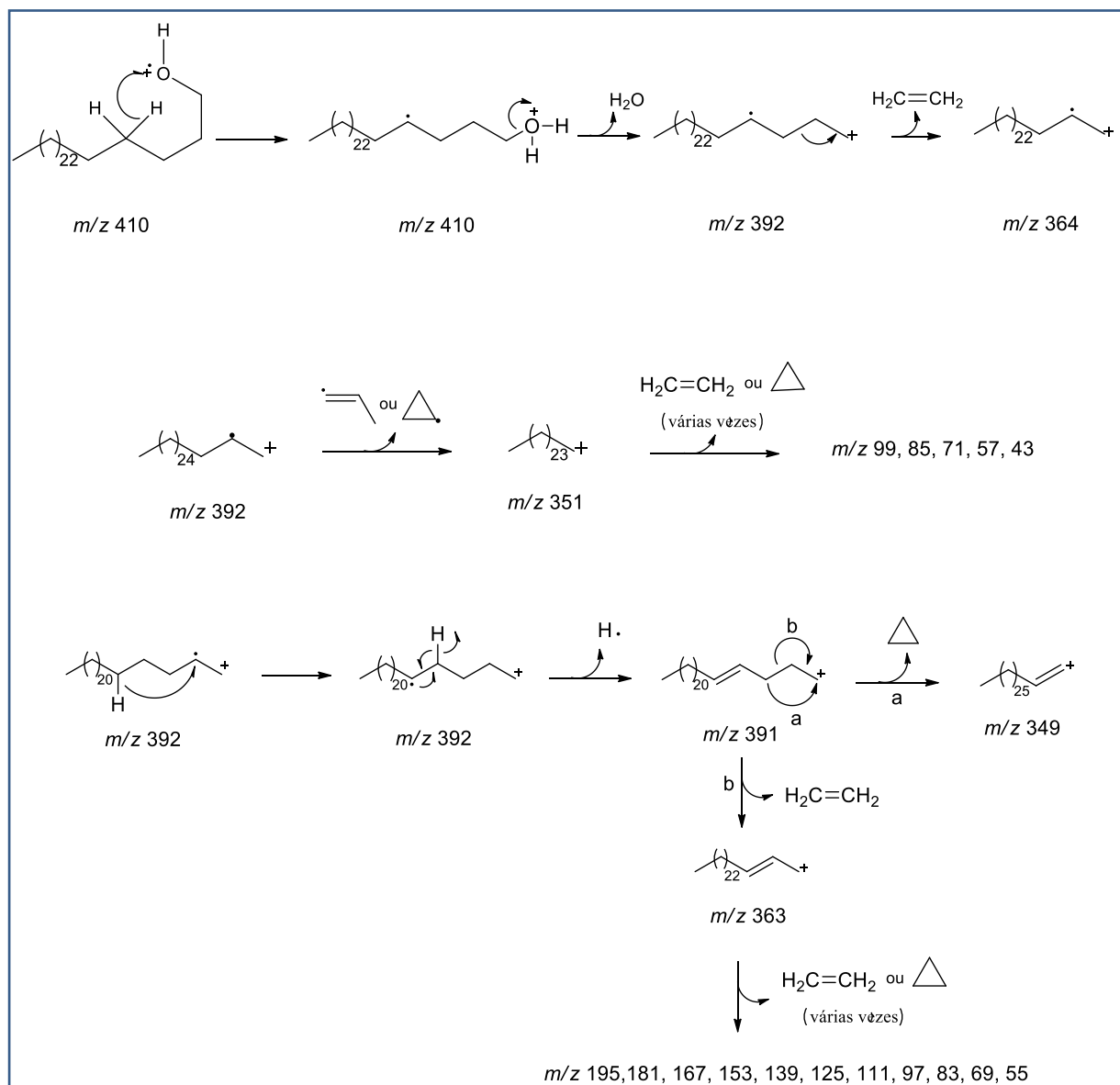


FIGURA 4.41 - Proposta de fragmentação para a substância XIII.

TABELA 4.15 - Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância XII e nonacosanoato de 2-(4'-hidroxifenil)etila (KUMAR et al., 2005, CDCl_3 , RMN ^1H 400 MHz e RMN ^{13}C 100 MHz)

δ_{H} e δ_{C}^* (ppm), J (Hz) Substância XII			δ_{H} e δ_{C} (ppm), J (Hz) H/C KUMAR et al., 2005		
1	4,23 (<i>t</i> , 7,0)	65,0	1	4,25 (<i>t</i> , 6,9)	64,9
2	2,85 (<i>t</i> , 7,0)	34,3	2	2,85 (<i>t</i> , 6,9)	34,3
1'	-	**	1'	-	129,8
2'	7,10 (<i>d</i> , 8,5)	130,0	2'	7,08 (<i>d</i> , 9,0)	129,9
3'	6,77 (<i>d</i> , 8,5)	115,5	3'	6,75 (<i>d</i> , 9,0)	115,3
4'	-	**	4'	-	154,3
5'	6,77 (<i>d</i> , 8,5)	115,5	5'	6,75 (<i>d</i> , 9,0)	115,3
6'	7,10 (<i>d</i> , 8,5)	130,0	6'	7,08 (<i>d</i> , 9,0)	129,9
1''	-	**	1''	-	173,9
2''	2,27 (<i>t</i> , 7,0)	34,4	2''	2,30 (<i>t</i> , 6,9)	31,9
3''	1,58 (<i>m</i>)	25,1	3''	1,60 (<i>m</i>)	22,6-29,6
4'' – 22''	1,25 (<i>sl</i>)	24,9-30,1	4'' – 28''	1,30 (<i>s</i>)	22,6-29,6
23''	0,89 (<i>t</i> , 6,2)	14,1	29''	0,92 (<i>t</i> , 6,2)	14,0

**Os valores do deslocamento químico para o RMN ^{13}C , são os valores do deslocamento químico de ^{13}C da projeção do carbono do mapa de correlação do HSQC./ **não foram observados.

TABELA 4.16 - Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância XIII e comparação com 1-octacosanol (FIRDOUS et al., 2014, CDCl_3 , RMN ^1H 300 MHz e RMN ^{13}C 75,0 MHz)

H/C	δ_{H} (ppm), J (Hz)		δ_{C} (ppm), J (Hz)	
	Substância XIII	FIRDOUS et al., 2014	Substância XIII	FIRDOUS et al., 2014
1	3,64 (<i>t</i> , 6,6)	3,62 (<i>t</i> , 6,6)	63,2	*
2	1,58 (<i>m</i>)	1,54 (<i>m</i>)	25,1	32,8
3 -27	1,25 (<i>sl</i>)	1,24 (<i>sl</i>)	24,9-31,0	22,7-31,9
28	0,89 (<i>t</i> , 6,2)	0,86 (<i>t</i> , 6,0)	14,1	14,1

* não foi relatado

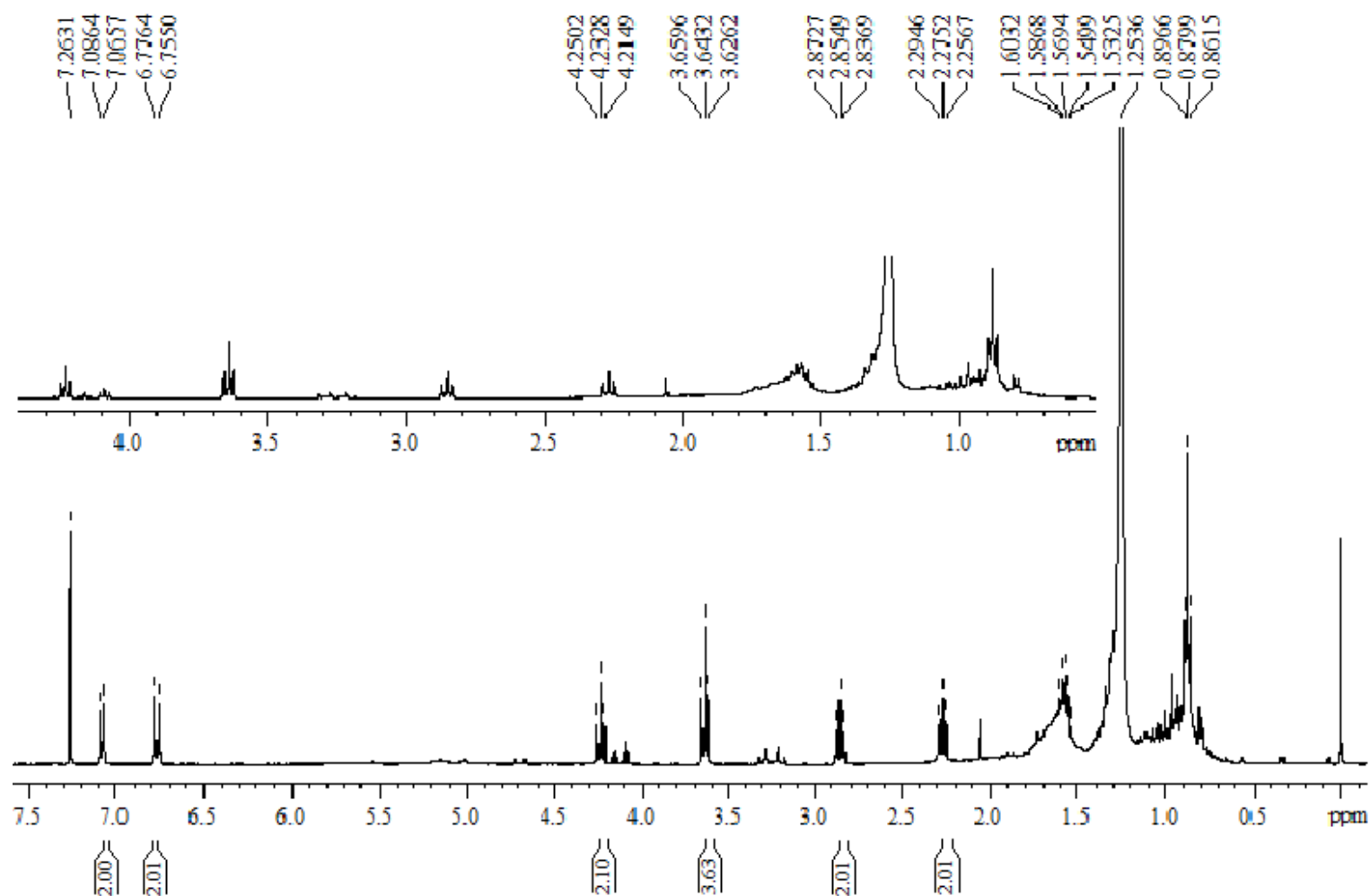


FIGURA 4.42 - Espectro de RMN ^1H das substâncias XII e XIII (CDCl_3 400 MHz).

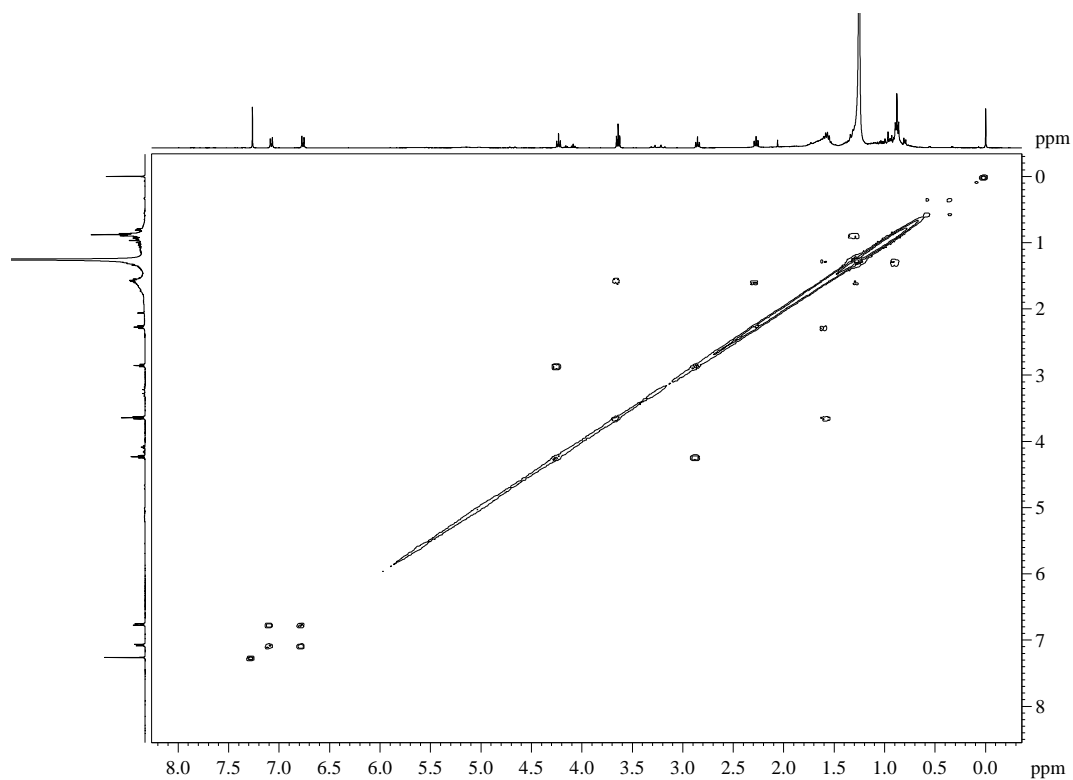


FIGURA 4.43 - Mapa de contornos COSY das substâncias XII e XIII (CDCl_3 400 MHz).

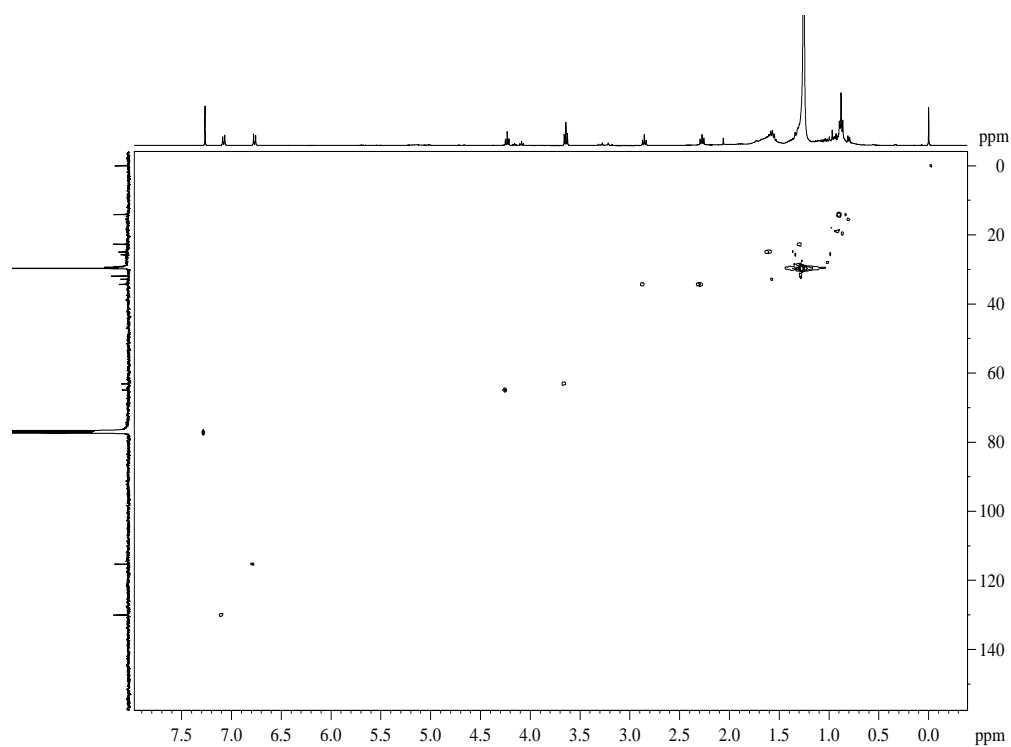


FIGURA 4.44 - Mapa de correlações HSQC das substâncias XII e XIII (CDCl_3 400 MHz).

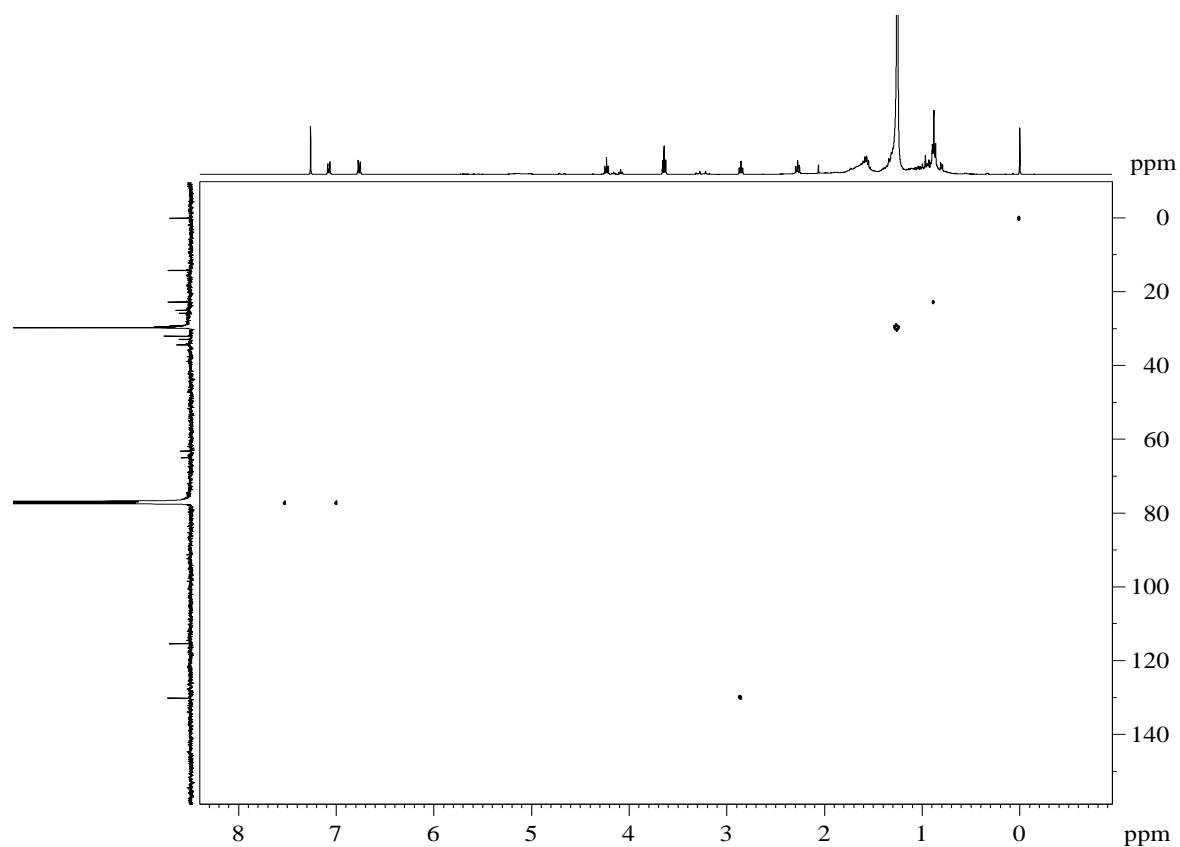
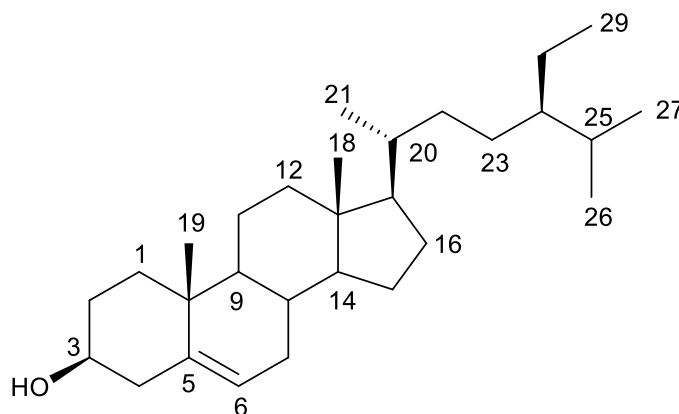


FIGURA 4.45 - Mapa de correlações HMBC das substâncias XII e XIII (CDCl_3 400 MHz).

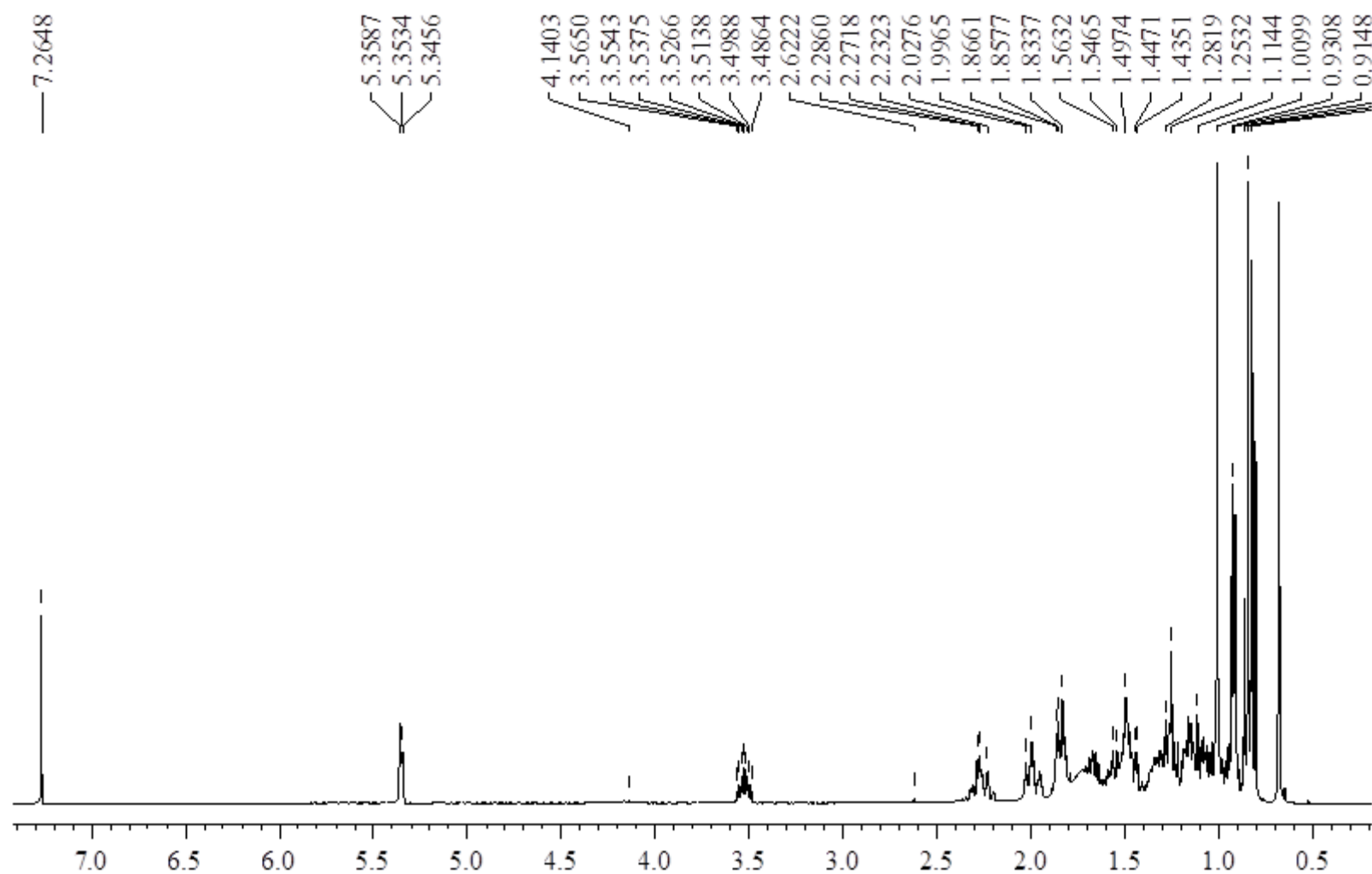
4.1.5 – Esteróide

4.1.5.1 – Identificação Estrutural da Substância XIV

O espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância XIV (Figura 4.46) isolada da fração C2-7, a partir da fração hexânica das folhas (Fluxograma 3.9, p.31), apresenta duplete largo em δ_{H} 5,34 ($J = 5,4$ Hz) atribuídos ao H-6 e um multiplete em δ_{H} 3,51 referente ao hidrogênio H-3. Os sinais presentes na região de δ_{H} 0,67-2,30 são referentes aos prótons metínicos, metilênicos e metílicos que indicam a presença de um esqueleto esteroidal. Para a confirmação da estrutura da substância foi realizado o experimento de CG-EM, onde o pico íon molecular em m/z 414 de fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, corresponde à substância β -sitosterol.



β -sitosterol (Substância XIV)

FIGURA 4.46 - Espectro de RMN ^1H da substância XIV (CDCl_3 , 400 MHz).

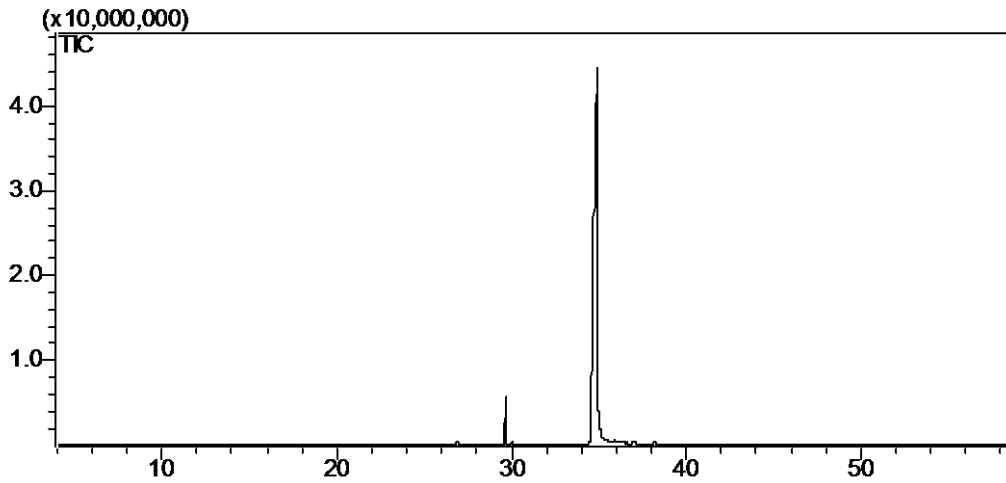


FIGURA 4.47 - Cromatograma obtido no GC-EM para a substância XIV. Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 150 °C; tempo inicial de 5,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 6 °C/min. até 280 °C, permanecendo na temperatura de 280 °C por 20,0 min.

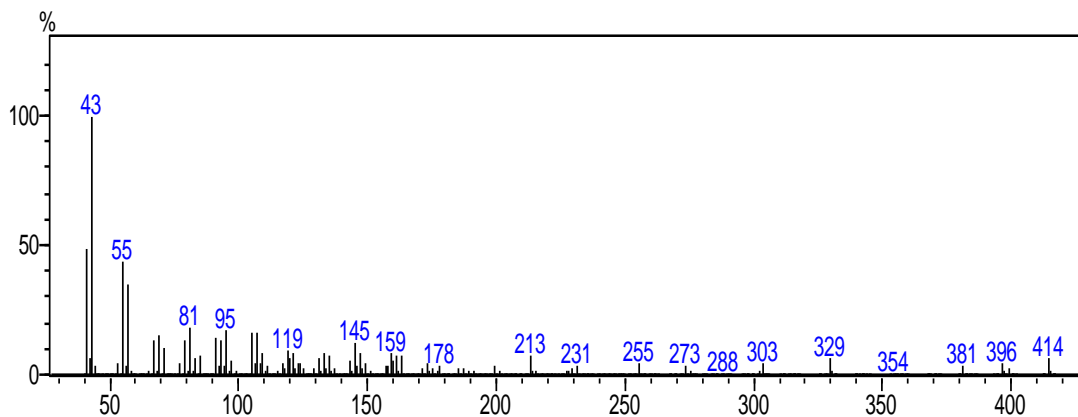


FIGURA 4.48 - Espectro de massas do β -sitosterol.

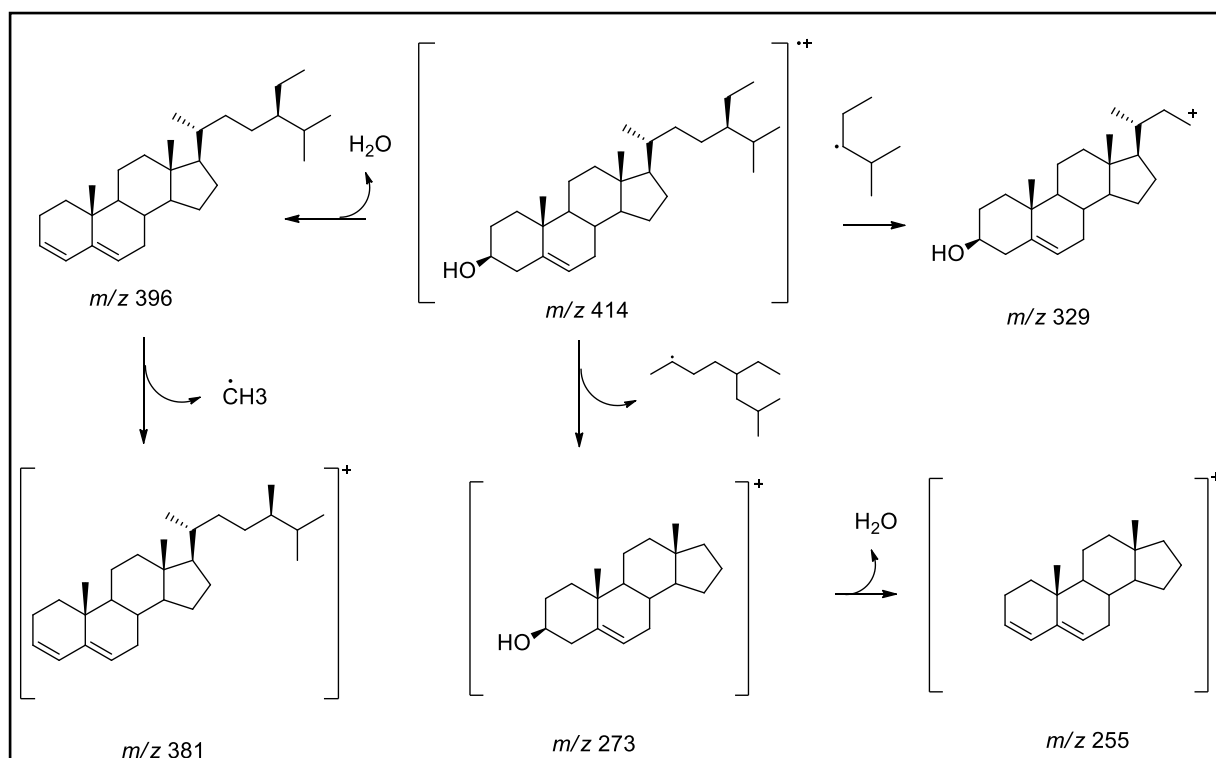


FIGURA 4.49 - Proposta de fragmentação do β -sitosterol.

4.2 – Ensaio

4.2.1 – Ensaio por Ingestão com as Operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

4.2.1.1 – Efeito dos Extratos Brutos Etanólico de *Eugenia myrcianthes* Frente às Operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Os extratos brutos etanólico das folhas (EMF) e dos galhos (EMG) de *Eugenia myrcianthes* foram ensaiados frente as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* conforme a metodologia descrita no item 3.5.4.1. Para análise dos dados obtidos foram traçadas as curvas de sobrevivência das formigas submetidas ao tratamento por ingestão dos extratos incorporados à dieta, comparando-se com a curva obtida do controle contendo apenas a dieta pura, após um período de 25 dias de experimento. Os resultados obtidos estão apresentados no Gráfico 4.1 e na Tabela 4.17.

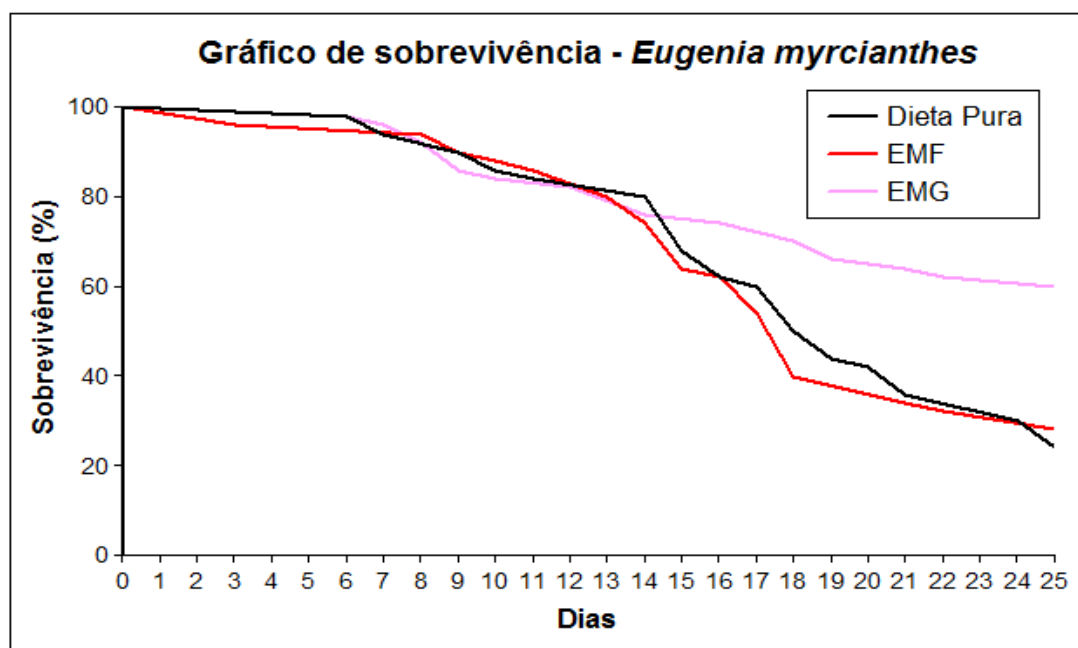


GRÁFICO 4.1 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com o extrato bruto etanólico das folhas e galhos de *E. myrcianthes*.

TABELA 4.17 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com o extrato bruto etanólico das folhas e galhos de *E. myrcianthes*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	6	14	20	40	64	76	18,5a
EMG	0	0	0	2	8	16	24	26	36	40	>25b
EMF	0	0	4	4	6	12	26	46	66	72	18a

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($p < 0,05$).

Dos resultados obtidos nos ensaios por ingestão em formigas cortadeiras, quando foi comparado o extrato EMF com o extrato EMG, observou-se que ambos não apresentaram atividade inseticida significativa sobre as operárias *Atta sexdens rubropilosa*.

4.2.1.2 – Efeito das Frações das Folhas de *Eugenia myrcianthes* Frente às Operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

As frações obtidas através da partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico das folhas de *E. myrcianthes* (EMF), foram submetidas ao ensaio por ingestão sobre as operárias de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*. Foram ensaiadas as frações hexânica (EMFh), acetato de etila (EMFa) e hidroalcóolica (EMFha). Os resultados obtidos após 25 dias de experimento foram apresentados através de curvas de sobrevivência para cada tratamento em relação ao controle, que estão apresentadas no Gráfico 4.2 e na Tabela 4.18.

Analisando os resultados obtidos, observou-se que somente a fração EMFa mostrou ser ativa frente as formigas cortadeiras, apresentando sobrevivência mediana (S_{50}) no 15º dia, e mortalidade de 90% no final do experimento. Já as frações EMFh e EMH não apresentaram atividades significativas de acordo com os dados estatísticos.

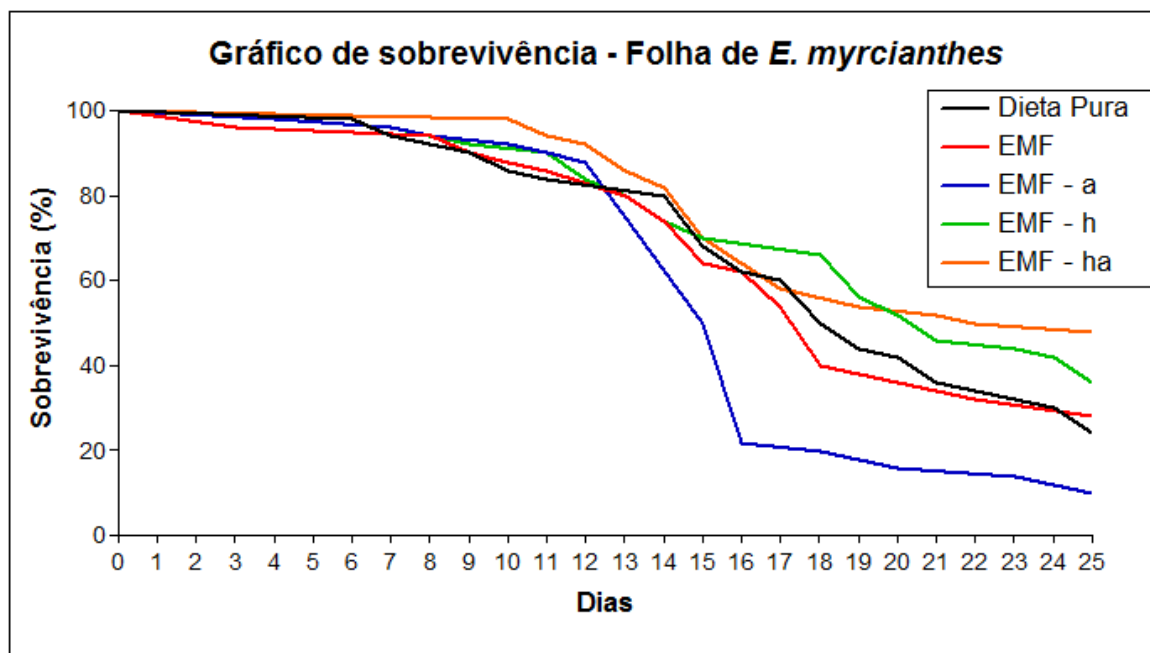


GRÁFICO 4.2 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com as frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato EMF.

TABELA 4.18 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com as frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato EMF

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	6	14	20	40	64	76	18,5 a
EMF	0	0	4	4	6	12	26	46	66	72	18a
EMFa	0	0	0	2	6	8	12	78	84	90	15b
EMFh	0	0	0	2	4	8	26	30	54	64	21a
EMFha	0	0	0	0	0	2	18	42	48	52	22b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($p < 0,05$).

4.2.1.3 – Efeito da Substância Obtida de *Eugenia myrcianthes* Frente às Operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

A substância I, Miricetrina, isolada da fração EMFa, foi a única substância pura com massa suficiente para realizar o ensaio, foi submetida ao

ensaio por ingestão sobre as operárias de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*. Para análise dos dados foram traçadas, inicialmente, as curvas de sobrevivência para o tratamento em relação ao controle. Os resultados obtidos estão apresentados em curvas de sobrevivência, no Gráfico 4.3 e na Tabela 4.19.

Para a substância ensaiada observou-se que ela não apresentou atividade inseticida significativa quando comparada com o controle. Esse resultado indica que o flavonoide glicosilado miricetrina, não apresentou potencial tóxico às operárias de formigas cortadeiras e por isso não foi considerada ativa. Porém, existem relatos na literatura de flavonoides glicosilados em altas concentrações que apresentaram atividade inseticida frente à formiga cortadeira (SUGAYAMA et al., 1997 *apud* FILHO et al., 2002; CINTRA et al., 2005). Para confirmar se a miricetrina realmente não apresenta atividade inseticida seria necessário realizar o experimento em diferentes concentrações. Outra justificativa, é que quando comparando os resultados obtidos da fração EMFa com os resultados obtidos para a substância I, propõe-se que a atividade apresentada pela fração seria consequência de efeito de sinergia, ou de algum composto em baixa concentração que não foi possível isolá-lo ou até mesmo de algum composto isolado que não possuem massa suficiente para realizar o ensaio.

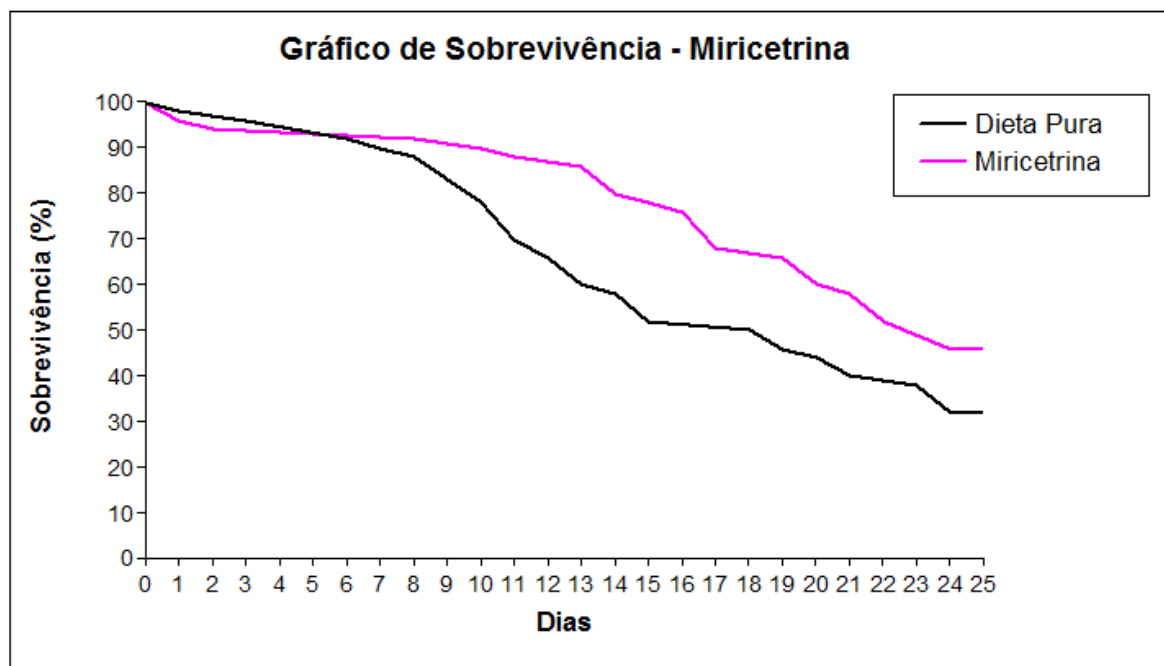


GRÁFICO 4.3 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com o flavonoide glicosilado miricetrina (substância I).

TABELA 4.19 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de tratamento por ingestão com o flavonoide glicosilado miricetrina (substância I)

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	2	2	4	8	12	22	42	48	60	68	18,5a
Miricetrina	2	6	6	6	8	10	20	32	42	54	19,5a

4.2.2 - Ensaio com o Fungo Simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*

4.2.2.1 – Atividades Inibitórias dos Extratos Brutos Etanólico de *Eugenia myrcianthes* sobre o Fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

Os extratos brutos etanólico das folhas (EMF) e dos galhos (EMG) de *Eugenia myrcianthes* foram ensaiados frente o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* conforme a metodologia descrita no item 3.5.4.2. Os experimentos com os extratos e frações foram realizados na concentração de 1000 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente.

Analisando os dados obtidos (Gráfico 4.4) observou-se que os extratos etanólicos das folhas (EMF) e dos galhos (EMG) não apresentaram resultados significativos, sendo 6% e 4%, respectivamente as inibições provocadas por eles. Mesmo apresentando um baixo poder de inibição do fungo simbionte, foi realizado o ensaio com as frações obtidas na partição líquido-líquido da amostra EMF.

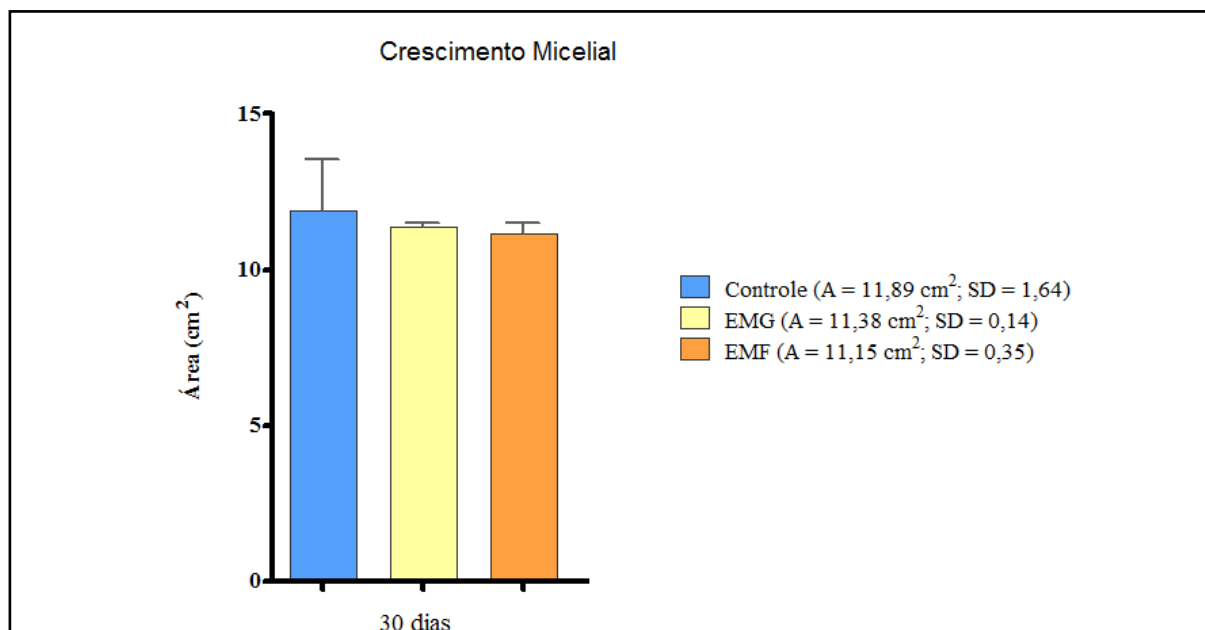


GRÁFICO 4.4 - Efeito dos extratos brutos etanólicos das folhas (EMF) e dos galhos (EMG) no crescimento micelial do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

4.2.2.2 – Atividades Inibitórias das Frações de *Eugenia myrcianthes* sobre o Fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

As frações obtidas através da partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico das folhas de *E. myrcianthes* (EMF), foram submetidas ao ensaio de inibição sobre o fungo simbiote *L. gongylophorus*. O crescimento micelial do fungo simbiote ensaiado com as frações do extrato etanólico das folhas, hexânica (EMFh) e a hidroalcóolica (EMFha) (Gráfico 4.5), apresentaram inibição de 29 % e 4 %, respectivamente, já a fração etanólica das folhas acetato de etila (EMFa) apresentou crescimento de 1 % maior que a dieta controle. Estas observações indicam que a fração rica em substâncias polares promove o crescimento do fungo, indicando baixa ação fungicida.

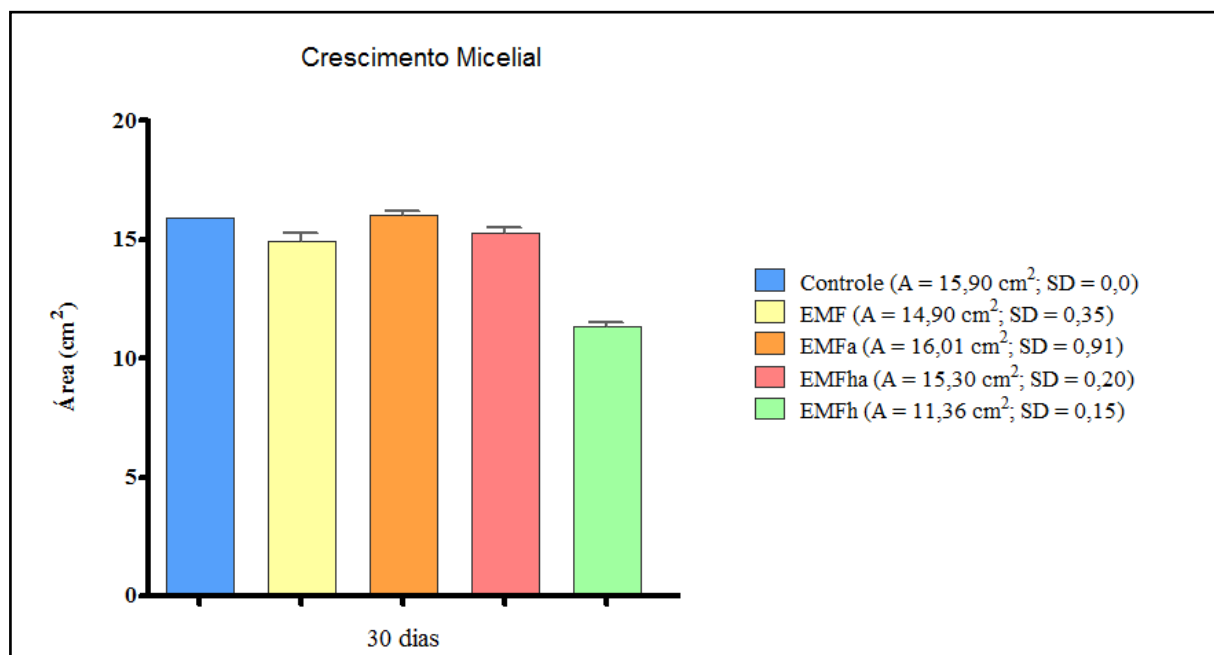


GRÁFICO 4.5 - Efeito dos extratos brutos etanólicos das folhas (EMF) e dos galhos (EMG) no crescimento micelial do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

4.2.2.3 – Atividades Inibitórias da Substância Obtida de *Eugenia myrcianthes* sobre o Fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

A substância Miricetina-3-*O*- α -L-raminosídeo (I), isolada da fração EMFa foi a única substância pura com massa suficiente para realizar o ensaio de inibição sobre o fungo simbiote *L. gongylophorus*. O experimento com esta substância foi realizado na concentração de 100 μ g/mL. O flavonoide glicosilado miricetrina apresentou inibição de 2 % sobre o fungo simbiote, mostrando atividade fungicida insignificativa (Gráfico 4.6).

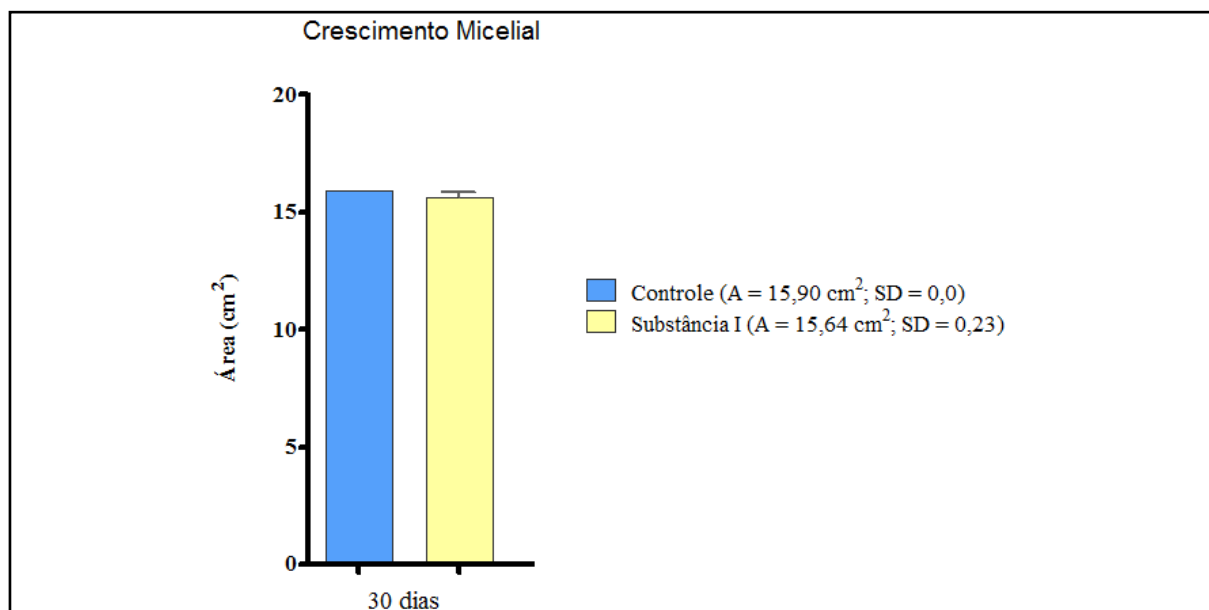


GRÁFICO 4.6 - Efeito da substância I no crescimento micelial do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

4.2.3 – Ensaio Antimicrobiano

4.2.3.1 – Ensaio Antimicrobiano do Extrato Bruto Etanólico e das Frações de *Eugenia myrcianthes*

A atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *Eugenia myrcianthes* foram testadas frente aos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Sendo três bactérias, 2 cepas Gram-negativas (*Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*) e 1 cepa Gram-positivas (*Pseudomonas aeruginosas*), e dois fungos (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*). A escolha das cepas ocorreu por serem microrganismos patógenos, ou seja, que causam sérias infecções aos seres humanos.

O ensaio antimicrobiano realizado com os antibióticos e antifúngicos mostra o comportamento dos microrganismos utilizados frente aos fármacos vancomicina para a bactéria *B. subtilis*, estreptomicina para as bactérias *P. aeruginosa* e *M. luteus*, e fluconazol para as leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Onde confirma que os fármacos utilizados como

controle positivo foram ativos contra seus respectivos microrganismos, para as concentrações testadas de 1000 a 7,81 µg/mL.

Estão apresentados na Tabela 4.20 os valores da CIM (Concentração Inibitória Mínima) para o extrato bruto e fracionado de *Eugenia myrcianthes*. A amostra EMG mostrou ação bacteriostática contra *P. aeuroginosa* (1000 µg/mL), *M. luteus* (125 µg/mL), *C. albicans* (62,5 µg/mL) e *C. tropicalis* (250 µg/mL). Já EMF também apresentou ação bacteriostática contra *C. albicans* (500 µg/mL) e *C. tropicalis* (500 µg/mL). Para a amostra EMF a foi notada ação bacteriostática contra *P. aeuroginosa* (1000 µg/mL), *M. luteus* (1000µg/mL), *C. tropicalis* (125 µg/mL) e ação bactericida contra *C. albicans* (125 µg/mL). EMFh, mostrou ação bacteriostática contra *M. luteus* (1000µg/mL) e *C. tropicalis* (250 µg/mL) e ação bactericida contra *C. albicans* (125 µg/mL). A amotra EMFha apresentou ação bacteriostática contra *M. luteus* (500µg/mL), *C. albicans* (125 µg/mL) e *C. tropicallis* (500 µg/mL).

De acordo com SANTOS et al. (2010), os extratos que apresentam CIM menor que 500 µg/mL a inibição antimicrobiana é considerada forte, entre 600 a 1500 µg/mL moderada e fraca acima de 1600 µg/mL.

TABELA 4.20 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL, para o extrato bruto e suas frações de *Eugenia myrcianthes* frente aos microrganismos

Microrganismos	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)				
	EMG	EMF	EMFa	EMFh	EMFha
<i>B. subtilis</i>	*	*	*	*	*
<i>P. aeuroginosa</i>	1000	*	1000	*	*
<i>M. luteus</i>	125	*	1000	1000	500
<i>C. albicans</i>	62,5	500	125	125	125
<i>C. tropicalis</i>	250	500	125	250	500

*Não houve atividade nas concentrações testadas (15,62 a 1000 µg/mL).

4.2.3.2 – Ensaio Antimicrobiano das Substâncias Obtidas de *Eugenia myrcianthes*

Algumas substâncias obtidas de *Eugenia myrcianthes*, como as substâncias Miricetina-3-*O*- α -L-raminosídeo (I), Miricetina-3-*O*- α -L-arabnopiranosídeo (II), Miricetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo (III), Quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo (VI), Quercetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo (VII), Xantiletina (IX) e β -sitosterol (XIV), foram testadas frente a três cepas bacterianas (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Micrococcus luteus*) e duas cepas de leveduras (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*).

Estão apresentados na Tabela 4.21 os valores da CIM (Concentração Inibitória Mínima) para as substâncias obtidas de *Eugenia myrcianthes*. As substâncias II, VI, IX e XIV mostram ação bacteriostática contra *C. albicans* com MIC de 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Somente a substância IX apresentou ação bactericida contra *C. tropicalis* (7,81 $\mu\text{g/mL}$).

Segundo RÍOS & RECIO (2005) a presença da atividade é mais interessante no caso de concentrações abaixo de 10 $\mu\text{g/mL}$ para compostos isolados.

TABELA 4.21 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$, das substâncias obtidas de *Eugenia myrcianthes* frente aos microrganismos

Microrganismos	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$)						
	I	II	III	VI	VII	IX	XIV
<i>B. subtilis</i>	*	*	*	*	*	*	*
<i>P. aeuroginosa</i>	*	*	*	*	*	*	*
<i>M. luteus</i>	*	*	*	*	*	*	*
<i>C. albicans</i>	*	250	*	500	*	62,5	500
<i>C. tropicalis</i>	*	*	*	*	*	7,81	*

*Não houve atividade nas concentrações testadas (7,81 a 500 $\mu\text{g/mL}$)

4.2.4 – Ensaio de Atividade Antioxidante

O método DPPH avalia o poder redutor do antioxidante, que ao doar elétrons se oxida (DUARTE-ALMEIDA, 2006). Os resultados da atividade antioxidante deste método foram expressos em relação à concentração eficiente do composto (CI_{50}), capaz de decrescer a concentração inicial do radical DPPH em 50%. Assim, a melhor atividade antioxidante foi atribuída aos menores valores de IC_{50} .

4.2.4.1 - Atividade Antioxidante do Extrato Bruto Etanólico e das Frações de *Eugenia myrcianthes*

Os resultados obtidos no ensaio de atividade supressora do radical DPPH estão apresentados no Gráfico 4.7 e na Tabela 4.22. A amostra que apresentou o menor valor de IC_{50} foi o extrato EMFa, com CI_{50} de 3,47 $\mu\text{g/mL}$, devido apresentar a maior concentração de flavonoides. Porém, as amostras EMG, EMF e EMFha, apresentaram valores de CI_{50} 5,97 $\mu\text{g/mL}$, 8,47 $\mu\text{g/mL}$ e 7,08 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, o que é bastante significativo por apresentar um valor baixo de CI_{50} . A atividade antioxidante da fração hexânica (EMFh) não foi significativa por apresentar um valor de IC_{50} muito alto, devido a baixa

concentração de compostos fenólicos encontrada nesta fração. Isso é devido a falta de capacidade doadora de hidrogênio dos extratos lipofílicos que dificultam a análise de seus resultados pela metodologia utilizando o DPPH.

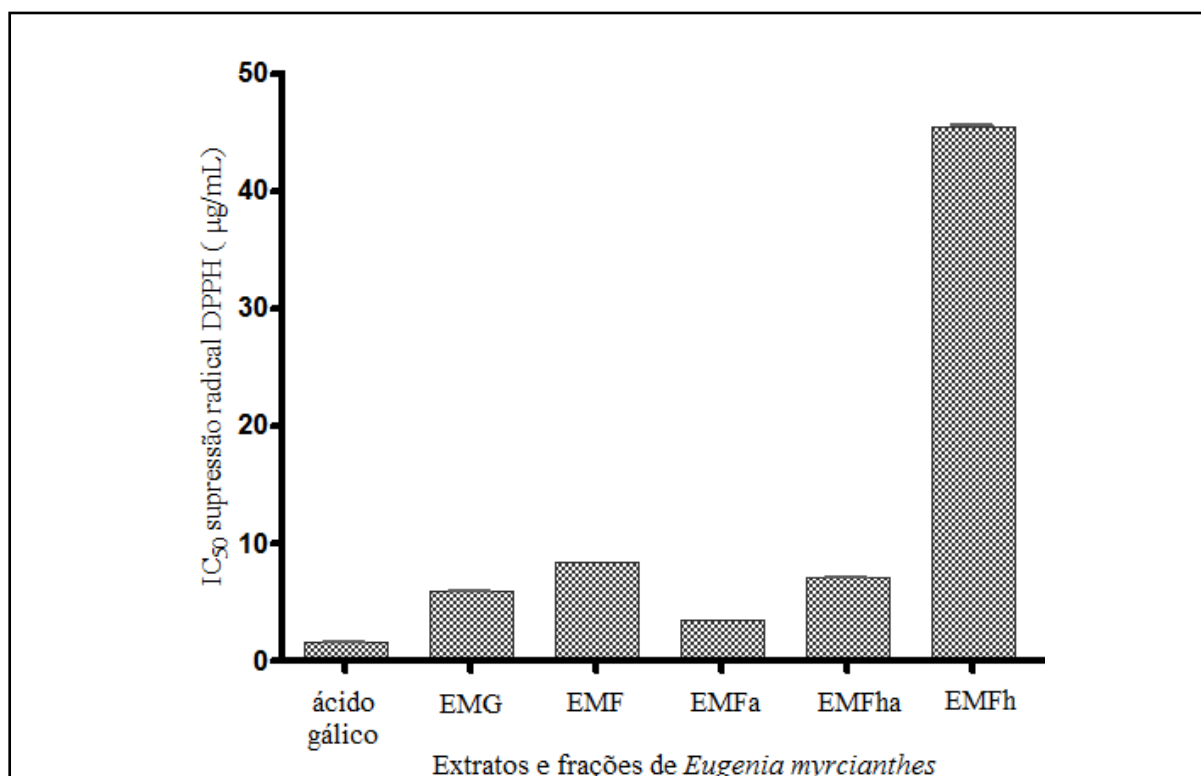


GRÁFICO 4.7 - Potencial de supressão do radical DPPH pelos extratos e partições obtidos de *Eugenia myrcianthes*, expresso em CI_{50} (média \pm desvio padrão, n=3).

TABELA 4.22 - Valores da média e desvios padrões do CI_{50} para o DPPH com extratos e partições de *Eugenia myrcianthes*

Amostra	CI_{50} (µg/mL)	Desvio padrão
Ácido Gálico	1,57	0,0574
EMG	5,97	0,0105
EMF	8,47	0,0031
EMFa	3,47	0,0000
EMFha	7,08	0,0706
EMFh	45,44	0,0980

4.2.4.2 – Atividade Antioxidante das Substâncias Obtidas de *Eugenia myrcianthes*

Foram testadas as substâncias obtidas de *E. myrcianthes*: Miricetina-3-*O*- α -L-raminosídeo (I), Miricetina-3-*O*- α -L-arabnopiranosídeo (II), Miricetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo (III), Quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo (VI), Quercetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo (VII). Os resultados obtidos no ensaio de atividade supressora do radical DPPH estão ilustrados no Gráfico 4.8 e na Tabela 4.23. A amostra que apresentou o melhor valor de CI_{50} foi a subatância I, com CI_{50} de 5,16 $\mu\text{g/mL}$. Porém, pode-se observar que todas as substâncias testadas apresentaram valores de CI_{50} bem próximos, isso ocorreu devido à semelhança estrutural entre as substâncias isoladas.

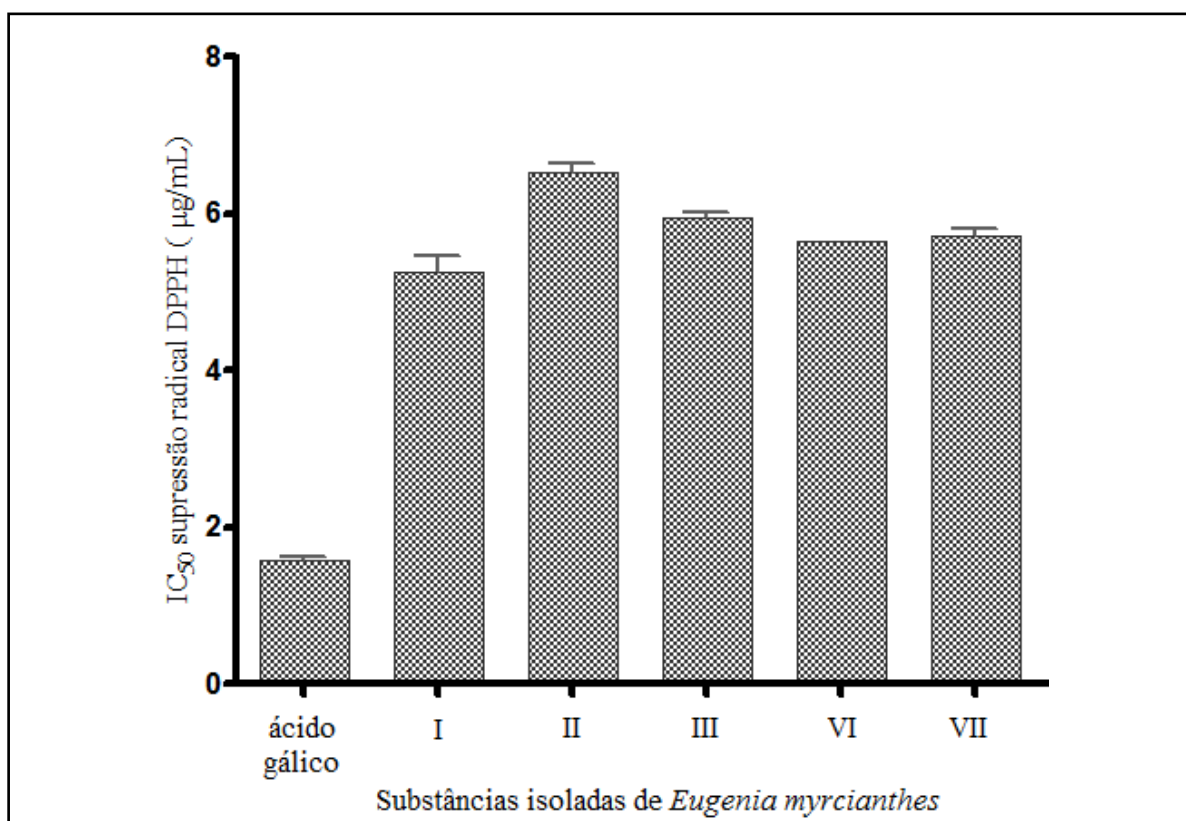


GRÁFICO 4.8 - Potencial de supressão do radical DPPH das substâncias obtidas de *Eugenia myrcianthes*, expresso em CI_{50} (média \pm desvio padrão, $n=3$).

TABELA 4.23 - Valores da média e desvios padrões do CI_{50} para o DPPH das substâncias obtidas de *Eugenia myrcianthes*

Substância	CI_{50} (($\mu\text{g/mL}$))	Desvio padrão
Ácido Gálico	1,57	0,0574
I	5,26	0,1972
II	6,53	0,1105
III	5,96	0,0706
VI	5,65	0,0000
VII	5,73	0,0947

5 – CONCLUSÕES

A partir do estudo fitoquímico realizado com a espécie de *Eugenia myrcianthes* levou ao isolamento e identificação de 14 substâncias, 10 relatadas pela primeira vez na espécie, sendo 8 flavonoides glicosilados, 1 cumarina, 2 triterpeno, 1 derivado do tirosol, 1 álcool de cadeia alifática saturada longa e 1 esteroide, contribuindo, assim, para o conhecimento do perfil químico de *E. myrcianthes*, já que existem poucos relatos na literatura sobre o estudo desta planta.

Os ensaios realizados com os extratos etanólicos brutos do galho e da folha, e as frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica das folhas, e a miricetrina frente às operárias *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* não apresentaram resultados significativos.

Os resultados obtidos do ensaio antimicrobiano foram bastante promissores quando realizados com os extratos e as frações. O extrato EMG apresentou inibição moderada contra *P. aeuroginosa* e inibição forte contra *M. luteus*, *C. albicans* e *C. tropicallis*; o extrato EMF mostrou inibição forte contra *C. albicans* e *C. tropicallis*; a fração EMFa apresentou inibição moderada contra *P. aeuroginosa* e *M. luteus*, e apresentou efeito fungicida forte para *C. albicans* e *C. tropicallis*; a fração EMFh mostrou inibição moderada para *M. luteus* e apresentou inibição forte contra *C. albicans* e *C. tropicallis* e por fim, a fração EMFha, mostrou inibição forte para *M. luteus*, *C. albicans* e *C. tropicallis*. Para substâncias isoladas somente a xantiletina, apresentou atividade bastante significativa frente ao fungo *C. tropicallis*.

O ensaio antioxidante utilizando o reagente DPPH, mostrou resultados significativos, apresentando valores baixos de CI_{50} variando entre 3,47 e 7,08, para o ensaio realizado com os extratos, frações e substâncias puras e em mistura.

É importante ressaltar que não há relatos na literatura de ensaios realizada com a planta *E. myrcianthes* sobre *A. sexdens rubropilosa*, *L.*

gongylophorus, *P. aeuroginosa*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *C. albicans*, *C. tropicallis* e ensaio de atividade antioxidante, assim reforçando a importância do estudo realizado.

O trabalho desenvolvido permitiu o acréscimo de conhecimentos para a complementação da formação acadêmica, tanto em relação às técnicas cromatográficas e determinações estruturais, quanto para a realização dos ensaios, antimicrobiano e antioxidante.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, P.K. “Carbon-13 NMR of Flavonoids”, Elsevier Sc. Publishers, Amsterdam: 444 p, 1989.
- ALLEN, H.K; DONATO, J.; WANG, H.H.; CLOUD-HANSEN, K.A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. “Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments”. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8: 251-259, 2010.
- ALMADO, R.P. “Manejo de formigas cortadeiras na Arcelormittal Florestas”. *Biológico*, 69: 133, 2007, suplemento 2.
- AL-MAMARY, M. AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. “Antioxidant Activities and Total Phenolics of Diferente Types of Honey”. *Nutr. Res.*, 22: 1041-1047, 2002
- ALMEIDA, S.S.M.S. "Estudo químico de plantas com atividade sobre insetos sociais". Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- Angiosperm Phylogeny Website. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 21 dez. 2013.
- APEL, M.A.; SOBRAL, M.; MENUT, C. BASSIERE, J-M.; ZUANAZZI, J.A.; SCHAPOVAL, E.E.S.; HENRIQUES, A.T. “Volatile constituents of four *Hexachlamys* species growing in south Brazil”. *Flavour Fragr. J.*, 20: 176-179, 2005.
- ARAGÃO, J.G. & CONCEIÇÃO, G.M. “Myrtaceae: espécies das subtribos Eugeniinae, Myrciinae, Myrtinae registradas para o estado do Maranhão”. *Rev. Sinapse Amb.*, 7-17, 2008.
- AURICCHIO, M.T. & BACCHI, E.M. “Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas”. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62: 55-61, 2003.
- AYLWARD, F.O.; CURRIE, C.R.; SUEN, G. “The evolutionary innovation of nutritional symbioses in leaf-cutter ants”. *Insects*, 3: 41-61, 2012.
- BACCI Jr., M.; SOLOMON, S.E.; MUELLER, U.G.; MARTINS, V.G.; CARVALHO, A.O.R.; VIERA, L.G.E; SILVA-PINHATI, A.C.O. “Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta fabricius* (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences”. *Mol. Phylogen. Evol.*, 51: 427-437, 2009.
- BOARETTO, M.A.C. & FORTI, L.C. “Perspectivas no controle de formigas cortadeiras”. *Série Técnica IPEF*, 11: 31-46, 1997.
- BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. “kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method”. *Lebens,-Wiss.u.-Technol*, 30: 609-615, 1997.
- BOULOGNE, I.; PETIT, P.; OZIER-LAFONTAINE, H.; DESFONTAINES, L.; LORANGER-MERCIRIS, G. “Inseticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review”. *Environ. Chem. Lett.*, 10: 325-347, 2012.

- BRANDELLI, C.L.C.; GIORDANI, R.B.; CARLI, G.A.C.; TASCA, T. “Indigenous traditional medicine: in vitro anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea”. *Parasitol Res.*, 104: 1345–1349, 2009.
- BRAVO, L. “Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance”. *Nutr. Rev.*, 56: 317-333, 1998.
- CASTILHO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; GÓMEZ, M.V.; VELDERS, A.H.; GUTIÉRREZ-HERMOSÍN, I. “Flavonol 3-*O*-glycosides seires of *Vitis vinífera* cv. petit verdot red winw grapes”. *J. Agr. Food Chem.*, 57: 209-219, 2009.
- CAZAL, M.C.; DOMINGUES, V.C.; BATALHÃO, J.B.; BUENO, O.C.; FILHO, E.R.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B. “Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ant’s symbiotic fungus, by high-speed conter-current chromatography”. *J. Chromatogr. A*, 1216: 4307-4312, 2009.
- CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. “Screening of antioxidante activity and antioixidant compounds of some edible plants of Thailand”. *Food Chem.*, 92: 491-497, 2005
- CINTRA, P.; BUENO, F.C.; BUENO, O.C.; MALASPINA, O.; PETACCI, F.; FERNANDES, J.B. “Astilbin toxicity to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae)”. *Sociobiology*, 45: 347-353, 2005.
- CONCEIÇÃO, G.M. & ARAGÃO, J.G. “Diversidade e importância econômica das Myrtaceae do cerrado, Parque Estadual do Mirador, Maranhão”. *Sci. Plena*. 6: 1-8, 2010.
- COUTINHO, I.D.; KATAOKA, V.M.F; HONDA, N.K.; COELHO, R.G.; VIERA, M.C.; CARDOSO, C.A.L. “Influência da variação sazonal nos teores de flavonoides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae”. *Rev. Bras. Farmac.*, 20: 322-327, 2010.
- COWAN, M.M. “Plants products as antimicrobial agents”. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12: 564-582, 1999.
- DELLA LUCIA, T. M. C. e VILELA, E. F. “Métodos atuais de controle e perspectivas”. In: *As formigas cortadeiras*. DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. p. 163-176.
- DEWICK, P.M. “Medicinal natural products: a biosynthetic approach”. New York: John Wiley & Sons, 3º ed., 539 p., 2009.
- DOMINGUES, E.A.; NAKAMURA, C.V.; SOUZA, M.C.; TEIXEIRA, T.S.; PEIXOTO, J.L.; SARRAGIOTTO, M.H.; VIDOTTI, G.J. “Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psoddiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae”. *Rev. Bras. Farmac.*, 20: 23-27, 2010.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. “Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistemas β -

- caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH”. *Cienc. Tecnol. Alimentos*, 26: 446-452, 2006.
- EINBOND, L.S.; REYNERTSON, K.A.; LUO, X.D.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. “Anthocyanin antioxidants from edible fruits”. *Food Chem.*, 84: 23-28, 2004.
- ERLUND, I. “Review of the flavonoids quercetin, desperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology”. *Nutr. Res.*, 24: 851-874, 2004.
- ERTHAL Jr., M.; SILVA, C.P.; SAMUELS, R.I. “Digestive enzymes in larvae of the leaf cutting ant, *Acrimyrme subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini)”. *J. Insect Physiol.*, 53: 1101-1111, 2007.
- FERNANDES, J.B. “A inversão do jogo: plantas contra saúva”. *Revista Pesquisa Fapesp*, edição 74, Abril 2002.
- FERREIRA, P.R.B.; MENDES, C.S.O.M.; REIS, S.B.; RODRIGUES, C.G.; OLIVEIRA, D.A.; MERCADANTE-SIMÕES, M.O. “Morphoanatomy, histochemistry and phytochemistry of *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae) leaves”. *J. Pharm. Res.*, 4: 942-944, 2011.
- FERREYRA, M.L.F.; RIUS, S.P.; CASATI, P. “Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications”. *Front. Plant Sci.*, 3: 1-15, 2012.
- FILHO, O.P.; DORVAL, A.; FILHO, E.B. “Preferência de saúva limão, *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae) a diferentes espécies florestais em condições de laboratório”. *Ciência Florestal*, Santa Maria, 12: 1-17, 2002.
- FILHO, W.R.; SANTOS, F.; STRAPASSON, P.; NICKELE, M.A. “Danos causados por diferentes níveis de desfolha artificial para simulação do ataque de formigas cortadeiras e *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis*”. *Pesq. Flor. Bras.*, 31: 37-42, 2011.
- FIRDOUS, S. KHAN, K.; ZIKR-UR-REHMAN, S.; ALI, Z.; SOOMRO, S.; AHMAD, V.U.; RASSHEED, M. MESAİK, M.A.; FAIZI, S. “Isolation of phytochemicals from *Cordia rothii* (Boraginaceae) and evaluation of their Immunomodulatory properties”. *Rec. Nat. Prod.*, 8: 51-55, 2014.
- FRAISSE, D.; HEITZ, A.; CARNAT, A.; CARNAT, A.-P.; LAMAISON, J.L. “Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*”. *Fitoterapia*, 71: 463-464, 2000.
- GAYOSO, C.W.; LIMA, V.T.; OLIVEIRA, E.O.; PEREIRA, F.O.; SOUZA, E.L.; LIMA, I.O.; NAVARRO, D.F. “Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol”. *Fitoterapia*, 76: 247-249, 2005.
- GODOY, M.F.P.; VICTOR, S.R.; BELLINI, A.N.; GUERREIRO, G.; ROCHA, W.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; BACCI, M.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; PAGNOCCA, F.C. “Inhibition of the

- symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins”. J. Braz. Chem. Soc., 16: 669-672, 2005.
- GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B.K.; LANDRUM, L.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L.H.; WILSON, P.G.; LUCAS, E.. “World checklist of Myrtaceae. The board of trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew”. 2005. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp/>>. Acesso em: 31 out. 2011.
- GRESSLER, E.; PIZO, M A.; MORELLATO, L.P.C. “Polinização e dispersão em Myrtaceae”. Rev. Bras. Bot., 29: 509-530, 2006.
- GUTIÉRREZ, R.M.P.; MITCHEL L.; SOLIS, R.V. “*Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology”. J Ethnopharmacol., 17: 117-127, 2008.
- HAN, M.; KIM, S.; AHN, Y. “Insecticidal and antifeedant activities of medicinal plant extracts against *Attagenus unicolor japonicus* (Coleoptera: Dermestidae)”. J. Store Prod. Res., 42: 15-22, 2006.
- HARBONE, J.B. & MABRY, T.J. “The flavonoids: advances in research”, Chapman & Hall, London: 1-131, 1982.
- HARBONE, J.B. & MABRY, T.J. “The flavonoids advances in research”, Chapman & Hall, London: p. 57-87; 336-365; 441-471; 499-536, 1994.
- HICHRI, I.; BARRIEU, F.; BOGS, J.; KAPPEL, C.; DELROT, S.; LAUVERGEAT, V. “Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway”. J. Exp. Bot., 62: 2465-2483, 2011.
- HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PASCUAL-TERESA, S. “Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidante activity”. Food Chem., 121: 691-696, 2010.
- HIROSE, M.; HAGIWARA, A.; MASUI, T.; INOUE, K.; ITO, N. “Combined effects of butylated hydroxyanisole and other antioxidants in induction of forestomach lesions in rats”. Cancer Lett., 30: 169-174, 1986.
- HOLLDOBLER, B. & WILSON, E.O. “The Ants”. Cambridge: Harvard University Press, 1990.
- HONG, N.H. “Kava root (*Piper methysticum* L.) as potencial natural herbicide and fungicide”. Crop Prot., 22: 873-881, 2003.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. “The Chemistry behind antioxidante capacity assays”. J. Agric. Food Chem., 53: 1841-1856, 2005.
- HUI, C.; QI, X.; QIANYONG, Z.; XIAOLI, P.; JUNDONG, Z.; MANTIAN, M. “Flavonoids, flavonoids subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies”. PLOS ONE, 8: 2013. Disponível em: <www.plosone.org>. Acessado em: 20 dez. 2013.
- ISIDORO, M.M.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. “Fitoquímica e quimiosistemática de *Euxylophora paraenses* (Rutaceae)”. Quím. Nova, 35: 2119-2124, 2012.

- JACCOUD, D.A.B. “Formigas cortadeiras: princípios de manejo integrado de áreas infestadas”. Ed. IBAMA, 56 p., 2000.
- Jardim Botânico UTAD - Ordem Myrtales. Disponível em: <<http://jb.utad.pt/ordem/myrtales>>. Acesso em: 21 dez. 2013.
- JAVOID, A & REHMAN, H. A. “Antifungal activity of leaf extracts of some medicinal trees against *Macrophomina phaseolina*”. J. Med. Plants Res., 5: 2868-2872, 2011.
- JAY, M; VIRICEL, M-R; GONNET, J-F. “C-glycosylflavonoids”. In: Andersen OM, Markham KR, editors. Flavonoids, chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group. p. 857 – 916, 2006.
- JUNG, P.H.; SILVEIRA, A.C.; NIERI, E.M.; POTRICH, M.; SILVA, E.R.L.; REFATTI, M. “Atividade inseticida de *Eugenia uniflora* L. e *Melia azedarach* L. sobre *Atta laevigata* Smith”. Floresta Ambient., 20: 191-196, 2013.
- JUSTI-JUNIOR, J.; IMENES, S.L.; BERGMANN, E.L.; CAMPOS-FARINHA, A.E.C.; ZORZENON, F.J. “Formigas Cortadeiras”. Bol. Técn. Inst. Biol., 4: 5-31, 1996.
- JUTIVIBOONSUK, A.; ZHANG, H-J.; KONDRATYUK, T.P.; HERUNSALEE, A.; CHAUKUL, W.; PEZZUTO, J.M.; FONG, H.H.S.; BUNYAPRAPHATSARA, N. “Isolation and characterization of cancer chemopreventive compounds from *Barringtonia maunwoyathiae*”. Pharm. Biol., 45: 185-194, 2007.
- KALEGARI, M.; MIGUEL, M.D.; DIAS, J.F.G.; LORDELLO, A.L.L.; LIMA, C.P.; MIYAZAKI, C.M.S.; ZANIN, S.M.W.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, O.G. “Phytochemical constituents and preliminar toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae)”. Braz. J. Pharm. Sci., 47: 636-642, 2011.
- KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. Phytochem., 62: 229-237, 2003.
- KRAUS, C.N. “Low hanging fruit in infectious disease drug development”. Curr. Opin. Microbiol., 11: 434-438, 2008.
- KUMAR, U.S.; TIWARI, A.K.; REDDY, S.V.; APARNA, P.; RAO, R.J.; ALI, A.Z.; RAO, J.M. “Free-radical-scavenging and xanthine oxidase inhibitory constituents from *Stereospermum personatum*”. J. Nat. Prod., 68: 1615-1621, 2005.
- KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; MORALES, M.T.; FETT, R. “Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas”. Cienc. Rural, 36: 1283-1287, 2006.
- LANDRUM, L.R. & KAWASAKI, M.L. “The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys”. Brittonia. 49: 508-536, 1997.

- LORCA, G.G.; AMAT, A.G.; GONZÁLEZ, C. “Análises comparativo de caracteres diagnósticos para la identificación de tres especies argentinas de Myrtaceae empleadas en la medicina popular”. *Acta Farm. Bonaerense*, 14: 81-86, 1995.
- LORENZI, H.; SARTORI, S.F.; BACHER, L.B.; LACERDA, M.T.C. “Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (consumo in natura)”. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, Nova Odessa – SP, 2006.
- LUCAS, E.J.; HARRIS, S.A.; MAZINE, F.F.; BELSHAM, S.R.; NIC LUGHADHA, E.M.; TELFORD, A.; GASSON, P.E; CHASE, M.W. “Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales)”. *Taxon*, 56: 1105-1128, 2007.
- LUQMAN, L.; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, R.; MAURYA, A.K.; CHANDA, D. “Experimental assesment of *Morinda oleífera* leaf and fruit dor its antistress, antioxidant, and scavenging potential using *in vitro* and *in vivo* assays”. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2012/519084>>. Acesso em: 09 jul. 2013.
- MADIKIZELA, B.; ADEROGBA, M.A.; STADEN, J.V. "Isolation and characterization of antimicrobial constituents of *Searsia chirindensis* L. (Anacardiaceae) leaf extracts”. *J. Ethnopharmacol.*, 150: 609-613, 2013.
- MAHMOUD, T.S.; MARQUES, M.R.; PESSOA, C.O.; LOTUFO, L.V.C.; MAGALHÃES, H.I.F.; MORAES, M.O.; LIMA, D.P.; TININIS, A.G.; OLIVEIRA, J.E.. “*In vitro* cytotoxic activity of Brazilian middle west plant extracts”. *Braz. J. Pharmacog.*, 21: 456-464, 2011.
- MARINHO, C.G.S.; DELLA LUCIA, T.M.C.; PICANÇO, M.C. “Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras”. *Bahia Agríc.*, 7: 18-21, 2006.
- MEHDIABADI, N.J. & SCHULTZ, T.R. “Natural history and phylogeny of the fungus-framing ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini)”. *Myrmecol. News*, 13: 37-55, 2009.
- MISHIRA, B.B. & TIWARI, V.K. “Natural products: an evolving role in future drug discovery”. *Eur. J. Med. Chem.*, 46: 4769-4807, 2011.
- MIYASHIRA, C.H.; TANIGUSHI, D.G.; GUGLIOTTA, A.M.; SANTOS, D.Y.A.C. “Influence of caffeine on the survival of leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* and *in vitro* growth of their mutualistic fungus”. *Pest. Manag. Sci.*, 68: 935-940, 2012.
- MOUTINHO, P.; NEPSTAD, D.C.; DAVIDSON, E.A. “Influence of leaf-cutting ant nest on secondary forest growth and soil properties in Amazônia”. *Ecology*, 84: 1265-1276, 2003.
- NICKELE, M.A.; PIE, M.R.; FILHO, W.R.; PENTEADO, S.R.C. “Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras”. *Pesq. Florestal Bras.*, 33: 53-72, 2013.

- NILE, S.H.; KHOBRADE, C.N.; PARK, S.W. “Optimized and comparative antioxidant assays and its applications in herbal and synthetic drug analysis as na antioxidants”. *Mini Rev. Med. Chem.*, 12: 1007-1014, 2012.
- NORTH, R.D.; JACKSON, C.W.; HOWSE, P.E. “Evolutionary aspects of antifungus interactions in leaf-cutting ants”. *Trends Ecol. Evol.*, 12: 386-389, 1997.
- OSBORN, E.M. On the occurrence of antibacterial substances in green plants. *British J. Exp. Pathol.*, 24: 227-231, 1943.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. “Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*”. *Food Control*, 18: 414-420, 2007.
- PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. “Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive methods for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*”. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46: 2720-2722, 2002.
- PEPATO, M.T.; MORI, D.M.; BAVIERA, A.M.; HARAMI, J.B.; VENDRAMINI R.C.; BRUNETTI, I.L. “Fruit of the jambolão tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes”. *J. Ethnopharmacol.*, 96: 43-48, 2005.
- PETERNELLI, E.F.O.; DELLA-LUCIA, T.M.C.; MARTINS, S.V. “Espécies de formigas que interagem com as sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae)”. *Rev. Árvore*, 28: 733-738, 2004.
- PETERNELLI, E.F.O.; BARBOSA, L.C.A.; DELLA-LUCIA, T.M.C. "Isolation of compounds attractive to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) from *Mabea fistulifer* ELAIOSOME". *Quím. Nova*, 31: 475-478, 2008.
- PETERSON, J. & DWYER, J. “Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity”. *Nutr. Res.*, 18: 1995-2018, 1998.
- POURGHOLAMI, M.H.; KAMALINEJAD, M.; JAVADI, M.; MAJZOOB, S.; SAYYAH, M. “Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice”. *J. Ethnopharmacol.*, 64: 167-171, 1999.
- REIS FILHO, W.; IEDE, E.T.; NICKELE, M.A.; CALDATO, M.; FERREIRA, A.C. “Reconhecimento dos danos causados por formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em plantios iniciais de *Pinus taeda* no Sul do Brasil”. *Comunicado Técnico 189 – Embrapa*, p 1-4, 2007.
- RICHARD, F.-J.; MORA, P.; ERRARD, C.; ROULAND, C. “Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of theirs fungal cultivar to the degradation of plant material”. *J. Comp. Physiol. B.*, 175: 297-303, 2005.
- RÍOS, J.L. & RECIO, M.C. “Medicinal plants and antimicrobial activity”. *J. Ethnopharmacol.*, 100: 80-84, 2005.

- RODRIGUES, E.D.; SILVA, D.B.; OLIVEIRA, D.C.R.; SILVA, G.V.J. "DOSY NMR applied to analysis of flavonoid glycosides from *Bidens sulphurea*". Magn. Reson. Chem., 47: 1095-1100, 2009.
- ROMAGNOLO, M.B. & SOUZA, M.C. "Os gêneros *Calycorectes* O. Berg, *Hexachlamys* O. Berg, *Myrcianthes* O. Berg, *Myrciaria* O. Berg e *Plinia* L. (Myrtaceae) na planície alagável do alto rio Paraná, Brasil". Acta Bot. Bras., 18: 613-627, 2007.
- ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. "Atividade Antioxidante de Frutas do Cerrado". Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27: 53-60, 2007.
- SANTOS, J.C.; OLIVEIRA, C.A.N.; VARELLA, L. MATOS, A.P.; TEREZAN, A.P.; LEITE, A.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F. "Constituintes químicos e atividade antimicrobiana dos extratos de *Dilodendron bipinnatum* (SAPINDACEAE)". Quím. Nova, 33: 2080-2082, 2010.
- SANTOS, R.M.; FORTES, G.A.C.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. "Influence of foliar nutrients on phenol levels in leaves of *Eugenia uniflora*". Braz. J. Pharmacogn., 21: 581-586, 2011.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. & ZUNIGA, J. "Xanthine oxidase inhibitory activity of flavonoids and tannins from *Hexachlamys edulis* (Myrtaceae)". Phytother. Res., 10: 160-162, 1996.
- SIES, H. "Strategies of antioxidante defense". Eur. J. Biochem., 215: 213-219, 1993.
- SILVA, A.; BACCI Jr., M.; SIQUEIRA, C.G.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A. "Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources". J. Insect Physiol., 49: 307-313, 2003.
- SHARMA, S.B.; NASIR, A.; PRABHU, K.M.; MURTHY, P.S. "Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus". J. Ethnopharmacol., 104: 367-373, 2006.
- SHARMA, B.; VISWANATH, G.; SALUNKE, R.; ROY, P. "Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice". Food Chem., 110: 697-705, 2008.
- SHEN, C-J.; CHEN, C-K.; LEE, S-S. "Polar constituents from *Sageretia thea* leaf characterized by HPLC-SPE-NMR assisted approaches". J. Chinese Chem. Soc., 56: 1002-1009, 2009.
- SOUZA, A.; ZANETTU, R.; CALEGARIO, N. "Nível de dano econômico para formigas-cortadeiras em função do índice de produtividade florestal de eucaliptais em uma região de mata Atlântica". Neotrop. Entomol., 40: 483-488, 2011.
- THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; HIRSCHMANN, G.S. "Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan myrtaceae". J. Ethnopharmacol., 24: 179-183, 1988.

- VALLILO, M.I.; BUSTILLOS, O.V.; AGUIAR, O. T. “Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg – Myrtaceae”. Rev. Inst. Flor., 18: 15-22, 2006.
- VUKICS, V. & GUTTMAN, A. “Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry”. Mass Spectr., 29: 1-6, 2010.
- WANG, S-P. & HUANG, K-J. “Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis”. J. Chromatogr. A, 1032: 273-279, 2004.
- WILLIAMS, C.A. “Flavone and flavonol O-glycosides”. In: Andersen OM, Markham KR, editors. Flavonoids, chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group. pp. 749 – 856, 2006.
- YANG, L-L.; LEE, C-Y.; YEN, K-Y. “Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells”. Cancer Lett., 157: 65-75, 2000.
- YOO, C.; HAN, K.; HA, J.; PARK, H.; NAM, J.; KIL, U.; LEE, K. “Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells”. Cancer Lett., 225: 41-52, 2005.
- ZHANG, Y.; JIAO, J.; LIU, C.; WU, X.; ZHANG, Y. “Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography”. Food Chem., 107: 1326-1336, 2008.