

CRISTIAN ALDEMAR GASCA SILVA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
*Eugenia dysenterica* Mart. ex. DC. Berg (Myrtaceae).

BRASÍLIA

2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CRISTIAN ALDEMAR GASCA SILVA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
*Eugenia dysenterica* Mart. ex. DC. Berg (Myrtaceae).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da  
Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de  
Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Dâmaris Silveira

BRASÍLIA

2016

CRISTIAN ALDEMAR GASCA SILVA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
*Eugenia dysenterica* Mart. ex. DC. Berg (Myrtaceae).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dâmaris Silveira (presidente)  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yris Maria Fonseca Bazzo  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Lucília dos Santos  
Instituto de Química da Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni (suplente)  
Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho a Deus, meus familiares e aos meus amigos, cujo apoio reflete em cada uma das minhas realizações.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me oferecer esta experiência de vida. Por me dar forças e coragem na tomada de decisões que envolveram, inclusive, o afastamento dos meus entes queridos. Agradeço ter me possibilitado conhecer esse grupo de pessoas maravilhosas no Brasil que hoje são grandes amigos.

A minha família, especialmente meus pais Ana e Aldemar, meus irmãos Bladimir, Danilo, bem como meu primo Freiman, que são minha motivação para continuar na luta de superação pessoal e profissional.

À professora Dâmaris, que com uma simples mensagem, aceitou me orientar no mestrado sem ter me conhecido previamente. Obrigado por acreditar em mim e ter me permitido fazer parte de sua família de pesquisa.

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais (LaProNat): Pérola, Yris, e Maurício, por seu apoio incondicional e orientação.

Aos integrantes da banca examinadora, seus comentários contribuíram no enriquecimento da presente dissertação.

À professora Lucília, bem como os estudantes Saulo e Leandro, por abrir as portas do seu laboratório, Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas (LITMO) do Instituto de Química da UnB, onde foram identificadas as moléculas reportadas neste trabalho.

A professora Catarina e o seu estudante e grande amigo William Castillo, por ter me recebido no seu grupo de pesquisa. A experiência no Laboratório de Genética (Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto) foi uma oportunidade de aprendizagem maravilhosa para meu desempenho profissional.

Aos membros da banca por ter dedicado parte de seu tempo na avaliação desta dissertação.

Ao Denis por sua contribuição na revisão final da dissertação.

Aos meus colegas e amigos do LaProNat, especialmente Patrícia, Michelle, Diegue e Marline, que com seu companheirismo fizeram da UnB minha segunda casa. Obrigado por sua colaboração e paciência.

A esse grupo maravilhoso de amigos que fizeram da minha experiência no Brasil uma aventura inesquecível: Lais, Nicole, Fernanda, Zita, Isabela, Natalia, Élida, Josimar, Rodrigo, Gustavo, Junior e Anderson.

Aos estagiários e técnicos da Central Analítica do Instituto de Química da UnB, especialmente Matheus e Luiz, que dedicaram parte do seu tempo para à análise das minhas amostras por CG-MS e RMN.

Ao Matheus, novo integrante e PIBIC do LaProNat, que com sua dedicação contribuiu no estudo do extrato hexânico da planta.

Aos meus amigos colombianos: Elena, Vianny, Vanesa, Wilson, Manuel, José, Janeth, Ángela, Jemid, Yesenia e Francisco. As palavras de apoio na distância me mantiveram focado para cumprir com mais um projeto da minha vida.

Ao Grupo Poliglota de Brasília, especialmente Maria Fernanda, Emeline, Soledad, pelo abraço paternal na minha chegada em Brasília e por me considerar parte de sua família.

Ao Decanato de Pesquisa e Pós-graduação (DPP) da UnB pelo apoio financeiro para participar do Congresso Phytopharm (Bonn-Alemanha).

A CAPES pela bolsa de mestrado durante os dois anos de estudo.

Ao CNPq e FAPDF pelo suporte financeiro por meio do apoio financeiro recebido da Rede Pró Centro-Oeste, Edital 31/2010 CNPQ, subprojeto coordenado pela Profa Dra Pérola Magalhães, processo CNPq 564208/2010-8 e processo FAPDF 193.000.484/2011.

*Esta dissertação se enquadra no projeto Levantamento etnobotânico e biomonitoramento químico de plantas e microorganismos do Cerrado e Pantanal com atividade farmacológica. Projeto vinculado a Rede Pró Centro-Oeste, financiado pelo Edital 31/2010 CNPQ, processo CNPq 564208/2010-8 e processo FAPDF 193.000.484/2011.*

*“Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”*

(Sarah Westphal)



## RESUMO

GASCA, Cristian. **Contribuição ao estudo químico e de atividade biológica de *Eugenia dysenterica* Mart. ex. DC. Berg (Myrtaceae)**. Brasília, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Esta dissertação contribui para o estudo químico e de atividade biológica dos extratos aquoso e hexânico das folhas de *Eugenia dysenterica* Mart. ex. DC. *Eugenia dysenterica*, pertencente à família Myrtaceae, é uma árvore nativa do Cerrado, conhecida popularmente como cagaita ou cagaiteira e que deve seu nome à propriedade laxativa do fruto. O estudo químico do extrato aquoso das folhas levou ao isolamento e identificação de dois flavonoides, quercetina e catequina. As estruturas foram estabelecidas por ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  (600 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz), DEPT, espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-VIS) e espectrometria de infravermelho (IV). Os dados espectroscópicos foram comparados com os dados da literatura. Embora os flavonoides tenham sido descritos nas folhas da planta é a primeira vez que são isolados a partir de folhas de cagaita. O estudo químico do extrato hexânico levou à identificação de quatro triterpenos pentacíclicos ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, neolupenol e gammacer-16-en-3 $\beta$ -ol), e  $\alpha$ -tocoferol ou vitamina E. As estruturas destes compostos foram confirmadas por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , espectrometria de IV, espectrometria de UV-VIS e CG-EM. Quanto à atividade biológica, foi avaliada a viabilidade de células de neuroblastoma humano (linhagem celular SH-SY5Y) quando expostas ao extrato aquoso. O extrato aquoso se mostrou citotóxico a concentrações acima de 7,8  $\mu\text{g/mL}$ . Para o mesmo extrato, foi avaliada a capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), mostrando uma atividade inibitória baixa ( $\text{CI}_{50} = 155,20 \pm 2,09$ ) quando comparado com o padrão fisostigmina ( $\text{CI}_{50} = 18,69 \pm 0,07$   $\mu\text{g/mL}$ ). O extrato hexânico assim como suas frações não se mostraram ativos contra algumas espécies de fungos e bactérias pertencentes aos gêneros *Candida* e *Staphylococcus*, respectivamente. Este estudo se constitui no primeiro registro de triterpenos identificados nas folhas de *E. dysenterica*.

Palavras chave: *Eugenia*; triterpenos; flavonoides; acetilcolinesterase; Cerrado.

## ABSTRACT

GASCA, Cristian. **Contribution to chemical study and biological activity of *Eugenia dysenterica* Mart. ex. DC. Berg (Myrtaceae)**. Brasília, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

The present dissertation contributes to chemical study and the biological activity of aqueous and hexane extracts of leaves of *Eugenia dysenterica* Mart. ex. DC. *Eugenia dysenterica* is a native tree which belongs to the Myrtaceae family that occurred in the Cerrado biome. The plant is popularly known as “cagaita” or “cagaiteira” and gets its name from the laxative property of the fruit. The chemical study of the aqueous extract led to the isolation and identification of two flavonoids, quercetin and catechin. The structures were established by  $^1\text{H}$  (600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) nuclear magnetic resonance (NMR), distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT), ultraviolet–visible spectroscopy (UV-VIS) and infrared spectroscopy (IR). The spectroscopic data were compared with literature reports. Although these flavonoids have been described in the plant, this is the first report of the isolation from leaves of cagaita. The chemical study of the hexane extract leads to the identification of four triterpenes ( $\alpha$ -amyrine,  $\beta$ -amyrine, neolupenol and gammacer-16-en-3 $\beta$ -ol) and  $\alpha$ -tocopherol. The structures were established by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, UV-VIS, IR and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). All data were submit to literature data comparison. Related to biological activity, it was evaluated the cell viability of the human neuroblastoma cells (cell line SH-SY5Y) when exposed to aqueous extract of cagaita, proving to be cytotoxic at concentrations higher than 7.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The extract also was evaluated the capability of inhibit the enzyme acetylcholinesterase. Results showed a relatively low acetylcholinesterase inhibitory activity ( $\text{IC}_{50}$  155.20 $\pm$ 2.09) compared to the standard physostigmine ( $\text{IC}_{50}$  18.69 $\pm$ 0.07  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The hexane extract, as well as their fractions, were not active against certain fungi and bacteria species belonging to the genus *Candida* and *Staphylococcus* respectively. As far as we know, this is the first report of triterpenes identified from leaves of *E. dysenterica*.

Keywords: Eugenia; triterpenes; flavonoids; acetylcholinesterase; Cerrado.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. <i>Eugenia dysenterica</i> . <b>A.</b> Árvore <b>B.</b> Folhas; <b>C.</b> Flores; <b>D.</b> Galhos, folhas e frutos. ....      | 22 |
| Figura 2. Compostos identificados em <i>E. dysenterica</i> .....   | 24 |
| Figura 3. Inibidores clássicos da AChE de origem sintética e natural. ....   | 28 |
| Figura 4. Fundamentação química do método de Ellman. ....  | 42 |
| Figura 5. Clivagem do sal de tetrazólio a formazam. ....   | 45 |
| Figura 6. Representação esquemática da metodologia empregada no estudo.....  | 49 |
| Figura 7. CCD comparativa das frações e os padrões de triterpenos. ....  | 52 |
| Figura 8. Padrões de triterpenos usados na CCD.....  | 53 |
| Figura 9. CCD comparativa das subfrações obtidas na pré-purificação de EDE e EDG. ....   | 55 |
| Figura 10. Estrutura química dos compostos separados e identificados por CG-EM no extrato hexânico de <i>E. dysenterica</i> . ....       | 58 |
| Figura 11. Espectro de infravermelho da fração EDE .....   | 61 |
| Figura 12. Espectro de massas dos picos correspondentes a $\alpha$ -amirina (parte superior) e a $\beta$ -amirina (parte inferior). .... | 63 |
| Figura 13. Proposta de fragmentação para os triterpeno $\alpha$ -amirina (lado esquerdo) e $\beta$ -amirina (lado direito). ....         | 64 |
| Figura 14. Espectro de massas do pico correspondente ao gammacer-16-en-3 $\beta$ -ol. ....   | 65 |
| Figura 15. Proposta de fragmentação para o triterpeno gammacer-16-en-3 $\beta$ -ol. ....   | 65 |
| Figura 16. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da subfração EDD (150 MHz, DMSO - $d_6$ ).....   | 66 |
| Figura 17. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da subfração EDD (600 MHz, DMSO - $d_6$ ).....  | 67 |
| Figura 18. Espectro de massas do pico correspondente ao neolup-12-en-3 $\beta$ -ol .....   | 70 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 19. Proposta de fragmentação para o triterpeno neolup-12-en-3 $\beta$ -ol.....  | 70 |
| Figura 20. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da fração EDE (150 MHz, DMSO - d <sub>6</sub> ).....                           | 71 |
| Figura 21. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da subfração EDE (600 MHz, DMSO - d <sub>6</sub> ) .....                        | 72 |
| Figura 22. Espectro de massas do pico correspondente ao $\alpha$ -tocoferol.....   | 75 |
| Figura 23. Proposta de fragmentação para o $\alpha$ -tocoferol. ....   | 76 |
| Figura 24. Espectro de massas do pico correspondente ao acetil tributil citrato. ....  | 77 |
| Figura 25. Proposta de fragmentação para o acetil tributil citrato. ....   | 77 |
| Figura 26. Espectro de ultravioleta (UV) de FaqG.....  | 80 |
| Figura 27. Núcleo estrutural básico de um flavonoide.....  | 80 |
| Figura 28. Espectro de Infravermelho de FaqG. ....   | 82 |
| Figura 29. Espectro RMN de <sup>13</sup> C de FaqG (150 MHz, DMSO - d <sub>6</sub> ).....                                    | 83 |
| Figura 30. Expansão do espectro RMN de <sup>13</sup> C na região 98-160 ppm de FaqG (150 MHz, DMSO - d <sub>6</sub> ) .....  | 84 |
| Figura 31. Expansão do espectro RMN de <sup>13</sup> C na região 24-96 ppm de FaqG (150 MHz, DMSO - d <sub>6</sub> ) .....   | 85 |
| Figura 32. Espectro DEPT 135 de FaqG (600 MHz, DMSO - d <sub>6</sub> ).....  | 86 |
| Figura 33. Espectro RMN de <sup>1</sup> H de FaqG (600 MHz, DMSO - d <sub>6</sub> ) .....                                    | 87 |
| Figura 34. Expansão do espectro RMN de <sup>1</sup> H de FaqG (600 MHz, DMSO - d <sub>6</sub> ).....                         | 88 |
| Figura 35. Compostos de tipo flavan-3-ol.....  | 89 |
| Figura 36. Espectro de ultravioleta (UV) de FaqH.....  | 92 |
| Figura 37. Espectro infravermelho de FaqH.....   | 94 |
| Figura 38. Espectro RMN de <sup>13</sup> C de FaqH (150 MHz, DMSO - d <sub>6</sub> ) .....                                   | 95 |
| Figura 39. Expansão do Espectro RMN de <sup>13</sup> C na região 177-136 ppm de FaqH (150 MHz, DMSO - d <sub>6</sub> ) ..... | 96 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 40. Expansão do Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ na região 195-94 ppm de FaqH (150 MHz, DMSO - $d_6$ ) .....  | 97  |
| Figura 41. Espectro RMN de $^1\text{H}$ de FaqH (600 MHz, DMSO - $d_6$ ).....   | 98  |
| Figura 42. Expansão do espectro RMN de $^1\text{H}$ de FaqH (600 MHz, DMSO - $d_6$ ) .....  | 99  |
| Figura 43. Viabilidade celular das células de neuroblastoma SH-SY5Y quando expostas ao extrato aquoso de Cagaita. ....  | 102 |
| Figura 44. Curva dose-resposta da fisostigmina, quercetina e catequina (lado direito) e o extrato aquoso de <i>Eugenia dysenterica</i> (lado esquerdo) sobre a atividade da AChE..... | 103 |

## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 1. Condições cromatográficas do CG-EM utilizado na análise das frações obtidas por CC .....   | 37  |
| Tabela 2. Condições cromatográficas experimentais da separação do EAQ em coluna de Sephadex LH-20.....                                     | 41  |
| Tabela 3. Porcentagem de rendimento das pré-frações do extrato hexânico de folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> .....                      | 50  |
| Tabela 4. Frações obtidas da Fhex/AcOEt por CC. ....   | 51  |
| Tabela 5. Fator de retenção (Rf) das frações e padrões de triterpenos. ....  | 52  |
| Tabela 6. Subfrações obtidas na pré-purificação por CC das frações EDE e EDG. .  | 55  |
| Tabela 7. Fator de retenção (Rf) das subfrações obtidas por CC de EDE e EDG. ...   | 55  |
| Tabela 8. Resultado da análise por CG-EM das subfrações de <i>Eugenia dysenterica</i> .....  | 59  |
| Tabela 9. Ocorrência dos compostos identificados nas diferentes frações.....   | 60  |
| Tabela 10. Dados experimentais e teóricos de RMN de <sup>13</sup> C para alguns triterpenos pentacíclicos.....                             | 68  |
| Tabela 11. Exemplo de linhagens celulares neoplásicas sensíveis a alguns grupos de triterpenos. ....                                       | 74  |
| Tabela 12. Rendimento e tempo de retenção das frações da partição do EAQ de folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> . ....                    | 78  |
| Tabela 13. Constante de acoplamento (J) para compostos de tipo flavan-3-ol (WILHELM, 2008).....  | 90  |
| Tabela 14. Dados de RMN de <sup>1</sup> H, RMN de <sup>13</sup> C e DEPT de FaqG em comparação com os dados reportados na literatura*..... | 91  |
| Tabela 15. Dados RMN de <sup>1</sup> H e RMN de <sup>13</sup> C do composto FaqH.....  | 100 |
| Tabela 16. Porcentagem de inibição do extrato aquoso, dos compostos isolados (catequina e quercetina) e do padrão fisostigmina.....        | 103 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\delta$  – deslocamento químico  
%R - porcentagem de rendimento  
**A $\beta$**  - beta amiloide  
**AcOEt** - acetato de etila  
**Acetil-CoA** - acetilcoenzima A  
**ACh** - acetilcolina  
**AChE** - Acetilcolinesterase  
**AChEi** - inibidores da acetilcolinesterase  
**ANOVA** - análise de variância  
**ATBC** - Acetil tributil citrato  
**ATCC** - *American Type Culture Collection*  
**ATCh** - Acetiltiocolina  
**ATCI** - iodeto de acetiltiocolina  
**BuChE** - butirilcolinesterase  
**CC** - cromatografia em coluna  
**CCD** - cromatografia em camada delgada  
**CG-EM** - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas  
**Cl<sub>50</sub>** - concentração necessária para 50% da atividade máxima inibitória  
**CIM** - concentração inibitória mínima  
**CLAE-EM** - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas  
**DA** - doença de Alzheimer  
**dd** - duplo duplete  
**DEPT** - distortionless enhancement by polarization transfer  
**DMSO** – dimetilsulfóxido  
**DTNB** - Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)  
**EAQ** - Extrato aquoso  
**EHX** - Extrato hexânico  
**HC** – Hidrato de catequina  
**IV** - infravermelho  
**J** - constante de acoplamento  
**M<sup>+</sup>** - Íon molecular  
**NCCLS** - National Committee for Clinical Laboratory Standards  
**NIST** - National Institute of Standards and Technology  
**NP/PEG** - reagente polietilenoglicol  
**OMS** - Organização Mundial de Saúde  
**RF** - fator de retenção  
**RMN <sup>13</sup>C** - Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13  
**RMN <sup>1</sup>H** - Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio  
**RTA** - reflectância total atenuada  
**TMS** - tetrametilsilano  
**TNB** - ácido 5-tio-2-nitrobenzoico  
**t<sub>R</sub>** - tempo de retenção  
**UV** - ultravioleta

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>18</b> |
| 1.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE <i>EUGENIA DYSENTERICA</i> MART EX. DC. BERG (MYRTACEAE)..... | 20        |
| 1.2 CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>E. DYSENTERICA</i> .....                               | 22        |
| 1.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE <i>E. DYSENTERICA</i> MART EX. DC. BERG.....                 | 26        |
| 1.4 ENZIMAS ESTERASES E DOENÇA DE ALZHEIMER.....  | 26        |
| 1.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....   | 30        |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | <b>32</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....  | 32        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 32        |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS ANALÍTICOS</b> .....   | <b>33</b> |
| 3.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....  | 33        |
| <b>3.1.1 Fase estacionária</b> .....  | <b>33</b> |
| <b>3.1.2 Preparo e aplicação da amostra</b> .....                                       | <b>33</b> |
| <b>3.1.3 Sistemas de Eluição</b> .....  | <b>33</b> |
| <b>3.1.4 Reveladores</b> .....  | <b>34</b> |
| 3.1.4.1 Reagente de NP/PEG - <b>R1</b> .....  | 34        |
| 3.1.4.2 Reagente do anisaldeído - ácido sulfúrico - <b>R2</b> .....                     | 34        |
| 3.1.4.3 Reagente de Komarovsky - <b>R3</b> .....  | 35        |
| 3.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC).....   | 35        |
| <b>3.2.1 Fase estacionária</b> .....  | <b>35</b> |
| <b>3.2.2 Empacotamento</b> .....  | <b>35</b> |
| 3.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL .....   | 35        |
| <b>3.3.1 Espectrometria de infravermelho (IV)</b> .....                                 | <b>36</b> |
| <b>3.3.2 Espectroscopia de ultravioleta (UV)</b> .....                                  | <b>36</b> |
| <b>3.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</b> .....                | <b>37</b> |
| <b>3.3.4 Cromatografia de gases acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)</b> .....   | <b>37</b> |
| 3.4 ESTUDO FITOQUÍMICO.....   | 38        |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.4.1 Material botânico</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>3.4.2 Determinação da umidade de folhas frescas</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>3.4.3 Preparo do material botânico, folhas secas pulverizadas</b> .....                           | <b>38</b> |
| <b>3.4.4 Extrato hexânico (EHX)</b> .....  | <b>38</b> |
| <b>3.4.5 Extrato aquoso (EAQ)</b> .....  | <b>39</b> |
| <b>3.4.6 Processo de purificação e fracionamento dos extratos</b> .....                              | <b>39</b> |
| 3.4.6.1 Purificação e fracionamento do EHX por cromatografia em coluna (CC).....                     | 39        |
| 3.4.6.1.1 Pré-fracionamento do EHX.....  | 39        |
| 3.4.6.1.2 Fracionamento por CC da Fhex/AcOEt.....  | 39        |
| 3.4.6.1.3 Pré-Purificação por cromatografia em coluna das subfrações EDE e EDG<br>.....              | 40        |
| 3.4.6.2 Purificação e fracionamento do EAQ por CC .....  | 40        |
| 3.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....   | 41        |
| <b>3.5.1 Ensaio de atividade de inibição da acetilcolinesterase</b> .....                            | <b>41</b> |
| 3.5.1.1 Reagentes e Soluções .....   | 43        |
| <b>3.5.2 Proliferação celular avaliada pelo Kit XTT</b> .....  | <b>44</b> |
| 3.5.2.1 Cultura de células de neuroblastoma .....  | 45        |
| 3.5.2.2 Efeito do extrato aquoso de <i>E. dysenterica</i> na viabilidade celular.....                | 46        |
| <b>3.5.3 Teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos e antifúngicos por disco difusão</b> ..... | <b>47</b> |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>50</b> |
| 4.1 MATERIAL BOTÂNICO E EXTRATOS .....   | 50        |
| 4.2 PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS .....   | 50        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>4.2.1 Extrato hexânico (EHX)</b> .....   | <b>50</b>  |
| 4.2.1.1 Análise por CG-EM das frações do extrato hexânico de folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> ..... | 56         |
| 4.2.1.2 Caracterização dos compostos presentes na fração EDD .....                                      | 60         |
| 4.2.1.3 Caracterização do composto <b>47</b> presente na fração EDE.....                                | 69         |
| 4.2.1.4 Análise por EM do composto <b>43</b> presente na fração EDA.....                                | 75         |
| 4.2.1.5 Análise por EM do composto <b>44</b> presente na fração EDE.....                                | 76         |
| <b>4.2.2 Extrato aquoso (EAQ)</b> .....   | <b>78</b>  |
| 4.2.2.1 Elucidação estrutural .....   | 79         |
| <b>4.2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA</b> .....  | <b>101</b> |
| 4.2.3.1 Proliferação celular.....   | 101        |
| 4.2.3.2 Inibição da acetilcolinesterase <i>in vitro</i> .....   | 102        |
| 4.2.3.3 Sensibilidade a agentes antimicrobianos e antifúngicos .....                                    | 104        |
| <b>5 CONCLUSÃO</b> .....  | <b>107</b> |
| <b>6 REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>108</b> |

## **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quinto país com a maior extensão territorial no planeta e ocupa o primeiro lugar, no quesito, na América Latina, com aproximadamente 8.500.000 km<sup>2</sup>. Considerado um país megadiverso, possui variedade de climas e ambientes, propícios para o desenvolvimento de diferentes espécies de plantas e animais. No que tange ao reino vegetal, possui aproximadamente 50.000 espécies de plantas, das quais 46,2% são endêmicas (GIULIETTI *et al.*, 2005), distribuídas nos cinco biomas característicos: pantanal, pampa, mata atlântica, caatinga e cerrado (BEUCHLE *et al.*, 2015).

O Cerrado constitui o segundo bioma com maior extensão da América do Sul e cobre 22% do território brasileiro, ocupando o segundo lugar em biodiversidade; é superado pelo Amazonas que cobre aproximadamente o 49% do território nacional (SANO *et al.*, 2010; BEUCHLE *et al.*, 2015). O Cerrado localiza-se principalmente na região central do país: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, Minas Gerais e Bahia, porém pequenas áreas podem ser encontradas no norte do Pará e Roraima e no sul de São Paulo e Paraná (BATLLE-BAYER; BATJES; BINDRABAN, 2010).

Dentro do bioma Cerrado existem diferentes fitofisionomias caracterizadas pela flora e por suas estruturas vegetais peculiares que podem coexistir no mesmo espaço geográfico. As mais reconhecidas são o Cerrado *stricto sensu*, o Cerradão, as Matas de Galeria, o Campo Sujo e o Campo Limpo. Sua distribuição é variada como consequência de uma complexa interação de diferentes fatores, como o clima, características do solo, profundidade do lençol freático, incidência de fogo e a história local (CASSINO; MARTINHO; SILVA, 2015).

O Cerrado *stricto sensu* possui fisionomia típica de savana com árvores pequenas e retorcidas, arbustos de grande porte e estrato herbáceo denso. O Cerradão tem ampla cobertura de árvores esclerófitas, que formam um dossel contínuo ao longo do estrato herbáceo-arbustivo. Os Campos são pastagens caracterizadas pela presença de algumas árvores e arbustos (Campo Sujo) ou pela ausência de árvores (Campo Limpo). As Matas de Galeria prosperam ao lado dos pequenos rios do planalto brasileiro com árvores de maior tamanho e com uma cobertura arbórea importante (CASSINO; MARTINHO; SILVA, 2015). A floresta tem

sido classificada como floresta aberta decidual e floresta fechada decidual, assim como floresta semidecidual e pode atingir até 15 m de altura (BEUCHLE *et al.*, 2015).

Com relação às condições climáticas, o Cerrado apresenta um clima tropical semiúmido com sazonalidade pronunciada. A temperatura média anual varia de 26 °C no Norte a 20 °C no Sul. A diferença entre a temperatura média do mês mais frio (julho) e o mês mais quente (setembro) é aproximadamente 4 °C. O cerrado exibe uma estação chuvosa (6-7 meses) com média de precipitação anual entre 800-2000 mm/ano. Cerca de 90 % da chuva precipita entre outubro e abril e a taxa de evaporação é de 1500-1600 mm/ano (BATLLE-BAYER; BATJES; BINDRABAN, 2010; BEUCHLE *et al.*, 2015).

Esse bioma enfrenta a maior taxa de desmatamento nos ecossistemas brasileiros, atingindo um valor de 0,69 %/ano e somente 3,0 % da área estão protegidos por unidades de conservação. Este desmatamento causa a perda de aproximadamente 50% da cobertura vegetal e nesse sentido, as mudanças no uso da terra resultam em uma paisagem altamente fragmentada. A vegetação nativa remanescente sofre um processo de fragmentação e está imersa em territórios destinados à agricultura, pastagens e desenvolvimento urbano. A maioria dos fragmentos está exposta a atividades de criação de gado, cultivo e colheita de plantas e suas partes, e incêndios (GIROLDO; SCARIOT, 2015). O efeito negativo das atividades humanas no bioma Cerrado é agravado pelos efeitos diretos das mudanças climáticas. Existem poucos estudos que mostrem o nível de perturbação e os impactos sobre os ecossistemas e da biodiversidade no bioma Cerrado e são necessárias novas estratégias de conservação para mitigá-los (GANEM; DRUMMOND; FRANCO, 2013).

Diferentes espécies vegetais encontradas no Cerrado são usadas na medicina tradicional e têm sido objeto de diversos estudos etnofarmacológicos e etnobotânicos. Na literatura são mostrados registros para espécies pertencentes às famílias Anacardiaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Boraginaceae, Bignoniaceae, Combretaceae, Caesalpinaceae, Dilleniaceae, Fabaceae, Guttiferae, Leguminosae, Malvaceae, Malpighiaceae, Mimosaceae, Moraceae, Myrtaceae, Tiliaceae, Volchysiaceae, entre outras (TOLEDO *et al.*, 2011; CECÍLIO *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2014; CERCATO *et al.*, 2015; CHAVES *et al.*, 2015). Esses registros assim

como o elevado interesse na produção de novos medicamentos a partir de plantas medicinais, fazem com que esse recurso natural seja valorizado no que tange ao desenvolvimento econômico e à conservação da biodiversidade nacional (MARQUES, P., 2015).

A família Myrtaceae constitui um grupo de plantas amplamente distribuídas nas áreas pantropical e subtropical, abrangendo cerca de 130 gêneros e aproximadamente 4.000 espécies (SOUZA, V.; LORENZI, 2005; COLE; HABER; SETZER, 2007). O gênero *Eugenia* é um dos mais reconhecidos na família Myrtaceae, com plantas com variado uso na medicina tradicional. Este gênero possui aproximadamente 500 espécies (COLE; HABER; SETZER, 2007; SAINT-HILAIRE; BRANDÃO, 2011) e é considerado o mais estudado dessa família (NOVAES *et al.*, 2013).

#### 1.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE *Eugenia dysenterica* Mart ex. DC. Berg (Myrtaceae).

Sinonímia: *Stenocalyx dysenterica*, *Stenocalyx dysentericus* (Mart. Ex DC.) Berg, *Myrtus dysenterica* Mart (MOBOT, 2016; SOBRAL *et al.*, 2016).

A planta é conhecida popularmente como cagaita ou cagaiteira. Esses nomes estão relacionados com a capacidade laxativa dos frutos da espécie (CAMPOS *et al.*, 2001; SILVA, R.; CHAVES; NAVES, 2001; LORENZI, 2002; ZUCCHI *et al.*, 2003; OLIVEIRA, V. *et al.*, 2012).

*Eugenia dysenterica* ocorre no Cerradão Mesotrófico e Distrófico, Cerrado sentido restrito e ralo (SILVA, J. A. *et al.*, 1994; ALMEIDA, SAMÍRAMIS *et al.*, 1998; SILVA, R.; CHAVES; NAVES, 2001; BRITO *et al.*, 2003; MARTINOTTO *et al.*, 2008; SOUZA, E. R. *et al.*, 2008). Cagaita pode ser encontrada na Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo, Tocantins (ALMEIDA, SEMÍRAMIS; SILVA; RIBEIRO, 1987; ALMEIDA, SAMÍRAMIS *et al.*, 1998; LORENZI, 2002; SOUZA, E. R. *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2003; JORGE; MORENO; BERTANHA, 2010; SILVEIRA *et al.*, 2013).

A cagaita é uma árvore frutífera (Figura 1) que quando adulta pode atingir de 10 a 15 m de altura (OGA; FONSECA, 1994; BRITO *et al.*, 2003; MARTINOTTO *et*

*al.*, 2008; FARIA 2010). Apresenta uma copa alongada e densa, com aproximadamente 8 m de amplitude e um tronco com 0,86 m de circunferência (SILVA, R.; CHAVES; NAVES, 2001; BRITO *et al.*, 2003).

As folhas são membranáceas, aromáticas, simples, opostas-cruzadas, elípticas a oblongo-elípticas, glabras quando na maturidade, e pubérulas quando jovens, com brilho na face superior, coriáceas, curto pecioladas, subsésseis e apresentam de 8 a 10 pares de nervuras na área lateral (NAVES *et al.*, 1995; SILVA, R.; CHAVES; NAVES, 2001; LORENZI, 2002; BRITO *et al.*, 2003; MARTINOTTO *et al.*, 2008). O tamanho aproximado é de 3 cm de comprimento e 1 cm de largura quando jovens a 13,8 cm de comprimento e 8,2 cm de largura quando adultas.

As flores podem atingir de 1,5 a 2 cm de diâmetro; são hermafroditas, actinomorfas, diclamídeas, tetrâmeras ou pentâmeras, dialipétalas e dialissépalas, elípticas. Apresentam anteras rimosas, elípticas, com 60 a 70 estames, estilete filiforme e estigma simples. Exibem ovário ínfero, bilocular, globuloso, com 2 a 4 óvulos por lóculo (BRITO *et al.*, 2003; MARTINOTTO *et al.*, 2008; PINA, 2008; FARIA 2010). Os botões florais podem atingir de 2,6 mm de diâmetro quando jovens a 4,2 mm de diâmetro quando adulto. Possuem brácteas lineares e pedicelo (desprovido de pelo) de até 4,7 e 40,8 cm de comprimento respectivamente. Evidencia bractéolas orbiculares ou lineares com ápice arredondado alcançando de 0,9 a 3,2 mm de comprimento (FARIA 2010).

O fruto é do tipo baga, de cor verde quando jovem e amarelo claro quando maduro (ALMEIDA, SEMÍRAMIS; SILVA; RIBEIRO, 1987). Apresenta casca delgada, glândulas salientes. A forma é globosa e um pouco achatada (NAVES *et al.*, 1995; SOUZA, E. R. *et al.*, 2008; FARIA 2010). O epicarpo é membranoso brilhante (SILVA, J. A. *et al.*, 1994; MARTINOTTO *et al.*, 2008), com peso entre 14 e 20 g (JORGE; MORENO; BERTANHA, 2010). Os frutos possuem de 1 a 4 sementes, de cor creme ou amarela pálida, com cerca de 1 a 1,5 cm de comprimento (ALMEIDA, SAMÍRAMIS *et al.*, 1998; BRITO *et al.*, 2003; MARTINOTTO *et al.*, 2008).



Figura 1. *Eugenia dysenterica*. **A.** Árvore **B.** Folhas; **C.** Flores; **D.** Galhos, folhas e frutos. Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília DF (arquivo pessoal).

## 1.2 CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *E. dysenterica*

Alguns constituintes químicos presentes nas folhas de *E. dysenterica*, têm sido identificados por técnicas como cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia de gases acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e



cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O resumo dos compostos majoritários identificados é mostrado na Figura 2.

A análise por CCD mostrou a presença de taninos, flavonoides, terpenos e saponinas no extrato etanólico das folhas (CECÍLIO *et al.*, 2012). A análise por CLAE mostrou a presença de polifenóis, taninos e flavonoides nos estratos etanólico e aquoso (DUARTE *et al.*, 2008; PRINCE *et al.*, 2015; SILVA, S. *et al.*, 2015).

Dentro do grupo dos flavonoides se destaca a catequina (**1**) como composto majoritário, com 47,51 mg/g em extrato padronizado de folhas (SILVA, S. M., 2014; ZORZIN, 2014), bem como a quercetina (**2**) e epicatequina (**3**) (LIMA, THAIS 2007). Do grupo dos polifenóis tem sido descrita a presença do ácido elágico (**4**) (ZORZIN, 2014) e procianidina B1 (**5**) (PRADO *et al.*, 2014).

A partir do óleo essencial, obtido por hidrodestilação das folhas, foram identificados compostos pertencentes ao grupo dos sesquiterpenos: óxido de  $\beta$ -cariofileno (**6**),  $\beta$ -cariofileno (**7**),  $\alpha$ -humuleno (**8**),  $\alpha$ -terpineol (**9**),  $\alpha$ -limoneno (**10**),  $\alpha$ -tujeno (**11**),  $\delta$ -cadineno (**12**) e sabineno (**13**) (COSTA, T. *et al.*, 2000).

No óleo essencial, obtido dos frutos semimaduros e imaturos, foram identificados  $\alpha$ -limoneno (**9**), (E)- $\beta$ -cimeno (**14**) e  $\beta$ -pineno (**15**). Nos frutos maduros foram identificados  $\gamma$ -muuroleno (**16**),  $\beta$ -cariofileno (**6**) e  $\alpha$ -humuleno (**7**) (DUARTE *et al.*, 2008). No óleo essencial obtido de sementes foram identificados os sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno (**6**),  $\delta$ -cadineno (**12**) e  $\beta$ -pineno (**15**), entre outros (DUARTE *et al.*, 2009).

Na polpa foram identificadas substâncias voláteis pela técnica de microextração em fase sólida acoplada à CG com detector de massas. Os compostos majoritários foram os ésteres hexanoato de etila (**17**) e butanoato de etila (**18**) (CARVALHO *et al.*, 2009). Outros autores relatam a presença de  $\beta$ -caroteno (**19**),  $\alpha$ -caroteno (**20**), retinol (**21**),  $\alpha$ -tocoferol (**22**), licopeno (**23**), ácido desidroascórbico (**24**), ácido ascórbico (**25**) e alguns folatos como (6S)-5,6,7,8-tetraidrofolato (**26**), (6S)-5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato (**27**) e (6S)-5-formil-5,6,7,8-tetraidrofolato (**28**) (CARDOSO *et al.*, 2011).

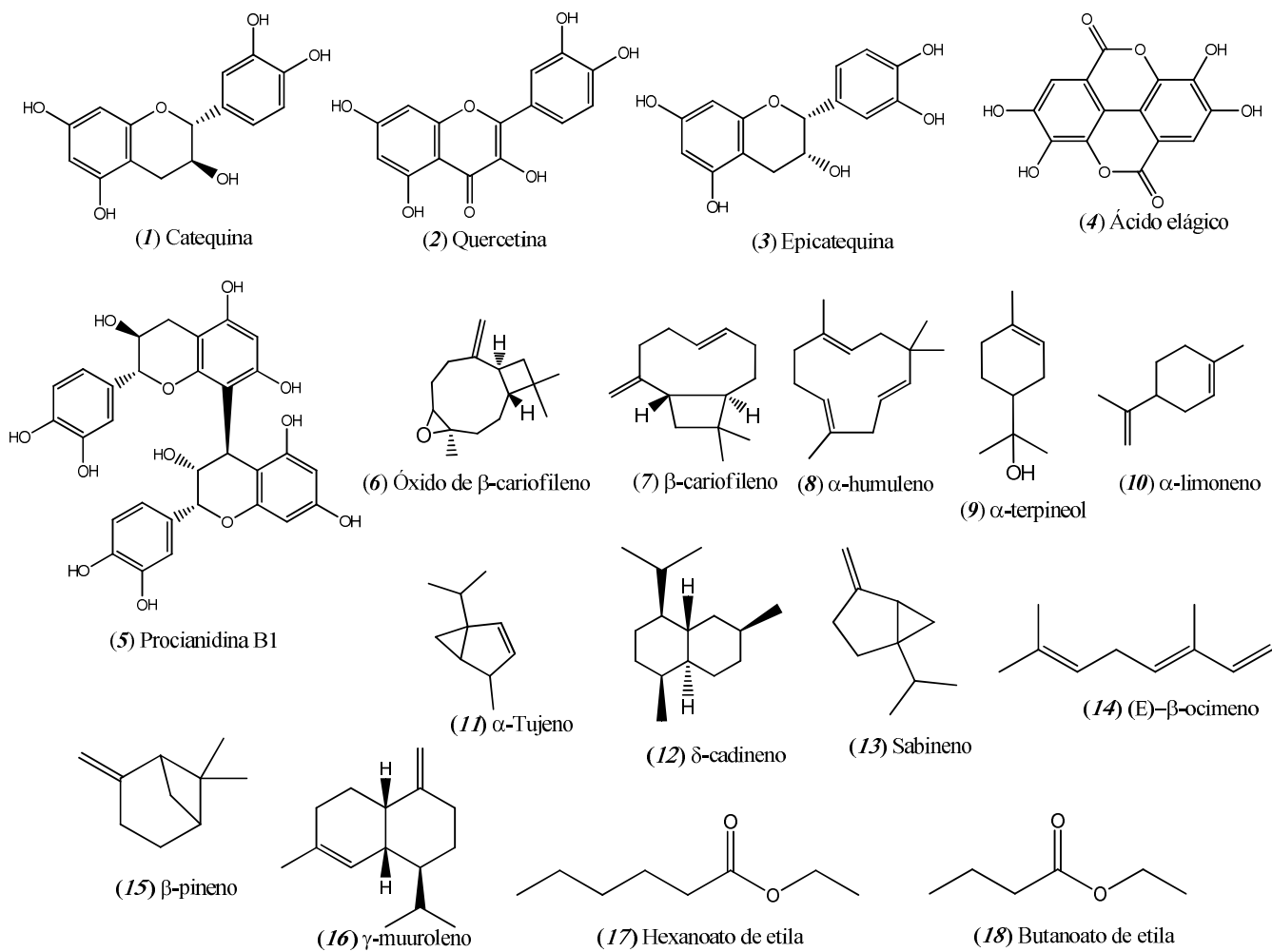


Figura 2. Compostos identificados em *E. dysenterica*

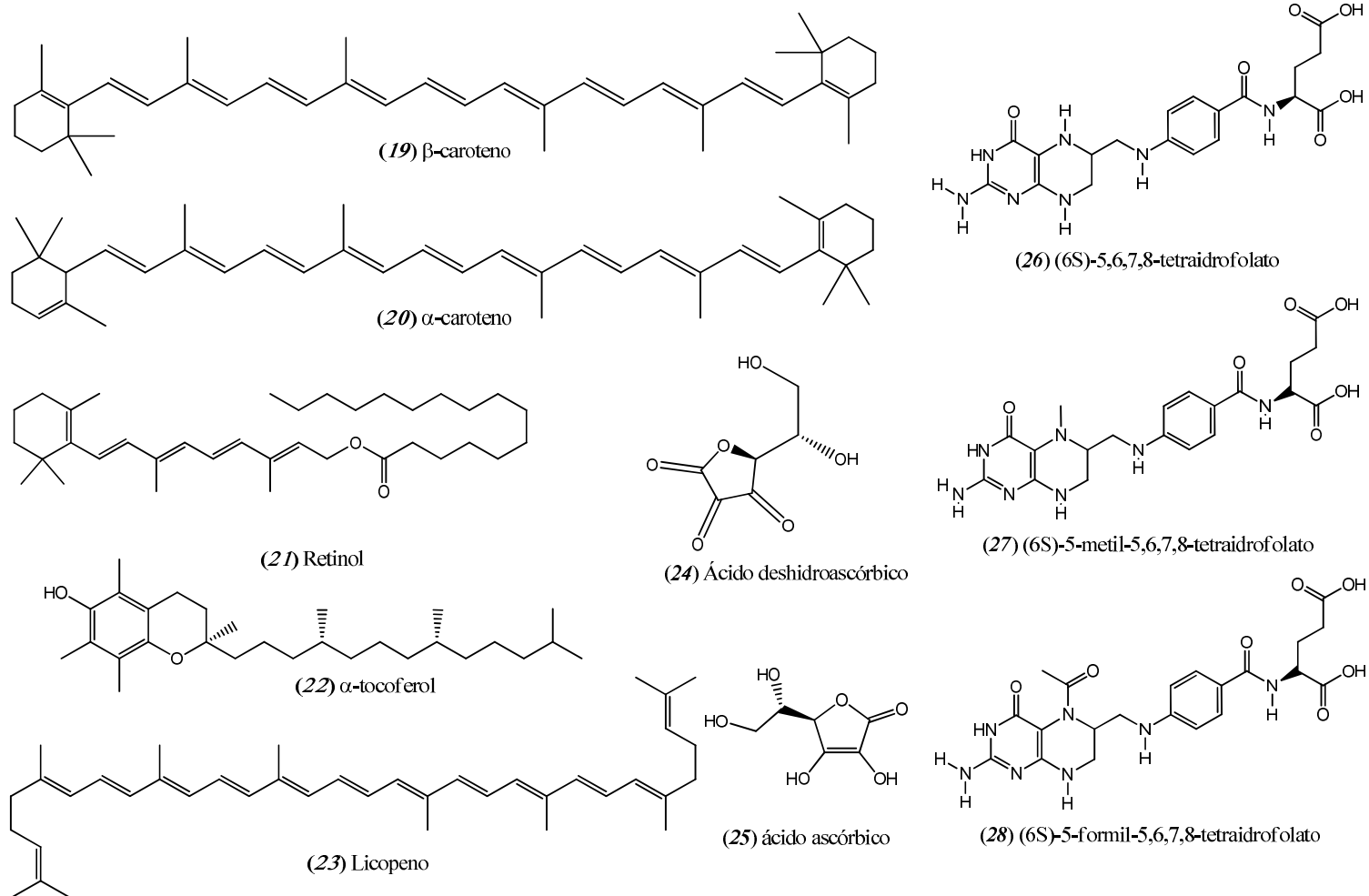


Figura 2. Compostos identificados em *E. dysenterica* (continuação)

### 1.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *E. dysenterica* MART EX. DC. BERG.

Diferentes partes da planta têm sido descritas para diferentes usos etnomedicinais. Os frutos apresentam propriedade laxativa (LIMA, T *et al.*, 2010); as flores são usadas para o tratamento de infecções na pele e na bexiga (LIMA, T *et al.*, 2011), as folhas são utilizadas para o tratamento de doenças cardíacas, diarreia, diabetes, icterícia, bem como para redução do nível de colesterol no sangue (LIMA, T *et al.*, 2011; SILVA, S. *et al.*, 2015). Atualmente é considerada uma espécie com elevado interesse econômico no Brasil (SILVA, S. *et al.*, 2015), com aplicação na indústria alimentícia e de cosméticos.

Pesquisas desenvolvidas com a planta têm mostrado estudos *in vitro* e *in vivo* relacionados com atividades: antelmintica (GASPAR *et al.*, 2010), citotóxica (ELIAS *et al.*, 2010; LIMA, T *et al.*, 2010; LIMA, T *et al.*, 2011; CECÍLIO *et al.*, 2012; SOUZA, P. *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012; FONSECA *et al.*, 2013), antidiarréica (LIMA, T *et al.*, 2011), laxativa (LIMA, T *et al.*, 2010), antiviral (CECÍLIO *et al.*, 2012), genotóxica (VIEIRA *et al.*, 2012), antioxidante (GENOVESE *et al.*, 2008; SOUZA, P. *et al.*, 2012; ALMEIDA, E. *et al.*, 2013), gastroprotetiva (PRADO *et al.*, 2014), antifúngica (COSTA, T. *et al.*, 2000; SOUZA, E. R. *et al.*, 2002), moluscicida (BEZERRA *et al.*, 2002), bem como atividade inibitória das enzimas tirosinase (SOUZA, P. M. *et al.*, 2012),  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase (SOUZA, P. *et al.*, 2012).

### 1.4 ENZIMAS ESTERASES E DOENÇA DE ALZHEIMER

As esterases são um grupo de enzimas presentes no soro dos animais e estão classificadas em três grupos: As alilesterases, que hidrolisam ésteres alifáticos, as esterases aromáticas, que hidrolisam ésteres aromáticos, e as colinesterases, que catalisam a hidrólise da acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético (BERNARDE, 2008).

Existem dois tipos de colinesterase: acetilcolinesterase (AChE), que pode ser encontrada em alguns tipos de tecido condutor (nervo e músculo, tecido central e periférico, fibras motoras e sensoriais, além de fibras colinérgicas e não colinérgicas; e a butirilcolinesterase (BuChE), conhecida como colinesterase do plasma ou

acetilcolina-acil-hidrolase. A atividade da AChE é maior nos neurônios motores que nos neurônios sensoriais, enquanto a BuChE é encontrada no fígado. A BuChE se diferencia da AChE na maior capacidade de hidrólise da butirilcolina quando comparada com a acetilcolina. As colinesterases possuem estrutura molecular diversa e propriedades catalíticas semelhantes. Diferem uma da outra na sua disposição oligomérica e no modo de ligação na membrana celular. No cérebro de mamíferos, a enzima ocorre em disposição tetramérica de forma G4 com pequenas porções da enzima em disposição monomérica em forma G1 (BERNARDE, 2008).

Acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso simpático e parassimpático, bem como na medula adrenal. É biosintetizada em única etapa pela enzima colina acetil transferase. A enzima é um marcador de neurônios colinérgicos. É armazenada em vesículas de 100 nm localizadas nas terminações nervosas, porém uma pequena parte pode encontrar-se livre no citosol (COSTA, A. S., 2015).

Durante a neurotransmissão, a ACh é liberada na fenda sináptica, seguida de interação com receptores (nicotínicos e muscarínicos) na região pós-sináptica, onde termina a transmissão do sinal por hidrólise da ACh, originando colina e acetato. A colina liberada é recapturada no nervo pré-sináptico e o neurotransmissor é sintetizado na presença de acetilcoenzima A (acetilCoA) por ação da colina acetiltransferase (ANAND; SINGH; SINGH, 2012; ATANASOVA *et al.*, 2015; DRACZKOWSKI *et al.*, 2015).

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva associada com perda da memória e da capacidade cognitiva. Algumas das características neuropatológicas da doença são: a presença de placas  $\beta$ -amiloide (principal constituinte das placas senis), que se depositam no exterior dos neurônios; acumulação deovelos ou emaranhados neurofibrilares no interior dos neurônios; e degeneração/atrofia dos neurônios do prosencéfalo basal colinérgico. A perda dos neurônios do prosencéfalo basal colinérgico leva à redução da atividade sináptica da acetilcolina que conseqüentemente induz à deterioração das funções cognitivas (ANAND; SINGH; SINGH, 2012; GOMATHI; MANIAN, 2015).

Um estudo recente mostrou que a AChE acelera a agregação da proteína  $\beta$ -amiloide formando complexos neurotóxicos estáveis. Esses complexos induzem a desregulação da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular no hipocampo neuronal

(processo dependente do  $\beta$ -amiloide), disfunção mitocondrial, distrofia neurítica e apoptose (ATANASOVA *et al.*, 2015).

De acordo com a hipótese colinérgica, a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) aumenta os níveis de acetilcolina no cérebro, aprimorando as funções colinérgicas em pacientes com DA (DRACZKOWSKI *et al.*, 2015). O uso deste tipo de inibidor pode atenuar os sintomas, mas não consegue atrasar nem reverter o progresso da doença.

Existem no mercado dois tipos de fármacos para o tratamento da DA (ATANASOVA *et al.*, 2015): os inibidores de *N*-metil-D-aspartato e os inibidores de acetilcolinesterase (AChEi). No último grupo é possível encontrar inibidores sintéticos como tacrina (29) e donepezil (30), além de inibidores de origem natural como galantamina (31), rivastigmina (32) e huperzina A (33) (Figura 3).

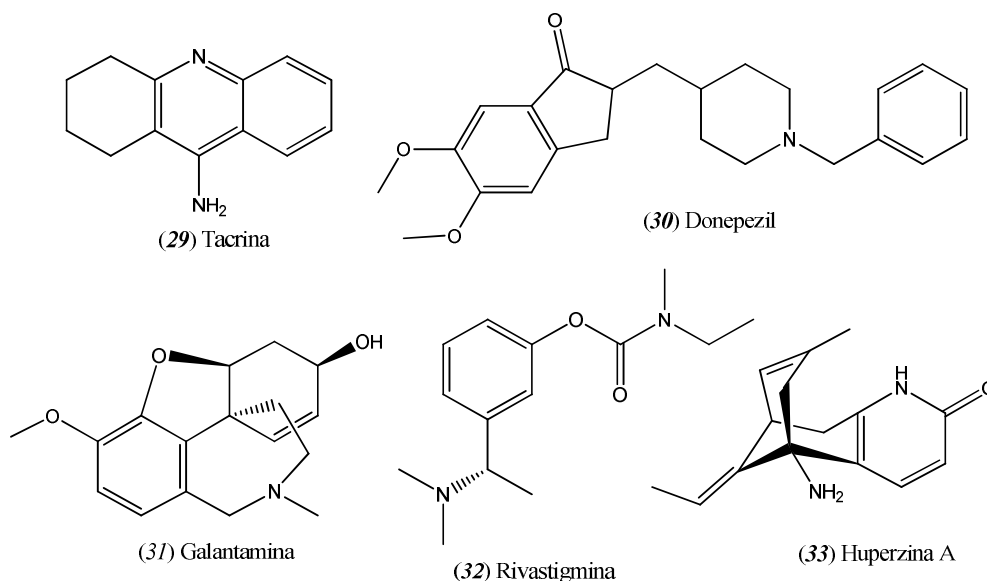


Figura 3. Inibidores clássicos da AChE de origem sintética e natural.

O estudo desse tipo de inibidores tem levado os cientistas na busca de modelos celulares adaptáveis ao estudo de doenças neurodegenerativas. O neuroblastoma humano, originado a partir das células da crista neural durante o desenvolvimento embrionário, é um dos tumores mais frequentes em crianças. As células SH-SY5Y são um subclone obtido da linhagem parental neuroblástica SK-N-

SH, estabelecida a partir de uma biópsia de medula óssea de neuroblastoma (CICCARONE *et al.*, 1989)..

As células SH-SY5Y têm sido utilizadas como modelo neuronal para avaliar doenças neurodegenerativas como as doenças de Parkinson e de Alzheimer, doenças do desenvolvimento neuronal, autismo, metabolismo mitocondrial, entre outras (AGHOLME *et al.*, 2010; SCHNEIDER *et al.*, 2011; YASUI *et al.*, 2011). Entre as características mais importantes das células SH-SY5Y está sua capacidade para diferenciar-se num fenótipo neuronal funcionalmente maduro (YUSUF *et al.*, 2013), a plasticidade biológica e a expressão de enzimas biossintéticas noradrenérgicas, receptores para o fator de crescimento nervoso, opióide e muscarínico (RETTIG *et al.*, 1987; SADEE *et al.*, 1987). Cada uma dessas características tornaram a linhagem SH-SY5Y como um modelo clássico na neurociência nos estudos de doenças neurodegenerativas, aplicado tanto a ensaios de citotoxicidade, como genotoxicidade, mutagenicidade, clonogênica, entre outros (YU *et al.*, 2014).

O estudo das doenças neurodegenerativas é de bastante relevância para a comunidade científica. Estima-se que cerca de 35,6 milhões pessoas no mundo sofreram de demência em 2010. Espera-se que esse valor se duplique a cada 20 anos, passando a 65,7 milhões em 2030 e 115,4 milhões em 2050. Os custos globais aumentaram de US \$ 604 bilhões em 2010 para US \$ 818 bilhões em 2015. No ano 2015 se tem uma estimativa aproximada de 46.8 milhões de pessoas com esse tipo de doença no Brasil, e é estimado que em 2050 a população idosa ultrapasse 22,7% da população (PRINCE *et al.*, 2015).

Uma das conclusões do World Alzheimer Report 2015 (PRINCE *et al.*, 2015) refere-se ao aumento dos investimentos para pesquisa relacionada com demência, que deve ser proporcional ao custo social da doença. O investimento deve estar equilibrado entre os programas de prevenção, tratamento, cura e cuidados paliativos. Do mesmo modo estabelece a criação de grupos de trabalho em países de baixa e média renda, para concepção de programas de conscientização visando a melhora das respostas do sistema de saúde com relação a demência.

Nesse sentido, o Brasil vem apoiando a criação de programas que respondem a algumas dessas demandas, como a formulação da lei de inovação tecnológica nº 10.973 em 2004 (BASSO; GROSSI ; PELEGRINI, 2010), além da aprovação em 2006 da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos-PNPMF (BRASIL,

2006) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares-PNPIC (BRASIL, 2006). Estas políticas visam incentivar a pesquisa e o desenvolvimento de plantas medicinais e fitoterápicos, apontando ao aproveitamento da biodiversidade e a melhoria da qualidade de vida da população brasileira.

Com base nas considerações anteriores, a busca de espécies vegetais, como novas fontes de compostos ativos com aplicação farmacológica, atende as demandas de políticas nacionais como a PNPMF e PNPIC, e valoriza esse recurso natural aprimorando processos de conservação de espécies endêmicas do Brasil.

O presente projeto de pesquisa contribui para estudo de uma espécie vegetal do Cerrado pertencente ao gênero Myrtaceae e para a identificação de compostos de origem natural que atuem no tratamento de doenças neurodegenerativas, entre outras. Além disso, o projeto contribui nas atividades previstas no projeto de rede Pro-Centro-Oeste, visando a valorização do Cerrado e suas espécies vegetais com potencial atividade biológica.

Pesquisas recentes estão focando na identificação de extratos vegetais e frações obtidas a partir de processos de pré-purificação dos mesmos (JIVAD; RABIEI, 2014; ADEWUSI; STEENKAMP, 2015). Mesmo que estes estudos não tenham levado ainda à identificação de moléculas com maior eficácia do que as já descritas, têm permitido identificar novos núcleos estruturais, que podem ser ponto de partida para o desenvolvimento de novas moléculas ativas, com ajuda de técnicas como a síntese orgânica convencional e técnicas de modelagem molecular, entre outras.

## 1.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As doenças infecciosas causadas por agentes biológicos, bactérias e fungos, são a principal causa de morbidade e mortalidade em seres humanos. Estima-se que esse tipo de microrganismos é responsável por 8,7 milhões de mortes no ano 2008. A maioria das vítimas desse tipo de doenças tem sido relacionada a pessoas com condições de vida precárias, provenientes de países subdesenvolvidos ou em via de desenvolvimento (RADULOVIC *et al.*, 2013).



A busca por novos agentes antimicrobianos tornou-se o principal objetivo de grupos de pesquisa orientados ao desenvolvimento de processos inovadores nas áreas da química medicinal e a farmacologia, entre outros. Muitos desses trabalhos tem focado no estudo de produtos naturais obtidos de diferentes espécies de plantas. As plantas sintetizam diversos grupos de metabólitos secundários que cumprem funções de defesa, proteção, comunicação, entre outras. Terpenoides, alcaloides, flavonoides, quinolinas, sesquiterpenos, entre outros, fazem parte desse grupo de metabolitos com atividade antifúngica e antimicrobiana (RADULOVIC *et al.*, 2013).

Tem sido reportada atividade antimicrobiana em algumas espécies de plantas do gênero *Eugenia*: no óleo essencial das sementes de *E. uniflora* e *E. malaccensis* (OLIVEIRA, M. *et al.*, 2008; VICTORIA *et al.*, 2012), no extrato hidroalcoólico e metanólico de *E. uniflora* (HOLETZ *et al.*, 2002; AURICCHIO *et al.*, 2007), no óleo essencial das folhas de *E. umbelliflora* e *E. brasiliensis* (MAGINA *et al.*, 2009), no extrato aquoso das folhas (LARHSINI *et al.*, 2001) e no óleo essencial extraído a partir dos botões florais de *E. caryophyllata* (CHAIEB *et al.*, 2007), nos extratos hidroalcoólico e aquoso obtidos das folhas de *E. mansonii*, *E. uniflora* e *E. repanda* (BERTUCCI *et al.*, 2009) e no extrato acetônico e aquoso obtido da casca de *E. jambos* (DJIPA; DELMÉE; QUETIN-LECLERCQ, 2000). *E. dysenterica* tem mostrado uma relevante atividade antibacteriana. Pesquisa desenvolvida por SILVA, S. M. (2014) demonstrou que o extrato aquoso de Cagaita inibe o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*.

Com base nas considerações acima expostas, esta pesquisa busca contribuir ao estudo da atividade antifúngica e antibacteriana do extrato hexânico de *E. dysenterica*. O extrato não tem sido objeto de estudos químicos nem biológicos, e portanto, os resultados encontrados serão ponto de partida para novas pesquisas relacionadas aos compostos de natureza apolar presentes nas folhas de *E. dysenterica*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para a caracterização da composição micromolecular e da atividade biológica de folhas de *Eugenia dysenterica* Mart. ex. DC. Berg.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar o estudo químico dos extratos hexânico e aquoso de *Eugenia dysenterica*.

Avaliar a atividade inibitória do extrato aquoso frente à enzima acetilcolinesterase.

Estimar o efeito do extrato aquoso de *E. dysenterica* na viabilidade celular de células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y.

Identificar a atividade inibitória do extrato hexânico e suas frações sobre alguns agentes patogênicos pertencentes aos gêneros *Candida* e *Staphylococcus*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS ANALÍTICOS**

O resumo da metodologia empregada no estudo é mostrado na Figura 6. Os métodos analíticos empregados são descritos a seguir.

#### **3.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)**

##### **3.1.1 Fase estacionária**

Neste estudo foram utilizados dois tipos de placas de sílica: Placas de sílica gel 60G (F254 -Fluka) fixadas em suporte de vidro de 10 cm por 7 cm, com 0,25 mm de espessura e ativadas a 110 ° C por 1 hora e placas analíticas de sílica gel 60 com 0,2 mm de espessura (Kieselgel 60 Alugram Sil G -MACHEREY – NAGEL) fixadas em suporte de alumínio.

##### **3.1.2 Preparo e aplicação da amostra**

Uma alíquota de 10 µL de cada fração na concentração de 1 mg/mL foi aplicada na placa. As amostras, previamente concentradas, foram aplicadas com auxílio de um capilar a cerca de 1 cm da base inferior da placa para o ponto de aplicação e cerca de 1 cm entre uma amostra e outra (MARQUES, J.; BORGES, 2012). Os cromatogramas foram visualizados sob luz ultravioleta, no comprimento de onda de 365 nm. Posteriormente, foram utilizados reagentes de detecção (3.1.4).

##### **3.1.3 Sistemas de Eluição**

Foram utilizados variados eluentes, de acordo com as características da amostra analisada.

Para a detecção de compostos fenólicos, foi usado como fase móvel o eluente constituído de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água destilada (100:11:11:26) (WAGNER; BLADT, 1996), identificado como FM1. Para a detecção de triterpenos e outros terpenoides foi usado o eluente hexano: acetato de etila (7:3) identificado como FM2. Para a detecção de saponinas, foi usado o eluente constituído de clorofórmio:ácido acético glacial:metanol:água (64:32:12:8) identificado como FM3.

### 3.1.4 Reveladores

Foram preparados os reveladores com base na metodologia descrita por WAGNER;BLADT (1996).

#### 3.1.4.1 Reagente de NP/PEG - **R1**

Reagente usado para a detecção de substâncias fenólicas, principalmente flavonoides. A metodologia envolve a borrifação da placa cromatográfica com solução 1% de difenilboriloxietilamina em metanol seguida de solução 5% de polietilenglicol-4000 em metanol. Os flavonoides apresentam fluorescência intensa quando observados sob luz ultravioleta – 365 nm, podendo- ser observadas manchas com fluorescência de cor laranja, amarelo ou verde.

#### 3.1.4.2 Reagente do anisaldeído - ácido sulfúrico - **R2**

É um reagente universal para produtos naturais que podem ser diferenciados por mudança de cor. A metodologia envolve a preparação de duas soluções: Solução A, composta de solução ácida de anisaldeído a 2% em ácido acético, e solução B, composta de solução etanólica de ácido sulfúrico a 20%. A placa cromatográfica foi borrifada com as soluções A e B respectivamente e em seguida foi aquecida até o surgimento das bandas com auxílio de secador serigráfico.

O reagente é estável por várias semanas armazenado sob refrigeração e apresenta resposta positiva (mancha de cor rósea ou roxa) para antioxidantes, esteroides, prostaglandinas, fenóis, glicosídeos, sapogeninas, terpenos, antibióticos e micotoxinas.

O mecanismo de reação ainda não foi elucidado. Tem sido indicado que diferentes reações acontecem simultaneamente. Uma proposta envolve a formação de cátions ciclopentenila os quais condensam com o anisaldeído para produzir o composto colorido, além de intermediários de tipo trifenilmetano em presença de compostos aromáticos.

### 3.1.4.3 Reagente de Komarovsky - R3

Reagente usado para detecção de glicosídeos (saponinas), pelo aparecimento de manchas azuis, alaranjadas ou marrons, após aquecimento. A metodologia envolve a preparação de duas soluções: solução em metanol de 4-hidroxibenzaldeído a 2% e solução etanólica de ácido sulfúrico a 50%. As duas soluções foram misturadas em proporção 3:2. Após a borrifação com esta solução, a placa foi aquecida até o surgimento das bandas com auxílio de secador serigráfico.

## 3.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)

### 3.2.1 Fase estacionária

Foram utilizadas duas fases estacionárias:

3.2.1.1 Sephadex LH-20® (Sigma-Aldrich) tamanho de partícula 25-100 µm, foi usado para separação por exclusão por tamanho. A amostra foi diluída em quantidade mínima de solvente. A solução foi incorporada pela parte superior da coluna, começando imediatamente o processo de eluição, mantendo o fluxo contínuo de fase móvel.

3.2.1.2 Sílica-gel 60 (Merck) tamanho de partícula 70-230 µm, foi utilizada para separação em fase normal. A amostra foi incorporada em sílica gel e aplicada no topo da coluna.

### 3.2.2 Empacotamento

Foram empregadas colunas de vidro dotadas de placas porosas, fibra de vidro ou chumaço de algodão. A coluna foi preenchida com a fase estacionária suspensa em solvente apropriado e deixada em repouso por 24 horas.

## 3.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

A elucidação estrutural baseia-se num conjunto de técnicas comuns que tem como objetivo a identificação dos átomos presentes numa molécula assim como sua

proporção (identificação da fórmula molecular), o reconhecimento das ligações presentes entre os átomos, além de grupos funcionais e subestruturas e a disposição espacial dos átomos assim como a rotação das ligações na molécula (SKOOG *et al.*, 2002; PAVIA *et al.*, 2010).

Dentro da elucidação estrutural podem ser descritas quatro técnicas de análises espectrométricas: ultravioleta, infravermelho, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (mono e bidimensional). Essas técnicas quando usadas de forma complementar, constituem-se em ferramentas valiosas para elucidação estrutural, quantificação de substâncias orgânicas, determinação de pureza, além de controle de reações e processos de purificação (SKOOG *et al.*, 2002; PAVIA *et al.*, 2010).

Na atualidade, a inovação tecnológica permite acoplar estas técnicas num sistema eficiente de separação, purificação e quantificação de matrizes complexas de compostos químicos, em alguns casos sem destruição da amostra, com técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia de gases (CG).

### **3.3.1 Espectrometria de infravermelho (IV)**

O espectro de infravermelho dos compostos isolados foi determinado em equipamento Spectrum 100 FT-IR spectrometer (Perkin Elmer) com acessório para a medição de transmitância e reflectância total atenuada (RTA). A varredura foi feita numa faixa de 4000-650  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.3.2 Espectroscopia de ultravioleta (UV)**

Os espectros de UV dos compostos isolados foram obtidos em equipamento UV 1800 (Shimadzu, UV spectrophotometer ). A varredura foi feita numa faixa de 200-400 nm.

### 3.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos no Instituto de Química da Universidade de Brasília, usando um equipamento NMR Bruker Ascend™ spectrometer (9,4 T), operado a 600 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  e 150 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ . O espectro DEPT-135 foi gerado para algumas das moléculas para a identificação de carbonos metínicos (-CH); carbonos metilênicos (-CH<sub>2</sub>) e carbonos metílicos (-CH<sub>3</sub>). Os carbonos quaternários não estão ligados a hidrogênio e, portanto, não aparecem nesse espectro. As amostras foram diluídas em metanol deuterado CD<sub>3</sub>OD (Sigma Aldrich) ou clorofórmio deuterado CDCl<sub>3</sub> (Sigma Aldrich). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) e as constantes de acoplamento foram expressos em ppm e Hz, respectivamente. Como padrão interno foi usado tetrametilsilano (TMS).

### 3.3.4 Cromatografia de gases acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As análises CG-EM foram realizadas no Instituto de Química da Universidade de Brasília em equipamento GCMS modelo QP2010 Plus – Shimadzu. As condições de operação do equipamento são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições cromatográficas do CG-EM utilizado na análise das frações obtidas por CC

| Condições CG               |   |
|----------------------------|---|
| Coluna cromatográfica      | Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ )<br>Fase estacionária: 5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano (Restek) |
| Modo de injeção            | Splitless (1:50)  |
| Temperatura de injeção     | 250 °C  |
| Gás de arraste             | Hélio; fluxo 0,6 mL/min   |
| Velocidade linear          | 28,8 cm/s   |
| Fluxo total                | 33,6 mL/min   |
| Temperatura da coluna      | 100 °C  |
| Programação de temperatura | 100 - 320 °C, $\uparrow$ 5 °C/min.  |
| Condições EM               |   |
| Faixa de massas            | 40 - 600 uma  |
| Tipo de ionização          | Impacto eletrônico (70 eV)  |
| Temperatura de interface   | 280 °C  |
| Volume injetado            | 2 $\mu\text{L}$   |
| Temperatura de interface   | 280 °C  |
| Varredura                  | 0,5 s/scan  |



### 3.4 ESTUDO FITOQUÍMICO

#### **3.4.1 Material botânico**

As folhas de *E. dysenterica*, foram coletadas no bioma Cerrado, na Universidade de Brasília, campus Darcy Ribeiro, Brasília, Distrito Federal em maio de 2013. A espécie foi identificada pela professora Dra. Sueli Maria Gomes e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade de Brasília (UB 914) para assegurar a autenticidade da espécie coletada.

#### **3.4.2 Determinação da umidade de folhas frescas**

A umidade de campo foi determinada num equipamento detector de umidade por infravermelho. Para esta análise foi usado 1 g de folha (análise por triplicata).

#### **3.4.3 Preparo do material botânico, folhas secas pulverizadas.**

O material vegetal foi seco em estufa com controle de temperatura a 37 °C até atingir o teor de umidade entre 5 e 10%. O teor de umidade foi medido em analisador de umidade por infravermelho (modelo IV2000-Gehaka). As folhas secas foram pulverizadas em moinho de facas e passadas em tamiz N° 0,01.

Os extratos aquoso e hexânico foram preparados pelos métodos de infusão e maceração, respectivamente, com base no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, com algumas modificações (BRASIL, 2011).

#### **3.4.4 Extrato hexânico (EHX)**

Para obtenção do extrato hexânico foi aplicada a proporção 1:6 de folhas secas pulverizadas em relação ao solvente. O material pulverizado (1000 g) foi depositado em percolador de aço inox e submetido a maceração durante sete dias com hexano (Vetec). A solução extrativa foi coletada e o solvente foi removido com auxílio de um evaporador rotatório sob pressão reduzida (Heidolph - Hei-VAP Advantage, ML, G1.).

### 3.4.5 Extrato aquoso (EAQ)

O extrato aquoso foi obtido por infusão do material botânico (100 g) em água destilada (500 mL) a aproximadamente 70 °C. A mistura foi deixada arrefecer até aproximadamente 40 °C, sendo então submetida à filtração. A solução extrativa resultante foi mantida a -30 °C e submetida ao processo de liofilização. O extrato foi armazenado em baixa temperatura (-30 °C) para análises posteriores.

### 3.4.6 Processo de purificação e fracionamento dos extratos

#### 3.4.6.1 Purificação e fracionamento do EHX por cromatografia em coluna (CC)

##### 3.4.6.1.1 Pré-fracionamento do EHX

Parte de EHX (16,17 g) foi submetida à pré-purificação em funil sinterizado (diâmetro 9,70 cm e altura 3,8 cm) preenchido com 140,0 g de sílica gel 60. Como sistema de eluição, foram usados os solventes hexano, acetato de etila e metanol. A eluição consistiu na adição de solvente puro ou mistura de solvente (300 mL) em diferentes proporções seguido da coleta das respectivas pré-frações: Hexano (Fhex), hexano:acetato de etila 1:1 (Fhex/AcOEt), acetato de etila (FAcOEt), acetato de etila:metanol 1:1 (FAcOEt/MeOH) e metanol (FMeOH). Com base no perfil cromatográfico por CCD, foi escolhida a pré-fração Fhex/AcOEt para continuar o processo de purificação por CC. As considerações relativas a escolha da fração são indicadas na seção de análise de resultados.

##### 3.4.6.1.2 Fracionamento por CC da Fhex/AcOEt

Uma alíquota da pré-fração Fhex/AcOEt (9,01 g) foi submetida à separação por cromatografia em coluna preenchida com 175 g de sílica gel 60. Como sistema de eluição foi usada a mistura hexano com acetato de etila em diferentes proporções (Fluxo 5 mL/min): hexano/AcOEt 9:1-1:9. Foram coletadas 100 frações, 10 frações por cada relação de solvente, e reunidas em grupos conforme perfil cromatográfico analisado por CCD. Com base no perfil cromatográfico por CCD, foram escolhidas as

frações EDE e EDG para continuar o processo de purificação por CC. As considerações relativas a escolha das frações são indicadas na seção de análise de resultados.

#### *3.4.6.1.3 Pré-Purificação por cromatografia em coluna das subfrações EDE e EDG*

Em experimentos independentes, parte das frações EDE e EDG (200 mg) foi submetida à separação por cromatografia em coluna (CC) preenchida com 24 g de sílica gel 60. Como sistema de eluição, foi usada a mistura hexano - acetato de etila em proporção 7:3. Foram coletadas 25 subfrações (volume final 5 mL) e reunidas em grupos conforme perfil cromatográfico analisado por CCD.

#### *3.4.6.2 Purificação e fracionamento do EAQ por CC*

Para o fracionamento do EAQ foi usada Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) como fase estacionária e metanol como fase móvel. Foi usada uma coluna de vidro de 2,3 cm de diâmetro e 49,5 cm de comprimento, que foi empacotada colocando a mistura da fase sólida com metanol pela parte superior. Foi mantido o fluxo contínuo de fase móvel até obter um grau de empacotamento adequado. A fase sólida ocupou um comprimento de 27,5 cm. As condições cromatográficas estão resumidas na Tabela 2.

O extrato aquoso (500 mg) foi solubilizado em metanol (7 mL), utilizando banho ultrassom por 20 minutos. Em seguida, o extrato solubilizado foi adicionado pela parte superior da coluna e imediatamente foi acrescentado metanol, visando manter um perfil de eluição homogêneo no sistema cromatográfico. As amostras foram coletadas periodicamente a cada 7 minutos, por um tempo total de 308 minutos, e concentradas em banho-maria (QUIMIS modelo Q334M-28) a 40 °C. Subsequentemente foi estudado o perfil cromatográfico das frações por CCD.

O primeiro perfil cromatográfico mostrou mistura de compostos nas frações obtidas, assim, foi continuado processo de purificação por meio de lavagem com solventes de diferente polaridade (acetona, acetato de etila, e clorofórmio). Foi obtido um segundo grupo de subfrações que quando analisadas por CCD revelaram um maior grau de pureza.

Tabela 2. Condições cromatográficas experimentais da separação do EAQ em coluna de Sephadex LH-20.

| Condição                              | Característica                  |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| Coluna                                | Vidro                           |
| Diâmetro coluna                       | 2,3 cm                          |
| Comprimento                           | 49,5 cm                         |
| Fase estacionária                     | Sephadex - LH20 (Sigma-Aldrich) |
| Tamanho de partícula                  | 25-100 $\mu\text{m}$            |
| Volume ocupado pela fase estacionária | 114,25 $\text{cm}^3$            |
| Quantidade de fase estacionária       | 20,08 g                         |
| Fase móvel                            | Metanol                         |
| Fluxo                                 | 1,4 mL/min                      |
| Tempo de coleta da fração             | 7 min                           |
| Tempo total de coleta                 | 385 min                         |

### 3.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA

#### 3.5.1 Ensaio de atividade de inibição da acetilcolinesterase

O ensaio *in vitro* para avaliar a atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) foi realizado a partir do método desenvolvido por ELLMAN *et al.* (1961) e modificado por INGGANINAN *et al.* (2003). A técnica baseia-se na hidrólise da acetiltiocolina (ATCh) pela enzima acetilcolinesterase para produzir tiocolina e acetato. A colina gerada reage com o composto DTNB [Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)] para produzir 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, composto de cor amarela, que apresenta um máximo de absorção a 405 nm (Figura 4). No ensaio, se a enzima AChE é inibida pelos compostos presentes no extrato ou as frações, será menor a quantidade de tiocolina produzida a partir da hidrólise da ATCh. A concentração do cromóforo produzido a partir da reação da tiocolina com o DTNB será menor, e por tanto será um indicativo da eficácia do extrato na inibição enzimática.

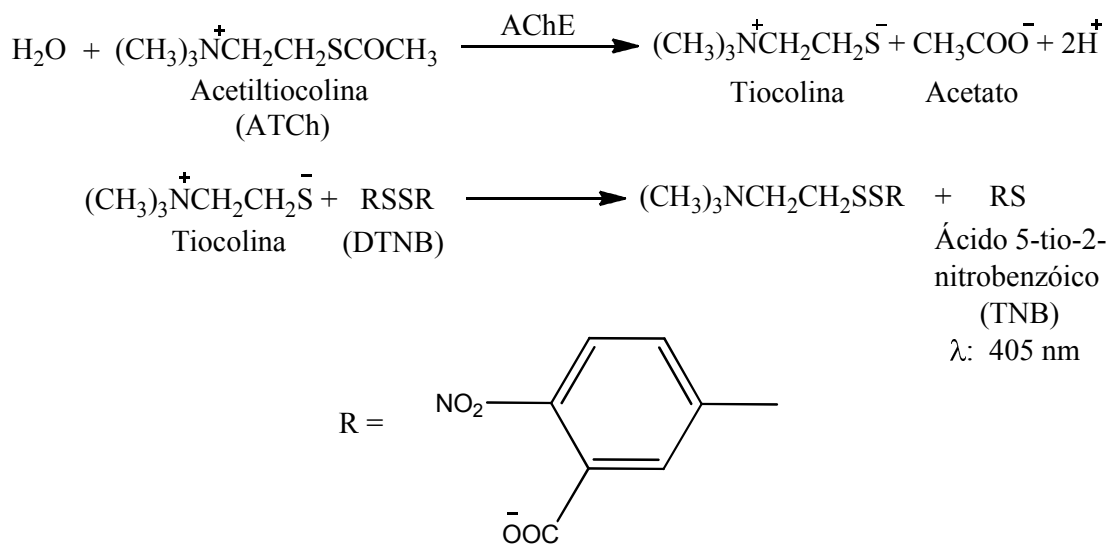
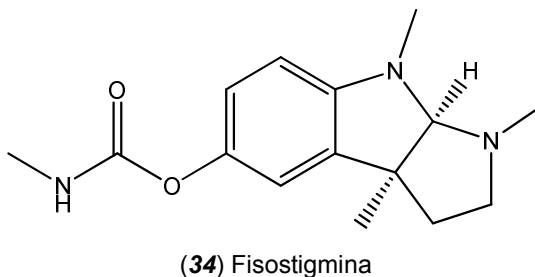


Figura 4. Fundamentação química do método de Ellman.

No experimento, 125  $\mu\text{L}$  de DTNB 3 mM, 25  $\mu\text{L}$  de ATCh (iodeto de acetiltiocolina) 15 mM, 50  $\mu\text{L}$  de solução tampão e 25  $\mu\text{L}$  de extrato ou padrão, nas diferentes concentrações, foram colocados numa microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de AChE 0,28 U/mL. A reação foi monitorada num leitor de microplacas (TP-Reader, Biogenic Scientific Product) aos 3,3 minutos,  $\lambda$  405 nm.

Como controle positivo de inibição enzimática, foi utilizado o inibidor fisostigmina (**34**). A curva dose-resposta foi construída com concentrações variando entre 100-0,78  $\mu\text{g/mL}$ . A curva de inibição enzimática foi obtida plotando a porcentagem de inibição *versus* o logaritmo da concentração da fisostigmina (**34**). Para o cálculo de  $\text{CI}_{50}$  foi feito um análise de regressão não linear utilizando o software GraphPad prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).



As porcentagens de inibição enzimática foram calculadas comparando a absorbância da amostra (ensaio contendo extrato, enzima e substrato) com a do controle da enzima (enzima, substrato e tampão). Os valores de referência para o cálculo da atividade biológica foram os obtidos em 3,3 minutos, tempo no qual a reação foi estável, mostrando variação de absorbância menor a 2%. Os valores de absorbância do controle da enzima forneceram a atividade máxima da enzima utilizada para realizar o teste. Na ausência do extrato a enzima não é inibida o que gera maior produção de tiocolina e, conseqüentemente, o composto colorido ácido 5-tio-2-nitrobenzoico. As porcentagens de inibição foram calculadas de acordo com a equação: % inibição =  $[(C-A) \times 100] / C$ , onde C representa a absorbância do controle da enzima e A representa a absorbância do extrato subtraído ao valor do branco (extrato vegetal, substrato e tampão-controle negativo).

#### 3.5.1.1 Reagentes e Soluções

- Solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0,

Preparado pela mistura de 1,53 g de base Tris HCl e 250 mL de água destilada. O pH foi ajustado com solução de ácido clorídrico 5 M.

- Solução de AChE:

A acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (498,3 U; Sigma-Aldrich) foi diluída em 2 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Para o ensaio, 3,8 µL da solução estoque foram diluídos em 4 mL de tampão tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo 0,1% de albumina sérica bovina. A concentração final da enzima foi de 0,28 U/mL.

- Solução de acetiltiocolina 15 mM:

Preparada pela dissolução de 18,26 mg de iodeto de acetiltiocolina (Sigma, Aldrich) em 4 mL de solução tampão.

- Solução de DTNB 3 mM:

Foi preparada uma solução estoque de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo NaCl 0,1 M e MgCl<sub>2</sub> 0,02 M. O DTNB (19,21 mg) foi solubilizado em 16 mL solução estoque.

➤ Solução de fisostigmina - Controle positivo

Foi preparada solução de fisostigmina (Sigma-Aldrich) 1 mg/mL em solução tampão. A partir dessa solução foram feitas diluições e construída a curva dose-resposta com concentrações ente 100 a 0,78 µg/mL.

➤ Preparo das amostras:

Foi preparada solução de extrato aquoso 1 mg/mL em solução tampão. A partir dessa solução foram feitas diluições e construída a curva dose-resposta com concentrações concentração final no ensaio de 1000- 7,8 µg/mL.

### 3.5.2 Proliferação celular avaliada pelo Kit XTT

A proliferação celular e ensaios de viabilidade celular são de particular importância para aplicações de rotina em biologia celular. Sais de tetrazólio (por exemplo, MTT, XTT, WST-1) são particularmente úteis para este tipo de análise (MONTALDI, 2013; BANDARUK; MUKAI; TERAQ, 2014).

O ensaio com o kit-XTT possibilita detectar células viáveis com base no princípio da clivagem do sal de tetrazolium, XTT, na presença de um reagente de acoplamento de elétrons. Esta conversão, biorredução, ocorre somente nas células viáveis ou metabolicamente ativas, para formar o corante formazam. No teste, as células cultivadas numa placa de cultura de 96 poços são incubadas com o kit XTT (XTT Labeling Reagent e Electron-coupling Reagent), por 2-20 horas. Após o período de incubação, o corante de formazam formado é quantificado usando um espectrofotômetro de microplacas ou leitor de Elisa. A medida de absorbância a 490 e 690 nm está diretamente relacionada com o número de células viáveis. Na técnica, o sal de tetrazólio é clivado ao formazam pelo sistema succinato-tetrazólio redutase (Figura 5), que pertence à cadeia respiratória da mitocôndria e que se apresenta ativa

apenas em células metabolicamente ativas (MONTALDI, 2013; BANDARUK; MUKAI; TERAQ, 2014).

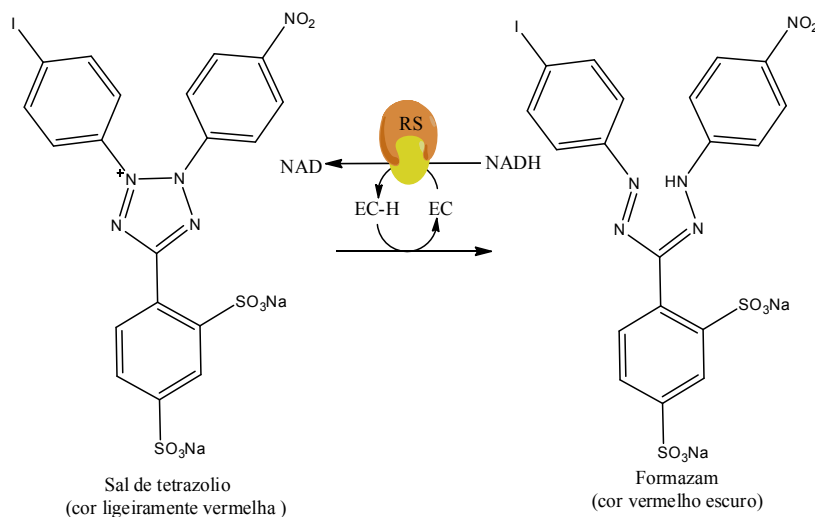


Figura 5. Clivagem do sal de tetrazólio a formazam.

RS: succinato-tetrazólio redutase, EC-H/EC: reagentes de acoplamento de elétrons.

### 3.5.2.1 Cultura de células de neuroblastoma

O ensaio de citotoxicidade do extrato aquoso de *E. dysenterica* foi realizado no laboratório de Genética, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-Ribeirão Preto, utilizando as células de neuroblastoma humano, linhagem celular SH-SY5Y (Banco de Células do Rio de Janeiro-BCRJ).

As células de neuroblastoma foram cultivadas em uma mistura de meio de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM/HAM-F-10 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub>.

Quando as células atingiram 80% de confluência, foram desagregadas, "tripsinizadas" com solução de tripsina (0,25%) e foi preparada uma subcultura de células numa densidade de 1x10<sup>4</sup> células por poço em uma placa de 96 poços. As células foram cultivadas nas condições experimentais até atingirem 70% de confluência.



### 3.5.2.2 Efeito do extrato aquoso de *E. dysenterica* na viabilidade celular.

A fim de se avaliar o efeito do extrato aquoso sobre a viabilidade celular, as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato numa faixa de concentração de 500,0 a 3,9 µg/mL. A concentração final de DMSO para todas as amostras foi ≤0,1% por poço. Quando as células atingiram uma confluência de 70% o meio foi descartado e trocado por 180 µL de meio novo suplementado com soro fetal bovino 10%. Ao término, foram adicionados 20 µL do extrato a ser avaliado nas diferentes concentrações. As células foram incubadas nas condições experimentais por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com 100 µL da solução de XTT e incubadas por 3 horas nas condições experimentais.

Preparo da solução de XTT: para cada amostra foram usados 0,2 µL de XTT Labeling Reagent, 10 µL de Electron-coupling Reagent (Cell Proliferation Kit-XTT, Roche Molecular Biochemicals) e 89,8 µL do meio de cultura. A medida da absorbância foi determinada no espectrofotômetro para microplacas Tecan Infinite M-200 (Tecan Group Ltd, Männedorf/Switzerland) a 490 e 690 nm.

Para obter a citotoxicidade induzida pelo tratamento, a absorbância no meio contendo as células tratadas com extrato foi comparada com a absorbância de seu devido controle negativo (células tratadas apenas com meio de cultura e solução de PBS na mesma concentração utilizada para as células tratadas com o extrato), que foi estabelecido como 100% de células viáveis.

Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata e os resultados foram expressos como o valor médio ± desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software estatístico GraphPad prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Os valores encontrados foram comparados com o controle com o uso da ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. Os testes buscam identificar se as médias encontradas para a amostra e para o controle são significativamente diferentes.

### 3.5.3 Teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos e antifúngicos por disco difusão

A triagem da atividade antimicrobiana e antifúngica do extrato hexânico e suas frações foi realizada no Laboratório de Pesquisas em Doenças Imunogenéticas e Crônico-degenerativas da Universidade de Brasília.

O estudo de sensibilidade foi realizado em dois tipos de agentes patogênicos de relevância clínica, bactérias e fungos, utilizando a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e três espécies de fungos pertencentes ao gênero *Candida*: *Candida albicans* ATCC 40277, *C. glabrata* ATCC 40136 e *C. krusei* ATCC 34135. Foi utilizado o método de difusão em disco descrito por NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Foi empregado o meio de cultura Sabouraud para as leveduras e Muller Hinton para bactéria, formulado segundo as instruções do fabricante, aliquotado em recipiente lacrados, aquecidos e distribuído em placas de Petri (90x15mm). As subculturas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C e 29 °C para a bactéria e as leveduras, respectivamente; a partir da subcultura, foi feita uma suspensão em 1 mL de água ultrapura, de modo que essa suspensão apresentasse uma turvação de 0,5 na escala de McFarland, correspondente a  $1-5 \times 10^6$  células/mL. A superfície do meio foi inoculada com o swab, previamente umedecido com a suspensão de células.

Foram preparadas soluções do extrato e frações diluídas em solvente adequado, em concentrações variando de 1 a 0,06 mg/mL. As amostras foram solubilizadas em hex:AcOEt 1:1. Os discos de papel esterilizados (6 mm) foram embebidos com 20 µL da amostra e foram devidamente acondicionados para secagem à temperatura ambiente durante 24 horas antes de ser colocados nas placas previamente semeadas.

Após absorção completa do inóculo no meio de cultura, foram colocados 5 discos em pontos equidistantes. Na sequência, as placas foram invertidas e incubadas em estufa à temperatura de 37 °C. O grau de sensibilidade de cada amostra e padrão foi avaliado pela medida (mm) do diâmetro da zona de inibição formada ao redor do disco após 48 horas da inoculação. Foram consideradas ativas as amostras que apresentaram 10 mm ou mais de zona clara de inibição.

Como controle positivo, foram empregados discos impregnados com ampicilina na inibição de *S. aureus* e fluconazol na inibição das três espécies de *Candida*. Como controle negativo, foram utilizados discos impregnados com solução de hexano:acetato de etila 1:1. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. As análises estatísticas dos resultados foram feitas pela média ponderada e os respectivos desvios padrão das amostras das triplicatas utilizando GraphPad Prism versão 6.0. Foi identificada a concentração inibitória mínima (CIM) definida como a menor concentração, detectada visualmente, que inibiu o crescimento do microrganismo.

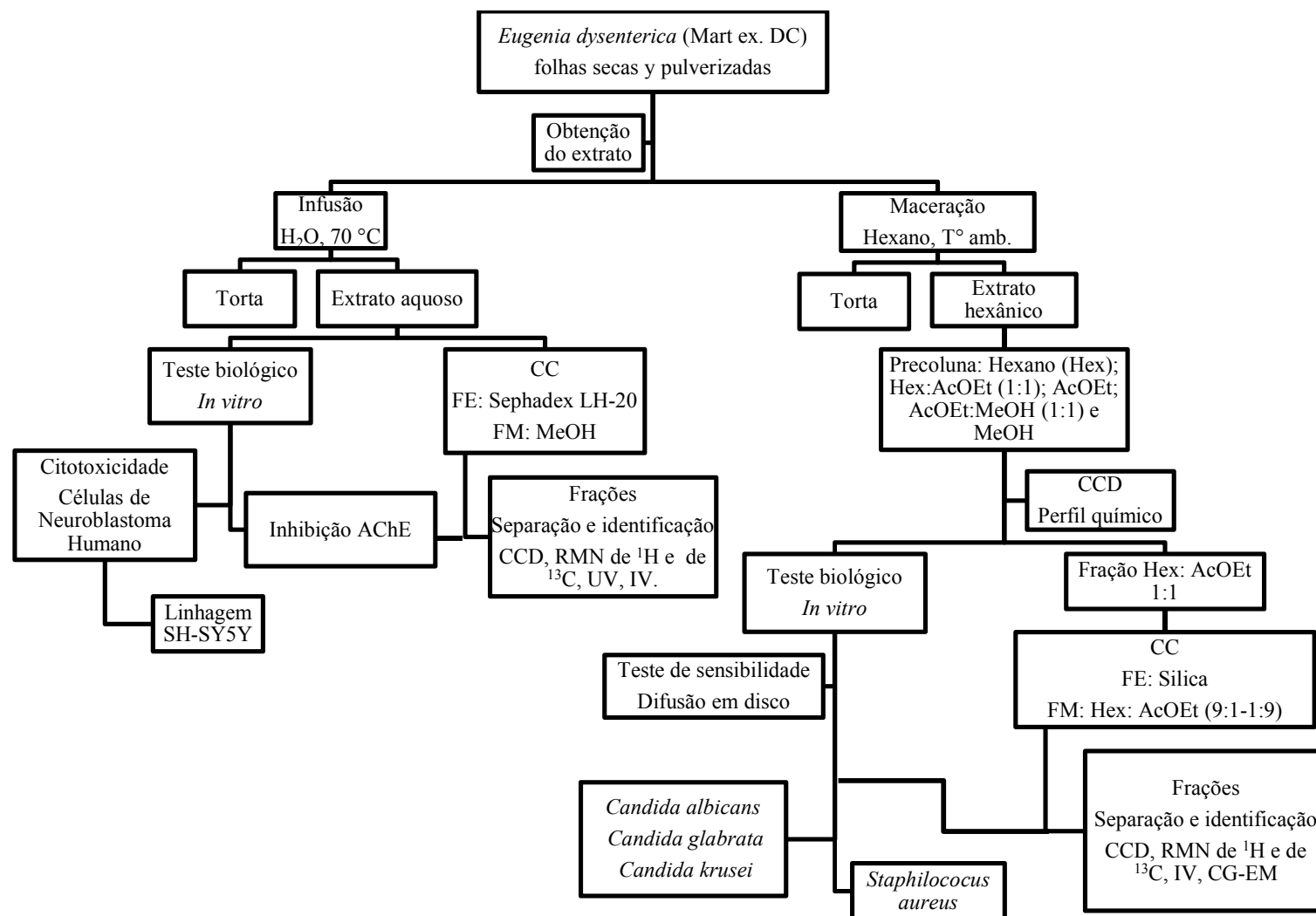


Figura 6. Representação esquemática da metodologia empregada no estudo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MATERIAL BOTÂNICO E EXTRATOS

As folhas frescas de *E. dysenterica* apresentaram umidade de campo de  $44,15 \pm 1,72$  %. Após a secagem em estufa, as folhas exibiram um teor de umidade de  $7,01 \pm 0,83$  %. A partir das folhas pulverizadas, foram obtidos 21,38 g de extrato hexânico, correspondentes a 2,18 % de rendimento. O rendimento do extrato aquoso após liofilização foi de 7,15 %. Os extratos foram armazenados em baixa temperatura ( $-30$  °C) para análises posteriores.

### 4.2 PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

#### 4.2.1 Extrato hexânico (EHX)

A partir da pré-purificação do EHX em funil sinterizado, foram obtidas cinco pré-frações: Hexano (Fhex), hexano:acetato de etila 1:1 (Fhex/AcOEt), acetato de etila (FAcOEt), acetato de etila:metanol 1:1 (FAcOEt/MeOH) e metanol (FMeOH). As porcentagens de rendimento são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de rendimento das pré-frações do extrato hexânico de folhas de *Eugenia dysenterica*.

| Pré-fração      | Peso (g) | %R*   | Secagem        |
|-----------------|----------|-------|----------------|
| Fhex            | 4,06     | 25,11 |                |
| Fhex/AcOEt      | 11,01    | 68,09 |                |
| FAcOEt          | 0,65     | 4,02  | Rotaevaporação |
| FAcOEt/MeOH 1:1 | 0,03     | 0,19  |                |
| FmeOH           | 0,42     | 2,60  |                |

\*Rendimento em relação ao EHX

Foi estudado o perfil cromatográfico das pré-frações por CCD usando o revelador **R2**. Qualitativamente, os resultados mostraram um perfil cromatográfico variado para os diferentes tipos de metabólitos secundários. Nas condições experimentais, Fhex/AcOEt e FAcOEt mostraram maior abundância de compostos. Fhex/AcOEt mostrou manchas de cor cinza, roxo e rosa em diferentes tonalidades e

FAcOEt mostrou manchas em diferentes tons de amarelo e rosa. Com base nos resultados da CCD e os porcentagens de rendimento das pré-frações, foi escolhida a pré-fração Fhex/AcOEt para continuar o estudo fitoquímico dos compostos de natureza apolar obtidos a partir do extrato hexânico.

Como resultado do fracionamento da Fhex/AcOEt foram coletadas 110 frações e reunidas em grupos conforme perfil cromatográfico analisado por CCD (Tabela 4). Para futuras considerações será adotada a nomenclatura indicada na Tabela 4.

Tabela 4. Frações obtidas da Fhex/AcOEt por CC.

| Frações reunidas | Nome: ED | %R*   | Frações reunidas | Nome: ED | %R*  |
|------------------|----------|-------|------------------|----------|------|
| 1                | EDA      | 3,90  | 36-42            | EDN      | 1,42 |
| 2                | EDB      | 4,46  | 43-50            | EDO      | 0,93 |
| 3,4              | EDC      | 4,54  | 51-61            | EDP      | 0,57 |
| 5-8              | EDD      | 44,25 | 62-65            | EDQ      | 0,41 |
| 9,10             | EDE      | 5,41  | 66-80            | EDR      | 0,28 |
| 11               | EDF      | 4,99  | 81-85            | EDS      | 0,32 |
| 12               | EDG      | 4,42  | 86-93            | EDT      | 1,21 |
| 13,14            | EDH      | 2,29  | 94-97            | EDU      | 1,92 |
| 15               | EDI      | 1,89  | 98-100           | EDV      | 1,20 |
| 16-21            | EDJ      | 2,66  | 101              | EDX      | 1,12 |
| 22-26            | EDK      | 3,36  | 102-106          | EDY      | 0,55 |
| 27-30            | EDL      | 2,23  | 107              | EDZ      | 0,19 |
| 31-35            | EDM      | 1,89  | 108-110          | EDA1     | 0,39 |

\*Rendimento em relação a Fhex/AcOEt

Considerando o perfil de eluição, as frações EDE, EDF e EDG, foram escolhidas para continuar o processo de purificação e identificação. Qualitativamente, as manchas observadas são características de metabólitos do grupo dos triterpenos. Conforme esta informação qualitativa, as frações foram comparadas com padrões de triterpenos quando revelados nas mesmas condições por CCD (Figura 7). Foram escolhidos 7 triterpenos e 1 esteroide (Figura 8) para realizar as comparações:  $\alpha$ -amirina (**35**),  $\beta$ -amirina (**36**), lupeol (**37**), estigmasterol (**38**), friedelina (**39**), friedelanol (**40**), acetato de  $\alpha$ -amirina (**41**) e  $\beta$ -sitosterol (**42**).

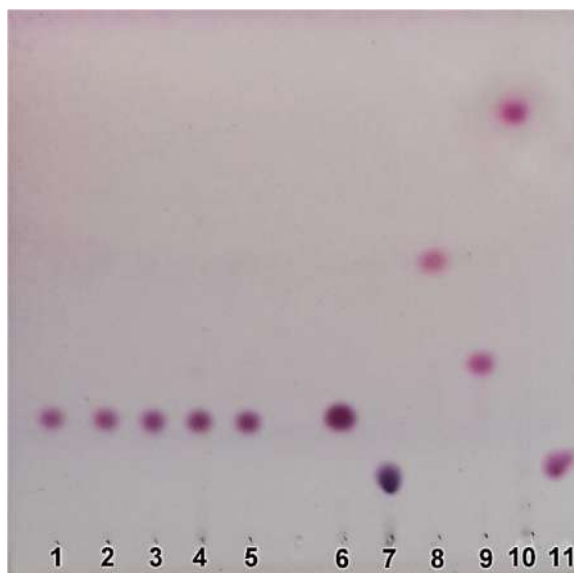


Figura 7. CCD comparativa das frações e os padrões de triterpenos.

Na ordem de esquerda para direita: 1. EDE, 2. EDF, 3. EDG, 4.  $\alpha$ -amirina, 5.  $\beta$ -amirina, 6. lupeol, 7. estigmasterol, 8. friedelina, 9. friedelanol, 10. acetato de  $\alpha$ -amirina, 11.  $\beta$ -sitosterol. Eluente: hex/AcOEt 9:1; Solução reveladora: anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Tabela 5. Fator de retenção (Rf) das frações e padrões de triterpenos.

| Fração/Padrão                          | Distância percorrida (cm) | Rf    |
|--|---------------------------|-------|
| EDE                                    | 1,30                      | 0,236 |
| EDF                                    | 1,30                      | 0,236 |
| EDG                                    | 1,30                      | 0,236 |
| $\alpha$ -amirina                      | 1,30                      | 0,236 |
| $\beta$ -amirina                       | 1,25                      | 0,227 |
| lupeol                                 | 1,30                      | 0,236 |
| estigmasterol                          | 0,60                      | 0,109 |
| Friedelina                             | 2,90                      | 0,527 |
| Friedelanol                            | 1,80                      | 0,327 |
| Acetato de $\alpha$ -amirina           | 4,10                      | 0,745 |
| $\beta$ -sitosterol                    | 0,70                      | 0,127 |
| Distância percorrida pelo eluente (cm) |                           | 5,50  |

Eluente: hex/AcOEt 7:3; Solução reveladora: anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Na Figura 7, pode ser observado que as frações EDE, EDF e EDG apresentam um perfil de eluição similar aos padrões  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e lupeol. O valor do fator de retenção (Rf) para as frações e os padrões é indicado na Tabela 5.



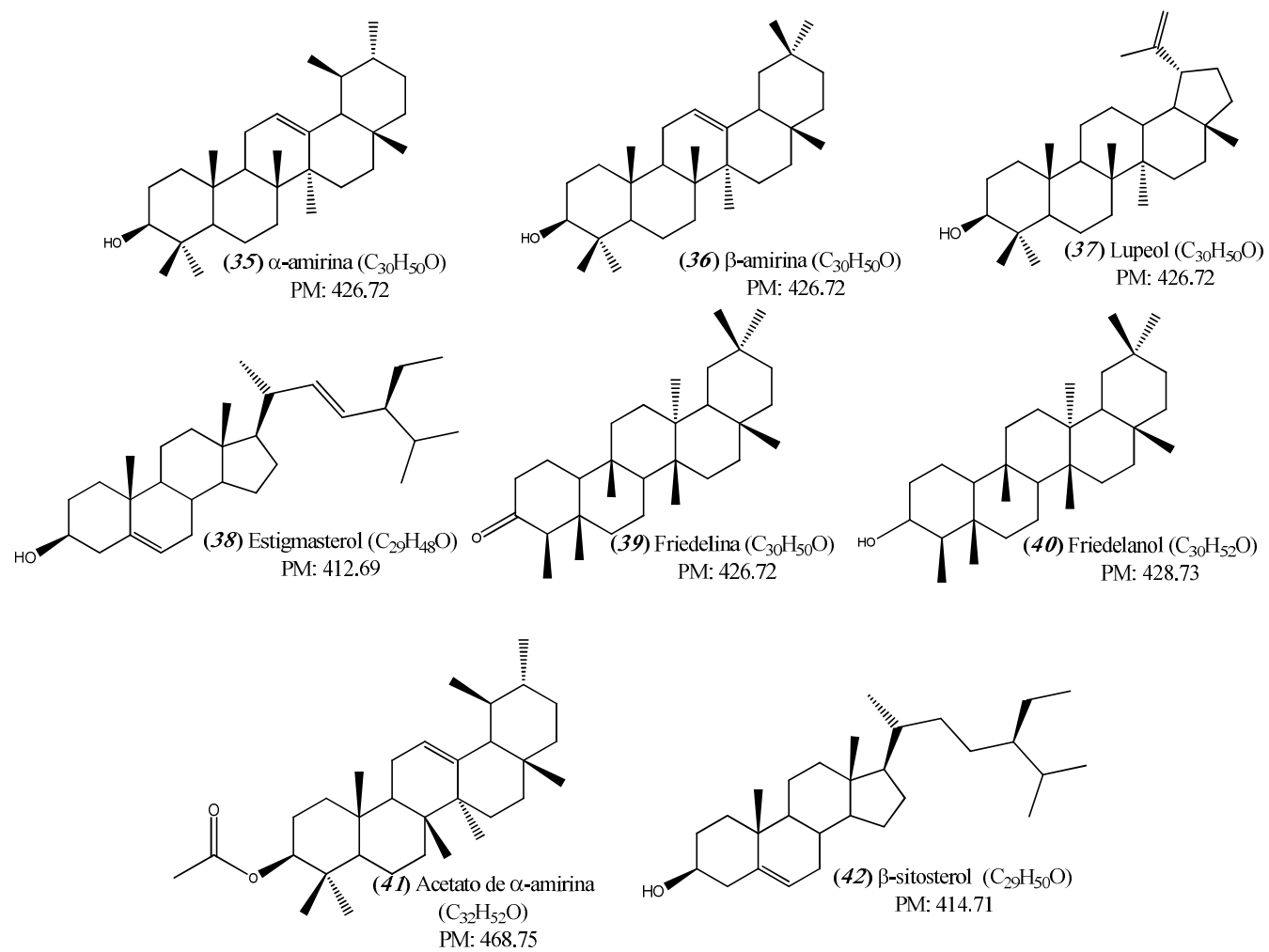


Figura 8. Padrões de triterpenos usados na CCD.

Os resultados não foram conclusivos com relação à identidade da molécula mas permitiram inferir que tratam de metabólitos do grupo dos triterpenos e que podem ter um núcleo estrutural semelhante. Os três padrões,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e lupeol, contêm o mesmo número de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio (Formula molecular  $C_{30}H_{50}O$ ), com peso molecular de 426,72 g/mol.  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina exibem uma dupla ligação na posição 12 enquanto o lupeol exibe um grupo isopropenilo no carbono da posição 19 (Figura 8).

A observação de uma mancha na CCD não é conclusiva sob a obtenção de uma substância pura e requer análise química complementar. Assim, foi realizada a análise preliminar por RMN de duas frações, EDG e EDD (escolhida por apresentar o maior rendimento das frações obtidas), considerando a possibilidade de a amostra ser constituída de uma mistura de substâncias. A partir dos espectros de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  foram observados grupos de sinais entre  $\delta$  7,5-0,2 e  $\delta$  170-1,0, respectivamente. Em vista dos resultados foi possível concluir que estas amostras apresentam mistura de substâncias; e em função disto, foi realizada uma nova separação por CC.

#### CROMATOGRAFIA EM COLUNA DAS FRAÇÕES EDE E EDG

As frações EDE e EDG foram submetidas à separação por CC. Como sistema de eluição foi usado Hex/AcOEt 7:3. Foram coletadas 25 subfrações (volume final 5 mL), e reunidas em grupos conforme perfil cromatográfico analisado por CCD (Tabela 6). O perfil de eluição por CCD para as subfrações EDG e EDE se manteve, mostrando uma mancha característica violeta (Figura 9). Na figura, foram escolhidas as subfrações que se mostraram no estado sólido e de cor branco a temperatura ambiente. Qualitativamente foi inferido que o processo de separação tinha sido efetivo para a separação dos compostos de interesse. Os valores de  $R_f$  são indicados na Tabela 7.

Tabela 6. Subfrações obtidas na pré-purificação por CC das frações EDE e EDG.

| EDE        |       |       | EDG        |           |       |
|------------|-------|-------|------------|-----------|-------|
| Subfrações | Nome  | %R*   | Subfrações | Nome: EDG | %R*   |
| 1,2        | EDE1  | 1,06  | 1-3        | EDG1      | 0,52  |
| 3-5        | EDE2  | 1,51  | 4,5        | EDG2      | 5,27  |
| 6-9        | EDE3  | 5,27  | 6,7        | EDG3      | 0,92  |
| 10         | EDE4  | 13,91 | 8          | EDG4      | 1,05  |
| 11         | EDE5  | 20,72 | 9          | EDG5      | 0,55  |
| 12         | EDE6  | 19,06 | 10         | EDG6      | 7,24  |
| 13         | EDE7  | 16,54 | 11         | EDG7      | 14,36 |
| 14         | EDE8  | 4,02  | 12         | EDG8      | 16,04 |
| 15         | EDE9  | 5,50  | 13         | EDG9      | 18,72 |
| 16         | EDE10 | 5,22  | 14         | EDG10     | 7,50  |
| 17-19      | EDE11 | 2,06  | 15         | EDG11     | 8,25  |
| 20         | EDE12 | 1,07  | 16         | EDG12     | 10,50 |
| 21-25      | EDE13 | 1,68  | 17-20      | EDG13     | 4,67  |
|            |       |       | 21-25      | EDG14     | 2,50  |

\*Rendimento em relação as subfrações EDE e EDG respectivamente

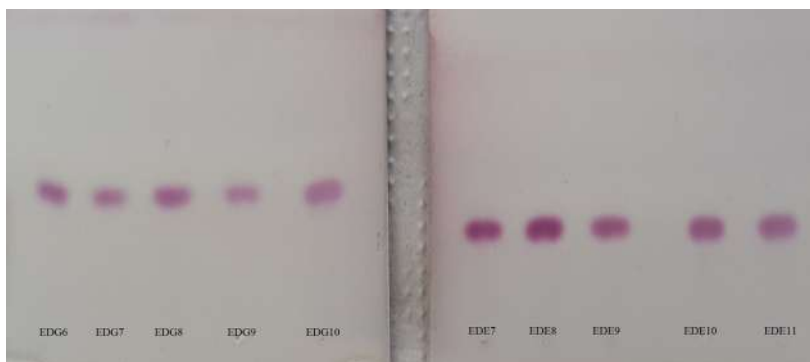


Figura 9. CCD comparativa das subfrações obtidas na pré-purificação de EDE e EDG.  
Eluente: hex/AcOEt 7:3; Solução reveladora: anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Tabela 7. Fator de retenção (Rf) das subfrações obtidas por CC de EDE e EDG.

| EDG   |                           |       | EDE   |                           |       |
|---|---------------------------|-------|---|---------------------------|-------|
| Subfração                                   | Distância percorrida (cm) | Rf    | Subfração                                   | Distância percorrida (cm) | Rf    |
| EDG6  | 1,90                      | 0,463 | EDE7  | 1,35                      | 0,364 |
| EDG7  | 1,85                      | 0,451 | EDE8  | 1,35                      | 0,364 |
| EDG8  | 1,85                      | 0,451 | EDE9  | 1,35                      | 0,364 |
| EDG9  | 1,90                      | 0,463 | EDE10                                       | 1,40                      | 0,378 |
| EDG10                                       | 1,90                      | 0,463 | EDE11                                       | 1,40                      | 0,378 |
| Distância percorrida pelo eluente (cm): 4,1 |                           |       | Distância percorrida pelo eluente (cm): 3,7 |                           |       |

Eluente Hex/AcOEt 7:3; Solução reveladora: anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Considerando os resultados prévios de RMN, uma subfração (EDG6) foi escolhida para análise por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  revelou um grupo abundante de sinais na faixa  $\delta$  169 -1,0 enquanto que o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  revelou um conjunto de sinais na faixa de  $\delta$  7,23 – 0,2. Estes resultados são semelhantes aos obtidos antes da pré-purificação e evidenciam que a subfração EDG6 apresenta mistura de moléculas.

Quanto à técnica de separação por cromatografia em coluna pode-se apreciar que foi efetiva quanto ao objetivo de separar o grupo de compostos de interesse (terpenoides). No entanto, esta técnica não permitiu isolar os componentes individuais. Possivelmente as moléculas pertencem ao mesmo grupo de metabólitos secundários e apresentam propriedades como fórmula molecular, estrutura molecular e peso molecular semelhantes.

Tendo em vista os resultados obtidos, foi feita a análise por CG-EM para continuar o estudo de elucidação estrutural dos compostos presentes em algumas das frações obtidas a partir da pré-fração Fhex/AcOEt. Como já foi indicado na seção metodológica (3.3.3), esta técnica é de utilidade para resolver amostras complexas, sendo neste caso amostras que apresentam moléculas com propriedades físicas e químicas semelhantes.

#### 4.2.1.1 Análise por CG-EM das frações do extrato hexânico de folhas de *Eugenia dysenterica*

A análise CG-EM foi realizada nas frações que apresentaram um perfil cromatográfico variado quando reveladas por CCD com solução de anisaldeído/ácido sulfúrico; assim, foram escolhidas EDA, EDB, EDC, EDD, EDE, EDF e EDG. As amostras foram preparadas em clorofórmio grau analítico a 1 mg/mL. Os resultados são mostrados na Tabela 8.

As subfrações revelaram um grupo diverso de compostos, com tempos de retenção variando de 21,68 até 51,62 min. O perfil de fragmentação dos compostos e o tempo de retenção foram comparados com a biblioteca interna (NIST) do espectrômetro de massas. Esta ferramenta foi de utilidade para identificar dois compostos,  $\alpha$ -tocoferol (**43**) presente nas frações EDA e EDB, e o composto acetil

tributil citrato (**44**) presente na fração EDE (Tabela 8). Dos picos cromatográficos restantes, não foi identificado qualquer outro composto com ajuda da biblioteca, porém o resultado comparativo mostrou porcentagens de semelhança menores a 85% com triterpenoides das séries lupano e ursano.

Com base nos resultados foi estudado o perfil de fragmentação das moléculas presentes nas frações EDC-EDG, e em comparação com dados da literatura (SHIOJIMA *et al.*, 1992), foram identificados quatro triterpenos pentacíclicos: urs-12-en-3 $\beta$ -ol ( $\alpha$ -amirina) (**45**); olean-12-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -amirina) (**46**), neolupen-12-en-3 $\beta$ -ol (neolupenol) (**47**) e gammacer-16-en-3 $\beta$ -ol (**48**). A estrutura dos compostos é mostrada na Figura 10 e sua ocorrência nas frações é indicada na Tabela 9.

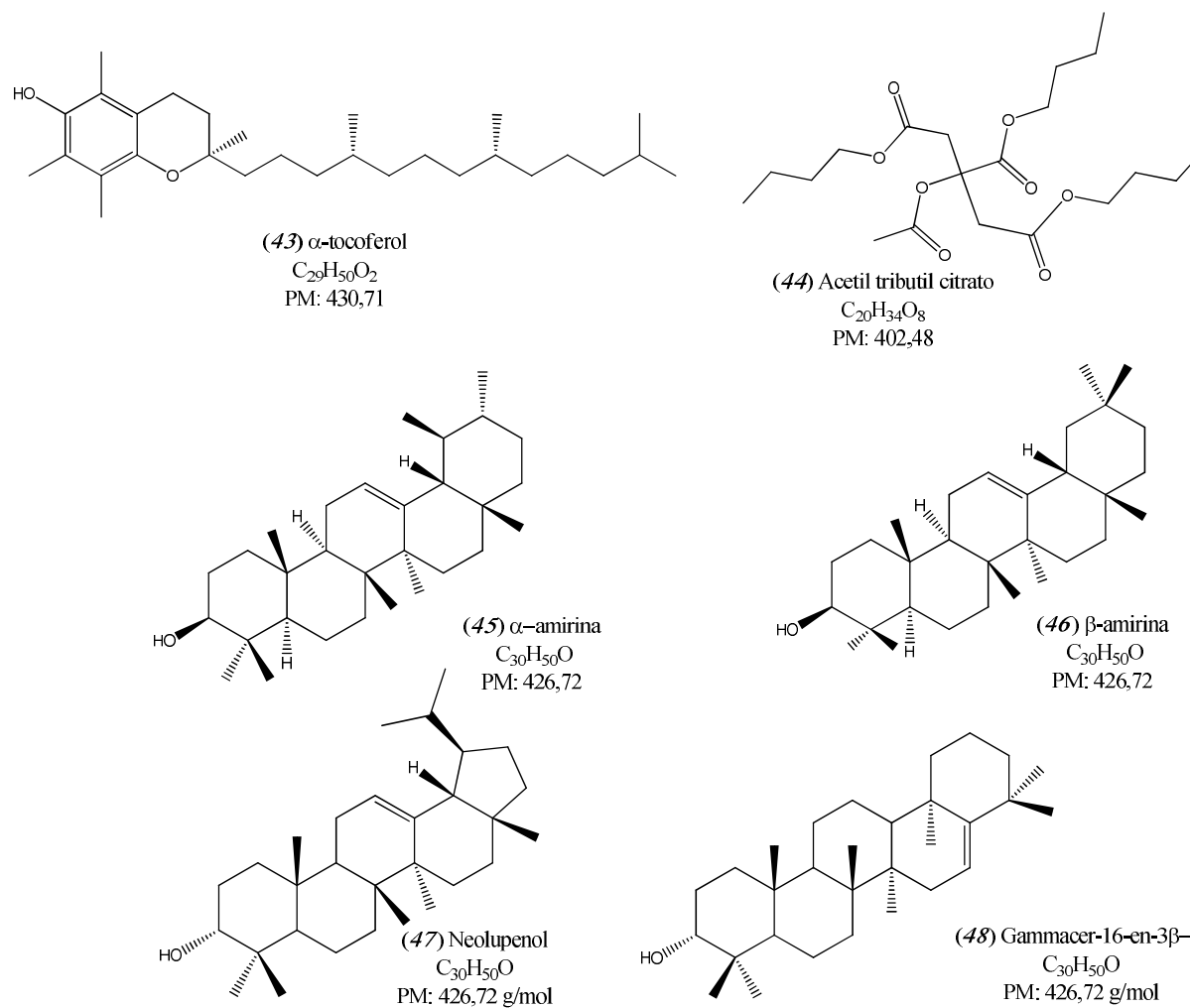


Figura 10. Estrutura química dos compostos separados e identificados por CG-EM no extrato hexânico de *E. dysenterica*.

Tabela 8. Resultado da análise por CG-EM das subfrações de *Eugenia dysenterica*

| Subfração | Pico | Área (%) | tR (min) | Pico Base | M <sup>+</sup> | Composto                              |
|-----------|------|----------|----------|-----------|----------------|---------------------------------------|
| EDA       | 1    | 49,41    | 48,008   | 165,10    | 430            | α-tocoferol ( <b>43</b> )             |
|           | 2    | 13,48    | 39,842   | 149,05    | 355            | NI                                    |
|           | 3    | 1,82     | 31,875   | 149,05    | 150            | NI                                    |
|           | 4    | 12,00    | 22,333   | 67,05     | 138            | NI                                    |
|           | 5    | 13,90    | 21,683   | 43,01     | 177            | NI                                    |
| EDB       | 1    | 25,80    | 48,000   | 165,10    | 430            | α-tocoferol ( <b>43</b> )             |
|           | 2    | 33,40    | 39,850   | 149,00    | 355            | NI                                    |
|           | 3    | 2,06     | 37,442   | 129,10    | 207            | NI                                    |
|           | 4    | 10,95    | 22,342   | 67,05     | 138            | NI                                    |
|           | 5    | 12,30    | 21,692   | 43,01     | 177            | NI                                    |
| EDC       | 1    | 29,95    | 51,583   | 218,15    | 426            | α-amirina ( <b>45</b> )               |
|           | 2    | 12,84    | 51,183   | 218,15    | 426            | β-amirina ( <b>46</b> )               |
|           | 3    | 46,48    | 51,117   | 189,10    | 426            | Gammacer-16-en-3β-ol ( <b>48</b> )    |
|           | 4    | 2,63     | 50,800   | 207,00    | 429            | NI                                    |
|           | 5    | 1,44     | 39,850   | 149,05    | 355            | NI                                    |
| EDD       | 1    | 30,96    | 51,633   | 218,10    | 426            | α-amirina ( <b>45</b> )               |
|           | 2    | 5,12     | 51,191   | 218,10    | 426            | β-amirina ( <b>46</b> )               |
|           | 3    | 41,81    | 51,175   | 189,10    | 426            | Gammacer-16-en-3β-ol ( <b>48</b> )    |
|           | 4    | 17,27    | 51,050   | 218,10    | 426            | Neolupenol ( <b>47</b> )              |
|           | 5    | 3,67     | 50,808   | 207,00    | 429            | NI                                    |
| EDE       | 1    | 49,94    | 51,178   | 189,10    | 426            | Gammacer-16-en-3β-ol ( <b>48</b> )    |
|           | 2    | 11,18    | 51,049   | 218,15    | 426            | Neolupenol ( <b>47</b> )              |
|           | 3    | 2,10     | 50,817   | 206,95    | 429            | NI                                    |
|           | 4    | 1,28     | 44,829   | 161,00    | 393            | NI                                    |
|           | 5    | 0,53     | 39,855   | 149,00    | 279            | NI                                    |
|           | 6    | 2,82     | 35,261   | 185,05    | 279            | Acetil tributil citrato ( <b>44</b> ) |
| EDF       | 1    | 3,21     | 52,833   | 206,95    | 451            | NI                                    |
|           | 2    | 1,38     | 52,683   | 206,95    | 451            | NI                                    |
|           | 3    | 2,33     | 52,250   | 206,95    | 479            | NI                                    |
|           | 4    | 21,10    | 51,283   | 189,10    | 426            | Gammacer-16-en-3β-ol ( <b>48</b> )    |
|           | 5    | 8,98     | 50,850   | 204,10    | 426            | NI                                    |
|           | 6    | 1,06     | 45,500   | 206,95    | 365            | NI                                    |
|           | 7    | 8,98     | 45,033   | 161,05    | 394            | NI                                    |
| EDG       | 1    | 30,74    | 51,617   | 218,10    | 426            | Gammacer-16-en-3β-ol ( <b>48</b> )    |
|           | 2    | 12,89    | 50,808   | 135,15    | 426            | NI                                    |
|           | 3    | 1,01     | 50,517   | 207,00    | 414            | NI                                    |
|           | 4    | 1,16     | 48,083   | 43,00     | 430            | NI                                    |

NI: não identificado; tR: Tempo de retenção; M<sup>+</sup>: íon molecular

Tabela 9. Ocorrência dos compostos identificados nas diferentes frações.

| Composto                                   | Fração |     |     |     |     |     |     |
|--|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | EDA    | EDB | EDC | EDD | EDE | EDF | EDG |
| $\alpha$ -tocoferol ( <b>43</b> )          | X      | X   |     |     |     |     |     |
| acetil tributil citrato ( <b>44</b> )      |        |     |     |     | X   |     |     |
| $\alpha$ -amirina ( <b>45</b> )            |        |     | X   | X   |     |     |     |
| $\beta$ -amirina ( <b>46</b> )             |        |     | X   | X   |     |     |     |
| neolupenol ( <b>47</b> )                   |        |     |     | X   | X   |     |     |
| gammacer-16-en-3 $\beta$ -ol ( <b>48</b> ) |        |     | X   | X   | X   | X   | X   |

O composto  $\alpha$ -tocoferol (**43**) foi identificado nas frações mais apolares, EDA e EDB, com tempo de retenção aproximado de 48,0 minutos. O plastificante acetil tributil citrato (**44**) só foi detectado na fração EDE, com tempo de eluição de 35,3 min. Os triterpenoides  $\alpha$ -amirina (**45**) e  $\beta$ -amirina (**46**) foram detectados nas frações EDC e EDD, com tempos de retenção aproximados 51,6 e 51,1 minutos, respectivamente. Neolupenol (**47**) foi identificado nas frações EDD e EDE, mostrando tempo de retenção aproximado de 51,0 min. O composto gammacer-12-en-3 $\beta$ -ol (**48**), por sua vez, apresentou uma distribuição mais ampla, esteve presente nas frações EDC, EDD, EDE, EDF e EDG com tempo de retenção aproximado entre 51,1 e 51,3 minutos.

#### 4.2.1.2 Caracterização dos compostos presentes na fração EDD

O espectro de infravermelho (IV) da fração EDD é mostrado na Figura 11. Foi identificada uma banda intensa de absorção em 3275,2  $\text{cm}^{-1}$  característica do estiramento de ligação O-H. As bandas entre 2942 e 2869  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a estiramento da ligação C-H de grupos metílicos e metilênicos; em 1744  $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento de ligação C=O; em 1644  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída a ligação dupla C=C; e em 987  $\text{cm}^{-1}$  um sinal de deformação da ligação C-H fora do plano. Os sinais no espectro IV nessa fração são semelhantes aos observados em EDE, EDF e EDG e são característicos de núcleos estruturais de triterpenos.



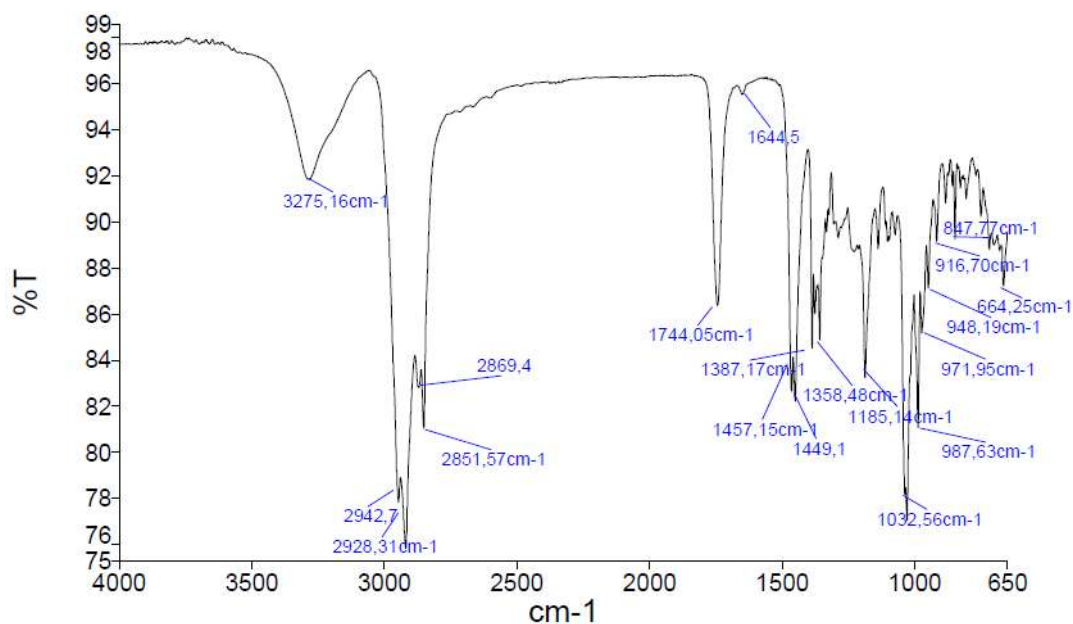


Figura 11. Espectro de infravermelho da fração EDE

O espectro de massas (EM) e os mecanismos de fragmentação propostos para os triterpenos **45** e **46** são mostrados nas Figuras 12 e 13 respectivamente. O EM de triterpenos com dupla ligação na posição C12-C13, gera um fragmento com valor  $m/z$  218. Nos grupos ursano e oleanano (Figura 12) este fragmento corresponde ao pico base e é produzido via uma reação Retro-Diels-Alder. O carbono vizinho à ligação dupla (C14) fica carregado positivamente e a ligação alílica C9-C11 é clivada para gerar o fragmento correspondente ao pico base. Os fragmentos com  $m/z$  203 e 189 são formados por perda de dois grupos metila (BUDZIKIEWICZ; WILSON; DJERASSI, 1963; OGUNKOYA, 1981; SHIOJIMA *et al.*, 1992).

Os espectros de massas da  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina (Figura 13) apresentaram o mesmo padrão de fragmentação, com fragmentos característicos em  $m/z$  218, 203 e 189. A diferença entre os dois espectros está relacionada com a intensidade dos sinais no espectro de MS. No grupo ursano o sinal em  $m/z$  218 é mais intenso, enquanto o sinal em  $m/z$  189 é menos intenso quando comparados com o grupo dos oleananos (BASAR, 2005). Esta tendência foi observada tanto no composto **45** como no composto **46**, e está em acordo com os resultados encontrados por SILVA, C. (2007).

Para esses triterpenos, o fragmento com  $m/z$  135 é formado a partir da reação Retro-Diels-Alder, onde é produzido um fragmento que, após perda de um grupo metila e rompimento das ligações C18-C19 e C21-C22, gera o fragmento observado no espectro de massas (Figura 13) (BUDZIKIEWICZ; WILSON; DJERASSI, 1963; SHIOJIMA *et al.*, 1992).

O espectro de massas do composto **48** é mostrado na Figura 14. A fragmentação inicia com a clivagem das ligações C11-C12 e C8-C14 para produzir um fragmento radical-cátion com  $m/z$  204. O fragmento com  $m/z$  189 é produzido por perda de um grupo metila. O fragmento com  $m/z$  135 é produzido por rompimento das ligações C13-C18 e C15-C16 para formar um cátion radical estabilizado por ressonância (Figura 15) (SHIOJIMA *et al.*, 1992).

O resumo dos principais sinais observados no espectro de massas para esses três triterpenos é mostrado a seguir; a abundância relativa é indicada entre parêntese:

$\alpha$ -amirina (Figura 12): 426 (5,03), 411 (7,09), 393 (1,98), 218 (100,00), 207 (33,25), 203 (40,05), 189 (20,04), 175 (16,13), 135 (21,23).

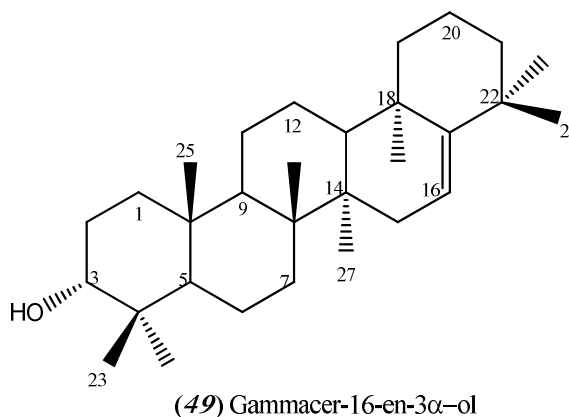
$\beta$ -amirina (Figura 12): 426 (5,44), 411 (0,62), 393 (2,38), 218 (100,00), 207 (22,82), 203 (30,01), 189 (33,92), 175 (11,61), 135 (39,64).

Gammacer-16-en-3 $\beta$ -ol (Figura 14): 426 (510,54), 411 (25,08), 393 (3,95), 218 (28,47), 204 (75,79), 203 (24,69), 189 (100,00), 177 (77,28), 150 (16,18), 135 (41,21).

Os resultados experimentais vão ao encontro do perfil de fragmentação reportado na literatura (SHIOJIMA *et al.*, 1992). O perfil de fragmentação do composto **47**, presente na fração EDD, não permitiu concluir sobre a identidade do composto; as considerações a sua identificação são descritas na secção 4.2.1.3.

Segundo os dados obtidos por CG-MS, EDD foi a única fração que apresentou os quatro triterpenos identificados. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  dessa fração mostrou um conjunto diversificado de sinais entre  $\delta$  145 e 1,01 (Figura 16), confirmando os resultados da análise por CG-MS, que sugere uma mistura de compostos de natureza triterpênica. Os dois grupos de sinais,  $\delta$  124,4-139,6 e  $\delta$  121,7-145,2 são característicos dos carbonos  $\text{sp}^2$  das posições C12 e C13 dos triterpenos **45** e **46** (MAHATO; KUNDU, 1994), os dois sinais em  $\delta$  116,9 e 145,2 correspondentes aos carbonos  $\text{sp}^2$  das posições C16 e C17 da molécula **48** (SHIOJIMA *et al.*, 1989).

Os triterpenos identificados apresentam um grupo hidroxila na posição 3 do esqueleto carbônico. O deslocamento químico para o carbono C3 está em torno de  $\delta$  79,0 (MAHATO; KUNDU, 1994). No gammacer-16-en-3 $\alpha$ -ol (**49**), o carbono C3, com um grupo hidroxila na posição  $\alpha$ , apresenta um deslocamento em torno de  $\delta$  76,3, aproximadamente três unidades a menos do que o composto proposto. Os dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os dados reportados na literatura e um resumo é mostrado na Tabela 10.



No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 17) puderam ser observados sinais entre  $\delta$  0,70 e 1,95 (posições C22 a C30) correspondentes a hidrogênios metílicos e metilênicos dos esqueletos citados; em  $\delta$  5,10 e 5,15 foram observados tripletos dos hidrogênios H12 característicos de triterpenos dos tipos ursano e oleanano, respectivamente (AGETA *et al.*, 1981; VÁZQUEZ; PALAZON; NAVARRO, 2012). No grupo gammacerano pode ser observado um sinal duplo duplete em  $\delta$  5,50 característico do hidrogênio da posição C16 (SHIOJIMA *et al.*, 1989).

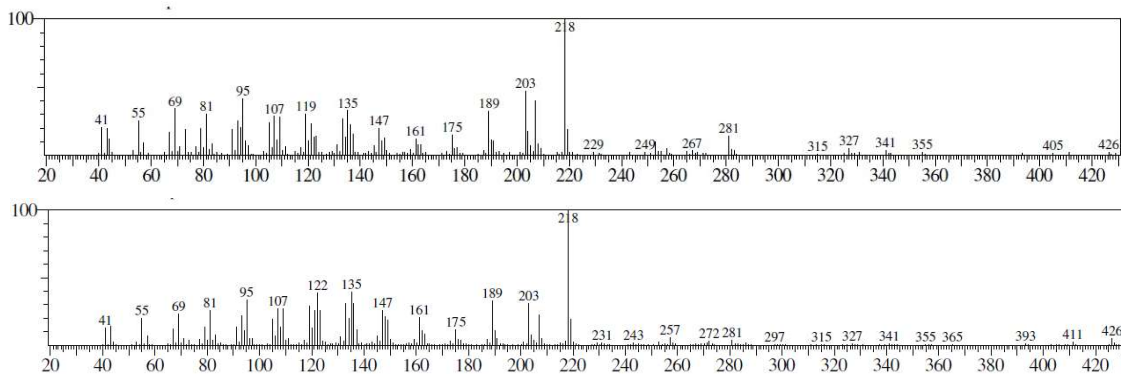


Figura 12. Espectro de massas dos picos correspondentes a  $\alpha$ -amirina (parte superior) e a  $\beta$ -amirina (parte inferior).

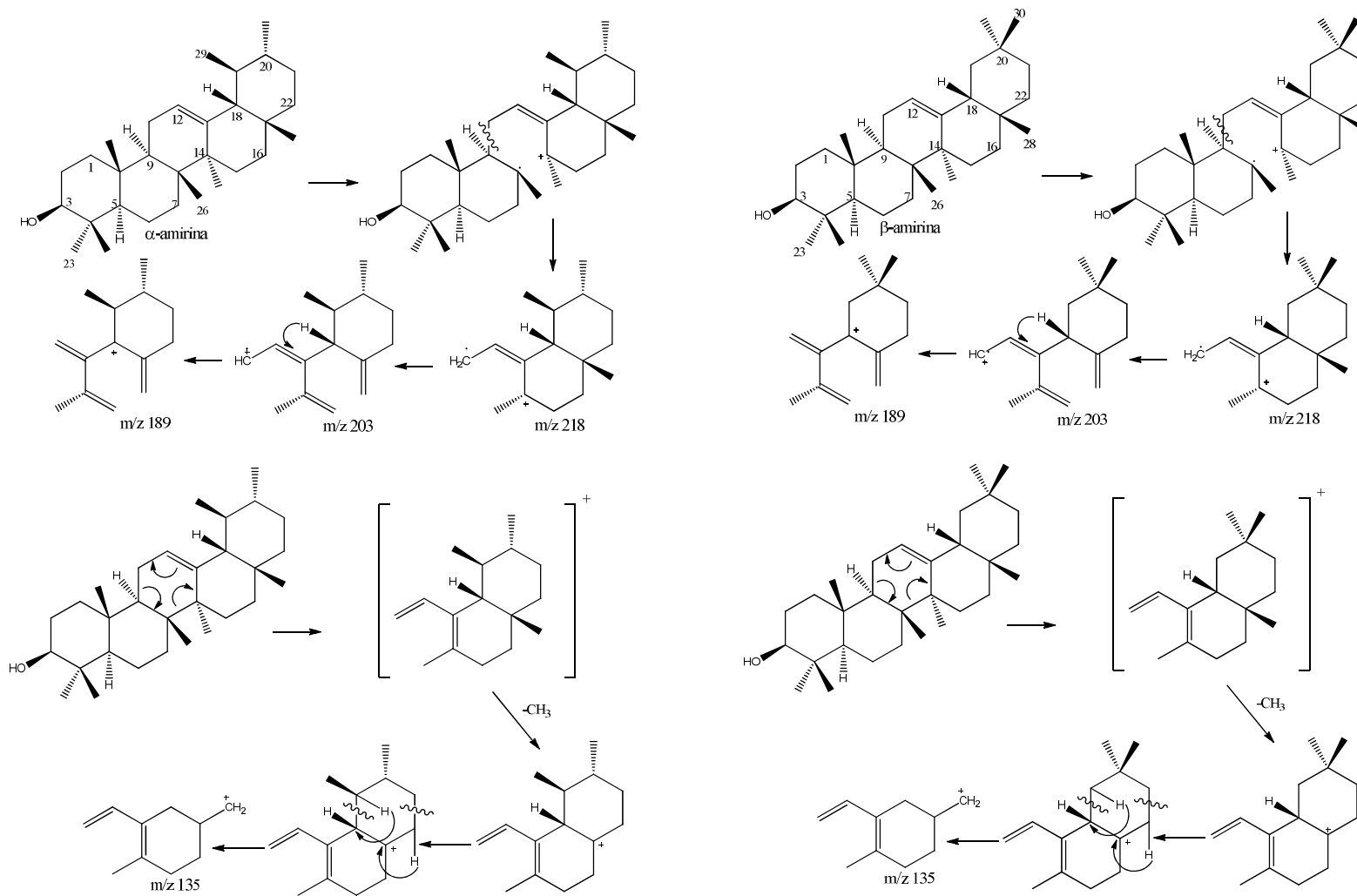


Figura 13. Proposta de fragmentação para os triterpeno  $\alpha$ -amirina (lado esquerdo) e  $\beta$ -amirina (lado direito).

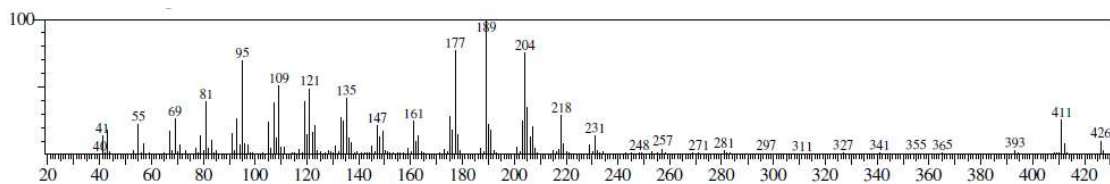


Figura 14. Espectro de massas do pico correspondente ao gammacer-16-en-3 $\beta$ -ol.

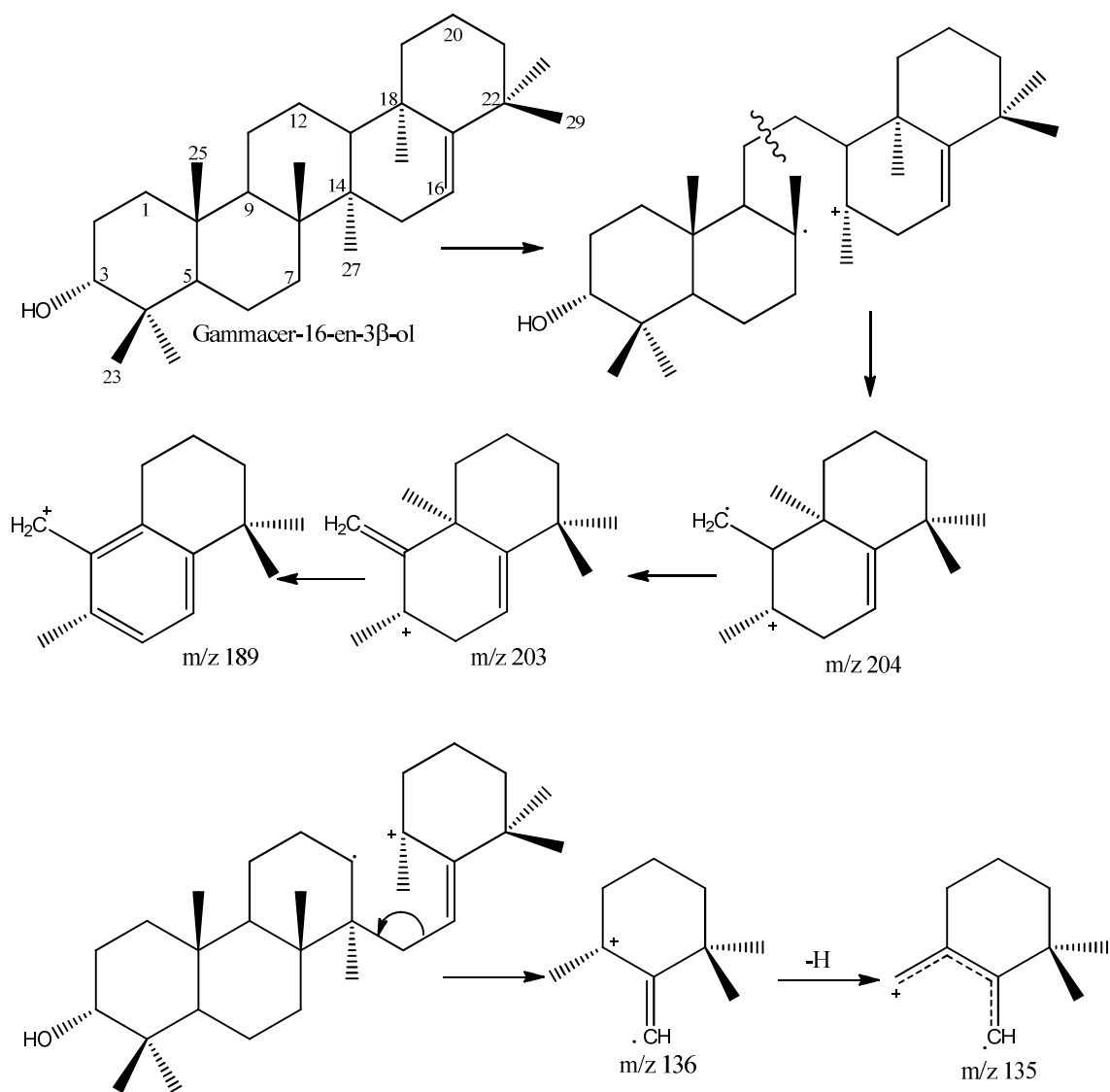


Figura 15. Proposta de fragmentação para o triterpeno gammacer-16-en-3 $\beta$ -ol.

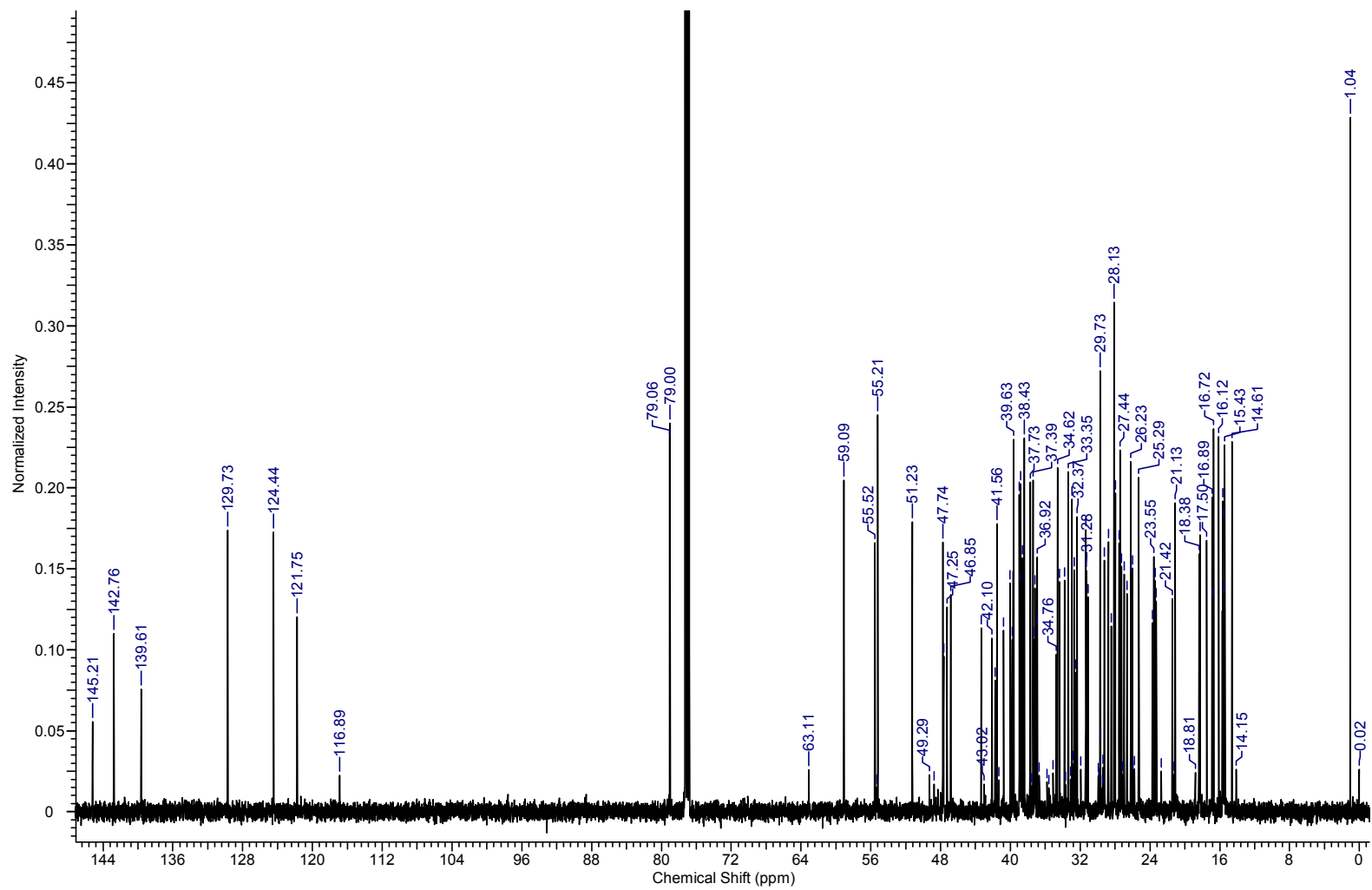


Figura 16. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da subfração EDD (150 MHz,  $\text{DMSO} - d_6$ )

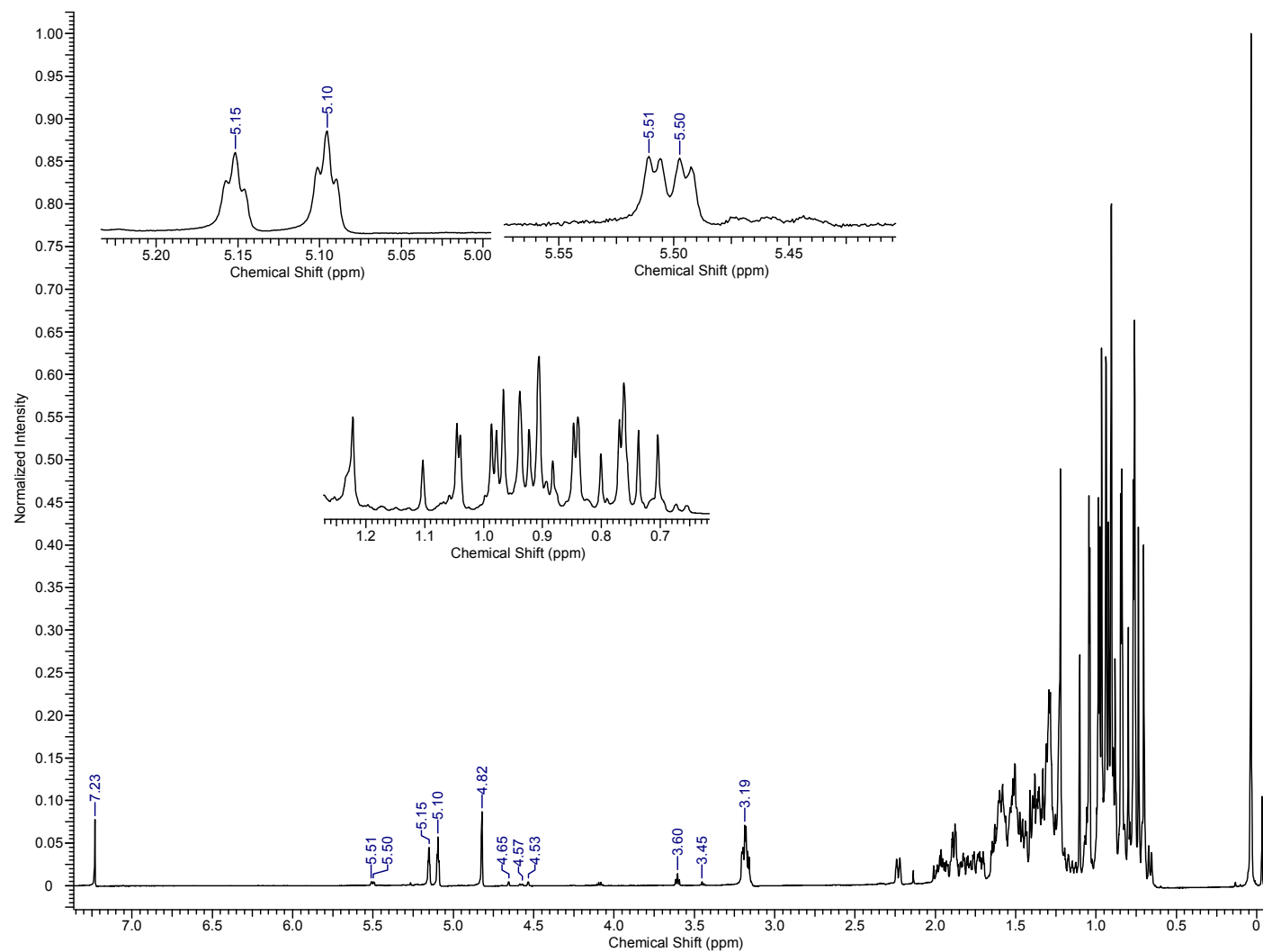


Figura 17. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração EDD (600 MHz,  $\text{DMSO} - d_6$ )

Tabela 10. Dados experimentais e teóricos de RMN de  $^{13}\text{C}$  para alguns triterpenos pentacíclicos.

| C  | EDD   | SHIOJIMA <i>et al.</i> (1989)        |                                       | EDD          | MAHATO;KUNDU<br>(1994)       |                  | EDE   | SAGAR;<br>DHOKE;SHAW<br>(2004) |
|----|-------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------|------------------------------|------------------|-------|--------------------------------|
|    |       | $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )         |                                       |              | $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ) |                  |       | $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )   |
|    |       | Gammacer<br>-16-en-3 $\beta$ -<br>ol | Gammacer<br>-16-en-3 $\alpha$ -<br>ol |              | $\alpha$ -<br>amirina        | $\beta$ -amirina |       | Neolupenol                     |
| 1  | 38,8  | 38,7                                 | 33,3                                  | 38,6         | 38,7                         | 38,7             | 41,7  | 41,9                           |
| 2  | 27,4  | 27,4                                 | 25,4                                  | 27,2; 27,3   | 27,2                         | 27,3             | 28,4  | 28,5                           |
| 3  | 79,1  | 79,1                                 | 76,3                                  | 79,0; 79,1   | 78,3                         | 79,0             | 79,1  | 79,5                           |
| 4  | 38,9  | 38,9                                 | 37,5                                  | 38,6; 38,8   | 38,7                         | 38,8             | 37,2  | 37,3                           |
| 5  | 55,2  | 55,3                                 | 49,0                                  | 55,2; 55,3   | 55,2                         | 55,3             | 55,5  | 55,6                           |
| 6  | 18,4  | 18,7                                 | 18,7                                  | 18,3; 18,4   | 18,3                         | 18,5             | 19,0  | 18,8                           |
| 7  | 33,4  | 33,5                                 | 33,4                                  | 32,7; 32,8   | 32,9                         | 32,8             | 33,4  | 33,4                           |
| 8  | 41,3  | 41,3                                 | 41,5                                  | 40,1; 38,8   | 40,0                         | 38,8             | 40,1  | 40,4                           |
| 9  | 49,3  | 50,5                                 | 50,2                                  | 47,7         | 47,7                         | 47,7             | 48,0  | 48,1                           |
| 10 | 37,2  | 37,1                                 | 37,2                                  | 36,9; 37,6   | 36,9                         | 37,6             | 34,3  | 34,1                           |
| 11 | 21,4  | 21,4                                 | 21,2                                  | 23,4; 23,5   | 23,3                         | 23,6             | 27,3  | 27,0                           |
| 12 | 22,7  | 22,7                                 | 22,7                                  | 124,4; 121,7 | 124,3                        | 121,8            | 124,4 | 124,8                          |
| 13 | 46,8  | 46,5                                 | 46,5                                  | 139,6; 145,2 | 139,3                        | 145,1            | 139,6 | 140,0                          |
| 14 | 39,6  | 39,4                                 | 39,5                                  | 42,1; 41,6   | 42,0                         | 41,8             | 42,1  | 42,5                           |
| 15 | 33,3  | 33,4                                 | 33,4                                  | 28,8; 26,2   | 28,7                         | 26,2             | 23,7  | 23,8                           |
| 16 | 116,9 | 117,8                                | 117,9                                 | 26,6; 27,0   | 26,6                         | 27,0             | 27,9  | 27,7                           |
| 17 | 145,2 | 147,7                                | 147,7                                 | 33,7; 32,5   | 33,7                         | 32,5             | 39,6  | 39,2                           |
| 18 | 37,7  | 37,7                                 | 37,6                                  | 59,1; 47,2   | 58,9                         | 47,4             | 59,1  | 59,5                           |
| 19 | 41,6  | 41,5                                 | 41,5                                  | 39,7; 46,9   | 39,6                         | 46,9             | 40,0  | 40,1                           |
| 20 | 18,3  | 18,2                                 | 18,1                                  | 39,7; 31,1   | 39,6                         | 31,1             | 39,9  | 40,0                           |
| 21 | 41,7  | 41,8                                 | 41,8                                  | 31,3; 34,8   | 31,2                         | 34,8             | 31,9  | 31,7                           |
| 22 | 36,7  | 36,1                                 | 36,1                                  | 41,5; 37,2   | 41,5                         | 37,2             | 39,6  | 39,2                           |
| 23 | 28,1  | 28,1                                 | 28,3                                  | 28,1; 28,2   | 28,1                         | 28,2             | 28,4  | 28,5                           |
| 24 | 15,5  | 15,5                                 | 22,2                                  | 15,6; 15,4   | 15,6                         | 15,5             | 16,1  | 16,1                           |
| 25 | 16,1  | 16,2                                 | 16,0                                  | 15,5; 16,7   | 15,6                         | 16,6             | 16,0  | 16,0                           |
| 26 | 16,9  | 16,9                                 | 16,9                                  | 16,8; 16,9   | 16,8                         | 16,9             | 18,0  | 17,9                           |
| 27 | 17,5  | 17,6                                 | 17,7                                  | 23,3; 26,0   | 23,3                         | 26,0             | 29,2  | 29,1                           |
| 28 | 29,9  | 29,9                                 | 29,9                                  | 28,0; 28,4   | 28,1                         | 28,4             | 23,7  | 23,7                           |
| 29 | 20,9  | 20,6                                 | 20,7                                  | 17,5; 33,3   | 17,4                         | 33,3             | 21,4  | 21,8                           |
| 30 | 33,4  | 33,5                                 | 33,5                                  | 21,1; 23,7   | 21,3                         | 23,7             | 17,5  | 17,3                           |



#### 4.2.1.3 Caracterização do composto **47** presente na fração EDE

O composto **47** foi detectado nas frações EDD e EDE. A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  na fração EDD é dificultada para esta molécula devido às semelhanças entre os deslocamentos químicos quando comparados com os espectros de **45** e **46**. Assim, a análise espectroscópica foi proposta a partir dos dados de RMN da fração EDE que só apresenta os triterpenos derivados de neolupano e de gamacerano.

O espectro de massas (Figura 18) e o mecanismo de fragmentação (Figura 19) para o triterpeno **47** é similar ao mostrado para os compostos **45** e **46** (seção 5.2.1.2). O fragmento com valor  $m/z$  218 (pico base) é produzido via uma reação Retro-Diels-Alder e os fragmentos com  $m/z$  203 e 189 são formados por perda de dois grupos metila. O fragmento com  $m/z$  135 é produzido a partir do rompimento das ligações C13-C18 e C15-C16, além de um rearranjo com transposição de hidrogênio (Figura 19) (SHIOJIMA *et al.*, 1992).

O resumo dos principais sinais observados no espectro de massas para esse triterpeno é mostrado a seguir; a abundância relativa está indicada entre parêntese: **Neolup-12-en-3 $\beta$ -ol** (Figura 18 e 23): 426 (7,51), 411 (13,72), 393 (2,68), 218 (100,00), 207 (18,67), 203 (71,37), 189 (74,56), 175 (22,54), 135 (37,96).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 20) revelou sinais em  $\delta$  124,4-139,6, correspondentes aos carbonos  $\text{sp}^2$  da posição C12 e C13. Estes sinais são semelhantes aos observados no espectro do composto **45** (Figura 10). Para esses dois compostos, as principais diferenças no espectro estão associadas aos carbonos C19, C20, C21, C22, C29 e C30 (Tabela 10). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 21) podem ser observados sinais em:  $\delta$  5,15 (J = 3,12 MHz) (triplete correspondente ao hidrogênio H12;  $\delta$  1,58 (simpleto – hidrogênio do grupo hidroxila na posição C3); além de sinais entre  $\delta$  0,90-1,25, correspondentes aos hidrogênios metílicos e metilênicos do esqueleto triterpênico.

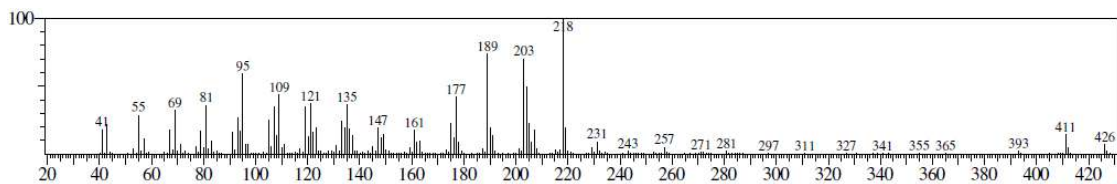


Figura 18. Espectro de massas do pico correspondente ao neolup-12-en-3 $\beta$ -ol

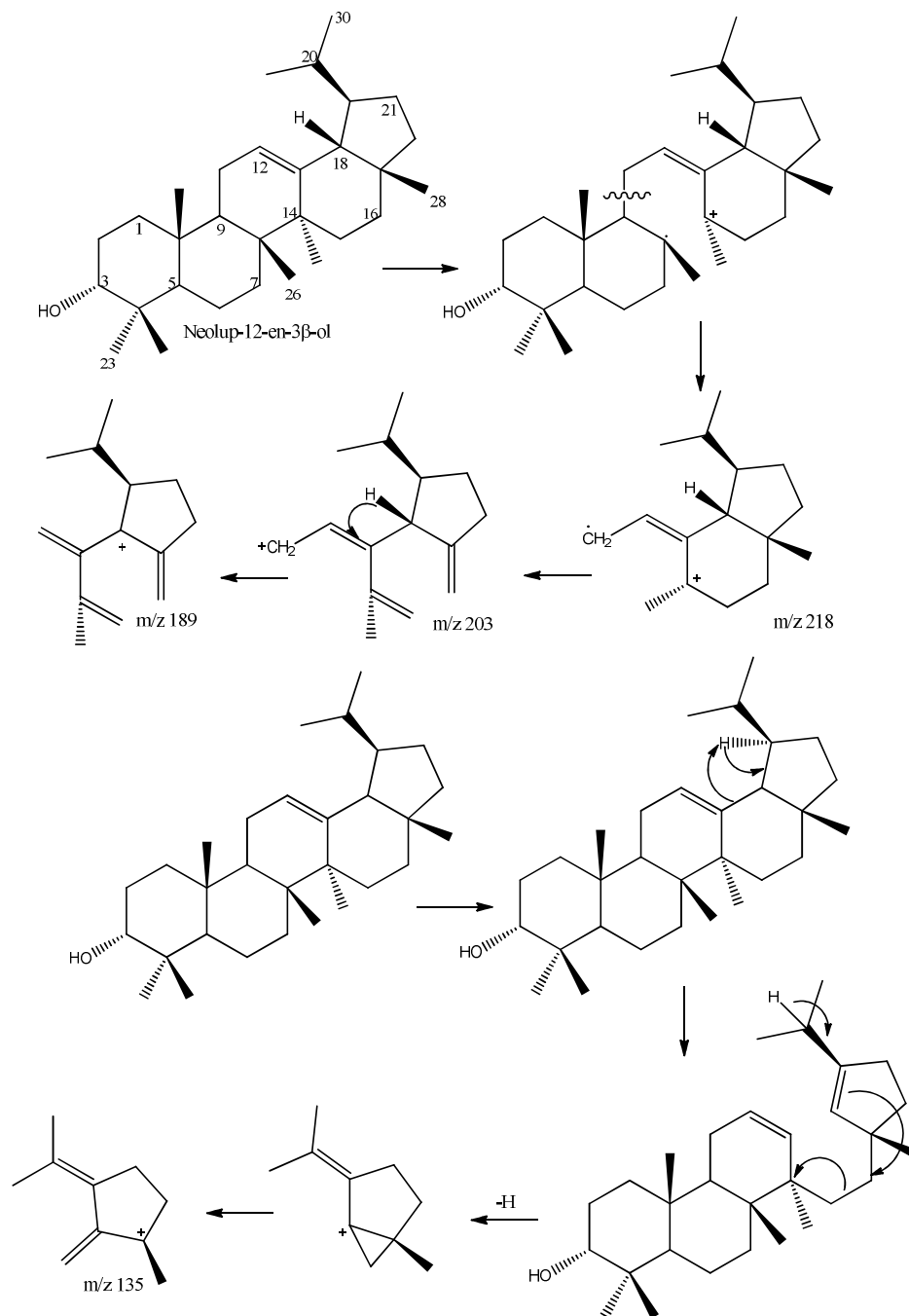


Figura 19. Proposta de fragmentação para o triterpene neolup-12-en-3 $\beta$ -ol.

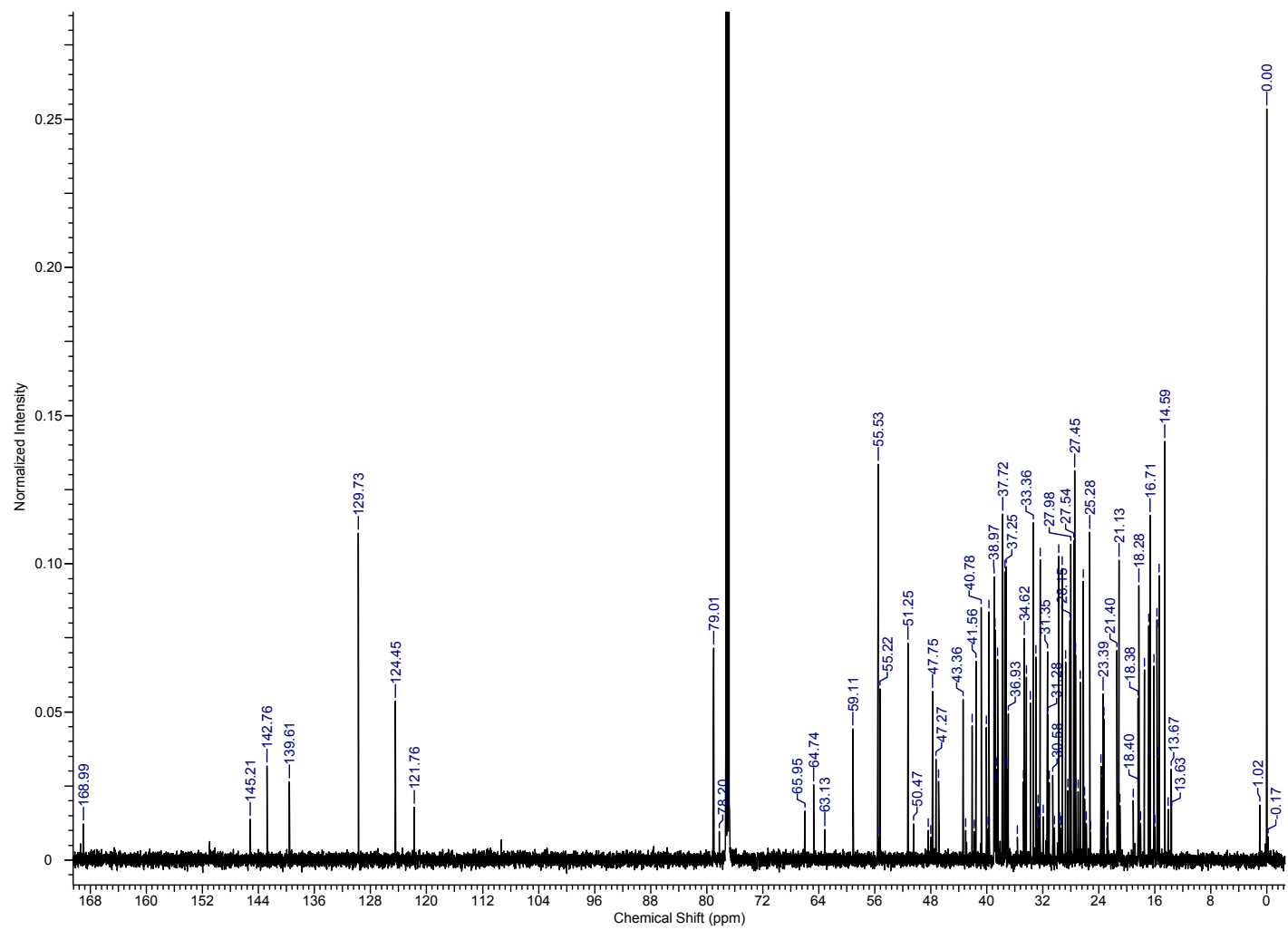


Figura 20. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração EDE (150 MHz, DMSO -  $\text{d}_6$ )

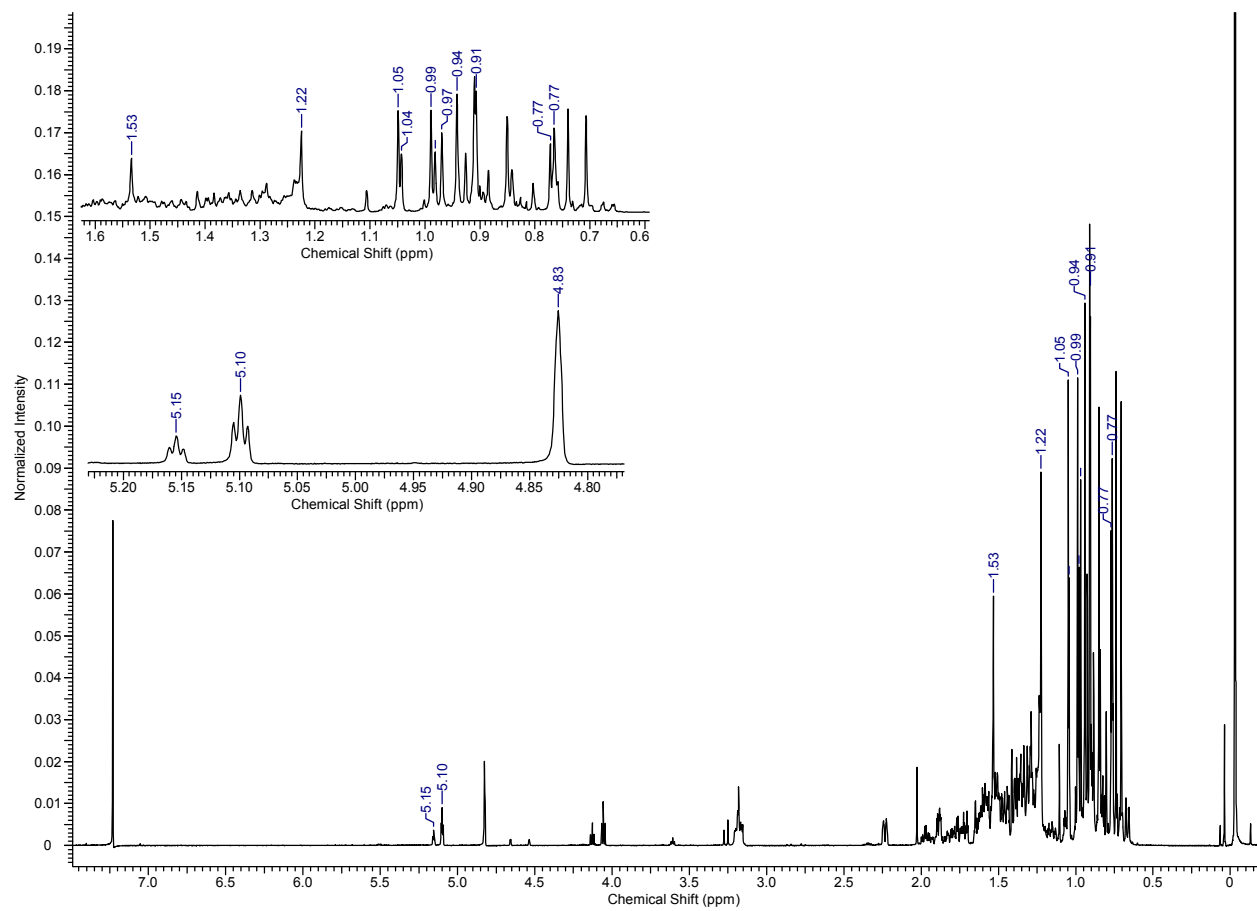


Figura 21. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração EDE (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )

Mesmo que os triterpenos identificados (Tabela 10) já estejam descritos na literatura, os resultados são relevantes, porque constituem no primeiro registro de triterpenos pentacíclicos identificados em folhas de *E. dysenterica*. Os triterpenos são amplamente encontrados em diversas espécies de plantas e tem despertado um grande interesse pela comunidade científica por sua atividade biológica. A Tabela 11 resume alguns exemplos de linhagens de células neoplásicas sensíveis às propriedades citotóxicas de alguns triterpenos pentacíclicos (CHUDZIK; KORZONEK-SZLACHETA; KRÓL, 2015).

Na revisão feita por VÁZQUEZ; PALAZON; NAVARRO (2012), pode ser encontrado que os compostos,  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, têm sido isolados de resinas de plantas, além de suas respectivas frações hexânica, clorofórmica, etanólica e metanólica. Os extratos apolares (hexânico e clorofórmico) obtidos de folhas, raiz, e caule em diferentes espécies de plantas são fonte desse tipo de compostos. Os extratos apolares (hexânico e clorofórmico) mostraram atividade antifúngica fraca ou nula quando comparados com extratos mais polares (metanólico e etanólico) em espécies de fungos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Por outro lado,  $\beta$ -amirina se mostrou efetiva contra a praga do grão de bico (valor CIM de 0,0156 mg/mL). Extratos de algumas espécies dos gêneros *Bursera*, *Calotropis*, *Acacia*, *Protium* e *Ligustrum* têm mostrado atividade anti-inflamatória segundo estudo feito em modelos celulares *in vitro* (VÁZQUEZ; PALAZON; NAVARRO, 2012).

Recentemente foi despertado um interesse considerável no estudo das propriedades químicas e farmacológicas de triterpenos pentacíclicos e os seus análogos, como moléculas promissoras para o tratamento de doenças cancerígenas. Os registros sobre a atividade biológica em extratos brutos referem-se principalmente a atividades sinérgicas dos metabólitos secundários encontrados nos extratos (VÁZQUEZ; PALAZON; NAVARRO, 2012; CHUDZIK; KORZONEK-SZLACHETA; KRÓL, 2015; DRĄG-ZALESIŃSKA *et al.*, 2015). Resulta interessante focar esses estudos em novos modelos *in vitro* e *in vivo* na procura de compostos bioativos. Assim, o extrato hexânico e as respectivas frações de folhas de *E. dysenterica* podem ser um ponto de partida para outros projetos de pesquisa relacionados a este tipo de doenças.

Tabela 11. Exemplo de linhagens celulares neoplásicas sensíveis a alguns grupos de triterpenos.

| <b>Triterpenos</b>           | <b>Tipo de neoplasia*</b>  |
|------------------------------|--|
| Derivados de escualeno       | Leucemia, melanoma, sarcoma, câncer de pulmão, câncer do sistema nervoso periférico, câncer de cólon, câncer de mama, carcinoma de ovário, carcinoma cervical, câncer de próstata.                                     |
| Derivados de dammarano       | Glioma, câncer de pulmão, carcinoma de ovário, carcinoma colorrectal, câncer de cólon.   |
| Lanostano e derivados        | Leucemia, melanoma, glioma, carcinoma gástrico, câncer pancreático, câncer de cólon, câncer hepático, câncer de pulmão, câncer de mama, carcinoma do ovário.   |
| Lupeol                       | Câncer colorrectal, câncer gástrico  |
| Ácido oleanólico e derivados | Carcinoma da tireoide e de ovário, câncer de mama, câncer colorrectal, glioma, leucemia, adenocarcinoma gástrico.  |
| Ácido betulínico e derivados | Câncer: de pulmão, de mama, de próstata, colorrectal, de cólon. Carcinoma de próstata, de ovário, cervical e epidermóide escamoso (DRAĞ-ZALESIŃSKA <i>et al.</i> , 2015). Adenocarcinoma, leucemia, glioma e melanoma. |
| Ácido ursólico e derivados   | Carcinoma de ovário, de pâncreas e cervical. Câncer: de próstata, hepático, de mama, colorrectal. Leucemia, neuroma e adenocarcinoma de cólon.   |
| Extratos vegetais            | Leucemia, melanoma e glioma. Carcinoma de ovário e epitelial. Câncer: Hepático, de mama, de laringe, gástrico, de próstata e de cólon.   |
| Extrato de fungos            | Melanoma, linfoma e glioma. Câncer: de mama, de próstata, hepático, gástrico, de cólon. Carcinoma de nasofaringe epidérmico e de ovário.   |

\*Método de avaliação da citotoxicidade/proliferação celular: SRB. Quantificação das proteínas celulares com sulforrodamina; MTT. Avaliação da atividade oxidoreductiva das mitocôndrias - células vivas; LDH. Ensaio colorimétrico da lactato desidrogenase - dano da membrana celular. Informação adaptada de CHUDZIK; KORZONEK-SZLACHETA; KRÓL (2015).

#### 4.2.1.4 Análise por EM do composto **43** presente na fração EDA

O espectro de massas do  $\alpha$ -tocoferol (**43**) é mostrado na Figura 22 e se caracteriza por apresentar poucos fragmentos. Os principais fragmentos/íons são gerados por dois processos: o primeiro por rompimento da porção não aromática do anel cromano, ambos com e sem transferência de hidrogênio. Este processo é favorecido pela energia cinética do íon, o que propicia a formação do íon tropílio. O segundo processo de fragmentação acontece via perda da cadeia de isoprenoide (Figura 23) (SCHEPPELE *et al.*, 1972).

O caráter parcial cátion radicalar do oxigênio no anel heterocíclico proporciona a energia necessária para romper a ligação O-C1. Uma transferência de hidrogênio do grupo metila para o oxigênio leva à formação desse radical cátion. A condição metaestável apropriada e a composição elementar para o íon  $m/z$  165 ( $C_{10}H_{13}O_2$ ) confirma o fragmento correspondente ao íon molecular com perda do radical  $C_{19}H_{37}$  via ruptura homolítica da ligação C3-C4 na região aromática do anel cromanol (SCHEPPELE *et al.*, 1972).

O resumo dos principais sinais observados no espectro de massas para esse composto é mostrado a seguir; com a abundância relativa indicada entre parêntese:  **$\alpha$ -tocoferol** (Figuras 26 e 27): 430 (35,36), 205 (14,46), 165 (100,00), 136 (6,80), 57 (6,84), 43(15,50). Os resultados experimentais concordam com o perfil de fragmentação reportado na literatura (SCHEPPELE *et al.*, 1972).

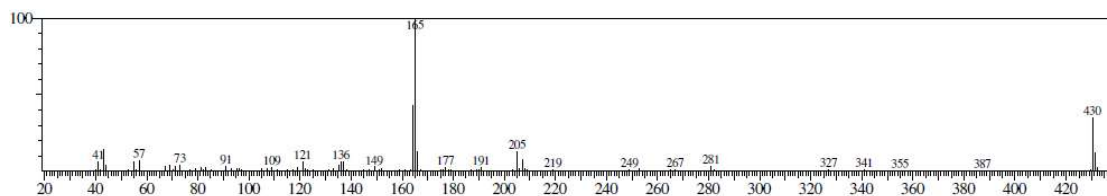


Figura 22. Espectro de massas do pico correspondente ao  $\alpha$ -tocoferol.

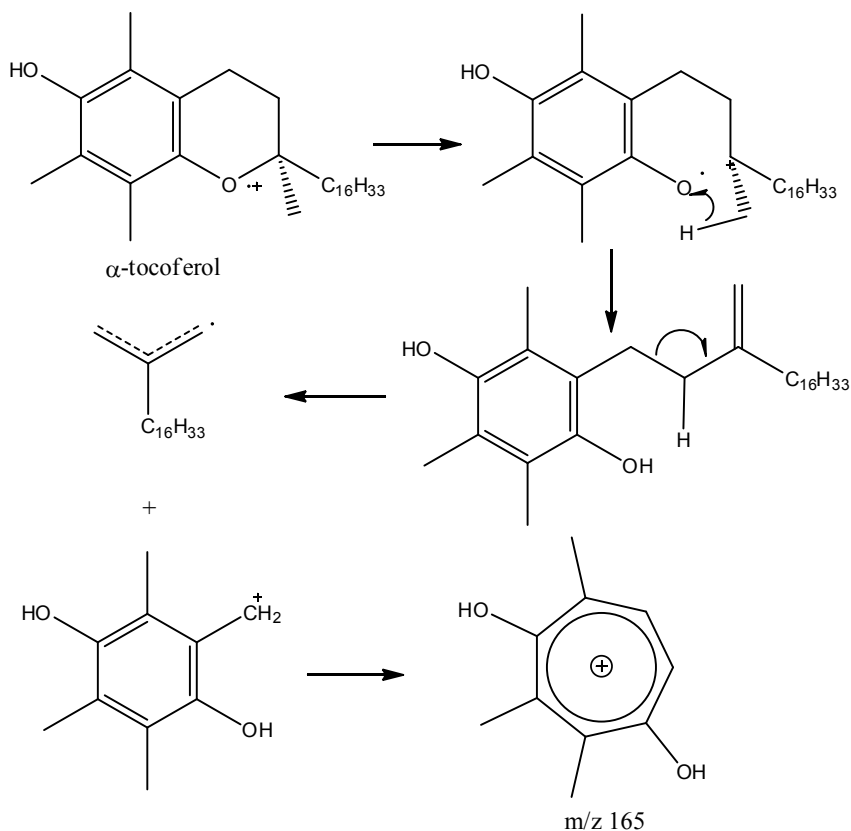


Figura 23. Proposta de fragmentação para o  $\alpha$ -tocoferol.

#### 4.2.1.5 Análise por EM do composto **44** presente na fração EDE

O espectro de massas do acetil tributil citrato (**44**) se caracteriza por apresentar poucos fragmentos (Figura 24). Os principais fragmentos correspondem ao  $m/z$  185 (pico base) e fragmentos secundários com  $m/z$  329, 259 e 129. O mecanismo de fragmentação proposto é mostrado na (Figura 25).

O resumo dos principais sinais observados no espectro de massas para esse composto é mostrado a seguir; a abundância relativa é indicada entre parênteses. Acetil tributil citrato (Figuras 32 e 33): 329 (3,58), 273 (6,06), 259 (32,37), 185 (100,00), 129 (86,32), 57 (33,99), 43 (48,59). Os resultados experimentais concordam com o perfil de fragmentação reportado na biblioteca NIST (2011).



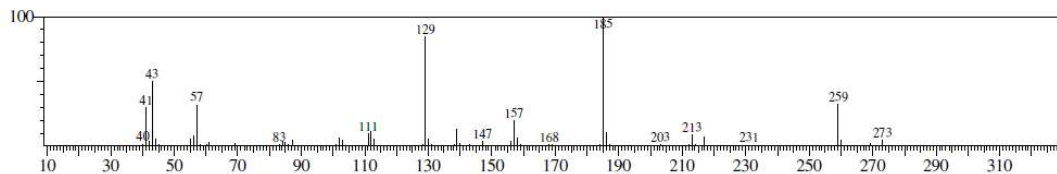


Figura 24. Espectro de massas do pico correspondente ao acetil tributil citrato.

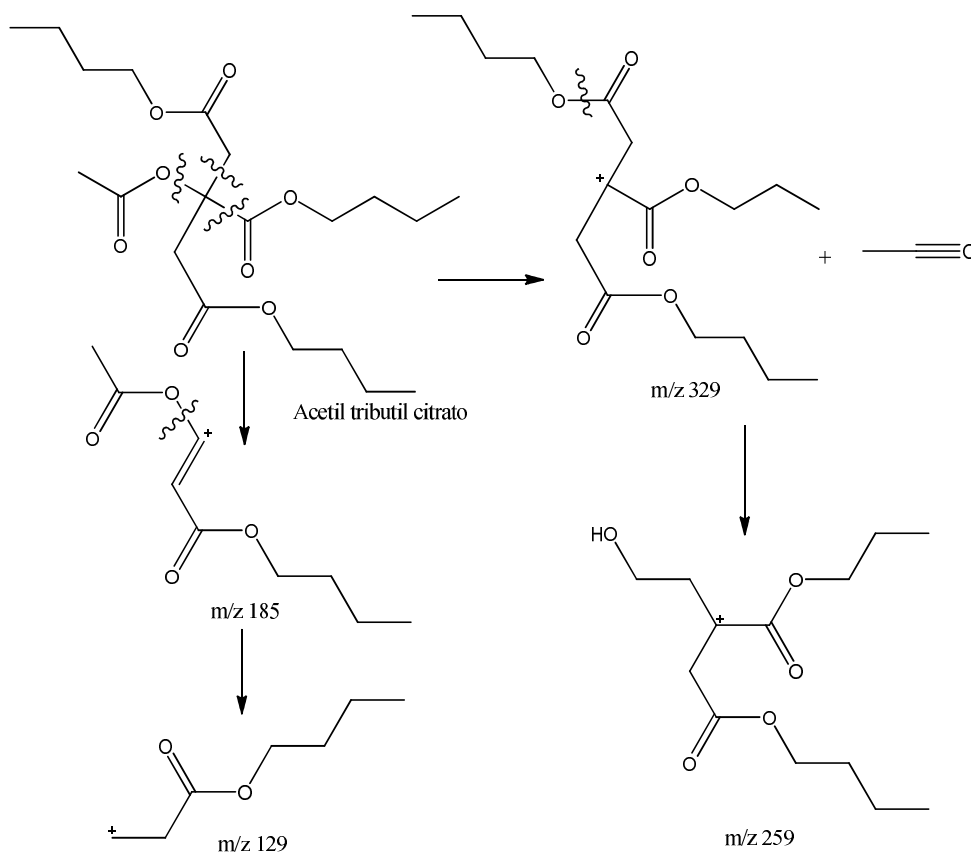


Figura 25. Proposta de fragmentação para o acetil tributil citrato.

Acetil tributil citrato (ATBC) é um plastificante muito utilizado em material de embalagem. Esse composto, em contato com determinados materiais, pode migrar e contaminar o material contido na embalagem (CASTLE, L *et al.*, 1988; CASTLE, LAURENCE *et al.*, 1988). FANG *et al.* (2014) analisaram a migração de ATBC em imersão em líquidos diversos, dentre eles hexano, e observaram a ocorrência de migração (FANG *et al.*, 2014). Dessa forma, não deve ser descartada a possibilidade de que a ocorrência de ATBC em EDE seja devida à contaminação do solvente utilizado na extração e análise.

#### 4.2.2 Extrato aquoso (EAQ)

A partir do fracionamento do EAQ por CC foram obtidas 55 frações. As frações metanólicas foram concentradas em banho-maria a 40 °C. Após da borrifação com o reagente NP/PEG (R1), foram observadas manchas de cor azul, verde e amarelo, características de metabólitos secundários de tipo flavonoide. No entanto, estes sinais sugeriram a mistura de compostos nas frações obtidas, Porém foi feito um processo de purificação por meio de lavagem das frações com solventes de diferente polaridade como acetona, acetato de etila e clorofórmio.

Numa segunda análise por CCD, foram obtidas frações com maior grau de pureza após lavagem com os solventes de diferente polaridade. Frações que apresentaram perfil semelhante em CCD foram reunidas, obtendo um total de 14 subfrações. As subfrações foram secadas em banho-maria a 40 °C, e o rendimento no processo extrativo foi determinado com base na quantidade de extrato aquoso utilizado na extração por cromatografia em coluna. O rendimento e o tempo de eluição para as frações estão indicados na Tabela 12. Os maiores rendimentos foram obtidos para as frações C, G e B com valores em peso seco de 21- 40 mg. As frações F, H, J, K, M e N apresentaram valores intermediários de rendimento entre 10 - 20 mg, enquanto que as frações A, D, E, I e L mostraram o menor rendimento com valores entre 2 - 8 mg.

Tabela 12. Rendimento e tempo de retenção das frações da partição do EAQ de folhas de *Eugenia dysenterica*.

| Fração (Faq) | Peso (mg) | %R  | Fração (Faq) | Peso (mg) | %R  |
|--------------|-----------|-----|--------------|-----------|-----|
| A            | 2,6       | 0,5 | H            | 11,3      | 2,2 |
| B            | 21,8      | 4,3 | I            | 5,5       | 1,1 |
| C            | 39,9      | 7,9 | J            | 18,7      | 3,7 |
| D            | 7,0       | 1,4 | K            | 12,3      | 2,4 |
| E            | 7,2       | 1,4 | L            | 7,9       | 1,6 |
| F            | 19,2      | 3,8 | M            | 11        | 2,2 |
| G            | 23,5      | 4,7 | N            | 10,2      | 2,0 |

%R: porcentagem de rendimento

O perfil de retenção dos compostos na coluna cromatográfica mostrou valores crescentes desde a fração A até a fração N, com tempos de retenção entre 7-308 minutos (Tabela 12). O perfil de separação dos compostos de interesse, de acordo com a metodologia utilizada, envolve uma separação por exclusão por tamanho. Este tipo de cromatografia tem como princípio a discriminação dos componentes de uma amostra pelos poros do material empacotado. Os componentes com maior tamanho não podem ou, podem apenas parcialmente, penetrar nos poros, enquanto moléculas menores podem acessar a maioria dos poros com menor tamanho. Dessa forma as moléculas que conseguem acessar todos os poros eluem por último da coluna ( $N > M > L > K > J$ ), as moléculas maiores eluem em primeiro lugar ( $A > B > C > D > E$ ) e moléculas de tamanho intermediário eluem depois ( $F > G > H > I$ ). Esta tendência oferece uma primeira aproximação qualitativa do tamanho das moléculas isoladas por esta técnica cromatográfica.

Com base no perfil fitoquímico, foram reunidas as frações com as mesmas características quando reveladas com o reagente para flavonoides R1. Duas frações, FaqG e FaqH, mostraram cores diferentes, amarelo e bege, e valores de *Rf* de 0,92 e 0,94, respectivamente. Estas duas frações foram escolhidas para análise espectrométrica posterior.

#### 4.2.2.1 Elucidação estrutural

As considerações teóricas referentes aos dados espectroscópicos foram baseadas na literatura clássica (livros) de SILVERSTEIN *et al.* (2014), SKOOG *et al.* (2002) e PAVIA *et al.* (2010).

**FaqG:** No aspecto físico esta fração apresentou-se como sólido de cor parda. No espectro UV foi observado o máximo de absorção em 319 nm e um pico menor em 282 nm (Figura 26). O espectro na região do infravermelho (Figura 28) apresentou uma banda intensa de absorção em  $3412\text{ cm}^{-1}$  característica de ligação O-H (deformação axial), e um conjunto de bandas entre  $1612$  e  $1350\text{ cm}^{-1}$  características de anel aromático. As bandas entre  $1225$  e  $1127\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas a vibrações de deformação C-O-C.

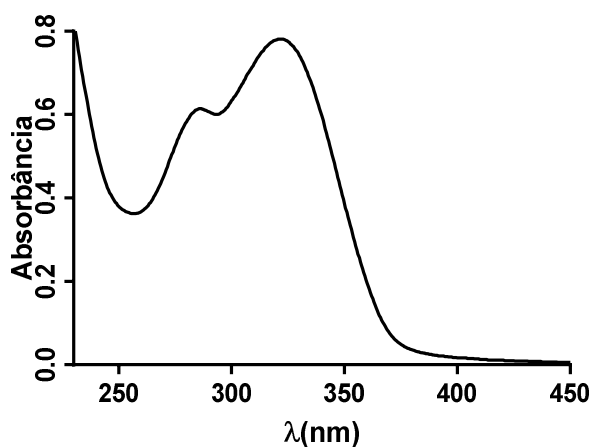


Figura 26. Espectro de ultravioleta (UV) de FaqG

Os deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 29) e RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 33) foram obtidos a 150 e 600 MHz respectivamente, utilizando DMSO deuterado como solvente. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou 14 linhas espectrais (Figura 30 e Figura 31) entre  $\delta$  157 e 27. Dos carbonos, quatro apresentam função oxigenada em  $\delta$ : 156,7; 156,4; 146,0 e 67,41. Os carbonos 3' e 4' apresentam o mesmo valor de deslocamento em  $\delta$  146. Esses sinais são característicos do esqueleto carbônico básico de flavonoides de 15 átomos de carbono (Figura 27).

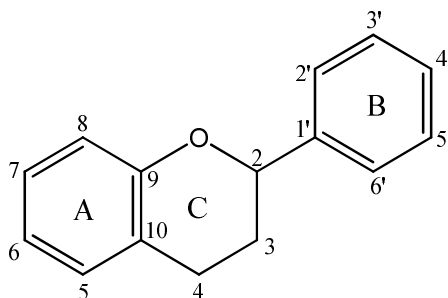


Figura 27. Núcleo estrutural básico de um flavonoide.

O espectro DEPT 135 (Figura 32) revelou que os carbonos 2, 3, 6, 8, 2', 5' e 6' correspondem a grupos CH com valores  $\delta$ : 81,4; 67,4; 95,0; 94,2; 113,9; 114,8 e 118,9, respectivamente, enquanto que o carbono 4 corresponde a um grupo  $\text{CH}_2$  com valor  $\delta$  de 27,1.

A análise por RMN de  $^1\text{H}$  revelou 5 sinais na região de  $\delta$  5,8 – 7,0 ppm, característicos a hidrogênios em anéis aromáticos (Figura 33). Os valores dos deslocamentos químicos permitiram propor a estrutura de um flavonoide com oxigenação em 3, 5, 7, 3' e 4' (BENAVIDES *et al.*, 2006; AYRES *et al.*, 2009).

Os sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,81 ( $\text{H}2'$ ,  $J=1,8$  Hz),  $\delta$  6,74 ( $\text{H}5'$ ,  $8,1=X$  Hz) e  $\delta$  6,69 ( $\text{H}6'$ ,  $J=1,8$  e  $8,1$  Hz) indicaram acoplamento *meta* entre  $\text{H}2'$  e  $\text{H}6'$  e acoplamento *orto* entre  $\text{H}5'$  e  $\text{H}6'$ , caracterizando uma dioxigenação do anel B em  $\text{C}3'$  e  $\text{C}4'$  (BENAVIDES *et al.*, 2006; AYRES *et al.*, 2009).

Na região referente a hidrogênios aromáticos, foram observados dupletos referentes aos hidrogênios  $\text{H}6$  ( $\delta$  5,91) e  $\text{H}8$  ( $\delta$  5,83), ambos com  $J=2,2$  Hz, característico de um acoplamento *meta* de um anel aromático, os quais correspondem ao anel A de um flavonoide substituído nas posições C-5 e C-7 (Figura 27) (AYRES *et al.*, 2009). Foi possível observar sinal em  $\delta$  3,94, além de dois sinais duplo-duplete em  $\delta$  2,80 ( $J=16,1$  e  $5,5$  Hz) e 2,48 ( $J=16,1$  e  $8,1$  Hz). Quando foram comparados com os sinais obtidos no experimento DEPT 135, permitiram concluir que o sinal em  $\delta$  3,94 corresponde ao hidrogênio na posição 3 na molécula, enquanto que os dois duplo-dupletos correspondem aos dois hidrogênios,  $\text{H}\alpha$  e  $\text{H}\beta$ , da posição 4 da molécula.

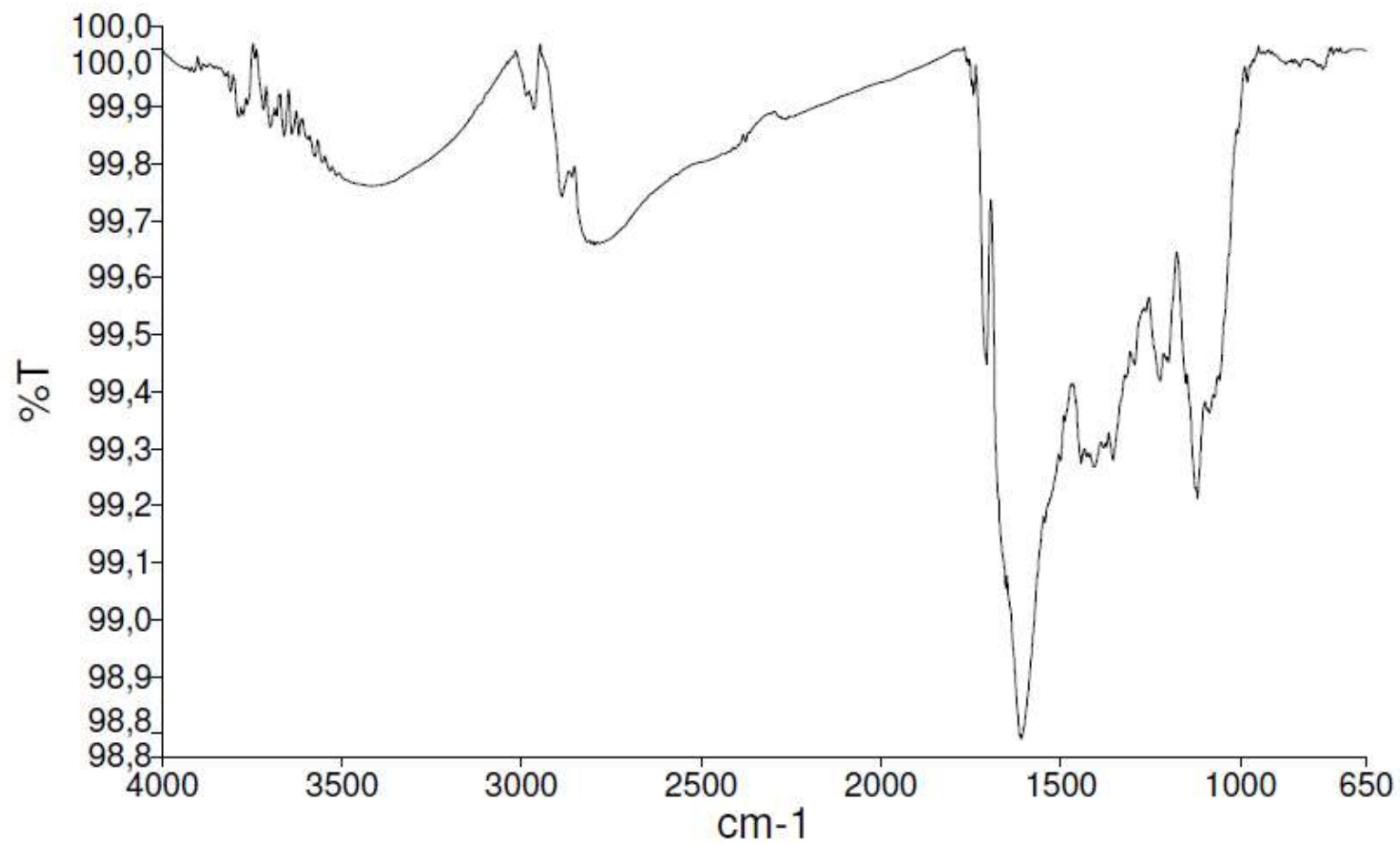


Figura 28. Espectro de Infravermelho de FaqG.

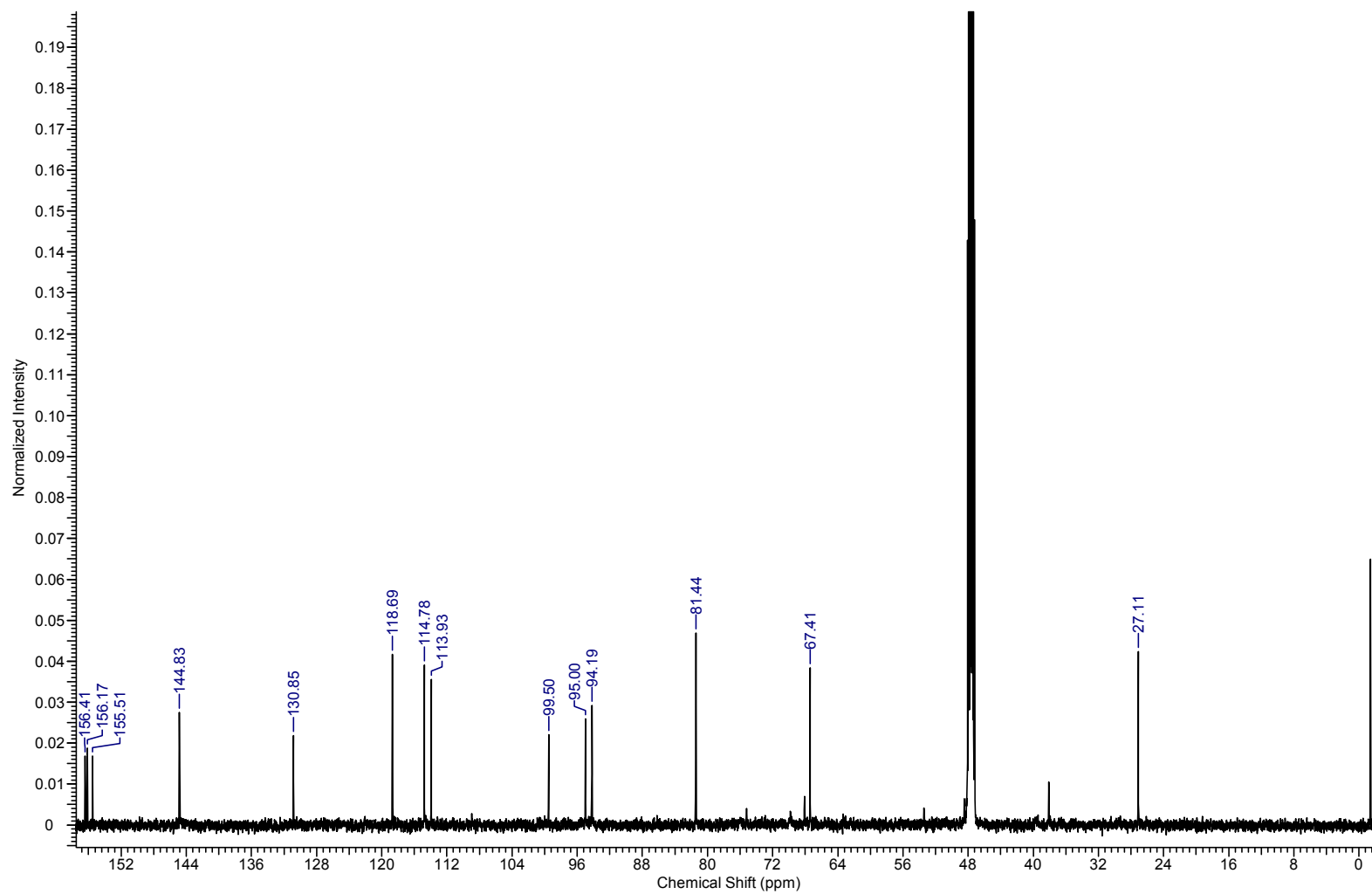


Figura 29. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  de FaqG (150 MHz, DMSO -  $\text{d}_6$ )

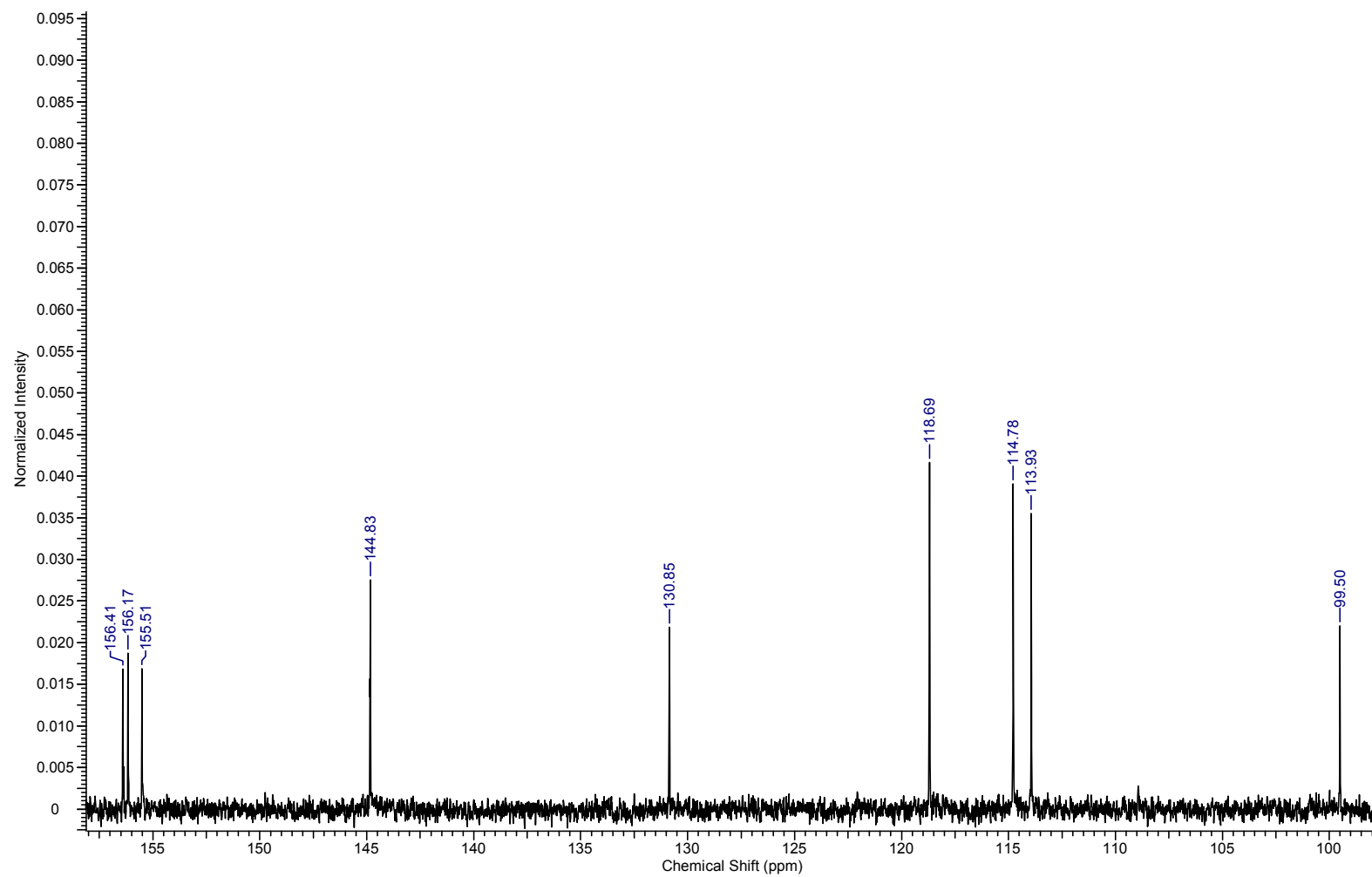


Figura 30. Expansão do espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  na região 98-160 ppm de FaqG (150 MHz, DMSO -  $\text{d}_6$ )



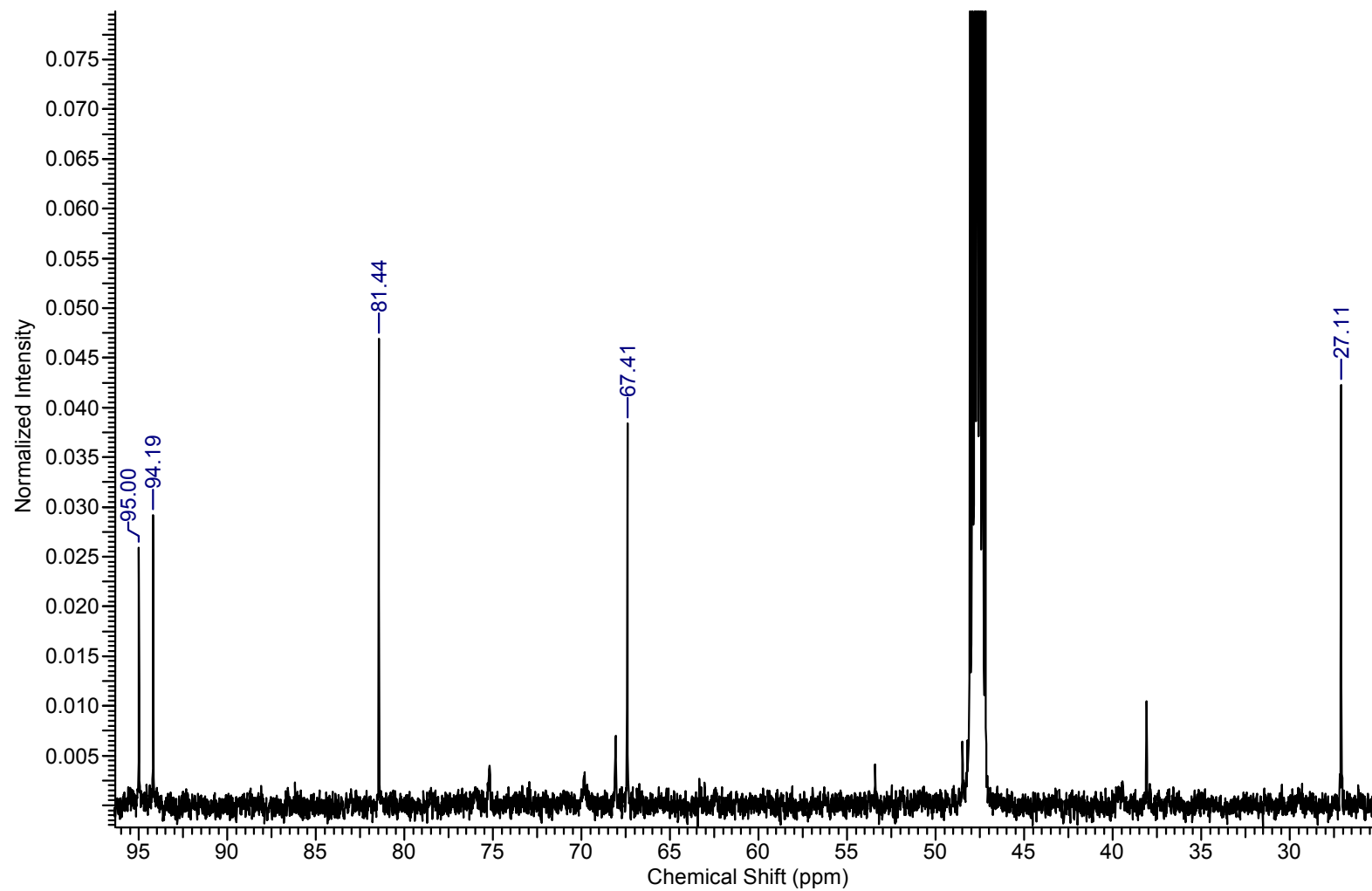


Figura 31. Expansão do espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  na região 24-96 ppm de FaqG (150 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )

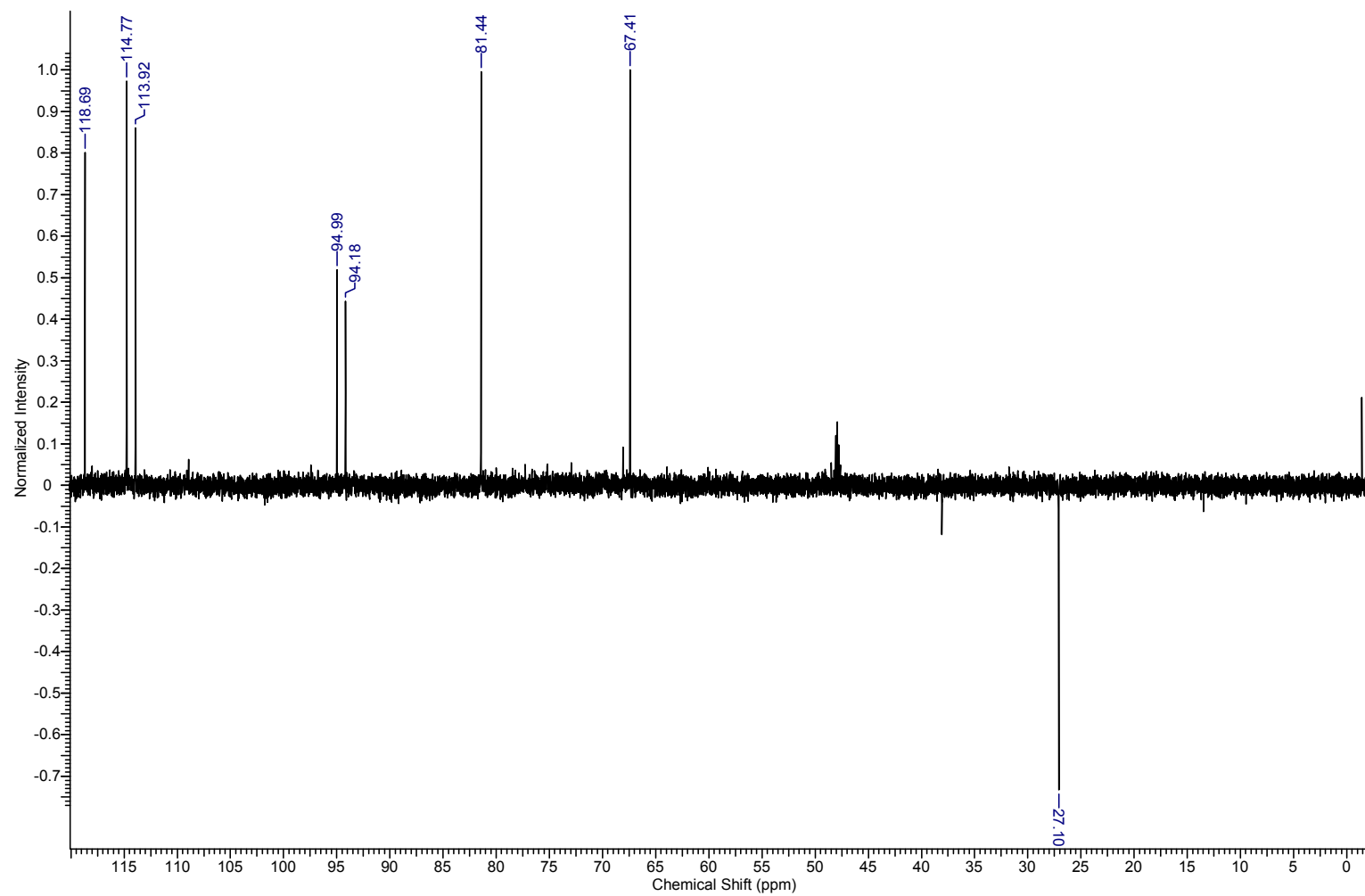


Figura 32. Espectro DEPT 135 de FaqG (600 MHz, DMSO - d<sub>6</sub>)

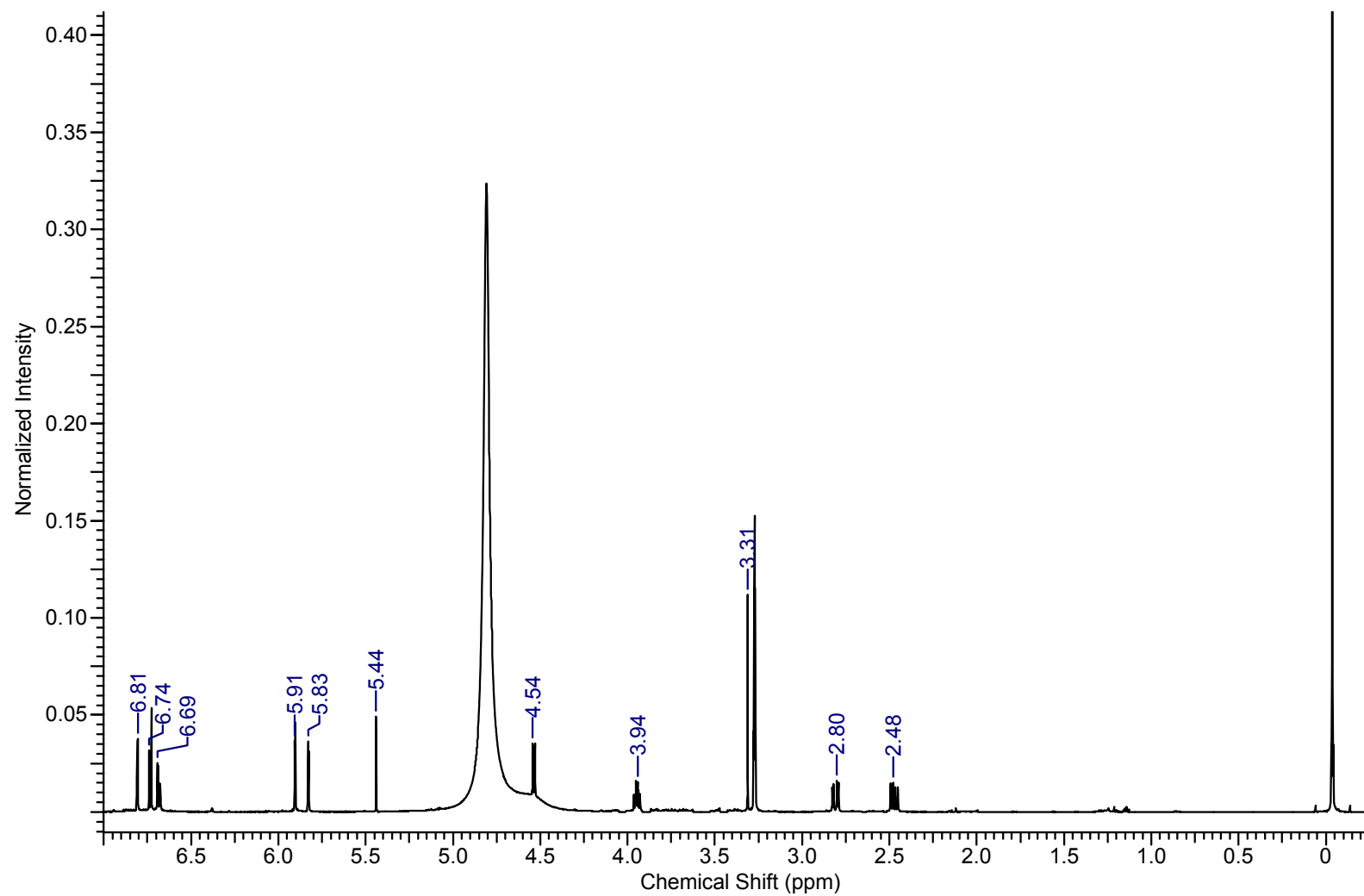
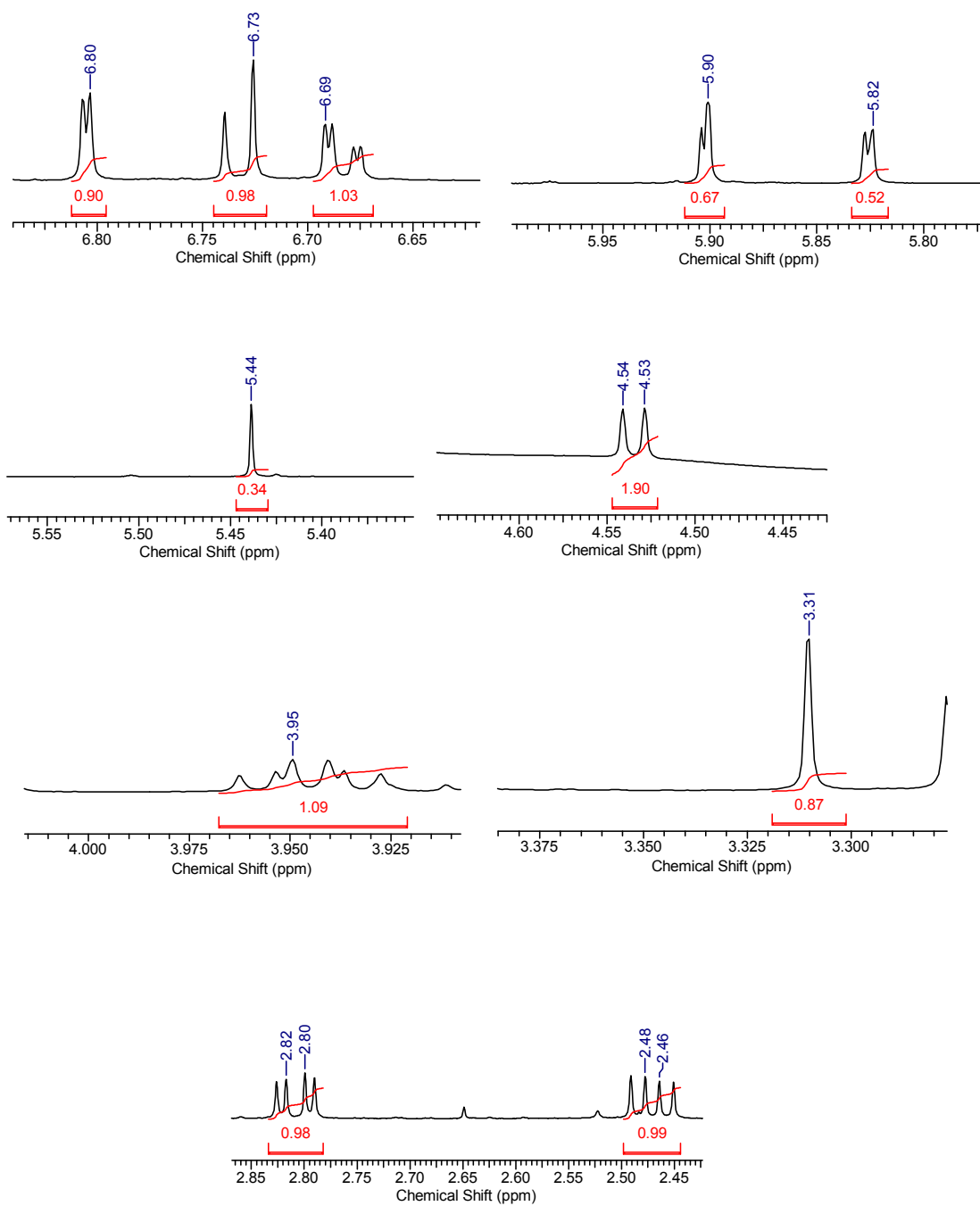


Figura 33. Espectro RMN de  $^1\text{H}$  de FaqG (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )

Figura 34. Expansão do espectro RMN de  $^1\text{H}$  de FaqG (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )

Estas particularidades permitiram propor uma estrutura de tipo flavan-3-ol do grupo das catequinas como a molécula correspondente a EDG (WILHELM, 2008). No grupo das catequinas se incluem (+)-catequina (**1**), (-)-epicatequina (**50**), (-)-ent-catequina (**51**), (+)-ent-epicatequina (**52**) assim com seus derivados (C-3-O-éster). Estas estruturas apresentam dois carbonos quirais, nas posições 2 e 3 da molécula (Figura 35).

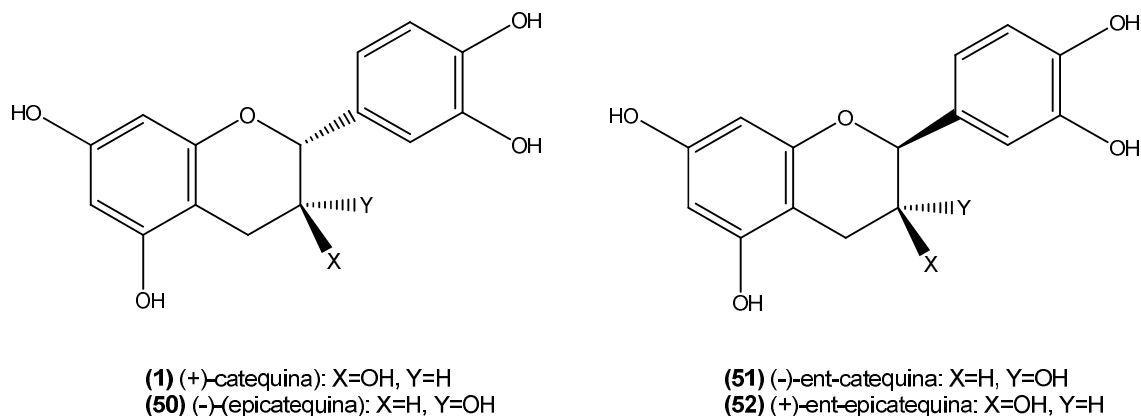


Figura 35. Compostos de tipo flavan-3-ol.

Para confirmar a estrutura da catequina é necessário identificar a distribuição espacial dos hidrogênios da posição 2 e 3. Na molécula de (+)-catequina (**1**) o hidrogênio da posição C-2 está localizado à frente do plano, enquanto que o hidrogênio da posição C-3 está localizado atrás do plano. Na molécula de (-)-ent-catequina (**51**) o hidrogênio da posição C-2 está localizado atrás do plano, enquanto que o hidrogênio da posição C-3 está localizado a frente do plano (WILHELM, 2008).

Os anéis heterocíclicos das catequinas e flavan-3,4-diois podem adotar uma conformação coplanar de 5 pontos ou de meia-cadeira, o que permite justificar a diferença das constantes de acoplamento dos prótons heterocíclicos das posições 2,3-*cis* e 2,3-*trans* (Tabela 13). No isômero 2,3-*trans*, o valor teórico de  $J_{3,4-trans}$  é maior, se comparado com ao da posição 2,3-*cis*, o qual indica uma diferença de distância menor entre os prótons da posição 3 e 4. Os dados experimentais de RMN de  $^1H$  (Tabela 14) mostraram que em FaqG o valor de  $J_{2,3-trans}$  é de 8,1 Hz, enquanto que o valor  $J_{3,4-cis}$  é 5,5 Hz (WILHELM, 2008).

Tabela 13. Constante de acoplamento (J) para compostos de tipo flavan-3-ol (WILHELM, 2008).

|                                       | $J_{2,3}$ | $J_{3,4}$ (cis) | $J_{3,4}$ (trans) |
|---------------------------------------|-----------|-----------------|-------------------|
| <b>2,3-trans-3,4-transflavan-3-ol</b> | 8,2       | 5,6             | 9,0               |
| <b>2,3-cis-3,4-transflavan-3-ol</b>   | 1,2       | 4,4             | 2,4               |

Quando comparados os dados experimentais com os dados teóricos, pode ser concluído sobre a estrutura do flavan-3-ol isolado como sendo (2R,3S)-3',4',5,7-tetrahidroxiflavan-3-ol, conhecido como (+)-catequina (**1**). A estrutura química da catequina isolada foi confirmada pela comparação com dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  reportados na literatura (CREN-OLIVÉ *et al.*, 2002; AYRES *et al.*, 2009). Os resultados podem ser observados na Tabela 14.

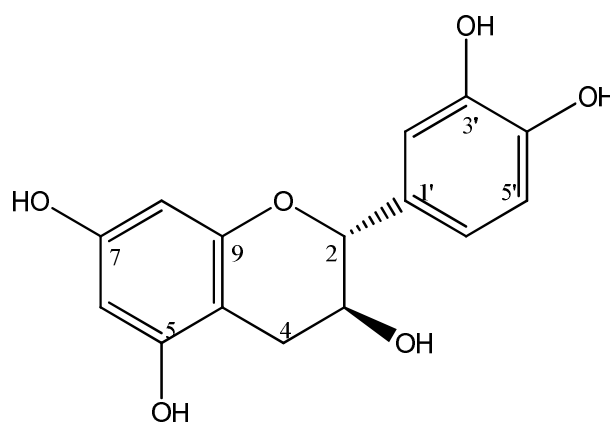
Estrutura química da (+)-catequina (**1**)

Tabela 14. Dados de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT de FaqG em comparação com os dados reportados na literatura\*.

| Posição | FaqG  |                        |               | (+)-catequina (CREN-OLIVÉ <i>et al.</i> , 2002; AYRES <i>et al.</i> , 2009)* |                        |                        |
|---------|---|------------------------|---------------|--|------------------------|------------------------|
|         | $\delta\text{H}$ (ppm)                                | $\delta\text{C}$ (ppm) | DEPT 135      | $\delta\text{H}$ (ppm)   | $\delta\text{C}$ (ppm) | $\delta\text{C}$ (ppm) |
| 2       | 4,54 (d; $J = 7,3$ Hz; 1H)                            | 81.4                   | CH            | 4,59 (d; $J = 7,4$ Hz; 1H)   | 82,6                   | 81,1                   |
| 3       | 3,95 (m; $J = 8,1$ ; 7,7 e 5,5 Hz; 1H)                | 67.4                   | CH            | 4,01 (m; $J = 8,0$ ; 7,4 e 5,4 Hz; 1H)                                       | 68,6                   | 66,4                   |
| 4       | 2,80 (dd, $\text{H}\alpha$ ; $J = 16,1$ e 5,5 Hz; 1H) | 27.1                   | $\text{CH}_2$ | 2,84 (dd, $\text{H}\alpha$ ; $J = 16,0$ e 5,4 Hz; 1H)                        | 28,2                   | 28.0                   |
|         | 2,48 (dd, $\text{H}\beta$ ; $J = 16,1$ e 8,1 Hz; 1H)  |                        |               | 2,52 (dd, $\text{H}\beta$ ; $J = 16,0$ e 8,0 Hz; 1H)                         |                        |                        |
| 5       | -   | 156.2                  | -             | -  | 157,3                  | 156,3                  |
| 6       | 5,91 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H)                            | 95.0                   | CH            | 5,96 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H)   | 96,4                   | 95,2                   |
| 7       | -   | 156.4                  | -             | -  | 157,4                  | 156,6                  |
| 8       | 5,83 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H)                            | 94.2                   | CH            | 5,89 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H)   | 95,6                   | 94,0                   |
| 9       | -   | 155.5                  | -             | -  | 156,7                  | 155,5                  |
| 10      | -   | 99.5                   | -             | -  | 100,9                  | 99,2                   |
| 1'      | -   | 130.8                  | -             | -  | 132,0                  | 130,7                  |
| 2'      | 6,81 (d; $J = 1,8$ Hz; 1H)                            | 113.9                  | CH            | 6,85 (d; $J = 1,8$ Hz; 1H)   | 115,2                  | 114,6                  |
| 3'      | -   | 146                    | -             | -  | 146,0                  | 145,0                  |
| 4'      | -   |                        | -             |  |                        |                        |
| 5'      | 6,74 (d; $J = 8,1$ Hz; 1H)                            | 114,8                  | CH            | 6,79 (d; $J = 8,1$ Hz; 1H)   | 116,2                  | 115,2                  |
| 6'      | 6,69 (d; $J = 1,8$ e 8,1 Hz; 1H)                      | 118.7                  | CH            | 6,72 (dd; $J = 1,8$ e 8,1 Hz; 1H)  | 120,1                  | 118,6                  |

\* RMN de  $^{13}\text{C}$ : equipamento Bruker AC 600 spectrometer - 14,1 Tesla (150 MHz,  $\text{MeOH-d}_4$ ); RMN de  $^1\text{H}$ : equipamento Bruker advance DRX-500 - 11,7 Tesla (500 MHz,  $\text{MeOH-d}_4$ )

**FaqH:** No aspecto físico, a fração apresentou-se como sólido amarelo. No espectro UV foram observados dois sinais intensos em 370 nm e 255 nm (Figura 36). O espectro na região do infravermelho (Figura 37) apresentou uma banda longa de absorção entre  $3402\text{ cm}^{-1}$  e  $3300\text{ cm}^{-1}$  característica de ligação O-H (deformação axial), uma banda em  $1667\text{ cm}^{-1}$  relativa à presença de ligação dupla C=O correspondente a carbonila conjugada, e um conjunto de bandas entre  $1611$  e  $1409\text{ cm}^{-1}$ , características de anel aromático. As bandas entre  $1014$  e  $677\text{ cm}^{-1}$  representam as deformações angulares de C-H do anel aromático (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2014).

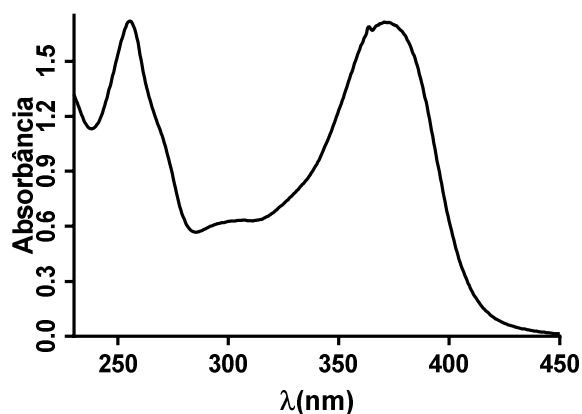


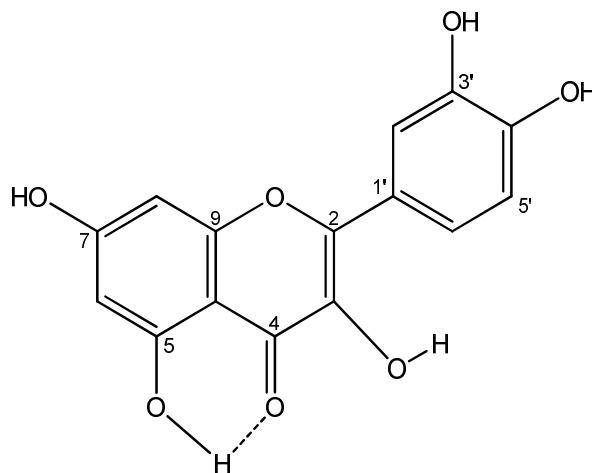
Figura 36. Espectro de ultravioleta (UV) de FaqH

Os deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 38) e RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 41) foram obtidos em 150 e 600 MHz respectivamente, utilizando DMSO deuterado como solvente. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou 15 linhas espectrais (Figura 39 e Figura 40), sinais característicos ao esqueleto carbônico de flavonoides; um sinal relacionado à carbonila em  $\delta$  176,3, e outros 14 entre  $\delta$  157 e 27. Dos sinais, 5 apresentam deslocamentos químicos característicos de carbonos com função oxigenada ( $\delta$ : 164,3; 161,18; 147,28; 145,53 e 136,19).

A análise de RMN de  $^1\text{H}$  revelou sinais na região de entre  $\delta$  6–8, característicos de presença de compostos aromáticos; um sinal em  $\delta$  12,43 (1 H, s), atribuído ao sinal de hidrogênio quelado entre a carbonila e o grupo hidroxila da posição 5 (KALEGARI *et al.*, 2011). Os valores dos deslocamentos químicos



(Figura 41) permitiram propor a estrutura de um flavonoide com oxigenação em 3, 5, 7, 3' e 4'.



Estrutura química da quercetina (**2**), hidrogênio quelado entre a carbonila e o grupo hidroxila da posição 5.

Os sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,62 ( $H_{2'}$ ,  $J=2.2$  Hz),  $\delta$  6,84 ( $H_{5'}$ ,  $J=8.4$  Hz) e  $\delta$  7,50 ( $H_{6'}$ ,  $J=8,4$  e  $2,1$  Hz) indicaram acoplamento *meta* entre  $H_{2'}$  e  $H_{6'}$  e acoplamento *orto* entre  $H_{5'}$  e  $H_{6'}$ , caracterizando uma dioxigenação do anel B em  $C_{3'}$  e  $C_{4'}$ . Nesta região são observados os dupletos referentes aos hidrogênios  $H_6$  ( $\delta$  6,14) e  $H_8$  ( $\delta$  6,36), ambos com  $J=2,2$  Hz, característico de um acoplamento *meta* de um anel aromático, os quais correspondem ao anel A de um flavonoide substituído nas posições C-5 e C-7 (Figura 42) (KALEGARI *et al.*, 2011; LAGE, 2011). A ausência do sinal de H-3, em conjunto com outros dados, permitiu propor a estrutura da quercetina (**2**) como a molécula correspondente a EDP.

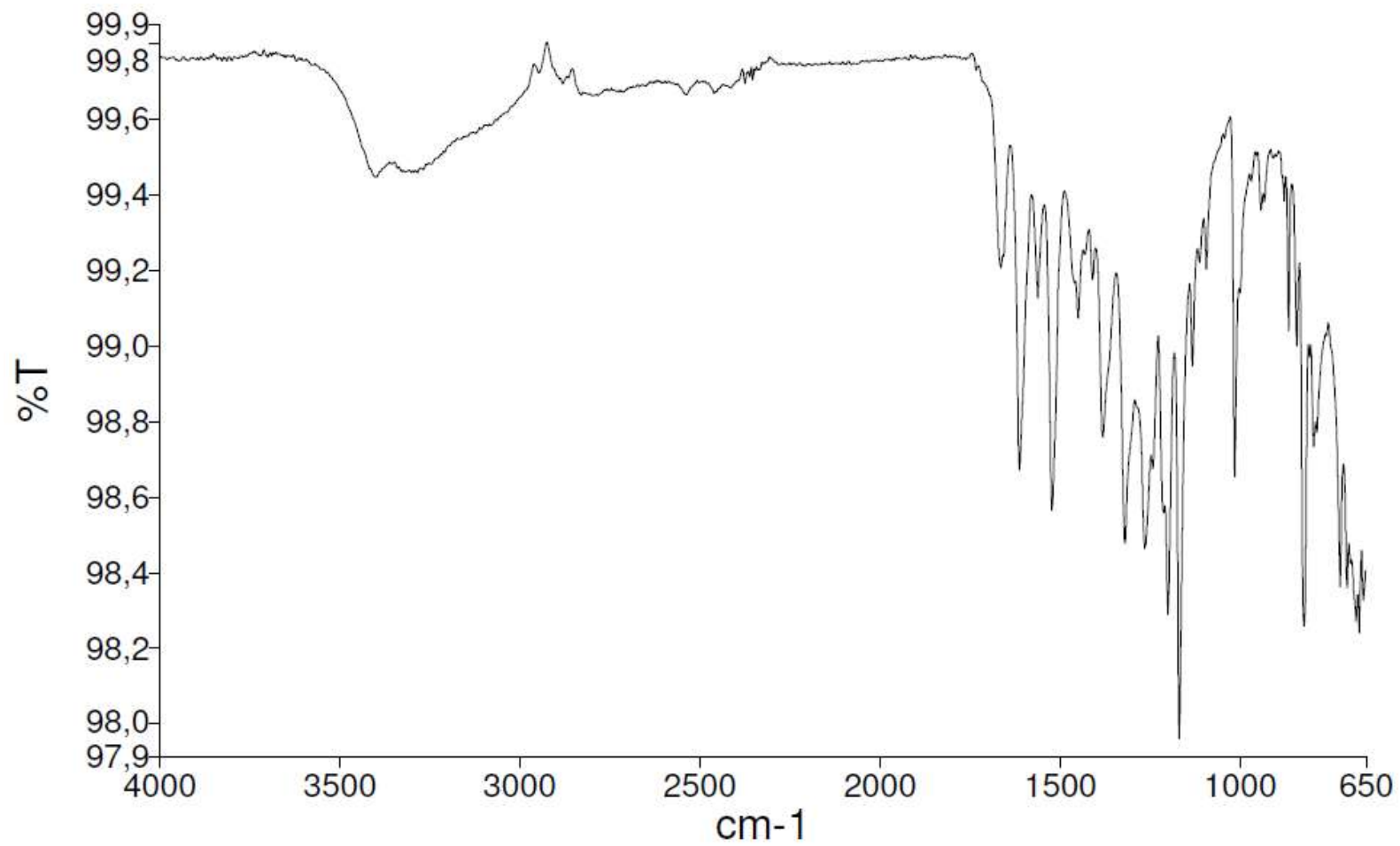


Figura 37. Espectro infravermelho de FaqH.

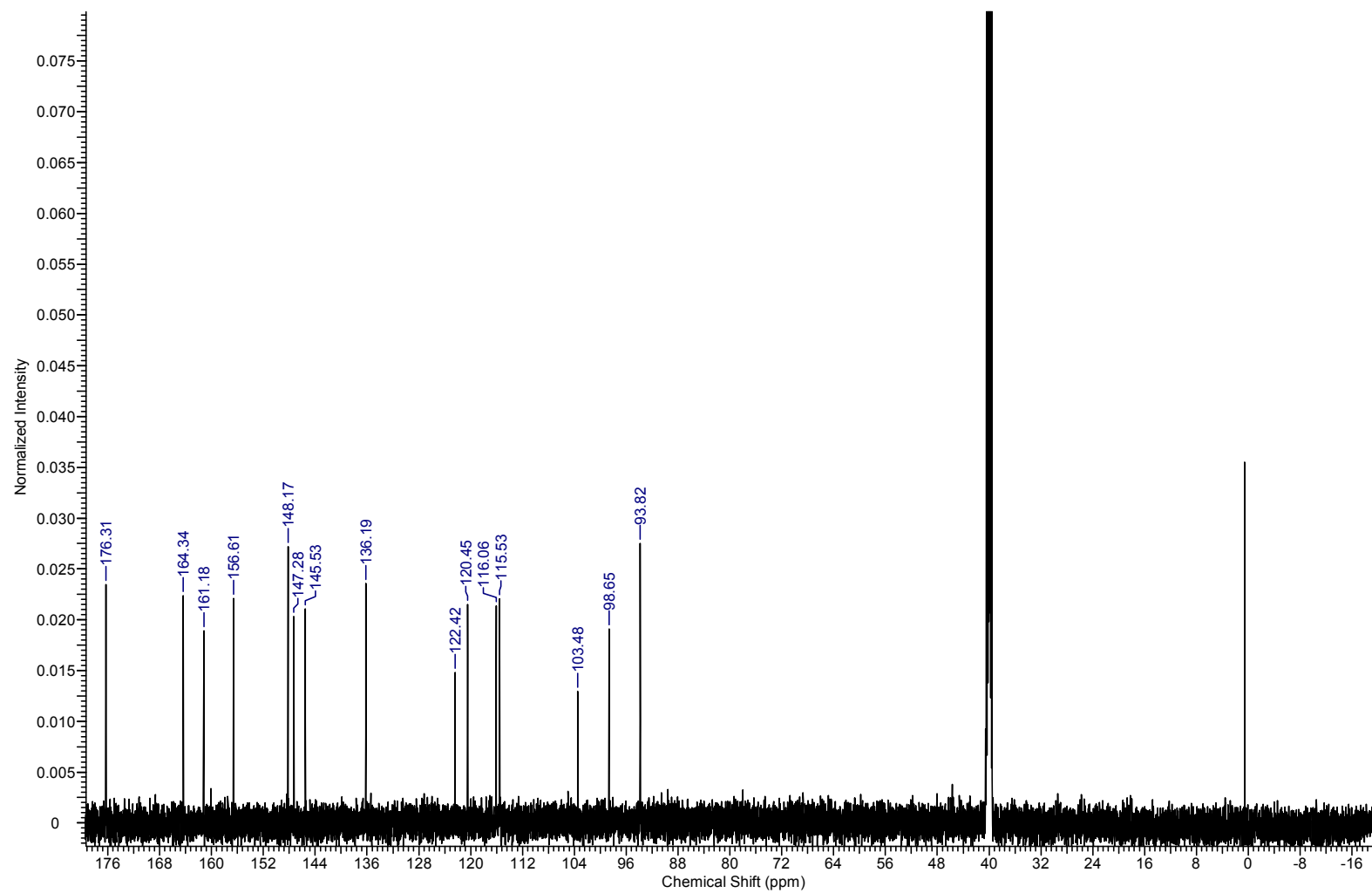


Figura 38. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  de FaqH (150 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )

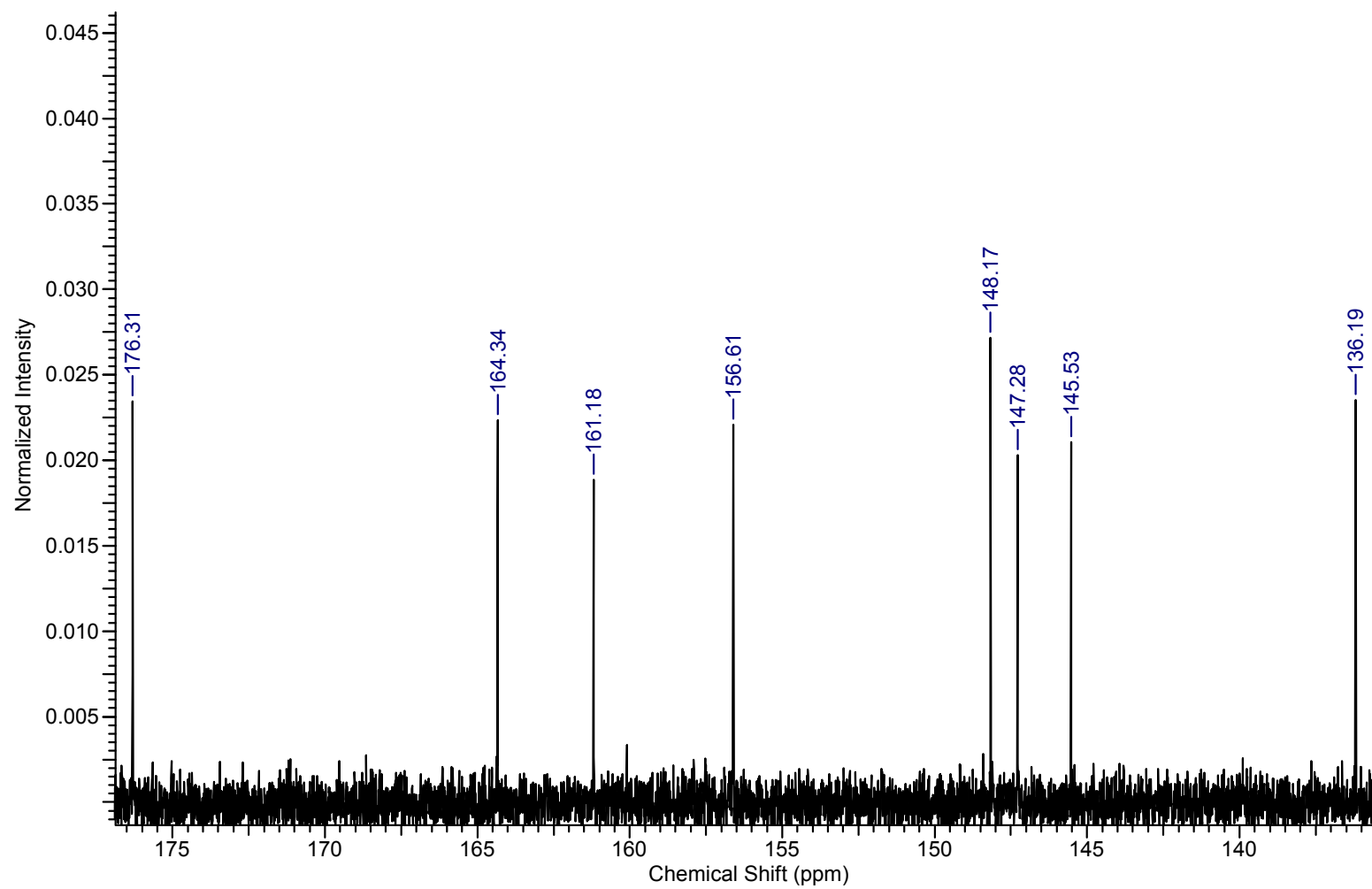


Figura 39. Expansão do Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  na região 177-136 ppm de FaqH (150 MHz, DMSO -  $\text{d}_6$ )

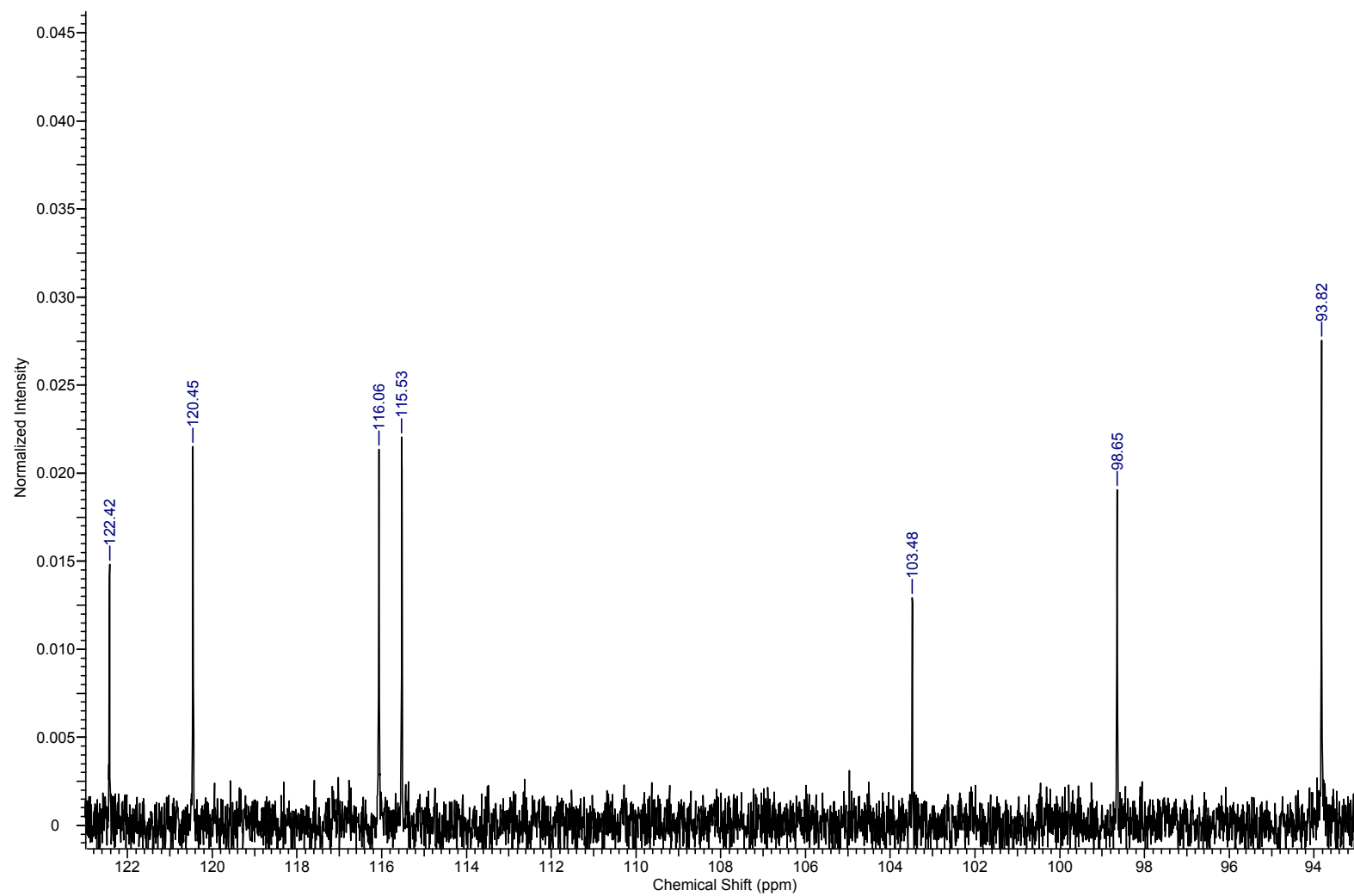


Figura 40. Expansão do Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  na região 195-94 ppm de FaqH (150 MHz, DMSO -  $d_6$ )

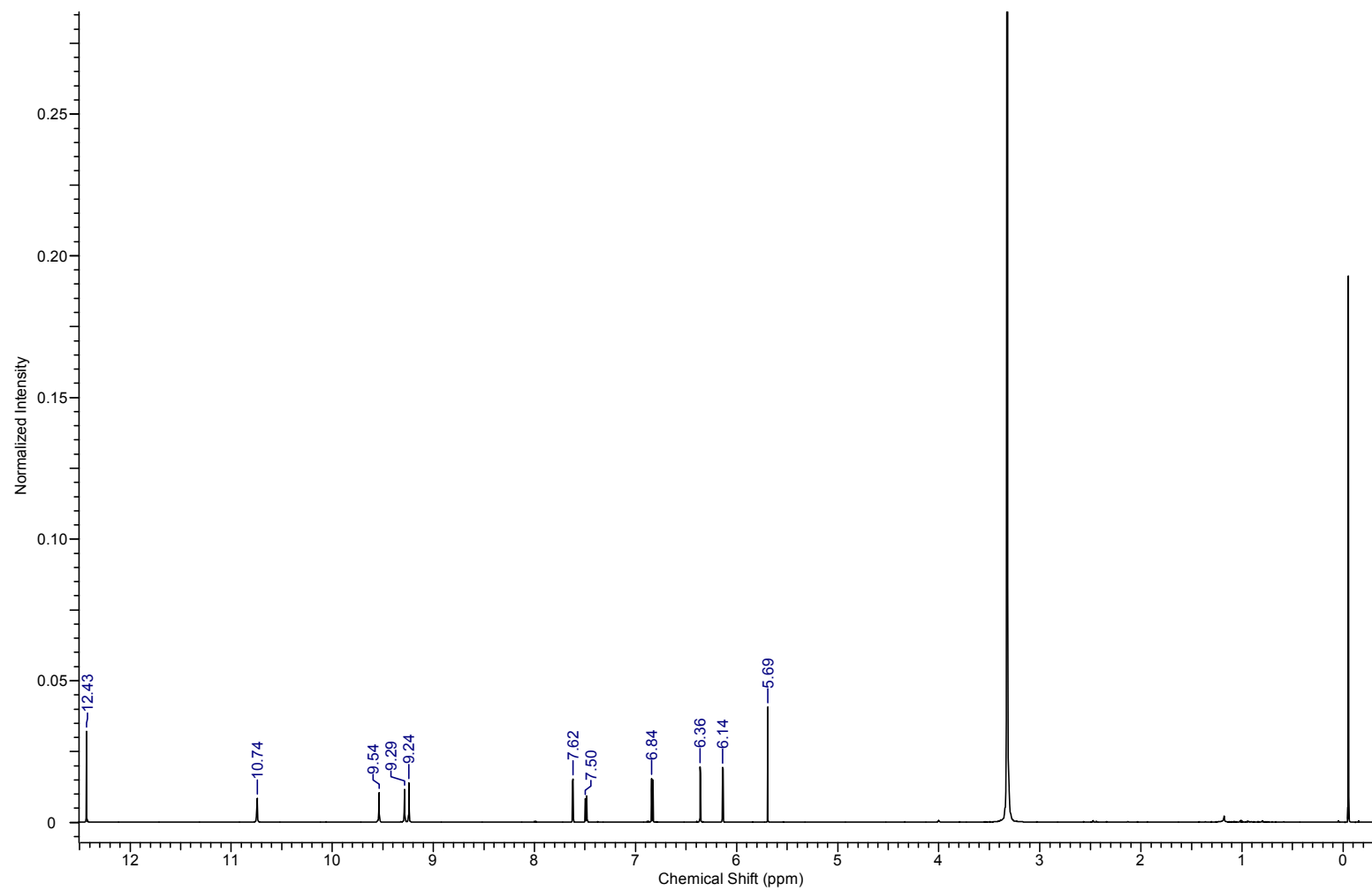


Figura 41. Espectro RMN de  $^1\text{H}$  de FaqH (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )

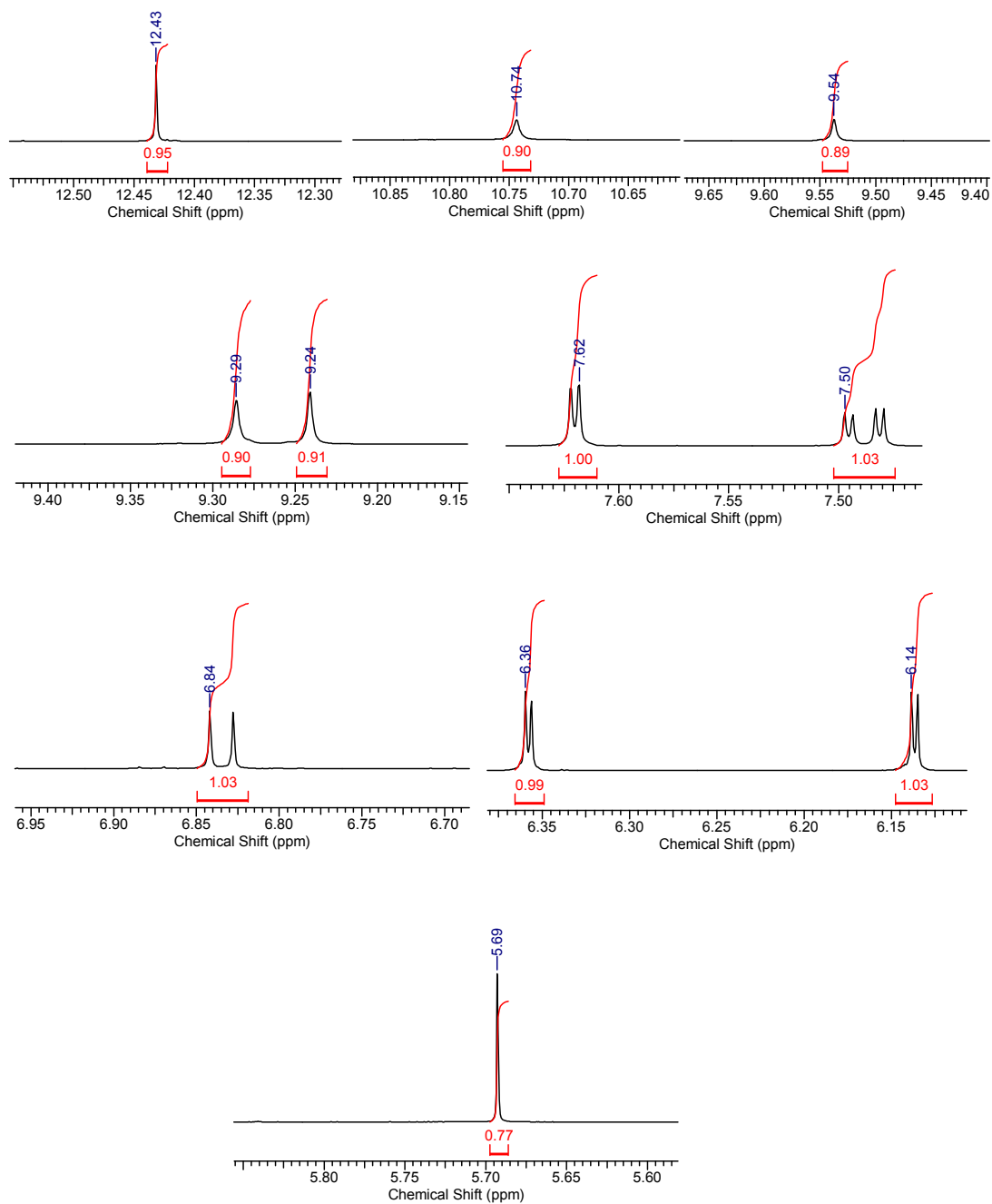


Figura 42. Expansão do espectro RMN de  $^1\text{H}$  de FaqH (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )

A estrutura foi confirmada pela comparação com dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  reportados na literatura (KALEGARI *et al.*, 2011). Os resultados podem ser observados na Tabela 15.

Tabela 15. Dados RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto FaqH.

| Posição | Experimental                        |                        | Quercetina (KALEGARI <i>et al.</i> , 2011) |                        |
|---------|-------------------------------------|------------------------|--|------------------------|
|         | $\delta\text{H}$ (ppm)              | $\delta\text{C}$ (ppm) | $\delta\text{H}$ (ppm)                     | $\delta\text{C}$ (ppm) |
| 2       | -                                   | 148,17                 | -  | 148,17                 |
| 3       | -                                   | 136,19                 | -  | 137,21                 |
| 4       | -                                   | 176,31                 | -  | 177,33                 |
| 5       | -                                   | 161,18                 | -  | 162,50                 |
| 6       | 6,14 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H)          | 98,65                  | 6,17 (d; $J = 2,1$ Hz; 1H)                 | 99,1                   |
| 7       | -                                   | 164,34                 | -  | 165,34                 |
| 8       | 6,36 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H)          | 93,82                  | 6,36 (d; $J = 2,1$ Hz; 1H)                 | 94,40                  |
| 9       | -                                   | 156,61                 | -  | 158,22                 |
| 10      | -                                   | 103,48                 | -  | 104,52                 |
| 1'      | -                                   | 122,42                 | -  | 124,15                 |
| 2'      | 7,62 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H)          | 115,53                 | 7,72 (d; $J = 2,1$ Hz; 1H)                 | 115,99                 |
| 3'      | -                                   | 147,28                 | -  | 148,75                 |
| 4'      | -                                   | 145,53                 | -  | 146,21                 |
| 5'      | 6,84 (d; $J = 8,4$ Hz; 1H)          | 116,06                 | 6,80 (d; $J = 8,4$ Hz; 1H)                 | 116,22                 |
| 6'      | 7,50 (dd; $J = 8,4$ e $2,1$ Hz; 1H) | 120,45                 | 7,6 (dd; $J = 8,7$ e $2,1$ Hz; 1H)         | 121,67                 |

\* Equipamento Bruker AC 200 spectrometer - 4,7 Tesla. RMN de  $^1\text{H}$ : 300 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>; RMN de  $^{13}\text{C}$ : 75 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>.



### 4.2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

#### 4.2.3.1 Proliferação celular

Os flavan-3-ol representam o maior grupo de metabólitos secundários presentes nas plantas (AHMED *et al.*, 2013; DAJAS *et al.*, 2015). Esses compostos possuem numerosas atividades biológicas e seus efeitos protetores estão relacionados a patologias que envolvem estresse oxidativo como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, entre outras (CREN-OLIVÉ *et al.*, 2002; AHMED *et al.*, 2013; SABOGAL *et al.*, 2015).

Relacionado com doenças neurodegenerativas, os polifenóis (flavonoides) inibem, de forma dose-dependente, a formação e desestabilização de fibrilas beta-amiloides (A $\beta$ ). Alguns autores concordam quanto à importância dos flavonoides como moléculas chave para o desenvolvimento de terapias para o tratamento da DA, especificamente na prevenção de sintomas relacionados a déficits de memória (ANSARI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2013; DAS *et al.*, 2014).

A catequina (**1**) e a quercetina (**2**) são conhecidas por sua ação benéfica para a saúde humana (IMAI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2014; HELGREN *et al.*, 2015). Catequina tem sido relacionada com atividade antioxidante, anticarcinogênica, neuroprotetora, anti-inflamatória, entre outras (BAN *et al.*, 2006; SUTHERLAND; RAHMAN; APPLETON, 2006; AHMED *et al.*, 2013). Quercetina está associada às atividades antioxidante, neuroprotetora, anti-inflamatória, antidepressiva, entre outras (ANSARI *et al.*, 2009; BANDARUK; MUKAI; TERAQ, 2014; DAJAS *et al.*, 2015; SABOGAL *et al.*, 2015).

O teste de sensibilidade das células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, quando expostas ao extrato aquoso de *E. dysenterica*, foi realizado para contribuir com estudo da segurança *in vitro* do extrato aquoso dessa espécie. Os resultados sugerem um efeito citotóxico consistente do extrato aquoso em concentrações maiores que 7,81  $\mu\text{g/mL}$ , e este efeito pode estar relacionado com atividade antiproliferativa. Em concentrações mais baixas, a viabilidade celular se manteve acima de 97% depois de 24 horas do tratamento ( $p < 0,05$ ).

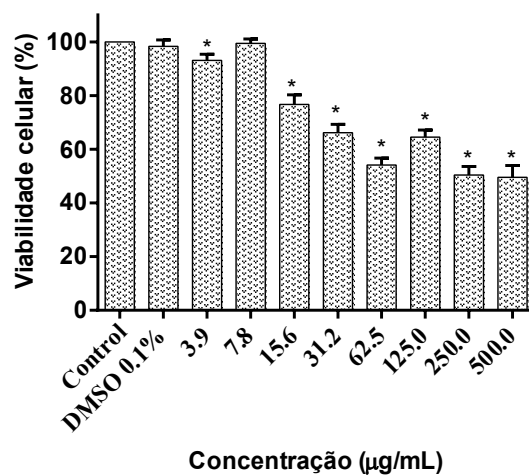


Figura 43. Viabilidade celular das células de neuroblastoma SH-SY5Y quando expostas ao extrato aquoso de Cagaita.

Diferença significativa entre o grupo controle e o extrato aquoso foram medidos pelo teste de comparação múltipla de Tukey (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3.2 Inibição da acetilcolinesterase *in vitro*

Foi avaliado o efeito inibidor do extrato aquoso e as substâncias isoladas (quercetina e catequina) sobre a enzima AChE pelo método colorimétrico de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961) em microplacas de 96 poços. Como padrão interno foi usado o inibidor fisostigmina (**34**). A curva dose-resposta é mostrada na Figura 44 e o resumo dos resultados é mostrado na

Tabela 16. A  $CI_{50}$  para o extrato aquoso e o padrão fisostigmina foi de  $155,20 \pm 2,09$  e  $18,69 \pm 0,07$  µg/mL, respectivamente. Os compostos isolados do extrato, quercetina e catequina, mostraram a  $CI_{50}$  de  $46,59 \pm 0,49$  e  $42,39 \pm 0,67$  µg/mL respectivamente. Esses compostos exibiram uma atividade inibitória semelhante e foram mais ativos que o extrato aquoso.

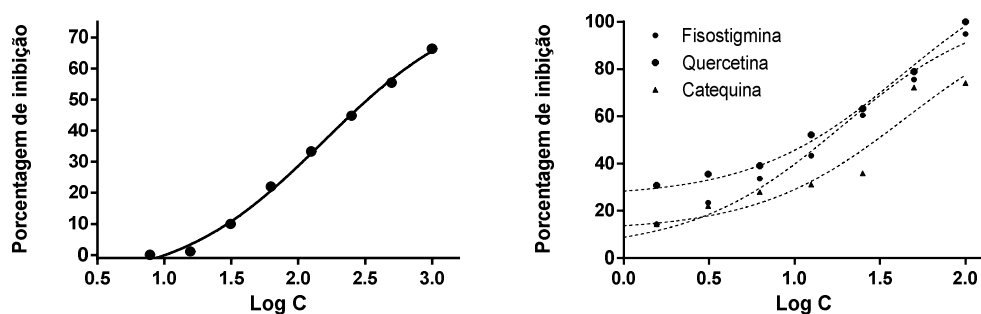


Figura 44. Curva dose-resposta da fisostigmina, quercetina e catequina (lado direito) e o extrato aquoso de *Eugenia dysenterica* (lado esquerdo) sobre a atividade da AChE.

Os valores estão expressos como o valor médio de um experimento feito por triplicata.

Tabela 16. Porcentagem de inibição do extrato aquoso, dos compostos isolados (catequina e quercetina) e do padrão fisostigmina

| Extrato aquoso |             | C (µg/mL) | Fisostigmina | Quercetina  | Catequina  |
|----------------|-------------|-----------|--------------|-------------|------------|
| C (µg/mL)      | PI          |           | PI           |             |            |
| 7,81           | 0,020±0,002 | 0,78      | 0,12±0,01    | 23,82±2,48  | 9,20±0,53  |
| 15,62          | 1,11±0,48   | 1,56      | 14,27±0,28   | 30,76±1,43  | 14,39±0,78 |
| 31,25          | 10,01±1,08  | 3,12      | 23,43±1,62   | 35,50±1,07  | 22,01±0,93 |
| 62,5           | 22,02±1,56  | 6,25      | 33,64±2,03   | 39,10±2,37  | 27,93±1,11 |
| 125            | 33,31±1,23  | 12,5      | 43,39±2,17   | 52,18±2,05  | 31,10±0,82 |
| 250            | 44,79±2,54  | 25        | 60,44±1,10   | 63,23±3,12  | 35,91±1,07 |
| 500            | 55,48±2,17  | 50        | 75,64±1,82   | 78,94±2,09  | 72,19±1,83 |
| 1000           | 66,33±2,82  | 100       | 94,89±1,36   | 100,00±3,11 | 74,15±2,13 |

PI: Porcentagem de inibição; C: Concentração (µg/mL)

Relatos na literatura sugerem que a catequina previne a formação de placas Aβ (25–35), que induzem dano celular em cultura de neurônios corticais isolados de ratos. O mecanismo de ação envolve o aumento da  $[Ca^{2+}]_c$ , a liberação de glutamato e diminuição das espécies reativas de oxigênio (ERO). Como resultado, atenua a apoptose neuronal em cultura primária de neurônios corticais isolados de ratos (BAN *et al.*, 2006). AHMED *et al.* (2013) identificaram o efeito neuroprotetivo do hidrato de catequina (HC) em ratos, usando o modelo experimental de DA por injeção intracerebroventricular de estreptozotocina. Os resultados mostraram que o HC induziu alterações no hipocampo e no córtex cerebral, atenuando os danos oxidativos e o déficit de memória e aprendizagem.

Estudo realizado em cultura primária de neurônios corticais, isolados de fetos de ratos Sprague-Dawley de 18 dias, concluiu que a quercetina (**2**) apresenta efeito protetor contra a toxicidade A $\beta$  (1-42), por modulação do estresse oxidativo em concentrações menores (5 e 10  $\mu$ M). No entanto, doses mais elevadas foram tóxicas e não apresentaram atividade neuroprotetora (ANSARI *et al.*, 2009). Esses resultados concordam com os efeitos dose-dependente da catequina que mostra propriedades pró-oxidantes em concentrações >100  $\mu$ M (SUTHERLAND; RAHMAN; APPLETON, 2006).

BANDARUK; MUKAI;TERAO (2014) estimaram o efeito citotóxico da quercetina em cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Os autores sugeriram que a porção catecol no anel B da quercetina pode sofrer reação de O-metilação pela catecol-O-metil-transferase para produzir os correspondentes derivados metilados, tamarixetina (4-O-metilquercetina) e isorhamnetina (3-O-metilquercetina). Porém, a quercetina e a isorhamnetina não mostraram efeitos significativos na viabilidade celular a concentrações menores a 100  $\mu$ M, após 24 horas de tratamento (BANDARUK; MUKAI; TERA0, 2014).

#### 4.2.3.3 Sensibilidade a agentes antimicrobianos e antifúngicos

Nas condições experimentais, o extrato hexânico, assim como as pré-frações e frações obtidas por cromatografia em coluna, não mostraram atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e contra as três espécies de fungos *Candida albicans* ATCC 40277, *C. glabrata* ATCC 40136 e *C. krusei* ATCC 34135. A ausência de atividade foi medida qualitativamente pela observação de halo de inibição. Segundo o NCCLS, considera-se sensível quando se observa halo  $\geq$ 10,0 mm e resistente quando não houve desenvolvimento de halo ou este foi 10,0 mm (NCCLS, 2003).

Vários relatos sobre a atividade antimicrobiana dos extratos e frações mais polares de folhas de *E. dysenterica* podem ser encontrados na literatura. Em um deles foi reportado que o extrato aquoso, obtido das folhas de *E. dysenterica*, apresenta um halo de inibição de  $10,3 \pm 0,6$  mm e um valor CIM de 250  $\mu$ g/disco, quando testado frente a *S. aureus*. Os mesmos autores testaram as frações acetônica, metanólica e isopropanólica, obtidas a partir do extrato aquoso. As três

frações mostraram igual valor CIM quando comparado com o extrato aquoso com halo de inibição de  $11,6 \pm 0,6$  mm para a fração acetônica e  $10,0 \pm 0,0$  mm para as frações metanólica e isopropanólica (SILVA, S. M., 2014).

A partir dos resultados de sensibilidade por difusão em disco, foi realizado o biomonitoramento do extrato aquoso e das frações acetônica, metanólica e isopropanólica da espécie pelo método de microdiluição em caldo. O extrato aquoso mostrou uma considerável atividade antimicrobiana para as diferentes cepas de *S. aureus*, enquanto a fração acetônica inibiu todas as cepas testadas (SILVA, S. M., 2014).

A sensibilidade da bactéria Gram-positiva *S. aureus*, quando exposta ao extrato aquoso de *E. dysenterica*, parece estar relacionada com compostos fenólicos como a catequina, entre outros. A caracterização fitoquímica por CCD e CLAE ratificou a presença desse flavonoide no extrato aquoso. No presente trabalho, é reportado o isolamento e caracterização espectrométrica de (+)-catequina no extrato aquoso, corroborando com os resultados descritos na literatura (SILVA, S. M., 2014).

Em uma revisão recente sobre a composição fitoquímica das folhas de *E. dysenterica* foi relatada a presença de compostos fenólicos (catequina, quercetina, epicatequina, procianidina, ácido elágico), além de monoterpenos e sesquiterpenos como  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -copaeno,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -limoneno, sabineno, entre outros (SILVA, S. *et al.*, 2015).

**CONCLUSÃO**

## 5 CONCLUSÃO

O estudo químico do extrato aquoso das folhas de cagaita levou ao isolamento e identificação de dois flavonoides do grupo flavan-3-ol, catequina e quercetina. Apesar de tais compostos serem amplamente difundidos na natureza e terem sido identificados anteriormente como componentes de extratos e frações de *E. dysenterica*, esse é o primeiro relato do seu isolamento em folhas da espécie.

A partir do extrato hexânico, foram identificados quatro triterpenos pentacíclicos,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, neolupenol e gammacer-16-en-3 $\beta$ -ol. Até onde vai nosso conhecimento, é a primeira vez que esses compostos são identificados e reportados nas folhas de cagaita. No mesmo extrato foi identificado  $\alpha$ -tocoferol.

O extrato aquoso da planta apresentou atividade inibitória da acetilcolinesterase menor quando comparado com o padrão fisostigmina. Os flavonoides isolados a partir desse extrato revelaram uma atividade inibitória maior quando comparados com o extrato aquoso.

O estudo de viabilidade celular pelo método com XTT revelou que as células de neuroblastoma humano (linhagem celular SH-SY5Y) se mostraram sensíveis quando expostas ao extrato aquoso de *E. dysenterica*.

O extrato hexânico, assim como suas frações não se mostraram ativos contra a cepa da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e as cepas de fungos *Candida albicans* ATCC 40277, *C. glabrata* ATCC 40136 e *C. krusei* ATCC 34135.

Os resultados aqui obtidos contribuem para o conhecimento da potencialidade de uma espécie do Cerrado e atendem às políticas públicas brasileiras que estimulam a pesquisa e desenvolvimento de produtos e processos a partir de espécies nativas.

## 6 REFERÊNCIAS

- ADEWUSI, E. A.; STEENKAMP, V. Medicinal plants and their derivatives with amyloid beta inhibitory activity as potential targets for drug discovery. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 6, p. 430-440, 2015.
- AGETA, H.; SHIOJIMA, K.; MASUDA, K.; LIN, T. Composite constituents: four new triterpenoids, neolupenol, tarolupenol and their acetates isolated from roots of a japanese dandelion, *Taraxacum japonicum*. **Tetrahedron Letters**, v. 22, n. 24, p. 2289-2290, 1981.
- AGHOLME, L.; LINDSTRÖM, T.; KÅGEDAL, K.; MARCUSSON, J.; HALLBECK, M. An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. 4, p. 1069-1082, 2010.
- AHMED, M. E.; KHAN, M. M.; JAVED, H.; VAIBHAV, K.; KHAN, A.; TABASSUM, R.; ASHAFAQ, M.; ISLAM, F.; SAFHI, M.; ISLAM, F. Amelioration of cognitive impairment and neurodegeneration by catechin hydrate in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 4, p. 492-501, 2013.
- ALMEIDA, E.; ROSA, F.; FUSTINONI, A.; SANTÁNA, L.; ARRUDA, S. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1-8, 2013.
- ALMEIDA, S.; PROENÇA, C.; SANO, S.; RIBEIRO, J. **Cerrado: Espécies vegetais úteis**. Planaltina, DF.: Embrapa-CPAC. 1998. 464 p.
- ALMEIDA, S.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá**. Planaltina-DF. : Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, v.26. 1987. 83 p.



- ANAND, P.; SINGH, B.; SINGH, N. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 3, p. 1175-1180, 2012.
- ANSARI, M. A.; ABDUL, H. M.; JOSHI, G.; OPII, W.; BUTTERFIELD, D. A. Protective effect of quercetin in primary neurons against A $\beta$  (1–42): Relevance to Alzheimer's disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 269-275, 2009.
- ATANASOVA, M.; STAVRAKOV, G.; PHILIPOVA, I.; ZHELEVA, D.; YORDANOV, N.; DOYTCHINOVA, I. Galantamine derivatives with indole moiety: Docking, design, synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 17, p. 5382-5389, 2015.
- AURICCHIO, M.; BUGNO, A.; BARROS, S.; BACCHI, E. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 76, 2007.
- AYRES, M.; CHAVES, M.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; JÚNIOR, G. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1509-1512, 2009.
- BAN, J. Y.; JEON, S.-Y.; BAE, K.; SONG, K.-S.; SEONG, Y. H. Catechin and epicatechin from *Smilacis chiniae* rhizome protect cultured rat cortical neurons against amyloid  $\beta$  protein (25–35)-induced neurotoxicity through inhibition of cytosolic calcium elevation. **Life Sciences**, v. 79, n. 24, p. 2251-2259, 2006.
- BANDARUK, Y.; MUKAI, R.; TERAQ, J. Cellular uptake of quercetin and luteolin and their effects on monoamine oxidase-A in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Toxicology Reports**, v. 1, n., p. 639-649, 2014.
- BASAR, S. **Phytochemical investigations on Boswellia species**. 256 p. - Institute of Organic Chemistry University of Hamburg, Hamburg, 2005.

- BASSO, A.; GROSSI, M.; PELEGRINI, P. Biopharmaceutical and Biosimilar Products in Brazil: From Political To Biotechnological Overview. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v. 5, n. 1, p. 60-66, 2013. 2010.
- BATLLE-BAYER, L.; BATJES, N.; BINDRABAN, P. Changes in organic carbon stocks upon land use conversion in the Brazilian Cerrado: A review. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 137, n. 1, p. 47-58, 2010.
- BENAVIDES, A.; MONTORO, P.; BASSARELLO, C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C. Catechin derivatives in *Jatropha macrantha* stems: Characterisation and LC/ESI/MS/MS qualitative analysis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 40, n. 3, p. 639-647, 2006.
- BERNARDE, C. C. **Estudo sobre amplificação e deleção dos genes BCHE e ACHE em portadoras de câncer de mama esporádico** 97 p. - Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BERTUCCI, A.; OLIVARO, C.; SILVA, P.; RAMOS, D.; CERDEIRAS, M. P.; VÁZQUEZ, A. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 20-25, 2009.
- BEUCHLE, R.; GRECCHI, R. C.; SHIMABUKURO, Y. E.; SELIGER, R.; EVA, H. D.; SANO, E.; ACHARD, F. Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach. **Applied Geography**, v. 58, n., p. 116-127, 2015.
- BEZERRA, J.; SILVA, I.; FERREIRA, H.; FERRI, P.; SANTOS, S. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 428-430, 2002.
- BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Brasília DF.: Ministério da Saúde: 91 p. 2006.

\_\_\_\_\_. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária: 126 p. 2011.

BRITO, M. A.; PEREIRA, E. B.; PEREIRA, A. V.; RIBEIRO, J. F. **Cagaita; biologia e manejo**. Planaltina, DF. : EMBRAPA 2003

BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII.<sup>1</sup> Pentacyclic triterpenes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 22, p. 3688-3699, 1963.

CAMPOS, M.; SILVA, R.; CHAVES, L. J.; COELHO, A.; DINIZ FILHO, J. A. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 11, p. 1387-1394, 2001.

CARDOSO, L. M.; MARTINO, H. S.; MOREIRA, A. V.; RIBEIRO, S. M.; PINHEIRO, H. M. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2151-2154, 2011.

CARVALHO, L.; RIBEIRO, E.; MOURA, M.; MOTTA, E.; VIANA, D.; BARBI, N.; FIGUEIREDO, V. **Study of volatile compounds in cagaita** 5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management. Potsdam: 1508-1512 p. 2009.

CASSINO, R. F.; MARTINHO, C. T.; SILVA, S. Modern pollen spectra of the Cerrado vegetation in two national parks of Central Brazil, and implications for interpreting fossil pollen records. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 223, n., p. 71-86, 2015.

CASTLE, L.; JICKELLS, S.; SHARMAN, M.; GRAMSHAW, J. Migration of the Plasticizer Acetyltributyl Citrate from Plastic Film into Foods during Microwave Cooking and Other Domestic Use. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 12, p. 916-919, 1988.

- CASTLE, L.; MERCER, A.; STARTIN, J.; GILBERT, J. Migration from plasticized films into foods 3. Migration of phthalate, sebacate, citrate and phosphate esters from films used for retail food packaging. **Food Additives & Contaminants**, v. 5, n. 1, p. 9-20, 1988.
- CECÍLIO, A.; FARIA, D.; CARVALHO, P.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D.; SOBRAL, M. E.; DUARTE, M. G.; SOUZA, C. P.; SILVA, C.; ALMEIDA, V. L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 975-981, 2012.
- CERCATO, L.; WHITE, P.; NAMPO, F.; SANTOS, M.; CAMARGO, E. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, n., p. 286-296, 2015.
- CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007.
- CHAVES, T. L.; RICARDO, L.; PAULA, J.; BRANDÃO, M. Useful Brazilian plants under the view of the writer-naturalist João Guimarães Rosa. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 5, p. 437-444, 2015.
- CHUDZIK, M.; KORZONEK-SZLACHETA, I.; KRÓL, W. Triterpenes as potentially cytotoxic compounds. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 1610-1625, 2015.
- CICCARONE, V.; SPENGLER, B. A.; MEYERS, M. B.; BIEDLER, J. L.; ROSS, R. A. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. **Cancer Research**, v. 49, n. 1, p. 219-225, 1989.
- COLE, R.; HABER, W.; SETZER, W. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 877-886, 2007.

- COSTA, A. S. **Neurotransmissores e drogas: Alterações e implicações clínicas**. 57 p. - Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.
- COSTA, T.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. L.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B. H. N.; SILVA, M. R. R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1, p. 111-117, 2000.
- CREN-OLIVÉ, C.; WIERUSZESKI, J. M.; MAES, E.; ROLANDO, C. Catechin and epicatechin deprotonation followed by <sup>13</sup>C NMR. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 25, p. 4545-4549, 2002.
- DAJAS, F.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; ARREDONDO, F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MARTÍNEZ, M.; RIVERA, F.; VAAMONDE, L. Quercetin in brain diseases: Potential and limits. **Neurochemistry International**, v. 89, n., p. 140-148, 2015.
- DAS, S.; MITRA, I.; BATUTA, S.; ALAM, N.; ROY, K.; BEGUM, N. A. Design, synthesis and exploring the quantitative structure–activity relationship of some antioxidant flavonoid analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 21, p. 5050-5054, 2014.
- DJIPA, C. D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1, p. 307-313, 2000.
- DRACZKOWSKI, P.; TOMASZUK, A.; HALCZUK, P.; STRZEMSKI, M.; MATOSIUK, D.; JOZWIAK, K. Determination of affinity and efficacy of acetylcholinesterase inhibitors using isothermal titration calorimetry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v., n., p., 2015.
- DRĄG-ZALESIŃSKA, M.; WYSOCKA, T.; BORSKA, S.; DRĄG, M.; POREBA, M.; CHOROMAŃSKA, A.; KULBACKA, J.; SACZKO, J. The new esters derivatives of betulin and betulinic acid in epidermoid squamous carcinoma treatment–In vitro studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, n., p. 91-97, 2015.

- DUARTE, A.; COSTA, A.; SANTOS, S.; FERRI, P.; PAULA, J.; NAVES, R. Changes in Volatile Constituents During Fruit Ripening of Wild *Eugenia dysenterica* DC. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 1, p. 30-32, 2008.
- DUARTE, A.; NAVES, R.; SANTOS, S.; SERAPHIN, J.; FERRI, P. Seasonal influence on the essential oil variability of *Eugenia dysenterica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 967-974, 2009.
- ELIAS, F.; ZILS, T.; AGUIAR, F.; BARROS, E.; MOLICA, M.; MELO, R. Toxicological studies on the *Eugenia dysenterica* DC and *Caryocar brasiliense* Cambess leaves in rats. **Planta Medica**, v. 76, n. 12, p. 643, 2010.
- ELLMAN, G.; COURTNEY, D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.
- FANG, J.; XIANGCHANG, H.; WENJIAN, X.; JIE, Y.; LILI, W.; CHAOJIAN, C. Study on migration of citrate plasticizers in food packaging materials. **Plastics Science and Technology** v. 1, n. 10, p. 108-111, 2014.
- FARIA, J. E. **O gênero Eugenia L.(Myrtaceae) nos estados de Goiás e Tocantins, Brasil**. p. (Dissertação) - Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.
- FONSECA, R.; SOUZA, N.; CORREA, T. C.; GARCIA, L.; REIS, L. G.; RODRIGUEZ, A. Assessment of toxic potential of Cerrado fruit seeds using *Artemia salina* bioassay. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 251-256, 2013.
- GANEM, R. S.; DRUMMOND, J. A.; FRANCO, J. L. Conservation policies and control of habitat fragmentation in the Brazilian Cerrado biome. **Ambiente & Sociedade**, v. 16, n. 3, p. 99-118, 2013.
- GASPAR, A.; HENRIQUE, R.; ARAUJO, A.; AGUIAR, F.; ZILS, T.; SILVA, B.; BARROS, E.; OLIVEIRA, Q.; MOLICA, M.; MELO, R. *Haemonchus contortus*: *in vivo* anthelmintic

activity of *Eugenia dysenterica* DC. and *Caryocar brasiliense* Cambess leaves in sheep. **Planta Medica**, v. 76, n. 12, p. P636, 2010.

GENOVESE, M.; PINTO, M.; GONÇALVES, A.; LAJOLO, F. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology**, v. 14, n. 3, p. 207-214, 2008.

GIROLDO, A.; SCARIOT, A. Land use and management affects the demography and conservation of an intensively harvested cerrado fruit tree species. **Biological Conservation**, v. 191, n., p. 150-158, 2015.

GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L.; WANDERLEY, M.; VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

GOMATHI, R.; MANIAN, S. Analgesic and acetylcholinesterase inhibition potential of polyphenols from *Scolopia crenata* (Flacourtiaceae): An endemic medicinal plant of India. **Industrial Crops and Products**, v. 73, n., p. 134-143, 2015.

HELGREN, T.; SCIOTTI, R.; LEE, P.; DUFFY, S.; AVERY, V.; IGBINOBA, O.; AKOTO, M.; HAGEN, T. The synthesis, antimalarial activity and CoMFA analysis of novel aminoalkylated quercetin analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 2, p. 327-332, 2015.

HOLETZ, F.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D.; NAKAMURA, C.; DIAS FILHO, B. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

IMAI, K.; NAKANISHI, I.; OHNO, A.; KURIHARA, M.; MIYATA, N.; MATSUMOTO, K.-I.; NAKAMURA, A.; FUKUHARA, K. Synthesis and radical-scavenging activity of a dimethyl catechin analogue. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 11, p. 2582-2584, 2014.

- INGKANINAN, K.; TEMKITTHAWON, P.; CHUENCHOM, K.; YUYAEM, T.; THONGNOI, W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2, p. 261-264, 2003.
- JIVAD, N.; RABIEI, Z. A review study on medicinal plants used in the treatment of learning and memory impairments. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 10, p. 780-789, 2014.
- JORGE, N.; MORENO, D. M.; BERTANHA, B. J. *Eugenia dysenterica* DC: actividad antioxidante, perfil de ácidos grasos y determinación de tocoferoles. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 37, n. 2, p. 208-214, 2010.
- KALEGARI, M.; MIGUEL, M. D.; DIAS, J.; LORDELLO, A. L.; LIMA, C. P.; MIYAZAKI, C. M.; ZANIN, S. M.; VERDAM, M. C.; MIGUEL, O. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch.(Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.
- KIM, T.; CHOI, H. J.; EOM, S.-H.; LEE, J.; KIM, T. H. Potential  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from thermal transformation of (+)-catechin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 6, p. 1621-1624, 2014.
- LAGE, G. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart.** 132 p. - Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- LARHSINI, M.; OUMOULID, L.; LAZREK, H.; WATALEB, S.; BOUSAID, M.; BEKKOUCHE, K.; JANA, M. Antibacterial activity of some Moroccan medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 250-252, 2001.
- LI, R.-S.; WANG, X.-B.; HU, X.-J.; KONG, L.-Y. Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potential multifunctional acetylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 9, p. 2636-2641, 2013.



- LIMA, T. **Caracterização Fitoquímica da cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC) para compostos laxativos e antidiarréicos** 84 p. (Dissertation) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF, 2007.
- LIMA, T.; SILVA, O.; OLIVEIRA, J.; VASCONCELOS, I.; SCALABRIN, F.; ROCHA, T.; GROSSI, M.; SILVA, L.; GUADAGNIN, R.; QUIRINO, B. Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: A novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. **Peptides**, v. 31, n. 8, p. 1426-1433, 2010.
- LIMA, T.; SILVA, O.; SILVA, L.; ROCHA, T.; GROSSI, M.; FRANCO, O.; LEONARDECZ, E. *In vivo* effects of Cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) leaf extracts on diarrhea treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, n., p. 1-10, 2011.
- LORENZI, H. **Arvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. São Paulo: Nova Odessa 2002. 368 p.
- MAGINA, M.; DALMARCO, E.; WISNIEWSKI, A.; SIMIONATTO, E.; DALMARCO, J.; PIZZOLATTI, M.; BRIGHENTE, I. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of Eugenia species. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, n. 3, p. 345-350, 2009.
- MAHATO, S.; KUNDU, A. <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.
- MARQUES, J.; BORGES, C. **Práticas de Química Orgânica**. Átomo. 2012
- MARQUES, P. **Estudo químico de folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. (Sapotaceae): Biomonitoramento por inibição da alfa-amilase** 128 p. - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2015.

MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SOARES, F.; SANTOS, B.; NOGUEIRA, R. **Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.)**. Lavras-MG: Universidade Federal de Lavras. 2008. 1-21 p. (Boletim Técnico)

MOBOT. **Tropicos.org**. Saint Louis: Missouri Botanical Garden 2016.

MONTALDI, A. P. **Influência do gene APE1/REF-1 nas respostas celulares das linhagens de glioblastoma ao quimioterápico temozolomida**. 166 p. - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

NAVES, R. V.; ALMEIDA, J. X.; ROCHA, M.; BORGES, J.; CARVALHO, G.; CHAVES, L. J.; SILVA, V. Determinação de características físicas em frutos e teor de nutrientes, em folhas e no solo, de três espécies frutíferas de ocorrência natural nos cerrados de Goiás. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 107-114, 1995.

NCCLS. **Approved Standard** NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. N. N. C. F. C. L. STANDARDS). 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA 2003.

NIST. **Standard Reference Data**. USA: U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America 2011.

NOVAES, P.; MOLINILLO, J.; VARELA, R.; MACÍAS, F. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 4, p. 839-855, 2013.

OGA, F. M.; FONSECA, C. E. Um método rápido para estimar área foliar em mudas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 571-578, 1994.

OGUNKOYA, L. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. **Phytochemistry**, v. 20, n. 1, p. 121-126, 1981.

- OLIVEIRA, M.; ANDRADE, C.; SANTOS, N.; COELHO, L.; TEIXEIRA, J.; CARNEIRO, M.; CORREIA, M. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 371-376, 2008.
- OLIVEIRA, V.; YAMADA, L.; FAGG, C.; BRANDÃO, M. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012.
- PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.; VYVYAN, J. **Introdução à espectroscopia**. 2010 (Cengage Learning)
- PINA, G. **Efeito alelopático do extrato aquoso foliar de *Eugenia dysenterica* DC.(Myrtaceae–cagaita) na germinação, crescimento e morfo-anatomia de *Sesamum indicum* L.(Pedaliaceae–gergelim) e *Raphanus sativus* L.(Brassicaceae–rabanete)**. 119 p. (Dissertation) - Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- PRADO, L. C.; SILVA, D. B.; OLIVEIRA, G.; HIRAKI, K. R.; CANABRAVA, H. A.; BISPO, L. The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: The possible role of condensed tannins. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 5, p. 722-730, 2014.
- PRINCE, M.; WIMO, A.; GUERCHET, M.; ALI, G.-C.; WU, Y.-T.; PRINA, M. World alzheimer report 2015: The Global Impact of Dementia. London, p.87. 2015
- RADULOVIC, N. S.; BLAGOJEVIC, P. D.; STOJANOVIC-RADIC, Z. Z.; STOJANOVIC, N. M. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 932-952, 2013.
- RETTIG, W. J.; SPENGLER, B. A.; CHESA, P. G.; OLD, L. J.; BIEDLER, J. L. Coordinate changes in neuronal phenotype and surface antigen expression in human neuroblastoma cell variants. **Cancer Research**, v. 47, n. 5, p. 1383-1389, 1987.

- RIBEIRO, D.; OLIVEIRA, L. G.; MACÊDO, D.; MENEZES, I. R.; COSTA, J. G.; SILVA, M. A.; LACERDA, S.; ALMEIDA, M. M. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1522-1533, 2014.
- SABOGAL, A. M.; MUÑOZ, J. I.; RAMÍREZ, J.; LAMPREA, M.; OSORIO, E.; CARDONA, G. P. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. **Neuropharmacology**, v. 93, n., p. 134-145, 2015.
- SADEE, W.; YU, V. C.; RICHARDS, M. L.; PREIS, P. N.; SCHWAB, M. R.; BRODSKY, F. M.; BIEDLER, J. L. Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of a human neuroblastoma cell line. **Cancer Research**, v. 47, n. 19, p. 5207-5212, 1987.
- SAGAR, R.; DHOKE, N. D.; SHAW, A. A convenient approach towards separation and identification of triterpenes of  $\Delta^{12}$  lupane series. **Indian Journal of Chemistry. Sect. B**, v. 43, n. 11, p. 2446-2451, 2004.
- SAINT-HILAIRE, A.; BRANDÃO, M. **Quadro geográfico da vegetação primitiva na província de Minas Gerais**. Belo Horizonte-Brasil: Fino Traço. 2011
- SANO, E.; ROSA, R.; BRITO, J.; FERREIRA, L. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 166, n. 1-4, p. 113-124, 2010.
- SCHEPPELE, S.; MITCHUM, R.; RUDOLPH JR, C.; KINNEBERG, K.; ODELL, G. Mass spectra of tocopherols. **Lipids**, v. 7, n. 5, p. 297-304, 1972.
- SCHNEIDER, L.; GIORDANO, S.; ZELICKSON, B. R.; S JOHNSON, M.; A BENAVIDES, G.; OUYANG, X.; FINEBERG, N.; DARLEY-USMAR, V. M.; ZHANG, J. Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 11, p. 2007-2017, 2011.

- SHI, Z.-H.; LI, N.-G.; TANG, Y.-P.; SHI, Q.-P.; ZHANG, W.; ZHANG, P.-X.; DONG, Z.-X.; LI, W.; ZHANG, X.; FU, H.-A. Synthesis, biological evaluation and SAR analysis of O-alkylated analogs of quercetin for anticancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 18, p. 4424-4427, 2014.
- SHIOJIMA, K.; ARAI, Y.; MASUDA, K.; TAKASE, Y.; AGETA, T.; AGETA, H. Mass spectra of pentacyclic triterpenoids. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 7, p. 1683-1690, 1992.
- SHIOJIMA, K.; MASUDA, K.; LIN, T.; SUZUKI, H.; AGETA, H.; INOUE, M.; ISHIDA, T. Composite constituents: Three gammacer-16-ene derivatives, novel triterpenoids isolated from roots of *Picris hieracioides* subsp. japonica. **Tetrahedron Letters**, v. 30, n. 37, p. 4977-4980, 1989.
- SILVA, C. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni (Sapotaceae)**. 197 p. - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- SILVA, J. A.; SILVA, D.; JUNQUEIRA, N. T.; ANDRADE, L. R. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília - DF: EMBRAPA-CPAC. 1994. 166 p.
- SILVA, R.; CHAVES, L.; NAVES, R. Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) no sudeste do Estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 330-334, 2001.
- SILVA, S.; GASCA, C. A.; FONSECA, Y. M.; MAGALHÃES, P.; SILVEIRA, D. *Eugenia dysenterica* Mart. Ex DC. (Cagaita): Brazilian plant with therapeutic potential. **Infarma**, v. 27, n. 1, p. 49-95, 2015.
- SILVA, S. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma Cerrado**. p. (Dissertação) - Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2014.

- SILVEIRA, C.; PALHARES, D.; PEREIRA, L.; PEREIRA, K.; SILVA, F. Strategies of plant establishment of two Cerrado species: *Byrsonima basiloba* Juss.(Malpighiaceae) and *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC (Myrtaceae). **Plant Species Biology**, v. 28, n. 2, p. 130-137, 2013.
- SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F.; KIEMLE, D.; BRYCE, D. **Spectrometric identification of organic compounds**. John Wiley & Sons. 2014
- SKOOG, D.; HOLLER, J.; NIEMAN, T.; SETTLE, F.; RUBINSON, K.; RUBINSON, J.; CHASTEEN, T. **Principios de análisis instrumental**. México, v.6. 2002 (S.A. Ediciones Paraninfo)
- SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae**. Lista de Espécies da Flora do Brasil (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10388>). REFLORA. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2016.
- SOUZA, E. R.; NAVES, R.; BORGES, J.; VERA, R.; FERNANDES, E. P.; SILVA, L.; TRINDADE, M. Fenologia de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 1009-1014, 2008.
- SOUZA, E. R.; NAVES, R.; CARNEIRO, I.; LEANDRO, W.; BORGES, J. Crescimento e sobrevivência de mudas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC) nas condições do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 491-495, 2002.
- SOUZA, P.; SALES, P. M.; SIMEONI, L. A.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; OLIVEIRA, P. Inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Medica**, v. 78, n. 04, p. 393-399, 2012.
- SOUZA, P. M.; ELIAS, S. T.; SIMEONI, L. A.; PAULA, J. E.; GOMES, S. M.; GUERRA, E. N. S.; FONSECA, Y. M.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; MAGALHAES, P. O. Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1-7, 2012.

- SOUZA, V.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** São Paulo: Nova Odessa. 2005. 640 p.
- SUTHERLAND, B.; RAHMAN, R.; APPLETON, I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 5, p. 291-306, 2006.
- TOLEDO, C.; BRITTA, E.; CEOLE, L.; SILVA, E.; MELLO, J.; DIAS, B.; NAKAMURA, C.; UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 420-425, 2011.
- VÁZQUEZ, L.; PALAZON, J.; NAVARRO, A. The pentacyclic triterpenes  $\alpha$ -,  $\beta$ -amyrins: A review of sources and biological activities. **Phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**, v. 23, n., p. 487-502, 2012.
- VICTORIA, F.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R.; ALVES, D.; SILVA, W.; MOTTA, A.; SILVA, P. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, 2012.
- VIEIRA, P.; VERONEZI, E.; SILVA, C.; CHEN-CHEN, L. Detection of genotoxic, cytotoxic, and protective activities of *Eugenia dysenterica* DC.(Myrtaceae) in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 6, p. 563-567, 2012.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.** 2a. Springer. 1996
- WILHELM, A. **Photochemistry of (+)-catechin and (-)-epicatechin.** 127 p. - Department of Chemistry, University of the Free State Bloemfontein, 2008.
- YASUI, D. H.; SCOLES, H. A.; HORIKE, S.-I.; MEGURO-HORIKE, M.; DUNAWAY, K. W.; SCHROEDER, D. I.; LASALLE, J. M. 15q11. 2–13.3 chromatin analysis reveals

epigenetic regulation of CHRNA7 with deficiencies in Rett and autism brain. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 22, p. 4311-4323, 2011.

YU, H.; YAO, L.; ZHOU, H.; QU, S.; ZENG, X.; ZHOU, D.; ZHOU, Y.; LI, X.; LIU, Z. Neuroprotection against A $\beta$  25–35-induced apoptosis by salvia miltiorrhiza extract in SH-SY5Y cells. **Neurochemistry International**, v. 75, n., p. 89-95, 2014.

YUSUF, M.; LEUNG, K.; MORRIS, K. J.; VOLPI, E. V. Comprehensive cytogenomic profile of the in vitro neuronal model SH-SY5Y. **Neurogenetics**, v. 14, n. 1, p. 63-70, 2013.

ZORZIN, F. M. **Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso da folha de *Eugenia dysenterica***. 99 p. - Programa de Pós-Graduação em Ciências da SaudeBrasília DF, 2014.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 449-457, 2003.