

**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Centro de Ciências Exatas e Tecnologia - Departamento de Química**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**

**Estudo químico e atividades biológicas de**  
***Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.**  
**Berg (Myrtaceae)**

*Isabel Duarte Coutinho*

CAMPO GRANDE

2008

**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Centro de Ciências Exatas e Tecnologia - Departamento de Química**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**

**Estudo químico e atividades biológicas de**  
***Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.**  
**Berg (Myrtaceae)**

***Isabel Duarte Coutinho***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química – Área de concentração: Química Orgânica.

CAMPO GRANDE

Abril - 2008



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO EM QUÍMICA

TERMO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO  
DE  
ISABEL DUARTE COUTINHO

“ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *CAMPOMANESIA  
ADAMANTIUM* (CAMBESS.) O. BERG (MYRTACEAE)”

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação – Nível de Mestrado em Química (Resolução nº 04/2008) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química – Área de Concentração: Química Orgânica.

Aprovada Por:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. CLÁUDIA ANDRÉA LIMA CARDOSO  
Orientadora e Presidente da Comissão Examinadora  
UEMS/Dourados

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. ROBERTA GOMES COELHO  
Co-orientadora  
DQI/UFMS

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS  
IQ/UNESP-Araraquara

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. NELI KIKA HONDA  
DQI/UFMS

Campo Grande, 10 de abril de 2008.

## *Dedicatória*

*A minha vó Eliza pelo amor e carinho*

*A minhas irmãs Cristiane e Adriane fontes de inspiração na continuidade dos meus estudos*

*A minha orientadora Claudia pela amizade, dedicação, incentivo e confiança.*

*A todas vocês minha eterna gratidão!*

## *AGRADECIMENTOS*

- ❖ Aos meus pais Frande e Mercedes pela vida. Meu eterno amor e carinho.
- ❖ A todos os meus irmãos que participaram diretamente da minha infância, adolescência e juventude, principalmente ao Marcelo, meu grande companheiro de lar. Amo vocês!
- ❖ Aos meus sobrinhos: Matheus, Lucas, João, Pedro Henrique, Luis Fernando e Camila, a tia sempre esquece dos aniversários, mas o carinho que sinto por eles é eterno.
- ❖ A Amanda, pela amizade e compreensão durante a minha ausência nestes últimos meses.
- ❖ Aos meus tios Robson e Sheila e meu priminho Djou pelos momentos de alegria e descontração.
- ❖ Ao aluno de iniciação científica Oscar pela ajuda na execução de alguns experimentos realizados neste trabalho, meu sincero agradecimento.
- ❖ Ao Thiago, Marcelo e Márcio do LP2 nos momentos de descontração.
- ❖ A professora Nilva pela confiança, auxílio nas análises empregando Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, elaboração dos artigos sobre óleos essenciais e a grande amizade durante estes dois anos.
- ❖ A Roberta pela co-orientação, amizade e ajuda principalmente no trabalho de fitoquímica e dicas na elucidação estrutural. Sinceramente, você foi muito especial, trouxe muita paz e luz no meu caminho.
- ❖ A professora Neli Kika Honda por abrir a porta de seu laboratório e disponibilizar toda a infra-estrutura disponível na execução dos trabalhos de fitoquímica e ensaios de atividade antioxidante. Assim como, por compartilhar muito do seu conhecimento durante a execução deste trabalho.
- ❖ A professora Rosenei nos momentos de descontração durante o cafezinho da tarde.
- ❖ Aos meus professores do mestrado pelo conhecimento adquirido.
- ❖ A Aline pela sua frase inesquecível “olha o desespero”, que eu realmente descobri o significado durante o período de elaboração da dissertação.
- ❖ A Lu pela amizade. Muito obrigada pelas dicas na formatação dos espectros de RMN.

- ❖ A Ana Camila pela sua disposição em todos os momentos, tanto no trabalho do laboratório, assim como durante a elaboração da dissertação. Além daquele “bom dia Isabel”, sentirei saudades...
- ❖ Aos meus amigos do mestrado: Carlão, Ana Carolina e Rute pela nossa amizade e momentos de estudos.
- ❖ Ao pessoal da físico-química pelo convívio no Departamento de Química durante estes dois anos.
- ❖ Ao Ricardo pela amizade e os conhecimentos transmitidos durante a execução deste trabalho.
- ❖ A UFMS/Propp pela oportunidade de desenvolver este trabalho.
- ❖ A Capes pela concessão da bolsa.
- ❖ Ao professor Marcos Sobral – UFMG pela identificação do material vegetal.
- ❖ Ao Cpbio-UEMS (Dourados, MS) na execução dos trabalhos empregando CLAE.
- ❖ A Professora Adriana Mary Mestriner Felipe de Melo (UNIGRAN – Dourados, MS) pela execução dos ensaios de atividade antimicrobiana.
- ❖ Ao Prof. Dr. Antônio Pancraio de Souza e Profa. Maria Rita Marques do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Morfofisiologia CBBS/UFMS pela execução dos ensaios de avaliação inseticida e antifúngica, respectivamente.
- ❖ A Lucinéia, Joaquim e Gláucia pela obtenção dos espectros de RMN.
- ❖ Aos técnicos e servidores do Departamento de Química da UFMS.
- ❖ A Daniel De Granville pelas lindas fotos de guavira. E mais, o seu blog e photograma foram referências durante o início do trabalho com este vegetal.

## *Antes de dormir*

*Um amigo me contou  
Que o tempo é um rio que corre no universo  
O rio é a frente  
E o tempo pode ser o verso*

*Tão pequena, e tão feliz  
Sou no tempo eterno aprendiz*

*Anoiteço lembrando velhos sonhos  
Meu sorriso para o dia que se foi  
Adormeço na reza mais bonita  
Pra viver um dia de cada vez*

*Como se agora fosse lembro de mim nascendo  
Como se fosse lua e eu gotinha de sereno  
Mil anos é nada  
Pra ver de tão perto o que o tempo faz*

*Tão pequena, e tão feliz  
Sou no tempo eterno aprendiz*

*Sou no tempo um rabisco de poeira  
De um soluço calado que chorou  
Mas também sou das nuvens companheira  
Ninguém vive tudo de uma só vez*

*O tempo foi quem me disse do tempo que não passou  
E como se agora fosse bem de ser começou  
Tudo na vida tem tempo  
Tudo no tempo tem vez  
E aprender a esperar  
É saber de coisas que o tempo já fez*

*Mas dessa vida sou só um triz  
Pelo tempo eterno aprendiz*

*Tão pequena, e tão feliz  
Sou no tempo eterno aprendiz*

Flavia Wenceslau

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
<i>Campomanesia adamantium</i> .....	xii
Substâncias isoladas das folhas de <i>Campomanesia adamantium</i> .....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais .....	1
1.2. Radicais livres, compostos fenólicos e atividade antioxidante .....	3
1.3. Família Myrtaceae e Gênero <i>Campomanesia</i> .....	5
2. OBJETIVOS .....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1. Padrões e Reagentes .....	8
3.2. Cromatografia em Coluna (CC) .....	8
3.3. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) .....	9
3.4. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) .....	9
3.5. Preparo dos reveladores:.....	9
3.6. Equipamentos .....	9
3.6.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	9
3.6.2. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).....	10
3.6.3. Espectrofotômetro de ultravioleta .....	10
3.6.4. Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	11
3.7. Coleta do material vegetal .....	11
3.8. Preparo dos óleos essenciais e extratos .....	11
3.8.1. Preparo dos óleos essenciais.....	11
3.8.2.Extratos orgânicos para isolamento e análise por CCDC.....	12
3.8.2.1 Fracionamento da fase hexânica ( <b>FHex</b> ).....	14
3.8.2.2. Fracionamento da interfase ( <b>IF</b> ).....	15
3.8.2.2.1. Cromatografia em coluna da fração 56-71 .....	16
3.8.2.2.2. Cromatografia em coluna da fração 60-62 .....	16
3.8.2.2.3. Cromatografia em coluna da fração 90-98 .....	17

3.8.2.3. Fracionamento da fase acetato de etila ( <b>FAcOEt</b> ) .....	17
3.8.2.3.1. Cromatografia em camada delgada preparativa da fração 87-89 .....	18
3.8.3 Amostras das folhas coletadas em diferentes estações do ano .....	19
3.8.4 Determinação do teor das substâncias <b>Ca2, Ca4, Ca5, Ca6, Ca9 e Ca14</b> .....	21
3.8.5 Determinação do teor de fenóis e flavonóides.....	21
3.8.6. Determinação do teor de taninos .....	22
3.8.7. Determinação da atividade antioxidante.....	23
3.8.7.1. Avaliação da inibição da peroxidação lipídica empregando o método $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.....	23
3.8.7.2. Avaliação do efeito de “sequestro” de radical empregando o radical livre DPPH..	24
3.8.8. Ensaio do método ágar de difusão em disco para determinação da atividade antimicrobiana. ....	25
3.8.9. Ensaio de bioautografia empregando o fungo <i>Cladosporium sphaerospermum</i> .....	25
3.8.10. Avaliação do efeito inseticida.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1. Óleos essenciais .....	28
4.1.2. Caracterização do óleo essencial obtido de <i>C. adamantium</i> coletada no município de Dourados.....	28
4.1.3. Caracterização do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantium</i> coletada em diferentes municípios do Estado de Mato Grosso do Sul.....	34
4.1.4. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantium</i> coletada em diferentes estágios fenológicos.....	41
4.2. Análises espectrométricas das substâncias <b>Ca1, Ca2, Ca3, Ca4, Ca5, Ca6, Ca7, Ca8, Ca9, Ca10, Ca11, Ca12 e Ca13</b> .....	42
4.2.1. Identificação estrutural de <b>Ca1</b> .....	42
4.2.2. Identificação estrutural de <b>Ca2</b> .....	45
4.2.3. Identificação estrutural de <b>Ca3</b> .....	48
4.2.4. Identificação estrutural de <b>Ca4</b> .....	51
4.2.5. Identificação estrutural de <b>Ca5</b> .....	56
4.2.6. Identificação estrutural de <b>Ca6</b> .....	61
4.2.7. Identificação estrutural de <b>Ca7</b> .....	64
4.2.8. Identificação estrutural de <b>Ca8</b> .....	70
4.2.9. Identificação estrutural de <b>Ca9</b> .....	75

4.2.10. Identificação estrutural de <b>Ca10</b> .....	80
4.2.11. Identificação estrutural de <b>Ca11</b> .....	85
4.2.12. Identificação estrutural de <b>Ca12</b> .....	90
4.2.13. Identificação estrutural de <b>Ca13</b> .....	96
4.3. Avaliação do perfil cromatográfico e determinação do teor das substâncias.....	103
4.3.1 Extrato metanólico ( <b>EMeOH</b> ) .....	103
4.3.2. Análise das amostras submetidas à avaliação sazonal: <b>Cav, Cao e Caip</b> .....	107
4.4. Ensaio químicos e biológicos.....	116
4.4.1 Determinação do teor de fenóis e flavonóides.....	116
4.4.2. Determinação do teor de taninos .....	117
4.4.3. Determinação da atividade antioxidante.....	119
4.4.3.1 Avaliação com o método radical livre DPPH.....	119
4.4.3.1.1 Ensaio nas amostras <b>EMeOH, FHex, FAcOEt, IF e FAq</b> .....	120
4.4.3.1.2 Ensaio nas amostras <b>Cav, Cao e Caip</b> .....	121
4.4.3.2. Avaliação com o método $\beta$ -caroteno /ácido linoléico .....	122
4.4.3.2.1 Ensaio nas amostras <b>EMeOH, FAcOEt, FAq, FHex e IF</b> .....	123
4.4.3.2.2 Ensaio nas amostras <b>Cav, Cao e Caip</b> .....	124
4.4.3.3. Concentração inibitória (CI <sub>50</sub> ) .....	126
4.4.3.3.1. Amostras <b>EMeOH, FAcOEt, FAq, FHex e IF</b> .....	126
4.4.3.3.1. Amostras <b>Cav, Cao e Caip</b> .....	127
4.4.4. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana empregando o método ágar de difusão em disco .....	130
4.4.5. Avaliação preliminar da atividade antifúngica empregando o ensaio de bioautografia	131
4.4.6. Avaliação do efeito inseticida.....	131
5. CONCLUSÃO.....	132
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	133

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Coordenadas geográficas e locais de coleta.....	11
<b>Tabela 2</b> – Amostras submetidas à análise em CG-EM .....	12
<b>Tabela 3</b> - Rendimento (%) dos extratos obtidos das folhas de <i>Campomanesia adamantium</i> durante o verão, outono e primavera. ....	20

<b>Tabela 4</b> – Substâncias identificadas no óleo essencial das flores e folhas de <i>C. adamantium</i> coletada em diferentes estágios fenológicos.....	31
<b>Tabela 5</b> – Caracterização do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantium</i> coletadas em 4 municípios diferentes.....	35
<b>Tabela 6.</b> Atividade antimicrobiana (mm) dos óleos essenciais das folhas de <i>C. adamantium</i> coletada em diferentes estágios fenológicos.....	42
<b>Tabela 7</b> – Deslocamento de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>Ca1</b> .....	43
<b>Tabela 8</b> – Deslocamento de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>Ca2</b> .....	46
<b>Tabela 9</b> – Deslocamento de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>Ca3</b> .....	49
<b>Tabela 10</b> – Deslocamento de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ acoplamento a longa distância (gHMBC) de <b>Ca4</b> .....	53
<b>Tabela 11</b> – Deslocamento de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>Ca5</b> .....	58
<b>Tabela 12</b> – Deslocamento de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>Ca6</b> .....	62
<b>Tabela 13</b> – Deslocamento de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e acoplamento a longa distância (gHMBC) de <b>Ca7</b> . .....	65
<b>Tabela 14</b> – Deslocamento de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e acoplamento a longa distância (gHMBC) de <b>Ca8</b> . .....	71
<b>Tabela 15</b> – Deslocamento de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>Ca9</b> .....	76
<b>Tabela 16</b> – Deslocamento de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>Ca10</b> .....	82
<b>Tabela 17</b> – Deslocamento de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e acoplamento a longa distância (gHMBC) de <b>Ca11</b> . .....	87
<b>Tabela 18</b> – Deslocamento de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e acoplamento a longa distância (gHMBC) de <b>Ca12</b> . .....	92
<b>Tabela 19</b> – Deslocamento de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e acoplamento a longa distância (gHMBC) de <b>Ca13</b> . .....	98
<b>Tabela 20</b> – Tempo de retenção dos picos referente ao cromatograma do <b>EMeOH</b> . .....	103
<b>Tabela 21</b> – Dados de regressão linear da curva analítica das substâncias <b>Ca2, Ca4, Ca5, Ca6, Ca9 e Ca14</b> .....	106
<b>Tabela 22</b> – Dados de regressão linear da curva analítica para determinação de fenóis e flavonóides. ....	116
<b>Tabela 23</b> – Teor de fenóis das amostras <b>Caip, Cav e Cao</b> (mg/g). .....	117
<b>Tabela 24.</b> Atividade antimicrobiana (mm) das amostras <b>EMeOH, FHex e IF</b> .....	130

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura química do BHA e BHT.....	3
<b>Figura 2</b> – Antioxidantes naturais utilizados como aditivos em alimentos.....	4
<b>Figura 3</b> – Fluxograma representativo do processo de obtenção dos extratos das folhas de <i>C. adamantium</i> . ....	13
<b>Figura 4</b> – Fluxograma da partição líquido-líquido obtida a partir do EMeOH.....	14
<b>Figura 5</b> – Fluxograma das frações obtidas a partir do fracionamento de IF. ....	16
<b>Figura 6</b> – Fluxograma das frações obtidas do fracionamento da amostra <b>EAcOEt</b> .....	18
<b>Figura 7</b> – Fluxograma de preparo dos extratos obtidos a partir das folhas de <i>C. adamantium</i> coletadas em diferentes estações do ano.....	20
<b>Figura 9</b> – Principais substâncias identificadas nos óleos essenciais de amostras coletadas em diferentes municípios.....	37
<b>Figura 10</b> – Principais vias de ciclização para a biossíntese de monoterpene de acordo com DEWICK (2005) e GEISMANN (1969). ....	39
<b>Figura 11</b> – Principais vias de ciclização para a biossíntese de sesquiterpene de acordo com DEWICK (2005) e GEISMANN (1969). ....	40
<b>Figura 12</b> – Estrutura molecular do $\beta$ -sitosterol ( <b>Ca1</b> ). ....	43
<b>Figura 13</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>Ca1</b> (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ). ....	44
<b>Figura 14</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>Ca1</b> (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ). ....	44
<b>Figura 15</b> – Espectro de DEPT $135^\circ$ de <b>Ca1</b> (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ). ....	45
<b>Figura 16</b> – Estrutura molecular de 6-metil-7-hidróxi-5-metóxi-flavanona ( <b>Ca2</b> ). ....	46
<b>Figura 17</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>Ca2</b> (300 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	47
<b>Figura 18</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>Ca2</b> (75 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	47
<b>Figura 19</b> – Espectro de DEPT $135^\circ$ de <b>Ca2</b> (75 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	48
<b>Figura 20</b> – Estrutura molecular de 7-hidróxi-5-metóxi-flavanona ( <b>Ca3</b> ). ....	49
<b>Figura 21</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>Ca3</b> (300 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	50
<b>Figura 22</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>Ca3</b> (75 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	50
<b>Figura 23</b> – Espectro de DEPT 135 de <b>Ca3</b> (75 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ). ....	51
<b>Figura 24</b> – Estrutura molecular de 5,7-diidróxi-6,8-dimetilflavanona ( <b>Ca4</b> ). ....	52
<b>Figura 26</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>Ca4</b> (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). ....	55
<b>Figura 27</b> – Experimento de gHSQC de <b>Ca4</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). ....	55
<b>Figura 28</b> – Experimento de gHMBC de <b>Ca4</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). ....	56

<b>Figura 29</b> – Estrutura molecular de 5,7-diidróxi-6-metilflavanona ( <b>Ca5</b> ). .....	57
<b>Figura 30</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>Ca5</b> (300 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	59
<b>Figura 31</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>Ca5</b> (75 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	60
<b>Figura 32</b> – Espectro de DEPT 135° de <b>Ca5</b> (75 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	61
<b>Figura 33</b> – Estrutura molecular de 5,7-diidróxi-8-metilflavanona ( <b>Ca6</b> ). .....	62
<b>Figura 34</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>Ca6</b> (300 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	63
<b>Figura 35</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>Ca6</b> (75 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	63
<b>Figura 36</b> – Estrutura molecular de 2',4'-diidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona ( <b>Ca7</b> ). ....	65
<b>Figura 37</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <b>Ca7</b> (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ).....	66
<b>Figura 38</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>Ca7</b> (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ).....	67
<b>Figura 39</b> – Experimento gHSQC de <b>Ca7</b> (300 MHz $^1\text{H}$ , $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ).....	68
<b>Figura 40</b> – Experimento de gHMBC de <b>Ca7</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ). .....	69
<b>Figura 41</b> – Ampliação do experimento de gHMBC de <b>Ca7</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ). .....	69
<b>Figura 42</b> – Estrutura molecular de 2',4'-diidróxi-3'-metil-6'-metóxicalcona ( <b>Ca8</b> ). ....	70
<b>Figura 43</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>Ca8</b> (300 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	72
<b>Figura 44</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>Ca8</b> (75 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	73
<b>Figura 45</b> – Experimento gHSQC de <b>Ca8</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	74
<b>Figura 46</b> - Experimento de gHMBC de <b>Ca8</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	74
<b>Figura 47</b> – Estrutura molecular de 2',4'-diidróxi-6'-metóxicalcona ( <b>Ca9</b> ).....	76
<b>Figura 48</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>Ca9</b> (300 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	77
<b>Figura 49</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>Ca9</b> (75 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	78
<b>Figura 50</b> – Experimento de gHSQC de <b>Ca9</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	79
<b>Figura 51</b> – Experimento de gHMBC de <b>Ca9</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ).....	79
<b>Figura 52</b> – Espectro de NOESY 1D de <b>Ca9</b> (500 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , $\delta$ ). .....	80
<b>Figura 53</b> – Estrutura molecular de 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol ( <b>Ca10</b> ).....	82
<b>Figura 54</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>Ca10</b> (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ).....	83
<b>Figura 55</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>Ca10</b> (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ).....	83
<b>Figura 56</b> – Experimento de gHSQC de <b>Ca10</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	84
<b>Figura 57</b> – Experimento de gHMBC de <b>Ca10</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	85
<b>Figura 58</b> – Estrutura molecular de 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L- raminopiranosídeo ( <b>Ca11</b> ).....	86
<b>Figura 59</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>Ca11</b> (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	88

<b>Figura 60</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>Ca11</b> (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ) .....	89
<b>Figura 61</b> – Experimento de gHSQC de <b>Ca11</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	89
<b>Figura 62</b> – Experimento de gHMBC de <b>Ca11</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	90
<b>Figura 63</b> – Estrutura molecular de 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo ( <b>Ca12</b> ).....	92
<b>Figura 64</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>Ca12</b> (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	93
<b>Figura 65</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da <b>Ca12</b> (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	94
<b>Figura 66</b> – Espectro de DEPT 135° de <b>Ca12</b> (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	94
<b>Figura 67</b> – Experimento de gHSQC de <b>Ca12</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	95
<b>Figura 68</b> – Experimento de gHMBC de <b>Ca12</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	96
<b>Figura 69</b> – Estrutura molecular de 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O-(5''-O-galoil)- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo ( <b>Ca13</b> ).....	97
<b>Figura 70</b> – Principais correlações de gHMBC da estrutura <b>Ca13</b> . .....	98
<b>Figura 71</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>Ca13</b> (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	99
<b>Figura 72</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>Ca13</b> (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	100
<b>Figura 73</b> - Espectro de DEPT 135° de <b>Ca13</b> (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	101
<b>Figura 74</b> - Experimento de gHSQC de <b>Ca13</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	101
<b>Figura 75</b> - Experimento de gHMBC de <b>Ca13</b> (300 MHz para $^1\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ ). .....	102
<b>Figura 76</b> – Cromatogramas representativos do extrato metanólico <b>EMeOH</b> em 284 e 340 nm. ....	104
<b>Figura 77</b> – Espectros de absorção molecular na região do UV-Vis dos picos referentes às substâncias presentes no extrato <b>EMeOH</b> na condição <b>1</b> . .....	105
<b>Figura 78</b> – Perfil cromatográfico representativo dos extratos hexânicos das amostras <b>CavHex</b> , <b>CaoHex</b> e <b>CaipHex</b> ( $\lambda=284$ nm). .....	108
<b>Figura 79</b> – Perfil cromatográfico representativo dos extratos acetato de etila das amostras <b>CavAcOEt</b> , <b>CaoAcOEt</b> e <b>CaipAcOEt</b> ( $\lambda=284$ nm). .....	109
<b>Figura 80</b> – Perfil cromatográfico representativo dos extratos etanólico das amostras <b>CavEtOH</b> , <b>CaoEtOH</b> e <b>CaipEtOH</b> ( $\lambda=284$ nm). .....	109
<b>Figura 81</b> – Perfil cromatográfico representativo dos extratos metanólico das amostras <b>CavMeOH</b> , <b>CaoMeOH</b> e <b>CaipMeOH</b> ( $\lambda=284$ nm). .....	110
<b>Figura 82</b> – Teor (mg/g) das substâncias <b>Ca2</b> , <b>Ca4</b> , <b>Ca5</b> , <b>Ca6</b> , <b>Ca9</b> , <b>Ca11</b> e <b>Ca14</b> .....	111
<b>Figura 83</b> – Biossíntese das chalconas e flavanonas DEWICK (2005). .....	112

<b>Figura 84</b> – Precursores do anel B das chalconas, flavanonas e flavonóis DEWICK (2005). .....	112
<b>Figura 85</b> – Proposta biossintética para as substâncias <b>Ca4</b> , <b>Ca5</b> , <b>Ca6</b> , <b>Ca7</b> e <b>Ca8</b> SCHRÖDER <i>et al</i> (1998). .....	113
<b>Figura 86</b> – Proposta biossintética de ciclização para as substâncias <b>Ca5</b> , <b>Ca6</b> , <b>Ca7</b> e <b>Ca8</b> . .....	114
<b>Figura 87</b> – Proposta biossintética das substâncias <b>Ca10 a Ca13</b> . .....	115
<b>Figura 89</b> – Efeito de “seqüestro” de radical nas amostras <b>EMeOH</b> , <b>FHex</b> , <b>FAcOEt</b> , <b>IF</b> e <b>FAq</b> . .....	120
<b>Figura 90</b> – Efeito “seqüestro” de radical nas amostras <b>Cav</b> , <b>Cao</b> e <b>Caip</b> . .....	122
<b>Figura 91</b> – Peroxidação do ácido linoléico. ....	123
<b>Figura 92</b> – Inibição da peroxidação lipídica do <b>EMeOH</b> , <b>FAcOEt</b> , <b>FAq</b> , <b>FHex</b> e <b>IF</b> e padrões quercetina, naringenina, BHT e ácido tânico. ....	124
<b>Figura 93</b> – Inibição da peroxidação lipídica empregando método $\beta$ -caroteno/ácido linoléico nas amostras <b>Cav</b> , <b>Cao</b> e <b>Caip</b> . .....	125
<b>Figura 94</b> – Atividade antioxidante ( $CI_{50}$ $\mu$ g/mL) empregando os ensaios com DPPH e $\beta$ - caroteno/ácido linoléico. ....	126
<b>Figura 95</b> – Concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) das amostras <b>Cav</b> , <b>Cao</b> e <b>Caip</b> no método efeito “sequestro” de radical e inibição da peroxidação lipídica. ....	128
<b>Figura 96</b> – Fenóis <i>versus</i> atividade antioxidante - $CI_{50}$ ( $\mu$ g/mL). .....	129

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt – acetato de etila

ACN - acetonitrila

C. - concentração

CC – Cromatografia em coluna

CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa

CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa

CDCl<sub>3</sub> – clorofórmio deuterado

CD<sub>3</sub>OD – metanol deuterado

C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O – acetona deuterado

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

*d* – dubleto

*dd* – duplo dubleto

EtOH – etanol

*g*HSQC – Gradiente heteronuclear single correlation

*g*HMBC – Gradiente heteronuclear multiple bond correlation

*g*NOESY 1D – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

Hfor – ácido fórmico

Hex – hexano

*m* – multipleteo

MeOH – metanol

*n*-PrOH – *n*-propanol

RMN <sup>13</sup>C – Ressonância nmgnética nclear de <sup>13</sup>C

RMN <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H

*s* – singleto

UV-Vis – Ultravioleta e visível

δ – deslocamento químico

## RESUMO

*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae) é uma espécie nativa encontrada na região de campos e cerrados dos Estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo. As folhas são utilizadas na medicina popular contra desarranjos estomacais e processos inflamatórios do trato urinário.

No presente trabalho, efetuou-se o estudo da composição química dos óleos essenciais (folhas e flores) e do extrato metanólico das folhas de *C. adamantium*.

Os óleos essenciais foram analisados empregando CG-EM e os constituintes identificados através da comparação do índice de retenção e do espectro de massas obtido, com os dados da literatura e da biblioteca do equipamento. Foram identificados 108 terpenos nos óleos essenciais (folhas e flores). Os sesquiterpenos foram majoritários nas flores.

Os terpenos majoritários foram monitorados nas folhas em diferentes estágios fenológicos durante o estágio de frutificação em amostras coletadas em 4 cidades do Estado de Mato Grosso do Sul. Os monoterpenos foram majoritários durante a floração, enquanto na frutificação foram os monoterpenos e sesquiterpenos, e no estágio vegetativo os sesquiterpenos. Ensaio de atividade antimicrobiana mostraram que os óleos essenciais de amostras coletadas durante o período de floração e frutificação foram mais ativos contra o fungo *Candida albicans* do que o óleo essencial de amostra coletada durante o estágio vegetativo.

O estudo fitoquímico do extrato metanólico levou ao isolamento de 13 substâncias:  $\beta$ -sitosterol (**Ca1**), 7-hidróxi-6-metil-5-metóxiflavanona (**Ca2**), 7-hidróxi-5-metóxiflavanona (**Ca3**), 5,7-diidroxi-6,8-dimetilflavanona (**Ca4**), 5,7-diidroxi-6-metilflavanona (**Ca5**), 5,7-diidroxi-8-metilflavanona (**Ca6**), 2',4'-diidroxi-5'-metil-6'-metóxichalcona (**Ca7**), 2',4'-diidroxi-3'-metil-6'-metóxichalcona (**Ca8**), 2',4'-diidroxi-6'-metóxichalcona (**Ca9**), 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol (**Ca10**), 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O- $\alpha$ -L-raminopiranosídeo (**Ca11**), 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (**Ca12**) e 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O-(5''-O-galoil)- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (**Ca13**). Todas essas substâncias estão sendo descritas pela primeira vez nas folhas da espécie *C. adamantium*, e a **Ca13** é descrita pela primeira vez na literatura. Essas substâncias foram monitoradas, por CLAE, no extrato metanólico e em amostras coletadas em diferentes estações do ano.

As fases obtidas através da partição líquido-líquido do extrato metanólico, assim como os extratos obtidos das amostras coletadas em diferentes estações foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante empregando o método DPPH e  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. No ensaio efeito "seqüestro" de radical foram encontrados percentuais na faixa de 2,69-95,67% e para o ensaio de peroxidação lipídica de 2,29-88,61%.

A avaliação do efeito inseticida do extrato etanólico das folhas mostrou taxa de mortalidade (%) de  $79,50 \pm 09,78$  para *Sitophilus zeamais*.

## ABSTRACT

*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae) is a native species found in the field and “cerrado” of both Mato Grosso do Sul and São Paulo States. The leaves are used in popular medicine as an anti-diarrhoeic and in inflammatory processes of the urinary tract.

The present study describes the chemical composition of the essential oils (flowers and leaves) and extracts from *C. adamantium* leaves.

The essential oils were characterized by GC-MS and the constituents were identified through a comparison of the retention index and the spectra of the mass obtained, with the literature and equipment library. The 108 compounds of the essential oils were identified (flowers and leaves). The sesquiterpenes were majority in flowers.

The terpenes majority were monitored in the leaves in different phenological stages and in 4 distinct cities of the State of Mato Grosso do Sul during the fruit bearing stage. The monoterpenes were the major compounds during the flowering stage, while in the fruit bearing stage were monoterpenes and sesquiterpenes, and in the vegetative stage the sesquiterpenes. The essential oil of the flowering and fruit bearing stage shows higher antimicrobial activity against *Candida albicans* than the essential oil of the vegetative stage.

The phytochemical investigation of the methanolic extract resulted in the isolation of 13 substances:  $\beta$ -sitosterol (**Ca1**), 7-hydroxy-5-methoxy-6-methyl-flavanone (**Ca2**), 7-hydroxy-5-methoxy-flavanone (**Ca3**), 5,7-dihydroxy-6,8-dimethyl-flavanone (**Ca4**), 5,7-dihydroxy-6-methyl-flavanone (**Ca5**), 5,7-dihydroxy-8-methyl-flavanone (**Ca6**), 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-5'-methyl- chalcone (**Ca7**), 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3'-methyl-chalcone (**Ca8**), 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-chalcone (**Ca9**), 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxy-flavonol (**Ca10**), 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxy-flavonol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (**Ca11**), 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxy-flavonol-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranoside (**Ca12**) and 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxy-flavonol-3-O-(5''-O-galloyl)- $\alpha$ -L-arabinofuranoside (**Ca13**). All the substances isolated from the *C. adamantium* leaves are here described for the first time, and the **Ca13** is described for the first time in the literature. The substances were monitored by HPLC in the methanolic extract and in samples collected in different seasons of the year.

The methanolic extract, the phases obtained through the liquid-liquid partition, as well as the extract obtained from the samples collected in different seasons were estimated as to their antioxidant potential using the DPPH method and  $\beta$ -carotene/linoleic acid. In the scavenging radical effect, percentages with a range of 2.69-95.67% and in lipidic peroxidation of 2.29-88.61% were obtained.

The estimate of the insecticide effect of the ethanolic leaf extract shows a mortality rate (%) of  $79.50 \pm 09.78$  when compared to *Sitophilus zeamans*.

*Campomanesia adamantium*

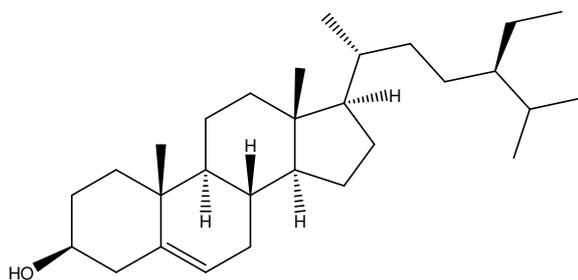


*Foto: Daniel De Granville/Bonito – MS (margens do Rio Formoso)*

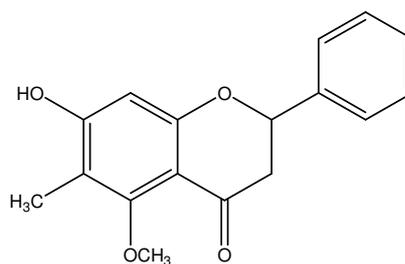


*Foto: Daniel De Granville/Jardim – MS (Recanto Ecológico Rio da Prata)*

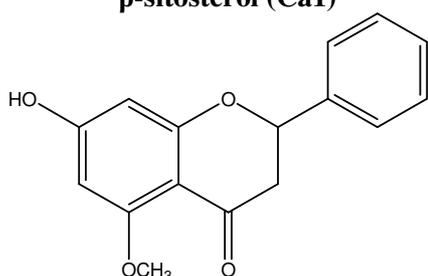
## Substâncias isoladas das folhas de *Campomanesia adamantium*



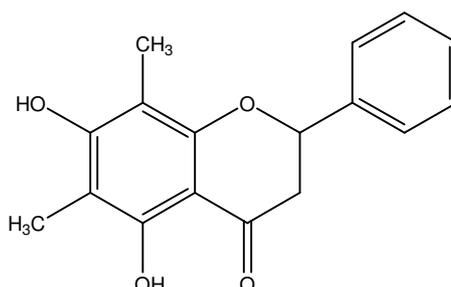
**$\beta$ -sitosterol (Ca1)**



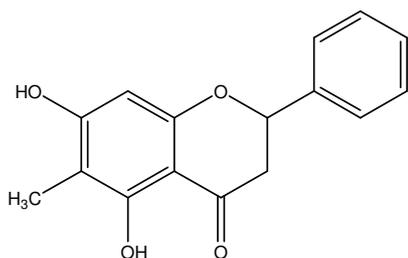
**7-hidróxi-6-metil-5-metóxi flavanona (Ca2)**



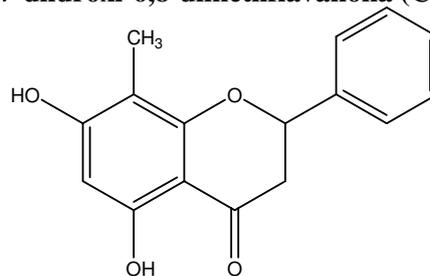
**7-hidróxi-5-metóxi flavanona (Ca3)**



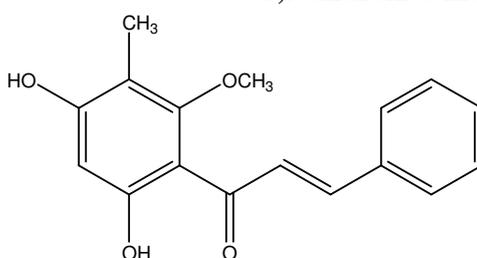
**5,7-diidróxi-6,8-dimetil flavanona (Ca4)**



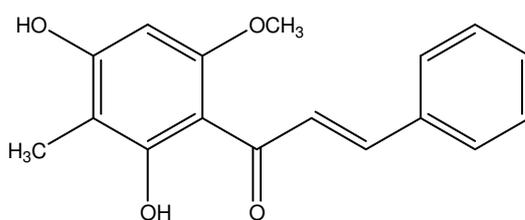
**5,7-diidróxi-6-metil flavanona (Ca5)**



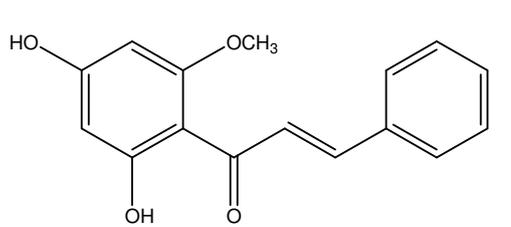
**5,7-diidróxi-8-metil flavanona (Ca6)**



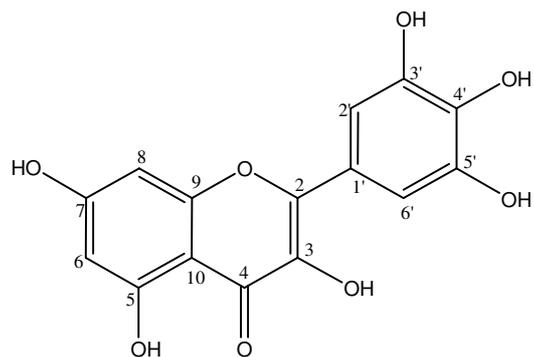
**2',4'-diidróxi-5'-metil-6'-metóxi chalcona (Ca7)**



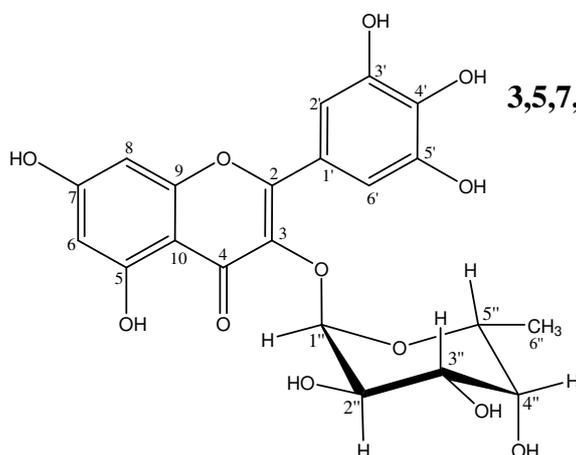
**2',4'-diidróxi-3'-metil-6'-metóxi chalcona (Ca8)**



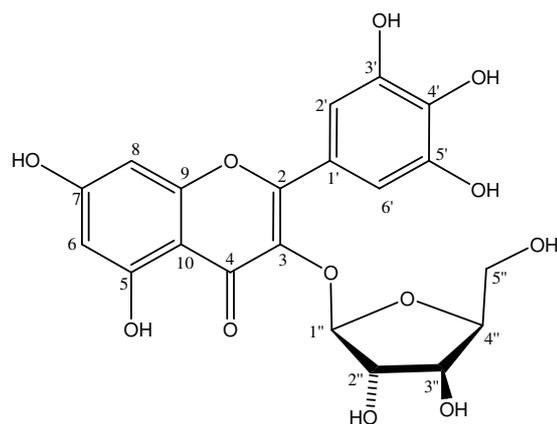
**2',4'-diidróxi-6'-metóxicalcona (Ca8)**



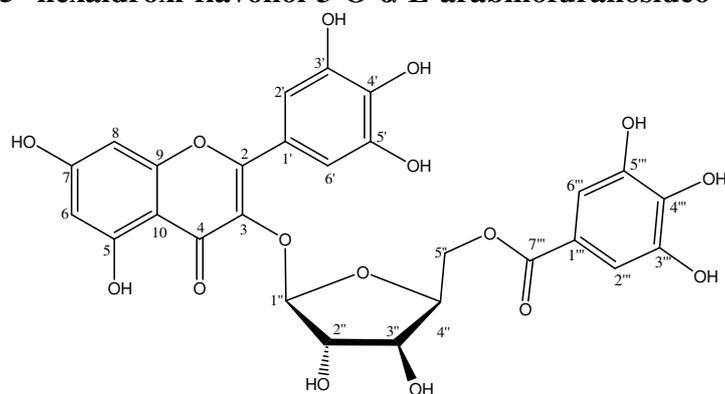
**3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol (Ca10)**



**3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O- $\alpha$ -L-raminopiranosídeo (Ca11)**

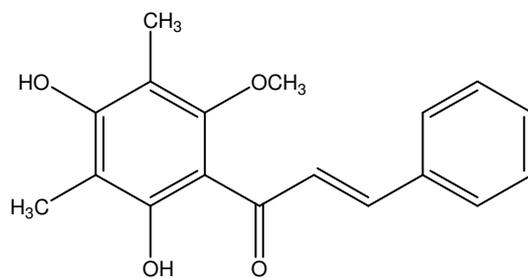


**3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (Ca12)**



**3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O-(5''-O-galoil)- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (Ca13)**

**Substância identificada nas folhas de *Campomanesia adamantium***



**2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona (Ca14)**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos gerais

Desde o princípio das civilizações, os vegetais têm sido utilizados não só como fonte alimentícia, como também medicamentosa. As mais diversas enfermidades têm sido tratadas com chás (infuso, decocto, macerado), sucos, tinturas, banhos, cataplasmas e unguentos, preparados a partir de parte das plantas (LIMA, 2001).

A farmacopéia do tempo de Cervantes, durante o Renascimento, foi baseada na aplicação, principalmente, de óleos, unguentos, bálsamos, cataplasmas e xaropes de raízes e cascas. Os bálsamos eram misturas de substâncias aromáticas empregadas para cicatrizar feridas. As raízes de ruibarbo (*Rheum officinale* B.) foi um dos agentes purgativos mais comumente usados (LÓPEZ-MUÑOZ & ALAMO, 2006).

Informações etnobotânicas associadas a estudos etnofarmacológicos têm levado os pesquisadores a descobertas de metabólitos secundários úteis e/ou tóxicos a saúde humana presentes em plantas medicinais, contribuindo assim para o conhecimento de várias espécies usadas pela população.

O conhecimento das substâncias presentes em plantas auxilia na elucidação do seu mecanismo de ação nos seres vivos. Um dos principais exemplos são os compostos presentes em óleos essenciais, os quais apresentam atividade antimicrobiana e antioxidante, sendo empregados para fins comerciais e medicinais (HENRIQUES *et al*, 2007). Outro exemplo são os compostos fenólicos também presentes em extratos vegetais, os quais geralmente apresentam atividade antioxidante, e são ingeridos diariamente em uma dieta à base de frutas, verduras e legumes (RAMALHO & JORGE, 2006).

De acordo com a Farmacopéia Francesa (1965) os óleos essenciais são produtos, geralmente com composição bastante complexa, incluindo os princípios voláteis de plantas, e mais ou menos modificados durante o processo de preparação. Posteriormente a Norma Francesa (NF) T 75-006 de outubro de 1987, definiu que os óleos essenciais são: produtos obtidos a partir de plantas, através de destilação a vapor ou por procedimentos mecânicos, ou por simples destilação (BRUNETON, 1999).

As substâncias presentes geralmente nos óleos essenciais são terpenos, como os monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ). Os esqueletos carbônicos são formados através de

unidades isoprênicas (C<sub>5</sub>), através da rota do ácido mevalônico ou metileritritol fosfato (DEWICK, 2005).

Os terpenos são objetos de estudo desde 1800 e têm lugar especial na química orgânica, devido a sua fácil acessibilidade, abundância e isolamento, assim como a fascinante transformação estrutural nas quais eles são encontrados.

Os estudos iniciais próximo de 1900 levaram ao estabelecimento das estruturas gerais e muitos dos nomes comuns dos terpenos, merecendo destaque os trabalhos de Ruzicka, o qual é considerado o Pai da regra do isopreno (GEISSMAN *et al*, 1969).

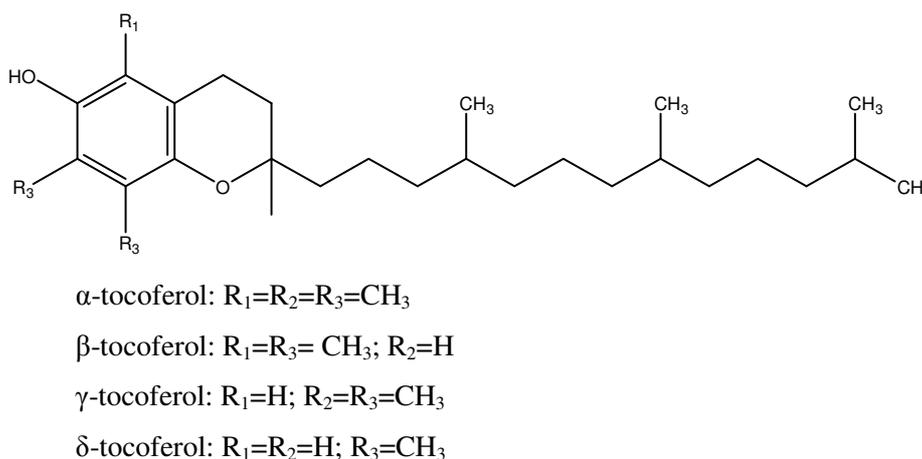
A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica empregada para análise de substâncias voláteis ou facilmente volatilizáveis (LANÇAS, 1993), logo, é bastante eficiente na separação das substâncias presentes nos óleos essenciais. Quando a mesma é acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) é uma técnica versátil na identificação dos compostos presentes em óleos essenciais, através da análise do espectro de massa obtido em cada pico.

Os óleos essenciais podem apresentar funções ecológicas, como inibidores de infestantes e predadores. Assim como atividades farmacológicas, como ação carminativa (camomila), antiespasmódica (sálvia e alho) e atividade secretora do epitélio respiratório (eucalipto, anis-estrelado) (SIMÕES *et al*, 2000).

Além disso, os óleos essenciais de vários extratos de plantas são interessantes e apresentam potencial como remédio alternativo para o tratamento de muitas doenças infecciosas, além da preservação de alimentos, agindo como antioxidantes (TEPE *et al*, 2005).



Os antioxidantes naturais são encontrados em frutas e vegetais, tais como tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), fenóis e carotenóides. Os tocoferóis (figura 2) são encontrados na maioria dos óleos vegetais, e a legislação brasileira permite a adição de 300 mg/Kg de tocoferóis em óleos e gorduras, como antioxidante (RAMALHO & JORGE, 2006). A vitamina C é amplamente difundida no reino vegetal, sendo encontrada em frutas, tais como laranja, limão e acerola, e também é vendida comercialmente na forma de pastilhas.



**Figura 2** – Antioxidantes naturais utilizados como aditivos em alimentos.

Devido à características químicas, as substâncias fenólicas são consideradas potentes agentes antioxidantes. São compostos com ampla distribuição no reino vegetal e encontrados em vários órgãos destes. São classificados em fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóicos e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (RAMALHO & JORGE, 2006). Especialmente os flavonóides que exibem uma grande variedade de atividades biológicas, onde estudos “in vitro” revelam que flavonóides na dieta podem reduzir risco de vários cânceres, especialmente câncer de mama e próstata (HODEK *et al*, 2002).

Extratos vegetais que apresentam alta atividade antioxidante têm sido estudados visando a obtenção de substâncias antioxidantes que combatam os radicais livres. Este extratos têm sido padronizados e utilizados como fitoterápicos, por exemplo o extrato das cascas da manga (*Mangifera indica*), o qual possui alta atividade antioxidante (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005).

Muitos antioxidantes naturais, tais como rutina, quercetina, naringenina são compostos suscetíveis a doação de um próton a um radical livre, devido a presença nestas substâncias de um sistema conjugado com hidroxilas quelada a carbonila e dupla ligação  $\alpha$ - $\beta$ -carbonila (CAI *et al*, 2006).

### 1.3. Família Myrtaceae e Gênero *Campomanesia*

O Estado de Mato Grosso do Sul possui uma ampla biodiversidade de vegetais que são utilizados na medicina popular, principalmente espécies frutíferas da família Myrtaceae como *Campomanesia adamantium* (guavira) e *Psidium guajava* (goiaba).

A família Myrtaceae possui cerca de 140 gêneros e mais de 3000 espécies, e seus maiores centros de dispersão são a América e a Austrália (SILVA *et al*, 2005). Está dividida em duas subfamílias a Myrtoideae e Leptospermoideae, sendo que no Brasil todos os representantes nativos pertencem a subfamília Myrtoideae.

A subfamília Myrtoideae é constituída de apenas uma tribo, Myrteae, a qual está dividida em três subtribos: Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae (LIMBERG *et al*, 2004).

Os gêneros *Eugenia*, *Myrciaria*, *Plinia* pertencem a subtribo Eugeniinae, gêneros *Myrcia*, *Calypttranthes*, *Marlierea*, *Myrceugenia* pertencem a subtribo Myrciinae e gêneros *Campomanesia* e *Psidium* pertencem a subtribo Myrtinae (MENUT *et al*, 1997). O gênero *Campomanesia* possui aproximadamente 80 espécies, das quais 11 são árvores frutíferas (OSÓRIO *et al*, 2006).

O Estado de Mato Grosso do Sul possui uma paisagem diversificada, caracterizada por cerrados e campos de inundação, como o Pantanal. A flora do Pantanal possui cerca de 1863 espécies, pertencentes a 774 gêneros e 136 famílias. A família Myrtaceae apresenta-se com 45 espécies com destaque às espécies *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg., *C. eugenioides* (Cambess.) Legr., *C. sessiflora* (O. Berg.) Mattos, *C. pubescens* (Cambess.) O. Berg (POTT *al.*, 1996).

A espécie *C. adamantium* ocorre em fisionomias campestres de cerrado e em cerrado típico, sendo encontrada na região do Estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Essa espécie é caracterizada como arbusto muito ramificado, ramos delgados de até 2 m de altura, folhas simples, opostas, ovais ou elípticas, cerca de 4 cm de comprimento e 2 cm de largura. Flores brancas e frutos verdes ou amarelados, glaba, com cerca de 1,5 cm de

diâmetro(DURIGAN,2004).

Os frutos são empregados na culinária sulmatogrossense no preparo de licores, sorvetes e geléias. As folhas são utilizadas na medicina popular para desarranjos estomacais e infecções do trato urinário (PIVA, 2002). Em relatos da população as raízes são empregadas no tratamento da diabete.

Devido a abundância deste vegetal em nosso Estado, todos os anos é realizado na cidade de Bonito o Festival da Guavira, onde o folclore e a culinária são as principais atrações.

Os estudos químicos reportados na literatura sobre o gênero *Campomanesia* são recentes. A espécie *C. lineatifolia* é nativa da região do Amazonas na Colômbia, onde é conhecida popularmente como champa, palillo, guayaba de mono, guayaba de anselmo. A partir de suas sementes foram isoladas três  $\beta$ -tricotonas denominadas de champanonas A, B e C as quais apresentaram atividade antimicrobiana (BONILA *et al*, 2005). Da polpa, casca, folhas e sementes foram caracterizados os compostos voláteis (OSÓRIO *et al*, 2006).

Foram caracterizadas também as substâncias presentes nos óleos essenciais das folhas de *C. sessiflora* (MARCONDES *et al*, 2002), *C. guazumifolia*, *C. rhombea* e *C. xanthocarpa* (LIMBERGER *et al*, 2001), *C. phaea* (ADATI & FERRO, 2006) e nos frutos de *C. adamantium* (VALLILO *et al*, 2006).

Estudos químicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), nas folhas relataram à presença de quercetina, miricitrina e rutina em *C. xanthocarpa*; miricitrina em *C. pubences* e miricitrina e quercetina em *C. quazumaefolia* (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1995).

Análise química das folhas de *C. xanthocarpa* indicou a presença de flavonóides, saponinas e taninos, também foram realizados testes de atividade antiulcera e de toxicidade em ratos (MARKMAN *et al*, 2004).

Tratamento com infusão das folhas de *C. xanthocarpa* em ratos com dieta de alta caloria, mostrou uma redução significativa de peso corpóreo e diminuição da glicemia, e não observou redução significativa de triglicérides e colesterol (BIAVATTI *et al*, 2004).

Não foram encontrados relatos na literatura da análise química das folhas e flores de *Campomanesia adamantium*.

## 2. OBJETIVOS

1. Estudar as folhas da espécie *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae), visando os seguintes itens:

- ✓ Caracterização do óleo essencial em diferentes estágios fenológicos e em diferentes cidades do Estado de MS empregando CG-EM;
- ✓ Isolamento das substâncias presentes nos extratos e avaliação da atividade antioxidante;
- ✓ A avaliação da atividade antimicrobiana em óleos essenciais e extratos;
- ✓ A avaliação do efeito inseticida no extrato etanólico;
- ✓ Monitoramento das substâncias em amostras coletadas em diferentes estações do ano empregando CLAE, determinação do teor de fenóis e flavonóides e avaliação da atividade antioxidante.

2 . Caracterização do óleo essencial das flores empregando CG-EM da espécie *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Padrões e Reagentes

Os solventes utilizados no preparo dos extratos, cromatografia em coluna (CC), cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram de grau p.A. Para os ensaios de atividade antioxidante, teor de fenóis, taninos e flavonóides, e as análises por CLAE foram usados solventes grau cromatográfico.

Para a realização dos ensaios do teor totais de fenóis, taninos, flavonóides e atividade antioxidante foram empregados os padrões de ácido gálico, ácido tânico e 4-hidroxi-3,5-diterc-butil-tolueno (BHT) obtidos a partir de Sigma-Aldrich.  $\beta$ -caroteno foi adquirido da Calbiochem e quercetina obtida a partir da hidrólise ácida da rutina, a qual foi isolada de *Dimorphandra mollis* Benth. Os reagentes para esses mesmos ensaios foram: Folin-Cicauteau, acetato de potássio, cloreto de alumínio, carbonato de sódio adquiridos da Merck, Tween 20 da Riedel-de Haën, 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e ácido linoléico obtidos da empresa Sigma-Aldrich.

Para a identificação das substâncias presentes no óleo essencial foram empregados padrões da série de *n*-alcanos C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub> adquiridos da Sigma.-Aldrich.

Para quantificação das substâncias presentes nos extratos foram empregadas as substâncias isoladas a partir do extrato metanólico da espécie analisada neste trabalho e a substância 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona (**Ca14**) isolada dos frutos de *Campomanesia pubescens* (SILVA *et al.*, 2007).

#### 3.2. Cromatografia em Coluna (CC)

Para fracionamento cromatográfico foram utilizadas: colunas de vidro de 3,5 cm de diâmetro x 40 cm e como fase estacionária sephadex LH-20 da Pharmacia e sílica gel 60 de 70-230 mesh da Merck; coluna de vidro de 1,5 cm de diâmetro x 15 cm e fase estacionária sephadex LH-20 da Pharmacia, sílica gel 60 230-400 mesh e sílica de fase reversa -C<sub>18</sub> da Merck. Foram utilizados solventes de grau p.A. como fase móvel.

### 3.3. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Para análise do perfil cromatográfico foram empregadas placas de alumínio impregnada com sílica gel F<sub>254</sub> (Macherey-Nagel), e reveladas empregando luz UV (254 e 365 nm), sulfato de cério, vanilina sulfúrica e solução de *p*-anisaldeído.

### 3.4. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

Para isolamento a partir do perfil cromatográfico foram empregadas placas de vidro (20 x 20 cm) cobertas com sílica gel 60 HF<sub>254-366</sub> e analisadas empregando luz ultravioleta.

### 3.5. Preparo dos reveladores:

- Solução de sulfato de cério: Sulfato de cério em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4,5%).
- Solução de vanilina sulfúrica: 600 mg de vanilina.  
60 mL de solução contendo: 45% de MeOH, 45% de EtOH e 10% de ácido sulfúrico concentrado.
- Solução de *p*-anisaldeído: 0,85 mL de anisaldeído  
85 mL de MeOH  
10 mL de ácido acético  
5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Luz ultravioleta: incidência de luz ultravioleta (Monitor UV de mão da Boitton com luz UV de 254 e 365 nm) em câmara escura.

### 3.6. Equipamentos

#### 3.6.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Todas as frações obtidas foram analisadas empregando um cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo: Varian 210, detector de arranjo de diodos (DAD), com varredura entre 200-800 nm. A coluna utilizada para as análises foi de fase reversa C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm) e pré-coluna (2,5 cm x 3 mm) de mesma fase da coluna (Phenomenex). A eluição foi realizada com solventes de grau HPLC em sistema gradiente, nas seguintes

condições cromatográficas:

**Condição 1:** Iniciou-se com 40% de metanol, 50% de água e 10% de acetonitrila indo até 40 minutos até atingir 80% de metanol, 10% de água e 10% de acetonitrila e 10 minutos para voltar à condição inicial. Tempo de análise foi de 60 minutos. Vazão de fluxo da bomba de 1 mL/min e volume injetado foi variável entre as amostras (10 a 50 uL)

**Condição 2:** Iniciou-se com com 1% de metanol, 84% de água e 15% de acetonitrila indo até 15 minutos para atingir 1% de metanol, 59% de água e 40% de acetonitrila, depois mais 5 minutos para atingir 1% de metanol, 21% de água e 78% de acetonitrila, 10 minutos para atingir 1% de metanol, 0% de água e 99% de acetonitrila, 10 minutos para atingir 0% de metanol, 0% de água e 100% de acetonitrila e por fim 10 minutos para voltar à condição inicial. Tempo de análise foi de 50 minutos. Vazão de fluxo da bomba de 1 mL/min e volume injetado foi variável entre as amostras (10 a 50 uL).

### 3.6.2. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

Todas as amostras de óleo essencial foram analisadas empregando um Cromatógrafo a Gás, GC 3900, acoplado ao Espectrômetro de Massas, Saturn 2100 T (Varian), utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25  $\mu\text{m}$  (ZB-5: 5% de fenil dimetilpolisiloxano). As condições cromatográficas empregadas foram as seguintes: hélio como gás de arraste (fluxo 1 mL/min), volume de injeção 1  $\mu\text{L}$ , razão de Split 1:20, com temperatura inicial do forno de 50 °C e aquecimento de 50 à 250 °C a 3 °C/min. As temperaturas do injetor e do trap foram de 240 e 200 °C, respectivamente, manifold a 70 °C e linha de transferência 240 °C. Os parâmetros de scan do EM foram ionização por impacto de elétrons a 70 eV, na faixa de massa de 40-430  $m/z$  e intervalo de scan de 0.5 s.

### 3.6.3. Espectrofotômetro de ultravioleta

A leitura das absorbâncias na região do visível realizadas para os testes químicos de avaliação da atividade antioxidante, teor de flavonóides e fenóis totais, foram realizadas empregando Espectrofotômetro Hitachi 1100, com comprimento de onda na faixa de 190-

1100 nm.

### 3.6.4. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram realizados em espectrômetro Bruker DPX-300, operando a 300 MHz para o  $^1\text{H}$  e 75 MHz para o  $^{13}\text{C}$ . Alguns experimentos foram realizados empregando um espectrômetro Varian, INOVA 500, operando a 500 MHz para o  $^1\text{H}$  e 125 MHz para o  $^{13}\text{C}$ . Os espectros foram registrados com as amostras solubilizadas em  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

### 3.7. Coleta do material vegetal

Para este trabalho as folhas de *C. adamantium* foram coletadas em quatro cidades do Estado de Mato Grosso do Sul e preparadas excicatas para identificação botânica. A tabela 1 indica as coordenadas geográficas referentes a cada local de coleta, assim como o número da excicatas do material vegetal.

**Tabela 1** – Coordenadas geográficas e locais de coleta.

Cidade	Latitude	Longitude	Número excicata
Dourados	22° 11' 813'' S	054° 55' 801'' W	5196
Bela Vista	22° 06' 35.8'' S	056° 33' 00.8'' W	5198
Jardim	21° 25' 02.0'' S	056° 13' 77.0'' W	5195
Bonito	21° 07' 50.0'' S	056° 24' 68.0'' W	5197

### 3.8. Preparo dos óleos essenciais e extratos

#### 3.8.1. Preparo dos óleos essenciais

Para o preparo dos óleos essenciais foram coletadas as folhas de *C. adamantium* em cidades diferentes do estado de Mato Grosso do Sul: Dourados durante o estágio de floração (**Ddos<sub>fl</sub>**), frutificação (**Ddos<sub>fr</sub>**) e vegetativo (**Ddos<sub>vg</sub>**); Bela Vista (**BV<sub>fr</sub>**), Jardim (**Jd<sub>fr</sub>**), Bonito (**BO<sub>fr</sub>**) e Dourados (**Ddos<sub>fr</sub>**) durante a frutificação. As flores foram coletadas na cidade de Dourados (**Ddos<sub>fs</sub>**).

Os óleos essenciais foram obtidos por arraste a vapor utilizando o extrator tipo Clevenger, a partir de 400,00 g das folhas e flores frescas, obtendo-se um total de oito amostras.

Foram preparadas soluções dos óleos essenciais em hexano grau cromatográfico e analisadas empregando CG-EM. A tabela 2 apresenta os códigos das amostras, locais de coletas, rendimento dos óleos obtidos e concentração das soluções para análise.

**Tabela 2** – Amostras submetidas à análise em CG-EM

Amostras	Local de coleta	C. do analito (µg/mL)	Estágio fenológico	Rendimento (%)
<b>BV<sub>fr</sub></b>	Bela Vista	2420	Primavera (frutificação)	0,13
<b>JD<sub>fr</sub></b>	Jardim	2460	Primavera (frutificação)	0,10
<b>BO<sub>fr</sub></b>	Bonito	2420	Primavera (frutificação)	0,20
<b>Ddos<sub>fs</sub></b>	Dourados	2030	Flores (Primavera)	0,05
<b>Ddos<sub>fl</sub></b>	Dourados	2270	Primavera (floração)	0,16
<b>Ddos<sub>fr</sub></b>	Dourados	2390	Primavera (frutificação)	0,39
<b>Ddos<sub>vg</sub></b>	Dourados	2320	Outono (vegetativo)	0,19

O índice de retenção (IR) foi determinado através de adição de padrão de *n*-alcano (C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub>) na concentração de 250 µg/mL.

O IR foi calculado utilizando a equação para temperatura programada (ISIDOROV *et al*, 1998; ZHAO *et al*, 2005).

De acordo com a equação abaixo:

$$I = 100z + 100 \frac{(Tr)_x - (Tr)_z}{(Tr)_z + 1 - (Tr)_z}$$

tr = tempo de retenção

z = número de carbono do menor padrão de *n*-alcano

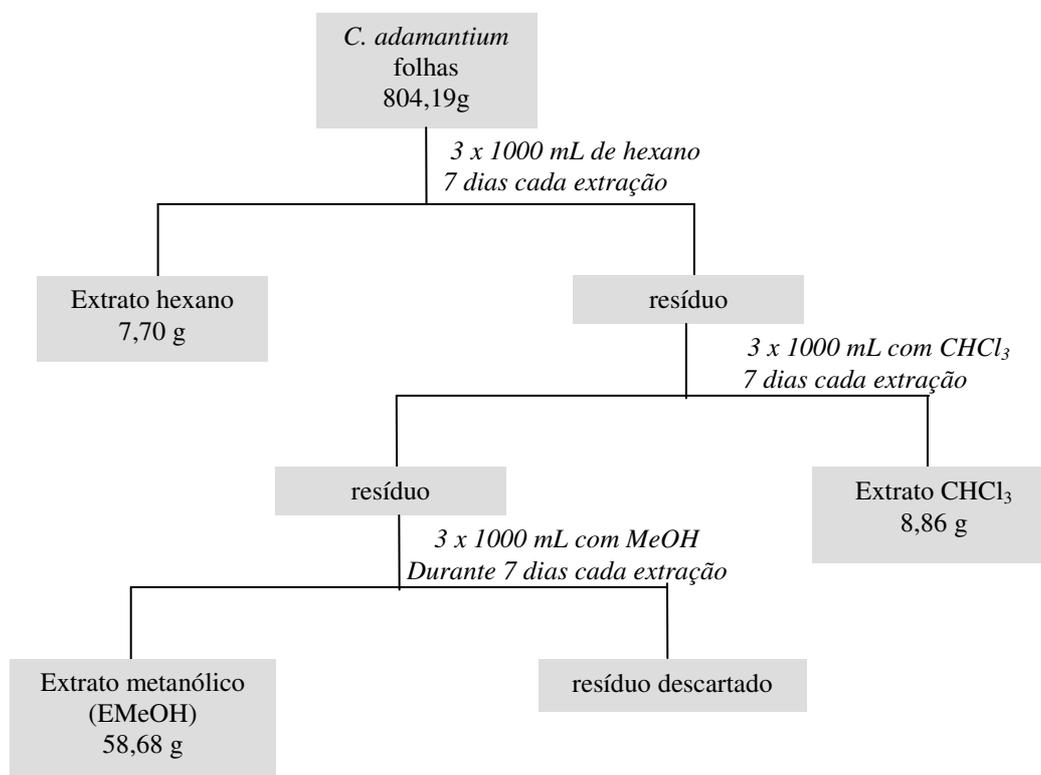
z+1 = número de carbono do próximo homólogo de *n*-alcano

Z = número de carbonos do alcano de retenção Xz

### 3.8.2. Extratos orgânicos para isolamento e análise por CCDC

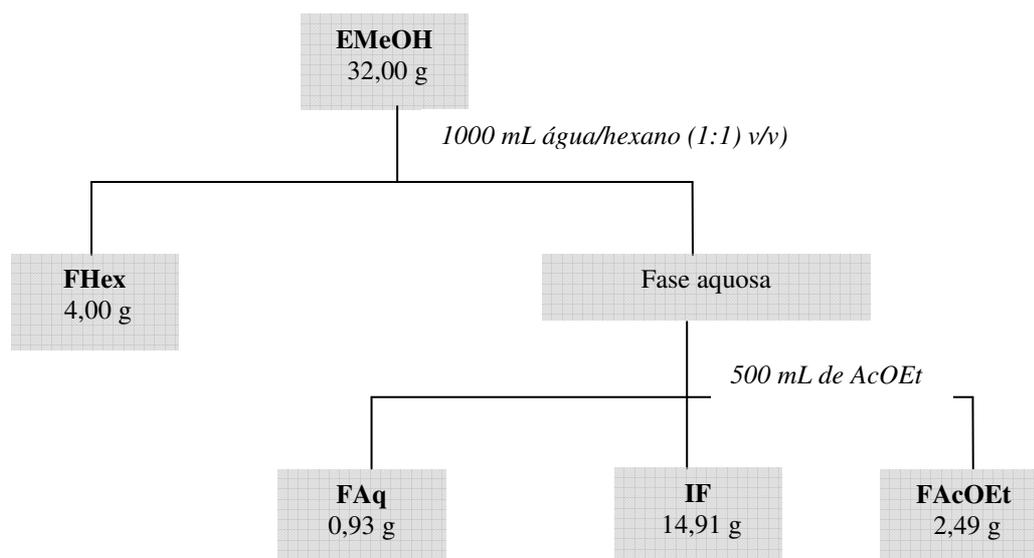
As folhas de *C. adamantium* coletadas na cidade de Jardim em novembro de 2005 durante o estágio de floração, foram secas em estufa a 37 °C, e posteriormente trituradas

em moinho de facas. Os extratos foram preparados partindo-se de 804,20 g de folhas secas, em ordem crescente de polaridade iniciando-se com hexano, seguido de clorofórmio e metanol por 3 vezes consecutivas com cada solvente durante um período de 7 dias (fig. 3).



**Figura 3** – Fluxograma representativo do processo de obtenção dos extratos das folhas de *C. adamantium*.

Os extratos hexânico, clorofórmico e metanólico foram obtidos evaporando-se os solventes em rotoevaporador. Para esse trabalho optamos por trabalhar com o extrato polar metanólico denominado **EMeOH**. Em seguida, o mesmo foi submetido a partição líquido-líquido (fig. 4) empregando-se uma mistura de 1000 mL de água/hexano (1:1 v/v), sendo obtida a fase hexânica (**FHex**). Essa foi separada e posteriormente foi adicionado 500 mL de AcOEt na fase aquosa (**FAq**), onde foi observado a formação de três fases, a de maior densidade referente a **FAq**, fase de menor densidade referente a fase acetato de etila (**FACoEt**) e uma fase entre **FAq** e **FACoEt** que não foi solúvel em nenhuma dessas fases e foi denominada de interfase (**IF**) (fig.4).



**Figura 4** – Fluxograma da partição líquido-líquido obtida a partir do EMeOH.

A análise por CCDC das fases obtidas através da partição líquido-líquido foi realizada empregando vários eluentes, mas os que apresentaram melhor separação foram as misturas de Tol/AcOEt/Hfor (6:4:1 v/v/v) para substâncias apolares e AcOEt/*n*-PrOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (140:8:80: v/v/v, fase orgânica) para detecção de substâncias polares. Após serem reveladas com luz UV as placas foram pulverizadas com vanilina sulfúrica.

Para análise empregando CLAE, 20 mg da amostra **EMeOH** foi dissolvida em 5 mL de metanol grau cromatográfico e filtrada com ultrafiltro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, esta solução foi diluída para 1,33 mg/mL e analisada.

### 3.8.2.1 Fracionamento da fase hexânica (**FHex**)

A **FHex** (3,30 g) foi fracionada empregando sílica gel 70 - 230 mesh como adsorvente e misturas de hexano/acetona e acetona/etanol em sistema gradiente como fase móvel. Foram obtidas 100 frações de 50 mL cada, as quais foram rotoevaporadas e posteriormente analisadas por CCDC empregando como eluentes uma mistura de Tol/AcOEt/HAc 80:20:5 (v:v:v) e Tol/AcOEt/HAc 139:83:8 (v:v:v) e revelada com vanilina sulfúrica. As frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas.

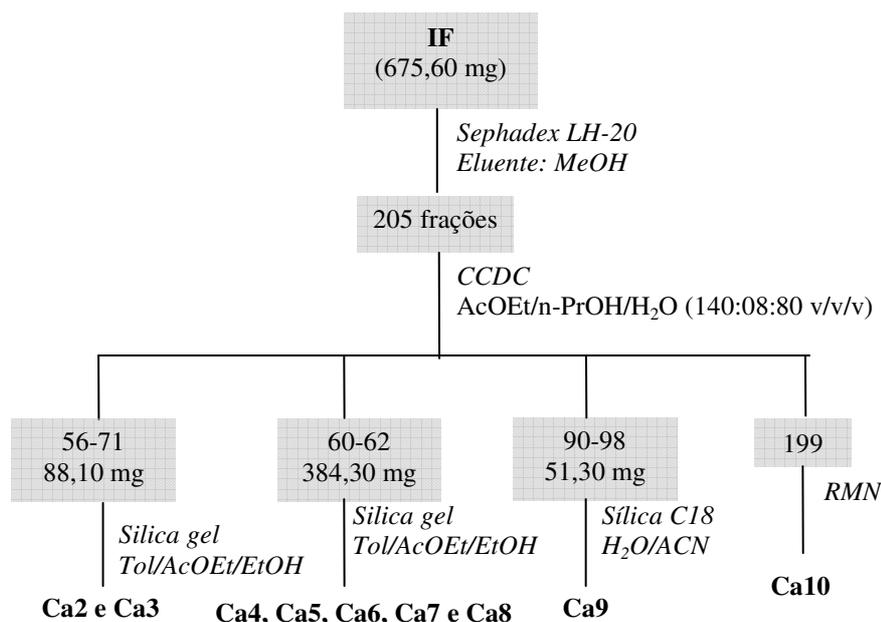
A fração 36-41 (80,13 mg) quando analisada por CCDC mostrou a presença de duas manchas, a primeira de maior polaridade de coloração roxa e a segunda de coloração amarela quando revelada com vanilina sulfúrica. Esta foi submetida à CCDP, empregando-se placa de vidro impregnada com sílica gel para escala preparativa HF<sub>254-366</sub> e eluída em uma mistura de Tol/AcOEt/HAc 80:20:5 (v:v:v). As manchas obtidas nas placas foram separadas e retiradas da sílica por solubilização em acetato de etila.

Após análise novamente por CCDC foi observado que a mancha de maior polaridade estava pura e foi submetida à análise espectroscópica empregando técnicas de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, sendo então denominada de **Ca1**.

### 3.8.2.2. *Fracionamento da interfase (IF)*

A interfase (675,60 mg) foi dissolvida em 15 mL de MeOH, centrifugada e em seguida aplicada em coluna empregando-se sephadex-LH20 como fase estacionária e MeOH como fase móvel (fig. 5). Foram obtidas 209 frações de 20 mL cada, que foram analisadas por CCDC empregando o eluente AcOEt/n-PrOH/H<sub>2</sub>O (140:08:80 v/v/v), fase orgânica, e revelada com solução de sulfato de cério.

Somente a fração 199 mostrou a presença de uma mancha em CCDC quando eluída com AcOEt/n-PrOH/H<sub>2</sub>O (140:8:80 v/v/v, fase orgânica) e revelada com sulfato de cério. Posteriormente, foi submetida à análise por RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT 135°, gHSQC e gHMBC, e foi denominada de **Ca9**. As frações que se apresentaram em mistura foram refractionadas e os procedimentos realizados com estas estão descritos abaixo.



**Figura 5** – Fluxograma das frações obtidas a partir do fracionamento de IF.

#### 3.8.2.2.1. Cromatografia em coluna da fração 56-71

A fração 56-71 (88,10 mg) foi purificada utilizando sílica gel (230-400 mesh) e eluída em sistema gradiente iniciando-se com tolueno, aumentando para acetato de etila terminando em etanol. Foram obtidas 82 frações de 20 mL, as quais foram analisadas por CCDC empregando os eluentes Tol/AcOEt/HAc (6:4:1 v/v/v) e Hex/CHCl<sub>3</sub>/MeOH (4:4:2 v/v/v) e revelada com vanilina sulfúrica. Dentre as frações obtidas, a fração **23** (12,50 mg) e **65** (7,05 mg) apresentaram somente uma mancha de coloração alaranjada, mas com Rf's diferentes. Posteriormente foram submetidas à análise por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, gHSQC, gHMBC, onde foram denominadas de substâncias **Ca2** (23) e **Ca3** (65).

#### 3.8.2.2.2. Cromatografia em coluna da fração 60-62

A fração 60-62 (384,30 mg) foi também submetida à coluna utilizando sílica gel (230-400 mesh, Merck) e eluída com Tol/AcOEt e AcOEt/EtOH em sistema gradiente. Foram obtidas 150 frações de 20 mL, as quais foram analisadas por CCD. As frações **5-7**

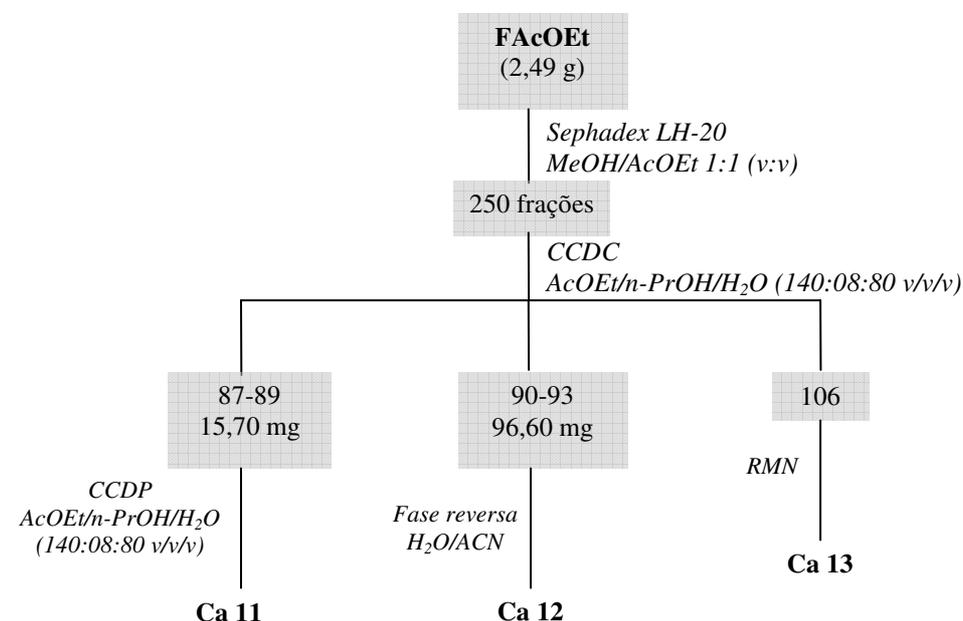
(6,10 mg), **16** (15,40 mg), **18** (7,50 mg) e **22-23** (6,50 mg) foram isoladas como um sólido amarelo amorfo, cristais transparentes, sólido amarelo alaranjado e sólido amarelo amorfo, respectivamente. As mesmas foram analisadas utilizando como fase móvel Tol/AcOEt (98:2 v/v), e estas apresentaram somente uma mancha em CCDC e quando reveladas com vanilina sulfúrica apresentaram coloração amarela, rosa-pink, alaranjada e amarela, respectivamente. Posteriormente foram submetidas à análise por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e experimentos de gHSQC e gHMBC, onde foram denominadas de substâncias **Ca4** (5-7), **Ca5** (16), **Ca6** (17), **Ca7** (18) e **Ca8** (22-23).

#### 3.8.2.2.3. Cromatografia em coluna da fração 90-98

Outra fração analisada foi a 90-98 (51,30 mg), o qual foi submetida à separação empregando sílica de fase reversa C18 como adsorvente e eluída com água/acetonitrila em sistema gradiente. Foram obtidas 46 frações e analisadas por CCDC empregando o eluente Tol/AcOEt/Hfor (6:4:1 v/v/v) e revelada com vanilina sulfúrica. A fração 12-13 obtida empregando a fase móvel  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (60:40 v/v) apresentou somente uma mancha de coloração amarela. Posteriormente, foi submetida à análise espectroscópica de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , gHSQC, gHMBC, onde foi determinada a substância **Ca9** (6,50 mg).

#### 3.8.2.3. Fracionamento da fase acetato de etila (**FAcOEt**)

A **FAcOEt** (2,49g) foi fracionada empregando-se Sephadex-LH20 como fase estacionária e MeOH/AcOEt 1:1 (v:v) como fase móvel (fig. 6). Para isso a **FAcOEt** foi dissolvida em 15,00 mL de solução metanol/acetato de etila 1:1 e centrifugada. O sobrenadante foi aplicado na coluna. Foram obtidas 250 frações de 20 mL cada, que foram analisadas por CCDC empregando o eluente AcOEt/n-PrOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (140:08:80 v/v/v), fase orgânica) e revelada com solução de sulfato de cério. A figura 6 mostra o procedimento realizado para o isolamento das substâncias presentes nesta fase e a purificação realizada com algumas frações que se apresentaram em mistura.



**Figura 6** – Fluxograma das frações obtidas do fracionamento da amostra **EAcOEt**.

### 3.8.2.3.1. Cromatografia em camada delgada preparativa da fração 87-89

A fração 87-89 (17,70 mg) foi submetida à CCDP empregando placas de alumínio impregnadas com sílica gel F<sub>254</sub> como fase estacionária e AcOEt/n-PrOH/H<sub>2</sub>O (140:08:80 v/v/v), fase orgânica) como fase móvel. A placa foi revelada empregando luz UV e foram observadas 5 manchas. Após a separação, somente a mancha 3 mostre-se pura através da análise por CCDC. Esta amostra foi submetida à análise por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, DEPT 135°, gHSQC e gHMBC, e foi denominada de substância **Ca11** (6,50 mg).

### 3.8.2.3.2. Cromatografia em camada delgada preparativa da fração 90-93

A fração 90-93 (96,60 mg) foi fracionada empregando sílica de fase reversa e H<sub>2</sub>O/ACN em polaridade decrescente como fase móvel. Foram obtidas 35 frações. A fração 2 (14,03 mg), obtida empregando a fase móvel H<sub>2</sub>O/ACN (6:4), apresentou duas manchas de coloração amarela quando revelada com vanilina sulfúrica, mas de intensidade

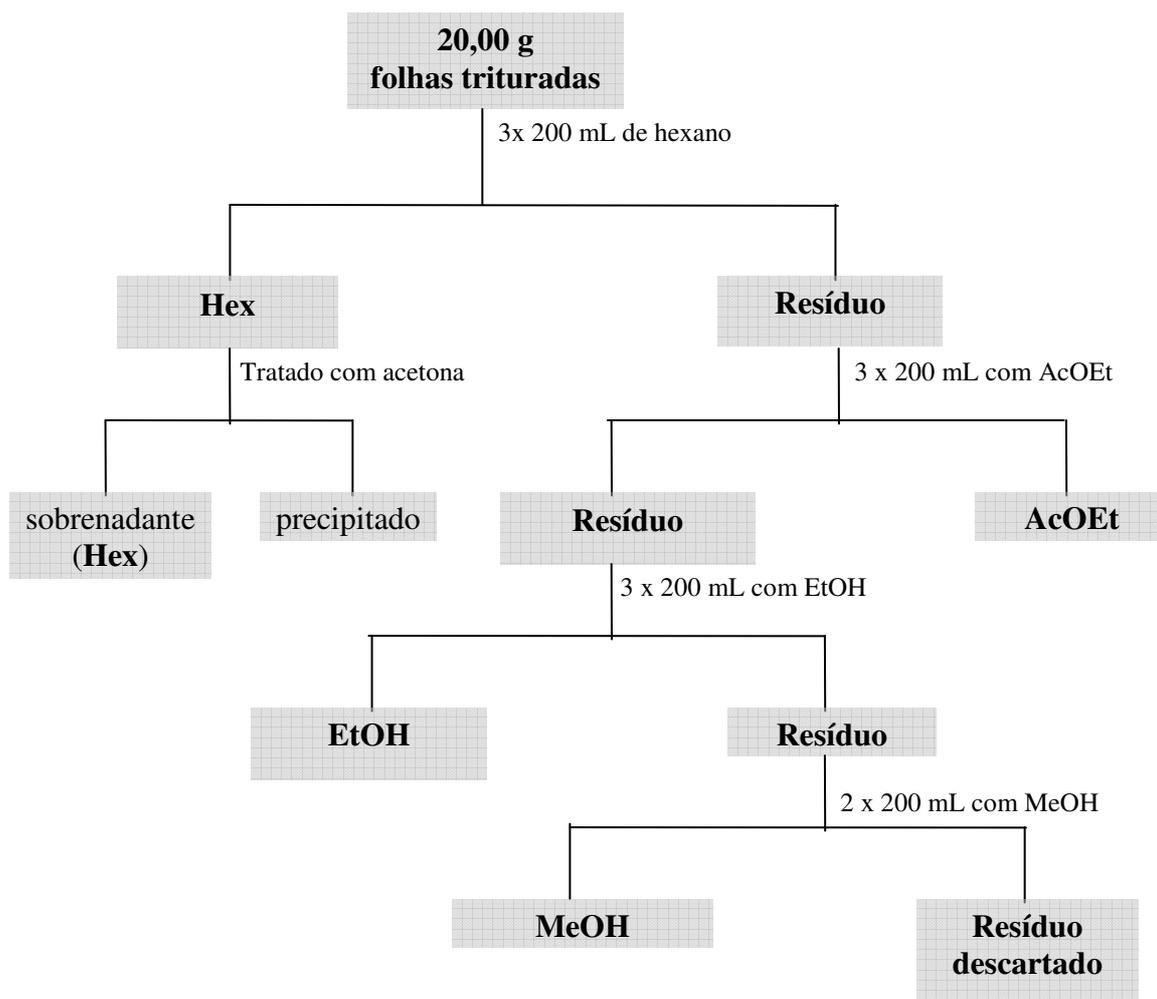
diferentes, sugerindo que a de Rf menor era majoritária em relação a outra. Posteriormente, essa fração foi analisada empregando técnicas espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135°, gHSQC e gHMBC, e foi denominada de substância **Ca12** (majoritária) em mistura com a substância **Ca11** (minoritária).

### 3.8.3 Amostras das folhas coletadas em diferentes estações do ano

Para o preparo dos extratos a partir das folhas de *C. adamantium* coletadas em diferentes estações do ano, coletou-se as folhas na cidade de Bela Vista em 2007 durante o verão (quente e úmido) e outono (frio e seco). Nestas duas estações do ano a planta encontrava-se no estágio vegetativo, enquanto na primavera (clima quente e seco) a planta encontrava-se no estágio reprodutivo.

Os extratos foram preparados a partir de 20,00 g de folhas trituradas em liquidificador e submetidos a maceração com 200 mL dos solventes hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt), etanol (EtOH) e metanol (MeOH), sequencialmente, em ordem crescente de polaridade, onde cada solvente permaneceu em contato com as folhas durante 48 horas (fig. 7). Foram obtidos os extratos hexânicos, acetato de etila, etanólico e metanólico. A tabela 3 mostra o rendimento dos extratos e seus respectivos códigos.

O extrato hexânico foi tratado com acetona, onde observou-se a formação de um precipitado, o qual foi separado do sobrenadante. Esse precipitado é formado provavelmente por substâncias insolúveis, como hidrocarbonetos de cadeia longa, com isso somente o sobrenadante foi empregado em todas as análises.



**Figura 7** – Fluxograma de preparo dos extratos obtidos a partir das folhas de *C. adamantium* coletadas em diferentes estações do ano.

**Tabela 3** - Rendimento (%) dos extratos obtidos das folhas de *Campomanesia adamantium* durante o verão, outono e primavera.

Amostras	Hex		AcOEt	EtOH	MeOH
	sobrenadante	precipitado			
Verão (Cav)	1,45	5,50	6,20	8,55	1,65
Outono (Cao)	2,06	1,73	6,75	7,75	3,63
Primavera (Caip)	0,87	1,85	2,50	5,38	2,29

Para quantificação empregando CLAE das substâncias presentes em todos os extratos obtidos da coleta sazonal, foram preparadas soluções estoques na concentração de 0,61 mg/mL em metanol e filtradas com ultrafiltro de 0,22 µm.

#### 3.8.4 Determinação do teor das substâncias **Ca2**, **Ca4**, **Ca5**, **Ca6**, **Ca9** e **Ca14**

As substâncias isoladas a partir da fase acetato de etila (**FAcOEt**) e interfase (**IF**), com exceção de **Ca1**, após elucidação estrutural através de técnicas de RMN 1D e 2D foram analisadas por CLAE/DAD empregando a condição 1. As substâncias isoladas foram purificadas por CLAE analítico apresentando pureza entre 90-94 % [ **Ca2** ( 92 % ), **Ca4** ( 92 % ), **Ca5** (93 % ), **Ca6** (91 % ), **Ca9** ( 92 % ), **Ca11** ( 94 % ), **Ca12** ( 90 % ) e **Ca14** ( 92 % )].

As substâncias foram dissolvidas separadamente em metanol grau cromatográfico para preparação das soluções estoques. Foram realizadas injeções de volumes variados da solução estoque do analito. Para cada analito foi obtido um cromatograma, deste foi retirada a área onde foi construída a curva analítica de área *versus* massa de cada substância. Através da análise de regressão linear foi possível estabelecer o coeficiente de correlação, assim como o coeficiente angular e linear para determinação da concentração destas substâncias no extrato metanólico e nas amostras **Cav**, **Cao** e **Caip**.

#### 3.8.5 Determinação do teor de fenóis e flavonóides

O ensaio para determinação de fenóis totais foi realizado com as amostras **EMEOH**, **Cav**, **Cao** e **Caip** e a determinação de flavonóides somente com o **EMeOH** de acordo com o método descrito por LIN & TANG, 2007.

O teste do teor de fenóis foi realizado a partir de uma alíquota de 0,1 mL de amostra na concentração de 160 µg/mL e adicionado a 2 mL de carbonato de sódio 2% e depois de três minutos foi adicionado 0,1 mL reagente Folin Ciocalteau (50%). As amostras foram incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente e depois realizada a leitura em 750 nm empregando espectrofotômetro. O branco foi preparado com todos os reagentes, menos a amostra, a qual foi substituída por 0,1 mL de metanol. Uma curva

analítica do padrão ácido gálico foi obtida empregando as seguintes concentrações: 10, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{g/mL}$  e através da absorbância obtida para cada concentração foi plotado um gráfico concentração *versus* absorbância.

O teor de flavonóides totais foi realizado a partir de uma alíquota de 0,5 mL de amostra na concentração de 160  $\mu\text{g/mL}$  e adicionado 1,5 mL de metanol, 0,1 mL de cloreto de alumínio hexaidratado (10%), 0,1 mL de acetato de potássio triidratado (1 mol/L) e 2,8 mL de água destilada. Os tubos foram incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente e a leitura realizada a 415 nm empregando espectrofotômetro. O branco foi preparado com todos os reagentes, menos a amostra, a qual foi substituída por 0,5 mL de metanol. Uma curva analítica do padrão quercetina foi obtida empregando as seguintes concentrações: 5, 10, 20, 40, e 50  $\mu\text{g/mL}$  e através da absorbância obtida para cada concentração foi plotado um gráfico concentração *versus* absorbância. Os testes foram realizados em triplicata.

#### 3.8.6. Determinação do teor de taninos

O ensaio da determinação do teor de taninos foi realizado devido observação da adsorção de amostra com coloração marron na fase estacionária sephadex LH-20 durante o fracionamento preliminar do extrato metanólico (**EMeOH**). O levantamento na literatura também indicou a presença de taninos em espécies da família Myrtaceae, como a *Psidium guajava* (VERZA *et al*, 2007).

A determinação do teor de taninos foi realizada através da diferença do teor de fenóis e tanantes, o último são fenóis que reagem com agentes complexantes, tais como pó de pele, caseína e carvão ativo. O conteúdo de fenóis foi determinado a partir da reação de 0,5 mL do **EMeOH** a 160  $\mu\text{g/mL}$ , 0,2 mL de Folin Ciocalteau e 4,3 mL de carbonato de sódio hexaidratado 2%, os quais permaneceram incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos e posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 715 nm.

Os tanantes foram determinados a partir de 20 mL do extrato a 160  $\mu\text{g/mL}$  com adição de 200 mg dos agentes complexantes pó de pele, caseína e carvão ativo, os quais permaneceram em contato sobre agitação durante 60 minutos. Posteriormente, os tanantes foram filtrados empregando algodão, desta solução foi retirada uma alíquota de 0,5 mL, a qual foi adicionado 0,2 mL de reagente de Folin Ciocalteau e 4,3 mL de carbonato de sódio

hexaidratado 2%, a mistura reacional foi incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos, e posteriormente foi realizada leitura empregando espectrofotômetro a 715 nm.

O branco foi preparado com todos os reagentes, menos a amostra, a qual foi substituída por 0,5 mL de metanol. Uma curva analítica do padrão ácido tânico foi obtida empregando as seguintes concentrações: 10, 20, 40, 80 e 160 µg/mL e através da absorbância obtida para cada concentração foi plotado um gráfico concentração *versus* absorbância. Os dois testes foram realizados em triplicata.

### 3.8.7. Determinação da atividade antioxidante

#### 3.8.7.1. Avaliação da inibição da peroxidação lipídica empregando o método β-caroteno/ácido linoléico

O ensaio de atividade antioxidante empregando o sistema β-caroteno/ácido linoléico foi realizado como descrito por TEPE *et al*, 2005 com algumas modificações e foi realizado nas seguintes amostras: **EMeOH**, **FACoEt**, **FHex**, **IF**, **FAq** e todos os extratos obtidos da coleta sazonal (**Cav**, **Cao** e **Caip**). Uma solução estoque de β-caroteno e ácido linoléico foi preparada a partir de 0,5 mg de β-caroteno dissolvido em 1 mL de clorofórmio e adicionado a 25 µL de ácido linoléico e 200 mg de Tween 20. O clorofórmio foi removido sobre nitrogênio líquido. A mistura resultante teve seu volume completado para 100 mL de água milli-Q aerada. O teste foi realizado através da adição de 2,5 mL da mistura e 0,3 mL de amostra nas concentrações de 10-160 µg/mL e imediatamente a leitura foi realizada no tempo zero a 470 nm e duas depois dos tubos permanecerem incubados a 50 °C em banho-Maria. O controle foi preparado substituindo a amostra pelo mesmo volume de metanol. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A inibição da peroxidação foi calculada a partir da equação:

$$\text{Inibição da peroxidação lipídica (\%)} = (\text{conteúdo de } \beta\text{-caroteno depois de 2 hs do ensaio/conteúdo inicial de } \beta\text{-caroteno}) \times 100.$$

Os resultados obtidos com os extratos foram comparados com os padrões quercetina, BHT, ácido tânico e naringenina na concentração de 10-160 µg/mL.

As amostras que mostraram o percentual inferior ou superior a 50% tiveram sua concentração alterada (aumento ou diminuição) para o cálculo da  $CI_{50}$ .

### 3.8.7.2. Avaliação do efeito de “sequestro” de radical empregando o radical livre DPPH

A determinação da atividade antioxidante empregando o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) a 0,004%, foi baseada na habilidade de compostos fenólicos em doar um próton para o DPPH e formar estruturas de ressonância estáveis, estabilizando assim o radical livre. Este ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por BLOIS (1958), nas amostras **EMeOH**, **FAcOEt**, **FHex**, **IF**, **FAq** e todos os extratos obtidos da coleta sazonal (**Cav**, **Cao** e **Caip**), onde alíquotas de 1 mL de cada amostra nas concentrações de 10-160  $\mu\text{g/mL}$  foram adicionadas a 2 mL da solução de DPPH e incubada na temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura da absorbância de cada amostra foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm. O controle foi preparado substituindo a amostra pelo mesmo volume de metanol. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

O efeito “sequestro” de radical (%) foi calculado usando a seguinte equação:

$$\text{Efeito “sequestro” de radical (\%)} = (A_0 - A) \times 100 / A_0$$

Onde  $A_0$ , é a absorbância do DPPH (controle) e  $A$  é a absorbância da amostra mais DPPH.

Os resultados obtidos foram comparados com os padrões quercetina, ácido tânico, BHT e naringenina na concentração de 10-160  $\mu\text{g/mL}$ .

As amostras que mostraram percentual inferior ou superior a 50% tiveram sua concentração aumentada ou diminuída para o cálculo da  $CI_{50}$ .

### 3.8.8. Ensaio do método ágar de difusão em disco para determinação da atividade antimicrobiana.

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados sob a supervisão da Professora Adriana Mestriner de Felipe Melo da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN) e foram realizados com as amostras **EMeOH**, **FHex**, **IF**, **Ddos<sub>fs</sub>**, **Ddos<sub>fl</sub>** e **Ddos<sub>fr</sub>** na concentração de 2000 µg/mL.

Os discos estéreis de papel filtro com 6,00 mm (Whatman n. 1) foram impregnados com 20 µL de amostra e colocados para secar em ambiente também estéril. Após solidificação do ágar as placas foram inoculadas com uma suspensão bacteriana correspondente a escala 0,50 de Mac Farland (0.1 mL of 10<sup>8</sup> UFC/mL) e uniformemente distribuída com Swab estéril. Os discos foram aplicados nas placas e as placas foram levadas para incubação a 37°C durante 24 horas. Cada teste foi realizado em triplicada. O controle foi realizado com etanol 80%. Para determinar o controle positivo realizou-se um antibiograma e padronizou-se a utilização de discos de antibióticos (Cecon®) adquiridos comercialmente para cada cepa teste, sendo imipenen (10 µg) para *Pseudomonas aeruginosa*, nitrofurantoína (300 µg) para *Staphylococcus aureus*, fluconazol (10 µg) para *Candida albicans*.

### 3.8.9. Ensaio de bioautografia empregando o fungo *Cladosporium sphaerospermum*

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada sob a supervisão da Professora Maria Rita Marques do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Morfofisiologia CBBS/UFMS com o **EMeOH**.

O fungo *Cladosporium sphaerospermum* foi cultivado em meio BDA a 28°C, na ausência de luz até a esporulação adequada. A manutenção dos inóculos foi realizada em água destilada estéril, segundo FIGUEIREDO & PIMENTEL (1975); HOMANS & FUNCHS (1970).

Os testes de bioautografia foram realizados a partir de alíquotas de 150 µL da amostra **EMeOH** na concentração de 176, 352, 704 e 2200 µg/mL aplicados sobre placa cromatográfica (Merck) de alumínio coberta de sílica de fase normal e eluída com o

sistema solvente hex/CHCl<sub>3</sub>/MeOH (4:4:2 v/v/v).

A placa foi pulverizada com uma suspensão de esporos do fungo *Cladosporium sphaerospermum* em solução nutriente contendo glicose e incubadas em câmara úmida por 48 horas, na ausência de luz e em estufa a aproximadamente 30°C.

### 3.8.10. Avaliação do efeito inseticida

A avaliação do efeito inseticida foi realizada no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Morfofisiologia CBBS/UFMS sob a supervisão do Prof. Dr. Antônio Pancaio de Souza.

Para esse teste, as folhas de *C. adamantium* foram coletadas durante o verão de 2007 na cidade de Bela Vista. O material vegetal foi seco a temperatura ambiente e triturados em liquidificador da NKS home. As folhas (10,00 g) foram submetidas a maceração com etanol durante duas horas em ultrassom, filtrado e o solvente evaporado empregando rotoevaporador e denominado de **EEtOH**.

Os grãos de trigo foram pulverizados em capela de fluxo laminar com pulverizador acoplado a uma bomba de vácuo com o **EEtOH**, o qual foi dissolvido em etanol numa quantidade máxima de 10 mL por amostra de 100 g de trigo. Foram conduzidos testes preliminares para se avaliar o efeito inseticida somente dos solventes sobre os insetos. Foi observado que se o trigo fosse deixado por cerca de 72 horas em estufa a 38°C, após a pulverização com etanol os insetos não eram afetados na sua sobrevivência. A temperatura de 38°C foi utilizada porque preserva as características naturais dos compostos químicos vegetais.

Após a secagem por 72 horas a 38°C, o trigo foi acondicionado em caixas plásticas circulares (6 cm de diâmetro e 2,1 cm de altura), totalizando 10 g de trigo por recipiente, além da testemunha apenas com trigo não tratado. Em cada recipiente foram liberados 20 adultos não sexados de *Sitophilus zeamais* (caruncho do milho), com idade entre dez e vinte dias. As avaliações foram feitas ao primeiro, segundo, quinto e décimo dia, contando-se o número de insetos mortos e descartando-os. As parcelas foram organizadas segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, com dez repetições para cada tratamento. Para efeito de análise os dados foram cumulativos desde o primeiro até ao décimo dia.

Os resultados dos ensaios foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e quando evidenciada a diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade de erro, foi efetuada a complementação da análise através da comparação entre médias pelo teste de Turkey.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Óleos essenciais

Os componentes presentes nos óleos essenciais foram identificados com base no índice de retenção calculado para temperatura linear programada, de acordo com a equação de van Dool e Kratz, e espectro de massas. O espectro de massas e o índice de retenção foram comparados com o indicado por ADAMS (1995), e também com o espectro de massas do banco de dados (NIST 2.0 e Saturn).

Foi analisado primeiramente o óleo essencial obtido das flores e folhas coletadas durante o período de floração. Posteriormente as substâncias majoritárias identificadas nestas folhas foram comparadas com as presentes nos óleos essenciais das folhas durante a frutificação e vegetativo. A composição do óleo essencial caracterizado durante o estágio de frutificação da amostra de Dourados foi comparada com a composição dos óleos essenciais das amostras coletadas em Bela Vista, Bonito e Jardim.

#### 4.1.2. Caracterização do óleo essencial obtido de *C. adamantium* coletada no município de Dourados

A tabela 4 mostra os componentes identificados no óleo essencial das flores, e também das folhas coletadas no estágio reprodutivo (floração e frutificação) e vegetativo. No óleo essencial das flores foram identificadas 37 substâncias, das quais 10,81% são monoterpenos e 86,49% são sesquiterpenos. Os sesquiterpenos majoritários foram ledol (20,77%), globulol (9,22%),  $\alpha$ -cadinol (7,46%) e *epi*- $\alpha$ -muurolol (5,00%). Nas folhas (estágio da floração) foram identificadas 82 substâncias, das quais 48,78% são monoterpenos e 48,78% são sesquiterpenos. Os componentes majoritários foram limoneno (22,24%),  $\alpha$ -pineno (13,23%) e  $\beta$ -pineno (8,99%). As flores apresentaram maior composição percentual de sesquiterpenos do que as folhas.

Segundo BUTTERY (1984) os sesquiterpenos possuem aromas relativamente fracos para humanos, mas muito mais importantes para o olfato de insetos. Estudos de detecção eletroantenografica associados com identificação das substâncias presentes no

óleo essencial mostrou que os sesquiterpenos oxigenados ledol, 1-cubenol, guai-6-en-10 $\beta$ -ol, 1-*epi*-cubenol e muurolol são responsáveis pela atração de *Hypsipyla grandella* a *Guarea macrophylla* ssp. *Tuberculata* (LAGO *et al*, 2006).

Com base nesses estudos da literatura, sugere-se que a presença dos sesquiterpenos oxigenados nas flores de *C. adamantium* esteja relacionada à interação planta-inseto, pois durante o estágio de floração este vegetal é visitado por diferentes tipos de insetos.

As substâncias identificadas no óleo essencial das folhas descrita acima foram comparadas com as folhas coletadas durante o estágio reprodutivo (frutificação) e vegetativo e as substâncias majoritárias são ilustradas na figura 8. Na frutificação foram identificadas 44 substâncias, das quais 31,82% são monoterpenos e 68,19% são sesquiterpenos, onde os componentes majoritários foram biciclogermacreno (18,95%), germacreno D (11,82%),  $\beta$ -cariofileno (8,97%),  $\alpha$ -pineno (7,45%) e  $\beta$ -pineno (6,69%).

No estágio vegetativo foram identificadas 60 substâncias, das quais 38,33% são monoterpenos e 61,67% são sesquiterpenos, onde os componentes majoritários foram biciclogermacreno (16,17%), germacreno D (5,87%),  $\beta$ -cariofileno (11,05%) e globulol (11,05%).

Qualitativamente a composição química dos óleos essenciais durante o estágio reprodutivo (frutificação e floração) e vegetativo é similar, mas são diferentes quantitativamente, porque os componentes no estágio vegetativo apresentaram maior composição percentual de sesquiterpenos do que no período de floração, onde o último apresentou maior composição percentual de monoterpenos.

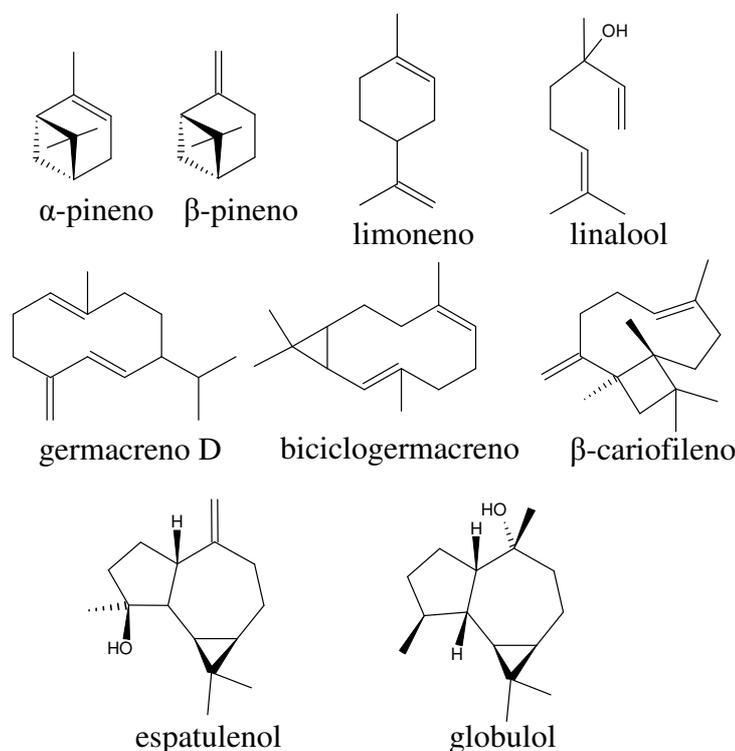
A produção e a variabilidade dos terpenóides nos vegetais podem estar associadas a fatores externos, como a diferença nas condições de luz, temperatura, níveis de nutrição e água, ou relacionada com a sua estratégia reprodutiva, podendo variar de acordo com o ciclo reprodutivo e vegetativo da planta (BRUNETON, 1999).

A literatura relata que folhas de *Salvia officinalis* apresentaram variação no rendimento de tujona, 1,8-cineol e cânfora a cada mês, onde o teor máximo na produção de óleo ocorreu no mês de julho, mas a produção maior de tujona ocorreu em outubro. Estudo da variação sazonal dos componentes do óleo essencial de *Artemisia campestris* L., demonstrou que durante o verão ocorreu uma quantidade relativamente elevada de monoterpenos, tais como,  $\alpha$ -pineno, *p*-cimeno, limoneno,  $\beta$ -ocimeno e  $\gamma$ -terpineno, e somente no mês de abril e agosto os sesquiterpenos apresentaram um rendimento maior

(LIMA *et al*, 2003).

Outro trabalho relatado foi com o óleo essencial das flores de *Gochnatia polymorpha*, o qual foi analisado no início e final da floração e apresentaram variabilidade química. Segundo o autor, no final da floração havia poucas flores e muitas sementes em estágios de maturação, e esta variabilidade pode estar relacionada como uma adaptação do vegetal para polinização a diferentes espécies de insetos (STEFANELLO *et al*, 2006).

Logo, sugere-se que a diferença observada nos componentes do óleo essencial de *C. adamantium* em diferentes períodos de coleta possa estar associada a interação planta-planta, planta-microorganismo e planta-inseto. Mas somente estudos de respostas eletrofisiológicas de insetos associados à análise dos óleos essenciais empregando CG-EM poderiam identificar as substâncias responsáveis pela atração de insetos pelo vegetal.



**Figura 8** – Principais substâncias identificadas no óleo essencial das folhas de *C. adamantium*

**Tabela 4** – Substâncias identificadas no óleo essencial das flores e folhas de *C. adamantium* coletada em diferentes estágios fenológicos.

Substâncias	IR <sub>cal</sub>	IR <sub>lit</sub>	Ddos <sub>fs</sub>	Ddos <sub>fl</sub>	Ddos <sub>fr</sub>	Ddos <sub>vg</sub>
$\alpha$ -tujeno	925	931	-	0,61	tr	-
$\alpha$ -pineno	939	931	0,03	13,23	7,45	0,07
$\alpha$ -fencheno	944	951	-	0,50	-	0,02
$\beta$ -pineno	976	977	tr	8,99	6,69	0,06
mirreno	990	991	-	0,88	0,21	-
mesitileno	993	994	0,03	Tr	-	-
$\alpha$ -felandreno	1004	1005	-	0,32	-	-
$\delta$ -3-careno	1010	1011	-	0,19	-	-
$\alpha$ -terpineno	1016	1018	-	0,24	-	-
<i>o</i> -cimeno	1024	1022	-	1,49	0,15	0,09
limoneno	1031	1031	0,03	22,24	0,99	0,66
1,8-cineol	1030	1033	-	0,87	0,44	-
(Z)- $\beta$ -ocimeno	1037	1040	-	0,03	-	-
(E)- $\beta$ -ocimeno	1047	1050	-	0,28	-	-
$\gamma$ -terpineno	1058	1062	-	0,83	0,14	0,03
terpinoleno	1087	1088	-	-	0,41	-
<i>p</i> -menta-2,4(8)-dieno	1088	1086	-	1,75	-	0,10
linalol	1100	1098	-	-	4,97	0,53
$\alpha$ -fenchol	1113	1112	-	0,34	tr	0,27
<i>cis-p</i> -ment-2-en-1-ol	1121	1121	-	0,06	-	0,09
$\alpha$ -camfonelal	1125	1125	-	tr	-	0,11
<i>cis</i> -óxido de limoneno	1132	1134	-	tr	-	-
<i>trans</i> -sabinol	1138	1140	-	0,06	-	0,03
cânfora	1143	1143	-	-	-	0,02
hidrato de camfeno	1146	1148	-	0,11	-	0,02
isoborneol	1155	1156	-	0,01	-	0,01
borneol	1164	1165	-	0,45	0,24	0,37
3-tujanol	1167	1166	-	tr	-	-
terpin-4-ol	1176	1177	-	0,57	0,26	0,04
<i>p</i> -cimen-8-ol	1184	1183	-	0,09	-	-
butirato de Z-3-Hexenila	1186	1186	-	0,01	-	-
$\alpha$ -terpineol	1190	1189	0,04	1,40	0,58	0,37
mirtenol	1195	1194	-	0,07	-	0,04
<i>trans</i> -piperitol	1206	1205	-	tr	-	-
<i>trans</i> -carveol	1217	1217	-	0,03	-	0,03

Substâncias	IR <sub>cal</sub>	IR <sub>lit</sub>	Ddos <sub>fs</sub>	Ddos <sub>fl</sub>	Ddos <sub>fr</sub>	Ddos <sub>vg</sub>
nerol	1227	1228	-	0,02	-	-
<i>cis</i> -carveol	1229	1229	-	0,01	-	-
aldeído de cumina	1238	1339	-	tr	-	-
carvona	1242	1242	-	0,01	-	-
geraniol	1254	1255	-	0,01	-	0,02
aldeído de perila	1272	1271	-	0,09	-	-
$\alpha$ -terpinen-7-al	1282	1282	-	0,02	-	-
<i>p</i> -cimen-7-ol	1286	1287	-	-	-	0,01
<i>trans</i> -acetato de sabinila	1290	1291	-	tr	-	-
carvacrol	1300	1298	-	-	-	0,02
acetato de <i>neo</i> -dihidro carveol	1303	1303	-	tr	-	-
geranato de metila	1323	1323	-	0,02	-	-
$\delta$ -elemeno	1337	1339	0,10	0,26	0,29	0,63
$\alpha$ -cubebeno	1349	1351	-	0,04	-	0,06
ciclosativeno	1371	1368	-	0,07	-	0,14
$\alpha$ -ilangeno	1372	1372	-	0,05	0,17	0,10
$\alpha$ -copaeno	1375	1376	0,33	0,37	-	1,40
isoleveno	1376	1373	-	-	1,57	-
$\beta$ -bourboneno	1384	1384	0,04	-	-	-
$\beta$ -cubebeno	1389	1390	-	0,01	-	0,06
$\beta$ -elemeno	1391	1391	0,33	0,60	0,50	1,21
$\alpha$ -gurjuneno	1409	1409	0,10	0,15	0,26	0,24
$\beta$ -cariofileno	1419	1418	3,13	3,23	8,97	6,12
$\beta$ -gurjuneno	1428	1432	-	0,21	0,36	0,35
aromadendreno	1438	1439	0,87	0,79	1,38	2,48
$\alpha$ -cariofileno	1453	1454	2,28	1,12	4,67	2,60
Seicheleno	1460	1460	0,48	0,43	1,01	-
<i>cis</i> -muurolo-4(14)-5-dieno	1462	1460	-	0,05	-	1,28
drima-7,9(11)-dieno	1469	1469	-	tr	-	-
$\gamma$ -gurjuneno	1472	1473	-	-	-	0,09
$\gamma$ -muuroloeno	1476	1477	1,00	0,68	1,00	1,15
germacreno D	1481	1480	0,72	2,66	11,82	5,87
curcumeno	1483	1483	0,28	-	-	-
$\beta$ -selineno	1485	1485	0,90	0,34	0,22	0,47
<i>cis</i> - $\beta$ -guaiano	1491	1490	0,16	0,21	-	0,23
biciclogermacreno	1496	1494	3,54	4,48	18,95	16,17

Substâncias	IR <sub>cal</sub>	IR <sub>lit</sub>	Ddos <sub>fs</sub>	Ddos <sub>fl</sub>	Ddos <sub>fr</sub>	Ddos <sub>vg</sub>
$\alpha$ -muuroleno	1499	1500	0,99	-	-	-
<i>trans</i> - $\beta$ -guaiano	1500	1500	-	-	-	0,52
$\alpha$ -bulneseno	1504	1505	-	0,14	-	0,18
germacreno A	1505	1503	-	-	0,42	-
$\gamma$ -cadineno	1513	1513	1,18	0,47	0,60	0,97
$\delta$ -cadineno	1523	1524	2,64	1,67	3,63	2,82
cadina-1,4-dieno	1532	1532	-	0,04	-	0,08
$\alpha$ -cadineno	1537	1538	0,30	0,13	-	0,18
selina-3,7(11)-dieno	1541	1542	0,87	0,06	-	-
$\alpha$ -calacoreno	1542	1542	-	0,04	-	-
germacreno B	1556	1556	-	0,36	0,27	0,30
<i>epi</i> -longipinanol	1559	1561	-	-	0,42	-
E-nerolidol	1564	1564	-	1,07	-	0,15
ledol	1566	1565	20,77	-	1,06	-
espatulenol	1577	1576	3,69	2,08	1,62	7,34
globulol	1584	1583	9,22	3,91	4,64	11,05
viridiflorol	1591	1590	-	-	2,54	-
guaiol	1593	1595	1,41	0,19	1,10	-
II epóxido de humuleno	1608	1606	1,16	0,24	tr	1,64
<i>epi</i> -1,10-di-cubenol	1614	1614	-	0,26	Tr	0,29
<i>epi</i> -1-Cubenol	1627	1627	1,39	0,64	-	1,33
$\gamma$ -eudesmol	1631	1630	1,63	0,40	0,21	0,86
<i>epi</i> - $\alpha$ -cadinol	1640	1640	5,00	1,00	1,99	1,17
$\alpha$ -muurolol	1645	1645	1,10	0,50	0,56	0,85
$\beta$ -eudesmol	1649	1649	1,22	-	-	-
$\alpha$ -cadinol	1654	1653	7,46	2,63	2,18	2,98
$\beta$ -bisabolol	1671	1671	1,93	-	-	-
cadaleno	1675	1674	-	-	-	0,19
cânfora "juniper"	1693	1691	-	0,07	-	-
monoterpenos	-	-	4	40	14	23
sesquiterpenos	-	-	32	40	30	37
não terpenos	-	-	1	2		
total de compostos	-	-	37	82	44	60
Total (%)	-	-	76,35	87,48	94,94	76,56

IR<sub>cal</sub>: índice de retenção calculado; IR<sub>lit</sub>: índice de retenção da literatura; Ddos<sub>fs</sub> (Dourados flores); Ddos<sub>fs</sub> (Dourados folhas coletadas durante a floração); Ddos<sub>fl</sub> (Dourados folhas coletadas durante a floração); Ddos<sub>fr</sub> (Dourados folhas coletadas durante a frutificação); Ddos<sub>vg</sub> (Dourados folhas coletadas durante o estágio vegetativo).

#### 4.1.3. Caracterização do óleo essencial das folhas de *C. adamantium* coletada em diferentes municípios do Estado de Mato Grosso do Sul

A Tabela 5 mostra os componentes identificados no óleo essencial das folhas de **Ddos<sub>fr</sub>** comparado com as amostras de **BV<sub>fr</sub>**, **BO<sub>fr</sub>** e **Jd<sub>fr</sub>**.

Na amostra **Ddos<sub>fr</sub>** foram identificadas 43 substâncias, onde os sesquiterpenos apresentaram maior percentual de 69,77% e os monoterpenos de 30,23%. Em **BO<sub>fr</sub>** foram identificadas 67 substâncias, das quais 35,82% são monoterpenos e 59,70% são sesquiterpenos. Na amostra **BV<sub>fr</sub>** foram identificadas 42 substâncias das quais 42,86% são monoterpenos e 57,14% são sesquiterpenos.

A amostra **Jd<sub>fr</sub>** mostrou menor número de substâncias com 40 substâncias identificadas, das quais 22,50% são monoterpenos e 77,50% são sesquiterpenos, a mesma também apresentou a menor quantidade percentual de monoterpenos.

A figura 9 ilustra o percentual relativo dos principais compostos identificados nos óleos essenciais. As amostras **BO<sub>fr</sub>** e **BV<sub>fr</sub>** mostraram maior percentual de monoterpenos do que **Ddos<sub>fr</sub>** e **Jd<sub>fr</sub>**, e em relação aos sesquiterpenos o oposto foi observado. Além do que a amostra **Jd<sub>fr</sub>** não mostrou a presença de limoneno e linalol.

Considerando que a biodiversidade é uma associação dos ecossistemas, comunidades, espécies, populações e genes em uma área definida, os quais apresentam uma distribuição desigual dos seus componentes no espaço geográfico (NODARI & GUERRA, 2000), a variação na composição dos terpenos da espécie *C. adamantium* distribuída em diferentes gradientes geográficos podem responder de modo diferente, devido a tensão ambiental exercida pelo ecossistema no qual está inserida, levando a alteração na resposta do metabolismo secundário.

Assim como os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias, sua síntese nos vegetais pode ser influenciada também por fatores externos e internos. Os fatores internos estão relacionados ao desenvolvimento vegetal e estágios fenológicos, enquanto os fatores externos são as variações no teor de luz, temperatura, água, solo e altitude (LIMA *et al*, 2003).

Há muitos estudos na literatura em relação a variação na composição química de vegetais da mesma espécie coletados em regiões diferentes, principalmente os trabalhos de

identificação de quimiotipos em óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (HOMER *et al*, 2000) e *Chamelaucium uncinatum* (EGERTON-WARBURTON *et al*, 1998).

Todavia, em estudos de monitoramento das substâncias presentes em extratos vegetais, estes fatores devem ser analisados em conjunto, pois muitas vezes, eles não atuam isoladamente.

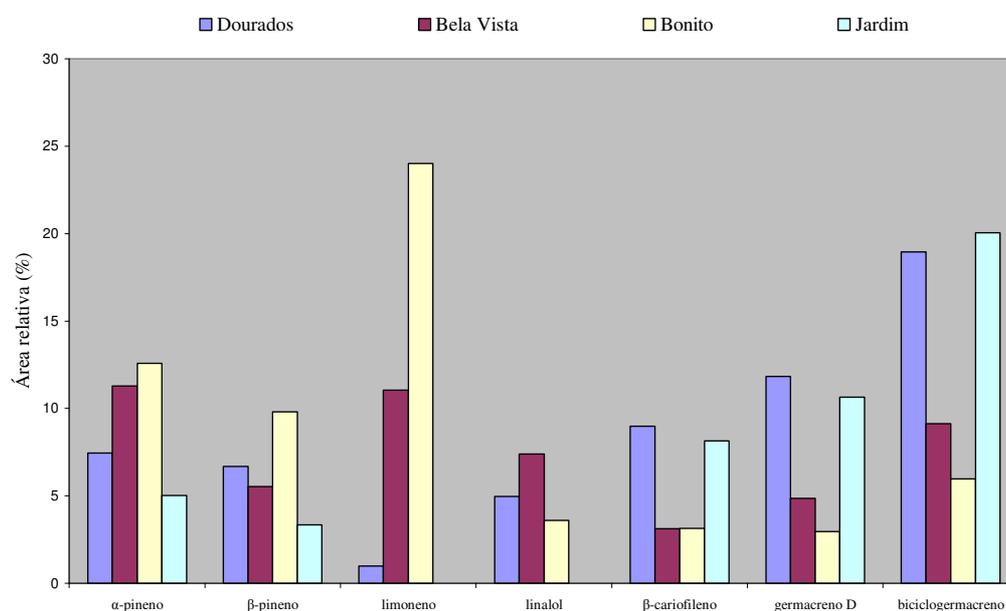
**Tabela 5** – Caracterização do óleo essencial das folhas de *C. adamantium* coletadas em 4 municípios diferentes.

Substâncias	IR <sub>lit</sub>	IR <sub>cal</sub>	BV <sub>fr</sub>	BO <sub>fr</sub>	Jd <sub>fr</sub>	Ddos <sub>fr</sub>
$\alpha$ -tujeno	931	925	-	tr	-	Tr
$\alpha$ -pineno	939	931	11,29	12,58	5,02	7,45
$\alpha$ -fencheno	951	946	tr	0,44	-	-
<i>n</i> -heptanol	969	965	-	0,04	-	-
propanoato de pentila	972	968	-	tr	-	-
$\beta$ -pineno	976	975	5,54	9,81	3,36	6,69
mirreno	991	990	0,56	0,88	tr	-
$\alpha$ -felandreno	1005	1004	tr	0,45	0,93	-
$\delta$ -3-careno	1011	1010	tr	0,22	-	-
$\alpha$ -terpineno	1018	1016	0,25	0,39	-	-
<i>o</i> -cimeno	1022	1023	0,41	0,97	5,45	0,15
limoneno	1031	1027	11,06	24,00	tr	0,99
1,8-cineol	1033	1031	3,65	1,41	-	0,44
(Z)- $\beta$ -ocimeno	1040	1037	-	tr	0,55	-
(E)- $\beta$ -ocimeno	1050	1047	0,31	0,32	0,81	-
$\gamma$ -terpineno	1062	1058	0,61	1,25	-	0,14
terpinoleno	1088	1088	0,91	2,49	0,94	0,41
linalol	1098	1100	7,40	3,60	-	4,97
$\alpha$ -fenchol	1112	1113	0,30	0,19	-	Tr
borneol	1165	1164	0,53	0,39	-	0,24
terpin-4-ol	1177	1176	-	0,53	-	0,26
<i>p</i> -cimen-8-ol	1183	1183	-	tr	-	-
$\alpha$ -terpineol	1189	1189	2,38	0,17	-	0,58

Substâncias	IR <sub>lit</sub>	IR <sub>cal</sub>	BV <sub>fr</sub>	BO <sub>fr</sub>	Jd <sub>fr</sub>	Ddos <sub>fr</sub>
mirtenol	1194	1195	-	tr	-	-
E-2-decenal	1261	1261	-	tr	-	-
aldeído de perila	1271	1273	-	tr	-	-
perilol	1295	1297	1,24	tr	-	-
δ-elemeno	1339	1337	0,31	0,37	tr	0,29
α-cubebeno	1351	1350	-	tr	-	-
α-ilangeno	1372	1372	-	-	-	0,17
α-copaeno	1376	1376	0,20	0,27	1,42	1,57
β-elemeno	1391	1392	0,81	0,27	0,93	0,50
α-gurjuneno	1409	1409	0,41	tr	-	0,26
β-cariofileno	1418	1419	3,12	3,15	8,14	8,97
β-gurjuneno	1432	1429	-	0,13	tr	0,36
aromadendreno	1439	1439	1,32	0,54	0,50	1,38
Z-β-farneseno		1443	-	0,04	-	-
α-cariofileno	1454	1453	1,01	0,93	2,07	4,67
seichelleno	1460	1460	0,55	0,30	0,70	1,01
γ-muuroleno	1477	1477	0,76	0,57	1,64	1,00
germacreno D	1480	1481	4,86	2,97	10,65	11,82
β-selineno	1485	1486	-	0,17	0,77	0,22
valenceno	1491	1491	-	0,24	0,81	-
biciclogermacreno	1494	1496	9,13	5,97	20,05	18,95
α-bulneseno	1505	1505	0,31	-	-	-
germacreno A	1503	1505	-	0,15	-	0,42
γ-cadineno	1513	1514	0,49	0,39	0,82	0,60
δ-cadineno	1524	1524	1,25	1,25	4,18	3,63
cadina-1,4-diene	1532	1532	-	tr	-	-
α-cadineno	1538	1538	-	tr	-	-
selina-3,7(11)-diene	1542	1542	-	tr	-	-
elemol	1549	1552	-	tr	-	-
germacreno B	1556	1557	-	0,16	0,64	0,27
epi-longipinanol	1561	1560	-	0,12	-	0,42

Substâncias	IR <sub>lit</sub>	IR <sub>cal</sub>	BV <sub>fr</sub>	BO <sub>fr</sub>	Jd <sub>fr</sub>	Ddos <sub>fr</sub>
E-nerolidol	1564	1564	5,50	0,82	tr	-
ledol	1565	1565	-	0,13	1,93	1,06
espatulenol	1576	1576	2,64	1,15	1,15	1,62
globulol	1583	1583	6,46	3,63	5,82	4,64
viridiflorol	1590	1590	1,85	1,16	2,38	2,54
<i>cis</i> - $\beta$ -elemoneno	1594	1593	-	-	1,18	
guaiol	1595	1595	-	0,70	-	1,10
epoxido de humulleno II	1606	1609	0,33	0,19	tr	Tr
<i>epi</i> -1,10-di-cubenol	1614	1615	-	0,18	tr	Tr
<i>epi</i> -10- $\delta$ -eudesmol	1619	1619	-	0,23	tr	-
<i>epi</i> -1-cubenol	1627	1627	0,44	0,56	0,40	-
$\gamma$ -eudesmol	1630	1630	-	tr	0,25	0,21
<i>epi</i> - $\alpha$ -cadinol	1641	1641	1,70	1,92	-	1,99
$\alpha$ -muurolol	1645	1646	0,36	0,23	3,00	0,56
$\alpha$ -cadinol	1653	1654	1,89	2,35	0,84	2,18

IR<sub>cal</sub>: índice de retenção calculado; IR<sub>lit</sub>: índice de retenção da literatura; BV<sub>fr</sub> (Bela Vista folhas coletadas durante a frutificação); BO<sub>fr</sub> (Bonito folhas coletadas durante a frutificação); Jd<sub>fr</sub> (Jardim folhas coletadas durante a frutificação); Ddos<sub>fr</sub> (Dourados folhas coletadas durante a frutificação).



**Figura 9** – Principais substâncias identificadas nos óleos essenciais de amostras coletadas em diferentes municípios.

Os principais compostos identificados nos óleos essenciais foram da série cíclica, com presença de hidrocarbonetos, álcoois, éteres, ésteres, epóxidos, aldeídos e cetonas.

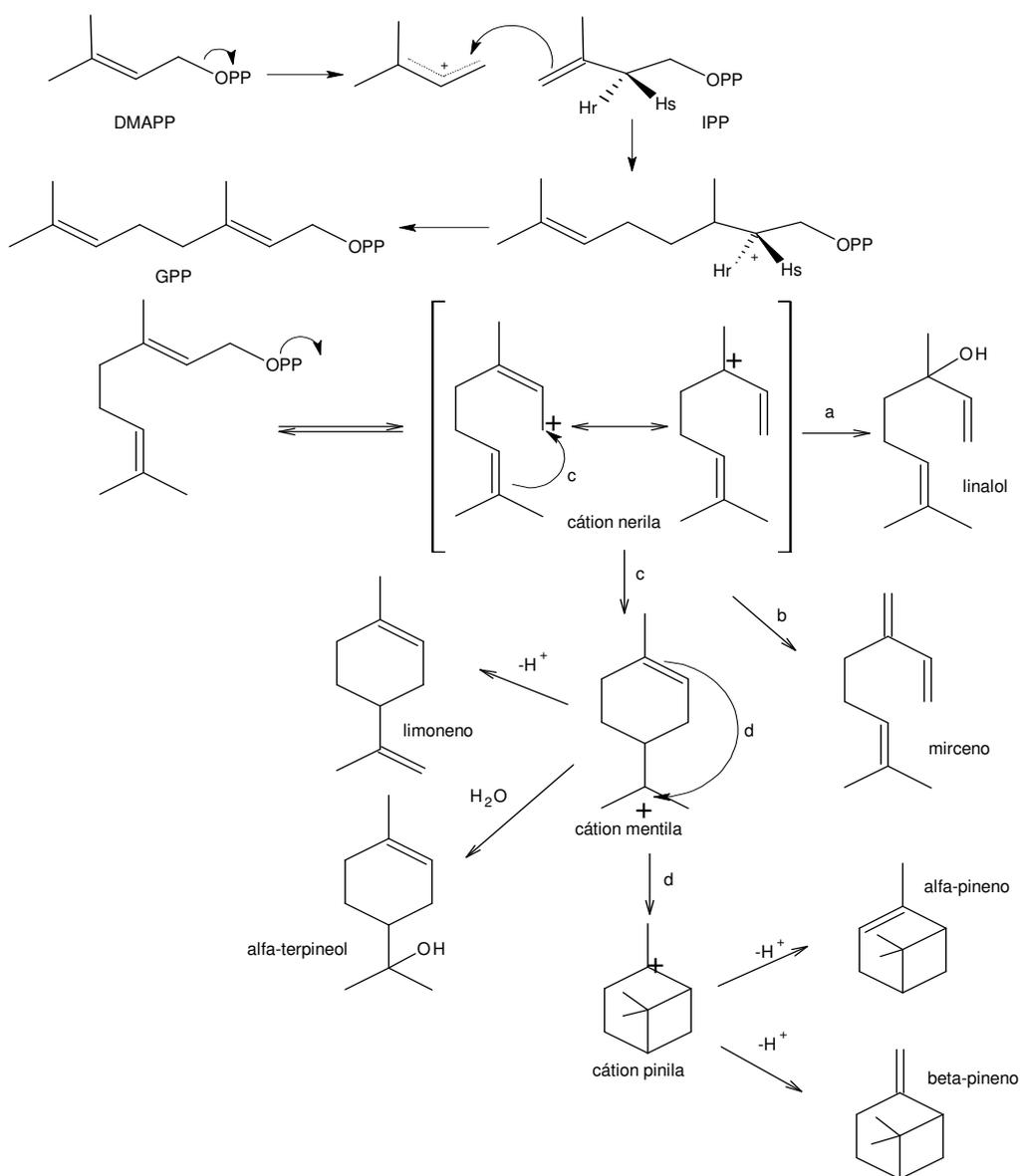
De acordo com DEWICK (2005) e GEISMANN (1969) os terpenos são sintetizados a partir de três unidades de acetil-CoA para formar o ácido mevalônico, onde são envolvidas reações de Claisen, aldol, redução e isomerização para formar uma unidade de isopentil pirofosfato (IPP), a qual isomeriza para formar uma unidade de dimetilalil pirofosfato (DMAPP).

Os monoterpenos são formados através da adição eletrofílica entre uma unidade de DMAPP e IPP para formar geranyl pirofosfato (GPP). O GPP pode ciclizar para formar os monoterpenos cíclicos ou não ciclizar para formar os monoterpenos acíclicos.

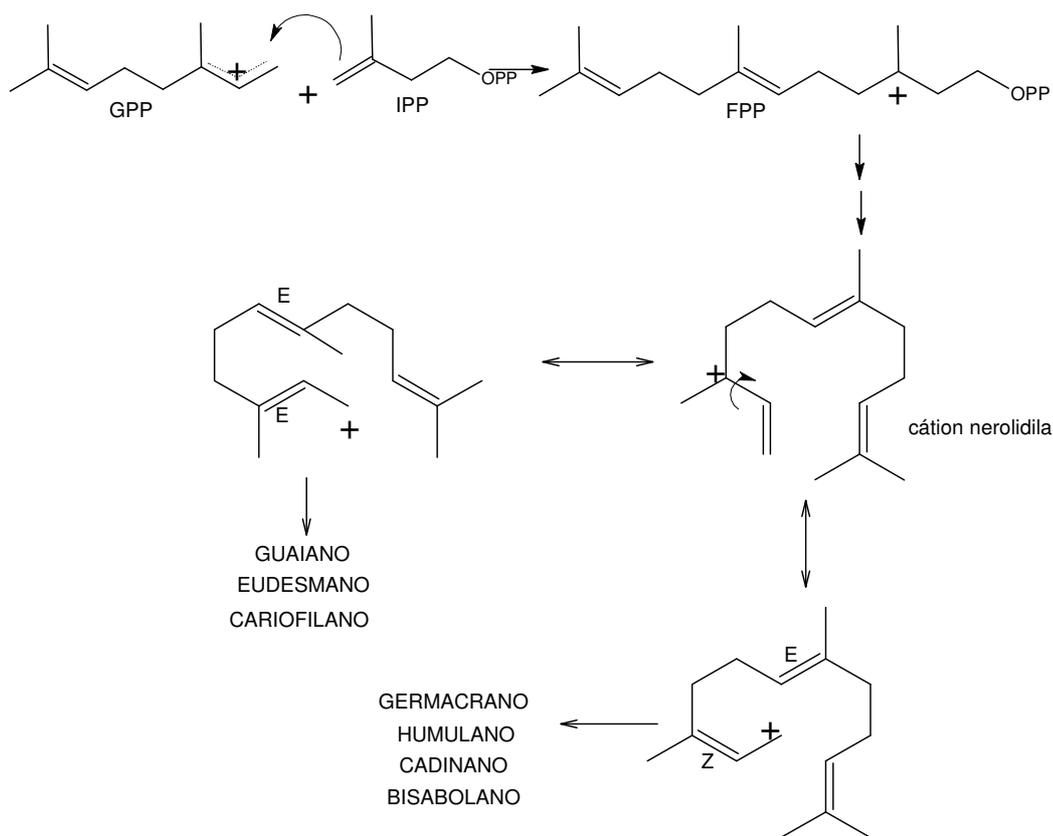
A fig. 10 mostra as principais vias de ciclização observada para os monoterpenos majoritários identificados nos óleos essenciais das folhas de *C. adamantium*, destacando-se os esqueletos do tipo mentano e pinano, bem representados neste trabalho por limoneno e linalool, respectivamente.

Os sesquiterpenos são formados através de uma unidade de GPP e IPP para formar farnesil pirofosfato (FPP), o qual também origina os sesquiterpenos cíclicos ou acíclicos.

A figura 11 mostra as reações propostas para a biossíntese dos sesquiterpenos e os esqueletos formados através da ciclização do FPP. Nos sesquiterpenos caracterizados nos óleos essenciais de *C. adamantium* foram identificados a presença de todos estes esqueletos, principalmente do esqueleto do tipo germacrano representado por biciclogermacreno, germacreno D e globulol.



**Figura 10** – Principais vias de ciclização para a biossíntese de monoterpene de acordo com DEWICK (2005) e GEISMANN (1969).



**Figura 11** – Principais vias de ciclização para a biossíntese de sesquiterpeno de acordo com DEWICK (2005) e GEISMANN (1969).

A diferença entre monoterpenos e sesquiterpenos identificados nas folhas de *C. adamantium* observados neste estudo foi comparada com outros trabalhos do gênero e de outras espécies da família Myrtaceae.

Trabalhos com o óleo essencial de *C. phaea* (ADATI & FERRO, 2006) relataram a presença dos compostos majoritários linalol e óxido de cariofileno, mas em termos de classes de compostos os sesquiterpenos são majoritários. Outro trabalho mostrou que o óleo essencial de *C. xanthocarpa* (MENUT *et al*, 1996) apresentou os sesquiterpenos como compostos majoritários.

Estudos dos óleos essenciais de outros vegetais da família Myrtaceae, como os das espécies do gênero *Calyptranthes*, no qual foram identificados 62 compostos, onde mais do que 90% são sesquiterpenos com esqueleto do tipo cadinano, bisabolano e germacrano (LIMBERGER *et al*, 2002).

Outro gênero analisado foi *Psidium*, onde a caracterização do óleo essencial de

*Psidium cymosum* Urb. revelou a presença dos sesquiterpenos oxigenados como majoritários. Todavia neste mesmo trabalho o óleo essencial de outra espécie analisada *Psidium sartorianum* Niedz forneceu monoterpenos hidrocarbonetos, que se apresentaram como constituintes majoritários (PINO *et al*, 2003).

A partir de estudo com os óleos essenciais dos gêneros *Calypttranthes*, *Campomanesia*, *Eugenia*, *Hexachlamys*, *Marlierea*, *Myrceugenia*, *Myrcia*, *Myrciaria*, *Plinia*, *Paramamyciaria* e *Psidium*, MENUT (1997) atribuiu que a quimiotaxinomia de espécies da família Myrtaceae é referente à presença de sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados, e o tipo de esqueletos desses terpenos estão relacionados com a subtribo onde cada espécie está inserida.

#### 4.1.4. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *C. adamantium* coletada em diferentes estágios fenológicos

As amostras de óleos essenciais **Ddos<sub>fs</sub>**, **Ddos<sub>fl</sub>** e **Ddos<sub>fr</sub>** foram testadas frente a 3 cepas de microorganismos, sendo as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (Hospitalar) e *Staphylococcus aureus* (Hospitalar) e o fungo leveduriforme *Candida albicans* (ATCC 10231), empregando o método ágar de difusão em disco (BRASILEIRO *et al*, 2006).

Este ensaio é um screening para a determinação do halo de inibição de uma amostra frente aos microorganismos, quanto maior o halo de inibição mais ativa é amostra frente a determinado tipo de microorganismo.

A tabela 6 mostra o halo de inibição em mm referente a cada amostra de óleo essencial. Todas as amostras exibiram halo de inibição menor, próximo e maior frente aos microorganismos testados quando comparados com os antibióticos empregados. O óleo essencial das folhas coletadas durante o estágio de floração e frutificação apresentou halo de inibição próximo daquele apresentado pelo do antibiótico padrão para a bactéria *S. aureus* e *P. aeruginosa* e mais ativo o fungo *C. albicans*. O óleo essencial das folhas coletadas durante o estágio vegetativo mostrou moderado halo de inibição para *S. aureus* e *C. albicans* e menor para *P. aeruginosa*.

As diferenças no halo de inibição dos diferentes óleos testados podem estar associadas a diferenças na composição química, pois os óleos essenciais obtidos durante a floração e a frutificação mostraram maior percentual em termos de área relativa dos

monoterpenos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno e linalol, do que o óleo essencial das folhas coletadas durante o estágio vegetativo, o qual mostrou maior quantidade dos sesquiterpenos, tanto em área relativa, como em números de substâncias.

Com base nestes ensaios pode-se sugerir que os monoterpenos são responsáveis pelo aumento do halo de inibição, mas não podemos afirmar qual a substância responsável por essa atividade, pois um efeito de sinergismo pode estar alterando esta resposta, assim como uma substância presente em pequena quantidade que pode ser muito ativa. Todavia as atividades antimicrobianas dos monoterpenos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno e linalol são descritas na literatura e sua atividade biológica está relacionada com a estrutura química, grupo funcional e estereoquímica (HENRIQUES *et al.*, 2006).

A partir destes resultados podemos inferir que os óleos essenciais das folhas de *C. adamantium* com maior área relativa dos monoterpenos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno e linalol apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* e principalmente contra o fungo *C. albicans*.

**Tabela 6.** Atividade antimicrobiana (mm) dos óleos essenciais das folhas de *C. adamantium* coletada em diferentes estágios fenológicos.

Microorganismos	Ddos <sub>fl</sub> *	Ddos <sub>fr</sub> *	Ddos <sub>vg</sub> *	Antibióticos
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,00±0,40	20,00±0,60	16,00±0,20	22,00±0,60 <sup>a</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,00±0,20	10,00±0,00	6,00±0,00	17,40±0,60 <sup>b</sup>
<i>Candida albicans</i>	26,00±0,60	26,00±0,40	16,00±0,20	22,00±0,40 <sup>c</sup>

\*Todas as análises empregaram 40  $\mu$ g de óleo essencial. a: nitrofurantoína (300  $\mu$ g); b: impenen (10  $\mu$ g); c: fluconazol (50  $\mu$ g).

## 4.2. Análises espectrométricas das substâncias **Ca1**, **Ca2**, **Ca3**, **Ca4**, **Ca5**, **Ca6**, **Ca7**, **Ca8**, **Ca9**, **Ca10**, **Ca11**, **Ca12** e **Ca13**.

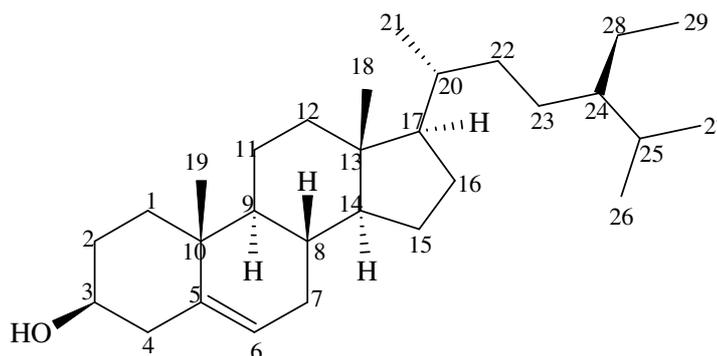
### 4.2.1. Identificação estrutural de **Ca1**

A análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H (fig. 13) da substância **Ca1** (fig. 12) mostrou uma série de sinais na região entre  $\delta$  0,65 a 2,27, além do multipletto em  $\delta$  3,5 correspondente a hidrogênio carbinólico e dubleto em  $\delta$  5,30 característico de hidrogênio olefínico.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (fig. 14, tab. 7) associado ao experimento de DEPT 135°

(fig. 15) mostrou 27 sinais, dos quais 1 sinal corresponde a carbono não ligado a hidrogênio, 8 sinais referentes a carbono metínico, 12 sinais referentes a carbonos metilênicos e 6 sinais referentes a grupos metílicos. Os sinais em  $\delta$  121,7 e 140,8 sugerem carbono de dupla ligação, assim como o sinal em  $\delta$  71,8 sugere a presença de uma hidroxila. Estes sinais são característicos de um esqueleto esteroidal.

Com base nos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com os dados da literatura (SAXENA & ALBERT, 2005) foi possível estabelecer que os sinais acima sejam referentes ao  $\beta$ -sitosterol (fig.12).



**Figura 12** – Estrutura molecular do  $\beta$ -sitosterol (Ca1).

**Tabela 7** – Deslocamento de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de Ca1.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ em $\text{CDCl}_3$	$\delta^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}^*$	Posição	$\delta^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$	$\delta^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}^*$
1	37,3	37,3	16	28,3	28,9
2	31,9	31,6	17	56,1	56,1
3	71,8	71,7	18	19,8	19,4
4	42,3	42,3	19	12,0	11,9
5	140,8	140,8	20	36,2	36,2
6	121,7	121,6	21	19,1	18,8
7	31,9	31,9	22	34,0	34,0
8	29,2	31,9	23	26,1	26,1
9	50,2	50,2	24	45,9	45,9
10	36,2	36,5	25	29,2	29,2
11	21,1	21,1	26	19,8	19,8
12	39,8	39,8	27	19,4	19,1
13	42,3	42,3	28	23,1	23,1
14	56,8	56,8	29	12,0	12,3
15	24,3	24,3			

\*valores obtidos da literatura (SAXENA & ALBERT, 2005).

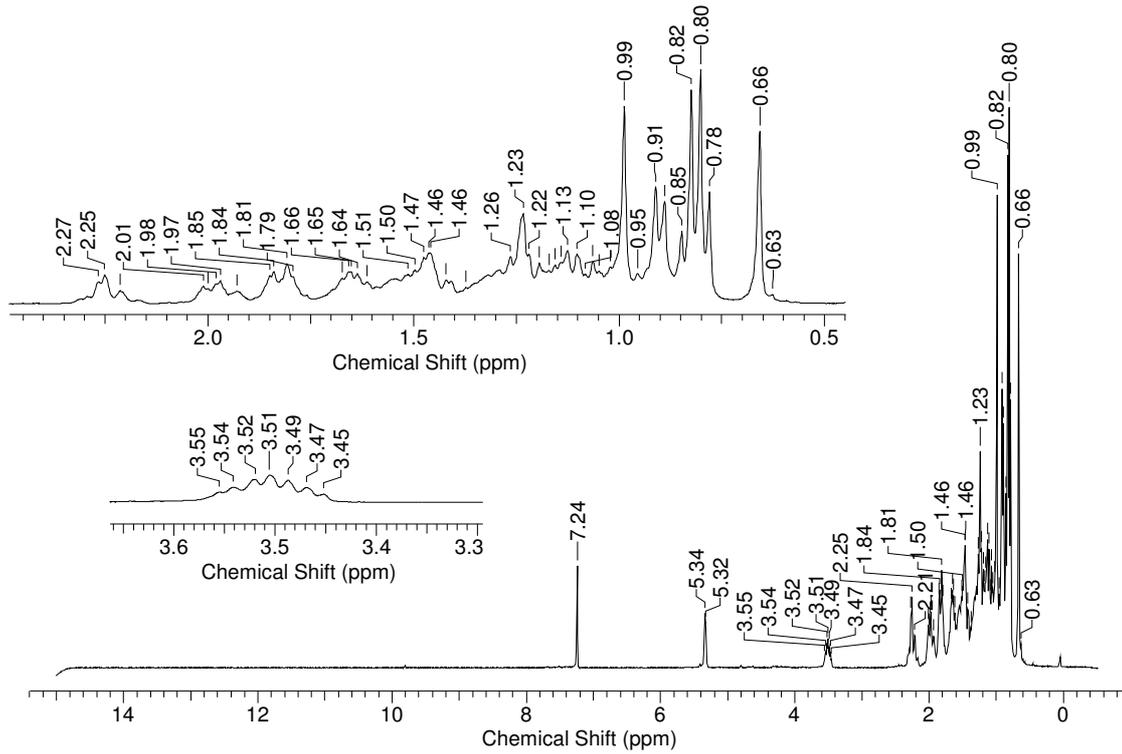


Figura 13 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de Ca1 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ).

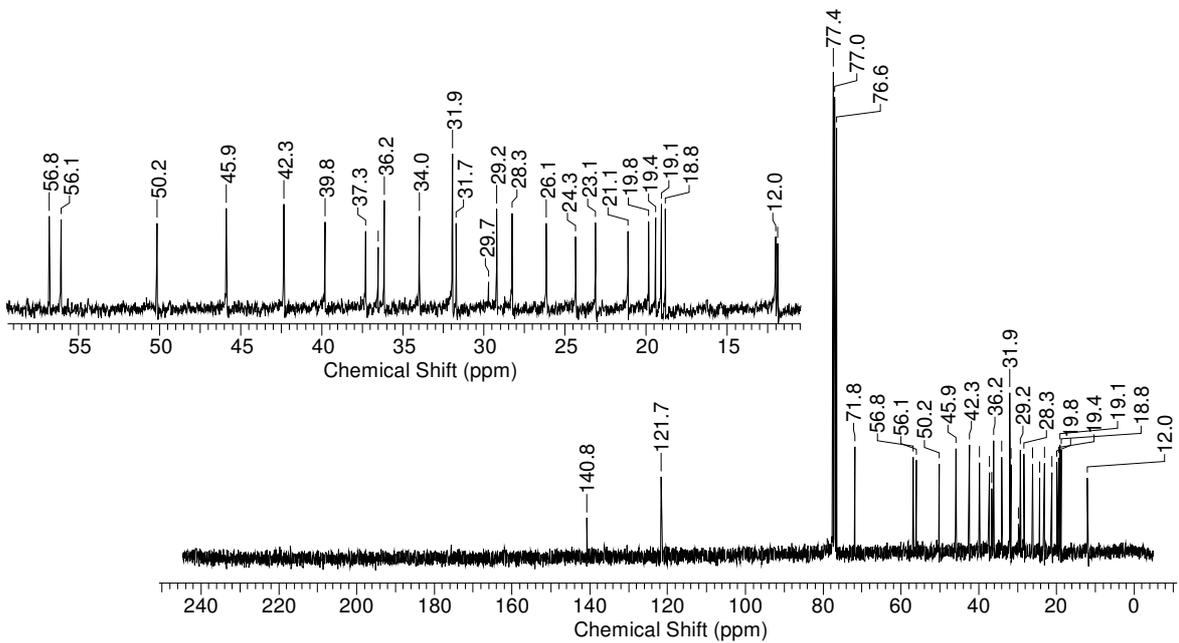
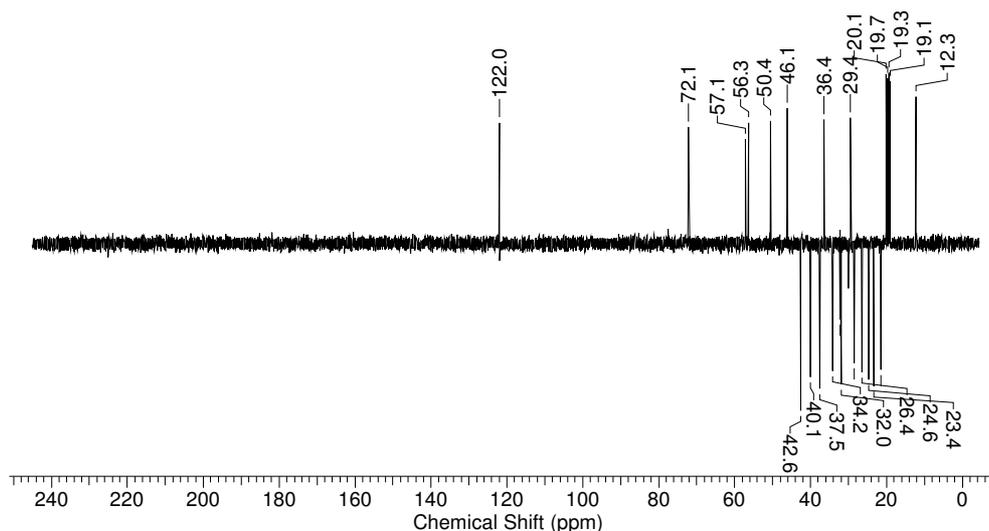


Figura 14 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de Ca1 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ).



**Figura 15** – Espectro de DEPT 135° de **Ca1** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ).

#### 4.2.2. Identificação estrutural de **Ca2**

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (fig. 17, tab. 8) da substância **Ca2** (fig. 16) mostrou padrão de sinais característicos de esqueleto de flavanona na região entre  $\delta$  2,65 e 5,49, com presença de dois duplo dubleto em  $\delta$  2,65 e 2,72 referentes ao H3 na posição equatorial e axial, respectivamente, e um duplo dubleto em  $\delta$  5,49 referente ao H2, todos pertencentes ao anel C. Foram observados os sinais em  $\delta$  7,45 (3-H, *m*) e 7,55 (2-H, *d*) referentes aos hidrogênios aromático do anel B monosubstituído.

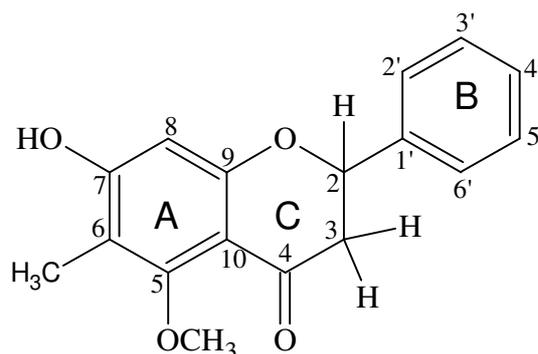
A presença de dois singletos, um em  $\delta$  2,05 com integração para 3 hidrogênios pode ser atribuído a uma metila e o outro em  $\delta$  6,35 (1-H) a um hidrogênio ligado ao anel A. Não foi observado sinal na região de  $\delta$  12,00, sugerindo uma troca de deutério entre solvente e amostra ou então ausência de grupo hidroxila quelada a carbonila na posição 5 do anel A, que são características de flavonóides. Em  $\delta$  3,77 (3-H, *s*) observou-se a presença de uma metoxila.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 18, tab. 8) forneceu sinais de 14 carbonos. Os sinais intensos  $\delta$  em 126,3 e 128,7 na região aromática estão sobrepostos, e são referentes aos carbonos 2'/6' e 3'/5', enquanto o sinal  $\delta$  em 128,5 é referente ao C4', todos pertencendo ao anel B. O sinal observado em  $\delta$  98,7 é referente ao C-8, enquanto que o sinal em  $\delta$  112,5 é referente ao C-6. Esse valor para C6 sugere que esse carbono está substituído por uma metila com  $\delta$  em 7,2 O sinal  $\delta$  em 60,2 sugere a presença de uma metoxila ligada ao C-5, o

qual possui deslocamento de  $\delta$  em 187,6.

O espectro de DEPT 135° (fig. 19) forneceu apenas um sinal em  $\delta$  45,5 referente ao CH<sub>2</sub> do C3. Sinais de carbonos de CH em  $\delta$  79,1 (C2), 98,7 (C8), 126,6 (C2'/6') e 126,8 (C3'/5'), e sinais de carbonos da metila em  $\delta$  7,5 e da metoxila em  $\delta$  60,2.

Com base nos sinais fornecidos pelos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT 135° e comparação com dados da literatura (Agrawal, 1989) foi possível atribuir os sinais destes espectros à estrutura denominada de **Ca2**: 6-metil-7-hidróxi-5-metóxi-flavanona (fig.16).



**Figura 16** – Estrutura molecular de 6-metil-7-hidróxi-5-metóxi-flavanona (**Ca2**).

**Tabela 8** – Deslocamento de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de **Ca2**.

Posição	$\delta$ <sup>1</sup> H em C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O J (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C em C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O	$\delta$ de <sup>13</sup> C em CDCl <sub>3</sub> *
2	5,49 <i>dd</i> (J= 3,00 e 9,00)	78,8	78,2
3 <sub>ax</sub>	2,97 <i>dd</i> (J= 3,00 e 15,00)	45,5	45,1
3 <sub>aq</sub>	2,69 <i>dd</i> (J= 3,00 e 18,00)	45,5	45,1
4	-	187,6	187,2
5	-	160,1	159,6
6	-	112,5	112,3
7	-	162,1	161,7
8	6,35 <i>s</i>	98,7	98,7
9	-	162,5	163,0
10	-	106,8	107,8
1'	-	139,7	139,3
2'	7,55 <i>d</i> (J= 6,00)	126,3	126,5
3'	7,40 <i>m</i>	128,7	128,6
4'	7,40 <i>m</i>	128,5	128,4
5'	7,40 <i>m</i>	128,7	128,6
6'	7,55 <i>d</i> (J= 6,00)	126,3	126,5
CH <sub>3</sub>	2,05 <i>s</i>	7,2	7,9
OCH <sub>3</sub>	3,77 <i>s</i>	60,2	60,5

\*valores obtidos da literatura (AGRAWAL, 1989).

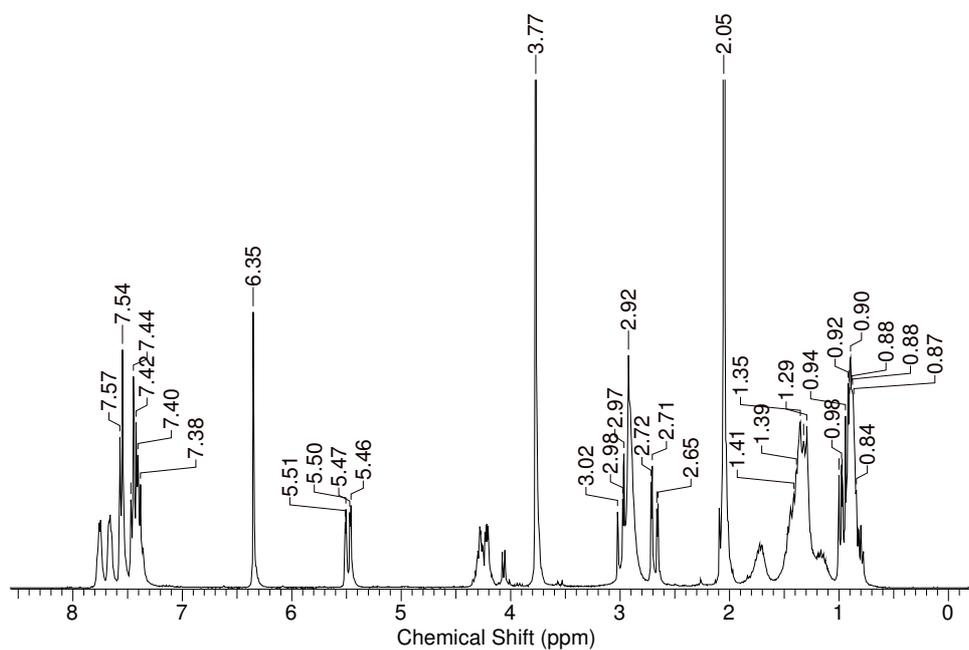


Figura 17 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de  $\text{Ca}_2$  (300 MHz,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ ).

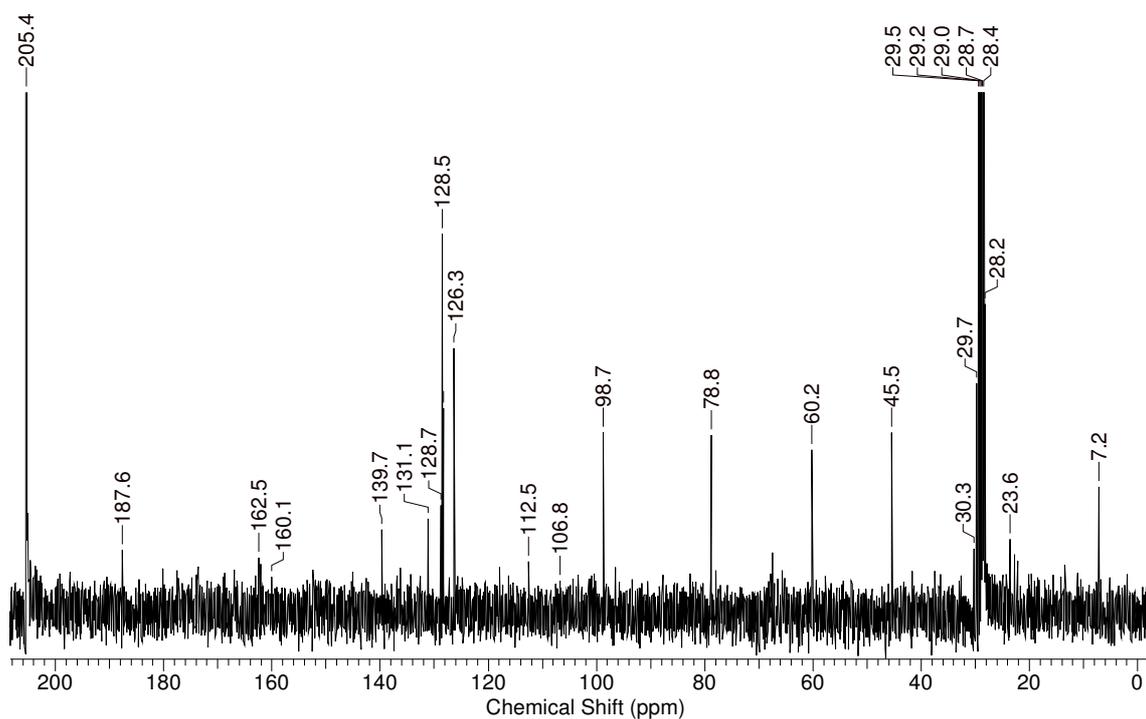
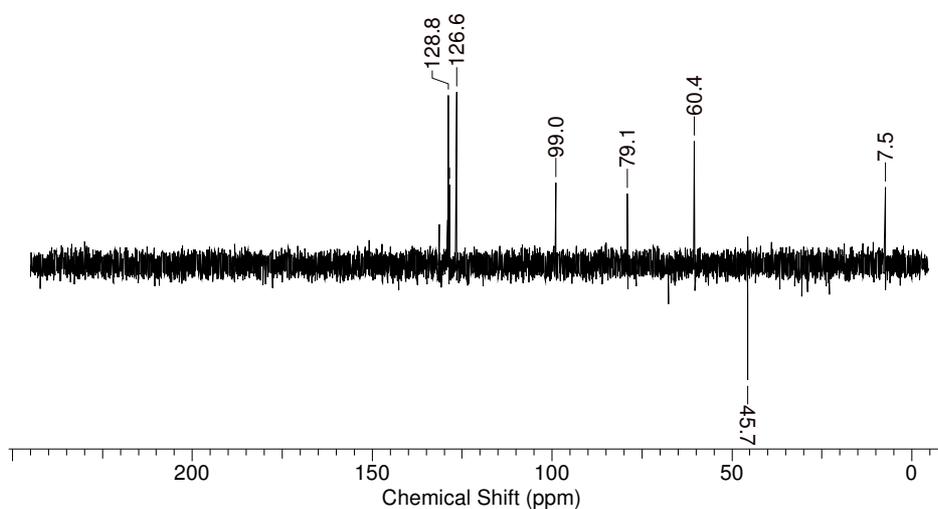


Figura 18 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de  $\text{Ca}_2$  (75 MHz,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ ).



**Figura 19** – Espectro de DEPT 135° de **Ca2** (75 MHz, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O,  $\delta$ ).

#### 4.2.3. Identificação estrutural de **Ca3**

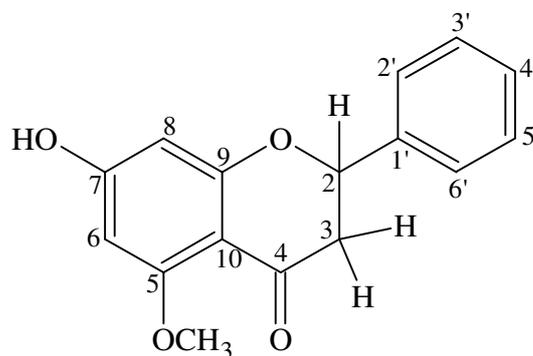
Os espectros de RMN <sup>1</sup>H (fig. 21, tab. 9) e RMN <sup>13</sup>C (fig. 22, tab.9) da substância **Ca3** (fig. 20) apresentou o mesmo padrão de sinais do anel B e C do esqueleto de uma flavanona, como descrito para **Ca2**, mas com multiplicidade diferentes para o anel A.

A presença de dois dubletos em  $\delta$  6,08 e 6,13 sugere a presença de dois hidrogênios ligados aos C6 e C8, respectivamente, enquanto o singlete em  $\delta$  3,78 sugere a presença de uma metoxila no C5 no anel A, devido a ausência do sinal de hidroxila quelada a carbonila.

Os sinais de RMN <sup>13</sup>C observado a  $\delta$  95,8 e 93,3 são referentes aos carbonos C6 e C8, respectivamente. O sinal a  $\delta$  55,2 confirma a presença de uma metoxila no anel A.

O espectro de DEPT 135° (fig. 23) forneceu apenas um sinal referente a carbono CH<sub>2</sub> em  $\delta$  45,8 devido ao C3. Outros sinais de carbonos de CH em  $\delta$  79,1 foram atribuídos para C2,  $\delta$  93,5(C-8),  $\delta$  96,0 (C-6),  $\delta$  126,5 para C2'/6' e  $\delta$  128,8 para C3'/5'.

Com base nos sinais fornecidos pelos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT 135° e comparação com dados da literatura (Agrawal, 1989) foi possível atribuir os sinais destes espectros. Essa estrutura foi denominada de **Ca3**: 7-hidróxi-5-metóxi-flavanona (fig.20).



**Figura 20** – Estrutura molecular de 7-hidróxi-5-metóxi-flavanona (**Ca3**).

**Tabela 9** – Deslocamento de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **Ca3**.

Posição	$\delta$ de $^1\text{H}$ em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ e $J$ (Hz)	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{CDCl}_3$ *
2	5,45 <i>dd</i> ( $J=2,40$ )	78,8	78,1
3 <sub>ax</sub>	2,92 <i>dd</i> ( $J=3,00$ )	45,5	45,0
3 <sub>aq</sub>	2,64 <i>dd</i> ( $J=3,00$ )	45,5	45,0
4	-	186,9	187,4
5	-	164,2	164,1
6	6,08 <i>d</i> ( $J=1,80$ )	95,8	95,8
7	-	164,6	164,4
8	6,13 <i>d</i> ( $J=1,80$ )	93,3	93,5
9	-	162,8	162,2
10	-	105,2	104,6
1'	-	139,7	139,2
2'	7,52 <i>dd</i> ( $J=9$ )	126,3	126,4
3'	7,40 <i>m</i>	128,5	128,5
4'	7,40 <i>m</i>	128,3	128,3
5'	7,40 <i>m</i>	128,5	128,5
6'	7,52 <i>dd</i> ( $J=9$ )	126,3	126,4
OCH <sub>3</sub>	3,78 <i>s</i>	55,2	-

\*valores obtidos da literatura (Agrawal, 1989).

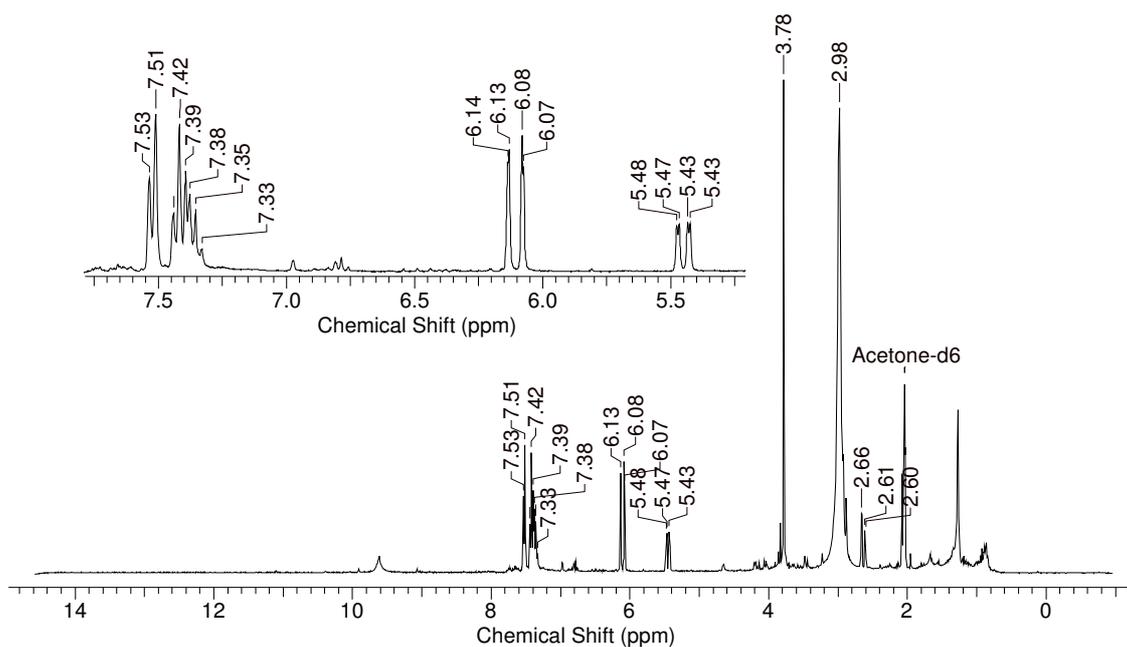


Figura 21 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Ca3** (300 MHz,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ ).

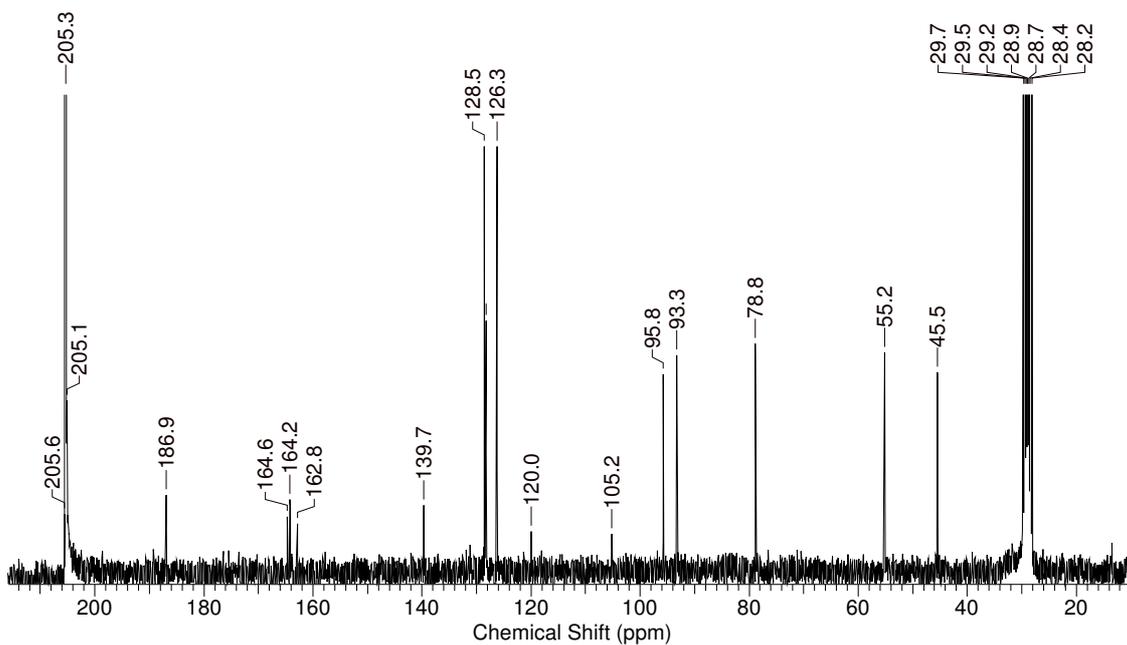
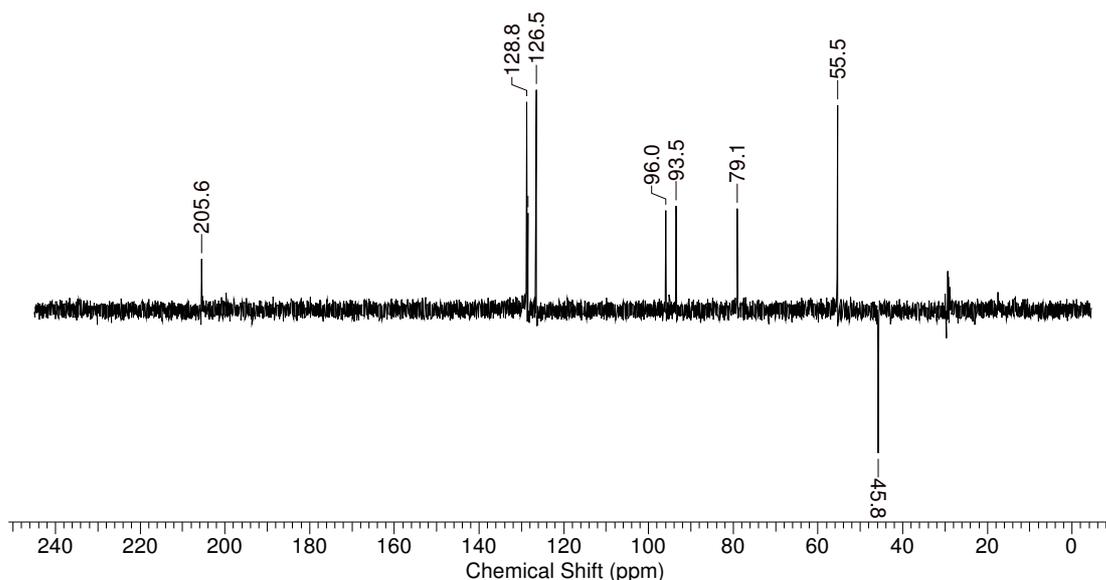


Figura 22 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **Ca3** (75 MHz,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ ).



**Figura 23** – Espectro de DEPT 135 de **Ca3** (75 MHz,  $C_3D_6O$ ,  $\delta$ ).

#### 4.2.4. Identificação estrutural de **Ca4**

A análise do espectro de RMN  $^1H$  (fig. 25, tab. 10) da substância **Ca4** (fig. 24) revelou a presença de duas substâncias em mistura. Isto foi observado devido às diferenças nos padrões de acoplamentos e intensidades dos sinais.

Para os picos majoritários, observou-se um padrão de sinais característicos do anel C e B de flavanona, como observado para **Ca2**. Enquanto dois singletos intenso em  $\delta$  2,00 e 2,01 indicou a presença de dois grupamentos metila no anel A, sugerindo que este seja pentasubstituído.

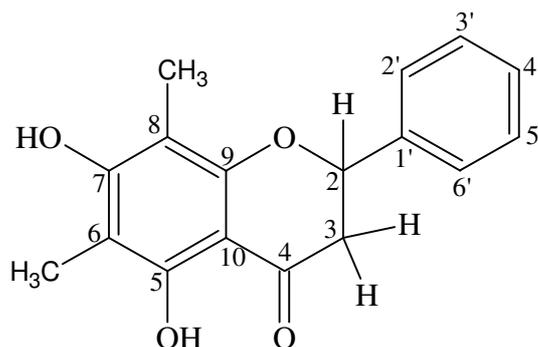
A figura 26 mostra os sinais do espectro de RMN  $^1H$  em mistura, e a região ampliada é referente somente aos sinais da flavanona.

O espectro de RMN  $^{13}C$  (fig. 26, tab. 10) forneceu sinais intensos na região entre  $\delta$  126,0 e 130,0 indicando a presença de anel aromático monosubstituído referentes ao anel B da flavanona. Destacam-se os sinais em  $\delta$  126,8, 129,2 e 129,4 referentes aos carbonos  $C2'/C6'$ ,  $C4'$  e  $C3'/C5'$ , respectivamente.

A análise do experimento gHSQC (fig. 27), mostrou correlação direta dos sinais de hidrogênio em  $\delta$  2,77 e 3,00 com o carbono em  $\delta$  44,0 e o sinal a  $\delta$  5,39 com  $\delta$  79,6, confirmando ser a molécula uma flavanona.

Neste mesmo experimento *g*HSQC observou-se a correlação do hidrogênio em  $\delta$  2,00 e 2,01 com os carbonos em  $\delta$  8,1 e 7,4. Os sinais da metila no espectro de *g*HMBC (fig. 28) também mostraram correlações com os carbonos do anel A indicando que a metila em  $\delta$  2,00 está ligada ao carbono em  $\delta$  8,1 e a metila a  $\delta$  2,01 está ligada ao carbono em  $\delta$  7,4.

Com base nestes dados de RMN fornecidos através de técnicas 1D e 2D e comparação com os dados da literatura (Agrawal, 1989) foi possível estabelecer que os sinais acima são referentes a uma flavanona **Ca4**, denominada de 5,7-diidroxi-6,8-dimetilflavanona (fig. 24), a qual foi previamente isolada de *Ceratiola ericoides*-Empretaceae (TANRISEVER *et al*, 1987) e *Agonis spathulata*-Myrtaceae (CANNON & MARTIN, 1977).

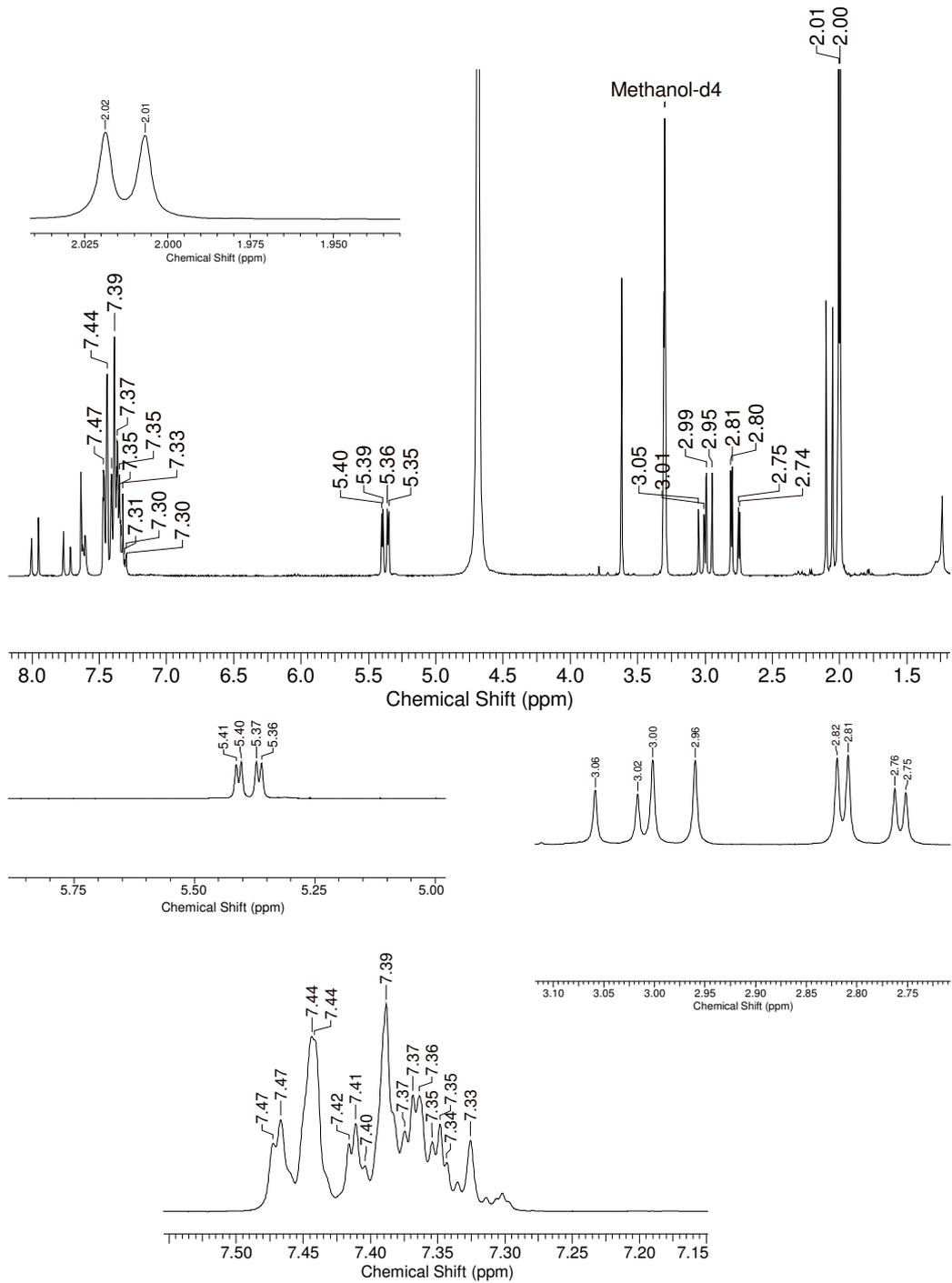


**Figura 24** – Estrutura molecular de 5,7-diidroxi-6,8-dimetilflavanona (**Ca4**).

**Tabela 10** – Deslocamento de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  acoplamento a longa distância (gHMBC) de Ca4.

Posição	$\delta$ de $^1\text{H}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$ e $J$ (Hz)	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$	gHMBC ( $\delta$ )	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{CDCl}_3$ *
2	5,39 <i>dd</i> ( $J= 3,12$ )	79,6	197,5; 140,2; 126,8	79,3
3 <sub>ax</sub>	3,00 <i>dd</i> ( $J= 3, 15$ )	44,0	197,5; 140,2; 79,6	43,5
3 <sub>aq</sub>	2,77 <i>dd</i> ( $J= 3, 15$ )	44,0	197,5; 104,1; 140,2	43,5
4	-	197,5	-	196,9
5	-	163,9	-	162,4
6	-	104,8	-	103,0
7	-	158,7	-	160,0
8	-	104,1	-	102,9
9	-	159,9	-	158,3
10	-	103,1	-	104,0
1'	-	140,2	-	140,5
2'	7,46 <i>dd</i> ( $J= 9$ )	126,8	140,2; 129,2	126,6
3'	7,35 <i>m</i>	129,4	129,2; 126,8	129,2
4'	7,35 <i>m</i>	129,2	126,8; 129,4; 140,2	128,8
5'	7,35 <i>m</i>	129,4	129,2; 126,8	129,2
6'	7,46 <i>dd</i> ( $J= 9$ )	126,8	140,2; 129,2	126,6
CH <sub>3</sub> (6)	2,00 <i>s</i>	8,1	159,9;104,1	-
CH <sub>3</sub> (8)	2,01 <i>s</i>	7,4	158,7; 104,8; 163,9	-
OH (5)	12,42 <i>s</i>	-	-	-

\*valores obtidos da literatura (Agrawal, 1989).



**Figura 25** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Ca4** (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ).

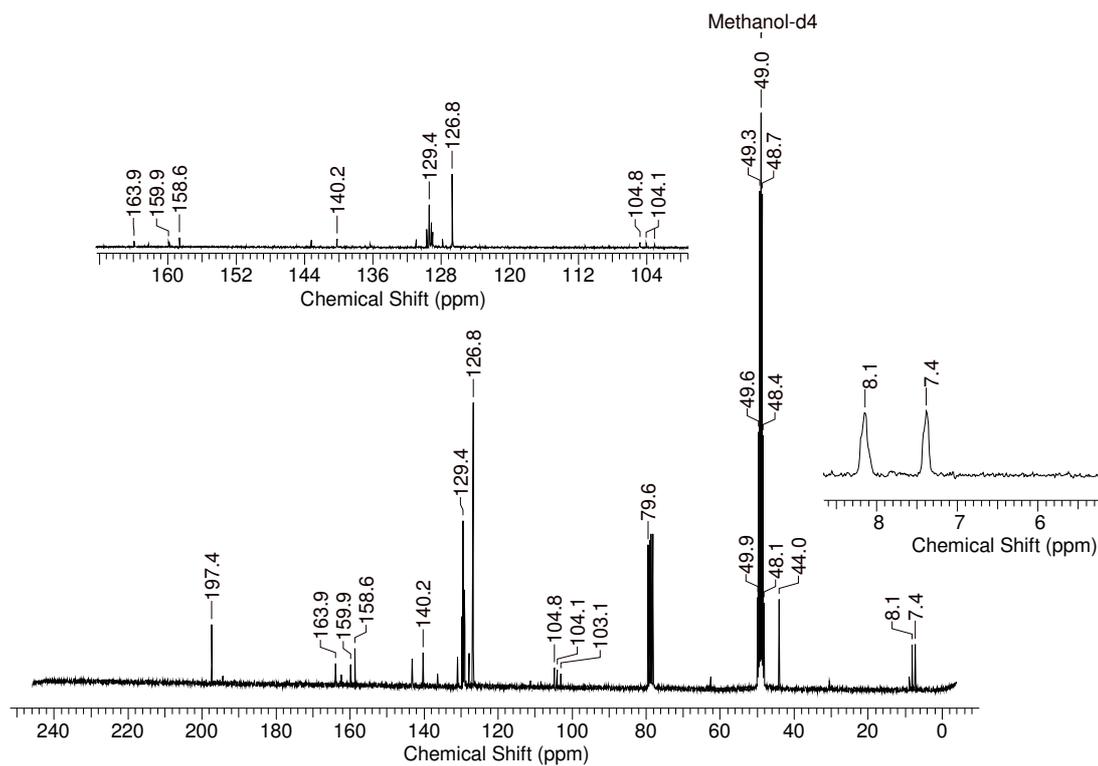


Figura 26 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de Ca4 (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ).

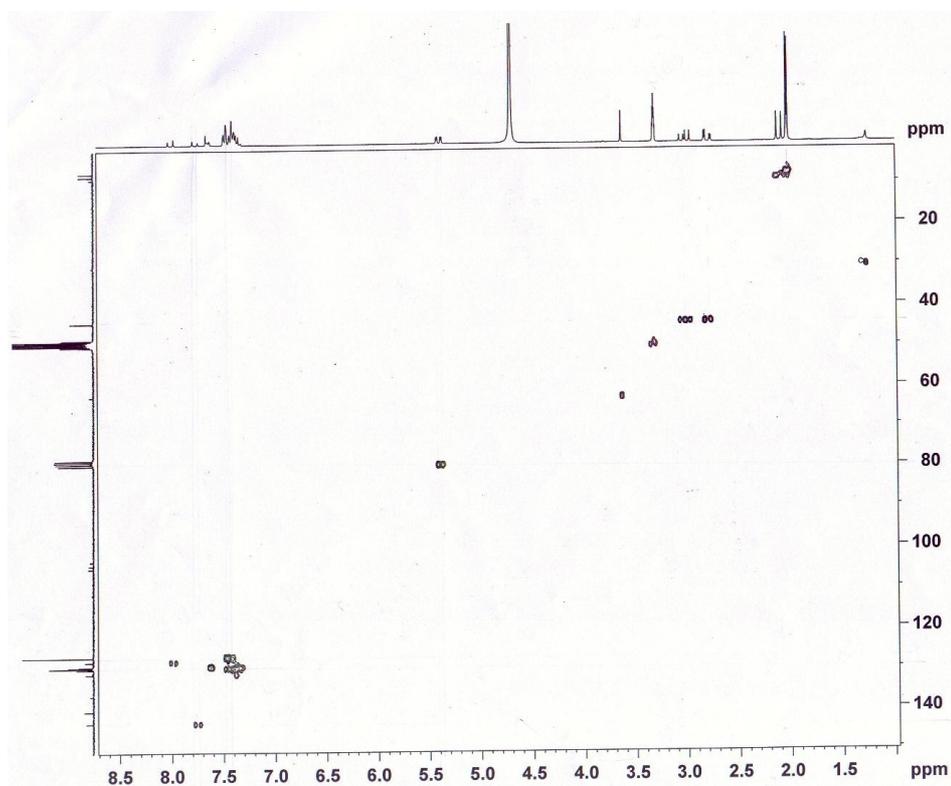
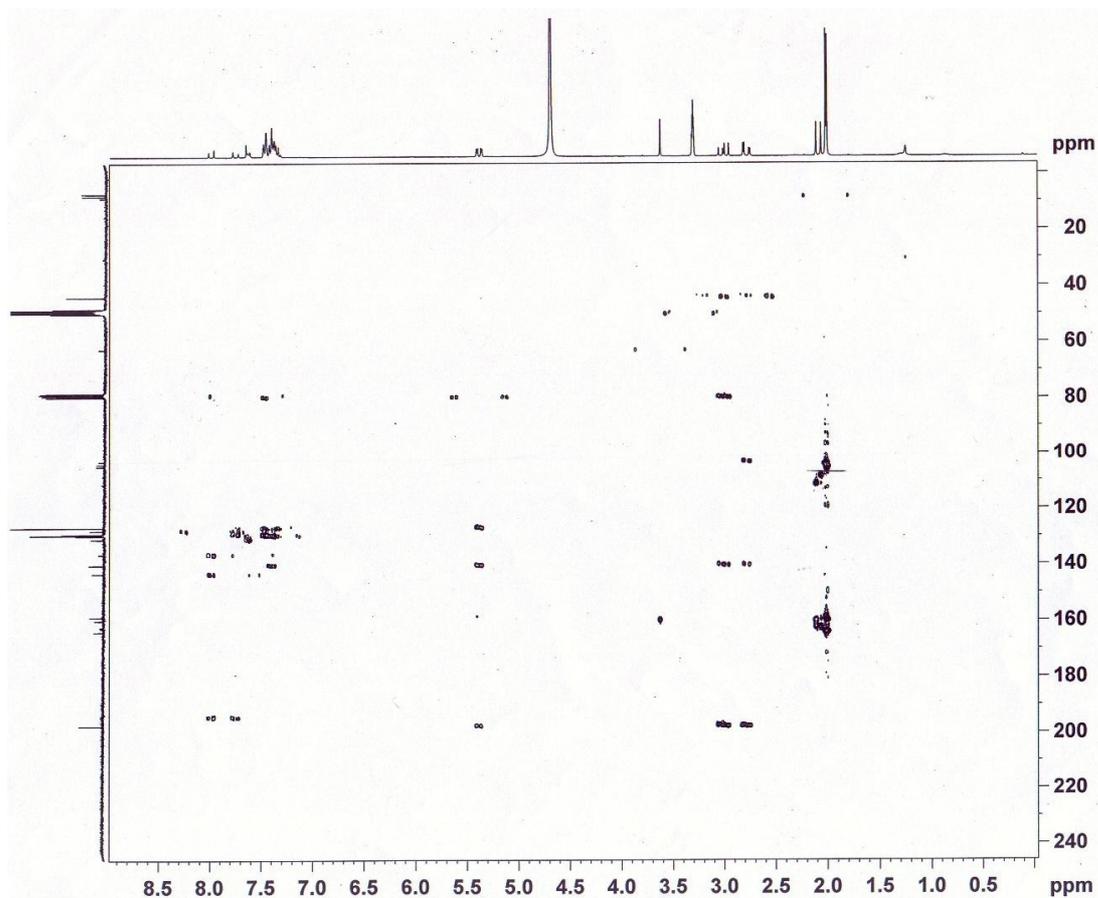


Figura 27 – Experimento de gHSQC de Ca4 (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ).



**Figura 28** – Experimento de gHMBC de **Ca4** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ).

#### 4.2.5. Identificação estrutural de **Ca5**

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (fig. 30, tab. 11) e RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 31, tab. 11) da substância **Ca5** (fig. 29) apresentou os mesmos sinais característicos do esqueleto de flavanona para os anéis B e C, como descrito anteriormente.

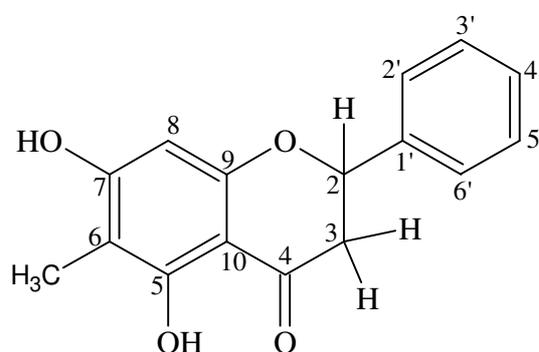
Diferente do observado para a substância **Ca4**, o espectro apresentou somente um sinal de metila em  $\delta$  1,97 (3-H, *s*), sugerindo que deva estar no anel A da flavanona. O deslocamento em  $\delta$  12,42 (1-H, *s*) sugere a presença de uma hidroxila na posição 5 quelada a carbonila (C4).

Em relação ao espectro RMN  $^{13}\text{C}$  o sinal observado a  $\delta$  95,2 e 104,9 é referente ao carbono C8 e C6, respectivamente.

O espectro de DEPT 135 $^\circ$  (fig. 32) forneceu apenas um sinal referente ao carbono

CH<sub>2</sub> em  $\delta$  43,8 referente ao C3, outros sinais de carbonos de CH em  $\delta$  79,92 (C2), 95,21(C2), 127,3 (C2'/6') e 129,5 (C3'/5') e de um CH<sub>3</sub> em  $\delta$  7,0.

Com base nos sinais fornecidos pelos espectros de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT 135° e comparação com dados da literatura (Agrawal, 1989) foi possível estabelecer que a molécula **Ca5** é a 5,7-diidróxi-6-metilflavanona (fig. 32), e foi previamente isolada de *Pinus strobus*-Pinacea e *Kunzea ambigua*-Myrtaceae (HIDEYUKI *et al*, 2004) e caracterizada a sua via biossintética a partir dos trabalhos com *Pinus strobus* (SCHRÖDER *et al*, 1998).



**Figura 29** – Estrutura molecular de 5,7-diidróxi-6-metilflavanona (**Ca5**).

Tabela 11 – Deslocamento de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de Ca5.

Posição	$\delta$ de $^1\text{H}$ em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ e $J$ (Hz)	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{CDCl}_3$ *
2	5,53 <i>dd</i> ( $J= 3,12$ )	79,9	78,4
3 <sub>ax</sub>	3,14 <i>dd</i> ( $J= 3, 15$ )	43,8	42,3
3 <sub>aq</sub>	2,79 <i>dd</i> ( $J= 3, 15$ )	43,8	42,3
4	-	196,9	196,0
5	-	162,5	161,0
6	-	104,9	103,6
7	-	165,1	164,7
8	6,07 <i>s</i>	95,2	94,4
9	-	161,6	160,3
10	-	103,0	101,7
1'	-	140,2	139,0
2'	7,56 <i>dd</i> ( $J= 9$ )	127,3	126,6
3'	7,41 <i>m</i>	129,5	128,6
4'	7,41 <i>m</i>	129,3	128,6
5'	7,41 <i>m</i>	129,5	128,6
6'	7,56 <i>dd</i> ( $J= 9$ )	127,3	126,6
CH <sub>3</sub>	1,97 <i>s</i>	7,0	-
OH (5)	12,42 <i>s</i>	-	-

\*valores obtidos da literatura (Agrawal, 1989)

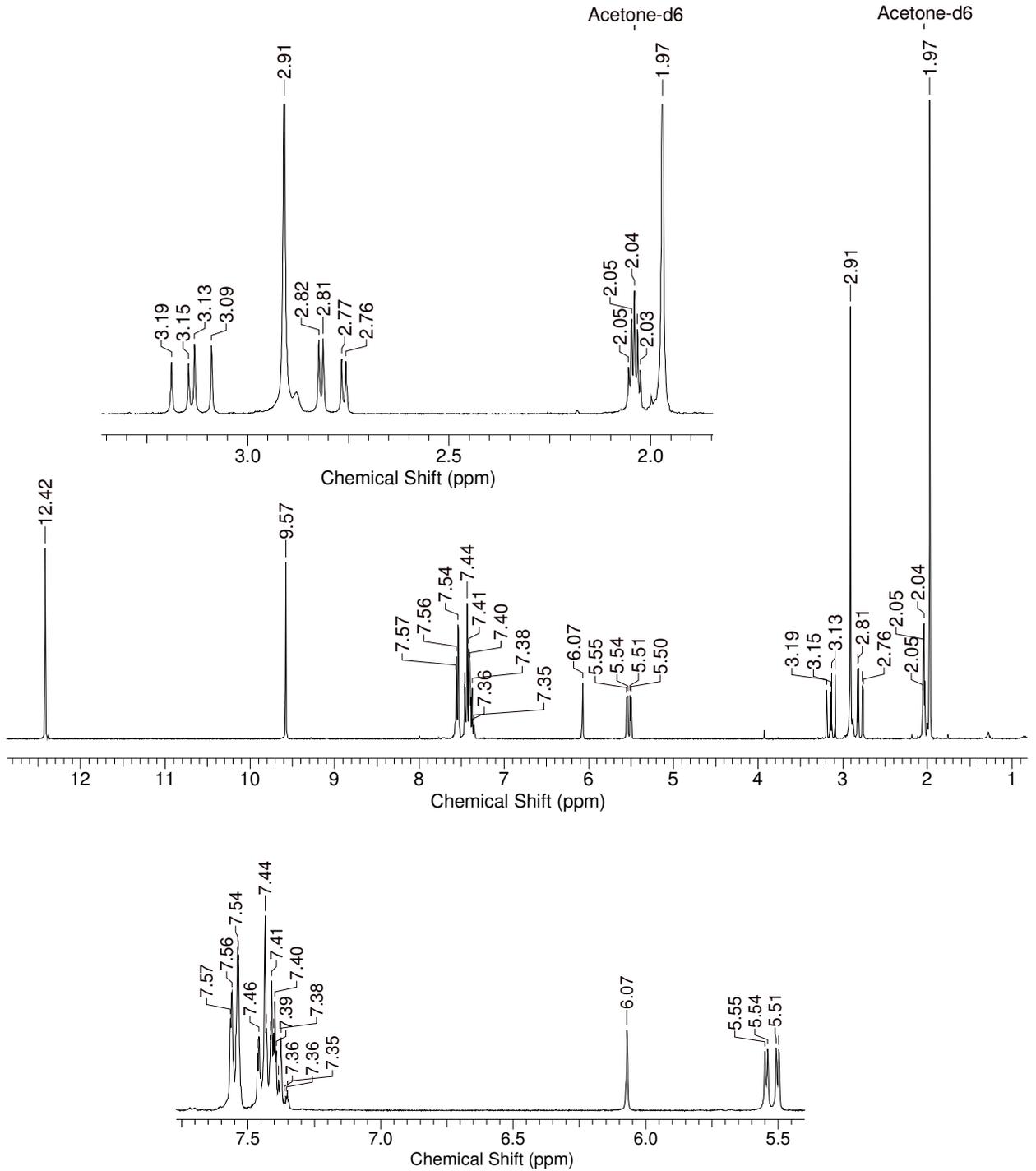


Figura 30 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de Ca5 (300 MHz, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O, δ)

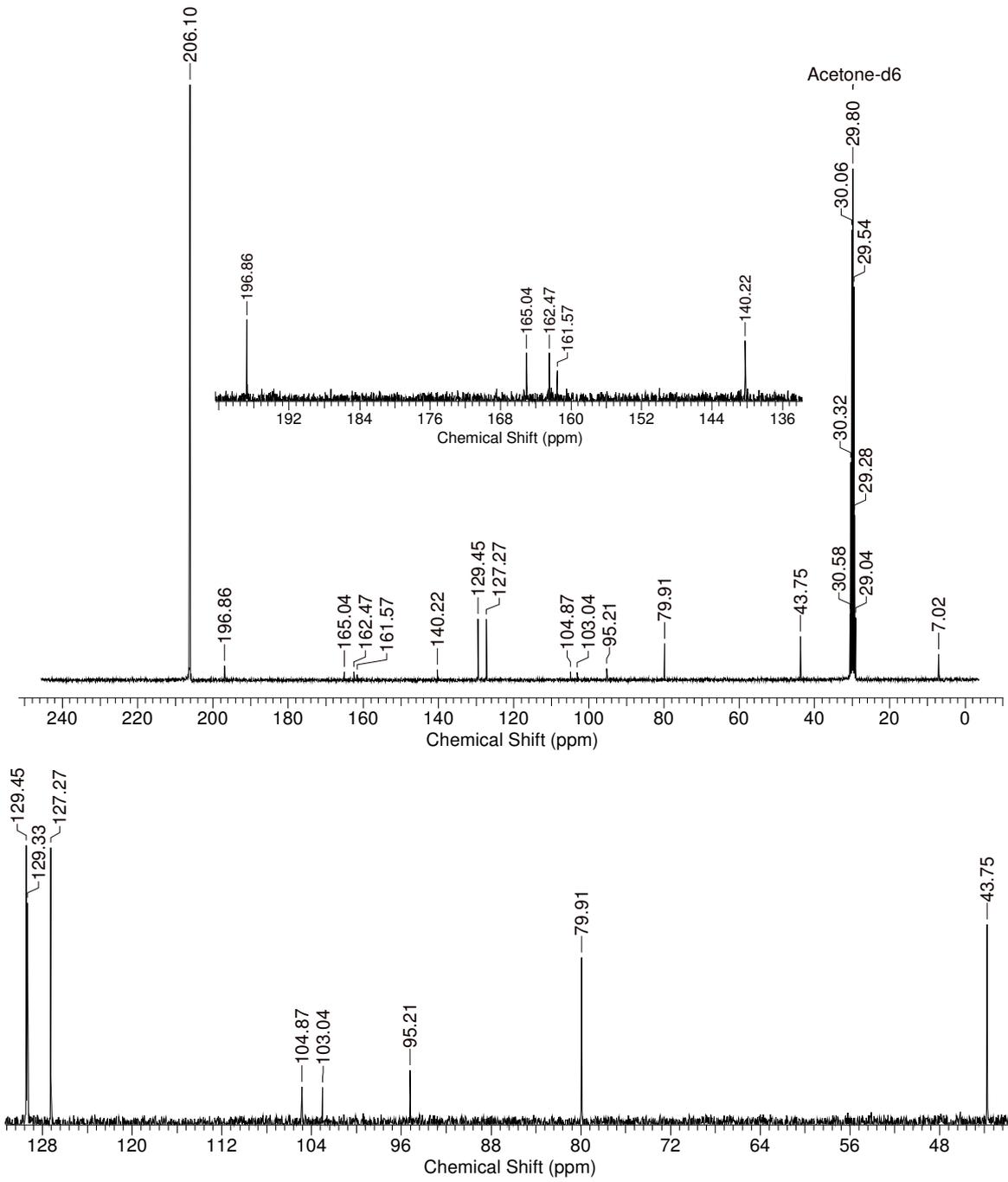
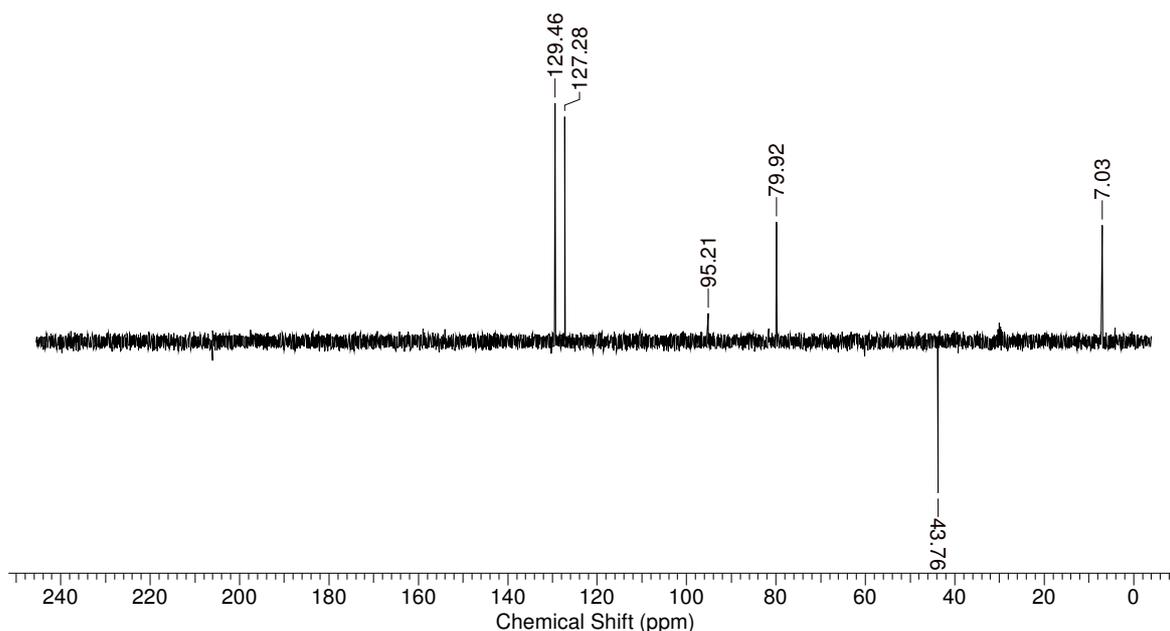


Figura 31 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **Ca5** (75 MHz,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ )

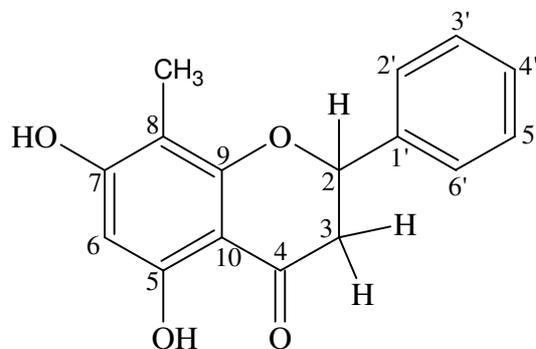


**Figura 32** – Espectro de DEPT 135° de **Ca5** (75 MHz, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O,  $\delta$ )

#### 4.2.6. Identificação estrutural de **Ca6**

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H (fig. 34, tab. 12) e RMN <sup>13</sup>C (fig. 35, tab. 12) da substância **Ca6** (fig. 33) mostrou padrão de sinais semelhante a **Ca5**. A análise do espectro de RMN <sup>13</sup>C de **Ca6** e comparação com o espectro de RMN <sup>13</sup>C de **Ca5**, foi possível observar a diferença no sinal a  $\delta$  6,2 referente a metila (3-H, *s*) ligada ao anel A, enquanto que para **Ca5** esta metila mostrou  $\delta$  7,0 no mesmo solvente. Em relação ao deslocamento do C6 e C8 para **Ca5** foi de  $\delta$  104,9 e 95,2, respectivamente, para **Ca6** foram encontrados os valores a  $\delta$  94,3 e 104,0. Estes dados sugeriram que a **Ca6** possui o mesmo padrão de substituição da **Ca5**, mas com a metila ligada no C8.

Com base nos sinais fornecidos pelos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e comparação com dados da literatura (AGRAWAL, 1989) foi possível estabelecer que a molécula **Ca6** é a 5,7-diidróxi-8-metilflavanona (fig. 33), a qual foi isolada e estudada do ponto de vista de biossíntese em *Pinus strobus*-Pinacea (SCHRÖDER *et al*, 1998).

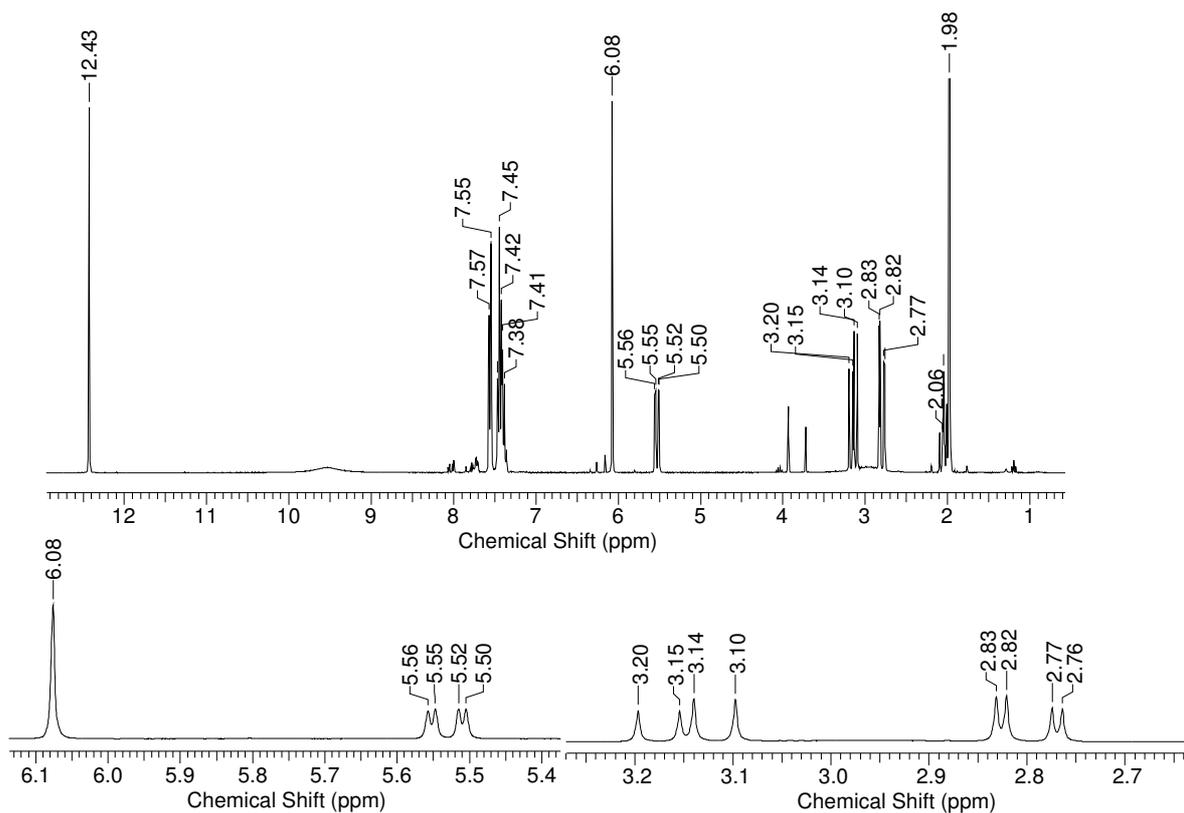


**Figura 33** – Estrutura molecular de 5,7-di-hidróxi-8-metilflavanona (**Ca6**).

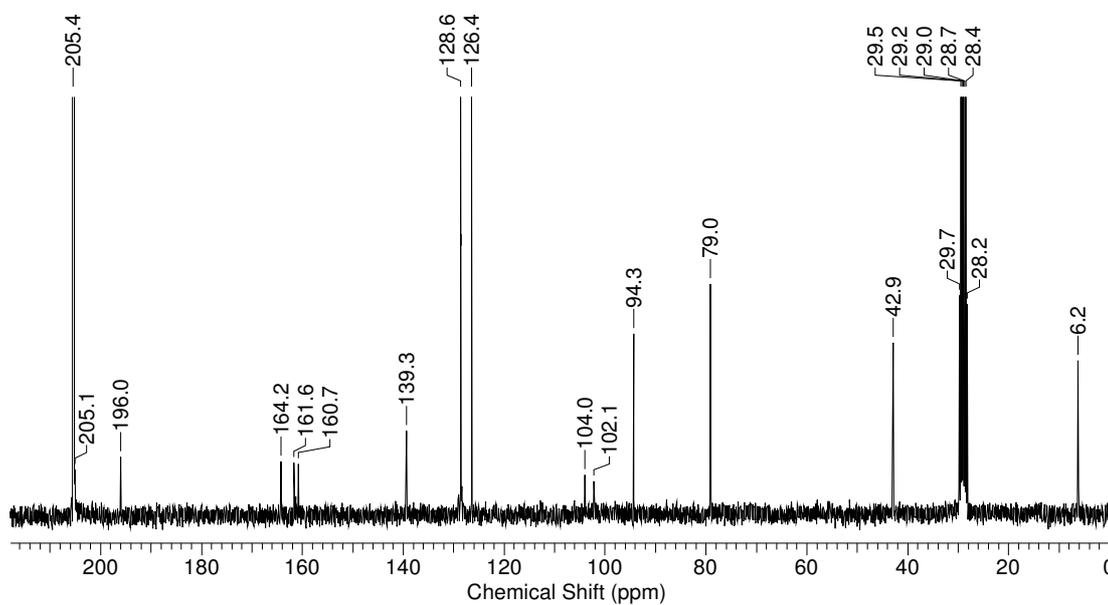
**Tabela 12** – Deslocamento de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **Ca6**.

Posição	$\delta$ de $^1\text{H}$ em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ e $J$ (Hz)	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{CDCl}_3^*$
2	5,53 <i>dd</i> ( $J= 3,12$ )	79,0	77,9
3 <sub>ax</sub>	3,15 <i>dd</i> ( $J= 3, 15$ )	42,9	41,9
3 <sub>aq</sub>	2,80 <i>dd</i> ( $J= 3, 15$ )	42,9	41,9
4	-	196,0	196,1
5	-	161,6	160,9
6	6,08 <i>s</i>	94,3	95,2
7	-	164,2	164,6
8	-	104,0	102,6
9	-	160,7	159,2
10	-	102,1	101,7
1'	-	139,3	139,0
2'	7,56 <i>dd</i> ( $J= 9$ )	126,4	126,2
3'	7,43 <i>m</i>	128,5	128,5
4'	7,43 <i>m</i>	128,5	128,2
5'	7,43 <i>m</i>	128,5	128,5
6'	7,56 <i>dd</i> ( $J= 9$ )	126,4	126,2
CH <sub>3</sub>	2,00 <i>s</i>	6,2	-

\*valores obtidos da literatura (Agrawal, 1989)



**Figura 34** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de Ca6 (300 MHz,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ )



**Figura 35** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de Ca6 (75 MHz,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ )

#### 4.2.7. Identificação estrutural de **Ca7**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (fig. 37, tab. 13) de **Ca7** (fig. 36) mostrou a presença de dois dubletos correspondentes a uma ligação dupla *trans* em  $\delta$  7,86 (1-H,  $J= 15$  Hz) e em  $\delta$  7,99 (1-H,  $J= 15$  Hz), um multiplete em  $\delta$  7,41 (3-H) e dublo dubleto  $\delta$  7,64 (2-H), estes sinais são indicativos da presença de um grupamento cinamoil com anel aromático monosubstituído. Assim como o singlete a  $\delta$  13,27 (1-H) sugere uma hidroxila quelada a carbonila do grupo cinamoil. Esses valores sugerem que a molécula seja um flavonóide da classe das chalconas.

Os sinais de uma metoxila em  $\delta$  3,68 (2-H, *s*), uma metila em  $\delta$  2,11 (3-H, *s*) e um hidrogênio em  $\delta$  6,23 (1-H, *s*) são referentes ao anel A da chalcona.

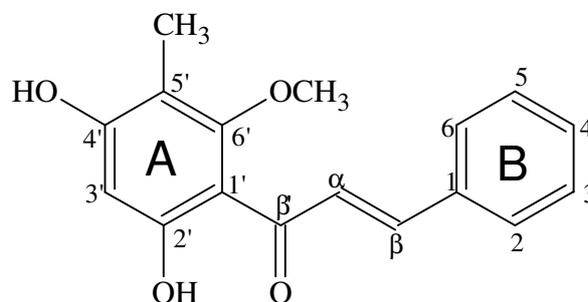
As análises dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 38, tab. 13) e do experimento gHSQC (fig. 39) forneceram sinais intensos sobrepostos em  $\delta$  128,8 (C3/5) e 128,5 (C2/6) ligados aos hidrogênios em  $\delta$  7,41 (H3/5, *m*) e 7,64 (H2/6, *dd*,  $J= 6,0$  Hz). Outro sinal de carbono em  $\delta$  8,0 ligado ao hidrogênio em  $\delta$  2,11 (3H, *s*). Um sinal em  $\delta$  62,3 ligado ao hidrogênio em  $\delta$  3,7 (3-H, *s*) e o sinal em  $\delta$  99,8 (C-3') ligado ao hidrogênio em  $\delta$  6,23 (H-3', *s*).

O experimento de gHMBC (fig. 40 e 41) permitiu visualizar o acoplamento a longa distância do hidrogênio em  $\delta$  3,8 com o sinal em  $\delta$  161,5 (C6'). O sinal de hidrogênio da metila em  $\delta$  2,12 acoplado com os carbonos em  $\delta$  110,1 (C5') e 161,3 (C4'), respectivamente, assim como o sinal em  $\delta$  6,22 (H3') acoplado com o carbono em  $\delta$  161,3 (C4') e 164,2 (C2'). A tabela 13 mostra as correlações obtidas através da análise do experimento de gHMBC.

Foi observado também os sinais dos hidrogênios *trans* em  $\delta$  7,86 (H- $\beta$ ) acoplado com os carbonos em  $\delta$  128,8 (C- $\alpha$ ) e 193,2 (C-  $\beta'$ ), evidenciando a presença de uma carbonila  $\alpha$ - $\beta$  insaturada. E o sinal em  $\delta$  7,99 (H- $\alpha$ ) acoplado com os carbonos em  $\delta$  143,3 (C-  $\beta$ ), 193,2 (C-  $\beta'$ ) e 134,3 (C1). Esses resultados permitiram concluir que a molécula é uma chalcona com uma metila na posição 5' e uma metoxila na posição 6' do anel A, além da presença de uma hidroxila na posição 4'.

Com bases nos sinais fornecidos empregando técnicas de RMN de 1D e 2D, atribuiu que a molécula **Ca7** refere-se a 2',4'-diidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona (fig. 36), isolada anteriormente de espécies do gênero *Metrosideos*-Myrtaceae (MUSTAFA *et*

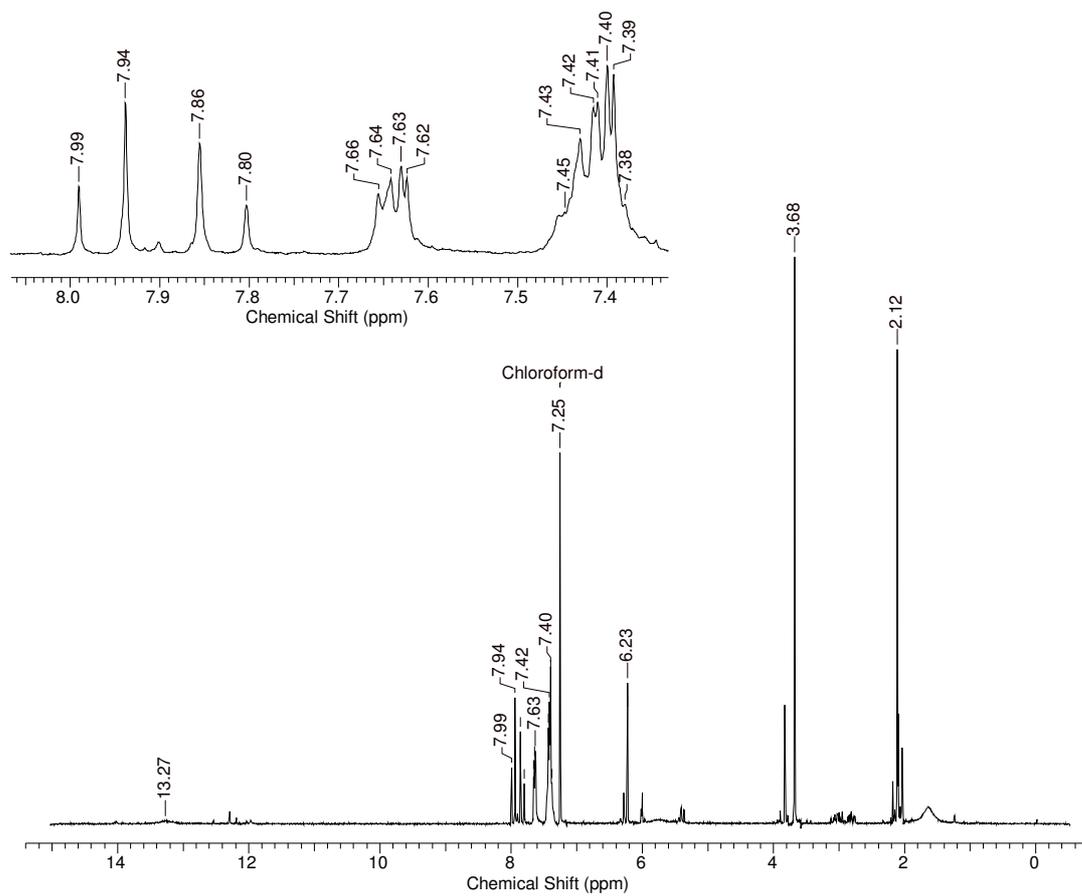
al, 2005) e de *Piper dilatatum*-Piperaceae (TERREAUX *et al*, 1998) e sua biossíntese sugerida nos trabalhos com *Pinus strobus* (SCHRÖDER *et al*, 1998).



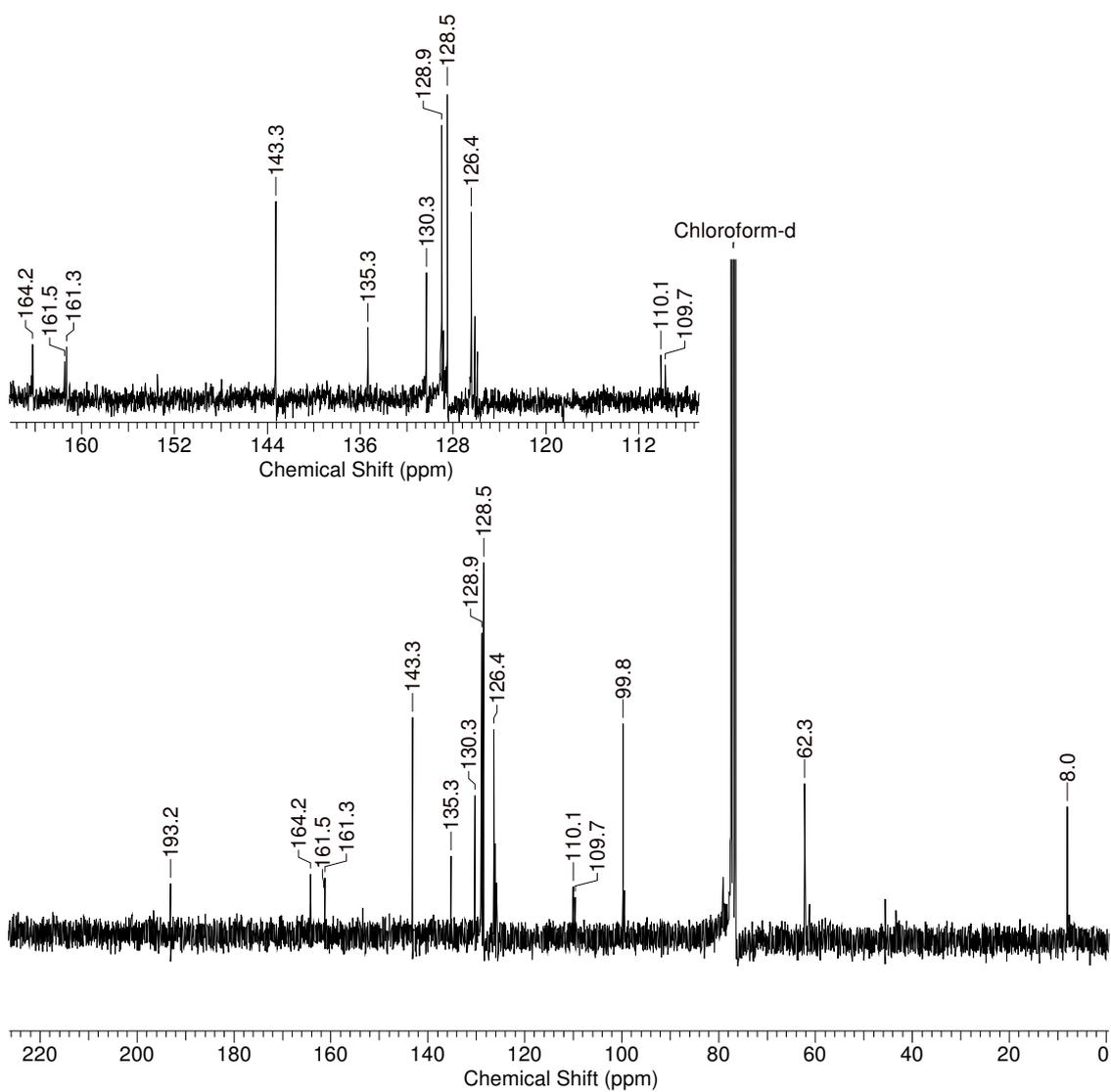
**Figura 36** – Estrutura molecular de 2',4'-diidróxi-5'-metil-6'-metóxicalcona (**Ca7**).

**Tabela 13** – Deslocamento de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e acoplamento a longa distância (gHMBC) de **Ca7**.

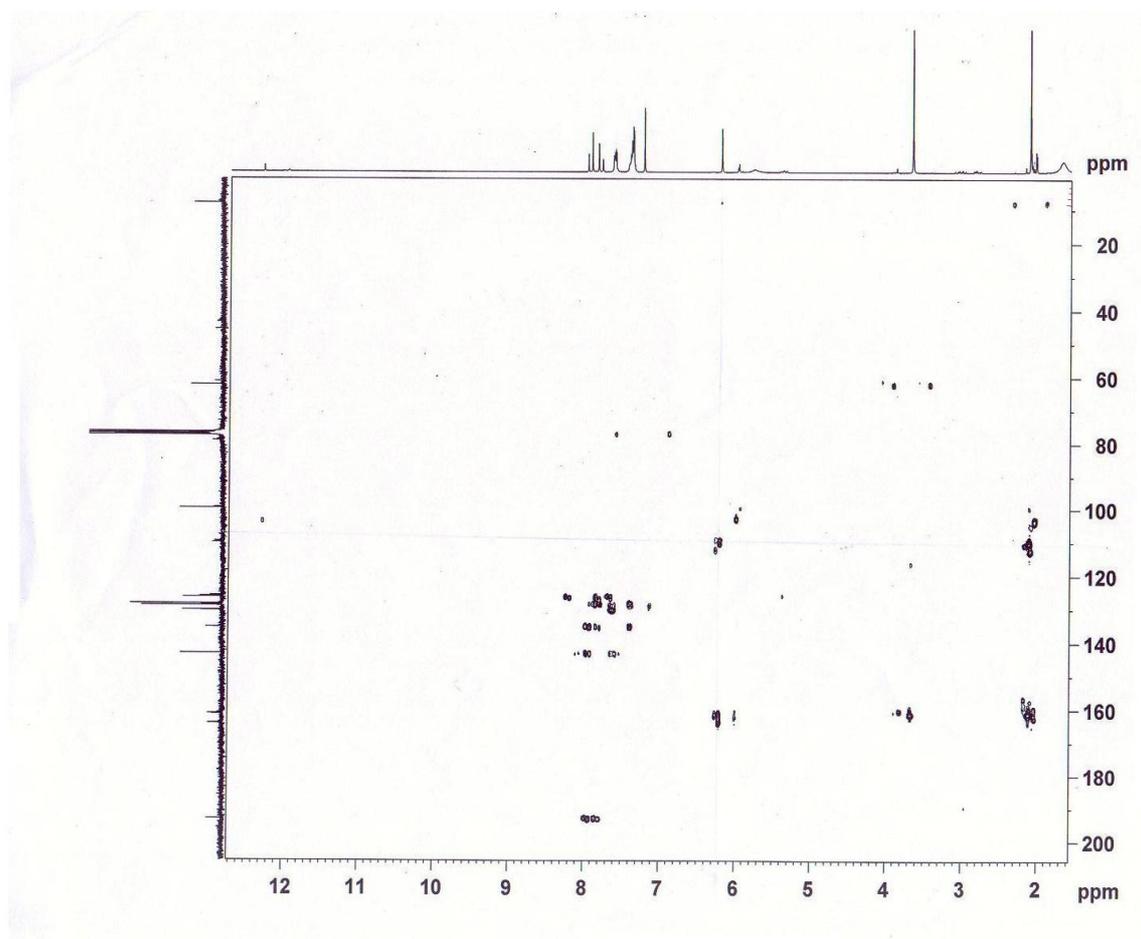
Posição	$\delta$ de $^1\text{H}$ em $\text{CDCl}_3$	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{CDCl}_3$	gHMBC ( $\delta$ )
$\alpha$	7,97 <i>d</i> ( $J= 15\text{Hz}$ )	126,4	135,3; 143,3; 193,2
$\beta$	7,83 <i>d</i> ( $J= 15\text{Hz}$ )	143,3	126,4; 193,2
$\beta'$	-	193,2	-
1'	-	109,7	-
2'	-	164,2	-
3'	6,22 <i>s</i>	99,8	161,3; 164,2
4'	-	161,3	-
5'	-	110,1	-
6'	-	161,5	-
1	-	135,3	-
2	7,64 <i>dd</i> ( $J= 6$ e $3\text{Hz}$ )	128,5	130,30
3	7,41 <i>m</i>	129,0	128,5; 135,3
4	7,41 <i>m</i>	130,3	128,5
5	7,41 <i>m</i>	129,0	128,5; 135,3
6	7,64 <i>dd</i> ( $J= 6$ e $3\text{Hz}$ )	128,5	130,30
$\text{CH}_3$	2,11	8,0	110,1; 161,3
$\text{OCH}_3$	3,67	62,3	161,5



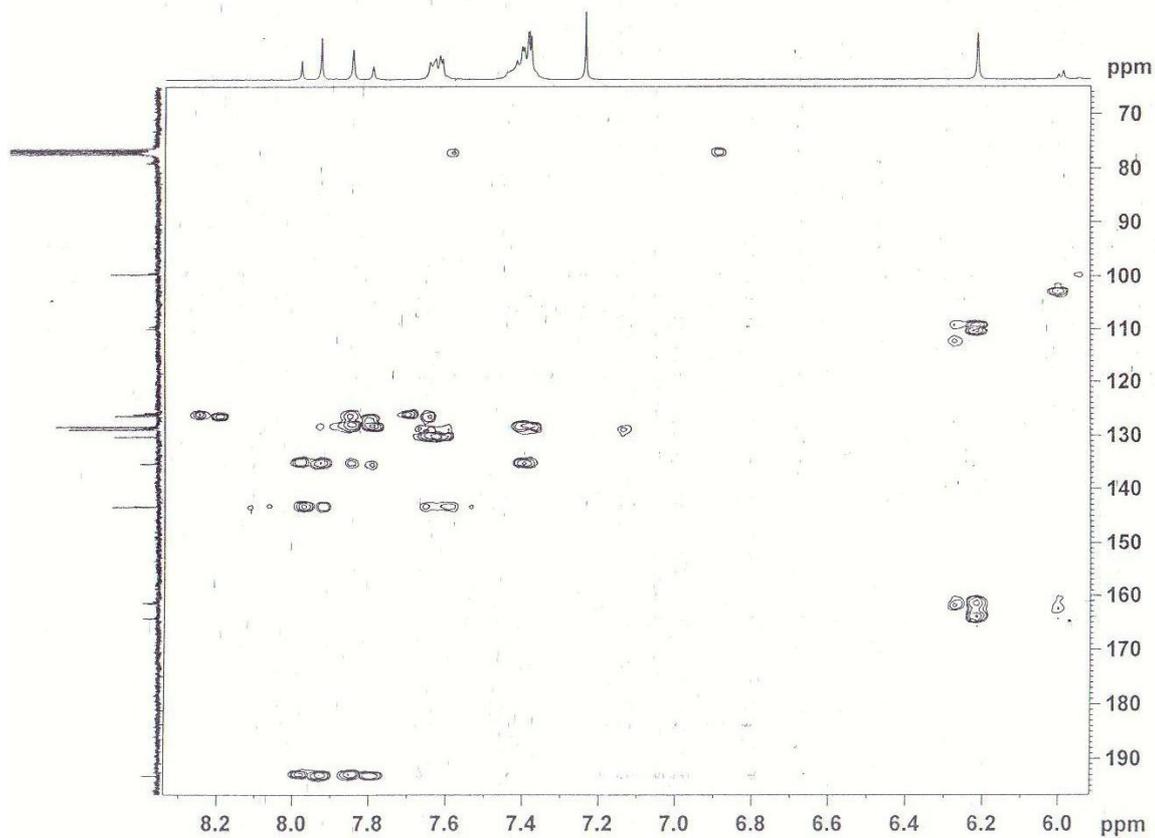
**Figura 37** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Ca7 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ )



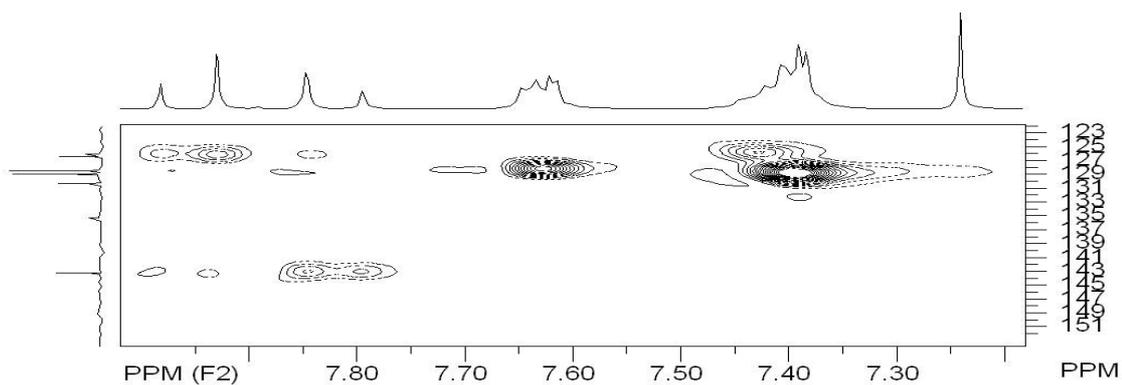
**Figura 38** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de  $\text{Ca7}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ )



**Figura 39** – Experimento gHSQC de **Ca7** (300 MHz  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ).



**Figura 40** – Experimento de gHMBC de **Ca7** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ).



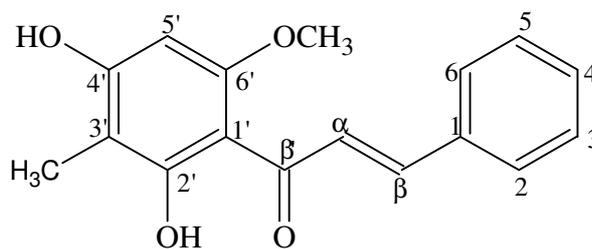
**Figura 41** – Ampliação do experimento de gHMBC de **Ca7** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ).

#### 4.2.8. Identificação estrutural de **Ca8**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (fig. 43, tab. 14) de **Ca8** (fig. 42) apresentou praticamente o mesmo espectro que a **Ca7**, com algumas diferenças. Somente através do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 44, tab. 14) e experimento gHSQC (fig. 45) foram possíveis detectar as diferenças entre a **Ca7** e **Ca8**. O sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,16 (H5') mostrou correlação direta com o carbono em  $\delta$  91,5 ppm (C5'), diferente de **Ca7**, a qual apresentou correlação direta com o carbono em  $\delta$  99,8. Sinais em  $\delta$  2,00 (3-H, *s*) e  $\delta$  3,93 (3-H, *s*) mostraram correlação direta com os carbonos em  $\delta$  7,5 e 56,2

Através da análise do experimento de gHMBC (fig. 46, tab. 14) foi possível identificar que os sinais em  $\delta$  3,93 (OCH<sub>3</sub>) e 6,16 (H5') apresentaram acoplamento a longa distância com o sinal em  $\delta$  162,0 (C6'), logo foi possível inferir que a metoxila ligado ao carbono em  $\delta$  162,0 está na posição *orto* ao hidrogênio ligado ao carbono (C5') em  $\delta$  91,5 e *para* a metila ligada ao carbono (C3') em  $\delta$  104,6. O sinal a  $\delta$  14,49 (OH) mostrou acoplamento a longa distância com em  $\delta$  106,2 e 166,6, indicativo da hidroxila na posição 2'. Logo foi possível sugerir que as substâncias **Ca8** e **Ca7** são chalconas isômeras. A figura 46 mostra os acoplamentos a longa distância.

Com base nestes sinais fornecidos e com dados da literatura (tab.14) pode-se sugerir que trata-se da 2',4'-diidróxi-3'-metil-6'-metóxicalcona (fig. 42), a qual foi isolada pela primeira vez em *Myrica serrata*-Myricaceae (GAFNER *et al*, 1996).

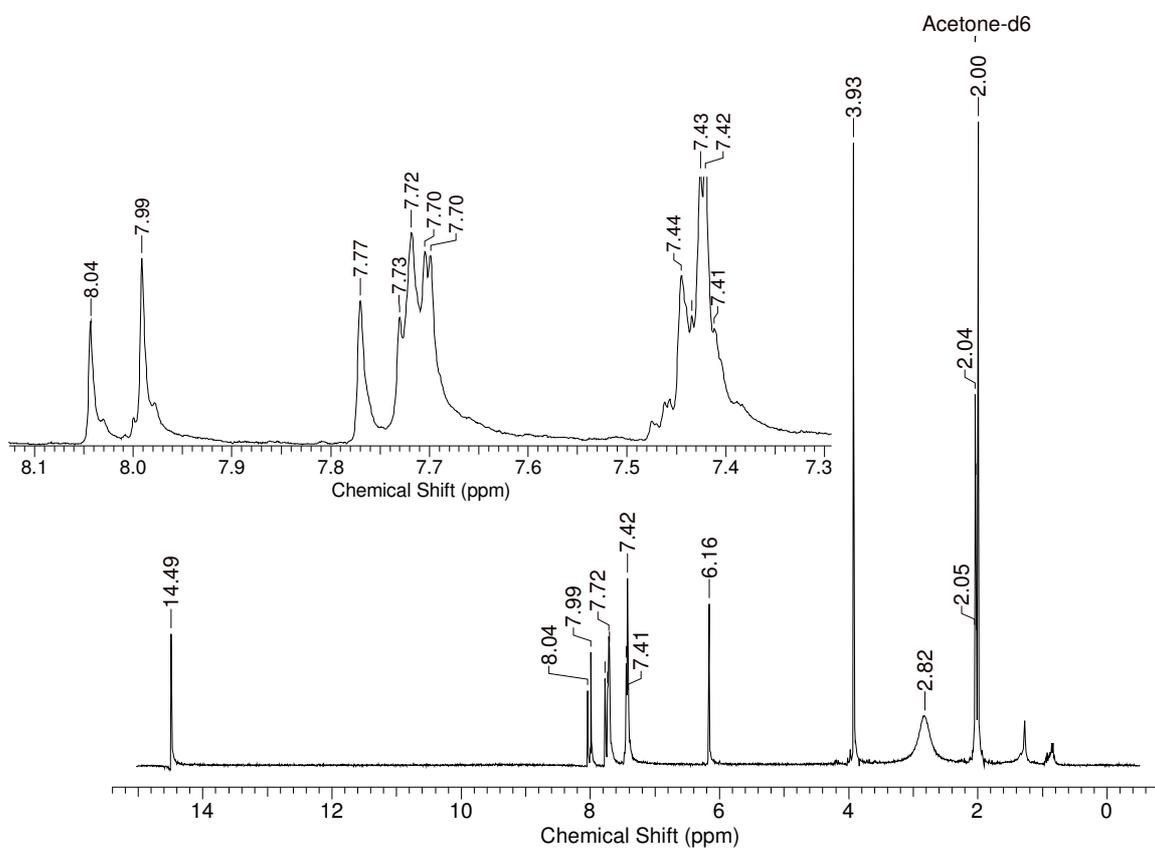


**Figura 42** – Estrutura molecular de 2',4'-diidróxi-3'-metil-6'-metóxicalcona (**Ca8**).

**Tabela 14** – Deslocamento de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e acoplamento a longa distância (gHMBC) de **Ca8**.

Posição	$\delta$ de $^1\text{H}$ em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ e $J$ (Hz)	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}^*$	gHMBC ( $\delta$ )	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}^*$
$\alpha$	8,02 <i>d</i> ( $J= 15\text{Hz}$ )	128,8	136,6; 142,4; 193,2	129,4
$\beta$	7,75 <i>d</i> ( $J= 15\text{Hz}$ )	142,4	128,8; 193,2	143,0
$\beta'$	-	193,2		193,9
1'	-	106,2		106,8
2'	-	166,6		167,3
3'	-	104,6		105,2
4'	-	163,5		164,4
5'	6,16 <i>s</i>	91,6	106,2; 163,5	92,4
6'	-	161,9		162,9
1	-	136,6		137,2
2	7,72 <i>dd</i> ( $J= 6$ e $3\text{Hz}$ )	129,2	129,8; 130,9	130,5
3	7,43 <i>m</i>	129,8	129,2; 136,6	129,8
4	7,43 <i>m</i>	130,9	129,2; 136,6	131,4
5	7,43 <i>m</i>	129,8		129,8
6	7,72 <i>dd</i> ( $J= 6$ e $3\text{Hz}$ )	129,2		130,5
$\text{CH}_3$	2,00 <i>s</i>	7,5	104,6; 163,5; 166,6	-
$\text{OCH}_3$	3,93 <i>s</i>	56,2	161,9	-
$\text{OH}$ (2')	14,49	-	-	-

\* valor comparado com a literatura (MUSTAFA *et al*, 2005).



**Figura 43** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Ca8** (300 MHz,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ ).

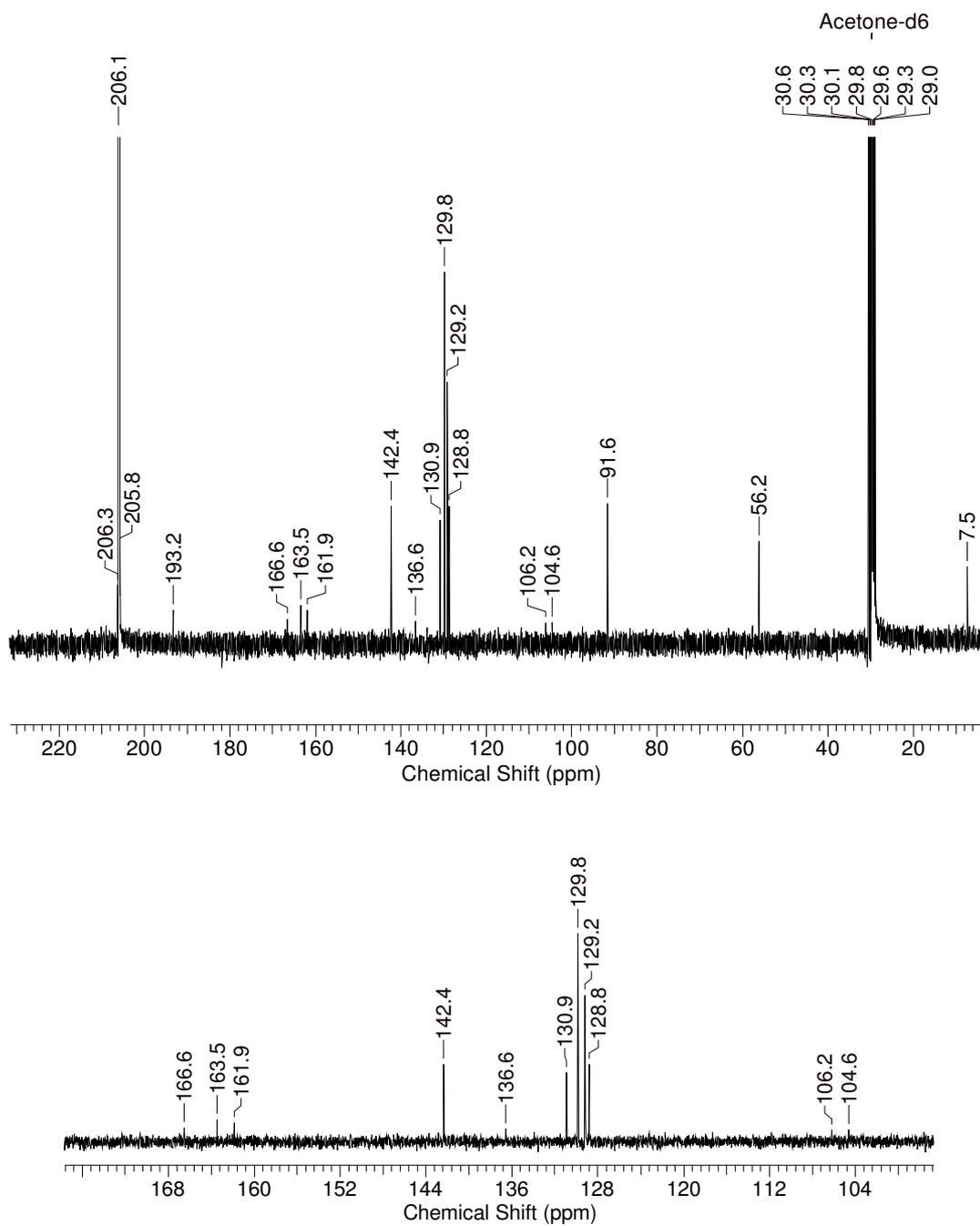


Figura 44 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **Ca8** (75 MHz,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ ).

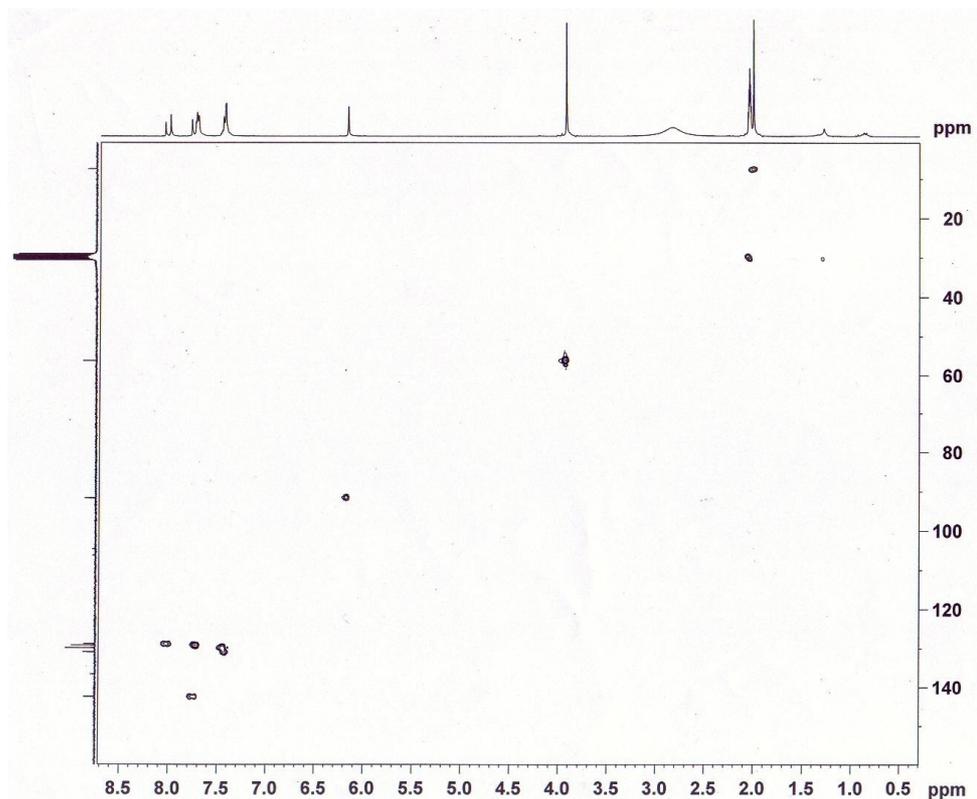


Figura 45 – Experimento gHSQC de **Ca8** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ ).

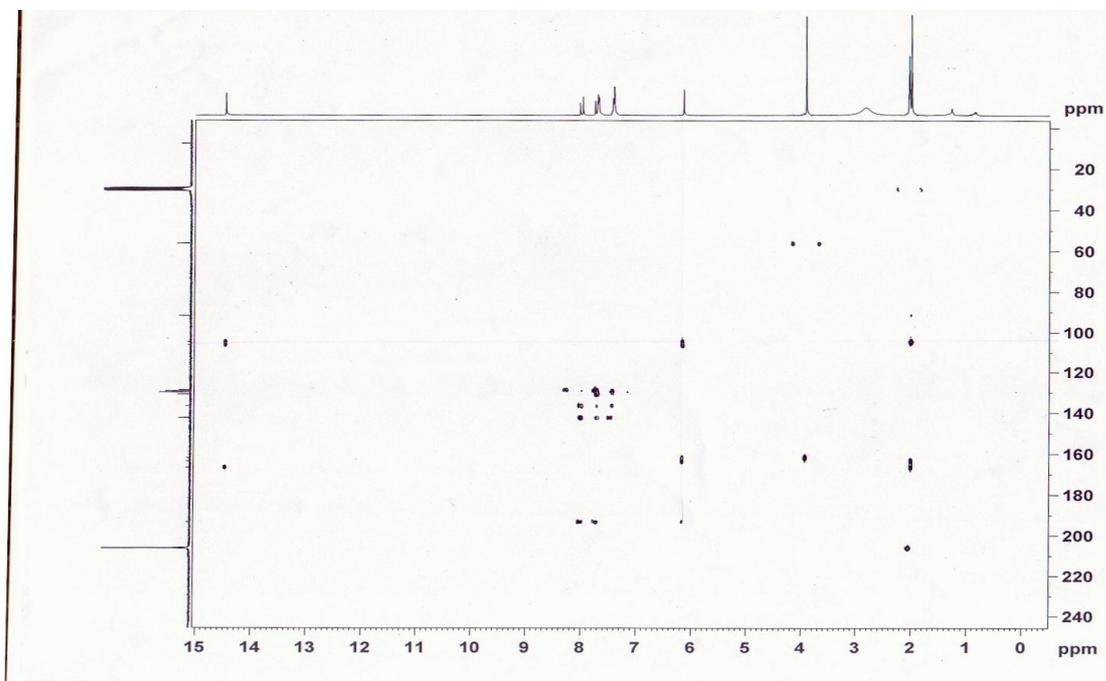


Figura 46 - Experimento de gHMBC de **Ca8** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ ).

#### 4.2.9. Identificação estrutural de **Ca9**

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (fig. 48, tab. 15) de **Ca9** (fig. 47), mostrou padrão de sinais semelhantes a **Ca7** referente ao grupo cinamoil. Mas sinais com multiplicidade diferentes em relação ao anel A da chalcona. Os sinais em  $\delta$  6,01 ( $\text{H}5'$ , *d*,  $J= 3\text{Hz}$ ) e  $\delta$  6,09 ( $\text{H}3'$ , *d*,  $J= 3\text{Hz}$ ), sugere que o anel A seja trissubstituído.

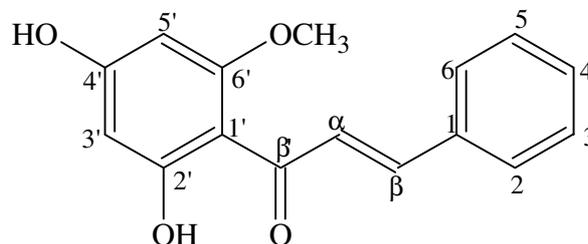
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 49, tab. 15) e experimento de gHSQC (fig. 50) mostrou correlação direta dos hidrogênios em  $\delta$  6,01 ( $\text{H}3'$ ) e 6,09 ( $\text{H}5'$ ) com sinais de carbono em  $\delta$  97,0 ( $\text{C}3'$ ) e 92,3 ( $\text{C}5'$ ), respectivamente. Observou-se também a correlação do sinal a  $\delta$  3,98 ( $3\text{-H}$ , *s*) com o sinal em  $\delta$  56,2. Os sinais em  $\delta$  7,79 ( $\text{H}\text{-}\beta$ ) e 8,02 ( $\text{H}\text{-}\alpha$ ) mostraram correlação direta com os sinais em  $\delta$  142,4 ( $\text{C}\text{-}\beta$ ) e 128,2 ( $\text{C}\text{-}\alpha$ ).

Através do experimento de gHMBC (fig. 51, tab. 15) foi possível sugerir que o sinais referente ao hidrogênio em  $\delta$  6,01 ( $\text{H}3'$ ) apresentou acoplamento a longa distância com o sinal em  $\delta$  106,3 ( $\text{C}1'$ ) e o sinal a  $\delta$  6,09 ( $\text{H}5'$ ) com os sinais em  $\delta$  106,3 ( $\text{C}1'$ ) e 164,4 ( $\text{C}6'$ ). O último sinal em  $\delta$  164,4 mostrou acoplamento a longa distância com o sinal da metoxila ligada ao  $\text{C}6'$ , que poderia ser uma evidência a presença desses hidrogênios na posição *orto* e *para* em relação a metoxila. Através da análise do espectro de NOESY 1D (fig. 52) foi possível sugerir mais uma vez que o hidrogênio em  $\delta$  6,09 ( $\text{H}5'$ ) ligado ao carbono em  $\delta$  92,3 ( $\text{C}5'$ ) estava na posição *orto* a metoxila, a qual foi irradiada e mostrou correlação com o sinal de 1H em  $\delta$  8,02 ( $\text{H}\text{-}\alpha$ , fig. 38) ligado ao carbono  $\text{C}\text{-}\alpha$  em  $\delta$  128,5.

O espectro de NOESY 1D foi realizado para confirmar a estrutura proposta, já que a literatura comparada apresentou alguns sinais invertidos, que no primeiro momento gerou dúvida.

Com base nos sinais fornecidos através das técnicas de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , experimentos de gHSQC, gHMBC, espectro de NOESY 1D e dados da literatura (tab. 10) foi possível sugerir que estes sinais são referentes a 2',4'-diidróxi-6'-metóxicalcona (fig. 47), esta substância foi isolada em várias espécies diferentes, tais como *Boesenbergia pandurata* Haltt (TEWTRAKUL *et al*, 2003), *Piper dilatatum*-Pyperaceae (TERREAUX *et al*, 2003), *Alpinia Henry* K. Schum-Zingiberaceae (WANG *et al*, 2001) e *Alpinia speciosa*- Zingiberaceae (ITOKAWA *et al*, 1981). A literatura também relata que essa substância exibiu considerável atividade anti-HIV-1 PR, com inibição de  $75,11\pm 1,44\%$ ,

quando comparada com o controle positivo pepstatina acetila  $98,47 \pm 0,27$  (TEWTRAKUL *et al*, 2003).

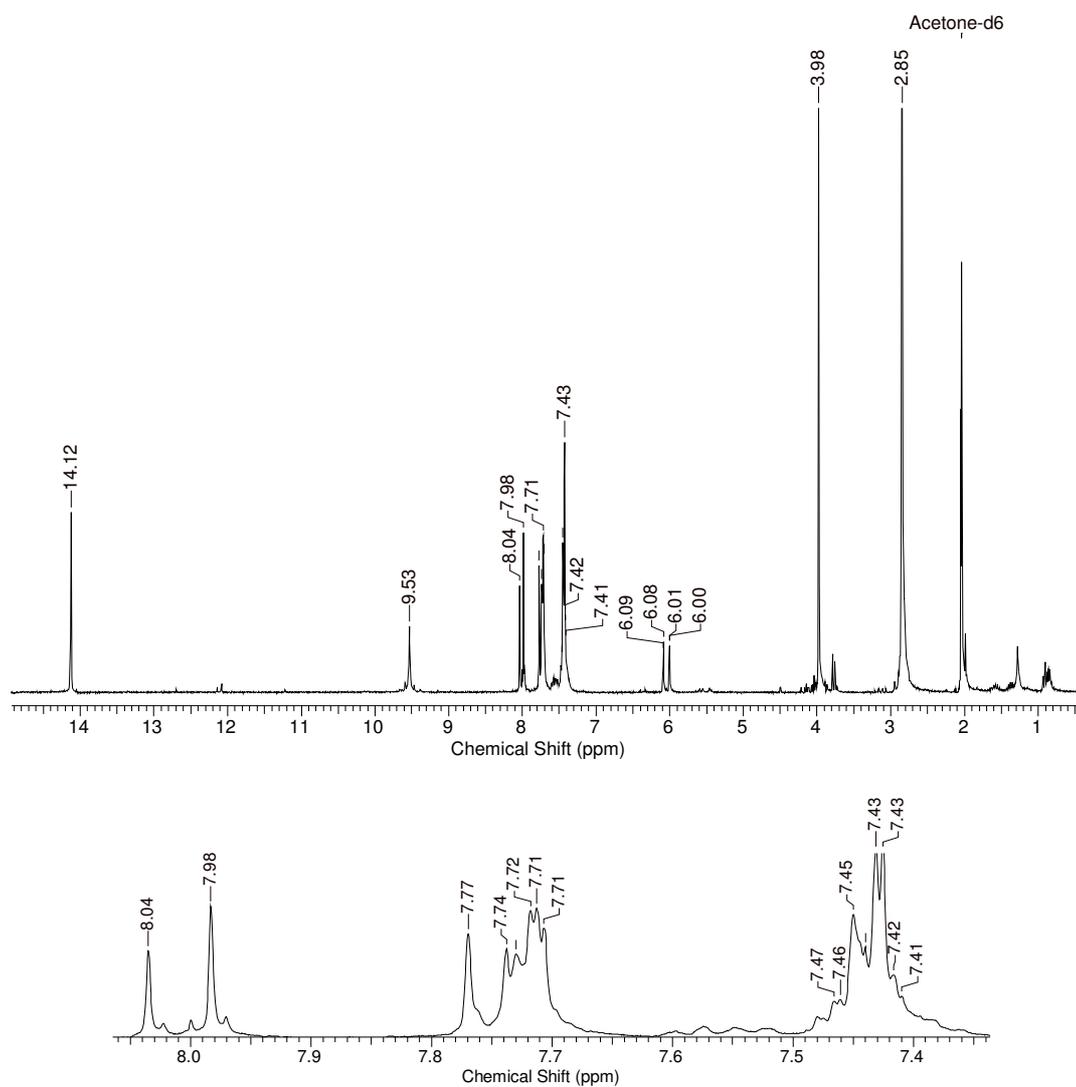


**Figura 47** – Estrutura molecular de 2',4'-diidróxi-6'-metóxicalcona (**Ca9**).

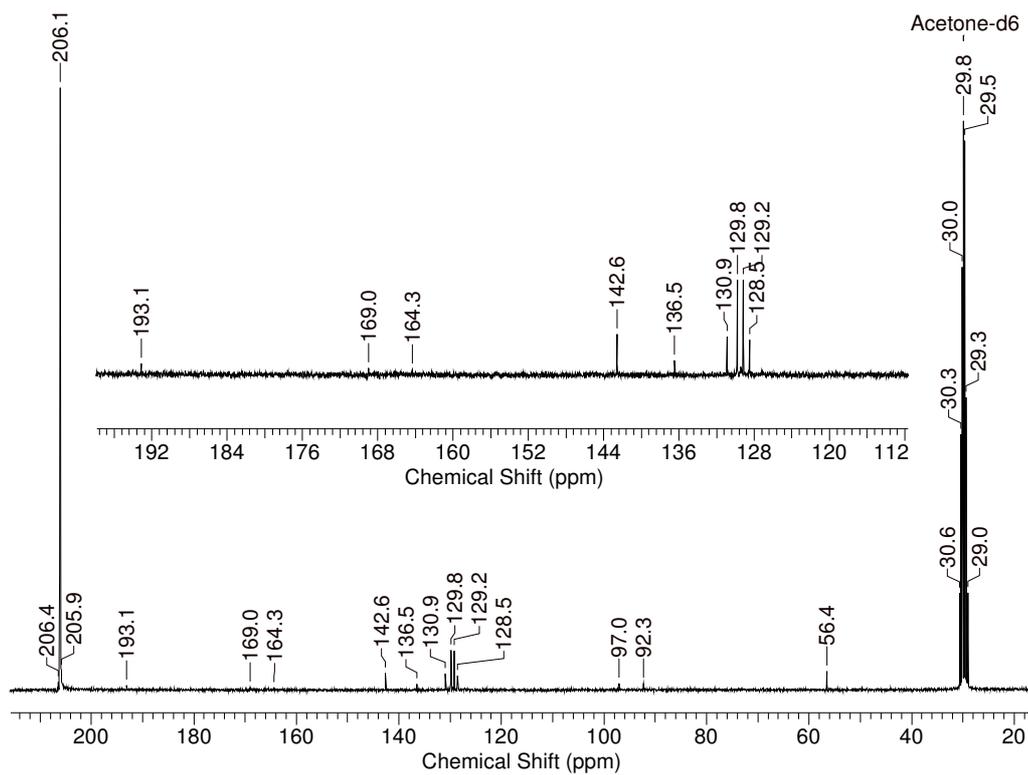
**Tabela 15** – Deslocamento de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **Ca9**.

Posição	$\delta$ de $^1\text{H}$ em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ e $J$ (Hz)	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$	$g\text{HMBC}$ ( $\delta$ )	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ *
$\alpha$	7,74 <i>d</i> ( $J= 15,5$ Hz)	128,5	136,3; 142,6; 193,1	128,6
$\beta$	8,01 <i>d</i> ( $J= 15,5$ Hz)	142,6	128,5; 193,1	142,4
$\beta'$	-	193,1	-	193,0
1'	-	106,0	-	106,4
2'	-	168,9	-	168,3
3'	6,01 <i>d</i> ( $J= 3\text{Hz}$ )	97,0	166,0; 168,9; 92,3; 106	92,3
4'	-	166,0	-	165,8
5'	6,09 <i>d</i> ( $J= 3\text{Hz}$ )	92,3	166,0; 164,0	97,0
6'	-	164,0	-	164,3
1	-	136,3	-	136,5
2	7,73 <i>dd</i> ( $J= 6$ e $3\text{Hz}$ )	129,2	130,9; 129,8; 142,6	129,0
3	7,44 <i>m</i>	129,8	142,6; 129,2	129,7
4	7,44 <i>m</i>	130,9	142,6; 129,2	130,7
5	7,44 <i>m</i>	129,8	142,6; 129,2	129,7
6	7,73 <i>dd</i> ( $J= 6$ e $3\text{Hz}$ )	128,2	130,9; 129,8; 142,6	129,0
$\text{OCH}_3$	3,98 <i>s</i>	56,4	164,0	-

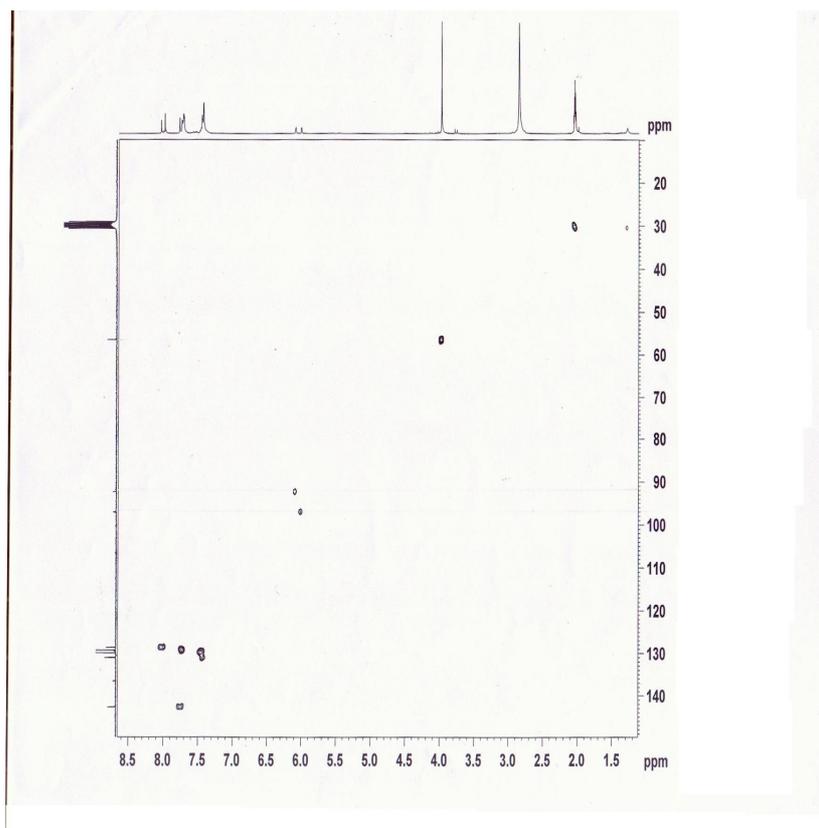
\*valores comparados com a literatura (ITOKAWA *et al*, 1981).



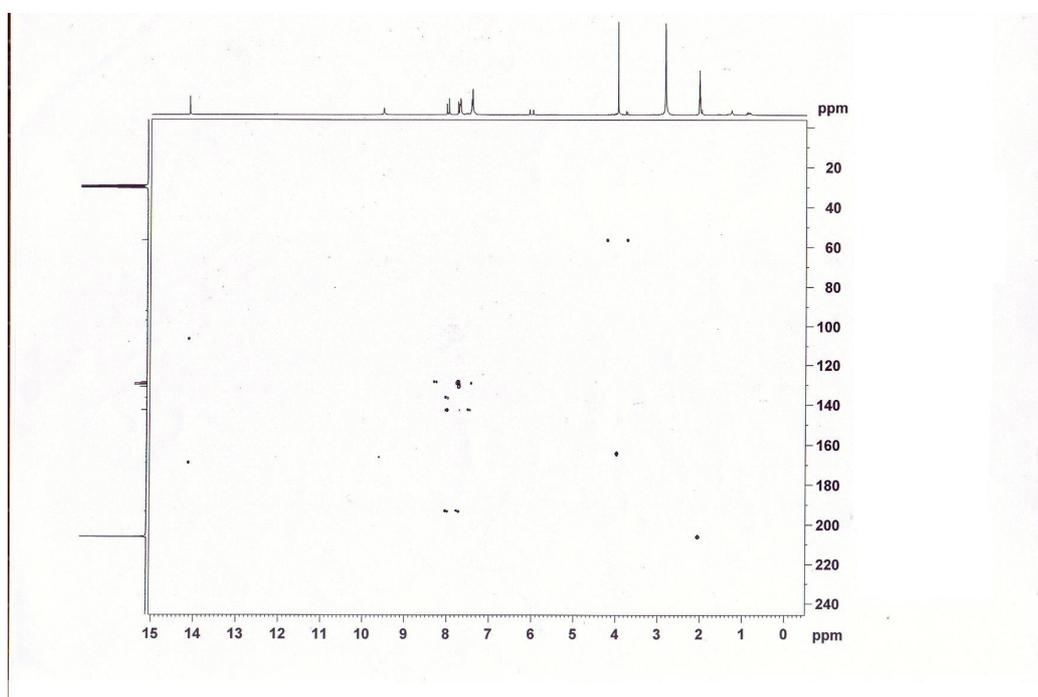
**Figura 48** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Ca9** (300 MHz,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ ).



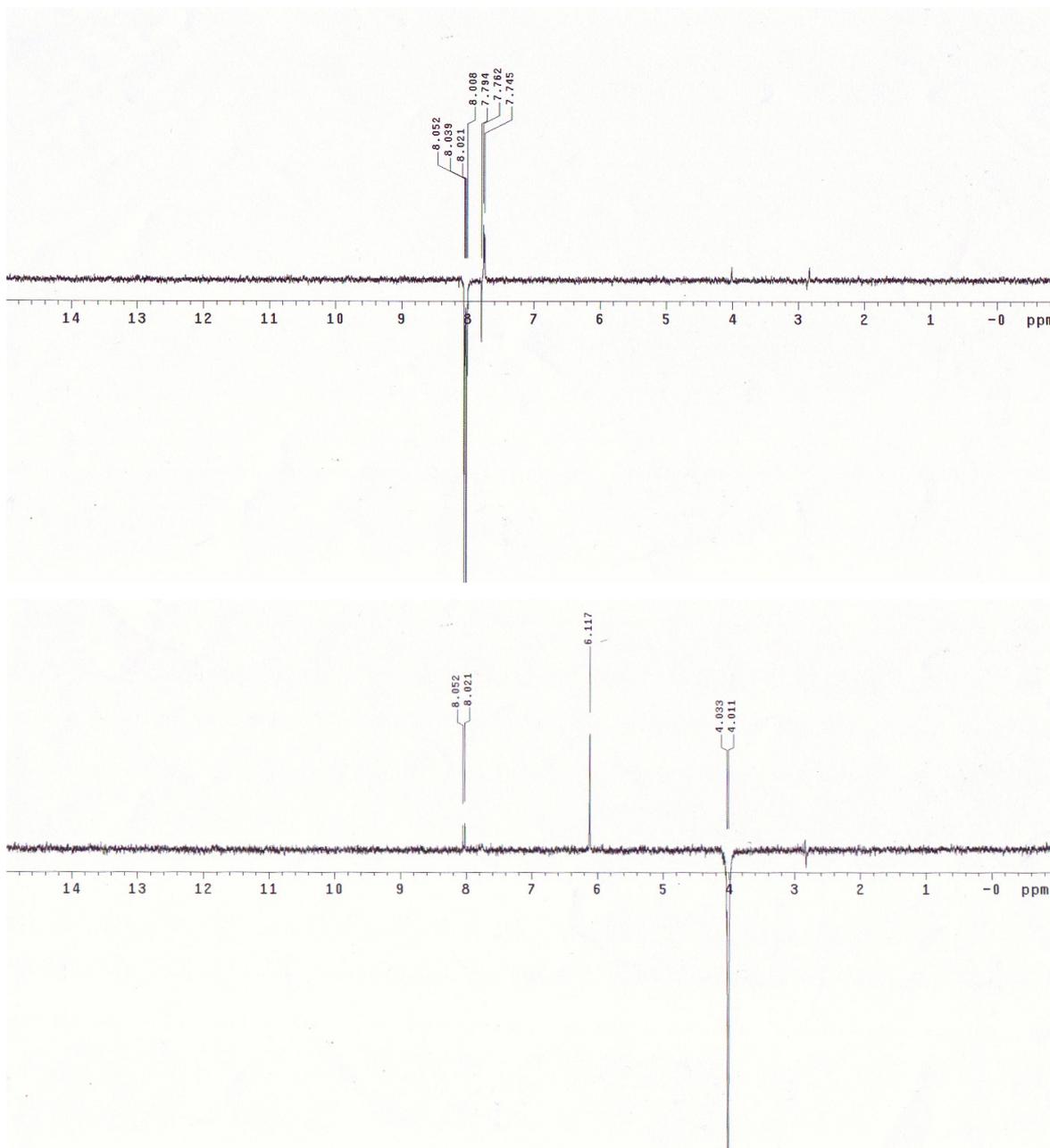
**Figura 49** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **Ca9** (75 MHz,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ ).



**Figura 50** – Experimento de gHSQC de **Ca9** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ ).



**Figura 51** – Experimento de gHMBC de **Ca9** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ ).



**Figura 52** – Espectro de NOESY 1D de **Ca9** (500 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ,  $\delta$ ).

#### 4.2.10. Identificação estrutural de **Ca10**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (fig. 54, tab. 16) de **Ca10** (fig. 53) apresentou um padrão de sinais na região correspondente aos hidrogênios aromáticos, mas diferentes dos observados para as flavononas e chalconas. Neste espectro pôde se observar que a amostra encontrava-se em mistura, devido a menor intensidade de alguns sinais, mas mesmo assim

foi possível sugerir uma estrutura e atribuir os sinais.

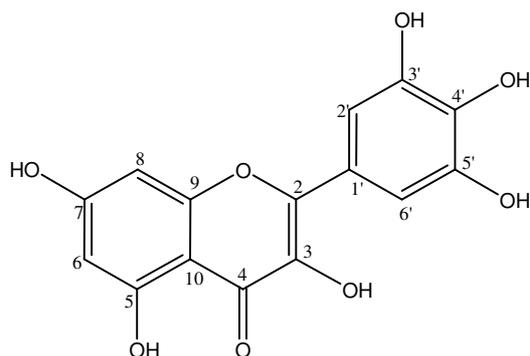
A presença de dois dubletos em  $\delta$  6,38 (1-H, 2,1 Hz) e  $\delta$  6,19 (1-H,  $J=2,4$  Hz) e um singlete em  $\delta$  7,34 (2-H) permitiu sugerir que esses sinais são relativos aos hidrogênios 6 e 8 do A e 2'/6' do anel B, respectivamente.

A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 55, tab. 16) forneceu 13 sinais, dos quais apenas 12 são referentes à molécula isolada. O sinal em  $\delta$  177,3 é referente à carbonila do C4 do anel C, o que permitiu sugerir que há uma ligação dupla entre o C-2/3, assim como sugerir que este esqueleto é característico de um flavonol devido a ausência de hidrogênios na região olefínica e dos sinais observados para os hidrogênios 2 e 3 de flavanona.

Através do experimento gHSQC (fig. 56) foi possível atribuir a correlação dos hidrogênios com seus respectivos carbonos. Sinais em  $\delta$  94,4 (1C) e 99,3 (1C) mostraram correlação com os dubletos  $\delta$  6,19 e 6,38 e são referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 6 e 8, respectivamente, do anel A, assim como sinal intenso em  $\delta$  108,6 (C2) mostraram correlação com o singlete em  $\delta$  7,34 corresponde ao C2'/6' do anel B, e estão sobrepostos.

Através do experimento de gHMBC (fig. 57, tab. 16) foi possível atribuir as correlações à longa distância. Neste foi observado a correlação em  $\delta$  7,34 com os carbonos 1', 3'/5' e 4' do anel B, assim como os sinais referentes aos hidrogênios 6 e 8, com os carbonos 4, 7, 9 e 10 do anel A.

Com base nos sinais fornecidos através das técnicas de RMN 1D e 2D, e comparação com os dados da literatura foi possível sugerir que os deslocamentos descritos para **Ca10** são referentes a 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol (fig. 53). Esta substância é amplamente descrita na literatura, e tem sido detectada em frutas e vegetais, tais como, maçã, morango, ameixa, babosa, espinafre e ervilha (SULTANA & ANWAR, 2008).

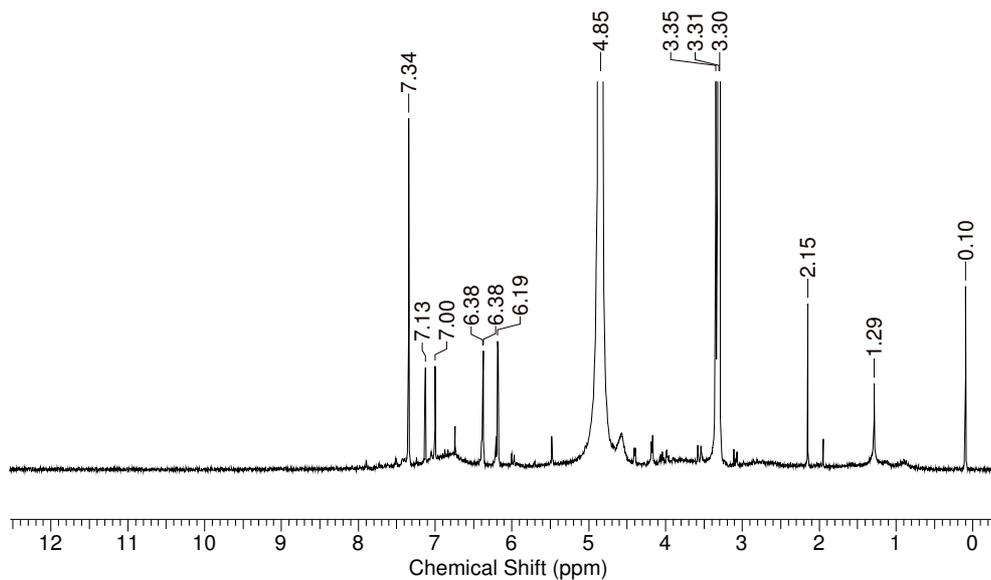


**Figura 53** – Estrutura molecular de 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol (**Ca10**).

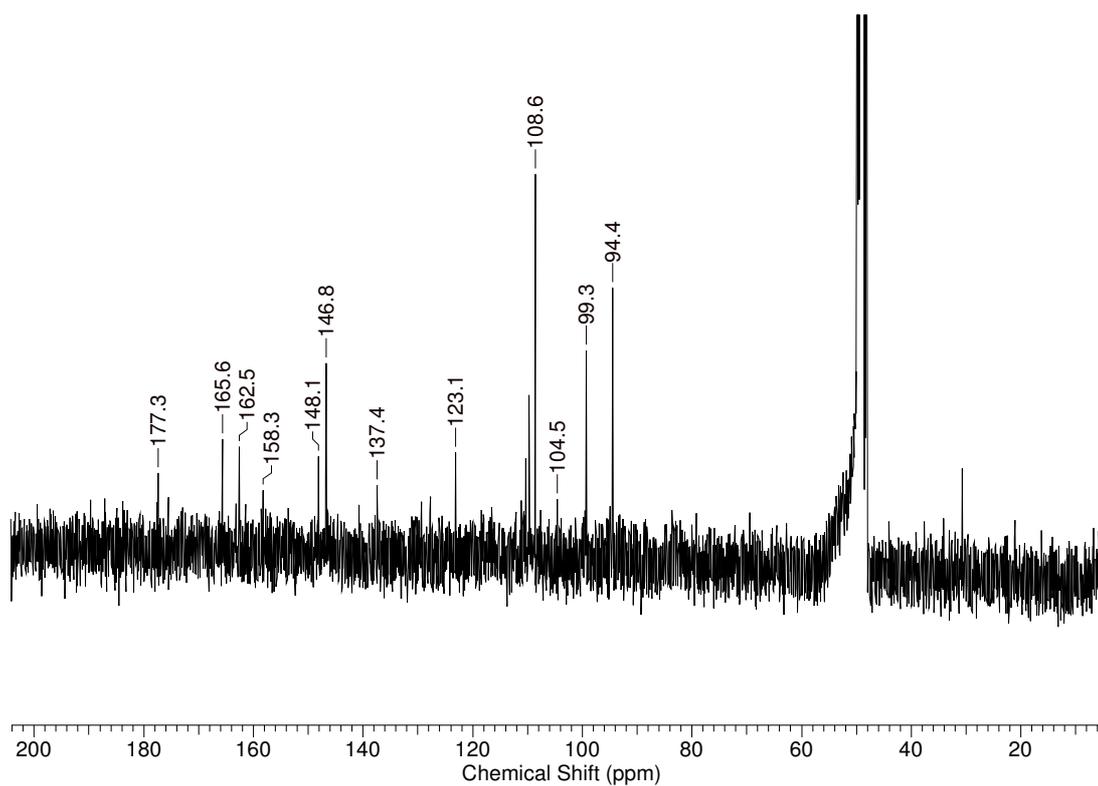
**Tabela 16** – Deslocamento de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **Ca10**.

Posição	$\delta$ de $^1\text{H}$ (ppm) em $\text{CD}_3\text{OD}$ $J$ (Hz)	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$	$g\text{HMBC}$ ( $\delta$ )	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{DMSO}$ *
2	-	148,1	-	147,1
3	-	137,4	-	136,1
4	-	177,3	-	176,0
5	-	162,5	-	161,0
6	6,19 <i>d</i> ( $J=2,4$ Hz)	99,3	177,3; 165,6; 158,3; 104,5;	98,5
7	-	165,6	-	164,2
8	6,38 <i>d</i> ( $J=2,1$ Hz)	94,4	165,6; 158,3; 104,5;	93,5
9	-	158,3	-	156,4
10	-	104,5	-	103,3
1'	-	123,1	-	121,2
2'	7,34 <i>s</i>	108,6	123,1; 146,8; 137,4	107,5
3'	-	146,8	-	146,0
4'	-	137,4	-	136,1
5'	-	146,8	-	146,0
6'	7,34 <i>s</i>	108,6	123,1; 146,8; 137,4	107,7

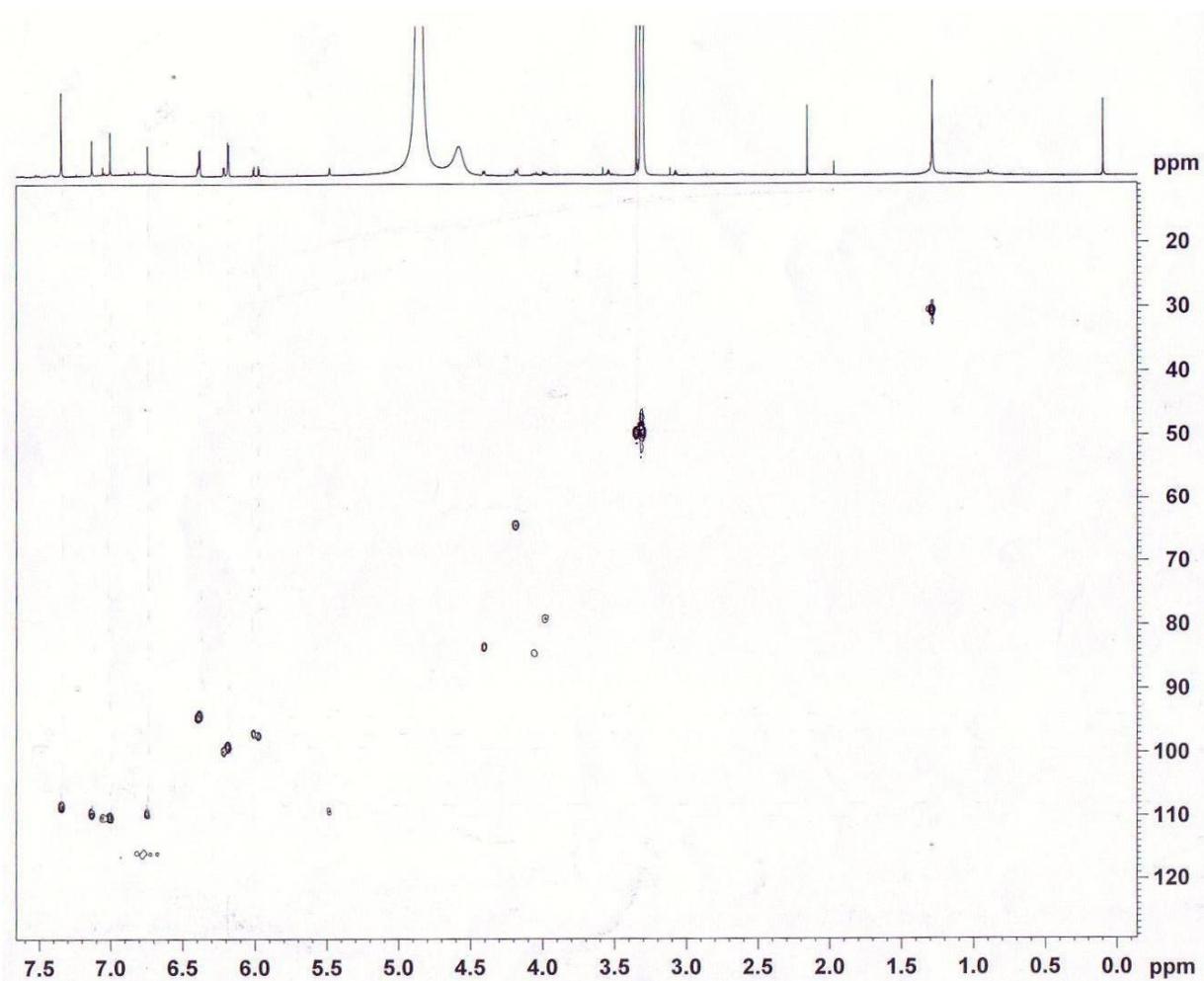
\*valores obtidos da literatura (AGRAWAL, 1989)



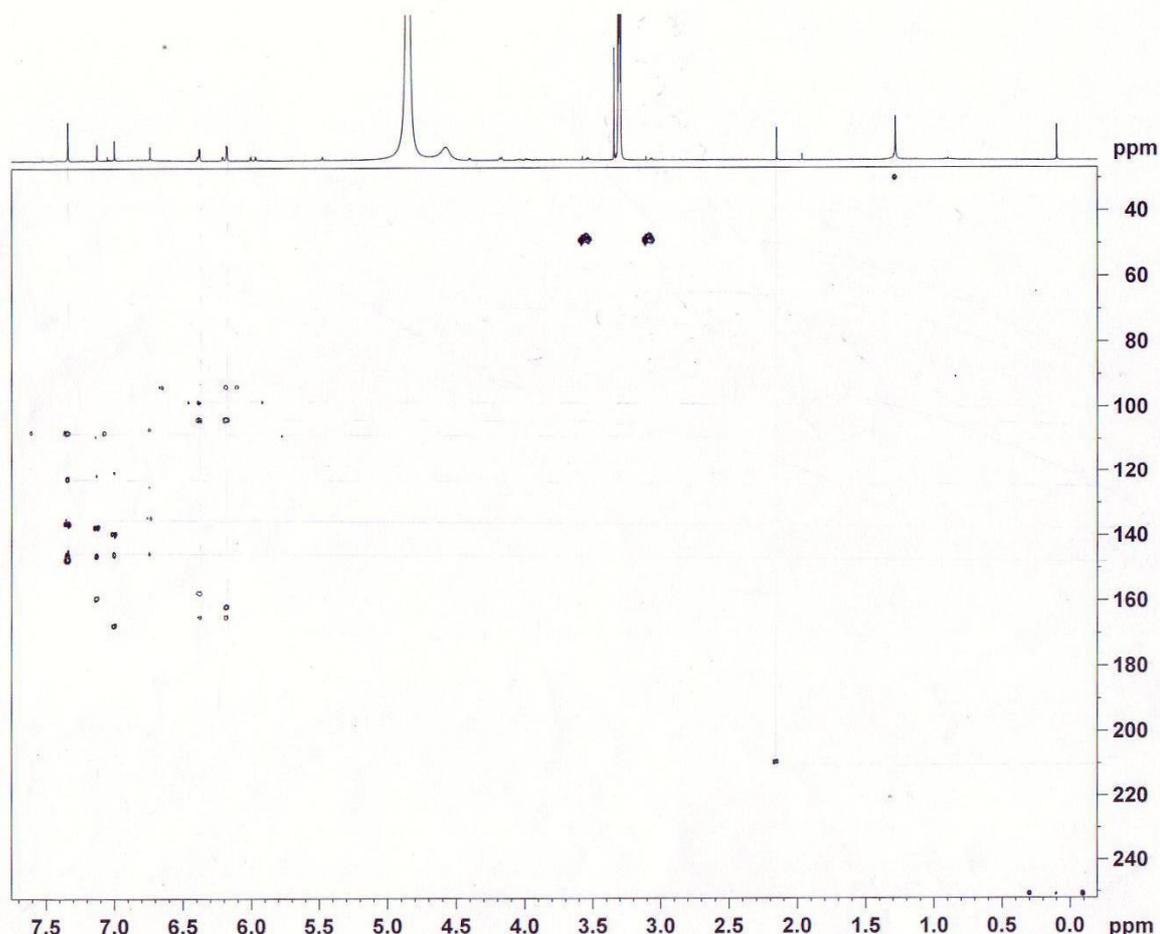
**Figura 54** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Ca10** (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}, \delta$ ).



**Figura 55** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **Ca10** (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}, \delta$ ).



**Figura 56** – Experimento de gHSQC de **Ca10** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ).



**Figura 57** – Experimento de gHMBC de **Ca10** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ).

#### 4.2.11. Identificação estrutural de **Ca11**

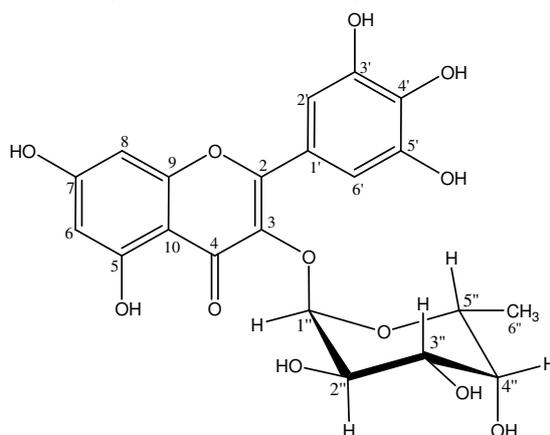
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (fig. 59, tab. 17) e RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 60, tab. 17) de **Ca11** (fig. 58) mostrou padrão de sinais característicos da **Ca10**, com exceção dos sinais na região em  $\delta$  3,50 e 4,21 e dubleto em  $\delta$  0,95 (3-H,  $J=6$  Hz). Estes sinais são indicativos da presença de um açúcar, sendo que o sinal a  $\delta$  0,95 é indicativo do H6 de raminose e o dubleto a  $\delta$  5,31 ( $J=3$  Hz) na conformação  $\alpha$ , pois segundo HARBONE (1996)  $\beta$ -L-raminopiranosídeo o valor da constante de acoplamento é 1 Hz, enquanto a  $\alpha$ -L-raminopiranosídeo é de 2 Hz. Este dados sugerem que a unidade de açúcar seja  $\alpha$ -L-raminopiranosídeo.

A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou sinais pouco intenso devido provavelmente à baixa quantidade de amostra, mas foi possível a análise deste espectro.

Através do experimento gHSQC (fig. 61) foi possível atribuir a correlação direta dos hidrogênios observados com seus respectivos carbonos. Esse espectro forneceu sinais em  $\delta$  103,7, 71,5, 72,1, 73,4, 71,9 e 17,7 correlacionados aos hidrogênios em  $\delta$  5,31, 3,65, 3,78, 3,50, 4,21 e 17,7, respectivamente, do açúcar raminose. Sinais em  $\delta$  99,9 e 94,7 correlacionam-se aos hidrogênios  $\delta$  6,19 e 6,34, respectivamente. Assim como em  $\delta$  109,6 (C2'/6') que se correlaciona ao hidrogênio  $\delta$  6,94 (2-H).

Através do experimento gHMBC (fig. 62 e tab. 17) foi possível atribuir qual carbono do anel flavonoídico a raminose estaria ligada. O acoplamento a longa distância do hidrogênio em  $\delta$  5,31 com o sinal em  $\delta$  136,3 e 71,5, sugere que a hidroxila anomérica da raminose está ligada ao C3 do esqueleto do flavonóide.

Com bases nos sinais fornecidos empregando técnicas de RMN de 1D e 2D, e com base nos dados da literatura (Agrawal, 1989) foi possível atribuir que a molécula **Ca11** refere-se 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O- $\alpha$ -L-raminopiranosídeo (fig. 58), previamente isolada de *Myrtus communis* (HAYDER *et al*, 2007) e identificada também em *Anacardium occidentale* (BRITO *et al*, 2007).

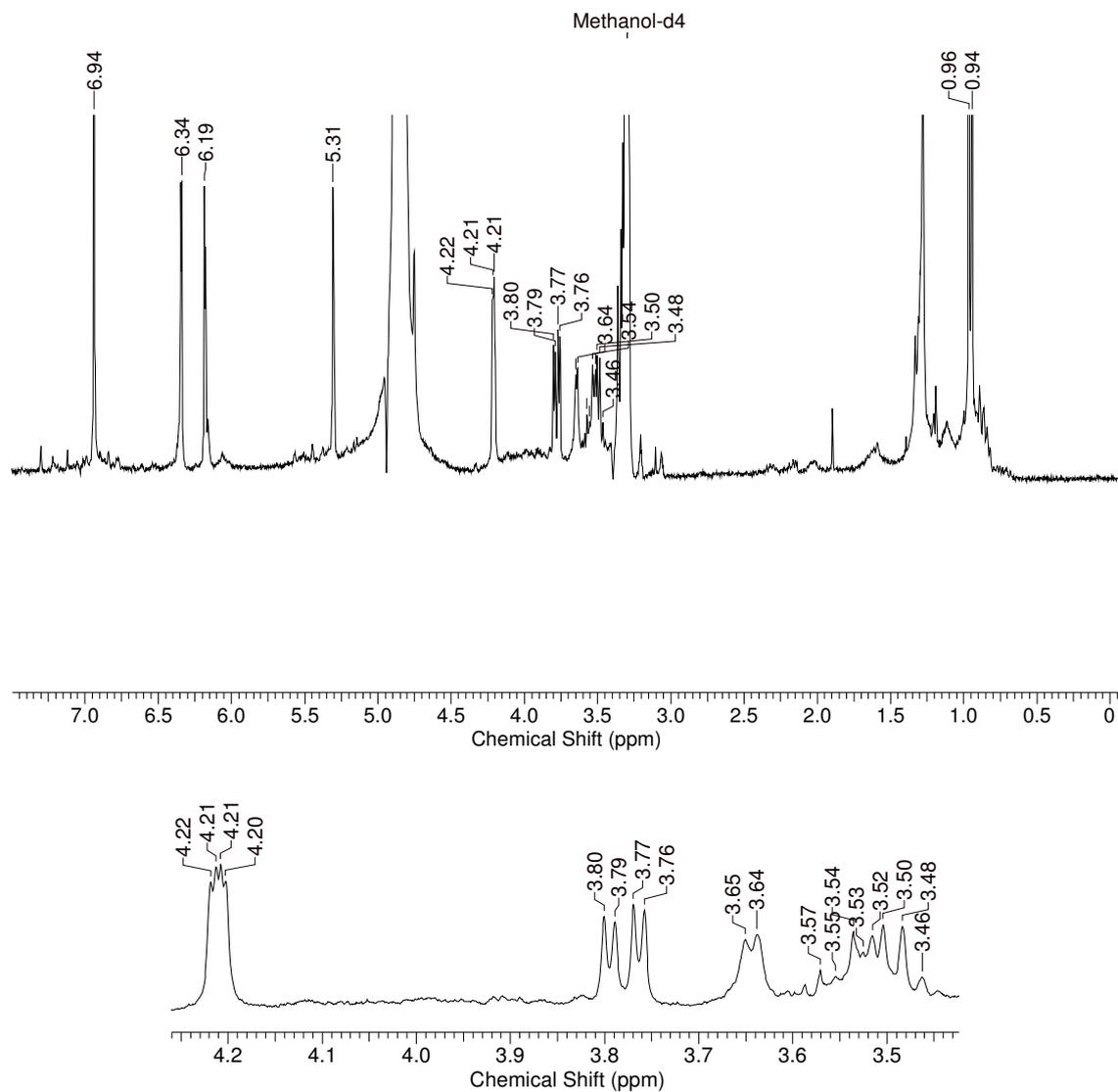


**Figura 58** – Estrutura molecular de 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O- $\alpha$ -L-raminopiranosídeo (**Ca11**).

**Tabela 17** – Deslocamento de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e acoplamento a longa distância (gHMBC) de Ca11.

Posição	$\delta$ de $^1\text{H}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$ e $J$ (Hz)	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$	gHMBC ( $\delta$ )	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$ *
2	-	158,6	-	158,4
3	-	136,3	-	134,5
4	-	179,7	-	178,0
5	-	163,2	-	162,8
6	6,19 <i>d</i> ( $J=3$ Hz)	99,9	163,2	99,9
7	-	166,0	-	165,4
8	6,34 <i>d</i> ( $J=3$ Hz)	94,7	158,6	94,4
9	-	158,6	-	157,5
10	-	Não observado	-	105,0
1'	-	Não observado	-	122,6
2'	6,94 <i>s</i>	109,6	137,9; 146,9; 158,2	109,5
3'	-	146,9	-	146,4
4'	-	137,9	-	137,0
5'	-	146,9	-	146,4
6'	6,94 <i>s</i>	109,6	137,9; 146,9; 158,2	109,5
1''	5,31 <i>d</i> ( $J=3$ Hz)	103,7	71,5; 136,3	103,2
2''	3,65 <i>d</i> ( $J=3$ Hz)	71,5	-	71,6
3''	3,78 <i>dd</i> ( $J=3$ Hz)	72,1	-	71,9
4''	3,50 <i>m</i>	73,4	71,9	73,1
5''	4,21 <i>brd</i> ( $J=3$ Hz)	71,9	73,4	71,6
6''	0,95 <i>d</i> ( $J=6$ Hz)	17,7	-	17,3

\*valores comparados com a literatura (AGRAWAL, 1989).



**Figura 59** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Ca11** (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ).

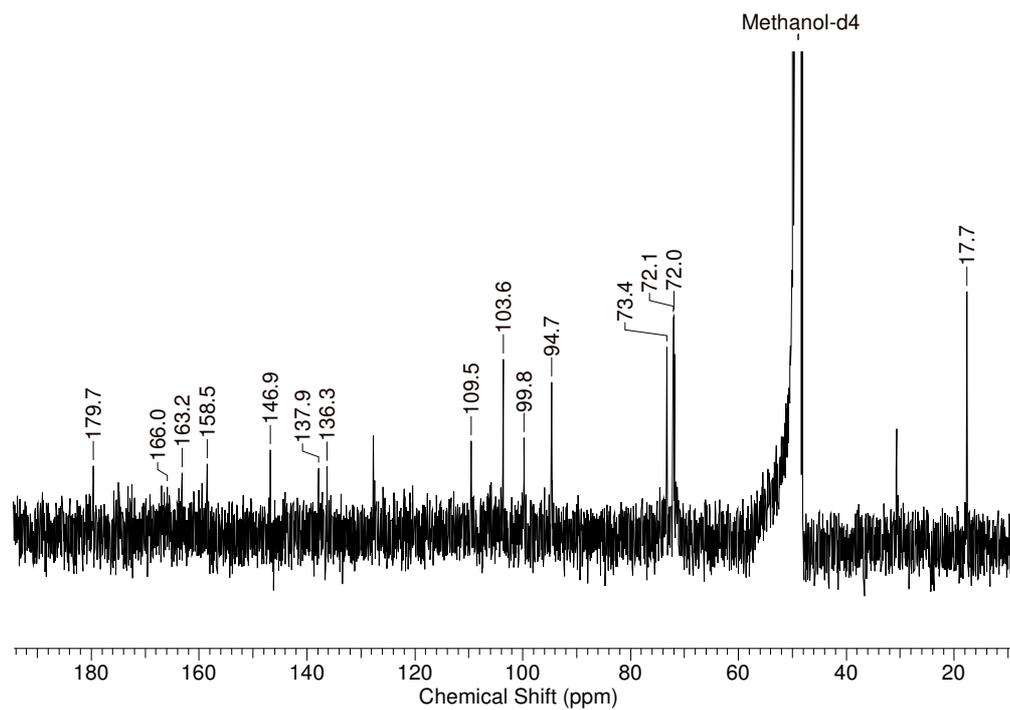


Figura 60 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **Ca11** (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ )

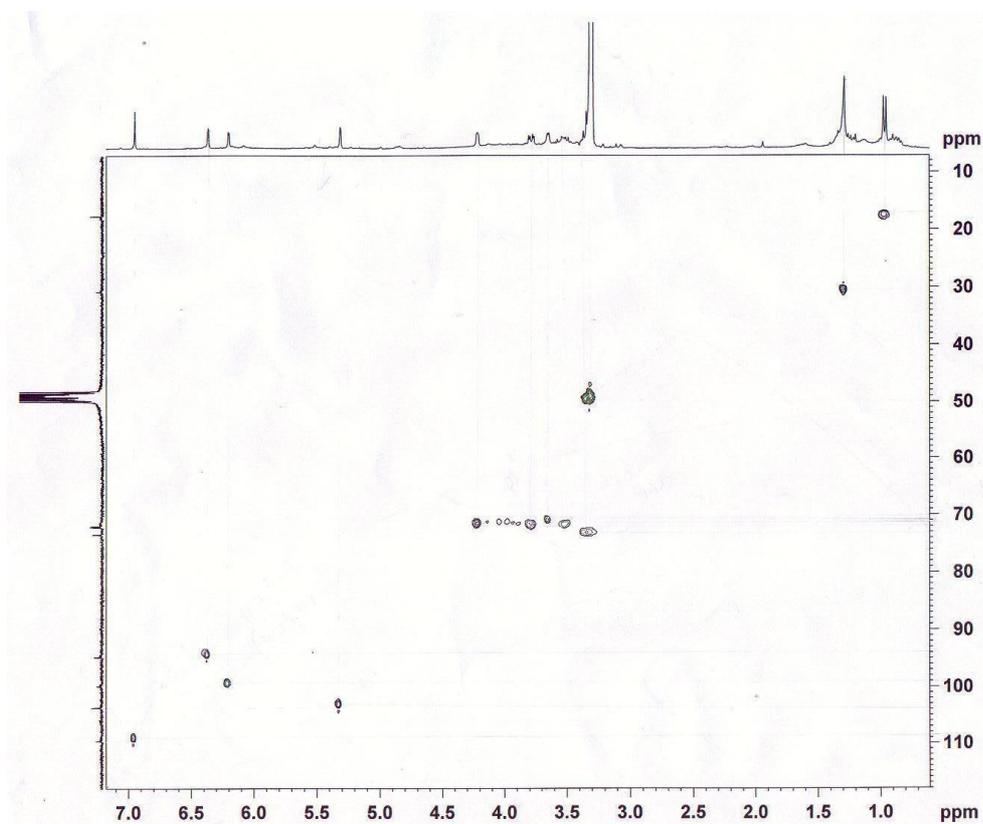
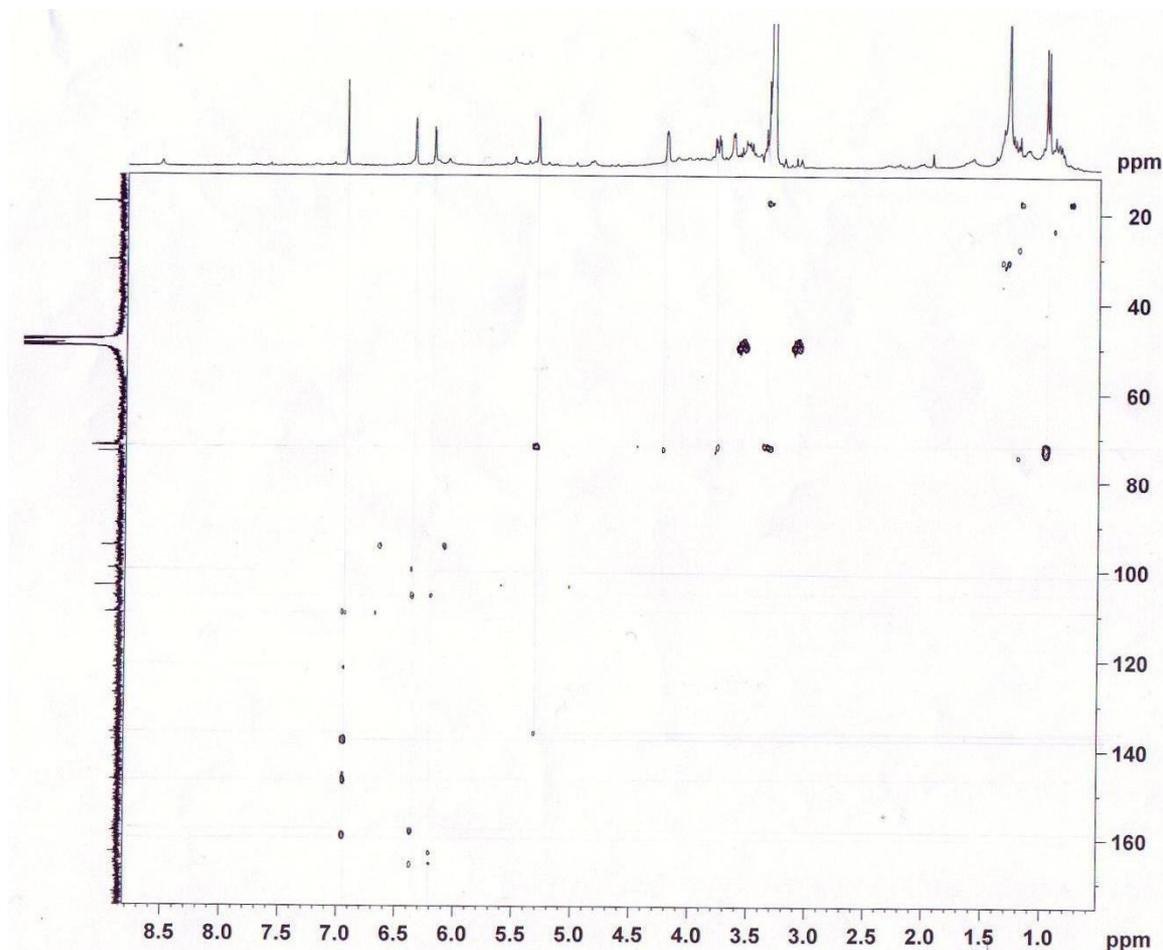


Figura 61 – Experimento de gHSQC de **Ca11** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ).



**Figura 62** – Experimento de gHMBC de **Ca11** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ).

#### 4.2.12. Identificação estrutural de **Ca12**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (fig. 64, tab. 18) da substância **Ca12** (fig.63) não se apresentou totalmente limpo. Pôde-se observar que uma das substâncias estava em maior quantidade devido a intensidade dos picos. Com base nisso, atribuímos a substância de maior intensidade um padrão de substituição para o anel A e B igual ao observado para **Ca10** e **Ca11**.

O espectro também sugeriu a presença de duas unidades de açúcar, devido aos singletos largos em  $\delta$  5,16 (1-H) e  $\delta$  5,30 (2-H) referentes aos hidrogênios anoméricos dos açúcares. Através da análise dos sinais na região entre  $\delta$  3,00 e 4,00, assim como a

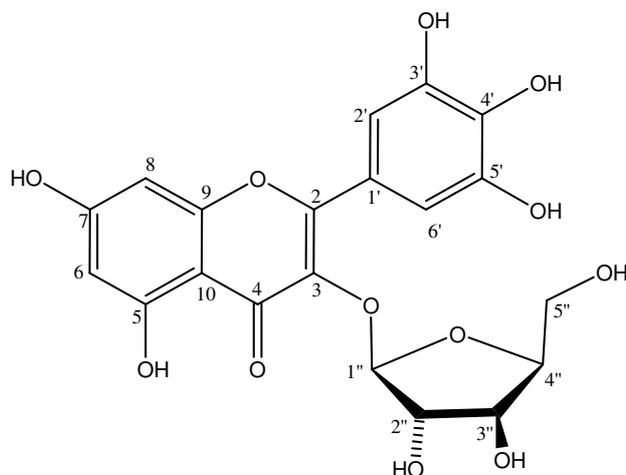
presença do dubleto em  $\delta$  0,97 (3-H), foi possível sugerir que a substância minoritária na amostra possuía todos os sinais apresentados pela amostra **Ca11**, mas com sinais do açúcar diferentes de uma raminose.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 65, tab. 18) mostrou 36 sinais, dos quais 19 apresentaram os mesmos deslocamentos observados para **Ca11**. Através dessa observação os sinais observados para 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O- $\alpha$ -L-raminopiranosídeo em todos os experimentos foram excluídos da análise. Dos 18 sinais restantes no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  associado ao DEPT 135 $^{\circ}$  (fig. 66), foi possível atribuir 10 sinais referentes a carbonos não ligados a hidrogênio, 7 sinais de carbonos metínicos e um sinal de carbono metilênico. Os sinais em  $\delta$  109,3, 87,9, 83,2, 78,4 e 83,2 referentes a todos os carbonos metínicos e o sinal de carbono metilênico em  $\delta$  62,5, comparados com dados da literatura (YASUKAWA *et al*, 1990) permitiu caracterizar o açúcar como  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo. O sinal em  $\delta$  109,3 é semelhante também ao deslocamento observado para uma unidade de açúcar apiose, mas os sinais referentes ao C-2'' e C-4'' deste possuem deslocamentos em  $\delta$  76,5 e 74,0, respectivamente, (AGRAWAL, 1989), diferentes dos observados para **Ca12** que foram em  $\delta$  83,2 (C-2'') e 87,9 (C-4''), o que descartou a hipótese desta unidade de açúcar ser uma apiose.

As correlações obtidas através do experimento de gHSQC (fig. 67) associado ao gHMBC (fig. 68, tab. 18) permitiram atribuir aos hidrogênios aos seus respectivos carbonos, assim como os acoplamentos à longa distância. O sinal em  $\delta$  6,94 mostrou correlação direta com o sinal em  $\delta$  109,6 (C2'/6') e acoplamento a longa distância com os sinais em  $\delta$  137,9 (C4'), 146,8 (C3'/5'), 121,9 (C1') e 159,4 (C2). O sinal em  $\delta$  6,17 mostrou correlação direta com o sinal em  $\delta$  94,7 (C-8) e acoplamento à longa distância com os sinais em  $\delta$  158,3 (C9), 105,5 (C10), 165,8 (C7) e 99,8 (C6). O sinal em  $\delta$  6,34 mostrou correlação direta com o sinal a  $\delta$  99,8 (C6) e acoplamento à longa distância com os sinais em  $\delta$  165,8 (C7), 162,1 (C5), 105,5 (C10) e 94,7 (C8). Foi possível estabelecer a posição na qual o açúcar estava ligado no flavonóide através do acoplamento à longa distância entre  $\delta$  5,46 (H1'') da arabinose e 134,8 (C3) do anel C do flavonóide.

Com bases nos sinais fornecidos empregando técnicas de RMN de 1D e 2D e com base nos dados da literatura (YASUKAWA *et al*, 1990), atribuiu-se que a molécula seja a 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (fig. 63), previamente isolada de *Lysimachia nummularia* (ITOKAWA *et al*, 1990) e identificada em

*Anacardium occidentale* (BRITO *et al*, 2007).



**Figura 63** – Estrutura molecular de 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (**Ca12**).

**Tabela 18** – Deslocamento de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e acoplamento a longa distância (gHMBC) de **Ca12**.

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$ e $J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$	gHMBC ( $\delta$ )	$\delta$ $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$ *
2	-	159,4	-	157,1
3	-	134,8	-	133,6
4	-	179,6	-	177,9
5	-	163,1	-	161,3
6	6,18 <i>d</i> ( $J=3$ Hz)	99,9	94,7; 105,8; 158,4; 163,1; 166,0	98,8
7	-	166,0	-	164,2
8	6,34 <i>d</i> ( $J=3$ Hz)	94,7	99,9; 105,8; 158,4; 166,0	93,5
9	-	158,4	-	156,5
10	-	105,8	-	104,2
1'	-	121,9	-	120,2
2'	7,13 <i>s</i>	109,6	121,9; 137,9; 159,4	108,4
3'	-	146,8	-	145,7
4'	-	137,9	-	136,6
5'	-	146,8	-	145,7
6'	7,13 <i>s</i>	109,6	121,9; 137,9; 159,4	108,4
1''	5,46 <i>br s</i>	109,4	78,7; 87,9; 134,8	108,1
2''	4,35 <i>br s</i>	83,2	78,7	82,1
3''	3,93 <i>dd</i> ( $J=3$ e 6 Hz)	78,7	78,7; 83,2; 109,4	77,4
4''	3,93 <i>dd</i> ( $J=3$ e 6 Hz)	87,9	78,7; 83,2; 109,4	86,1
5''	3,51 <i>d</i> ( $J=3$ Hz)	62,5	78,7	61,1

\*valores comparados com a literatura (YASUKAWA *et al*, 1990).



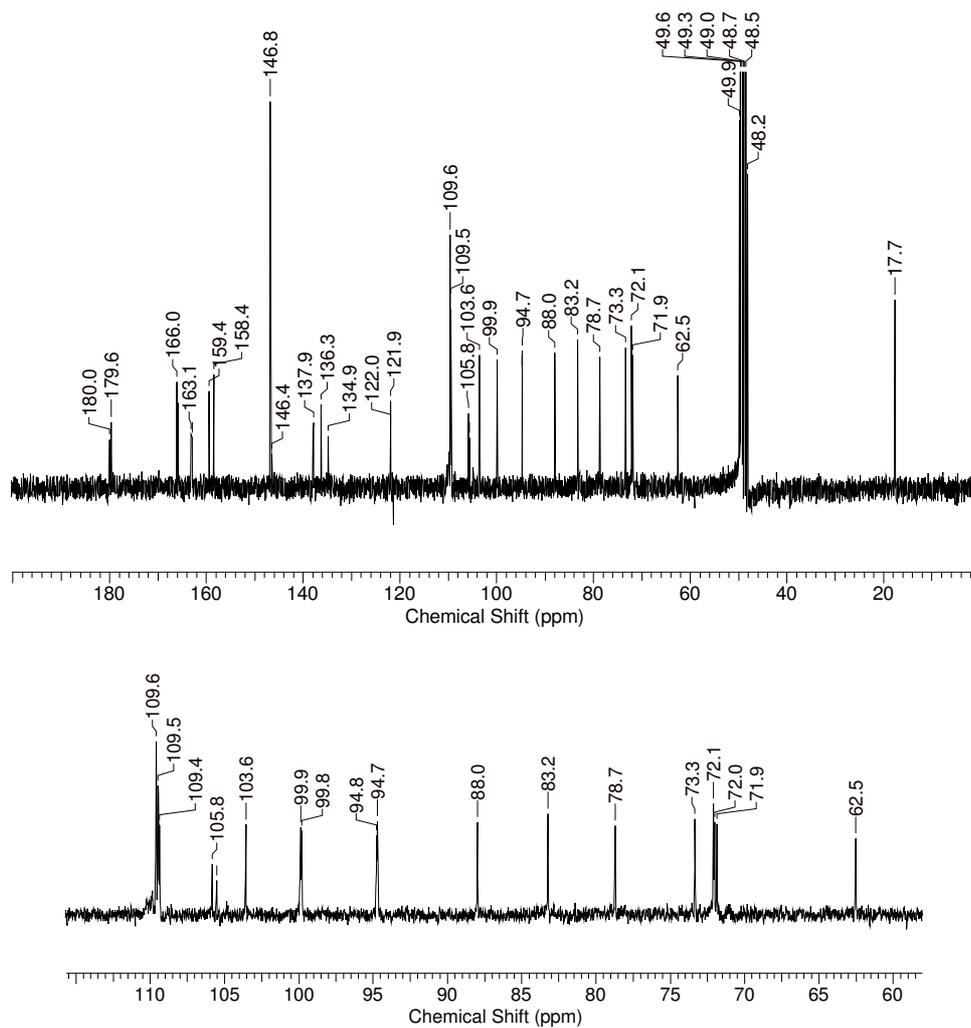


Figura 65 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da Ca12 (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}, \delta$ ).

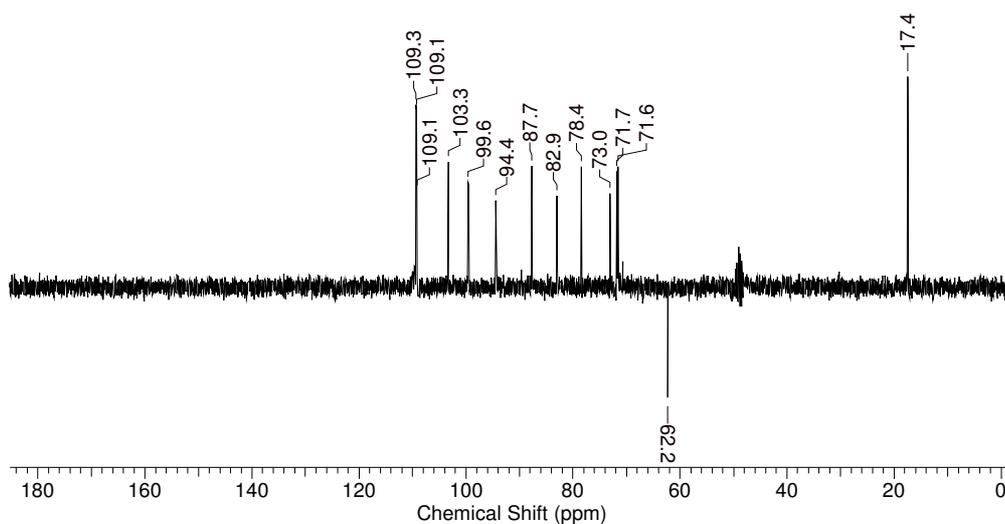
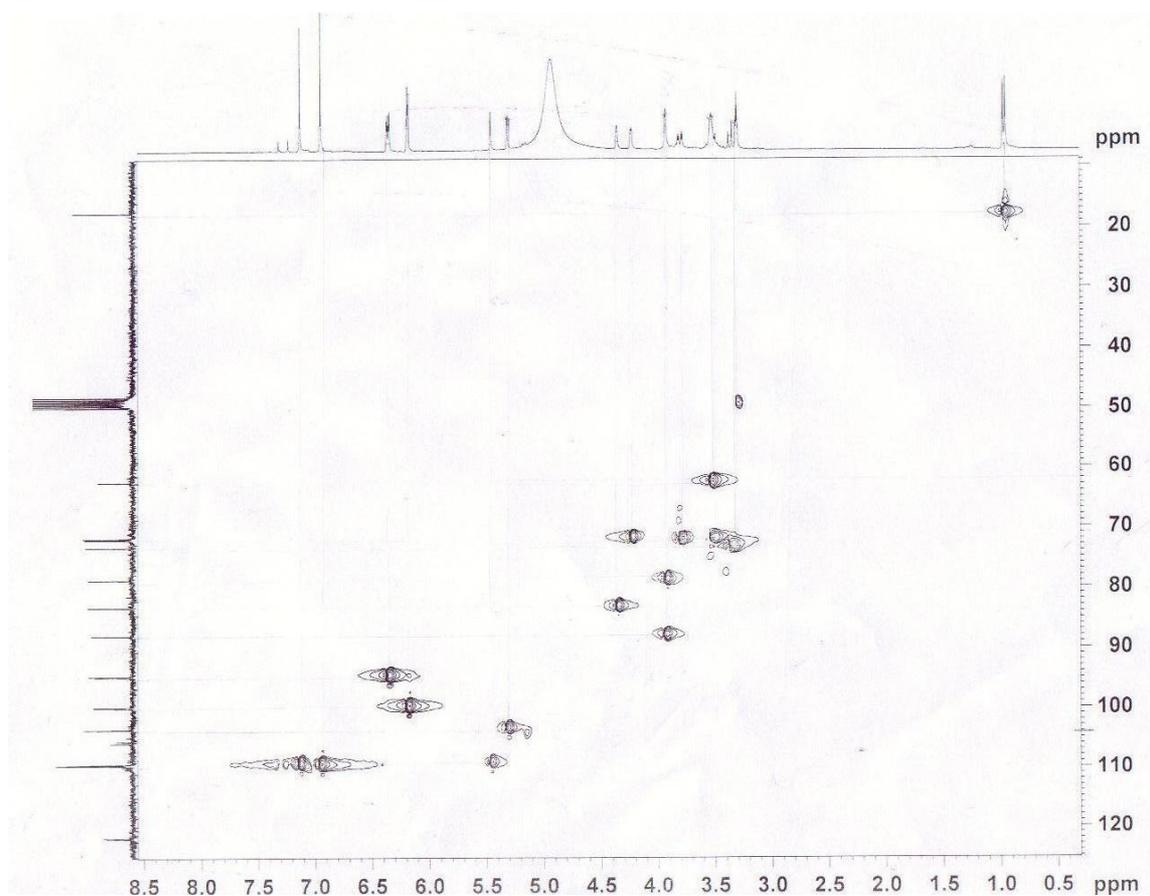
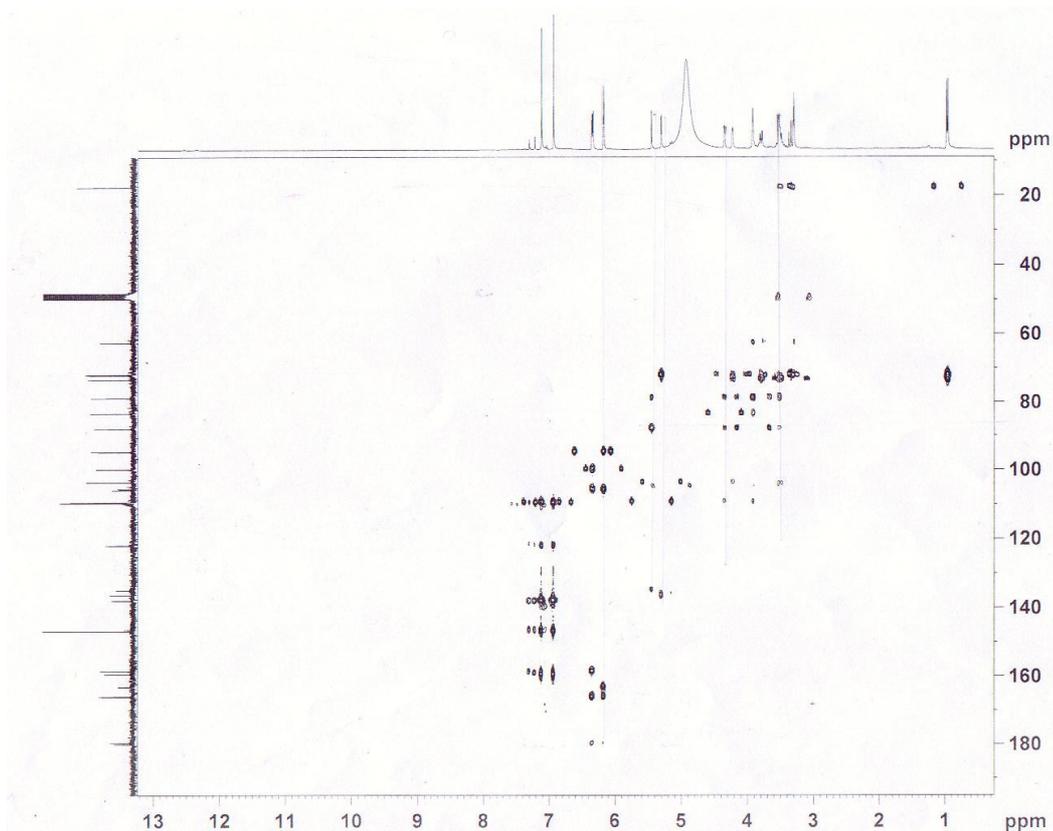


Figura 66 – Espectro de DEPT 135° de Ca12 (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}, \delta$ ).



**Figura 67** – Experimento de gHSQC de **Ca12** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ).



**Figura 68** – Experimento de gHMBC de **Ca12** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ).

#### 4.2.13. Identificação estrutural de **Ca13**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (fig. 71, tab. 19) da **Ca13** (fig. 69) apresentou sinais na região aromática semelhante ao observado para miricetina, mas um pouco mais complexo. Foram observados dois dubletos em  $\delta$  6,39 e 6,20 correspondentes aos hidrogênios 6 e 8 do anel A e o singleto em  $\delta$  7,13 referente aos hidrogênios 2' e 6' do anel B. Além destes sinais o espectro mostrou também um singleto na região aromática em  $\delta$  7,00 (2-H) sugerindo a presença de outro anel aromático além do flavonóide. Foram observados sinais também na região de  $\delta$  4,00 a 5,00 indicando a presença de açúcar.

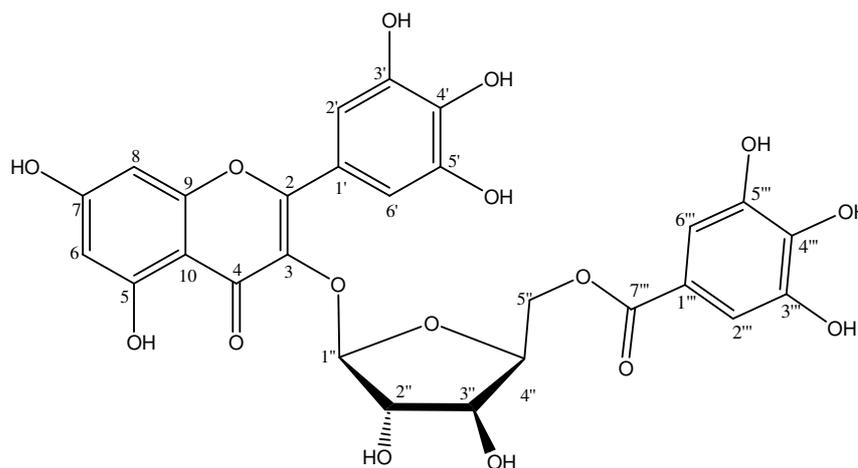
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 72, tab. 19) associado ao DEPT 135 ° (fig. 73) mostrou 26 sinais, dos quais apenas 23 são referentes a molécula, outros são de impurezas na amostra. Destes 23 sinais, 14 sinais são referentes a carbonos não ligados a hidrogênio, 8 sinais correspondem a carbonos metínicos e 1 sinal de carbono metilênico.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  juntamente com experimento gHSQC (fig. 74) permitiu a

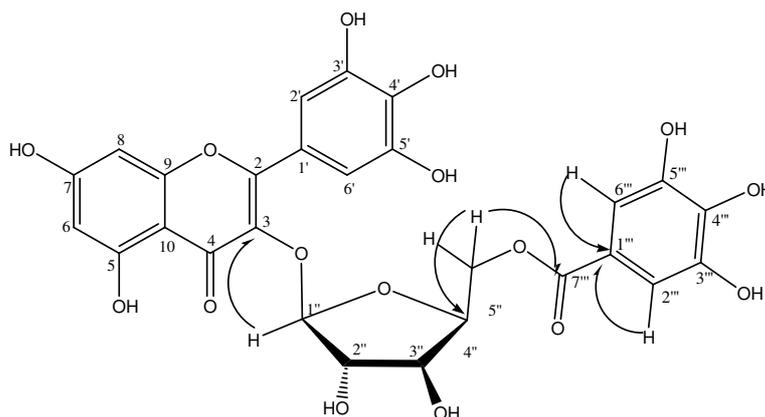
correlação direta entre os hidrogênios ligados aos respectivos carbonos. Os sinais de hidrogênio na região aromática em  $\delta$  6,39 *dd* (1-H,  $J=3$  Hz), 6,20 *dd* (1-H,  $J=3$  Hz), 7,13 *s* (1-H,  $J=3$  Hz) e 7,00 *s* (2-H,  $J=3$  Hz) mostraram correlação direta com os carbonos em  $\delta$  99,2 (1-C), 94,8 (1-C), 109,6 (2-C) e 110,2 (2-C). Essas correlações indicam a presença de um flavonóide e o último valor sugere a presença de um grupo galoil. Além disso, os sinais de hidrogênios não aromáticos em  $\delta$  3,93, 4,01, 4,17, 4,40 e 5,47 mostraram correlação direta com os carbonos em  $\delta$  79,1, 84,6, 64,5, 83,6 e 109,5, os quais indicaram a presença do açúcar arabinose, mas com deslocamentos diferentes ao observado para **Ca12**.

A localização do açúcar foi determinada através das correlações de acoplamento a longa distância realizada pelo experimento de *gHMBC* (fig. 75, tab. 19), onde foi observado que o sinal em  $\delta$  5,47 referente ao hidrogênio anomérico mostrou correlação com o carbono em  $\delta$  134,9, atribuído ao C3 do anel flavonoídico C. O hidrogênio em  $\delta$  4,17 ligado ao carbono metilênico do açúcar C5'' em  $\delta$  64,5 mostrou acoplamento a longa distância com  $\delta$  168,1, referente ao carbono carbonílico C7''' da unidade de galoil. Isto sugere que a hidroxila ligada ao C5'' da unidade de açúcar está ligada através de uma ligação éster com o C7 do galoil.

Com base nestes sinais de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e as correlações obtidas através dos experimentos de *gHSQC* e *gHMBC* pode-se sugerir que a estrutura elucidada é a 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O-(5''-O-galoil)- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (fig. 69), inédita na literatura.



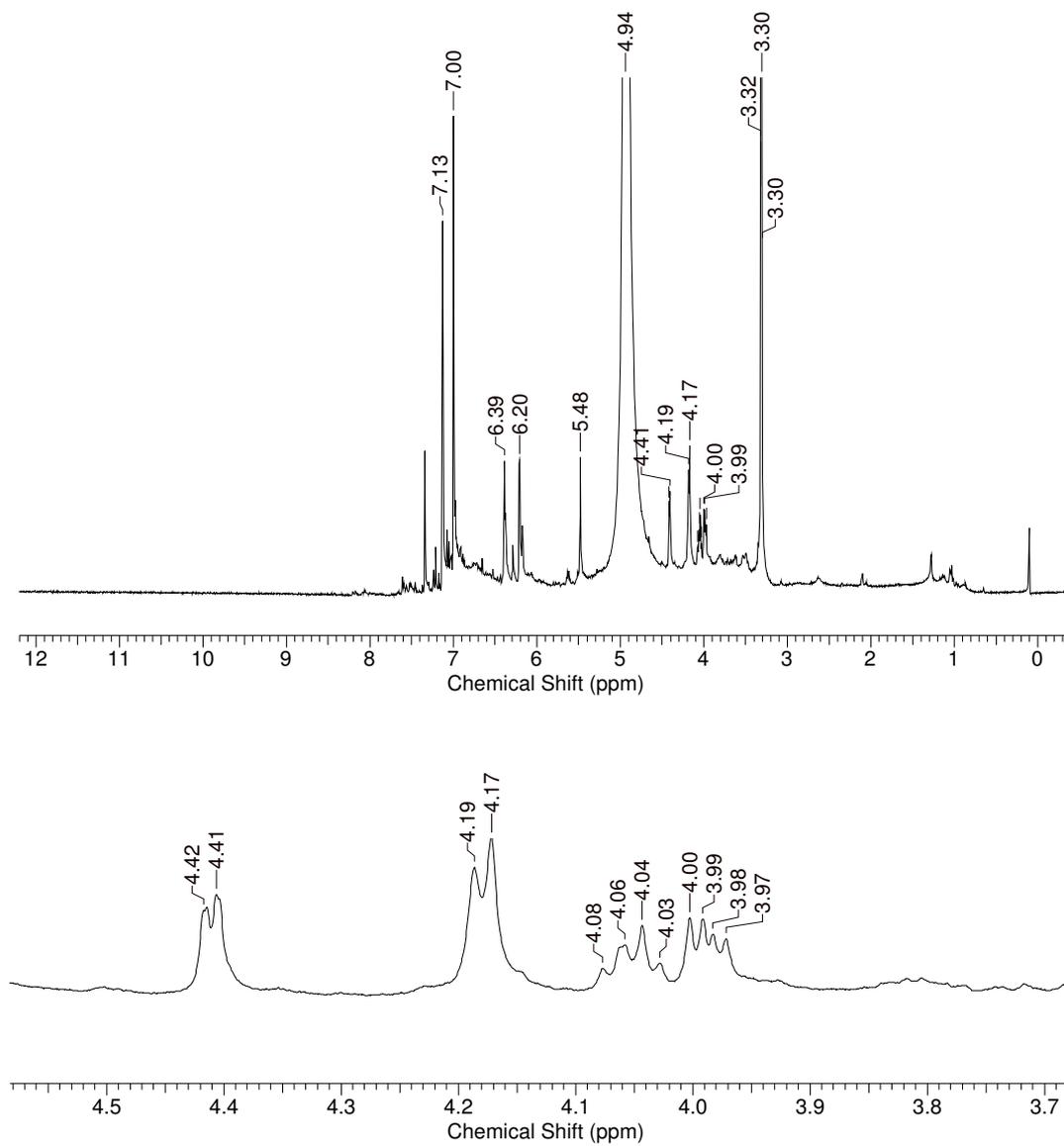
**Figura 69** – Estrutura molecular de 3,5,7,3',4',5'-hexaidróxi-flavonol-3-O-(5''-O-galoil)- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (**Ca13**).



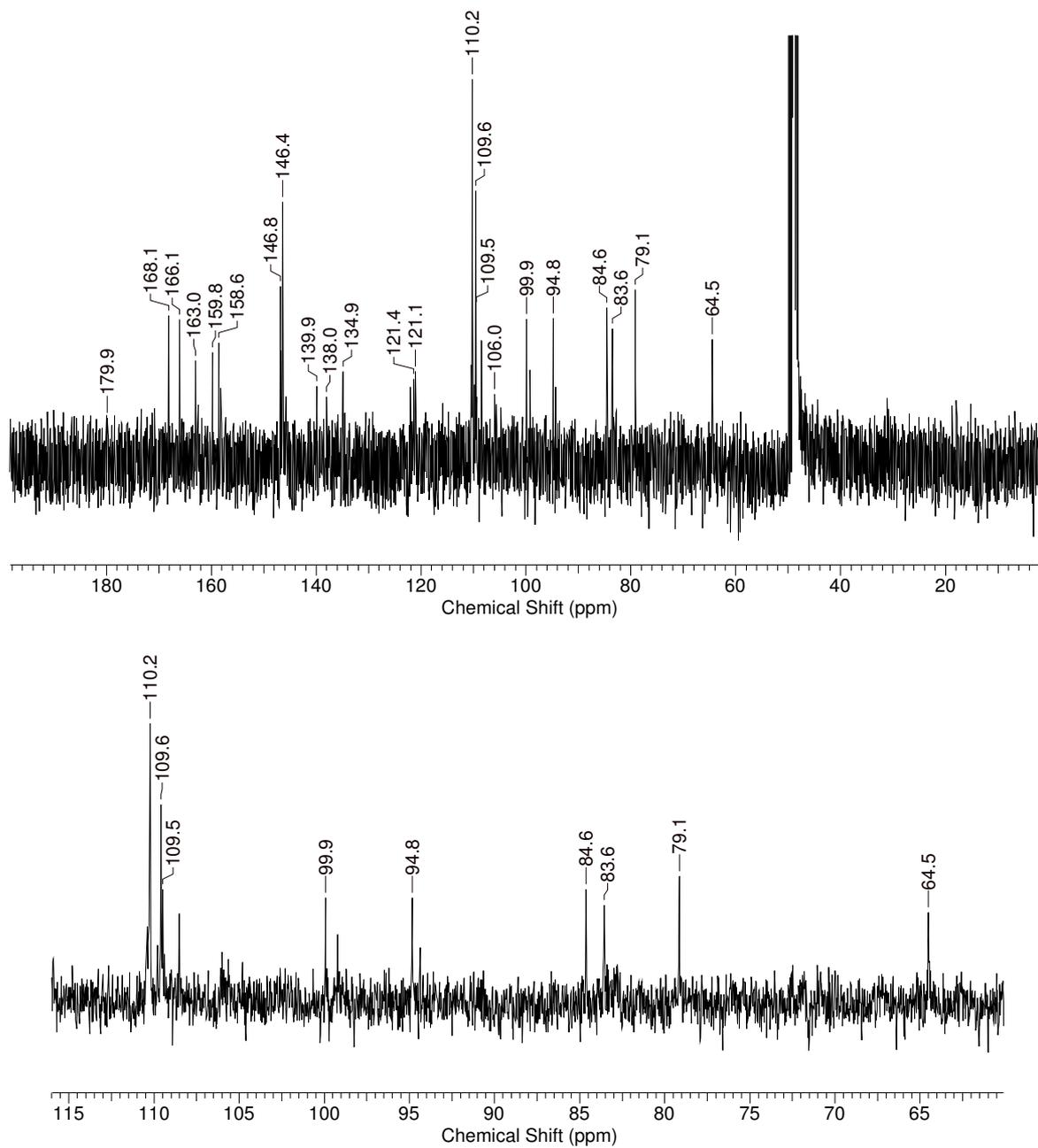
**Figura 70** – Principais correlações de gHMBC da estrutura **Ca13**.

**Tabela 19** – Deslocamento de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e acoplamento a longa distância (gHMBC) de **Ca13**.

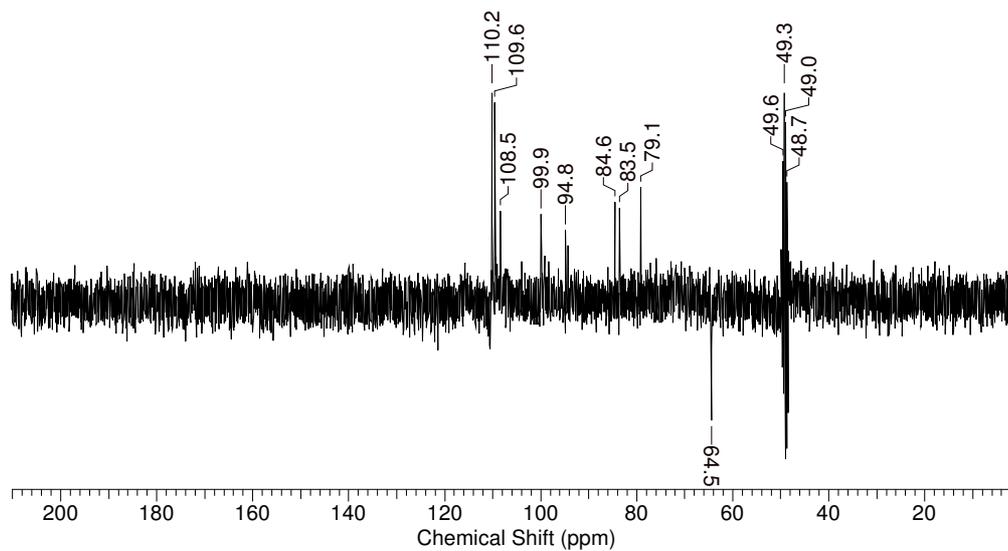
Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$ e $J$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$	gHMBC ( $\delta$ )
2	-	159,8	-
3	-	134,9	-
4	-	179,9	-
5	-	163,1	-
6	6,39 <i>d</i> ( $J=3$ Hz)	99,2	99,2; 106,0; 158,6
7	-	166,0	-
8	6,20 <i>d</i> ( $J=3$ Hz)	94,8	94,8; 106,0; 163,1;
9	-	158,6	-
10	-	106,0	-
1'	-	121,4	-
2'	7,13 <i>s</i>	109,6	121,4; 138,0; 146,8;
3'	-	146,8	-
4'	-	138,0	-
5'	-	146,8	-
6'	7,13 <i>s</i>	109,6	121,4; 138,0; 146,8;
1''	5,47 <i>br s</i>	109,47	134,9; 83,6; 84,6; 79,1
2''	4,40 <i>br s</i>	83,6	64,5; 79,1; 109,5
3''	3,93 <i>dd</i> ( $J=3$ e 9 Hz)	84,6	64,6; 83,6
4''	4,01 <i>dd</i> ( $J=3$ e 15 Hz)	79,1	79,1
5''	4,17 <i>d</i> ( $J=6$ Hz)	64,5	79,1; 84,6; 168,1
1'''	-	121,1	-
2'''	7,00 <i>s</i>	110,2	121,1; 139,9; 146,3;
3'''	-	146,3	-
4'''	-	139,9	-
5'''	-	146,3	-
6'''	7,00 <i>s</i>	110,2	121,1; 139,9; 146,3;
7'''	-	168,1	-



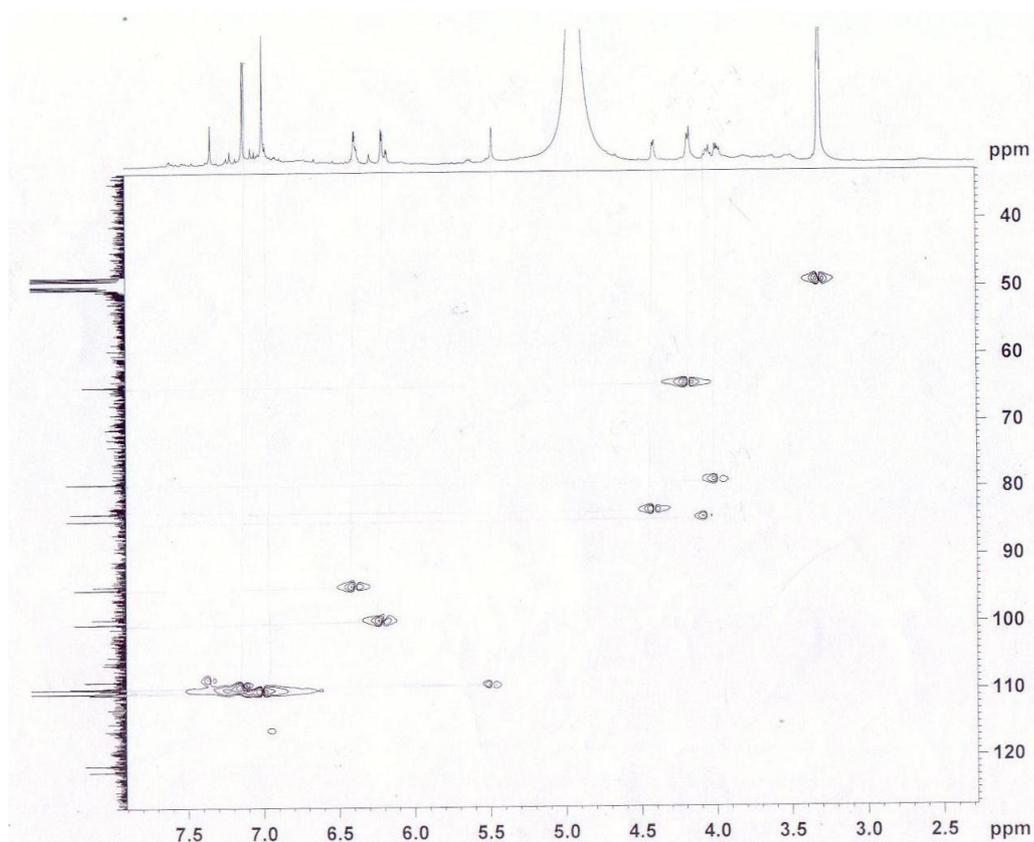
**Figura 71** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Ca13** (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ).



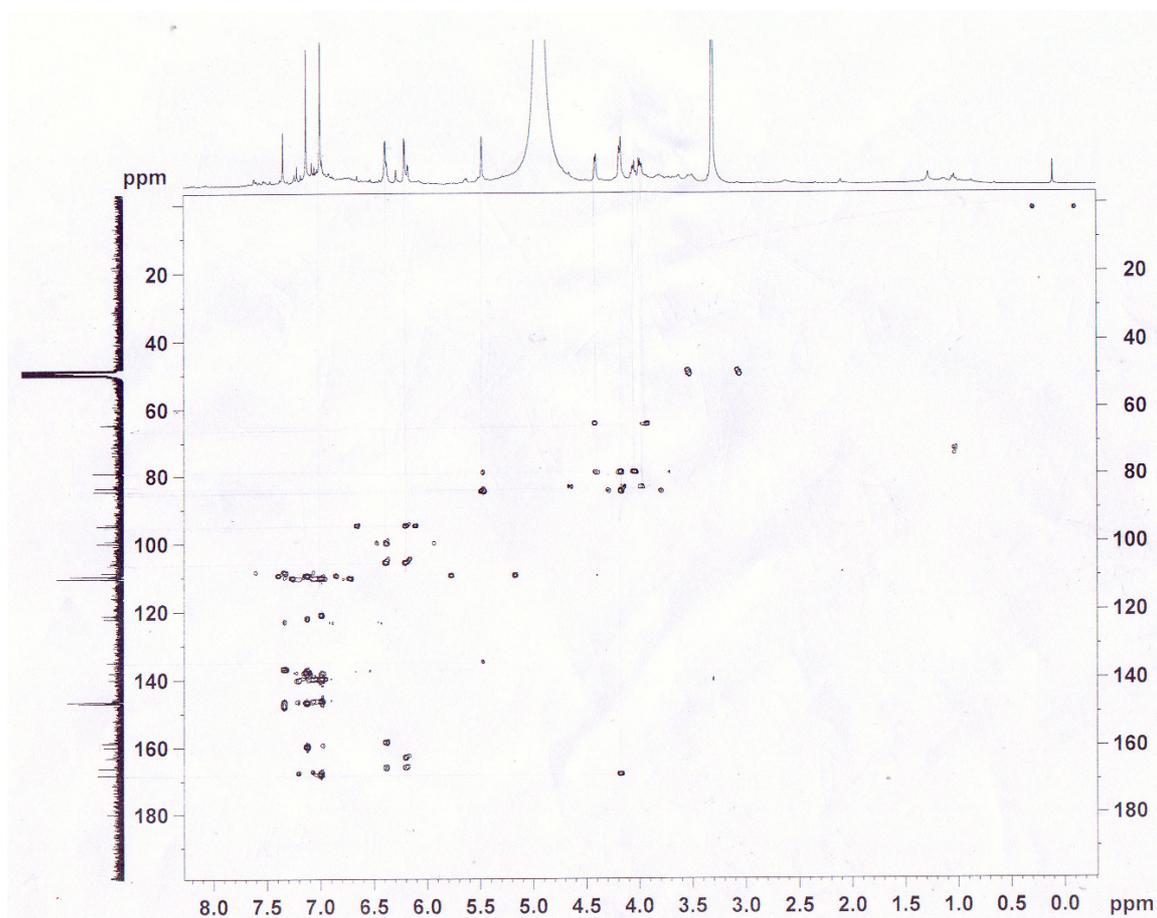
**Figura 72** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **Ca13** (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}, \delta$ ).



**Figura 73** - Espectro de DEPT 135° de **Ca13** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ ).



**Figura 74** - Experimento de gHSQC de **Ca13** (300 MHz para <sup>1</sup>H, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ ).



**Figura 75** - Experimento de gHMBC de **Ca13** (300 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ).

### 4.3. Avaliação do perfil cromatográfico e determinação do teor das substâncias

As substâncias isoladas **Ca2** a **Ca13** e a substância 2',4'-diidróxi-3',5'-dimetil-6'-metóxicalcona (**Ca14**), sendo esta última isolada em outra espécie por outro aluno do grupo, foram monitoradas no **EMEOH** e nas amostras submetidas a avaliação sazonal (**Ca<sub>v</sub>**, **Ca<sub>o</sub>** e **Ca<sub>ip</sub>**) empregando CLAE-DAD.

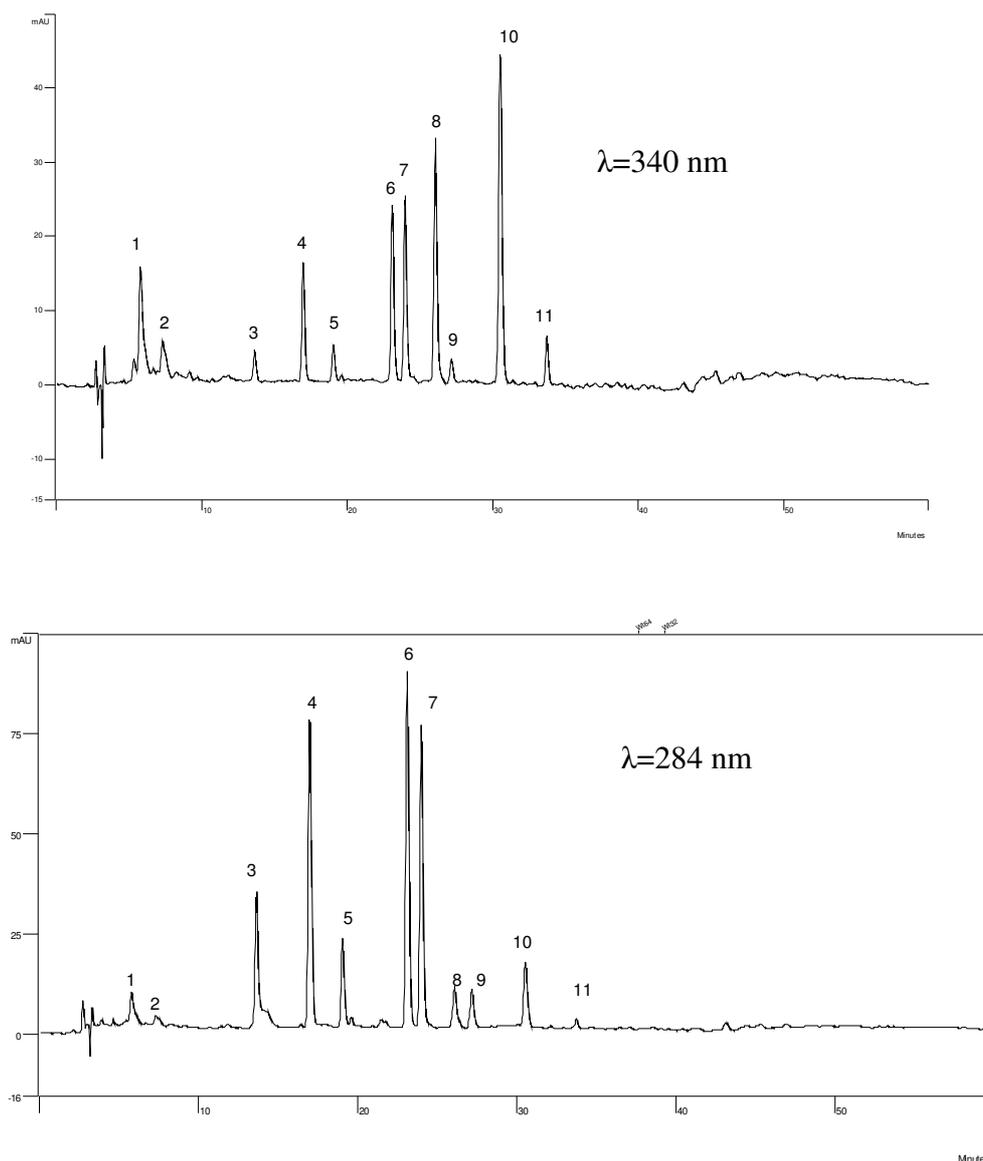
#### 4.3.1 Extrato metanólico (**EMeOH**)

A tabela 20 mostra o tempo de retenção de cada pico referente às substâncias **Ca2** a **Ca14** na condição **1**, após análise do tempo de retenção e do espectro de UV/Vis individualmente, para cada pico (fig. 76).

Os espectros de UV/Vis dos picos **3** a **9** e **11** estão apresentados na figura 77, enquanto que os picos **1**, **2**, **10** apresentaram vários espectros de UV/Vis ao longo do pico, sugerindo que estes estão impuros, conseqüentemente não foi possível obter um espectro demonstrativo dos mesmos.

**Tabela 20** – Tempo de retenção dos picos referente ao cromatograma do **EMeOH**.

Pico	Substâncias	Tempo de retenção (min)
1	<b>Ca10, Ca12 e Ca13</b> em mistura	5,77
2	<b>Ca11</b> em mistura	7,28
3	<b>Ca3</b>	13,62
4	<b>Ca2</b>	16,96
5	-	19,03
6	<b>Ca5</b>	23,08
7	<b>Ca6</b>	23,96
8	<b>Ca9</b>	26,04
9	<b>Ca4</b>	27,13
10	<b>Ca7 e Ca8</b>	30,50
11	<b>Ca14</b>	33,69

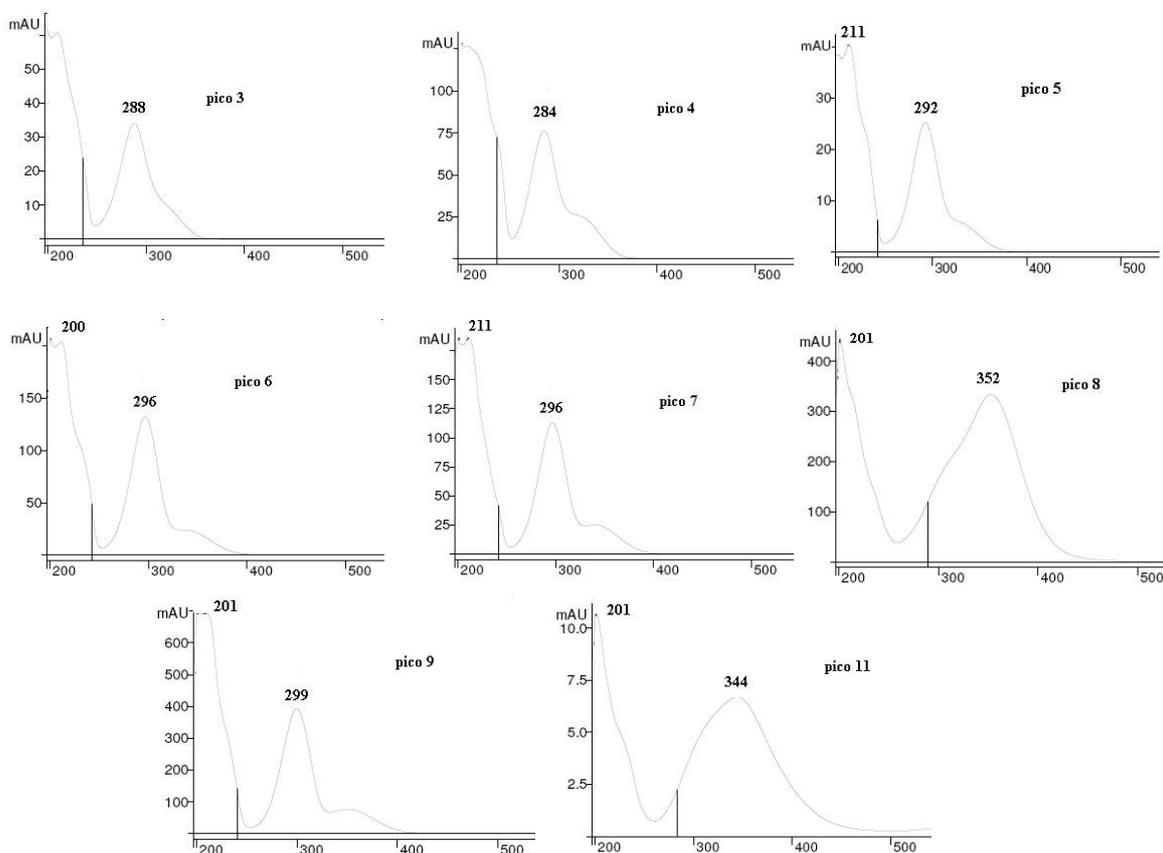


**Figura 76** – Cromatogramas representativos do extrato metanólico **EMeOH** em 284 e 340 nm.

O sistema CLAE-DAD permitiu caracterização das substâncias que possuem grupos cromóforos, assim como quantificação/monitoramento destas substâncias com base no tempo de retenção associado ao espectro de absorção molecular obtido na região do UV/Vis.

Cromóforos são estruturas moleculares que absorvem na região do UV-Vis e incluem grupos nos quais as transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$  são possíveis (VOGEL, 1989). Os espectros eletrônicos de moléculas orgânicas contendo grupos cromóforos são

normalmente complexos, porque a superposição de transições vibracionais com transições eletrônicas leva a uma combinação intrincada de linhas superpostas (SKOOG *et al*, 2002).



**Figura 77** – Espectros de absorção molecular na região do UV-Vis dos picos referentes às substâncias presentes no extrato **EMeOH** na condição **1**.

Muitas bandas de absorção são características de determinados grupos funcionais. De acordo com BHAT *et al*, 2007, banda de absorção na região de 200-290 nm (banda II) e 300-400 nm (banda I) sugerem a presença de sistemas benzoil e cinamoil, respectivamente. Logo a técnica de espectroscopia de absorção molecular na região de UV-Vis é útil na investigação destes sistemas.

As bandas de absorção máxima observada na região de 200 a 299 nm são referentes aos picos **2**, **3**, **6**, **7** e **9** foram atribuídas as substâncias **Ca3**, **Ca2**, **Ca5**, **Ca6** e **Ca4**, respectivamente. Este comprimento de onda é referente ao sistema benzoil do esqueleto de flavanona, enquanto as bandas de absorção na região entre 300 e 350 nm dos picos **8** e **11** são referentes as substâncias **Ca9** e **Ca14**, respectivamente, as quais possuem este espectro

de UV característico do sistema cinamoil de chalconas. Estes valores estão de acordo com o descrito por MARKHAM (1982), ao atribuir valores dos espectros de UV/Vis para as flavanonas de 275-295 nm (banda II, intensa) e 300-330 nm (banda I) e para as chalconas 230-270 nm (banda II) e 340-390 nm (banda I, intensa).

Após a análise da pureza dos espectros de UV/Vis das substâncias isoladas identificadas no cromatograma do **EMeOH**, foram utilizadas curvas analíticas para quantificação das mesmas neste extrato.

As substâncias **Ca2**, **Ca4**, **Ca5**, **Ca6**, **Ca9** e **Ca14** foram quantificadas, porque a condição 1, que foi utilizada permitiu boa separação dos picos, principalmente a partir do tempo de retenção de 10 minutos, com exceção para as substâncias **Ca7** e **Ca8**, as quais possuem o mesmo tempo de retenção, porém espectro de UV/Vis diferente.

A condição 2 foi empregada, na tentativa de melhorar a separação dos picos 1 e 2 e detectar as substâncias **Ca10** a **Ca13**, respectivamente, as quais possuem tempo de retenção na faixa de 2-10 minutos. Porém essa condição ainda não se mostrou a melhor para a separação dos picos do início do cromatograma (fig. 76), assim como não permitiu boa separação para os picos 3-11. Outras metodologias para desenvolvimento de melhores condições cromatográficas não foram testadas, devido ao curto espaço de tempo entre isolamento e monitoramento.

A tabela 21 mostra os parâmetros de regressão linear da curva analítica de cada substância quantificada e o teor expresso em mg do analito por g de extrato. As flavanonas **Ca5** e **Ca6** mostraram ser as substâncias majoritárias no extrato, seguido pela chalcona **Ca14**. Todas as substâncias quantificadas representam um total de 15,90 % das substâncias presentes no **EMeOH**.

**Tabela 21** – Dados de regressão linear da curva analítica das substâncias **Ca2**, **Ca4**, **Ca5**, **Ca6**, **Ca9** e **Ca14**.

Substâncias	Teor (mg/g)	F.I.	B	A	R	N
<b>Ca2</b>	27,40	0.04-10.80	4.95919.10 <sup>6</sup>	-161369.02552	0.99962	6
<b>Ca5</b>	42,50	0.16-4.10	6.58015.10 <sup>6</sup>	-1.3073.10 <sup>6</sup>	0.99889	5
<b>Ca6</b>	33,90	0.12-3.67	1.80351.10 <sup>7</sup>	-2.37114.10 <sup>6</sup>	0.99978	5
<b>Ca9</b>	18,10	0.20-5.00	5.60768.10 <sup>6</sup>	-1.29557.10 <sup>6</sup>	0.99825	5
<b>Ca4</b>	9,38	0.21-5.00	5.15469.10 <sup>6</sup>	-564964.75892	0.99921	5
<b>Ca14</b>	27,70	3.00-28.00	507205.62017	-22757.06765	0.99860	5

F.I.: faixa de intervalo. B: coeficiente linear. A: coeficiente angular. R: coeficiente de correlação.

#### 4.3.2. Análise das amostras submetidas à avaliação sazonal: *Cav*, *Cao* e *Caip*

As figuras 78, 79, 80 e 81 mostram os perfis cromatográficos dos extratos hexânicos (**CavHex**, **CaoHex** e **CaipHex**), acetato de etila (**CavAcOEt**, **CaoAcOEt** e **CaipAcOEt**), etanólico (**CavEtOH**, **CaoEtOH** e **CaipEtOH**) e metanólico (**CavMeOH**, **CaoMeOH** e **CaipMeOH**), respectivamente, em 284 nm. Este comprimento de onda foi escolhido, tendo em vista que é o mais representativo da amostra, pois foi possível detectar todos os picos presentes do início ao fim do cromatograma. Primeiramente foram avaliados e comparados qualitativamente os perfis cromatográficos de cada extrato de mesma polaridade, mas em diferentes amostras, e posteriormente foram quantificadas as substâncias em cada amostra (**Cav**, **Cao** e **Caip**).

As amostras dos extratos hexânico (fig. 78) mostraram perfis cromatográficos semelhantes em relação à presença dos picos 4 (**Ca2**), 6 (**Ca5**), 7 (**Ca6**), 8 (**Ca9**), 9 (**Ca4**), 10 (**Ca7** e **Ca8**) e 11 (**Ca14**). A diferença nos tempos de retenção dessas substâncias pode estar associado a polaridade e interação com a fase estacionária. A chalcona **Ca14** possui maior caráter lipofílico e foi a última a eluir, enquanto as flavanonas eluíram primeiro, com exceção da **Ca4**, porém esta também possui característica apolar como a **Ca14**.

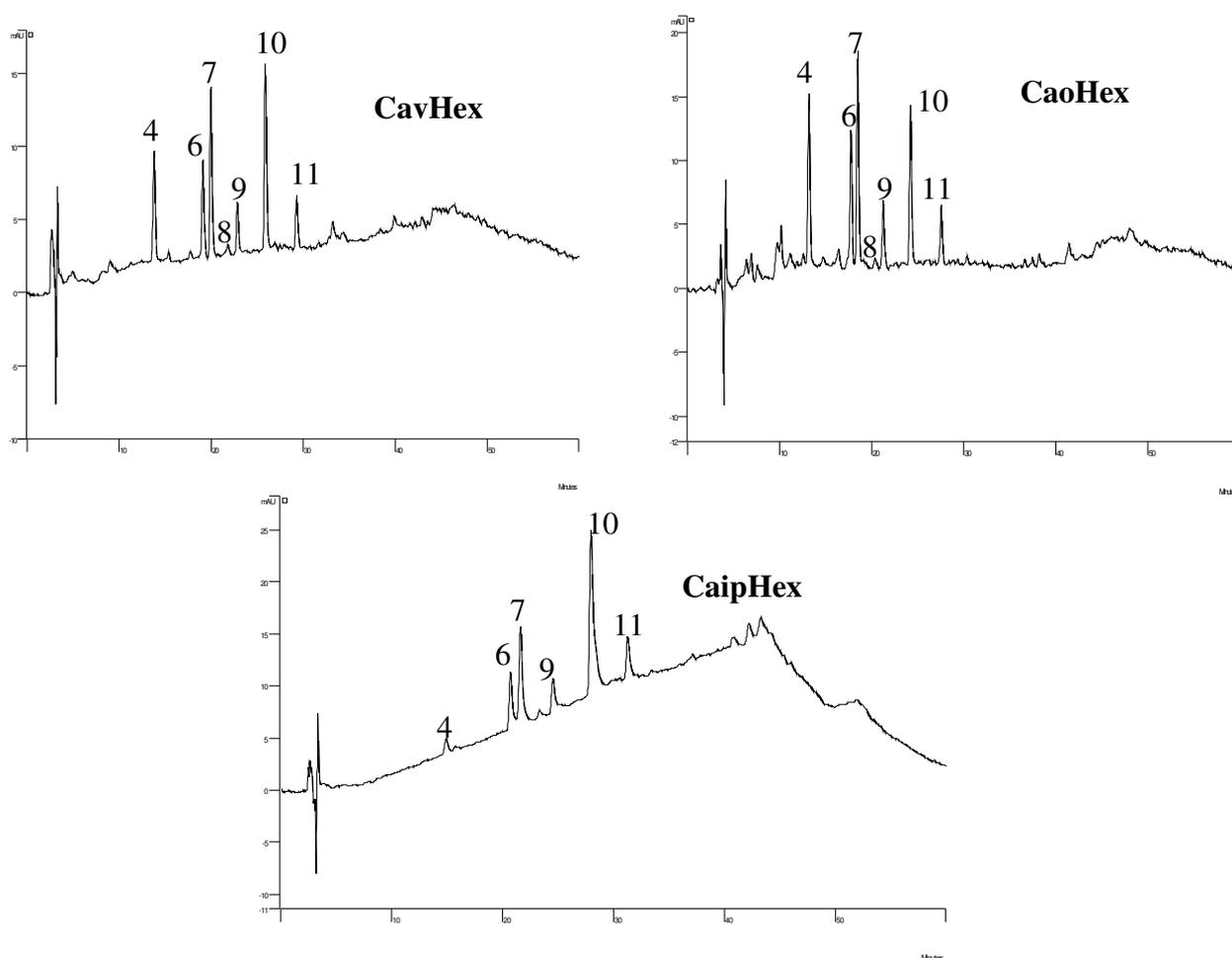
Em relação às amostras obtidas dos extratos acetato de etila (fig. 79), foi possível observar que as amostras **Cav** e **Cao** são semelhantes, mas a **Caip** apresenta diferenças, principalmente pelo aparecimento de um pico entre os picos **7** e **8**, além da ausência dos picos **1-3**. O solvente acetato de etila é mais polar do que o hexano, logo podemos observar a presença de picos no início do cromatograma, indicando a presença de substâncias com características mais polares.

O perfil cromatográfico dos extratos etanólicos de folhas de *C. adamantium* coletadas em diferentes estações do ano foi alterado (fig. 80). No verão o extrato mostrou maior quantidade de picos do que o outono e a primavera, os quais mostraram maior quantidade dos picos no início do cromatograma, mas com espectros de UV diferentes entre si. Sugere-se que esta diferença no perfil cromatográfico esteja associada ao estágio fenológico do vegetal, onde os picos detectados a partir do tempo de retenção de 10 minutos presentes em **Cav** são convertidos em outras substâncias mais polares que estão no início do cromatograma.

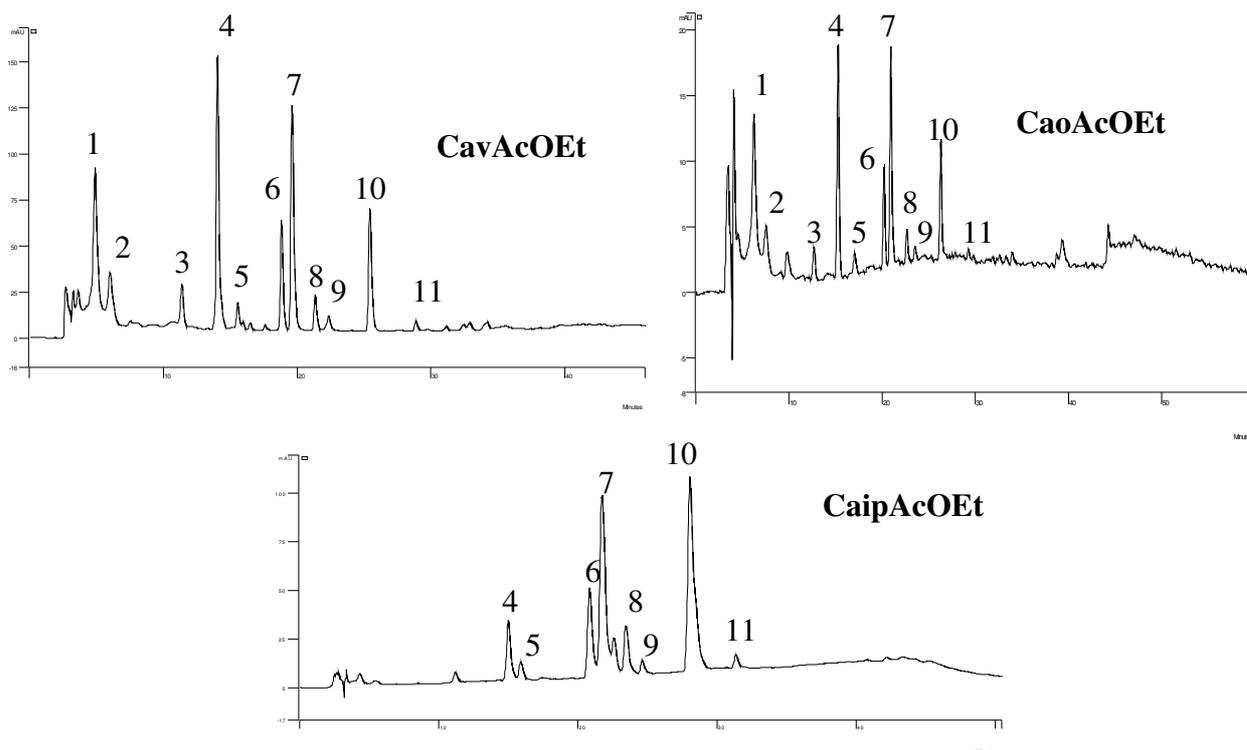
Os extratos metanólicos (fig. 81) apresentaram perfis cromatográficos semelhantes

em relação a presença dos picos iniciais, todavia estes picos são diferentes entre os extratos quando observados o seu espectro de UV, mas os espectros são semelhantes ao das substâncias **Ca10-Ca13** (classe das flavanonas), sugerindo a presença desta mesma classe de substâncias, mas provavelmente com substituintes diferentes.

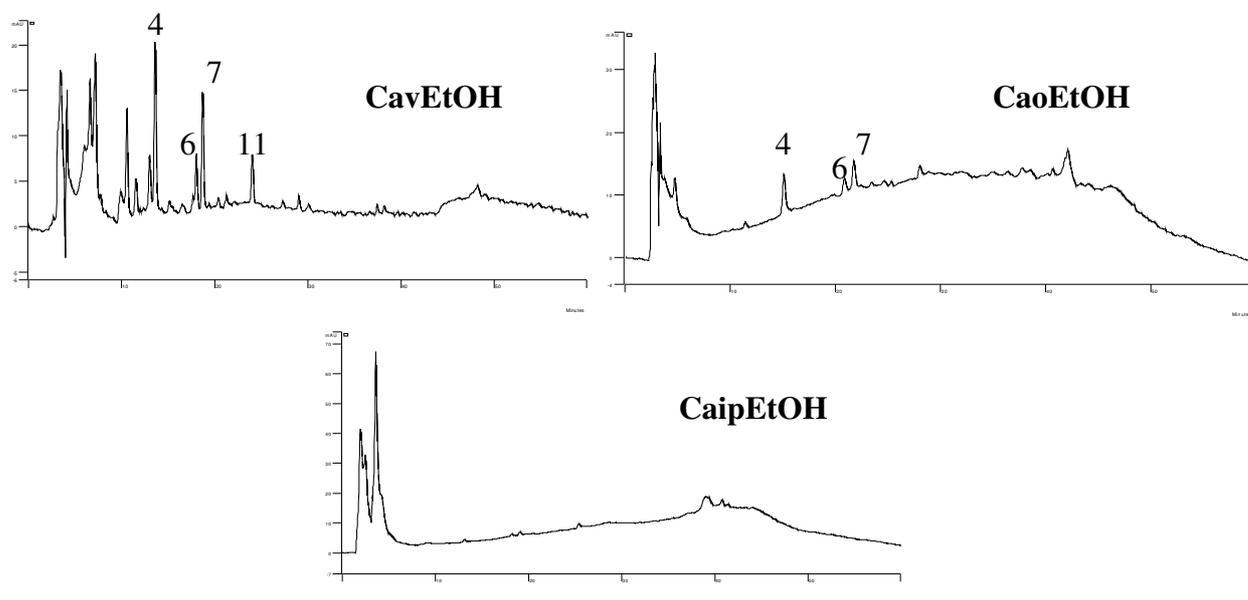
Com base nestes dados foi possível observar que os extratos hexânico e acetato de etila mostraram pouca variação na sua composição química em diferentes estações do ano associado com o desenvolvimento do vegetal, enquanto os extratos etanólico e metanólico mostraram alteração significativa em relação a composição química, já que estas substâncias são alteradas de acordo com a variação sazonal e desenvolvimento do vegetal.



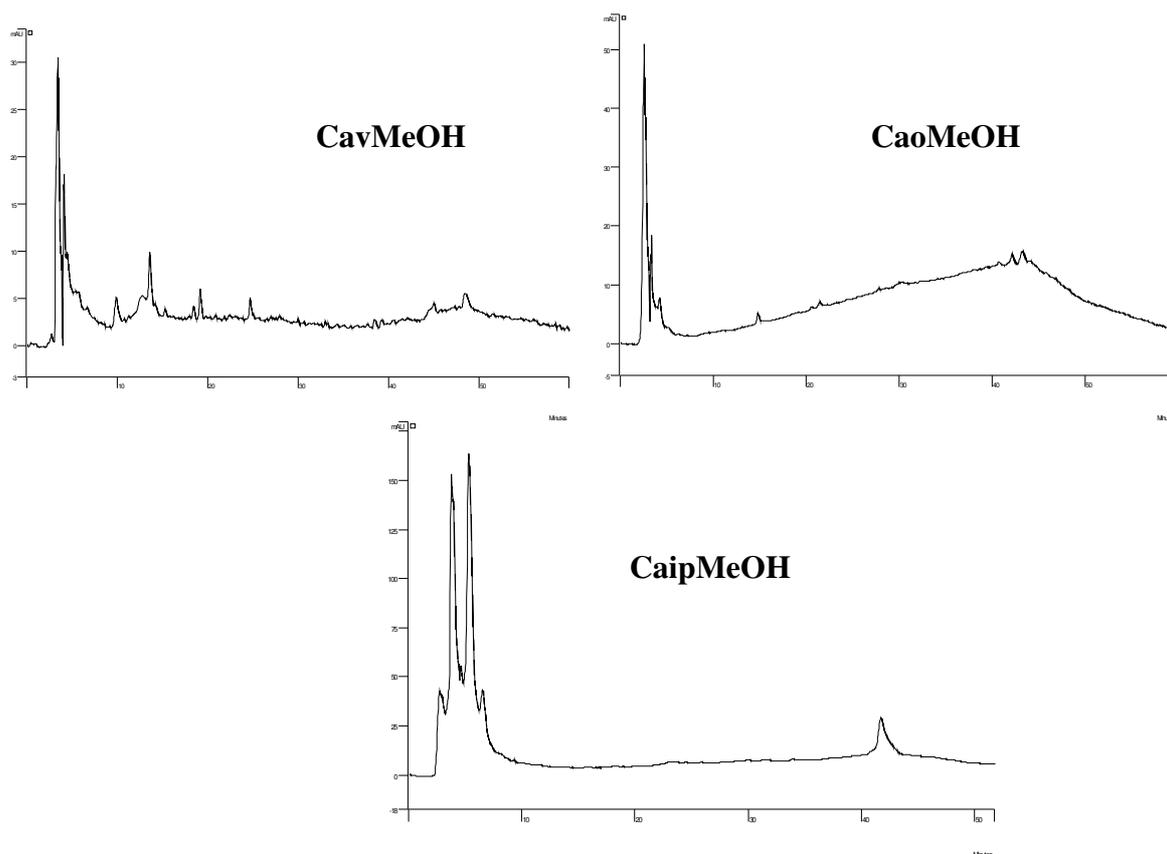
**Figura 78** – Perfil cromatográfico representativo dos extratos hexânicos das amostras **CavHex**, **CaoHex** e **CaipHex** ( $\lambda=284$  nm).



**Figura 79** – Perfil cromatográfico representativo dos extratos acetato de etila das amostras CavAcOEt, CaoAcOEt e CaipAcOEt ( $\lambda=284$  nm).



**Figura 80** – Perfil cromatográfico representativo dos extratos etanólico das amostras CavEtOH, CaoEtOH e CaipEtOH ( $\lambda=284$  nm).



**Figura 81** – Perfil cromatográfico representativo dos extratos metanólico das amostras **CavMeOH**, **CaoMeOH** e **CaipMeOH** ( $\lambda=284$  nm).

Após esta análise qualitativa das substâncias presentes nos extratos, essas mesmas substâncias **Ca2**, **Ca4**, **Ca5**, **Ca6**, **Ca9**, **Ca11** e **Ca14** foram quantificadas nesses extratos. A figura 82 mostra os teores dessas substâncias nas amostras **Cav**, **Cao** e **Caip**, a partir da soma do teor obtido para cada extrato em diferentes polaridades.

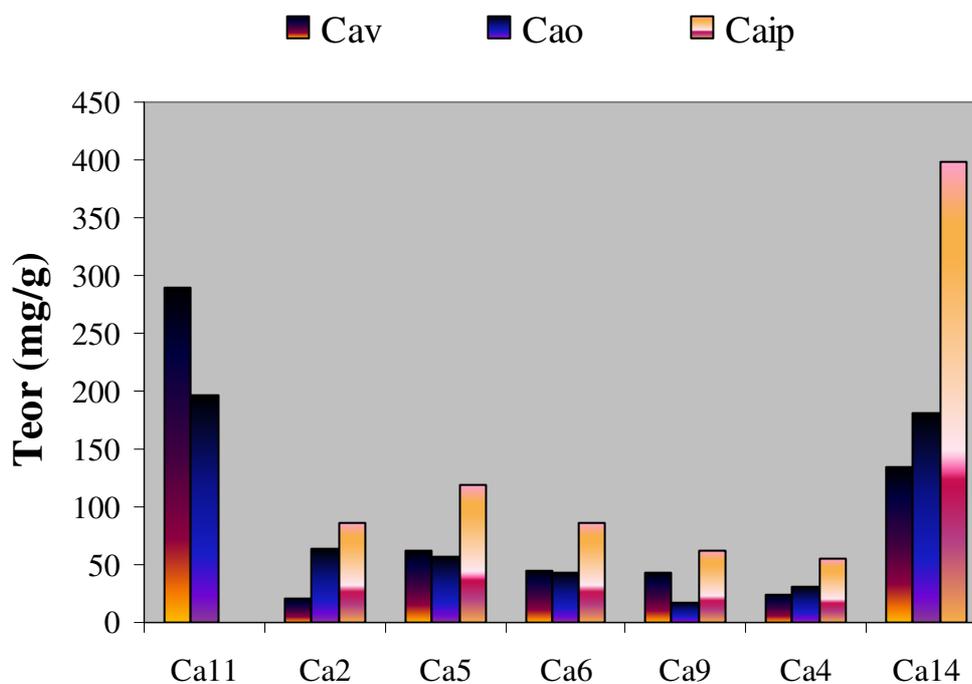
A amostra **Caip** mostrou maior teor de todas as substâncias, com exceção da **Ca11**, a qual foi detectada somente na amostra **Cav** e **Cao**. A substância **Ca14** é a substância majoritária em todas as amostras, seguida de **Ca11**.

As substâncias **Ca7** e **Ca8** não foram quantificadas porque possuem os mesmos tempos de retenção e são referentes ao pico **10** do cromatograma.

As folhas coletadas durante a floração mostraram maior teor das substâncias analisadas representando 8,11% das substâncias presentes no extrato, com exceção da **Ca11**, a qual foi detectada somente na amostra **Cav** e **Cao**. A síntese desses compostos diminuiu durante o verão (3,48%) e aumentou novamente no outono (7,73%),

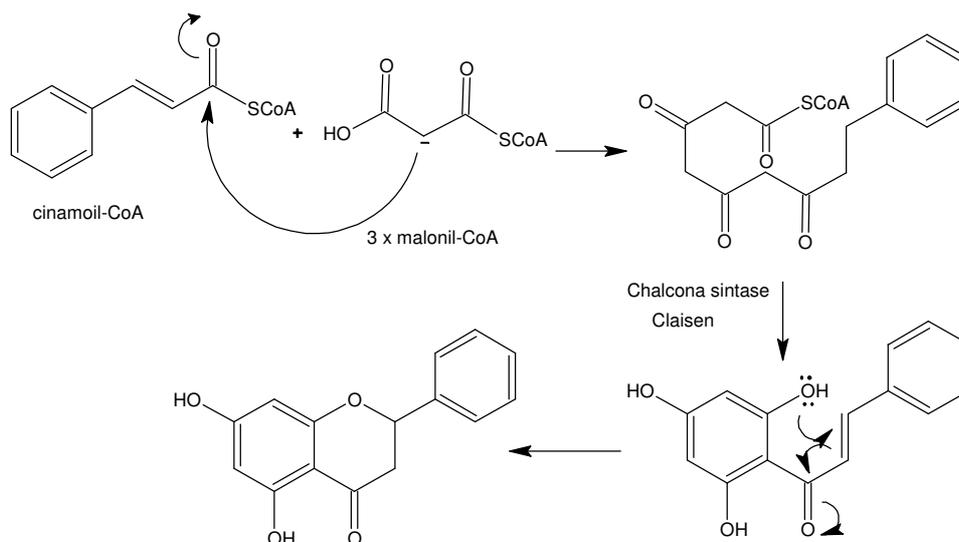
principalmente da substância **Ca11**.

A diferença do teor dessas substâncias nas folhas coletadas em diferentes estações do ano e em diferentes estágios fenológicos da planta, assim como entre elas, pode estar relacionada à biossíntese do vegetal associada a fatores fisiológicos e ambientais.



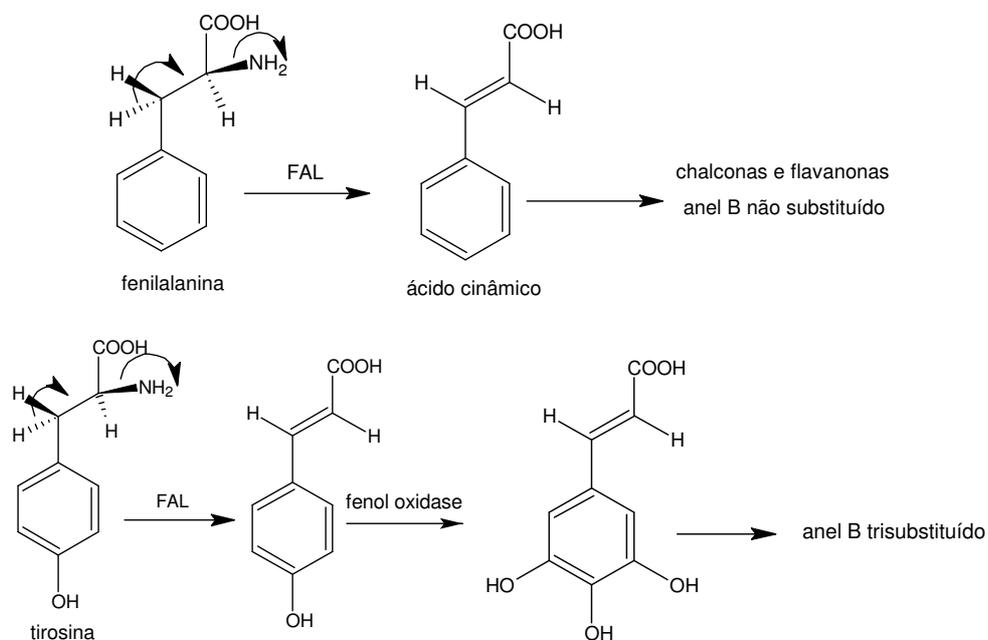
**Figura 82** – Teor (mg/g) das substâncias **Ca2**, **Ca4**, **Ca5**, **Ca6**, **Ca9**, **Ca11** e **Ca14**.

De acordo com DEWICK (2005) as chalconas são precursoras na via biossintética dos flavonóides (fig. 83), e formadas do cruzamento das vias entre os poliketídeos e ácido chiquímico através da reação de Claisen de uma unidade de ácido cinâmico (anel B) com três unidades de malonil-CoA (anel A).



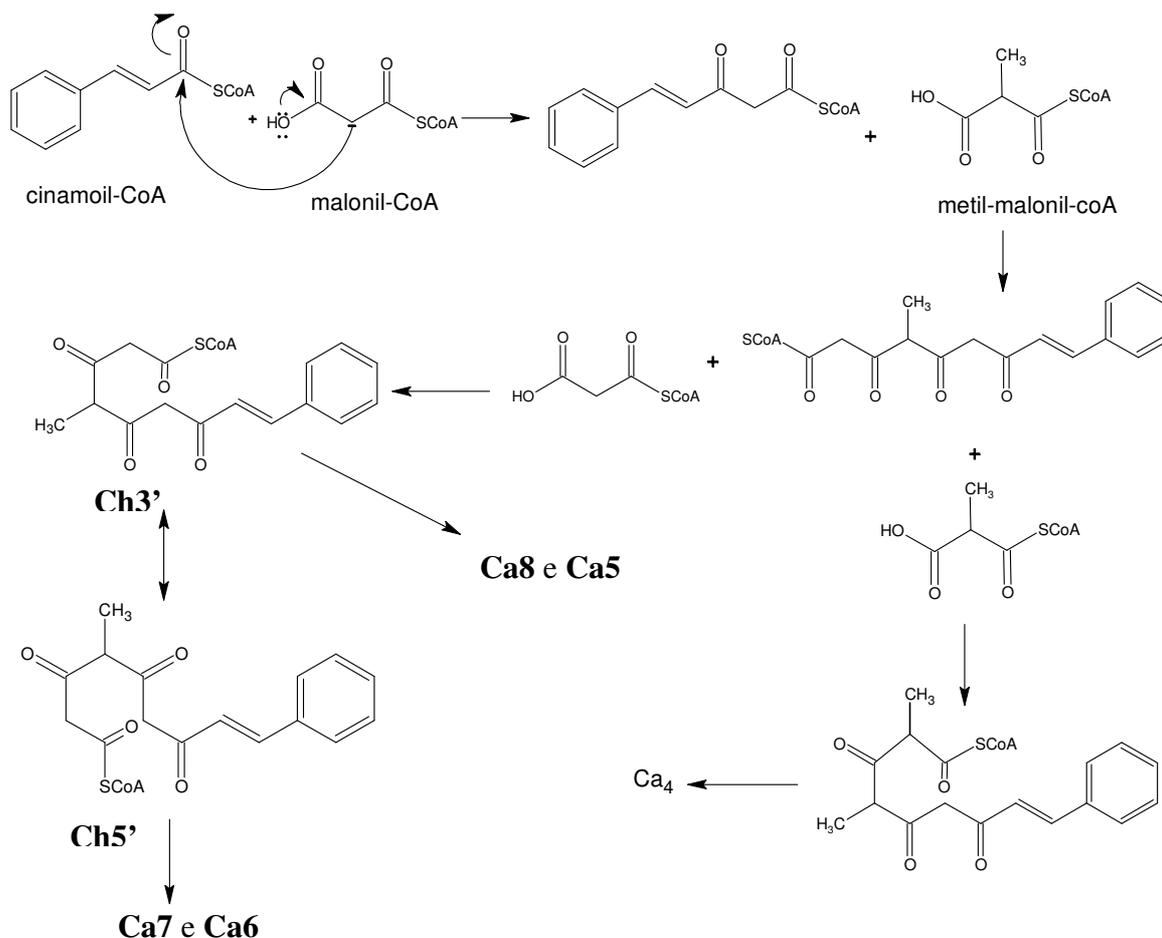
**Figura 83** – Biosíntese das chalconas e flavanonas DEWICK (2005).

Após isolamento dos flavonóides presentes, foi possível estabelecer dois padrões de substituição no anel B, do qual a fenilalanina e tirosina são precursores (fig. 84). As flavanonas e chalconas não mostraram substituintes no anel B, indicando que a planta emprega a fenilalanina como precursor, enquanto que para os flavonóis a tirosina é o precursor, formando no final o ácido 3,4,5-triidroxicinâmico, o que caracteriza o padrão de substituição para os flavonóis 3',4',5'-triidróxi encontrado em *C. adamantium*.



**Figura 84** – Precursores do anel B das chalconas, flavanonas e flavonóis DEWICK (2005).

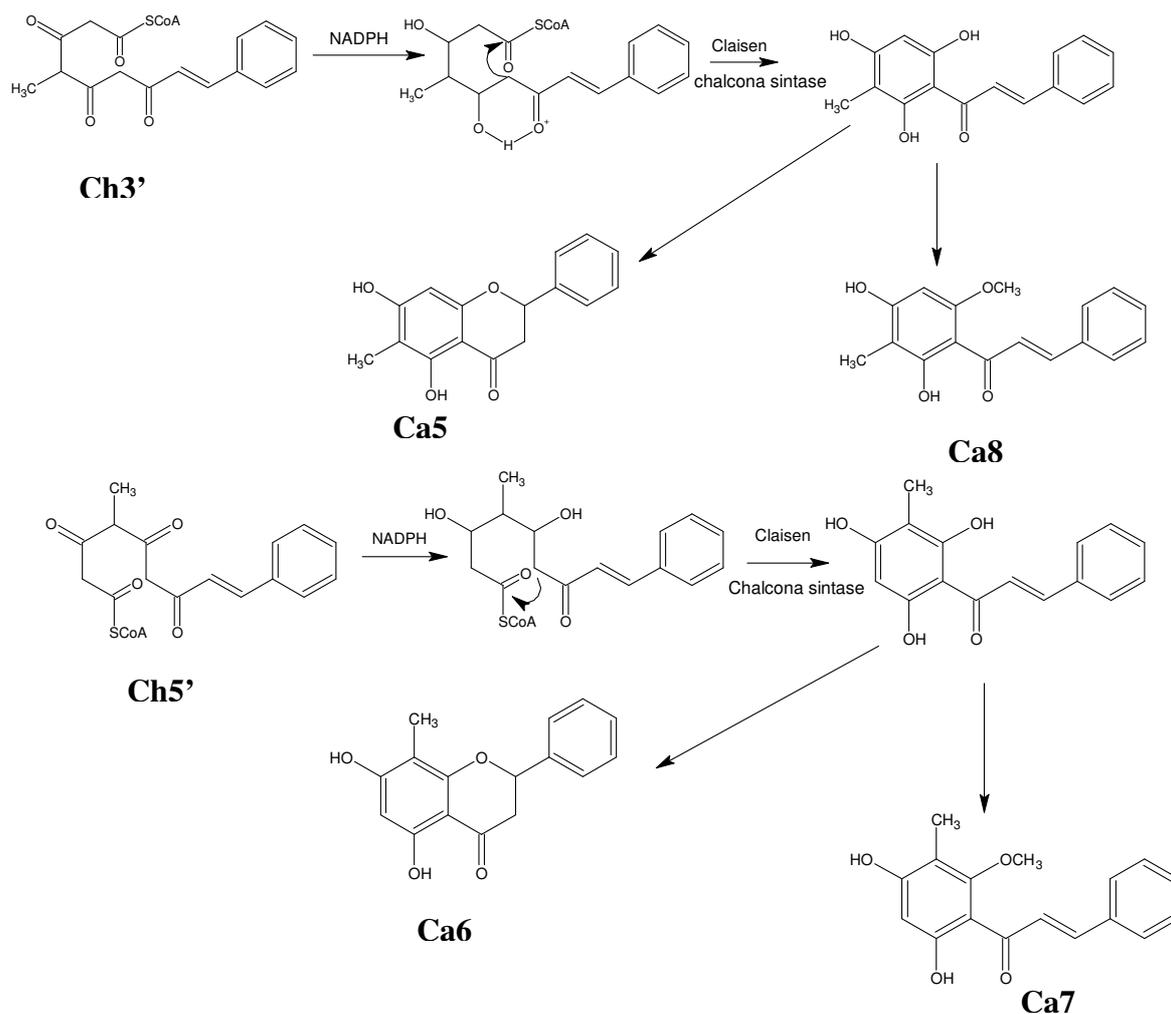
Foi observado também que as flavanonas e chalconas isoladas nesta espécie mostraram a presença de metila no anel A. SCHRÖDER *et al* (1998) apresentou uma proposta biossintética (fig. 85) para as chalconas e flavanonas C-metiladas por meio do monitoramento da chalcona sintase em *Pinus strobus*. De acordo com a proposta apresentada pelo autor, estamos mostrando abaixo (fig. 85) a proposta biossintética para as substâncias **Ca4**, **Ca5**, **Ca6**, **Ca7** e **Ca8**.



**Figura 85** – Proposta biossintética para as substâncias **Ca4**, **Ca5**, **Ca6**, **Ca7** e **Ca8** SCHRÖDER *et al* (1998).

A figura 86 mostra a diferença estrutural das chalconas e flavanonas isoméricas monitoradas no EMEOH. Tendo em vista a diferença entre o teor das flavanonas **Ca5** e **Ca6** e também para as chalconas **Ca7** e **Ca8** no EMEOH, sugere que as substâncias **Ca6** e **Ca7** são minoritárias devido a sua conformação estrutural. A ciclização da **Ca5** é mais favorecida do que a **Ca6**, o resultado encontrado pode ser explicado devido à formação de ligação de hidrogênio entre a hidroxila (C2') e carbonila ( $\beta'$ ) da chalcona, o que torna a

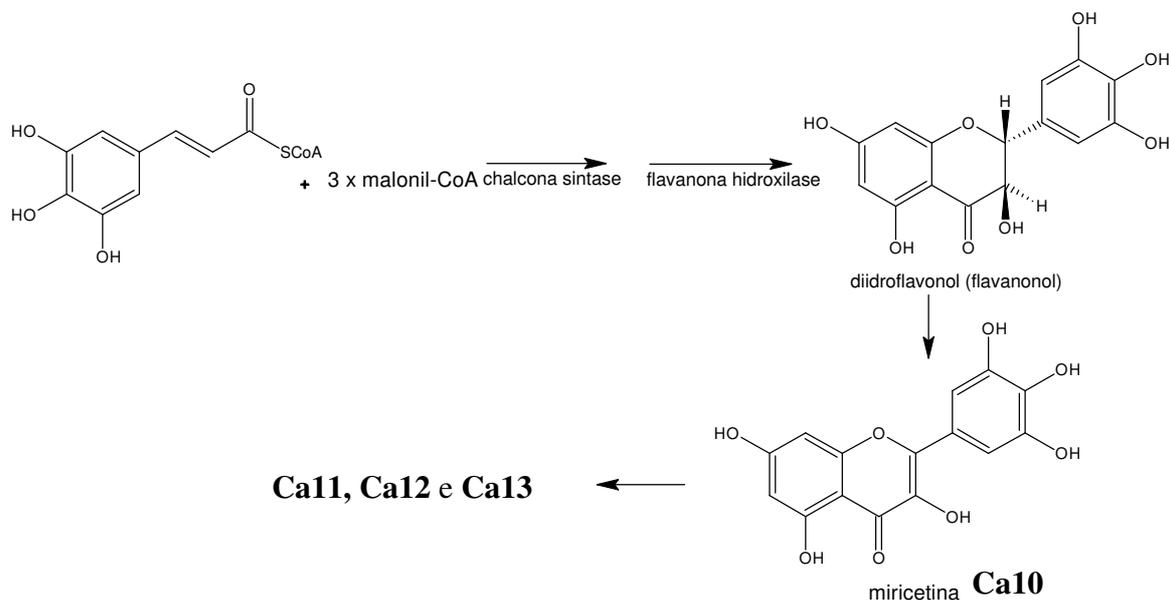
molécula fixa, suscetível ao ataque da OH na dupla ligação para a ciclização e formação do anel C, enquanto que a **Ca6**, de acordo com a proposta da figura 86, a formação da ligação de hidrogênio não é muito favorecida. Assim como a chalcona **Ca7** precursora da flavanona **Ca6** também é minoritária, sugerindo que muito pouco desta permanece com a conformação mostrada na figura 85 e 86, provavelmente devido a instabilidade desta conformação.



**Figura 86** – Proposta biossintética de ciclização para as substâncias **Ca5**, **Ca6**, **Ca7** e **Ca8**.

Devido ao menor teor apresentado pela substância **Ca9**, da qual a substância **Ca14** é precursora, significa que muito pouco de **Ca14** é convertido em **Ca9**. Enquanto que o menor teor apresentado de **Ca4** pode estar relacionado ao maior consumo desta para formação dos flavanóis (fig. 87), pois estes não mostraram presença de metila na posição 6

e 8, assim como não foi isolado flavanona sem metila nesta posição.



**Figura 87** – Proposta biossintética das substâncias **Ca10 a Ca13**.

Com base na discussão da biossíntese das substâncias isoladas da espécie *C.adamantium*, pode-se inferir que os flavonóides glicosilados encontrados nas folhas durante o verão e outono podem estar associados à ativação de enzimas específicas para a produção desses compostos, devido à diminuição das chalconas, principalmente a **Ca4**, assim como o aumento das substâncias semelhantes a **Ca10-Ca13** no início do cromatograma do extrato etanólico e metanólico da **Caip**.

Durante a coleta do material vegetal analisado foram avaliados os estágios de desenvolvimento do vegetal, assim como as condições climáticas, onde foi observada uma alteração significativa atípica entre o clima do outono e inverno.

A espécie *C.adamantium* é um vegetal que apresenta ciclo de desenvolvimento permanente, sendo classificada como decídua, visto que perdem as folhas durante o inverno e é induzida a floração após o frio (vernalização).

No verão observou-se que o vegetal encontrava-se na fenofase pós frutificação com alta disponibilidade hídrica. Durante o outono, ainda no estágio vegetativo houve um longo período de estiagem e geadas, conseqüentemente durante o inverno, a planta entrou em senescência, fenômeno observado através da perda das folhas. No final do inverno foi

possível verificar a formação de folhas, todavia o clima já era quente, porém ainda seco, e após uma semana iniciou-se a floração durante a primavera.

O monitoramento da variação da composição química associada a fatores ambientais e fenológicos, é necessário, tendo em vista, que uma alteração significativa de certas substâncias pode influenciar na atividade biológica dos vegetais, muitas vezes potencializando ou despotencializando os extratos vegetais.

#### 4.4. Ensaio químicos e biológicos

##### 4.4.1 Determinação do teor de fenóis e flavonóides

O conteúdo de fenóis das amostras **EMEOH**, **Cav**, **Cao** e **Caip** foram calculados a partir dos parâmetros de regressão linear da curva analítica do padrão de ácido gálico, e o resultado expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato.

O conteúdo de flavonóides da amostra **EMEOH** foi calculado a partir dos parâmetros de regressão linear da curva analítica do padrão de quercetina, e o resultado expresso em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato.

A tabela 22 mostra os parâmetros de regressão linear referentes a quercetina e ao ácido gálico utilizado para calcular o conteúdo de fenóis e flavonóides, respectivamente. O conteúdo de fenóis para **EMEOH** foi de 523,13 mg/g equivalentes de ácido gálico e de flavonóides foi de 93,38 mg/g equivalentes de quercetina.

**Tabela 22** – Dados de regressão linear da curva analítica para determinação de fenóis e flavonóides.

Parâmetros	Ácido gálico	Quercetina
IL µg	1-20	2,5-25
B	0,0266	0,01011
A	-0,03468	-0,02154
R	0,98898	0,99392
N	5	5

IL: intervalo linear, B: coeficiente angular, A: coeficiente linear, R: coeficiente de correlação, N: número de amostras.

A tabela 23 mostra o teor de fenóis dos extratos das amostras **Cav**, **Cao** e **Caip**. A amostra **Caip** mostrou maior teor de fenóis em todos os extratos analisados, seguida por **Cav** e **Cao**. Estes resultados mostraram que os extratos **AcOEt**, **EtOH**, **MeOH** possuem maior teor de compostos fenólicos do que **Hex**. Comparando estes valores com os

cromatogramas, principalmente do extrato **EtOH** e **MeOH** é possível sugerir que os picos do início do cromatograma são polifenóis, com estruturas semelhantes a das substâncias **Ca10-Ca13**, os quais respondem positivamente para este ensaio.

Em relação ao período de coleta, foi possível observar também que durante a primavera (floração) há um maior teor de fenóis, e que este diminui no verão (vegetativo) e decai um pouco mais no outono (vegetativo).

**Tabela 23** – Teor de fenóis das amostras **Caip**, **Cav** e **Cao** (mg/g).

Amostras	Fenóis			
	Hex	AcOEt	EtOH	MeOH
<b>Caip</b>	154,32 ± 0,00	379,13 ± 0,00	417,50 ± 0,01	365,81 ± 0,06
<b>Cav</b>	132,35 ± 0,00	260,78 ± 0,00	349,51 ± 0,01	398,57 ± 0,00
<b>Cao</b>	133,13 ± 0,00	269,44 ± 0,00	323,50 ± 0,01	278,88 ± 0,01

#### 4.4.2. Determinação do teor de taninos

A metodologia para determinação do teor de taninos empregando métodos espectrofotométricos foi adaptada de acordo com as metodologias empregadas na Farmacopéia Brasileira para análise de taninos em *Eugenia uniflora* - Myrtaceae (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA) e estudos realizados por REICHER *et al*, 1981.

O teor de taninos foi determinado como a diferença entre os fenóis que não reagem com o agente complexante e os fenóis que reagem com o agente complexante (tanantes). O ensaio foi realizado com o **EMEOH** a 160 µg/mL, e o teor de taninos determinado a partir dos parâmetros de regressão linear da curva analítica do padrão de ácido tânico na faixa de 10-160 µg/mL, onde  $y=0,0914 + 0,00814.x$ , com coeficiente de correlação (R) de 0,99917. O resultado expresso em mg de equivalentes de ácido tânico por g de extrato.

As soluções submetidas a reação com os agentes complexantes (tanante) pó de pele, carvão ativo e caseína foram analisadas empregando CLAE para a determinação do melhor agente complexante através do monitoramento da redução dos picos **1-11**, os quais não são taninos, e foram empregados como controle. A metodologia para a determinação do melhor agente complexante empregando CLAE foi adaptada do trabalho de VERZA *et al*

(2007).

Somente o teor de taninos empregando o agente complexante pó de pele foi calculado, devido a não eficiência dos outros métodos, apesar de todos os agentes complexantes mostrarem redução da área dos picos **1-11**.

Os valores em relação ao carvão ativo não foram colocados na tabela, porque ficaram abaixo da curva analítica, logo este método não foi considerado visto que na análise do cromatograma, todos os picos ilustrados neste para a determinação do teor de fenóis foram praticamente 100% complexados com carvão ativo.

A caseína mostrou 100% de redução dos picos de **8-11** e 70% dos picos de **1-7** e surgimento de um pico na região de 2-5 minutos, provavelmente um contaminante. Apesar da drástica redução das substâncias monitoradas a absorvância praticamente não foi alterada isso foi observado devido a um valor muito próximo do encontrado para análise de fenóis, sugerindo que o contaminante detectado pode ter influenciado na medida espectrofotométrica.

O agente complexante pó de pele não mostrou redução linear em todos os picos como o observado para caseína e carvão ativo, mas sim uma oscilação com redução nas áreas de 20-40%. Em relação ao ensaio espectrofotométrico houve uma redução de 52% na absorvância.

O teor de taninos empregando o agente complexante pó de pele foi de 217,62 mg/g de equivalentes de ácido tânico.

Todavia podem existir distorções neste resultado, porque apesar do pó de pele ser considerado o melhor agente complexante neste estudo, devido a variação em torno de 50% na absorvância, foi possível observar que complexou uma parte da fração flavonoídica presente no extrato vegetal que foram empregadas como controle.

Estudo das variáveis analíticas para determinação do teor de taninos em extrato aquoso das folhas de *Psidium guajava* L. (VERZA *et al*, 2007) mostrou alteração na composição do extrato vegetal quando se utiliza caseína e pó de pele como agente complexante. Estes resultados foram comprovados empregando ácido gálico, pirogalol, catequina e rutina como controle, onde foi observado que a caseína e pó de pele possuem afinidade maior por catequina e flavonóides que por ácido gálico, o último comprometendo o uso como referência na quantificação de taninos.

A partir dos resultados obtidos e o da literatura pode-se concluir que há uma falta

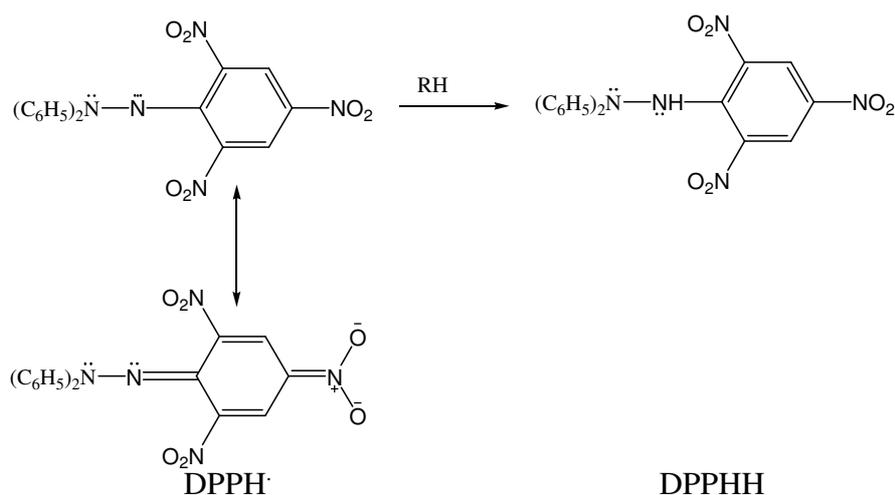
de especificidade no método e uma necessidade de se estabelecer parâmetros como tempo de leitura, comprimento de onda e quantidade de reagente para cada tipo de extrato vegetal na tentativa de diminuir as distorções nos resultados.

#### 4.4.3. Determinação da atividade antioxidante

##### 4.4.3.1 Avaliação com o método radical livre DPPH.

Neste ensaio o “sequestro” do radical livre DPPH é seguido por monitoramento da diminuição da absorvância a 517 nm, no qual ocorre a redução de antioxidantes devido a habilidade de compostos fenólicos transferir átomos de hidrogênios para os radicais (DJERIDANE *et al*, 2006).

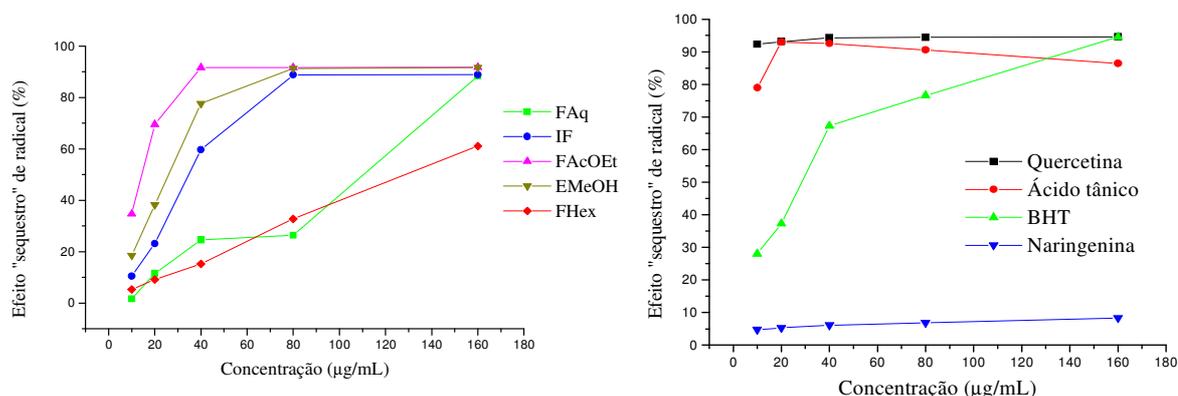
O uso de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) como um reagente para monitoramento da atividade antioxidante de moléculas pequenas tem sido reportado (VILLANO *et al*, 2006). O ensaio para determinação frente ao radical livre DPPH pode ser realizado a temperatura ambiente, o que elimina riscos de degradação térmica das moléculas testadas. A figura 88 apresenta a estrutura do DPPH na sua forma oxidada, o qual apresenta coloração púrpura, mas quando recebe um próton é reduzido e torna-se amarelo, logo é um ensaio colorimétrico, onde o teste positivo para presença de substâncias antioxidantes ocorre com o surgimento da coloração amarela.



**Figura 88** – Redução do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

#### 4.4.3.1.1 Ensaios nas amostras *EMeOH*, *FHex*, *FACoEt*, *IF* e *FAq*

A figura 89 mostra o Efeito de “sequestro” de radical para as amostras **EMeOH**, **FHex**, **FACoEt**, **IF** e **FAq** e dos padrões quercetina, naringenina, BHT e ácido tânico na concentração de 10-160 µg/mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as análises mostraram coeficiente de variação entre ± 0,00-2,66.



**Figura 89** – Efeito de “sequestro” de radical nas amostras **EMeOH**, **FHex**, **FACoEt**, **IF** e **FAq**.

Todas as amostras testadas apresentaram alto efeito de “sequestro” de radical, e surgimento da coloração amarela a partir de 40 µg/mL, com exceção da **FAq**, a qual apresentou-se positiva a partir de 80 µg/mL. A **FACoEt** e **IF** mostrou redução de 91,71% e 88,89% a 160 µg/mL, respectivamente, valor muito próximo ao encontrado para os padrões quercetina (94,64%), ácido tânico (86,43%) e BHT (94,54%), todos na mesma concentração.

A naringenina mostrou baixa atividade antioxidante, o que pode ser atribuído a ausência de dupla ligação  $\alpha$ - $\beta$  carbonila, o que permitiria a conjugação com anel B e a formação de mais estruturas de ressonância. A natureza química dos flavonóides depende da sua classe estrutural, tais como, grau de hidroxilação e de outros substituintes e conjugação (DI MAJO *et al*, 2005). Além do que, o mecanismo reacional entre o DPPH e o antioxidante depende da estrutura conformacional do antioxidante, como os estudos de mecanismo cinético dos agentes antioxidantes BHT, eugenol e isoeugenol (BONDET *et al*, 1997).

Estes resultados permitem afirmar que as folhas de *C. adamantium* são ricas em compostos antioxidantes capazes de inibirem a formação de radicais livres. De acordo com

as informações que obtivemos analisando os cromatogramas por CCD e por CLAE dos extratos e das partições, apresentam substâncias fenólicas, tais como flavonóides.

Estes resultados são confirmados pelo estudo fitoquímico que levou ao isolamento das substâncias **Ca2** a **Ca13**, principalmente das substâncias **Ca10-Ca13**, as quais possuem insaturação  $\alpha$ - $\beta$  carbonila no anel C e hidroxilas no anel B, permitindo a formação de estruturas de ressonâncias estáveis durante a formação de radical nestas moléculas. E mais, estudos de efeito de “seqüestro” de radical empregando miricetina-3-O-raminosídeo mostrou  $CI_{50}$  de 1,4  $\mu$ g/mL (HAYDER *et al*, 2008).

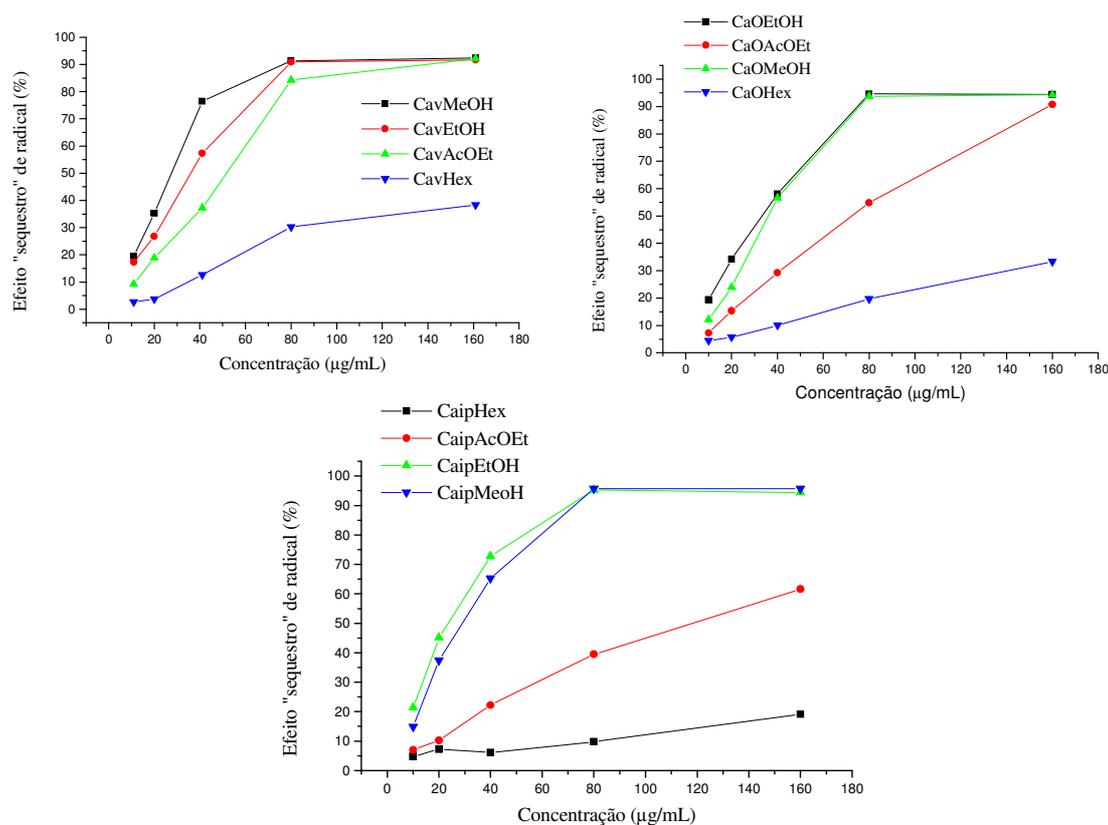
#### 4.4.3.1.2 Ensaio nas amostras **Cav**, **Cao** e **Caip**

A figura 90 mostra o efeito “seqüestro” de radical nas amostras coletadas em diferentes estações do ano na concentração de 10-160  $\mu$ g/mL.

O extrato hexânico mostrou baixa atividade antioxidante com percentual  $\leq 38,30\%$  em todas as amostras e com diminuição para 19,15% durante a primavera. Enquanto o extrato acetato de etila mostrou alta atividade antioxidante principalmente nas amostras **Cav** e **Cao** com atividade em 90,74% e 92,07%, respectivamente, e com redução para 61,57 % durante a primavera (**Caip**). Esta diferença na atividade entre os extratos AcOEt pode ser atribuída a presença das substâncias no início do cromatograma no tempo de retenção de 2-10 minutos das amostras **Cav** e **Cao**, e ausência destas em **Caip**.

Em relação aos extratos etanólicos e metanólicos, os dois mostraram aumento na atividade antioxidante com percentual na faixa de 91,69-95,67 % (160  $\mu$ g/mL) e descréscimo dentro desta faixa para as amostras **Caip**, **Cav** e **Cao**, respectivamente. Assim como atribuído para o extrato acetato de etila, sugere-se que a atividade para os extratos etanólicos e metanólicos esteja relacionada à presença das substâncias no início do cromatograma, mas diferentes das detectadas no extrato acetato de etila.

A partir dos resultados obtidos pode se concluir que a alteração na composição química das folhas de *C. adamantium* em diferentes estações do ano pode estar influenciando no aumento ou descréscimo da atividade antioxidante.

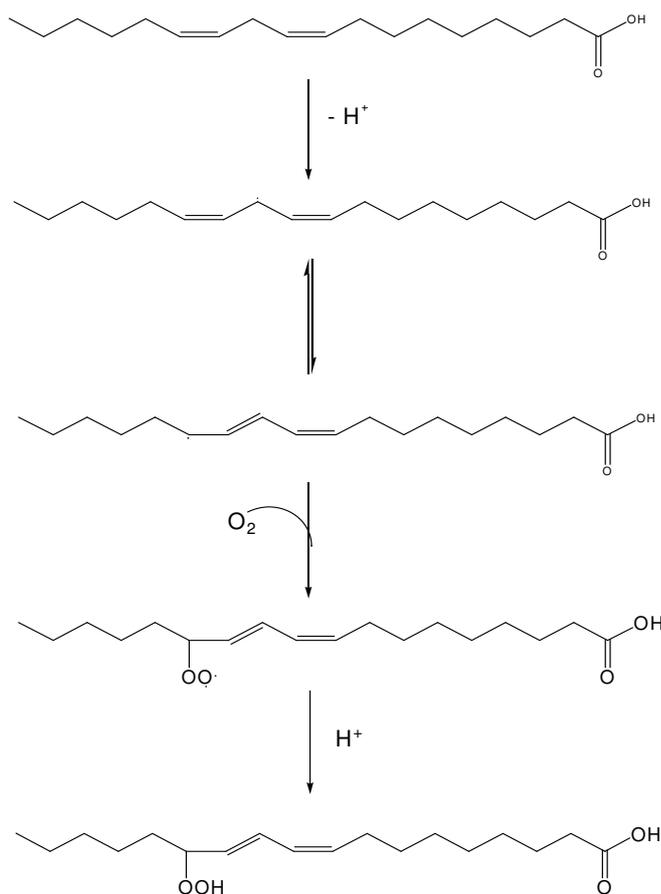


**Figura 90** – Efeito “sequestro” de radical nas amostras Cav, Cao e Caip.

#### 4.4.3.2. Avaliação com o método $\beta$ -caroteno /ácido linoléico

O ensaio  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico simula a oxidação dos componentes celulares da membrana lipídica em presença de antioxidantes, assim como, a capacidade de inibição da formação de radicais peróxidos a partir da oxidação do ácido linoléico (MATA *et al.*, 2007). No ensaio “in vitro” as substâncias antioxidantes inibem a peroxidação do ácido linoléico, assim como a oxidação do  $\beta$ -caroteno, evitando o descoloramento deste, logo a presença de substâncias antioxidantes pode ser percebido visualmente devido a manutenção da coloração alaranjada do  $\beta$ -caroteno, enquanto que na ausência de substâncias antioxidante o  $\beta$ -caroteno sofre descoloração.

O mecanismo da peroxidação lipídica (fig. 91) ocorre através da reação de espécies reativas de oxigênio (EROs) com ácidos graxos poliinsaturados (AGPI). Na presença de um antioxidante o radical peroxila é inibido pela doação de um átomo de hidrogênio e/ou “sequestro” de oxigênio por compostos antioxidantes.



**Figura 91** – Peroxidação do ácido linoléico.

Esses radicais peroxila também podem: sofrer dismutação ou clivagem, formando aldeídos; formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos ou sofrer um rearranjo formando produtos secundários da peroxidação lipídica (LIMA *et al*, 2001).

#### 4.4.3.2.1 Ensaio nas amostras **EMeOH**, **FAcOEt**, **FAq**, **FHex** e **IF**

A figura 92 mostra a inibição da peroxidação lipídica das amostras **EMeOH**, **FAcOEt**, **FAq**, **FHex** e **IF** e padrões quercetina, naringenina, BHT e ácido tânico na concentração de 10-160  $\mu\text{g/mL}$ . Os ensaios foram realizados em triplicata e as análises mostraram coeficiente de variação entre  $\pm 0,22-29,30$ .

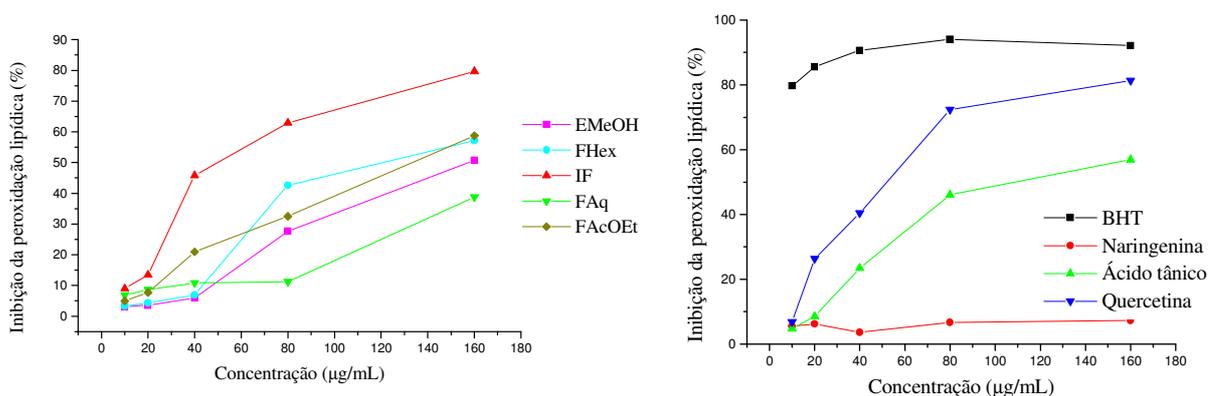
O BHT mostrou maior atividade antioxidante do que os outros padrões, seguido de quercetina, ácido tânico e naringenina, respectivamente. O BHT possui grupos terc-butila e metila na posição orto e para em relação hidroxila, respectivamente, enquanto os outros

padrões não possuem este mesmo padrão de substituintes.

Neste ensaio a **IF** (79,69%) apresentou maior percentual de inibição da peroxidação lipídica do que a **FHex** (57,15%), **FAcOEt** (58,73%), **EMeOH** (50,76%) e **FAq** (38,75%), respectivamente, quando comparados com os quercetina (81,32%), naringenina (3,60%), BHT (92,12%) e ácido tânico (56,88%), todos na concentração de 160 µg/mL.

Podemos inferir que a **IF** mostrou maior atividade frente este método, devido a maior presença de compostos fenólicos com substituintes na posição orto a hidroxila. Os quais são comprovados através do isolamento das substâncias **Ca5**, **Ca6** e **Ca4**, assim como as chalconas (**Ca7** e **Ca8**), que além de apresentar este mesmo padrão de substituição, possuem dupla ligação  $\alpha,\beta$ -carbonila.

Estudos da literatura (MARINOVA *et al*, 2008) mostraram que a miricetina é um antioxidante mais potente do que  $\alpha$ -tocoferol na inibição da autoxidação de triacilgliceróis, mas que uma mistura dessas duas substâncias potencializa ainda mais a atividade antioxidante.



**Figura 92** – Inibição da peroxidação lipídica do **EMeOH**, **FAcOEt**, **FAq**, **FHex** e **IF** e padrões quercetina, naringenina, BHT e ácido tânico.

#### 4.4.3.2.2 Ensaio nas amostras *Cav*, *Cao* e *Caip*

A figura 93 mostra os resultados obtidos através do ensaio da inibição da peroxidação lipídica com as amostras *Cav*, *Cao* e *Caip* na concentração de 10-160 µg/mL. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e mostraram desvio padrão  $\leq 2,95$ .

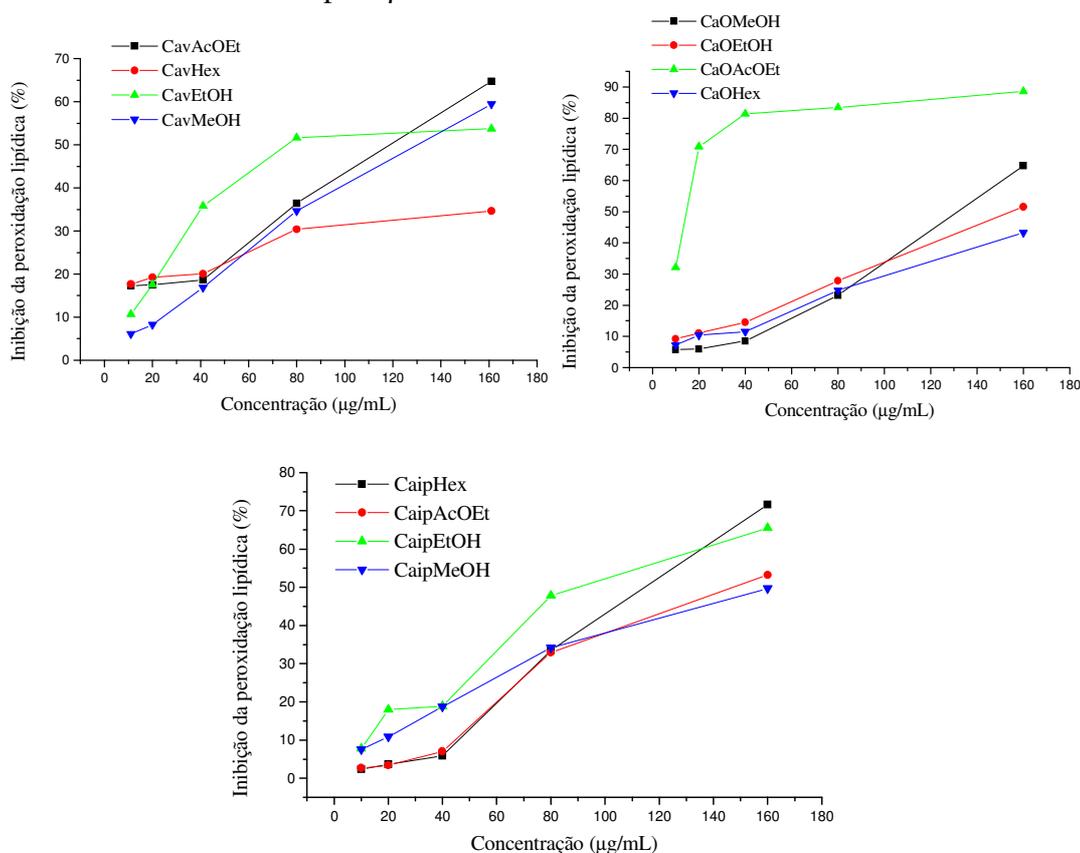
O extrato hexânico mostrou maior atividade antioxidante no método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico do que o método do DPPH. A amostra **Caiphex** mostrou maior atividade antioxidante (71,65%) a 160 µg/mL do que **Cavhex** (34,64%) e **Caohex**

(43,27%) na mesma concentração.

Em relação ao extrato acetato de etila, a amostra **Cao** mostrou maior percentual de atividade antioxidante (88,61%), seguida da amostra **Cav** (64,72%) e **Caip** (53,23%). Esta diferença na atividade pode ser atribuída a presença da substância **Ca11** (fig. 82, p. 106) nas amostras **Cao** e **Cav**, pois estudo da inibição da peroxidação lipídica com miricetina-3-O-raminopiranosídeo, mostrou que esta é um agente antioxidante com  $CI_{50}$  de 220  $\mu\text{g/mL}$  (HAYDER *et al*, 2008).

O extrato etanólico mostrou menor atividade antioxidante do que o extrato acetato de etila para as amostras **Cao** (79,69%) e **Cav** (53,73%), porém o mesmo não foi observado para **Caip**, o qual mostrou atividade maior no extrato etanólico (65,48%) do que em acetato de etila.

O extrato metanólico mostrou a menor atividade antioxidante com percentual na faixa de 45,91-59,45% (160  $\mu\text{g/mL}$ ), diferentemente dos resultados observados para DPPH. Observou-se então que as substâncias que respondem para o ensaio de DPPH não respondem da mesma forma para  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.



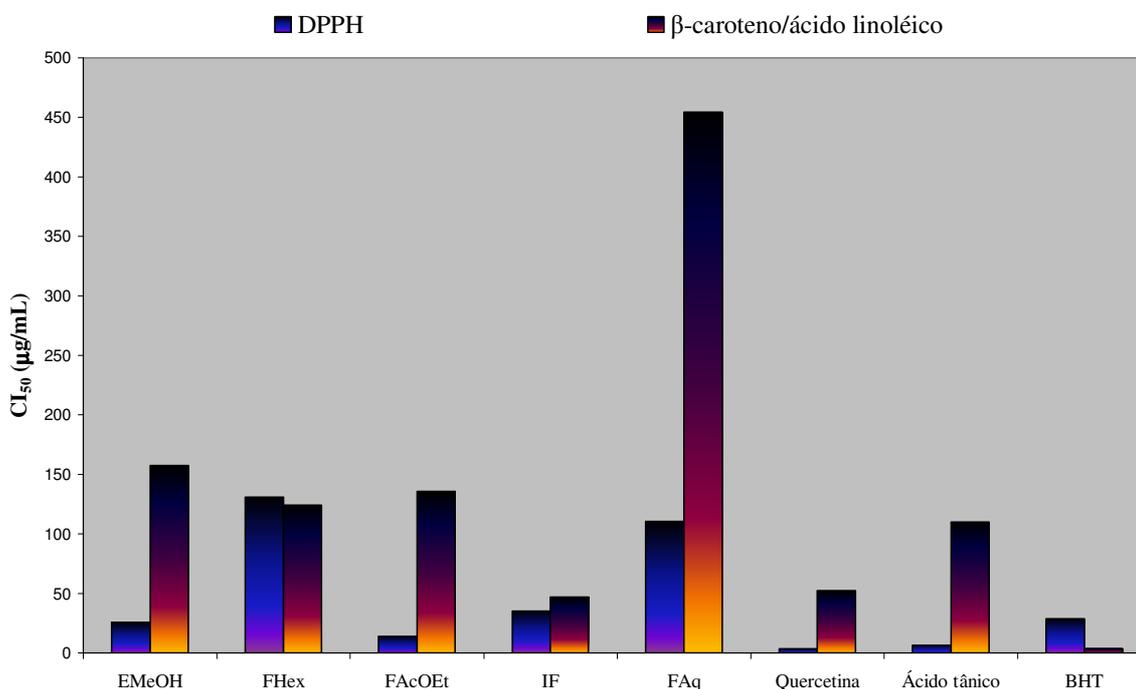
**Figura 93** – Inibição da peroxidação lipídica empregando método  $\beta$ -caroteno/ácido

linoléico nas amostras **Cav**, **Cao** e **Caip**.

#### 4.4.3.3. Concentração inibitória ( $CI_{50}$ )

##### 4.4.3.3.1. Amostras **EMeOH**, **FAcOEt**, **FAq**, **FHex** e **IF**

A concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) é referente à quantidade de substâncias antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial do radical em 50%, pois quanto menor o valor da  $CI_{50}$  maior a atividade antioxidante da amostra. A figura 94 mostra a  $CI_{50}$  obtida a partir do ensaio com DPPH e  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. A **FAcOEt** apresentou o menor valor de  $CI_{50}$  (14,00  $\mu\text{g/mL}$ ), seguido pelo **EMeOH** (25,75  $\mu\text{g/mL}$ ), **IF** (35,28  $\mu\text{g/mL}$ ), **FAq** (110,48  $\mu\text{g/mL}$ ) e **FHex** (130,67  $\mu\text{g/mL}$ ) empregando o método de seqüestro de radical (DPPH). Enquanto que no ensaio  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico o menor valor de  $CI_{50}$  foi obtido a partir da **IF** (46,81  $\mu\text{g/mL}$ ), seguido pela **FHex** (124,42  $\mu\text{g/mL}$ ), **FAcOEt** (135,46  $\mu\text{g/mL}$ ), **EMeOH** (157,54  $\mu\text{g/mL}$ ) e **FAq** (454,21  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 94** – Atividade antioxidante ( $CI_{50}$   $\mu\text{g/mL}$ ) empregando os ensaios com DPPH e  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.

A comparação da atividade antioxidante em termos de  $CI_{50}$  permite mostrar a especificidade dos diferentes ensaios. Em relação aos padrões, BHT mostrou-se mais específico para o método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico do que para o método radical livre DPPH, devido a sua característica mais apolar, enquanto que os padrões mais polares, como ácido tânico e quercetina mostraram-se mais ativos no método DPPH.

Estas mesmas comparações podem ser atribuídas as **FHex**, **FAcOEt**, **IF** e **FAq**, as quais mostraram diferenças também na atividade antioxidante empregando os diferentes métodos, devido à diversidade de substâncias nestas amostras com diferentes grupos funcionais.

Estudo da atividade antioxidante em *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica* e *Eugenia jambolana* empregando o ensaio de seqüestro de radical (DPPH) e inibição da peroxidação do ácido linoléico mostraram moderada correlação entre os testes, onde o ensaio de inibição do ácido linoléico apresentou maior percentual de inibição do que o DPPH os quais foram atribuídos a diferenças dos compostos antioxidantes, tais como tocoferóis, carotenóides e flavonóides que não somente exibem atividade antioxidante através da doação de átomos de hidrogênio, mas também através do “seqüestro” de oxigênio, e tais classes contribuíram significativamente para a atividade antioxidante no ensaio do ácido linoléico (SULTANA *et al*, 2007).

#### 4.4.3.3.1. Amostras **Cav**, **Cao** e **Caip**

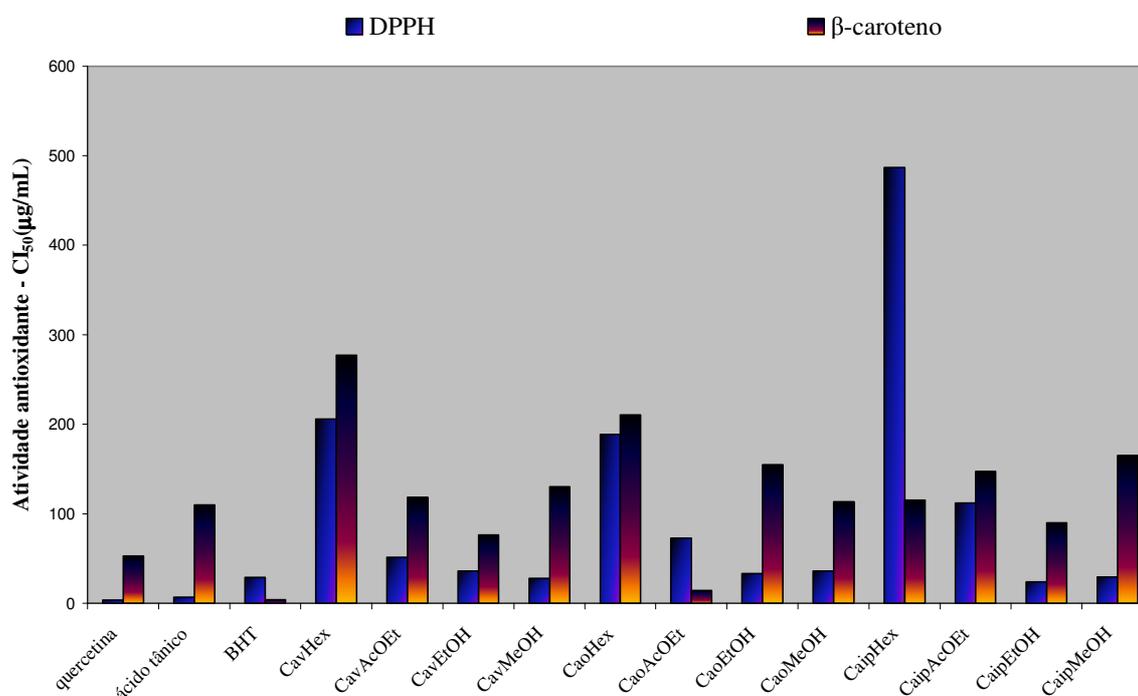
A figura 95 mostra o valor da  $CI_{50}$  obtida para as amostras **Cav**, **Cao** e **Caip** nos extratos **Hex**, **AcOEt**, **EtOH** e **MeOH**.

Em relação aos extratos hexânicos a amostra **Caiphex** mostrou maior atividade antioxidante frente ao método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico do que as amostras **Cavhex** e **Caohex**, porém o oposto foi observado para DPPH, no qual a atividade antioxidante diminuiu (**Caiphex**<**Cavhex**< **Caohex**).

Diferença significativa na atividade antioxidante do extrato acetato de etila foi observada entre as amostras. Em relação ao ensaio da inibição da peroxidação lipídica a amostra **CaoAcOEt** mostrou alta atividade, seguida de **CavAcOEt** e **CaipAcOEt**, respectivamente. Enquanto que no ensaio efeito “seqüestro” de radical **CavAcOEt** mostrou maior atividade do que **CaoAcOEt** e **CaipAcOEt**, respectivamente.

Todos os extratos etanólicos mostraram alta atividade antioxidante frente ao método DPPH e de moderada a alta para  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico (**Cav**>**Caip**>**Cao**). O extrato metanólico mostrou-se altamente específico para o método DPPH com diferença significativa em relação ao método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.

A alta atividade antioxidante exibida pelo extrato etanólico e metanólico no método efeito “sequestro” de radical pode ser atribuída a presença das substâncias do início do cromatograma, e não as substâncias **Ca2-Ca9**, mas sim as substâncias com estruturas semelhantes a **Ca10-Ca13**. Enquanto que o oposto pode ser atribuído ao extrato hexânico e acetato de etila, os quais possuem uma presença maior das substâncias **Ca2-Ca9** e **Ca14** e mostraram atividade de moderada a alta para o ensaio da inibição da peroxidação lipídica.



**Figura 95** – Concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) das amostras **Cav**, **Cao** e **Caip** no método efeito “sequestro” de radical e inibição da peroxidação lipídica

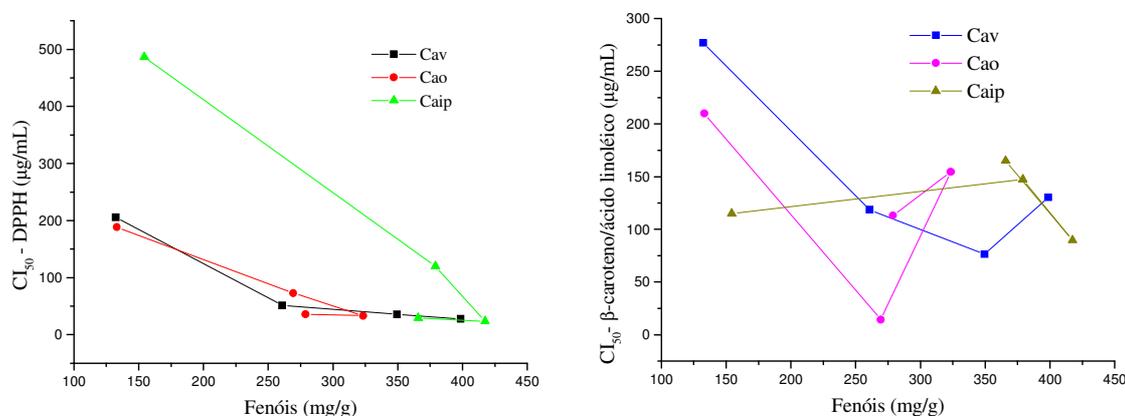
Foram estabelecidas correlações entre o teor de fenóis e atividade antioxidante no ensaio efeito “sequestro” de radical (DPPH) e inibição da peroxidação lipídica ( $\beta$ -caroteno/ácido linoléico) em termos de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) para cada extrato obtido em cada amostra (fig. 96). Observou-se correlação positiva entre o teor de fenóis e a  $CI_{50}$ -DPPH, no

entanto não foi observado correlação direta com a  $CI_{50}$ -  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.

Estudo da correlação entre atividade antioxidante e o teor de fenóis mostrou boa correlação entre o teor de fenóis e atividade antioxidante no método DPPH (SOUSA *et al*, 2007). Todavia, correlações entre os resultados de atividade antioxidante empregando diferentes métodos e a quantificação do teor fenóis, mostraram uma pobre correlação entre a inibição da peroxidação lipídica e o teor de fenóis, assim como entre a inibição peroxidação lipídica e efeito “seqüestro” de radical (SULTANA *et al*, 2007).

Estes resultados sugerem que são os compostos fenólicos responsáveis pelo efeito “seqüestro” de radical – DPPH, enquanto que para o ensaio inibição da peroxidação lipídica, além dos compostos fenólicos outros constituintes estão contribuindo para a resposta deste ensaio.

De maneira geral, podemos concluir que o extrato das folhas dessa planta é promissor na proteção contra os riscos causados pelos radicais gerados durante estresse oxidativo e auxiliar no sistema de defesa dos organismos. Entretanto, outros ensaios devem ser desenvolvidos para avaliar a possibilidade de aplicações em produtos para uso animal.



**Figura 96** – Fenóis *versus* atividade antioxidante -  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 4.4.4. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana empregando o método ágar de difusão em disco

Os agentes antimicrobianos podem apresentar suas atividades através de diversos mecanismos: lesão da parede celular, alterações de permeabilidade celular, alterações das moléculas das proteínas e ácidos nucleicos, inibição da síntese de ácidos nucleicos. (LIMA, 2001).

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC 10231) com as amostras **EMeOH**, **FHex** e **IF**.

A tabela 24 mostra os resultados obtidos a partir destes ensaios. O **EMeOH**, a **IF** e a **FHex** apresentaram moderada atividade para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para o fungo *Candida albicans* o **EMeOH** apresentou alta atividade, mas pôde se observar que as frações obtidas da partição apresentaram maior halo, provavelmente devido a maior concentração das substâncias responsáveis por esta atividade, sendo que a fase **IF** apresentou halo de inibição superior ao antibiótico fluconazol empregado como padrão.

Estes resultados preliminares da atividade antimicrobiana sugerem que os extratos de *C. adamantium* possuem substâncias com inibição de microorganismos, principalmente, de agentes antifúngicos. Há relatos na literatura sobre a atividade antifúngica de chalconas (NOWAKOWSKA, 2007), logo sugere-se que as chalconas isoladas neste trabalho e outras substâncias não isoladas podem estar respondendo pela atividade antimicrobiana.

**Tabela 24.** Atividade antimicrobiana (mm) das amostras **EMeOH**, **FHex** e **IF**.

Microorganismos	EMeOH*	IF*	FHex	Antibióticos
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	24,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	17,40 ± 0,60 <sup>b</sup>
<i>Candida albicans</i>	20,00 ± 0,40	30,00 ± 0,60	22,00 ± 0,40	22,00 ± 0,40 <sup>c</sup>

\* Todos os ensaios foram realizados com 40 µg de amostra. a: nitrofurantoína (300 µg); b: Impenem (10 µg); c: fluconazol (50 µg).

#### 4.4.5. Avaliação preliminar da atividade antifúngica empregando o ensaio de bioautografia

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada observando o aparecimento, ou não, de zonas do desenvolvimento do fungo. O extrato metanólico (**EMeOH**) apresentou atividade antifúngica positiva em placa cromatográfica contra o fungo *Cladosporium sphaerospermum* a partir da concentração de 350 µg/mL.

#### 4.4.6. Avaliação do efeito inseticida

Com o advento e desenvolvimento da ecologia bioquímica, foram atribuídas as substâncias presentes nas plantas, importância relevante nos mecanismos de defesa contra predadores e outros organismos. Estas substâncias envolvidas nos mecanismos de defesa da planta contra agentes agressores são conhecidas como fitoalexinas, sendo constituídas pelos fenóis, lignanas, isoflavonóides, fenantrenóides, flavonóides, benzofuranos, naftoquinonas, poliacetilenos, monoterpenos, diterpenos (LIMA, 2001).

As folhas mostraram taxa de mortalidade (%) significativa contra *Sitophilus zeamais*, onde no quinto dia a mortalidade foi de  $62,50 \pm 12,87$  e no décimo dia de  $79,50 \pm 09,78$ . A partir desses resultados podemos concluir que as folhas de *C. adamantium* possuem substâncias com atividade inseticida.

Este estudo sugere que o extrato etanólico (**EEtOH**) das folhas de *C. adamantium* é eficiente como inseticida natural, podendo ser usado na indústria ou pelo pequeno agricultor na substituição de agrotóxicos, durante o armazenamento de grãos, principalmente produtos como o trigo, os quais, muitas vezes chegam ao local de distribuição já contaminado com *Sitophilus zeamais*. Todavia, estudos para avaliação do efeito tóxico são necessários antes de serem empregados comercialmente.

## 5. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que os óleos essenciais das folhas de *C. adamantium* são ricos em terpenos, principalmente os monoterpenos e sesquiterpenos, e que há variação na composição relativa destas diferentes classes de acordo com o estágio fenológico da planta. Esta variação resultou na alteração da atividade antimicrobiana, onde os óleos ricos em monoterpenos mostraram moderado halo de inibição frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e alto halo de inibição para o fungo *Candida albicans*. As flores são ricas em sesquiterpenos.

O estudo da atividade antioxidante frente ao ensaio efeito “seqüestro” de radical e inibição da peroxidação lipídica mostrou que as folhas de *C. adamantium* são ricas em substâncias antioxidantes, e que estas substâncias respondem de forma diferente frente aos ensaios com radical livre DPPH e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.

Os extratos submetidos ao ensaio de atividade antimicrobiana exibiram halo de inibição de moderado a alto para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans*. O extrato etanólico das folhas apresentou atividade contra o inseto *Sitophilus zeamais*.

O estudo fitoquímico das folhas de *C. adamantium* está sendo relatado pela primeira vez na literatura e levou ao isolamento de 1 esteróide, 5 são flavanonas, 3 são chalconas, 1 flavonol, 3 flavonóis glicosilados, sendo uma delas descrita pela primeira vez na literatura.

Os extratos obtidos das folhas coletadas durante o verão, outono e primavera mostraram alteração na composição química, teor de fenóis e atividade antioxidante.

Considerando os resultados aqui apresentados, este trabalho representa uma contribuição para a fitoquímica da família da Myrtaceae. Os resultados dos ensaios de atividade biológica somam-se ao estudo fitoquímico com contribuição ao conhecimento das potencialidades desta espécie.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. 2. ed. Illinois-USA: Allured publishing corporation, 469 p., 1995.

ADATI, R. T.; FERRO, V. O. Volatile oil constituents of *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum. (*Myrtaceae*). **Journal Essential Oil Research**, v. 18, p. 691-692, 2006.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC n. 73, de 13 de abril de 2004 (ANVISA). In Farmacopéia Brasileira, [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br), acesso em 07/2007.

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Elsevier science publishing: New York-USA, 1989, 563 p.

ALVES, L. F. O laboratório da flora medicinal: marco no estudo das plantas medicinais brasileiras. **Revista Fitos**, v. 1, p. 30-40, 2005.

BHAT, S. V.; NAGASAMPAGI, B. A.; SIVAKUMAR, M. **Chemistry of Natural Products**. Narosa Publishing House, New York, 2007, cap. 9, p. 593.

BIAVATTI, M. W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L. M.; HORT, L.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F.Macbr. aqueous extract: Weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 385-389, 2004.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH<sup>•</sup> free radical method. **Food Science and Technology**,

30, p. 609-615, 1997.

BONILLA, A.; DUQUE, C.; GARZON, C.; TAKAISHI, Y.; YAMAGUCHI, K.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Champanones, yellow pigments from the seeds of champa (*Campomanesia lineatifolia*). **Phytochemistry**, v. 66, p. 1736-1740, 2005.

BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLO, V. R.; RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (RBCF)**, v. 42, p. 195-202, 2006.

BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; LIN, L-Z.; HARNLY, J. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. **Food chemistry**, v. 105, p. 1112-1118, 2007.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy: Phytochemistry Medicinal Plants**. 2. ed. Hampshire, U.K.: Intercept, 1999, p. 485.

BUTTERY, R. G.; LING, L. Corn leaf volatiles: identification using Tenax trapping for possible insect attractants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 1104-1106, 1984.

CAI, Y.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure-radical scavenging activity relationship of phenolic compounds from traditional chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 2872-2888, 2006.

CANNON, J. R.; MARTIN, P. F. The flavanones of *Agonis spathulata* (Myrtaceae). **Australian Journal Chemistry**, v. 30, p. 2099-2101, 1977.

CARLINI, E. L. A.; RODRIGUES, E. Plantas medicinais do Brasil: O pesquisador brasileiro consegue estudá-las? **Revista Fitos**, v. 1, p. 8-18, 2005.

CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L. O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acesso de mentrasto. **Química nova**, v. 27, p. 55-57, 2004.

CORDEIRO, R.; NUNES, V. A.; ALMEIDA, C. R. **Plantas que Curam**. São Paulo: Editora Três Ltda, 1996, v. 1, p. 9.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Estudo comparativo do perfil químico e do uso popular de espécies das famílias myrtaceae e melastomataceae. In: **XXVI Reunião Anual Sobre Evolução Sistemática e Ecologia Micromoleculares**, 2004, Rio de Janeiro. Resumos... Rio de Janeiro: Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, 2004. Anais.

DI MAJO, D.; GIAMMANCO, M.; LA GUARDIA, M.; TRÍPOLI, E.; GIAMMANCO, S.; FINOTTI, E. Flavanones in Citrus fruit: structure-antioxidant activity relationships. **Food Research International**, v. 38, p. 1161-1166, 2005.

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

DEWICK, P. M. The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathways: terpenoids and steroids. **Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach**. 2.ed. England: John Wiley & Sons, LTD, 2005, p. 167-285.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Evaluation of the antioxidant activity using the  $\beta$ -carotene/linoleic acid system and the DPPH scavenging method. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.

DURINGAN, G. **Plantas do Cerrado Paulista: Imagens de uma Paisagem Ameaçada**. São Paulo: Páginas e Letras Editora e Gráfica, 2004, p. 325.

EGERTON-WARBURTON, L. M.; GHISALBERTI, E. L.; CONSIDINE, J. A. Intraspecific variability in the volatile leaf oils of *Chamelaucium uncinatum* (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 873-888, 1998.

FIGUEIREDO, M. B.; PIMENTEL, C. P. Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca da seção do instituto Biológico. **Summa Phytopatologica**, v. 1, p. 299-302, 1975.

GEISSMAN, T. A., CROUT, D. H. G. **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**. United States of America: Freeman, Cooper & Company, 1969, p. 232-266.

GAFNER, S.; WOLFENDER, J. L.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and antibacterial chalcones from *Myrica serrata*. **Planta Medica**, v. 62, p. 67-69, 1996.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

HARBORNE, J. B. **The Flavonoids Advances in Research Since 1986**. Chapman e Hall: Londres, 1996.

HAYDER, N.; BOUHLEL, I.; SKANDRANI, I.; KADRI, M.; STEIMAN, R.; GUIRAUD, P.; MARIOTTE, A-M.; GHEDIRA, K.; DIJOUX-DIJOUX, M-G.; CHEKIR-GHEDIRA, L. In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-O-galactoside and myricetin-3-O-rhamnoside from *Myrtus communis*: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. **Toxicology in vitro**, in press, 2008.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C. A.; APEL, M. A. **Óleos Essenciais: Importância e Perspectivas Terapêuticas**. In Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Edition n. 1; Rosendo, A. Y.; Cechinel-Filho, V., Eds.; Publisher: Itajaí, Brazil, Universidade do Vale do Itajaí, 2006, p. 211.

HIDEYUKI, I.; HITOMI, I.; NAOKI, K.; MIYUKI, K.; TAKASHI, Y. Kunzeanones A, B and C: novel alkylated phloroglucinol metabolites from *Kunzea ambigua*. **Tetrahedron**, v. 60, p. 9971-9976, 2005.

HODEK, P.; Trefil, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, v. 139, p. 1-21, 2002.

HOMANS, A. L.; FUNCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal Chromatography**, v.51, p.327-329, 1970.

HOMER, L. E.; LEACH, D. N.; LEA, D.; LEE, L. S.; HENRY, R. J.; BAVERSTOCK, P. R. Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 367-382, 2000.

ISIDOROV, V.A.; ZENKEVICH, I.G.; DUBIS, E.N.; SLOWIKOWSKI, A.; WOJCIUK, E. Group identification of essential oils components using partition coefficients in a hexane-acetonitrile system. **Journal Chromatography A**, v. 814, p. 253-260, 1998.

ITOKAWA, H.; MORITA, M.; MIHASHI, S. Phenolic compounds from the rhizomes of *Alpinia speciosa*. **Phytochemistry**, v.20, p. 2503-2506, 1981.

KOROLKOVAS, A. A riqueza potencial de nossa flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, p. 1-7, 1996.

LAGO, J. H. G.; SOARES, M. G.; BATISTA-PEREIRA, L. G.; SILVA, M. F. G. F.; CORRÊA, A. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; ROQUE, N. F. Volatile oil from *Guarea macrophylla* ssp. *tuberculata*: seasonal variation and electroantennographic detection by *Hypsipyla grandella*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 589-594, 2006.

LANÇAS, F. **Cromatografia em Fase Gasosa**. São Carlos: Acta, 1993, 254 p.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, p. 71-77, 2003.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p. 293-303, 2001.

LIMA, E. O. **Plantas e suas Propriedades Antimicrobianas: uma Breve Análise Histórica**. In Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Orgs. Rosendo Augusto Yunes & João Batista Calixto. Chapecó: Agros, 2001, p. 481.

LIMBERGER, C.; BESSIERE, J-M.; HENRIQUES, A. Essential oils from *Calyptanthes concinna*, *C. lucida* and *C. rubella* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (RBCF)**, v. 38, p. 357, 2002.

LIMBERGER, R. P.; APEL, M.A.; SOBRAL, M.; MORENO, P.R.H.; HENRIQUES, A. T.; MENU, C. Aromatic Plant from Brazil - Chemical Composition of Essential Oils from Some *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal Essential Oil Research**, v. 13, p. 113-115, 2001.

LIMBERGER, R.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÉRE, J-M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, p. 916-919, 2004.

LIN, J-Y; TANG, C-Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**, v. 101, p.140-147, 2007.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C.; GARCÍA-GARCÍA, P. "The herbs that have the

property of healing ...”: the phytotherapy in Don Quixote. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 429-441, 2006.

MARCONDES, A. A.; CORRÊA, M. A.; GUIMARÃES, O. A.; NAKASHIMA, T. **Extração e análise química de óleos essenciais de folhas verdes e frescas de *Campomanesia sessiflora* (Berg.) Mattos, VIA GC/MS-MSD**. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 2000, Cuiabá. Resumos... Cuiabá: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 2002. CD ROM.

MARINOVA, E.; TONEVA, A.; YANISHLIEVA, N. Synergistic antioxidant effect of  $\alpha$ -tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 106, p. 628-633, 2008.

MARKHAM, K. R. **Techniques of Flavonoids Identification**. New York: Academic Press, 1982, p.36-49.

MARKMAN, B. E. O., BACCHI, E. M., KATO, E. T. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 55-57, 2004.

MATA, A. T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A. R.; SERRALHEIRO, M. L. M.; NOGUEIRA, J. M. F.; ARAÚJO, M. E. M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, v. 103, p. 778-786, 2007.

MATHIESEN, L.; MALTERUD, K. E.; SUND, R. B. Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of c-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. **Free radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 307-311, 1997.

MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: UFC: Edições UFC, 1997, p. 18-40.

MENUT, C.; VERIN, P.; BESSIERE J. M.; LAMATY, G.; HENRIQUES, A. T.; VON POSER, G. L.; TOFFOLI, M. E.; SOBRAL, M. E. **Chemical Exploration of Brazilian Aromatic Species Belonging to the Myrtaceae Family**, 27th International Symposium on Essential Oils, Viena (1996), Edits. Ch. Franz, A. Mathé and G. Buchbauer, 171-183, Allured Publication Corporation, Carol Stream, IL, 1997.

MUSTAFÁ, K.; PERRY, N. B.; WEAVES, R. T. Lipophilic C-methylflavonoids with no B-ring oxygenation in *Metrosideos* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics Ecology**, v. 33, p. 1049-1059, 2005.

NODARI, R. O.; GUERRA, M.P. **Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos**. In: Simões, C. M. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2000, p. 11-24.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-effective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 125-137, 2007.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Antioxidant therapy: Myth or Reality? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 699-710, 2005.

OSORIO, C.; ALARCON, M.; MORENO, C.; BONILLA, A.; BARRIOS, J.; GARZON, C.; DUQUE, C. Characterization of odor-active volatiles in Champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 509-516, 2006.

PIVA, M. G. **O Caminho das Plantas Medicinais: Estudo Etnobotânico**. Rio de Janeiro: Mondrian, 2002, p. 225.

PINO, J. A.; BELLO, A.; URQUIOLA, A.; AGÜERO, J.; MARBOT, R. Leaf oils of *Psidium cymosum* Urb. and *Psidium sartorianum* Niedz. From Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 187-188, 2003.

POTT, A.; POTT, V. J. Flora do Pantanal: listagem atual de fanerógamas. In: **II Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômico do Pantanal: Manejo e Conservação**, 1996, Corumbá. Resumos ... Corumbá: Embrapa Pantanal, 1996. Anais.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755-760, 2006.

SANTOS, R. I. **Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários**. In Farmacognosia: da planta ao medicamento. Cláudia Maria Oliveira Simões. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2000. p. 323-354.

REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; CORRÊA, J.B.C. Determinação espectrofotométrica de taninos pelo reativo fosfotúngstico-fosfomolibdico. **Arquivo de Biologia Tecnológica**, v. 24, 1981.

SAXENA, V. K.; ALBERT, S.;  $\beta$ -sitosterol-3-O-  $\beta$ -D-xylopyranoside from the flowers of *Tridax procumbens* Linn. **Journal of Chemistry Science**, v. 117, p. 263-265, 2005.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia**, v. 66, p. 373-374, 1995.

SCHRÖDER, J.; RAIBER, S.; BERGER, T.; SCHMIDT, A.; SCHMIDT, J.; SOARES-SELLO, A. M.; BARDSHIRI, E. STRACK, D. SIMPSON, T. J.; VEIT, M.; SCHRÖDER, G. Plant polyketide synthases: a chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of c-methylated chalcones. **Biochemistry**, v. 37, 8417, 1998.

SILVA, C. V.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, nº 1, p. 86, 2005.

SILVA, J. R. M.; CARDOSO, C. A. L.; COELHO, R. G.; HONDA, N. K. H. Isolamento e identificação de chalconas e avaliação da atividade antioxidante no extrato hexânico dos

frutos de *Campomanesia pubescens*. In: **XVI Congreso italo-latinoamericano de etnomedicina**, 2007, La Plata, Argentina. Resumos...Sociedad Italo-latinoamericana de etnomedicina (SILAE), 2007. Anais.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: Simões, C. M. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2000, p. 387-415.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p. 276.

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

STEFANELLO, M. E. A.; CERVI, A. C.; JÚNIOR, A. W.; SIMIONATTO, E. L. Óleo essencial de *Gochnatia polymorpha* (LESS) CABR. Ssp floccosa CABR. **Química Nova**, v. 29, p. 999-1002, 2006.

SULTANA, B.; ANWAR, F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal herbs. **Food Chemistry**, v. 108, p. 879-884, 2008.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. Trees. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1106-1114, 2007.

TEPE, K.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, v. 90, p. 333-340, 2005.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; MOYÁ, M. L.; TRONCOSO, A. M.;

GARCÍA-PARILLA, M. C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, p. 230-235, 2006.

VOGEL, A. I. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**. 5<sup>a</sup> ed. Longman scientific & technical, UK, 1989. p. 383.

TANRISEVER, N.; FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H.; WILLIAMSON, G. B. Ceratiolin and other flavonóides from *Ceratiola ericoides*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 175-179, 1987.

TEPE, B.; SOKMEN, M.; SOKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSION, M. Antimicrobial and antioxidante activity of the essential oil and various extracts of *Cyclotrichium origanifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. **Journal of Food Engineering**, v. 69, p. 335-342, 2005.

TEWTRAKUL, S.; SUBHADHIRASAKUL, S; PURIPATTANAVONG, J.; PANPHADUNG, T. HIV-1 protease inhibitory substances from the rizhomes of *Boesenbergia pandurata* Hallt. **Songklanakarín Journal Science Technology**, v. 25, p. 503-508, 2003.

TERREAUX, C.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMAN, K. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 461-464, 1998.

TUNG, Y-T.; WU, J-H.; KUO, Y-H.; CHANG, S-T. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1120-1123, 2006.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABERLOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg., **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 805-810, 2006.

VERZA, S. G.; KREINECKER, M. T.; REIS, V.; HENRIQUES, A. T.; ORTEGA, G. G. Avaliação das variáveis analíticas do método de folin-ciocalteau para a determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. **Química Nova**, v. 30, 815-820, 2007.

WANG, Z-T.; LAU, C-W.; CHAN, F. L.; YAO, X.; CHEN, Z-Y.; HE, Z-D.; HUANG, Y. Vasorelaxant effects of cardamonin and alpinetin from *Alpinia henry* K. Schum. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 37, p. 596-606, 2001.

YASUKAWA, K.; HIROSHI, O.; TAKIDO, M. Two flavonol glycosides from *Lysimachia nummularia*. **Phytochemistry**, 29, 1707-1708, 1990.

ZHAO, C.-X.; LIANG, Y.-Z.; FANG, H.-Z.; LI, X.-N. Temperature-programmed retention indices for a gás chromatography-mass spectroscopy analysis of plant essential oils. **Journal Chromatography A**, v. 76, p. 1096, 2005.