

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL/MG**

**RENAN GOMES BASTOS**

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS OBTIDOS DAS FOLHAS DE *Eugenia florida* DC.  
(MYRTACEAE)**

Alfenas/MG  
2016

RENAN GOMES BASTOS

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS OBTIDOS DAS FOLHAS DE *Eugenia florida* DC.  
(MYRTACEAE)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Obtenção e Avaliação de Insumos Farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva.

Co-orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Borges de Araújo Paula.

Alfenas/MG  
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Bastos, Renan Gomes.

Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas dos extratos obtidos das folhas de *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae). / Renan Gomes Bastos. – Alfenas - MG, 2016.

180 f.

Orientador: Marcelo Aparecido da Silva.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Compostos químicos. 3. Compostos Fenólicos. 4. Flavonoides. 5. Taninos. I. Silva, Marcelo Aparecido da. II. Título.

CDD-615.321


**RENAN GOMES BASTOS**

“Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas dos extratos obtidos das folhas de *Eugenia florida* DC.(myrtaceae)”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 19 / 02 / 2016

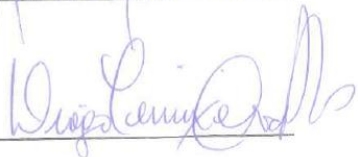
Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Maria do Socorro Fernandes Melo  
Instituição: Fac. Pitágoras

Assinatura: 

Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

**A todos que me apoiaram**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas bênçãos concedidas, por iluminar a minha vida, a minha caminhada, e por me dar fé e sustento para que este trabalho pudesse ser realizado; e a Nossa Senhora, por sua fiel intercessão.

Aos meus pais, Silvana e Silvio, por me darem todo o apoio necessário e me guiarem sempre nos melhores caminhos, que foram fundamentais para que eu chegasse até este momento. À minha avó Rosa e à minha tia Sandra, que sempre me apoiaram, torceram e me ajudaram, de várias formas, em todos os momentos.

À minha namorada e futura esposa Aline, um presente de Deus na minha vida, e que, em todos os momentos até aqui, me apoiou e esteve comigo nos momentos de alegria e também nas dificuldades.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva, pela paciência, atenção, compreensão, confiança, por todos os ensinamentos e pelo seu exemplo de profissionalismo, competência e humildade, que me ajudou muito a crescer como profissional.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Borges de Araújo Paula pela co-orientação, e ao doutorando Bruno César Corrêa Salles no auxílio com os ensaios de atividade antirradicalar, nas análises envolvendo os modelos animais e nas análises estatísticas.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amanda Latércia Tranches Dias e às alunas mestranda Josidel Conceição Oliver e doutoranda Naiara Chaves Silva nos auxílios com os testes antimicrobianos.

Ao Prof. Dr. Marcos José Marques e às alunas mestranda Patrícia Ferreira Espuri e graduanda Larissa Reis nos auxílios com os testes de atividade leishmanicida.

Aos professores Dr. Wagner Vilegas e Dr<sup>a</sup>. Cláudia Quintino da Rocha, da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Campus do Litoral Paulista, São Vicente-SP), nos auxílios com os testes envolvendo espectrometria de massas.

A todos do Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, pelo auxílio, companheirismo e amizade; em especial, às técnicas de laboratório Msc<sup>a</sup>. Ana Flávia da Silva e Sílvia Helena Martelli Dias; à auxiliar de laboratório Marilda de Souza Borges; aos professores Dr. Geraldo Alves da Silva e Dr<sup>a</sup>. Tati Ishikawa; e aos alunos de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG, Carla Pereira Rosa e Fabrício Leandro Damasceno.

Aos alunos de Iniciação Científica e Graduação em Farmácia da UNIFAL-MG (Izabela Ferreira Bini, Larissa Pradela Castaldini Letícia Castro Dias Silva, Mônica Scheibel e Pedro Henrique Cruvinel da Silva) pela colaboração em todos os experimentos envolvidos no trabalho.

A todos os amigos de Alfenas-MG, que sempre torceram e estiveram presentes durante todo esse tempo.

À CAPES, pelo auxílio financeiro necessário ao desenvolvimento do presente trabalho, e à Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade de realização do Mestrado.

E aos demais, que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

**“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos se erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe”.**

**(Leonardo da Vinci)**



## RESUMO

As plantas medicinais correspondem às mais antigas estratégias empregadas pelo homem no tratamento de enfermidades de todos os tipos. Devido à grande diversidade vegetal com potencial terapêutico, ao histórico e à cultura do povo brasileiro, plantas com potencial antioxidante, antidiabético, antimicrobiano e leishmanicida têm sido alvo de estudo por uma gama de pesquisadores. Com base nessas informações, a espécie vegetal *Eugenia florida* DC. é uma candidata promissora para tais estudos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos identificar e/ou determinar os compostos químicos presentes no extrato hidroetanólico 70% (v/v) e nos macerados em metanol, acetato de etila, acetona e hexano das folhas da espécie em questão, bem como a avaliação das atividades antirradicalar, antimicrobiana, leishmanicida e antidiabética destes extratos. Inicialmente, fez-se uma triagem fitoquímica preliminar, por meio de cromatografia em camada delgada nos extratos secos, que permitiram a detecção de compostos como flavonoides, taninos, ácidos fenólicos, saponinas e triterpenos. Posteriormente, os extratos foram analisados em espectrômetro de massas, no modo negativo, o que possibilitou a identificação de alguns constituintes químicos da classe dos fenóis, dos terpenoides e das saponinas, baseando-se na massa molecular e nos padrões de fragmentação de algumas das moléculas. As análises químicas quantitativas demonstraram que os extratos hidroetanólico (EB) e o macerado em acetato de etila (M-EtOAc) foram os que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos, enquanto que EB e o macerado em metanol (M-MeOH) foram os que demonstraram conter a maior quantidade de flavonoides e taninos. Na determinação da atividade antirradicalar, o valor de CE<sub>50</sub> para EB apresentou-se bem próximo ao obtido com o padrão de quercetina, indicando uma excelente atividade. Os macerados apresentaram atividade antirradicalar bem menor. Nas análises de atividade antimicrobiana, o M-MeOH foi o que se mostrou mais ativo contra as leveduras testadas, mas todos eles foram pouco efetivos para as bactérias usadas. Nenhum dos extratos foi efetivo para inibir o crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* utilizadas no teste. Na avaliação dos parâmetros bioquímicos de ratos diabéticos tratados com EB, observaram-se diminuições significativas nos níveis séricos de glicose, frutossamina e triglicérides, bem como o aumento dos níveis de colesterol HDL. A administração do EB não apresentou efeitos sobre a função renal, na atividade de AST e ALT e nos demais parâmetros do perfil lipídico. Porém, ocorreu melhora nos danos hepáticos e renais nos animais diabéticos tratados, através da redução do malondialdeído (MDA). Dessa forma, concluiu-se que a espécie *E. florida* DC. apresenta um potencial biológico interessante, devido, principalmente, aos seus metabólitos secundários bioativos, que demonstraram promissora atividade sobre os parâmetros bioquímicos em modelos de ratos diabéticos.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. *Eugenia florida* DC. Constituintes químicos. Compostos fenólicos. Flavonoides. Taninos. Potencial biológico.

## ABSTRACT

The medicinal plants correspond to the earliest strategies employed by man in the treatment of diseases of all types. Due to the great plant diversity with therapeutic potential, the history and culture of the Brazilian people, plants with potential antioxidant, antidiabetic, antimicrobial and leishmanicidal have been the study by a range of researchers. Based on this information, the plant species *Eugenia florida* DC. is a promising candidate for such studies. Thus, this study aimed to identify and/or determine the chemical compounds present in hydroethanolic extract 70% (v/v) and macerated in methanol, ethyl acetate, acetone and hexane of species leaves in question, and evaluating the antiradical, antimicrobial, antidiabetic and leishmanicidal activities. Initially, there was a preliminary phytochemical screening by means of thin layer chromatography in dry extracts, which allowed the detection of compounds such as flavonoids, tannins, phenolic acids, terpenoids and saponins. Subsequently, the extracts were analyzed in a mass spectrometer in negative mode, which allowed the identification of some chemical constituents of phenolics, terpenoids and saponins, based on the molecular weight and fragmentation mechanisms of some of the molecules. Quantitative chemical analysis showed that hydroethanolic extracts (EB) and macerated in ethyl acetate (M-EtOAc) were those with the highest levels of phenolic compounds, while EB and macerated in methanol (M-MeOH) were the demonstrated that contain the greater amount of flavonoids and tannins. In determining the antiradical activity, the EC<sub>50</sub> value for EB presented very close to that obtained with standard quercetin, indicating an excellent activity. The macerated showed much lower antiradical activity. In the analysis of antimicrobial activity, the M-MeOH was more active against the yeast tested, but they were ineffective for bacteria used. None of the extracts was effective to inhibit the growth of promastigotes of *Leishmania amazonensis* used in the test. In evaluating the biochemical parameters of diabetic rats treated with EB, there were significant decreases in serum glucose, fructosamine and triglyceride levels and increasing HDL cholesterol levels. EB's administration has had no effect on renal function, in AST and ALT activity and other parameters of lipid profile. However, there was an upgrade in liver and kidney damage in diabetic animals treated through reduction of malondialdehyde (MDA). Thus, it was concluded that the species *E. florida* DC. presents an interesting biological potential, mainly due to its bioactive secondary metabolites, which have demonstrated promising activity on biochemical parameters in models of diabetic rats.

**Keywords:** Medicinal plants. *Eugenia florida* DC. Chemical constituents. Phenolic compounds. Flavonoids. Tannins. Biological potential.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>a.C.</b>	Antes de Cristo
<b>AGEs</b>	Produtos de glicação avançada
<b>AGPI</b>	Ácidos graxos poliinsaturados
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>AT</b>	Atividade antimicrobiana total
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	Infusão de cérebro humano
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CDR</b>	<i>Cerebellar degeneration-related gene</i>
<b>CE</b>	Controle extrato
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentração que representa o sequestro de 50% de radical DPPH
<b>CETP</b>	Proteína plasmática transportadora de ésteres de colesterol
<b>CHE</b>	Colesterol esterase
<b>CHOD</b>	Colesterol oxidase
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>CN</b>	Controle negativo
<b>CT</b>	Colesterol total
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DHAP</b>	Fosfato de diidroxiacetona
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DN</b>	Diabético normal
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
<b>DT</b>	Diabético tratado
<b>EAG</b>	Equivalente de ácido gálico
<b>EAT</b>	Equivalente de ácido tânico
<b>EB</b>	Extrato bruto hidroetanólico 70% v/v
<b>EQ</b>	Equivalente de quercetina
<b>ERNs</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ESI</b>	Ionização por <i>electrospray</i>
<b>FIA</b>	Análise por injeção em fluxo
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>GFAT</b>	Glutamina frutose-6-fosfato amidotransferase
<b>Gln</b>	Glicina
<b>Glu</b>	Ácido glutâmico
<b>GOD</b>	Glicose oxidase
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glicada
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>HHDP</b>	Hexa-hidroxi-difenoil- <i>D</i> -glicose
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>HPLC</b>	<i>High performance liquid chromatography</i>

<b>HuH7</b>	Hepatócitos humanos do tipo H7
<b>IT</b>	<i>Ion-trap</i>
<b>IR</b>	Receptor de insulina
<b>ISM%</b>	Índice de susceptibilidade
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>LIT</b>	<i>Liver infusion triptose</i>
<b>M-Acet</b>	Macerado em acetona
<b>MDA</b>	Malonaldeído
<b>MDH</b>	Malato desidrogenase
<b>MDR</b>	<i>Multi-drug resistance gene</i>
<b>M-EtOAc</b>	Macerado em acetato de etila
<b>M-Hex</b>	Macerado em hexano
<b>MIC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória mínima para inibir 50% de crescimento
<b>MIC<sub>90</sub></b>	Concentração inibitória mínima para inibir 90% de crescimento
<b>M-MeOH</b>	Macerado em metanol
<b>MS</b>	Espectrometria de massas
<b>MS<sup>2</sup></b>	Espectrometria de massas de segunda ordem
<b>MS<sup>n</sup></b>	Espectrometria de massas em múltiplos estágios
<b>MTT</b>	Azul de nitrotetrazólio
<b>N°</b>	Número
<b>n-HDL</b>	Lipoproteínas aterogênicas
<b>NP/PEG</b>	Difenilboriloxietilamina em polietilenoglicol
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>P</b>	Fosfato
<b>P%</b>	Percentual de atividade
<b>PBS</b>	Tampão fosfato
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PMSF</b>	Fenil-metilfluoridosulfóxido
<b>POD</b>	Peroxidase
<b>RL</b>	Radical livre
<b>RSV</b>	Vírus sincicial respiratório
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SPE</b>	Extração em fase sólida
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TFG</b>	Taxa de filtração glomerular
<b>T<sub>m</sub></b>	Tamanho médio de partícula
<b>UDP-GLcNAc</b>	UDP-N-acetilglicosamina
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>UNIFAL-MG</b>	Universidade Federal de Alfenas
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta e visível
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muito baixa densidade

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Espécie <i>Eugenia florida</i> DC. ....	28
Figura 2 –	Estrutura básica dos flavonoides .....	31
Figura 3 –	Vias de danos gerados pela hiperglicemia .....	52
Figura 4 –	Distribuição da porcentagem do pó das folhas de <i>Eugenia florida</i> DC retido em cada tamis .....	73
Figura 5 –	Perfis cromatográficos dos extratos secos obtidos das folhas de <i>E. florida</i> DC. ....	77
Figura 6 –	Espectro de massas, em modo <i>full scan</i> , obtido do EB das folhas de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	80
Figura 7 –	Estruturas de alguns compostos fenólicos encontrados no EB de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	82
Figura 8 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (2) .....	83
Figura 9 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (4) .....	84
Figura 10 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (5) .....	85
Figura 11 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (7) .....	86
Figura 12 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (8) .....	87
Figura 13 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (9) .....	88
Figura 14 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (10) .....	88
Figura 15 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (11) .....	89
Figura 16 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (12) .....	90
Figura 17 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (13) .....	90
Figura 18 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (14) .....	91
Figura 19 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (15) .....	92
Figura 20 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (16) .....	92
Figura 21 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (17) .....	93
Figura 22 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (18) .....	94
Figura 23 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (19) .....	96
Figura 24 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (20) .....	96
Figura 25 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (21) .....	97
Figura 26 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (22) .....	97
Figura 27 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (23) .....	98
Figura 28 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (24) .....	99
Figura 29 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (25) .....	100
Figura 30 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (26) .....	101
Figura 31 –	Estruturas químicas dos compostos (27) e (33) .....	102
Figura 32 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (28) .....	103
Figura 33 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (29) .....	104
Figura 34 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (30) .....	105
Figura 35 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (31) .....	106
Figura 36 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (32) .....	107
Figura 37 –	Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (34) .....	108
Figura 38 –	Reação do ácido gálico com o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu .....	111
Figura 39 –	Formação do complexo entre flavonoide (quercetina) e o alumínio .....	112

Figura 40 –	Reação de oxidorredução entre a molécula antirradicalar (RH) e a substância sequestradora de radicais (DPPH) .....	115
Figura 41 –	Atividade sequestrante de radicais DPPH com os extratos das folhas de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	116

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Estruturas de alguns compostos naturais bioativos isolados de plantas .....	23
Quadro 2 –	Estruturas moleculares das principais subclasses dos flavonoides .....	31
Quadro 3 –	Estruturas básicas de galotaninos, elagitaninos, proantocianidinas e oligômeros .....	35
Quadro 4 –	Compostos bioativos isolados de plantas do gênero <i>Eugenia</i> sp .....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Cálculo do tamanho médio das partículas das folhas pulverizadas de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	74
Tabela 2 –	Rendimentos dos extratos obtidos das folhas de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	75
Tabela 3 –	Espectrometria de massas por injeção direta e ionização por electrospray do EB de <i>E. florida</i> DC. ....	80
Tabela 4 –	Teores de fenóis totais, flavonoides e taninos nos extratos das folhas de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	109
Tabela 5 –	Valores de CE <sub>50</sub> (µg/mL) obtidos na avaliação de atividade antirradicalar dos extratos das folhas de <i>Eugenia florida</i> DC, utilizando o método de DPPH .....	118
Tabela 6 –	Avaliação do perfil de sensibilidade de leveduras do gênero <i>Candida</i> sp frente aos extratos das folhas de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	121
Tabela 7 –	Avaliação do perfil de sensibilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> frente aos extratos das folhas de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	124
Tabela 8 –	Valores de IC <sub>50</sub> (µg/mL) obtidos na avaliação da atividade leishmanicida com os extratos das folhas de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	127
Tabela 9 –	Avaliação do perfil glicêmico em ratos <i>Wistar</i> submetidos ou não ao tratamento com EB de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	129
Tabela 10 –	Avaliação da função renal em ratos <i>Wistar</i> submetidos ou não ao tratamento com EB de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	132
Tabela 11 –	Avaliação da função hepática em ratos <i>Wistar</i> submetidos ou não ao tratamento com EB de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	135
Tabela 12 –	Avaliação do perfil lipídico em ratos <i>Wistar</i> submetidos ou não ao tratamento com EB de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	136
Tabela 13 –	Concentrações de proteínas totais e malondialdeído nos homogeneizados de fígado e rins de ratos <i>Wistar</i> submetidos ou não ao tratamento com EB de <i>Eugenia florida</i> DC. ....	139



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	PLANTAS MEDICINAIS E A IMPORTÂNCIA DA FITOTERAPIA .....	18
2.2	UMA VISÃO GERAL SOBRE O METABOLISMO SECUNDÁRIO .....	20
2.3	A FAMÍLIA MYRTACEAE E O GÊNERO <i>Eugenia</i> sp .....	27
<b>2.3.1</b>	<b>Aspectos botânicos</b> .....	27
<b>2.3.2</b>	<b>Aspectos fitoquímicos</b> .....	29
2.3.2.1	Compostos fenólicos .....	30
2.3.2.1.1	<i>Flavonoides</i> .....	30
2.3.2.1.2	<i>Taninos</i> .....	34
2.3.2.2	Compostos bioativos isolados em <i>Eugenia</i> sp .....	39
<b>2.3.3</b>	<b>Aspectos farmacológicos e biológicos</b> .....	43
2.3.3.1	Infecções microbianas .....	43
2.3.3.2	Leishmaniose .....	47
2.3.3.3	Diabetes e suas relações com estresse oxidativo e peroxidação lipídica .....	50
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	56
3.1	OBJETIVOS GERAIS .....	56
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	56
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	57
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	57
4.2	DEPÓSITO DA EXSICATA .....	57
4.3	SECAGEM E MOAGEM DO MATERIAL VEGETAL .....	57
4.4	DETERMINAÇÃO DA PERDA POR SECAGEM .....	58
4.5	DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA .....	58
4.6	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS SECOS .....	59
4.7	TRIAGENS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) .....	60
4.8	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (HPLC-ESI-IT-MS <sup>n</sup> E FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> ) .....	60
4.9	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS .....	61
4.10	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES .....	62
4.11	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TANINOS .....	63
4.12	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRRADICALAR PELO SEQUESTRO DE RADICAIS DPPH .....	64
4.13	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	65
4.14	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA .....	65
4.15	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM MODELOS MURINOS DIABÉTICOS .....	67
<b>4.15.1</b>	<b>Animais</b> .....	67
<b>4.15.2</b>	<b>Indução do diabetes <i>mellitus</i></b> .....	68
<b>4.15.3</b>	<b>Administração dos extratos</b> .....	68
<b>4.15.4</b>	<b>Obtenções das amostras biológicas</b> .....	68
<b>4.15.5</b>	<b>Determinações bioquímicas no soro dos animais</b> .....	69
<b>4.15.6</b>	<b>Preparo dos homogeneizados de rim e fígado</b> .....	70
<b>4.15.7</b>	<b>Determinação da concentração proteica</b> .....	70

4.15.8	<b>Determinação da atividade sobre peroxidação lipídica</b> .....	71
4.16	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	71
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	72
5.1	DETERMINAÇÃO DA PERDA POR SECAGEM .....	72
5.2	DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA .....	73
5.3	RENDIMENTOS DOS EXTRATOS SECOS .....	75
5.4	TRIAGENS FITOQUÍMICAS .....	77
5.5	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	79
5.6	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONOIDES E TANINOS .....	109
5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRRADICALAR PELO SEQUESTRO DE RADICAIS DPPH .....	115
5.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	120
5.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA .....	126
5.10	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM MODELOS MURINOS DIABÉTICOS .....	128
<b>5.10.1</b>	<b>Determinação do perfil glicêmico – glicemia de jejum e frutossamina</b> .....	128
<b>5.10.2</b>	<b>Avaliação da função renal – ureia e creatinina</b> .....	132
<b>5.10.3</b>	<b>Avaliação da função hepática – AST e ALT</b> .....	134
<b>5.10.4</b>	<b>Determinação do perfil lipídico – colesterol total (CT), HDL, n-HDL e triglicerídeos</b> .....	135
<b>5.10.5</b>	<b>Determinação da peroxidação lipídica</b> .....	138
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	141
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	142
	<b>APÊNDICE</b>	
	<b>ANEXO</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia é vista como opção na busca de soluções terapêuticas, utilizada principalmente pela população de baixa renda, pois se trata de uma alternativa eficiente, barata e culturalmente difundida (FRANZON et al., 2009).

O Bioma do Cerrado abrange a Região Central do país, de grande concentração populacional, apresentando uma grande demanda de plantas medicinais, passíveis de serem exploradas cientificamente (ZUCCHI et al., 2013).

Devido à grande diversidade vegetal com potencial terapêutico, ao histórico e à cultura do povo brasileiro, plantas com potencial antidiabético, antimicrobiano e leishmanicida têm sido alvo de estudo por uma gama de pesquisadores (FOULADVAND; BARAZESH; TAHMASEBI, 2013).

A terapia medicamentosa no diabetes mostra efeito positivo, porém o custo elevado e os efeitos colaterais de diversas drogas têm despertado o interesse de pesquisadores em conhecer os efeitos de substâncias naturais na redução dos níveis de glicose sanguínea (BALIGA et al., 2011).

Antimicrobianos têm sido usados para o tratamento de enfermidades causadas por bactérias e fungos, contribuindo para a redução da mortalidade. Porém, atualmente, é verificado que os pacientes apresentam resistência ao tratamento com drogas antimicrobianas comerciais, o que tem levado pesquisadores a investigarem o uso de produtos naturais no tratamento dessas infecções (KOCEVSKI et al., 2013).

O tratamento atual da leishmaniose tem sido baseado em quimioterápicos derivados do antimônio. Entretanto, vários estudos demonstram que tais compostos apresentam resultados insatisfatórios. Desta forma, recentemente, pesquisadores têm investigado a aplicação de produtos naturais e seus efeitos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, na cura da leishmaniose (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2013).

Apesar da grande quantidade de informações na literatura sobre o uso popular de plantas no tratamento de doenças, algumas delas ainda são pouco estudadas cientificamente, o que reflete um maior interesse em realizar ensaios químicos e de atividade biológica com as mesmas. Com base nessas informações, a espécie vegetal *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae), já usada popularmente como planta medicinal, é uma candidata promissora para tais estudos (FRIGHETTO et al., 2005).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão literária denotou aspectos científicos importantes sobre plantas medicinais, com destaque para a família Myrtaceae e para a espécie *Eugenia florida* DC.

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS E A IMPORTÂNCIA DA FITOTERAPIA

Por definição, planta medicinal é todo vegetal que contém, em um ou vários de seus órgãos, princípios ativos que podem ser empregados para objetivos terapêuticos ou precursores de substâncias utilizadas para tais fins, sendo amplamente aplicadas pela medicina alternativa (OLIVEIRA; MENINI NETO, 2012).

O tratamento feito com o uso desses recursos naturais é denominado de fitoterapia e os fitoterápicos são os medicamentos produzidos a partir dos mesmos. Sendo assim, a fitoterapia é caracterizada pelo tratamento com o uso de plantas medicinais e suas diferentes formas farmacêuticas (SIMÕES et al., 2010). Além disso, as moléculas isoladas dessas plantas também podem servir como protótipos para síntese de novas substâncias por meio da química medicinal e sintética (GEMIN, 2011).

As plantas medicinais correspondem às mais antigas estratégias empregadas pelo homem no tratamento de enfermidades de todos os tipos, ou seja, a sua utilização na prevenção e/ou na cura de doenças é um hábito que sempre existiu na história da humanidade (CHAVES; BARROS, 2012). Indícios de seus usos foram encontrados nas civilizações mais antigas da história, e, por isso, o tratamento com plantas pode ser considerado uma das práticas mais remotas utilizadas pelo homem (MADDULURI; SITARAM; BALASEKHARAN, 2014).

Os primeiros registros do uso de plantas como medicamentos datam de 2600 a.C., na Mesopotâmia, onde determinadas espécies como *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) e *Papaver somniferum* (papoula), usadas até hoje, eram empregados para tratamento de tosse, resfriados e infecções parasitárias (PALHARES et al., 2015). Antes do início do século XX, o uso dos produtos naturais se limitava principalmente ao uso de extratos e preparados a partir de plantas, baseado na observação do efeito causado pela sua administração. Pouco se conhecia a respeito da química de plantas medicinais (AJAO; AKINDELE, 2013).

Apesar do grande avanço e evolução da medicina, principalmente a partir da segunda metade do século XX, as plantas ainda representam uma grande contribuição para a manutenção da saúde e do alívio das enfermidades dos países em desenvolvimento (OLIVEIRA; BARROS; MOITA NETO, 2010). Dentre os principais motivos, encontram-se as condições de pobreza da população e a falta de acesso aos medicamentos comerciais, associados à fácil obtenção e tradição do uso popular de plantas com fins medicinais (SANTOS; NUNES; MARTINS, 2012).

Por conta destes fatores, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 80% da população mundial usam recursos das medicinais populares para o suprimento das necessidades de assistência médica privada (ALMEIDA; ALVES; AMARAL, 2012). Nas últimas décadas, tem-se observado um crescente interesse pelo uso de plantas medicinais e dos seus respectivos extratos na terapêutica, o que constitui, em certas circunstâncias, auxílio nos cuidados primários de saúde compatíveis com a medicina convencional (FIRMO et al., 2011).

No Brasil, a prática do uso de fitoterápicos e plantas medicinais é estimulada por diversos movimentos populares, diretrizes de conferências nacionais de saúde e por recomendações da OMS (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014). A publicação da Portaria 971, de 03/05/2006 (BRASIL, 2006), e o decreto nº 5.813, de 22/06/2006 (BRASIL, 2006), que regulamentam a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, respectivamente, foram marcos decisivos para a introdução do uso desses recursos no Sistema Único de Saúde (BRUNING, MOSEGUI; VIANNA, 2012).

Segundo Oliveira e Menini Neto (2012), o estudo de plantas medicinais, a partir de seu emprego pelas comunidades, tem o intuito de fornecer informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos e fitoquímicos sobre as espécies vegetais. Desta forma, pode-se planejar diversas pesquisas a partir de conhecimentos prévios.

Assim, para que haja a validação correta, de modo a verificar a eficiência e segurança das plantas medicinais, há a necessidade da divulgação de documentações técnicas e científicas em bibliografias ou publicações, bem como a realização de ensaios pré-clínicos e clínicos (BRASIL, 2012).

Com isso, pode-se afirmar que o uso da fitoterapia tem motivações diversas, tais como aumentar os recursos terapêuticos, resgatar saberes populares, preservar a biodiversidade, promover o desenvolvimento social e fomentar a educação permanente (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2013).

## 2.2 UMA VISÃO GERAL SOBRE O METABOLISMO SECUNDÁRIO

Os produtos da síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies vegetais são denominados de metabólitos primários, que incluem macromoléculas como lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e proteínas com funções vitais bem definidas. Através de uma gama de rotas biossintéticas, esses produtos originam um segundo grupo de compostos químicos conhecidos como metabólitos secundários (SIMÕES et al., 2010).

O metabolismo especial de plantas superiores produz compostos de estrutura complexa, baixo peso molecular e que apresentam atividades biológicas definidas que, em contraposição aos produtos do metabolismo primário, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em grupos restritos de plantas. A utilização de rotas biossintéticas elaboradas pelo vegetal, na síntese de metabólitos secundários, requer grande gasto de energia, o que explica a hipótese de que essa energia é consumida para a produção de compostos necessários à sobrevivência e preservação da planta (TOSCAN, 2010).

Segundo Bakkali e colaboradores (2008), os produtos advindos do metabolismo secundário em plantas atuam não apenas na defesa do vegetal contra insetos predadores, fungos, bactérias e nematoides, mas também na atração de agentes polinizadores e como sinalizadores químicos na intercomunicação planta-planta. Todas essas características estão intimamente relacionadas com os aspectos químicos das moléculas desses compostos.

Os compostos do metabolismo especial são originários, principalmente, de três rotas metabólicas derivadas da glicose, que são a rota do ácido chiquímico, a rota do acetato e a rota mista, que envolve os dois compostos citados anteriormente. A rota do ácido chiquímico dá origem aos protoalcaloides, alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos, taninos hidrolisáveis, cumarinas e fenilpropanoides. O acetato é precursor da formação de alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos e esteroidais, terpenoides, esteroides, óleos essenciais, saponinas, heterosídeos cardioativos, ácidos graxos e triacilgliceróis. A rota mista dá origem às antraquinonas, flavonoides e taninos condensados (ROWAN, 2011).

Como os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, a síntese é frequentemente afetada por condições ambientais, que podem coordenar ou alterar a taxa de produção. Algumas dessas condições apresentam correlações entre si e não atuam de forma isolada, podendo interferir em conjunto. Exemplos incluem: desenvolvimento, sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura e altitude, dentre outros. É importante ressaltar, também, que os estudos de influência destes fatores na

produção de metabólitos secundários geralmente são limitados a grupos restritos de espécies vegetais e devem ser realizados com cautela (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os metabólitos secundários são conhecidos, cientificamente, por apresentarem atividades biológicas diversas, atuando de forma direta no organismo ou sobre microrganismos patogênicos. Normalmente, estes efeitos estão associados à inibição ou ativação de importantes alvos celulares e moleculares, como mediadores inflamatórios, segundos mensageiros, fatores de transcrição, moléculas, canais iônicos e enzimas (CALIXTO, 2005). Diversos trabalhos de atividade biológica descritos na literatura, com os mais variados tipos de compostos encontrados em plantas, já foram descritos. Alguns exemplos são citados a seguir.

Sánchez-Tena e colaboradores (2012) estudaram a influência do hamamelitanino (Quadro 1, número 1), extraído do hamamélis, *Hamamelis virginiana* (Hamamelidaceae), na atividade citotóxica contra células cancerígenas do cólon. Tal estudo verificou que esse composto pode ser utilizado no tratamento da doença sem comprometer a viabilidade celular, devido à presença de hidroxilas fenólicas altamente reativas e que estão intimamente relacionadas com a atividade.

Ardiles e colaboradores (2012) isolaram um triterpenoide pentacíclico, o ácido friedooleanonoico (Quadro 1, n. 2), da casca da raiz de *Celastrus vulcanicola* (Celastraceae), uma planta trepadeira da região caribenha. Tais pesquisadores verificaram os efeitos do composto na sinalização em cascata mediada pela insulina, utilizando, como modelo biológico, hepatócitos humanos HuH7, altamente sensíveis à estimulação do hormônio. O composto isolado mostrou um efeito muito potente na ação da insulina sobre a fosforilação do receptor IR, etapa essencial para que ocorra a metabolização da glicose. Com isso, o triterpenoide poderia ser usado como protótipo para a elaboração de fármacos usados no tratamento do diabetes.

Silva e colaboradores (2013) verificaram que a epiisopiloturina (Quadro 1, n. 3), um alcaloide imidazólico isolado do jaborandi, *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae), apresenta uma possível atividade antinociceptiva em camundongos da linhagem *Swiss*, por interação com receptores opiáceos, atuando central e periféricamente na redução da dor. Além disso, os autores verificaram a atividade desta molécula na diminuição do edema de pata induzido por carragenina.

Fan e colaboradores (2013) isolaram um derivado do ácido quínico, um *O*-cafeoilquinato (Quadro 1, n. 4), das raízes e dos galhos de *Erycibe obtusifolia* (Convolvulaceae), uma planta chinesa popularmente conhecida como “gongo”. Os

pesquisadores verificaram a sua atividade antiviral contra o vírus sincicial respiratório (RSV), através de análises do efeito citopático sobre os vírus em cultura. Tal composto apresentou uma forte atividade antiviral, em todas as concentrações testadas (1,5-50 µg/mL).

Sepahvand e colaboradores (2014) verificaram que os componentes do óleo essencial extraído das partes aéreas da sálvia, *Salvia sclareoides* (Lamiaceae), como o linalol, carvacrol, espatulenol e agatadiol, exibiram forte atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas patogênicas e deteriorantes de alimentos (Quadro 1, n. 5-8). Tal efeito foi observado em relação aos baixos valores obtidos de concentração inibitória mínima (IC<sub>50</sub>) e à elevada redução da viabilidade microbiana em baixas concentrações do óleo.

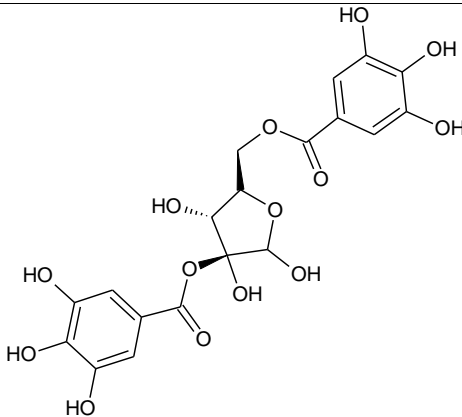
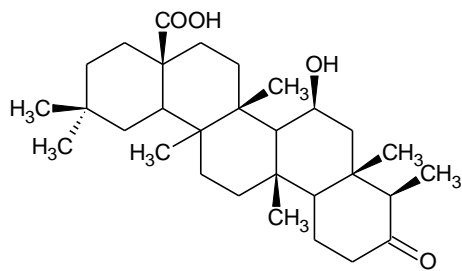
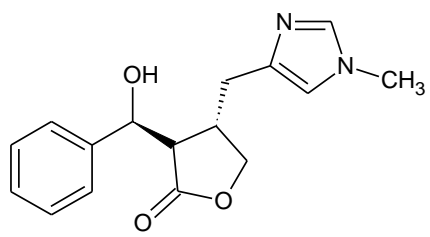
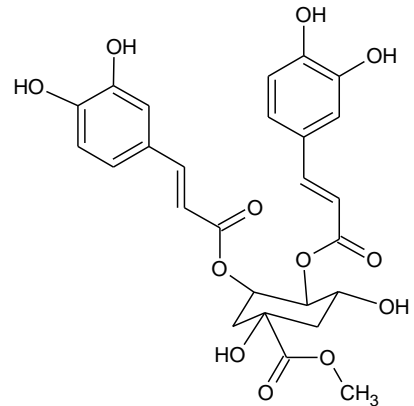
Estudos realizados por Xie e colaboradores (2015) mostraram que o flavonoide kaempferol (Quadro 1, n. 9), extraído das folhas de *Cyclocarya paliurus*, popularmente chamada pelos chineses de “árvore do chá doce”, mostrou uma excelente atividade antirradicalar *in vitro*, com concentração inibitória mínima (IC<sub>50</sub>) de 0,146 mg/mL, o que demonstra seus efeitos benéficos no controle do estresse oxidativo.

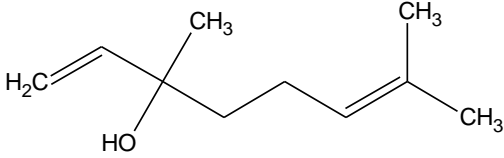
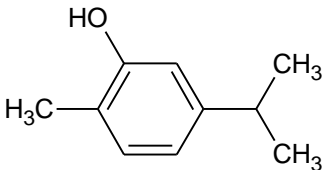
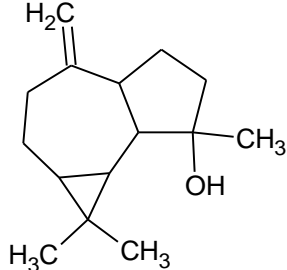
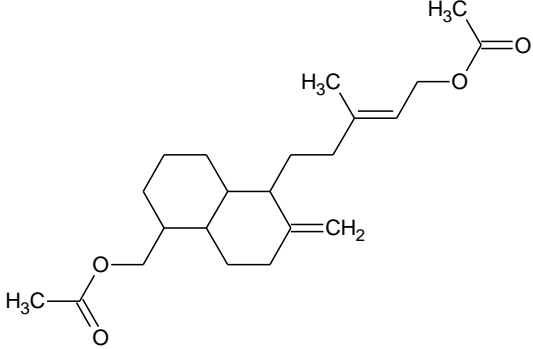
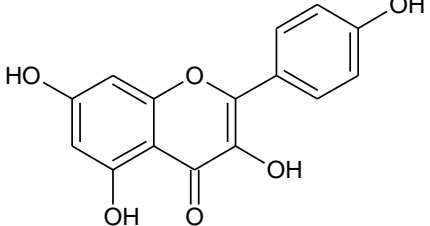
Stankov-Jovanović e colaboradores (2015) relataram que plantas do gênero *Seseli* sp apresentam metabólitos da classe das cumarinas, como a angelicina (Quadro 1, n. 10), e suas aplicações farmacêuticas são variadas, incluindo as atividades antimicrobiana e citotóxica e a ação inibitória sobre as enzimas acetilcolinesterase e monoamino-oxidase.

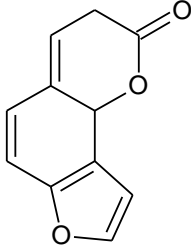
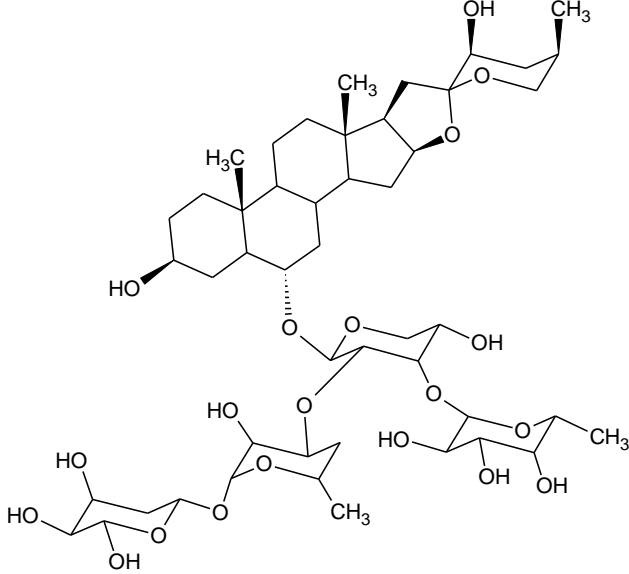
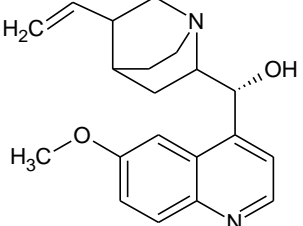
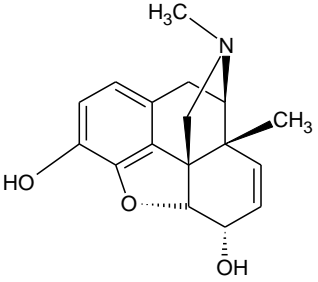
Vieira Júnior e colaboradores (2015) isolaram uma saponina esteroidal, solanolactosídeo B (Quadro 1, n. 11), das partes aéreas (folhas e galhos) da jurubeba (*Solanum paniculatum*) e verificaram que este composto apresenta atividade antiulcerogênica em ratos *Wistar* induzidos com etanol, oferecendo um potencial promissor como possível fármaco.

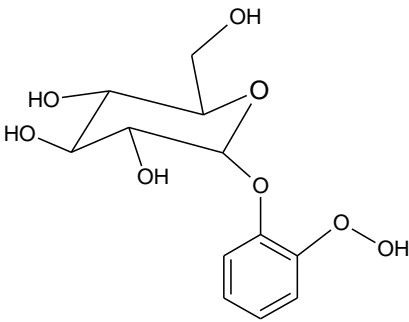
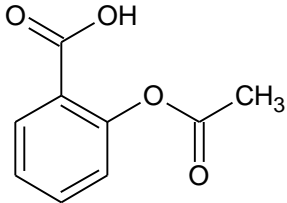


Quadro 1 – Estruturas de alguns compostos naturais bioativos isolados de plantas.

(continua)			
Número	Estrutura	Nome trivial	Referência bibliográfica
1		Hamamelitanino	SÁNCHEZ-TENA et al., 2012.
2		Ácido friedooleanoico	ARDILES et al., 2012.
3		Epiisopiloturina	SILVA et al., 2013.
4		O-cafeoilquinato	FAN et al., 2013.

(continuação)			
Número	Estrutura	Nome trivial	Referência bibliográfica
5		Linalol	SEPAHVAND et al., 2014.
6		Carvacrol	SEPAHVAND et al., 2014.
7		Espatulenol	SEPAHVAND et al., 2014.
8		Agatadiol	SEPAHVAND et al., 2014.
9		Kaempferol	XIE et al., 2015.

Número	Estrutura	Nome trivial	(continuação) Referência bibliográfica
10		Angelicina	STANKOV-JOVANOVIĆ et al., 2015.
11		Solanolactosídeo B	VIEIRA JÚNIOR et al., 2015.
12		Quinina	MAGINA, 2008.
13		Morfina	MAGINA, 2008.

Número	Estrutura	Nome trivial	(conclusão)
			Referência bibliográfica
14		Salicilina	MAGINA, 2008.
15		Ácido acetilsalicílico	MAGINA, 2008.

Fonte: Do autor.

Diversos pesquisadores têm concentrado sua atenção sobre os componentes bioativos de plantas e avaliado experimentalmente a sua ação benéfica no tratamento e prevenção de doenças humanas, com o objetivo de demonstrar cientificamente a sua eficácia real. Contudo, os estudos *in vivo* em animais devem ser preferidos aos *in vitro*, uma vez que o efeito de um determinado composto em células e tecidos humanos medidos *in vitro* pode não representar uma verdadeira avaliação do efeito *in vivo* (GIORDANI et al., 2011).

Os metabólitos secundários produzidos por plantas tiveram um papel fundamental no desenvolvimento de fármacos e da química sintética moderna. Eventos como o isolamento do princípio ativo anti-malárico, a quinina, das cascas do caule de espécies de cinchona (*Cinchona officinalis*), reportado em 1820 por farmacêuticos franceses, o isolamento da morfina do ópio produzido nas flores de papoula (*Papaver somniferum*) e da salicilina e ácido salicílico das cascas do salgueiro (*Salix alba*) (Quadro 1, n. 12-15) contribuíram para o desenvolvimento da fitoquímica, química medicinal e farmacologia. Assim, muitos destes compostos são de importância na área farmacêutica, pois representam uma fonte promissora para a descoberta de novas moléculas úteis ao homem (MAGINA, 2008; SIMÕES et al., 2010).

## 2.3 A FAMÍLIA MYRTACEAE E O GÊNERO *Eugenia* sp

A revisão literária a seguir denotou aspectos botânicos, fitoquímicos, biológicos e farmacológicos das espécies pertencentes à família Myrtaceae, com destaque para o gênero *Eugenia* sp e para a espécie *Eugenia florida* DC.

### 2.3.1 Aspectos botânicos

Dentre as plantas que apresentam propriedades biológicas relevantes, destacam-se as pertencentes à família Myrtaceae, especificamente aquelas que estão incluídas no gênero *Eugenia* sp (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006).

A família Myrtaceae encontra-se representada no Brasil por cerca de 23 gêneros e mil espécies, sendo que aproximadamente um terço pertence ao gênero *Eugenia* sp. De ampla distribuição, ocorre desde o México até a Argentina, com número ainda desconhecido de espécies que apresenta (NAKAMURA et al., 2010). É considerado de grande importância ecológica na Mata Atlântica, como na composição das restingas e do Cerrado brasileiro, além de ter inúmeras espécies com propriedades medicinais (LEITÃO et al., 2009).

A classificação das Myrtaceae, proposta por Wilson e colaboradores (2005) e atualizada por Bünger (2011), reconheceu duas sub famílias (Myrtoideae e Psiloxylodeae) e 17 tribos. Todas as espécies vegetais do continente americano estão incluídas na tribo Myrteae, caracterizada pela presença de frutos carnosos. A tribo Myrteae compreende três subtribos: Myrtinae, Myrciinae e Eugeniinae. Todos os representantes da subtribo Eugeniinae são constituídos por árvores ou arbustos com folhas simples, geralmente opostas, com margens inteiras, caracteristicamente providas de glândulas oleíferas.

Dentre os gêneros presentes na subtribo Eugeniinae, os mais comuns incluem *Eugenia*, *Myrcia*, *Psidium* e *Syzygium*. O gênero *Eugenia* encontra-se bem representado nas diversas formações vegetacionais do Brasil, não apenas quanto à riqueza específica, mas também quanto à abundância e frequência de suas espécies (APEL; SOBRAL; HENRIQUES, 2006 apud BELÉM LIMA, 2014).

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

- a) Reino: Plantae;

- b) Classe: Magnoliopsida;
- c) Subclasse: Rosidae;
- d) Ordem: Myrtales;
- e) Família: Myrtaceae;
- f) Subfamília: Myrtoideae;
- g) Tribo: Myrtae;
- h) Subtribo: Eugeniinae;
- i) Gênero: *Eugenia*.

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

A espécie *Eugenia florida* DC é uma pequena árvore, com aproximadamente 3,5 m de altura, que floresce em outubro e frutifica no final do mês de novembro até meados de dezembro (Figura 1). Popularmente, é conhecida como pitanga-do-Cerrado, pitanga-preta ou guamirim-cereja. Seus frutos apresentam odor característico, são comestíveis e muito saborosos (DONATO; MORRETES, 2009).

Figura 1 – Espécie *Eugenia florida* DC.



Fonte: Do autor.

Legenda: a: representante com frutos; b: fruto verde; c: fruto maduro; d: folhas.

Os dados morfológicos e anatômicos da folha de *E. florida* DC reúnem características comuns à família Myrtaceae, podendo-se destacar algumas de importância diagnóstica para a espécie, como a ocorrência de cavidades secretoras, a presença de floema interno ao xilema e alto teor de taninos. A presença de antocianinas é restrita às folhas jovens, as quais exibem coloração vinácea. Ocorre, ainda, a presença de uma nervura intramarginal contínua nas folhas dessa espécie (CRONQUIST, 1991).

Outras características anatômicas relevantes para a diagnose da espécie incluem a cutícula estriada, a ondulação das paredes anticlinais da epiderme, a ocorrência de numerosos cristais prismáticos encontrados no parênquima paliçádico e o pecíolo, cujo sistema vascular forma um arco com margens acentuadas (DONATO; MORRETES, 2009).

Uma das características marcantes do mesofilo de *E. florida* DC é a ocorrência de cavidades secretoras subepidérmicas, distribuídas pelas duas faces da lâmina foliar, com desenvolvimento incompleto e conteúdo essencialmente lipídico. Observa-se, nas áreas onde elas ocorrem, um grande espaço delimitado por células, porém sem as características de um epitélio secretor (CASTRO; MACHADO, 2003).

Demais espécies do gênero *Eugenia* sp também apresentam relevância e descrições bem detalhadas na literatura, sendo as mais comuns: pitanga vermelha (*Eugenia uniflora*), pedra-ume-caá (*Eugenia puniceifolia*), jabolão (*Eugenia jambolana*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*), jabuticaba (*Eugenia edulis*), uvaia (*Eugenia pyriformis*), cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata*), cambuí (*Eugenia moraviana*), cereja vermelha (*Eugenia calycina*), jamu (*Eugenia polyantha*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), jambo (*Eugenia malaccensis*), katukorandi (*Eugenia singampattiana*) e kanikar (*Eugenia floccosa*) (MAGINA, 2008).

### 2.3.2 Aspectos fitoquímicos

A seção literária a seguir denotará as características químicas dos principais compostos encontrados no gênero *Eugenia* sp, com destaque para a espécie *E. florida* DC.

### 2.3.2.1 Compostos fenólicos

Todas as substâncias fenólicas caracterizam-se por apresentar um anel aromático, com uma ou mais hidroxilas ligadas. Uma grande parte destes compostos não é encontrada sob a forma livre na natureza, mas na forma de glicosídeos ou heterosídeos (GARMUS et al., 2014).

Um aspecto bem característico desses compostos é a sua capacidade de complexação com metais, sendo que muitos desses quelatos metálicos são importantes em sistemas biológicos. Por serem compostos aromáticos, também apresentam intensa absorção na região do ultravioleta. Os compostos fenólicos são facilmente oxidáveis na presença de enzimas, luz, calor e/ou meio alcalino, levando ao escurecimento das soluções em que estão presentes (RATTMANN et al., 2012; SIMÕES et al., 2010).

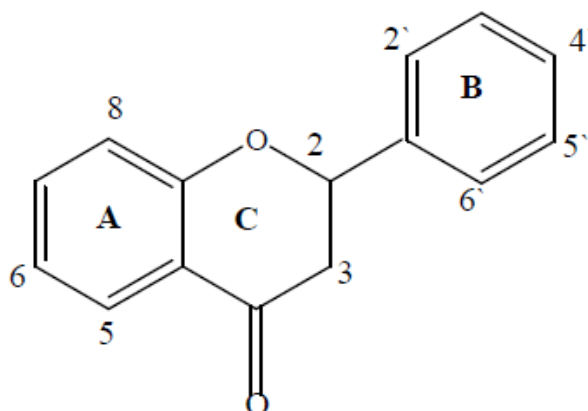
Dentre os compostos fenólicos mais comuns nas espécies do gênero *Eugenia* sp, podem destacar-se os flavonoides e os taninos.

#### 2.3.2.1.1 Flavonoides

Os flavonoides são uma ampla classe de substâncias de origem natural. São substâncias fenólicas aromáticas com 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, de estrutura elementar C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Apresentam-se com dois anéis aromáticos C<sub>6</sub> e um anel intermediário C<sub>3</sub>, que, geralmente, contém um átomo de oxigênio, conforme a Figura 2. (DORNAS et al., 2007; TRIPOLI et al., 2007).



Figura 2 – Estrutura básica dos flavonoides.



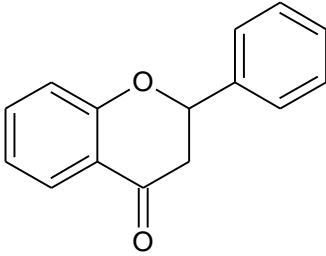
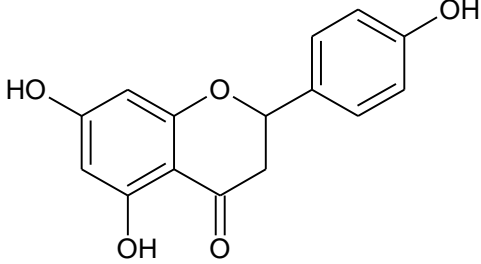
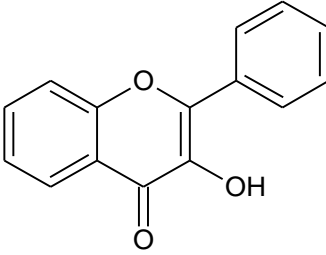
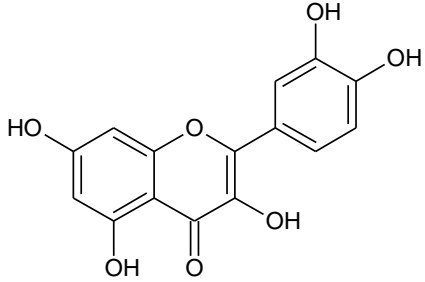
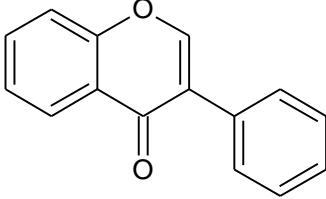
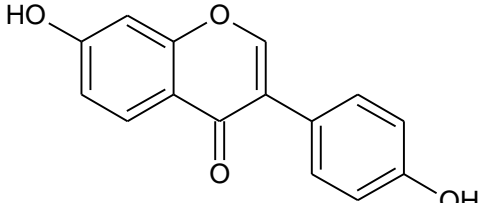
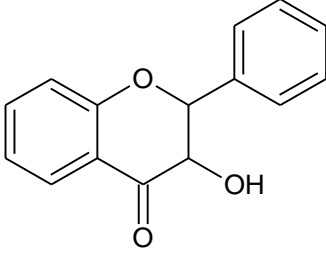
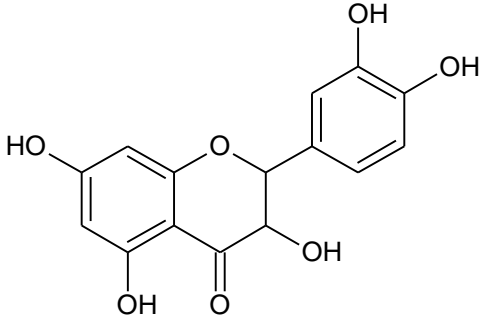
Fonte: Adaptado de DORNAS et al., 2007.

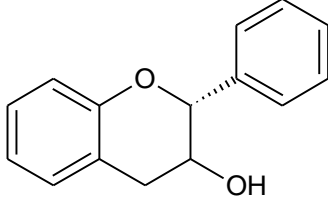
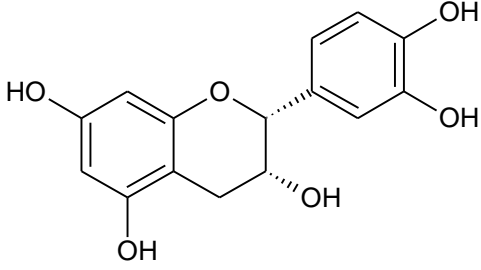
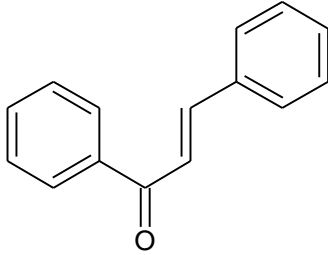
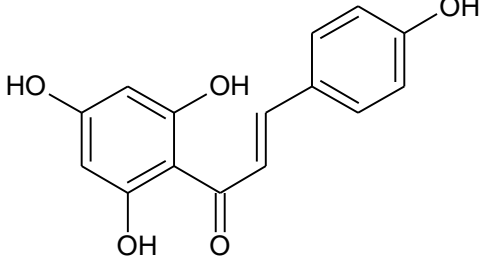
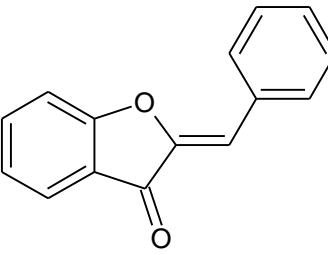
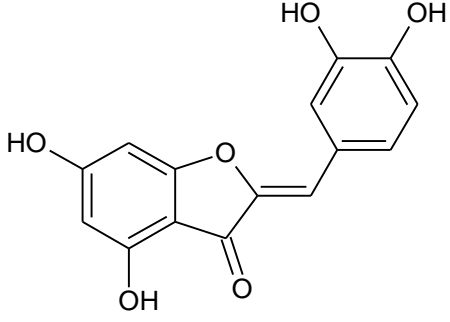
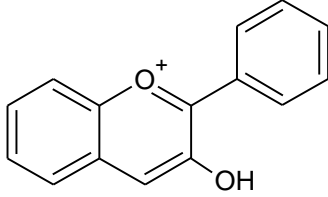
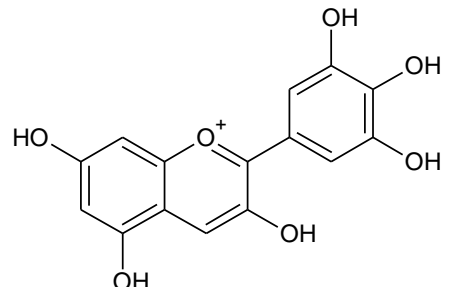
Eles podem ser divididos, de acordo com suas estruturas moleculares, em várias classes, sendo que as principais são: flavonas, flavanonas, flavonóis, isoflavonas, flavanonóis, flavan3-óis (ou catequinas), chalconas, auronas e antocianidinas. As estruturas químicas de tais classes estão representadas no Quadro 2. Todas elas podem se apresentar como agliconas ou ligadas a açúcares, na forma de *O*-heterosídeos ou *C*-heterosídeos (KUMAR; PANDEY, 2013).

Quadro 2 – Estruturas moleculares das principais subclasses dos flavonoides.

(continua)		
Subclasse	Estrutura geral	Exemplo
Flavonas		<p style="text-align: center;">Luteolina</p>

(continuação)

Subclasse	Estrutura geral	Exemplo
Flavanonas		 <p data-bbox="1150 611 1257 640">Naringina</p>
Flavonóis		 <p data-bbox="1145 981 1262 1010">Quercetina</p>
Isoflavonas		 <p data-bbox="1145 1305 1262 1335">Daidzeína</p>
Flavanonóis		 <p data-bbox="1145 1765 1262 1794">Taxifolina</p>

(conclusão)		
Subclasse	Estrutura geral	Exemplo
Flavan-3-óis (catequinas)		 Epicatequina
Chalconas		 Asebogenina
Auronas		 Aureusidina
Antocianidinas		 Delfinidina

### 2.3.2.1.2 *Taninos*

Os taninos, em sua maioria, são encontrados na natureza sob a forma de ésteres solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Por serem compostos fenólicos, os taninos são muito reativos quimicamente e formam pontes de hidrogênio intra e intermoleculares. São facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, que ocasiona o escurecimento de suas soluções (MONTEIRO et al., 2005 apud AZEVEDO et al., 201).

Segundo a estrutura química, os taninos são classificados em três grupos: hidrolisáveis, condensados e oligômeros.

Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente  $\beta$ -*D*-glicose, cujas hidroxilas estão esterificadas com o ácido gálico. Os taninos hidrolisáveis podem ser divididos em galotaninos e elagitaninos.

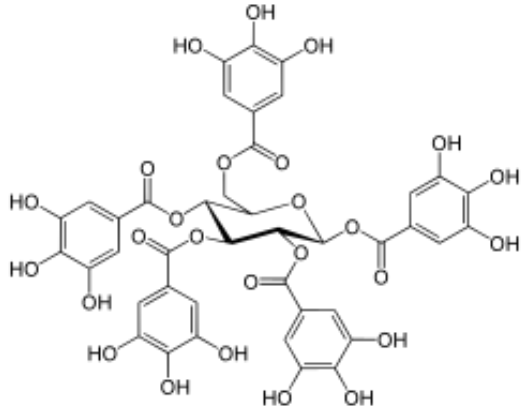
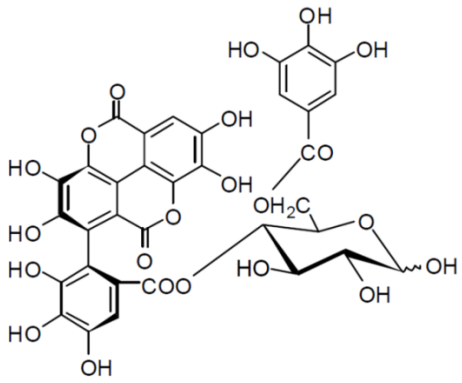
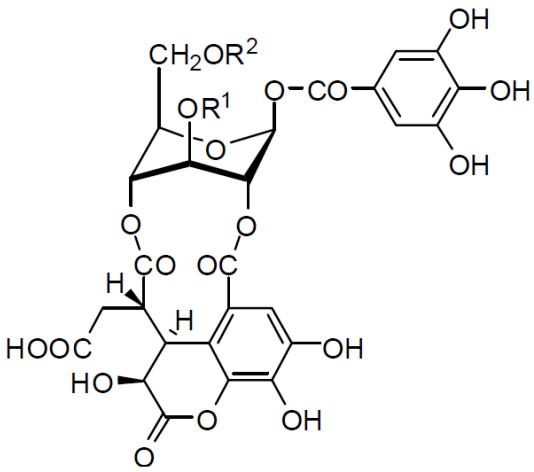
Os galotaninos resultam da união entre unidades de ácido gálico por ligações denominadas de meta-depsídicas (Quadro 3, número 1). Os elagitaninos possuem um ou dois resíduos de hexa-hidroxi-difenoil-*D*-glicose (HHDP), de configuração (*R*) ou (*S*), os quais são obtidos através do acoplamento oxidativo C-C entre dois resíduos de ácido gálico espacialmente adjacentes (SALES, 2013).

Os elagitaninos podem ser classificados em monômeros, dímeros, trímeros ou tetrâmeros. Os monômeros são classificados em quatro grupos, sendo eles: grupo I (glicose em conformação cadeira com substituintes na posição equatorial), grupo II (substituintes na posição axial), grupo III ou elagitaninos C-glicosídicos (glicose na forma de cadeia aberta) e grupo IV ou taninos complexos (elagitanino do grupo III ligado a um tanino condensado). As estruturas de cada um desses representantes estão indicadas no Quadro 3, n. 2-8 (SIMÕES et al., 2010).

Os taninos condensados ou proantocianidinas são formados pela poli-condensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol, biossintetizados a partir do aminoácido fenilalanina. Estes últimos apresentam uma rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades de monômeros e da estereoquímica (MA et al., 2014). A estrutura de uma proantocianidina está indicada no Quadro 3, n. 9.

Os oligômeros são estruturas macrocíclicas compostas por ligações entre unidades de elagitaninos (Quadro 3, n. 10) e são encontrados em espécies vegetais bem restritas, como *Oenothera* sp (YOSHIDA; AMAKURA; YOSHIMURA, 2010).

Quadro 3 – Estruturas básicas de galotaninos, elagitaninos, proantocianidinas e oligômeros.

(continua)			
Número	Estrutura	Classificação	Nome trivial
1		Galotanino	$\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloil- <i>D</i> -glicose
2		Elagitanino monomérico grupo I	Terflavina
3	 <p style="text-align: center;"><math>R^1 = R^2 = \text{ácido gálico}</math></p>	Elagitanino monomérico grupo II	Ácido quebulníco

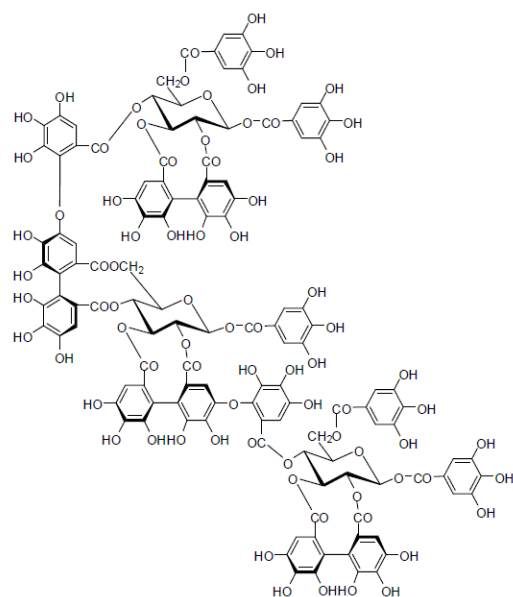
(continuação)

Número	Estrutura	Classificação	Nome trivial
4		Elagitanino monomérico grupo III	Punicacortéina C
5		Elagitanino monomérico grupo IV	Acutissimina A
6		Elagitanino dimérico	Nobotanino B

(continuação)

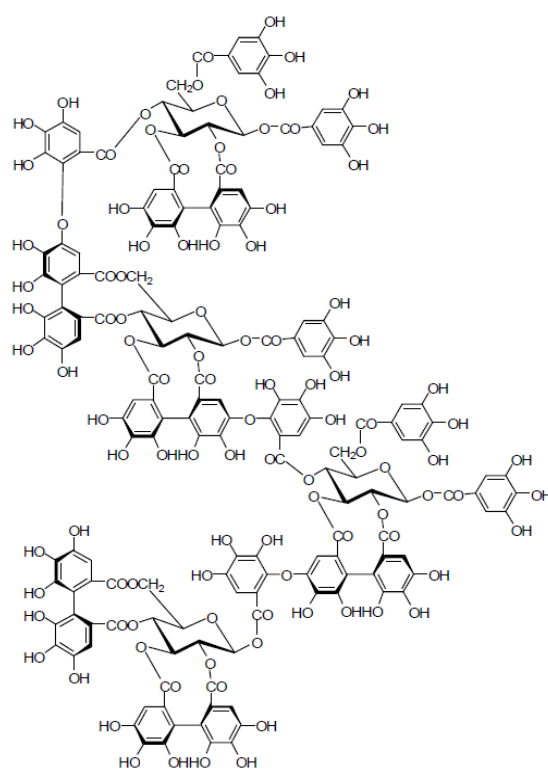
Número	Estrutura	Classificação	Nome trivial
--------	-----------	---------------	--------------

7

Elagitanino  
trimérico

Nobotanino E

8

Elagitanino  
tetramérico

Nobotanino K

(conclusão)			
Número	Estrutura	Classificação	Nome trivial
9		Proantocianidina	Cinamitanino A <sub>2</sub>
10		Oligômero	Eugeniflorina D <sub>2</sub>

Fonte: Do autor.



### 2.3.2.2 Compostos bioativos isolados em *Eugenia* sp

Gu e colaboradores (2001) isolaram três saponinas das frações em clorofórmio e em acetato de etila do extrato metanólico das partes aéreas de *Eugenia sandwicensis* (Quadro 4, números 1-3). Os pesquisadores verificaram que os compostos apresentaram uma alta atividade na inibição de lesões mamárias pré-neoplásicas em culturas de células mamárias de ratos, sendo promissores como agentes quimiopreventivos do câncer.

Bokesch e colaboradores (2008) identificaram quatro compostos fenólicos, nas frações em acetato de etila, do extrato em diclorometano-metanol (1:1) das raízes do guamirim-de-folha-miúda (*Eugenia hyemalis*). Os compostos fenólicos foram denominados de hiemalosídeos 1, 2, 3 e 4 (Quadro 4, n. 4-7). Todos esses compostos apresentaram uma excelente atividade biológica na inibição da enzima ribonuclease H do vírus HIV-1, essencial para a replicação viral.

Omar e colaboradores (2012) isolaram nove compostos fenólicos do extrato metanólico das sementes do jambolão (*Eugenia jambolana*), através das frações em acetato de etila e n-butanol, com conseqüente separação por cromatografia líquida de alta eficiência. Dentre esses compostos, os que apresentaram maior relevância foram dois elagitaninos (oenoteína C e cornussina B) e um flavonoide glicosilado (swertisina) (Quadro 4, n. 8-10). Todas estas substâncias apresentaram uma alta atividade na inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, com destaque para a swertisina, cujo valor de IC<sub>50</sub> se mostrou bastante próximo ao apresentado pela droga de referência acarbose. Segundo Brunton, Chabner e Knollmann (2012), a  $\alpha$ -glicosidase é uma enzima que está envolvida na degradação dos açúcares no intestino e sua inibição retarda a digestão dessas substâncias. Com isso, a glicose liberada pode ser absorvida na corrente sanguínea mais lentamente, reduzindo a elevação pós-prandial, evitando as oscilações glicêmicas e diminuindo os seus valores médios no sangue. Portanto, os compostos isolados podem ser úteis como tratamento alternativo no diabetes.

Kato e colaboradores (2013) isolaram e identificaram três compostos fenólicos da fração em acetato de etila, obtidas do extrato bruto em metanol:água (0,5:1) de *Eugenia polyantha*, com destaque para o hidroxicavicol (Quadro 4, n. 11). Todos os compostos apresentaram uma atividade biológica considerável na inibição *in vitro* da lipase pancreática, podendo ser utilizados como adjuvantes no tratamento e prevenção da obesidade.

Quadro 4 – Compostos bioativos isolados de plantas do gênero *Eugenia* sp.

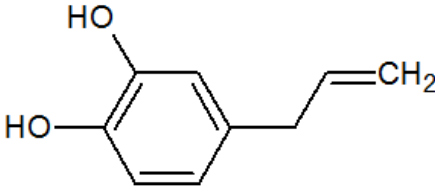
(continua)			
Número	Estrutura	Nome trivial	Referência
1		Ácido 3- <i>cis</i> - <i>p</i> -cumaroloxioleanóico	GU et al., 2001.
2		Ácido 3- <i>trans</i> - <i>p</i> -cumaroloxioleanóico	GU et al., 2001.
3		Ácido 23- <i>trans</i> - <i>p</i> -cumaroloxioleanóico	GU et al., 2001.

(continuação)

Número	Estrutura	Nome trivial	Referência
4		Hiemalosídeo 1	BOKESCH et al., 2008.
5		Hiemalosídeo 2	BOKESCH et al., 2008.
6		Hiemalosídeo 3	BOKESCH et al., 2008.

(continuação)

Número	Estrutura	Nome trivial	Referência
7		Hiemalosídeo 4	BOKESCH et al., 2008.
8		Oenoteína C	OMAR et al., 2012
9		Cornussina B	OMAR et al., 2012
10		Swertisina	OMAR et al., 2012

Número	Estrutura	Nome trivial	(conclusão) Referência
11		Hidroxicavicol	KATO et al., 2013

Fonte: Do autor.

Além dos compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides e taninos) isolados nos extratos e frações oriundos das espécies do gênero *Eugenia* sp, podem se destacar outras classes de compostos que também foram isolados, como: **saponinas**, incluindo o ácido betulínico nas folhas de *E. florida* (FRIGHETTO et al., 2005); e **terpenos**, incluindo  $\beta$ -pineno, *p*-cimeno e linalol nas folhas de *E. uniflora* (OLIVEIRA et al., 2006). Até o momento, poucos artigos da literatura relataram a presença de **alcaloides** nos extratos das espécies do gênero *Eugenia* sp, como nos trabalhos de Tresina, Kala e Mohan (2012) e Tresina e Mohan (2014) que apenas realizaram triagens fitoquímicas com os extratos das folhas da espécie *E. singampattiana*, sem a identificação química das estruturas dos compostos.

### 2.3.3 Aspectos farmacológicos e biológicos

A seção literária a seguir denotou alguns aspectos farmacológicos e biológicos relevantes do presente estudo.

#### 2.3.3.1 Infecções microbianas

As infecções microbianas são causadas pela invasão de agentes patogênicos (vírus, bactérias, fungos, etc.) ao organismo humano, que alteram o equilíbrio e geram consequências

prejudiciais, em muitos casos, potencialmente letais. Interações do microrganismo com o hospedeiro dependem de variáveis simples e complexas, como a saúde do hospedeiro, a virulência e a carga microbiana (DASGUPTA et al., 2015).

O conhecimento fisiopatogênico da infecção é indispensável à escolha da terapia anti-infecciosa apropriada, minimizando valores estatísticos e meta-análises de morbidade e mortalidade em todo o mundo, bem como a ocorrência de outras doenças (DUNBAR, 2003; SILVA et al., 2010).

Os agentes antimicrobianos têm sido utilizados desde o século XVII no tratamento de doenças infecciosas. Um agente antimicrobiano ideal deve exibir toxicidade seletiva, ou seja, a substância deve ser eficiente contra o microrganismo alvo, porém deverá ter segurança toxicológica para o paciente. Tais compostos agem sobre microrganismos susceptíveis, afetando crescimento e reprodução (ação bacteriostática) ou induzindo a sua morte (ação bactericida) (SOFIATI, 2009; ARAÚJO, 2011).

Existem diversas classes de antimicrobianos disponíveis no mercado, que têm eficácia comprovada para diversos tipos de bactérias e/ou fungos. Os mecanismos de ação dos antimicrobianos ainda não estão totalmente esclarecidos, mas podem ser divididos em quatro categorias, incluindo inibição da síntese da parede celular, da função da membrana celular, da síntese proteica e da síntese de ácidos nucléicos (MADIGAN et al., 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2011; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Os microrganismos podem desenvolver resistência aos antimicrobianos, cujo processo está intimamente relacionado à existência de genes que codificam diferentes mecanismos e evitam a ação das drogas. Ela pode ter origem em mutações que ocorrem durante o processo reprodutivo ou através da transferência do material genético por conjugação, transdução ou transformação (UETANABARO; GÓES-NETO, 2006).

A resistência também pode ser desenvolvida por alguns mecanismos já bem descritos na literatura, como modificação química do antibiótico por enzimas específicas, alteração do sítio de ligação do antibiótico, substituição do sítio de ligação da droga, diminuição da permeabilidade, aumento da síntese de substratos que competem com o sítio no qual a droga se liga e síntese de proteínas protetoras dos ribossomos (MIN et al., 2014). Alguns estudos mostram que os microrganismos estão se tornando cada vez mais resistentes aos antimicrobianos convencionais, como os descritos a seguir.

Sanglard (2002) e estudos posteriores feitos por Yoo e colaboradores (2010) relataram que os principais mecanismos de resistência das espécies de fungos do gênero *Candida* sp aos fármacos comerciais (azóis) se deve à expressão dos genes CDR1, CDR2 e MDR1, que

promovem, a partir da célula do patógeno, o efluxo da droga por transporte ativo e a consequente não inibição do crescimento, reprodução e/ou morte do fungo.

Para caracterizar a evolução da resistência aos medicamentos à bactéria *Escherichia coli*, Tadesse e colaboradores (2012) avaliaram a susceptibilidade deste microrganismo, isolado de amostras humanas e animais, a um grupo de 15 agentes antimicrobianos diferentes. Tal estudo demonstrou que a bactéria demonstrou maior resistência ao grupo dos antibióticos mais convencionais, com destaque para as sulfonamidas. Os autores informaram, segundo dados descritos por Bean, Livermore & Hall (2009), que a resistência observada estava comumente associada com elementos genéticos móveis da bactéria, que desempenharam um papel importante na disseminação dos genes de resistência às sulfonamidas.

Fernández-Natal e colaboradores (2015) realizaram um estudo genômico, com enfoque nas sequências do DNA da bactéria *Corynebacterium kroppenstedtii*, para verificar quais os aspectos genéticos responsáveis pela grande ocorrência de resistência desse microrganismo aos antibióticos convencionais no tratamento da mastite granulomatosa. Por meio de análises do genoma de bactérias presentes nos nódulos de pacientes infectados, os pesquisadores verificaram uma acentuada expressão dos genes *tetW*, *CMX*, *strA* e *strB* nos microrganismos isolados. Segundo Tauch e colaboradores (2008), estes genes estão diretamente envolvidos na atividade das enzimas condensase e micolato redutase, responsáveis pela produção de ácidos micólicos. Estes promovem uma maior lipofilicidade da membrana plasmática e dificultam a penetração da droga nos sítios ativos da célula bacteriana, como receptores de membrana, ribossomos e/ou DNA.

O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta. Portanto, devem ser tomadas atitudes que possam reduzir este problema como, por exemplo, controlar o uso de antibióticos, desenvolver pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e continuar o estudo de desenvolvimento de novas drogas (ARAÚJO, 2011).

A necessidade de encontrar novas alternativas no combate às infecções microbianas representa um desafio no tratamento das mesmas. Nesse sentido, as plantas medicinais constituem importantes fontes de substâncias biologicamente ativas, servindo para o desenvolvimento de um grande número de fármacos (SASIDHARAN; DARAH; JAIN, 2011).

As propriedades antimicrobianas de plantas estão sendo amplamente pesquisadas, porém ainda há pouca informação disponível sobre os mecanismos de ação dos compostos naturais frente a bactérias e fungos (SÁNCHEZ; GARCÍA; HEREDIA, 2010). Porém, há

diversos trabalhos na literatura que enfatizam os efeitos benéficos de diferentes extratos de plantas no combate a microrganismos, como os relatados a seguir.

Os estudos realizados por Silva e colaboradores (2012) tiveram o objetivo de verificar as concentrações inibitórias de 50% do crescimento ( $MIC_{50}$ ) dos extratos hidroetanólicos 70% (v/v) das folhas, caules, cascas do caule e raízes de *Mimosa caesalpiniiifolia* (Mimosaceae) sobre leveduras do gênero *Candida* sp (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*), bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*). O método usado foi o da microdiluição em caldo. Fluconazol e cloranfenicol foram usadas como drogas de referência para os fungos e para as bactérias, respectivamente. Todos os extratos exibiram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados, em concentrações que variaram entre 5-1000  $\mu\text{g/mL}$ . Porém, o extrato das folhas foi o que se mostrou mais efetivo, em comparação aos demais, pois apresentou valores de  $MIC_{50}$  bem menores para os microrganismos avaliados. A atividade sobre os fungos foi bem mais expressiva do que para as bactérias. Além disso, todos os extratos analisados mostraram-se bem mais efetivos para *C. glabrata* e *C. krusei* do que o fluconazol, que, neste ensaio, não demonstrou atividade sobre estas espécies de leveduras.

Rubio-Moraga e colaboradores (2013) realizaram um estudo de atividade antimicrobiana com extratos em metanol 80% (v/v) das folhas de onze espécies de *Helianthemum* sp (Cistaceae), no intuito de verificar quais as concentrações de cada extrato ( $MIC_{50}$ ) para as bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Neste sentido, prepararam-se várias diluições dos extratos em água e procedeu-se ao teste de microdiluição em caldo, usando estreptomicina como droga de referência. Apenas quatro dos onze extratos testados apresentaram uma excelente atividade contra as bactérias testadas ( $MIC_{50}$  menor que 1,0  $\text{mg/mL}$ ). Os autores correlacionaram esses resultados com os valores obtidos para a dosagem de fenóis totais, que estavam em maior concentração nesses quatro extratos. Segundo Quideau e colaboradores (2011), os fenóis estão intimamente relacionados com a atividade antimicrobiana.

Mafioleti e colaboradores (2013) avaliaram o potencial antimicrobiano do extrato hidroetanólico 70% (v/v) obtido das folhas de *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae) sob bactérias Gram positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus pyogenes*), bactérias Gram negativas (*Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*



e *Shigella flexneri*) e leveduras do gênero *Candida* sp (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). O método usado foi o da microdiluição em caldo e as concentrações dos extratos variaram entre 800-3,125 µg/mL. Claritromicina e cloranfenicol foram utilizados como drogas de referência para bactérias e anfotericina para os fungos. O extrato mostrou-se efetivo apenas para as bactérias *H. pylori* e *E. faecalis*, com MIC<sub>50</sub> de 12,5 e 100 µg/mL, respectivamente.

Assim, nos últimos anos, diversos pesquisadores têm estudado o potencial de diversas plantas no combate a microrganismos patogênicos ao ser humano, incluindo bactérias, fungos e vírus. A família Myrtaceae apresenta uma grande quantidade de espécies que, popularmente, tem seu uso como anti-infecciosas, devido aos constituintes químicos que apresentam (SOUZA, 2013).

Dentre as plantas desta família que apresentam propriedades antimicrobianas, destacam-se àquelas pertencentes ao gênero *Eugenia* sp, como pode-se verificar nos trabalhos realizados por Machado e colaboradores (2009), Coutinho e colaboradores (2010), Jasmine e colaboradores (2010), Sood e colaboradores (2012) e Bag e colaboradores (2012). Porém, dentre as espécies pertencentes a este gênero, a planta *Eugenia florida* DC ainda é pouco conhecida cientificamente com relação a seus efeitos antimicrobianos e, por isso, foi o alvo de estudo do presente trabalho.

### 2.3.3.2 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* sp. A transmissão da doença ocorre a partir da picada de insetos flebotômíneos fêmeas dos gêneros *Lutzomyia* sp ou *Phlebotomus* sp. Em minutos, os parasitos localizados na glândula salivar do inseto (promastigotas flagelados) são fagocitados por macrófagos, onde são convertidos na forma intracelular (amastigota). Estas formas celulares do parasito são altamente especializadas e adaptadas a sobreviver no fagolisossoma celular (VENDRAMETTO et al., 2010).

As formas amastigotas, em seguida, multiplicam-se dentro dos fagócitos do hospedeiro e, após a sua libertação, elas podem infectar outras células. Depois de algumas semanas, ocorre o acúmulo de células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos granulócitos, células dendríticas e células T), levando à formação do granuloma característico. O ciclo de

vida do patógeno é concluído quando o inseto pica novamente um indivíduo infectado e as amastigotas se transformam novamente em promastigotas no intestino do inseto (STEBUT, 2015).

Em geral, a leishmaniose ocorre nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que 90% dos casos, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorrem em países do Velho Mundo (Afeganistão, Argélia, Arábia Saudita, Irã) e em dois países do Novo Mundo (Brasil e Peru). O número de casos ultrapassa o valor de 300 mil, com cerca de 20 mil mortes por ano. No mundo todo, cerca de 310 milhões de pessoas são permanentemente expostas ao risco de ser infectadas com o parasita. Todos esses fatores fazem da leishmaniose um dos maiores problemas de saúde pública dos países em desenvolvimento (MISHRA; KUMAR; KHARE, 2009; MANSUETO et al., 2014).

As manifestações clínicas da doença dependem das subespécies de *Leishmania* que invadem o organismo, bem como da imunidade do hospedeiro afetado. Em pacientes imunodeprimidos, em geral, bem como nas crianças e indivíduos idosos, as manifestações são mais graves e, conseqüentemente, são os pacientes mais severamente afetados pela doença (STEBUT, 2015).

As formas clínicas de leishmaniose são a cutânea ou tegumentar, a mucocutânea e a visceral. A forma tegumentar é caracterizada por úlceras na pele, lesões satélites ou linfangite nodular, a mucocutânea apresenta-se com o envolvimento das mucosas e a visceral atinge órgãos internos, tais como o fígado, baço e medula óssea, sendo letal se não for tratada adequadamente (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

O tratamento convencional da leishmaniose, através da quimioterapia, é baseado na utilização de medicamentos que possuem metais pesados tóxicos em suas composições, como os antimoniatos. Dentre eles, os mais utilizados são o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio. Outros medicamentos, como pentamidina e anfotericina B, também são utilizados no tratamento da doença, porém apresentam efeitos colaterais bastante severos, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hiperbilirrubinemia, hiperfosfatemia, vasculite acentuada e hipertensão (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009; LIMA, 2014).

Devido aos problemas com relação à efetividade, toxicidade, resistência do parasito e sensibilidade das diferentes cepas de *Leishmania* aos fármacos convencionais, as pesquisas com produtos naturais têm sido desenvolvidas, no intuito da procura de novas alternativas no tratamento da leishmaniose. Nos locais endêmicos da doença, devido às dificuldades de

acesso aos medicamentos, vários pacientes fazem uso de plantas para aliviar os sintomas da leishmaniose (LIMA, 2014).

Neste contexto, os extratos das plantas, bem como seus respectivos metabólitos secundários presentes, podem prover uma imensa fonte de agentes medicinais leishmanicidas (TEMPONE et al., 2005). Alguns trabalhos da literatura têm estudado o uso de extratos de plantas no tratamento das leishmanioses, como os descritos a seguir.

Feily e colaboradores (2012) realizaram um estudo para verificar a atividade *in vitro* do extrato hidroetanólico 70% (v/v) das folhas do chá verde, *Cammelia sinensis* (Theaceae), contra formas promastigotas da espécie *Leishmania major*. O extrato foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) em seis concentrações diferentes, variando de 3,0 a 96 µg/mL. A droga estibogluconato de sódio a 85 µg/mL foi usada como controle positivo e um grupo contendo apenas as formas promastigotas foi usado como controle negativo. Procedeu-se ao teste em microplaca e as formas móveis, após o tempo de incubação, foram contadas. O extrato, nas diferentes concentrações testadas, apresentou atividade significativa, porém o efeito não se mostrou crescente com o aumento da concentração. Os resultados obtidos com a concentração de 12 µg/mL se mostraram semelhantes àqueles observados com o controle positivo.

Ezatzpour e colaboradores (2015) avaliaram os efeitos *in vitro* do extrato hidroetanólico 70% (v/v) das partes aéreas de *Pistacia khinjuk* (Anacardiaceae) contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania tropica* e *Leishmania major*, em diferentes concentrações testadas (0,5-100 µg/mL). Procedeu-se os testes em microplaca, usando a metodologia da viabilidade celular com azul de nitroterazólio (MTT). O extrato inibiu significativamente os crescimentos tanto da forma promastigota (MIC<sub>50</sub> = 58,6 mg/mL) quanto da forma amastigota (MIC<sub>50</sub> = 37,3 µg/mL), numa resposta do tipo dose-dependente.

Dessa forma, diversas outras plantas também têm sido estudadas para verificar as suas atividades contra as formas evolutivas do protozoário *Leishmania* sp. Dentre as espécies-alvo, as plantas do gênero *Eugenia* sp têm mostrado eficácia no combate a estes protozoários, conforme relatado por Santos e colaboradores, (2013), e Rodrigues e colaboradores, (2013). A espécie *Eugenia florida* DC apresenta poucos estudos na literatura, com relação ao seu uso no tratamento da leishmaniose, e, por este motivo, foi escolhida para ser avaliada no presente trabalho.

### 2.3.3.3 Diabetes e suas relações com estresse oxidativo e peroxidação lipídica

O diabetes *mellitus* é uma doença metabólica multifatorial, caracterizada principalmente pela hiperglicemia, resultante de deficiências na secreção e/ou na ação do hormônio insulina, produzido pelo pâncreas. Dessa forma, essa doença pode ser classificada em diversos tipos, sendo os mais comuns o tipo 1, o tipo 2 e o gestacional (PAN et al., 2010).

No tipo 1, ocorre destruição das células beta do pâncreas, usualmente por processo autoimune. A consequência da perda das células beta é a deficiência absoluta da secreção de insulina, o que, por sua vez, permite com que os pacientes fiquem suscetíveis à ocorrência de acidose metabólica. O pico de incidência do diabetes *mellitus* tipo 1 ocorre dos 10 aos 14 anos de idade, havendo, a seguir, uma diminuição progressiva da incidência até os 35 anos. (GINGRAS et al., 2015).

O tipo 2 é mais comum do que o tipo 1, perfazendo cerca de 90% dos casos da doença. É um distúrbio heterogêneo, caracterizado por deficiências na ação e na secreção da insulina. A etiologia específica deste tipo de diabetes ainda não está claramente estabelecida, diferentemente do tipo 1. A idade de início do diabetes tipo 2 é variável, embora seja mais frequente após os 40 anos de idade, com pico de incidência ao redor dos 60 anos (JUNG et al., 2015).

O diabetes gestacional é definido como a tolerância diminuída aos carboidratos, de graus variados de intensidade, diagnosticado pela primeira vez durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto. O rastreamento do diabetes gestacional é realizado a partir da primeira consulta pré-natal, utilizando-se a determinação da glicose em jejum e com o objetivo de detectar a presença de diabetes pré-existente (KC; SHAKYA; ZHANG, 2015).

O diabetes *mellitus* afeta, aproximadamente, 10% de toda a população mundial. No presente, há um número estimado de 246 milhões de pessoas no mundo com diabetes, dos quais 80% dos indivíduos acometidos estão presentes nos países em desenvolvimento. Em 2010, a OMS relatou que cerca de 1,1 milhões de pessoas foram a óbito por conta das complicações da doença (ALI et al., 2015).

Trata-se de um grande problema de saúde pública, pois a incidência e a prevalência do diabetes têm alcançado, ao longo dos anos, proporções epidêmicas. Este aumento é devido, principalmente, ao crescimento e envelhecimento populacional, à obesidade e ao sedentarismo (NASCIMENTO, 2013).

O diabetes apresenta um impacto bastante negativo na saúde dos pacientes, decorrente principalmente de distúrbios no metabolismo de lipídios, que contribuem significativamente para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares e cerebrais. Para evitar o risco de complicações graves, deve-se controlar não apenas os níveis de glicose no sangue, mas também os níveis de lipídios (MARKUSZEWSKI et al., 2006).

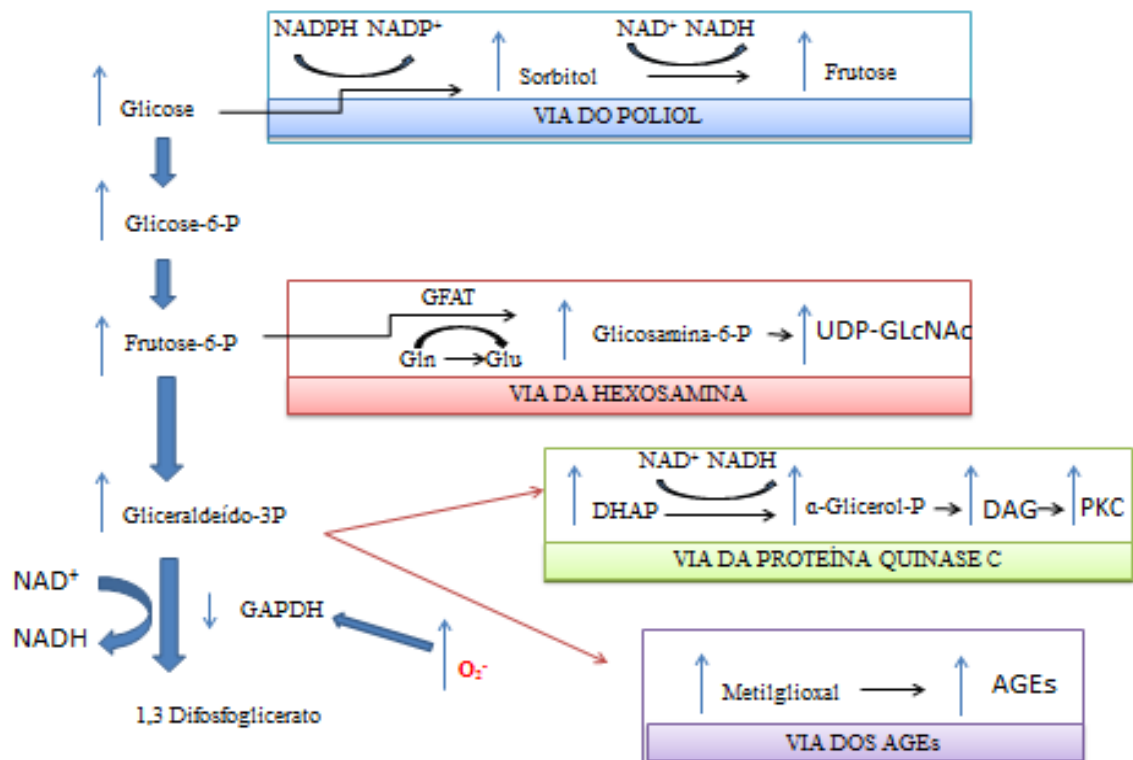
Sabe-se que o diabetes está intimamente ligado à produção excessiva de radicais livres no organismo. Denomina-se radical livre (RL) qualquer espécie química que contenha um ou mais elétrons desamparelhados em sua estrutura. A presença desses elétrons faz com que essas espécies sejam muito instáveis quimicamente e, com isso, elas se tornam altamente reativas. A alta capacidade de reação destas espécies pode levar a danos celulares, pois elas reagem facilmente com proteínas, fosfolipídios de membrana e ácidos nucleicos (PALIYATH; BAKOVIC; SHETTY, 2011).

Existem diversas classes de RL no organismo, sendo que as espécies que contêm oxigênio e nitrogênio são as mais comuns. Sendo assim, nos últimos anos, o termo “radical livre” tem sido substituído pela denominação “espécies reativas de oxigênio e nitrogênio” (EROs e ERNs, respectivamente), pois, além de incluir radicais de oxigênio, inclui também algumas espécies não-radicalares, como peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e ozônio. (RAINS; JAIN, 2011).

A relação entre o diabetes *mellitus* e o estresse oxidativo tem sido amplamente investigada. O termo estresse oxidativo é utilizado em situações em que as EROs causam dano tecidual, degeneração de tecidos, envelhecimento prematuro e morte celular por apoptose. Pode-se dizer que, nesta situação, ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes, geradores das espécies reativas, e antioxidantes, de modo que as defesas antioxidantes são insuficientes para neutralizar os níveis aumentados de EROs (KRYSTON et al., 2011).

Neste sentido, várias pesquisas têm demonstrado a contribuição do estado hiperglicêmico crônico, para a manifestação do estresse oxidativo, sendo este dependente do controle glicêmico e da duração do diabetes. Os principais mecanismos bioquímicos propostos para explicar a relação entre a hiperglicemia crônica e a produção acentuada de espécies reativas de oxigênio (EROs) no interior das células estão associados ao aumento do fluxo na via dos polióis, à ativação da proteína quinase C (PKC) e de produtos de glicação avançada (AGEs), a partir da auto-oxidação da glicose, conforme esquematizado na Figura 3 (BROWNLEE, 2001; GIACCO; BROWNLEE, 2010).

Figura 3 – Vias de danos gerados pela hiperglicemia.



Fonte: Adaptado de BROWNLEE, 2001.

Legenda: AGEs = produtos de glicação avançada; DAG = diacilglicerol; DHAP = fosfato de diidroxiacetona; GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; GFAT = glutamina frutose-6-fosfato amidotransferase; Gln = glicina; Glu = ácido glutâmico; O<sub>2</sub><sup>-</sup> = radical superóxido; P = fosfato; PKC = proteína quinase C; UDP-GLcNAc = UDP-N-acetilglicosamina.

A elevada concentração de glicose favorece o aumento do fluxo da via dos polióis, o que contribui para a redução da concentração intracelular do NADPH com concomitante elevação do NADH. O NADPH é cofator da enzima glutatona redutase e, dessa forma, favorece a elevação dos níveis de EROs por reduzir a atividade desta enzima. Por outro lado, o aumento dos níveis de NADH eleva a síntese de diacilglicerol, principal ativador da proteína quinase C, que tem capacidade de elevar a atividade da enzima NADPH-oxidase, catalisando a formação do radical superóxido (EL-BENNA et al., 2005).

Outro mecanismo indutor da produção de EROs no diabetes diz respeito à elevada formação de produtos de glicação não-enzimática e de seus receptores. A hiperglicemia crônica favorece a auto-oxidação da glicose, sendo que os açúcares oxidados reagem com componentes lipoprotéicos e receptores da membrana, estimulando a formação de ânions superóxido e peróxidos de hidrogênio. Além disso, o excesso de glicose circulante aumenta a

taxa de respiração celular com concomitante aumento da produção do ânion superóxido (GIACCO & BROWNLEE, 2010).

A glicose intracelular, em excesso, também pode ser desviada para a via da hexosamina, onde é convertida em frutose-6-fosfato, que, por sua vez, é transformada em glicosamina 6-fosfato. A glicosamina 6-fosfato é, posteriormente, convertida em UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc), que modula a expressão de proteínas, as quais funcionam como fatores de transcrição que estimulam a via da aldose redutase, potencializando o consumo de NADPH e diminuindo a regeneração da glutatona redutase (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009).

Associado aos mecanismos já mencionados, a relação entre hiperglicemia crônica, acidose metabólica e estresse oxidativo no diabetes *mellitus* também tem sido amplamente estudada. Alguns estudos demonstram a participação da glicose elevada na ativação da glicogenólise, lipólise e cetogênese, promovendo a manifestação da acidose metabólica (BARONE et al., 2007).

Estudos têm evidenciado que o diabetes *mellitus* está associado a danos oxidativos aos lipídios, às proteínas e ao DNA celular (LIMA, 2011).

Efeitos tóxicos do oxigênio sobre estruturas biológicas são resultantes da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), gerando espécies oxidantes, entre as quais se destacam as EROs. A reação entre estas espécies e AGPI, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, promove o início de um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica, que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular. (ANTUNES et al., 2008).

A peroxidação lipídica, desta maneira, pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação de espécies oxidantes sobre os lípidios insaturados de membrana, que alteram a estrutura das membranas celulares e das lipoproteínas que estão presentes em suas composições. Esta perturbação da integridade da membrana celular e das lipoproteínas pode gerar apoptose e comprometimento das funções orgânicas celulares (URSO; CLARKSON, 2003; MOSAVAT; OOI; MOHAMED, 2014).

Um dos produtos gerados durante as reações bioquímicas da peroxidação lipídica é o malonaldeído (MDA), um dialdeído reativo, capaz de reagir com proteínas, fosfolipídios ou ácidos nucleicos, induzindo modificações estruturais das biomoléculas e danificando a integridade celular (LEORNARDUZZI; SOTTERO; POLI, 2010).

Intervenções medicamentosas mostram efeitos positivos no controle do diabetes e no estresse oxidativo. Além da administração convencional da insulina a pacientes diabéticos, diversos fármacos disponíveis no mercado também têm sido usados no controle dessas doenças (RANG et al., 2012).

Devido ao custo elevado das drogas comerciais, além da observação de uma grande quantidade de interações medicamentosas e efeitos adversos que proporcionam, como, por exemplo, hipoglicemia, retenção hídrica, ganho de peso e hepatotoxicidade a longo prazo, os pesquisadores têm despertado o interesse em conhecer os efeitos de substâncias naturais e plantas medicinais no tratamento do diabetes (STANKOV; BENC; DRASKOVIC, 2013). Diversos estudos da literatura demonstram os efeitos antidiabéticos de extratos de plantas, como os descritos a seguir.

Cunha e colaboradores (2010) investigaram a atividade antidiabética *in vivo* dos extratos secos hidroetanólicos (1:2) das folhas de pata-de-vaca, *Bauhinia fortificata* (Fabaceae), obtidos por três métodos diferentes: estufa, *spray-drying* e granulação em via úmida. No experimento, foram utilizados ratos machos *Wistar* (200-300 g) divididos em 6 grupos diferentes, que incluíram os grupos de controles normais, controles diabéticos, diabéticos tratados com os diferentes extratos e diabéticos tratados com glibenclamida (droga de referência). O diabetes foi induzido com 60 mg/kg de estreptozotocina (STZ) em tampão fosfato 0,1 M pH 4,5. Os extratos foram administrados durante 7 dias, e, após este período, a glicose de jejum foi determinada, bem como a estimativa do teor de glicogênio hepático nos fígados murinos. O teor de glicose sanguínea diminuiu significativamente nos grupos de tratamento com os extratos (redução aproximada de 46,42%) e observou-se uma diminuição significativa no conteúdo de glicogênio hepático nos controles diabéticos, em comparação com o grupo de controle normal e com os grupos de extratos secos. Os autores ainda concluíram que os diferentes processos de secagem não apresentaram influência significativa na atividade hipoglicemiante dos extratos.

Gwarzo e colaboradores (2014) avaliaram o teor de glicose sérica de jejum e de MDA em ratos *Wistar* diabéticos tratados com extrato metanólico das folhas de *Tacazzea apiculata* (Periplocaceae). Os ratos foram divididos em 5 grupos (não-diabéticos, diabéticos não-tratados, diabéticos tratados com extrato e diabéticos tratados com clorpropamida). A indução do diabetes foi feita pela injeção intraperitoneal de solução de aloxano, na dosagem de 100 mg/kg. Após 4 semanas, o teor de glicose de jejum e MDA foram doseados no soro dos ratos. Os resultados indicaram que o extrato teve efeito hipoglicemiante significativo nos ratos diabéticos tratados (média de glicose de 95,2 mg/dL), em comparação com o grupo diabético



não-tratado, cuja média de glicose foi de 238,91 mg/dL. Um elevado nível de MDA foi também observado no soro dos ratos diabéticos, antes do tratamento, e decresceu de forma significativa após o tratamento.

Sharma e colaboradores (2015) avaliaram o perfil antidiabético *in vivo* do extrato seco aquoso de *Brassica olearacea* var. *gongylodes* (Brassicaceae) em ratos *Wistar* (160 ± 15 g). Os ratos foram divididos em 4 grupos diferentes (controle normal, controle diabético, diabético tratado com extrato e diabético tratado com glibenclamida) e o tratamento se deu por 28 dias. Os ratos diabéticos foram induzidos com 47 mg/kg de STZ em tampão fosfato 0,1 M pH 4,5. Os parâmetros bioquímicos analisados nos soros dos ratos foram glicemia de jejum, hemoglobina glicada (HbA1c), colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídeos, ureia, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Os resultados revelaram que a administração do extrato nos grupos de tratamento diminuiu significativamente os teores de glicose e HbA1c, no final do tratamento (aproximadamente 64% e 43% de redução, respectivamente). Além disso, a diminuição também foi observada para colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídeos, HbA1c, ureia, AST e ALT, sugerindo, adicionalmente, que o extrato apresenta, além dos efeitos hipoglicêmicos, propriedades antilipêmicas e hepatoprotetoras.

O gênero *Eugenia* sp apresenta, na literatura, um histórico de uso como antidiabético, conforme relatado por Jelastin, Tresina e Mohan (2011), Chatterjee e colaboradores (2012) e Sales e colaboradores (2014). Somando-se este fato à informação de que a espécie *Eugenia florida* DC apresenta poucas informações relatadas no seu uso como hipoglicemiante, torna-se uma escolha promissora para que estes estudos possam ser feitos.

### 3 OBJETIVOS

As seções a seguir denotaram os objetivos do presente trabalho.

#### 3.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem, por objetivos, realizar o estudo químico e biológico dos extratos obtidos das folhas de *Eugenia florida* DC.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato hidroetanólico seco e os macerados das folhas da espécie *Eugenia florida* DC;
- Realizar a triagem e a caracterização química por CCD e FIA-ESI-IT-MS dos extratos;
- Quantificar, por métodos espectrofotométricos, os teores de fenóis totais, flavonoides e taninos nos extratos;
- Avaliar as atividades biológicas dos extratos.

### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

As seções a seguir denotaram a metodologia adotada no presente trabalho.

#### 4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas da espécie *Eugenia florida* DC foram coletadas às 10 horas, em abril de 2014, no sul do Estado de Minas Gerais, próximo à Fazenda Cachoeirinha, município de Alfenas, em uma área de cultivo de café, sob as coordenadas geográficas W 045°56'07.8'' e S 21°33'51.7''. Os dados de coleta e as coordenadas do local foram fornecidos pelo Prof. Dr. Flávio Nunes Ramos, do Instituto de Ciências da Natureza – Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

#### 4.2 DEPÓSITO DA EXSICATA

A exsicata foi depositada e registrada no Herbário da Universidade Federal de Alfenas, campus Alfenas-MG, sob o número de registro 2562. A espécie já havia sido identificada anteriormente pelo professor Dr. Geraldo Alves da Silva, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNIFAL-MG).

#### 4.3 SECAGEM E MOAGEM DO MATERIAL VEGETAL

As folhas coletadas foram dispostas em camadas finas, sendo submetidas à secagem em estufa de circulação e renovação de ar (Solab<sup>®</sup> SL 102), a 45°C, durante 72 horas. A temperatura da estufa foi controlada por meio de termostato e de termômetro, os quais garantiram a homogeneidade no processo.

Após a secagem, o material vegetal passou por uma divisão grosseira, seguida pela pulverização em moinho de facas (Cienlab<sup>®</sup> CE 430). O pó obtido foi armazenado em frascos de vidro âmbar devidamente rotulados.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA PERDA POR SECAGEM

Cerca de 20 g do material vegetal fresco foram colocados para secagem em estufa de ar circulante à temperatura de 45°C. O material vegetal foi pesado diariamente até o peso constante e os resultados foram expressos em perda de substâncias voláteis e/ou de água percentual, pela média de três determinações. As amostras foram pesadas em um tempo pré-estabelecido, de 6 em 6 horas (MELLO; PETROVICK, 2000).

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA

Os pós obtidos, após a moagem, foram padronizados quanto ao seus tamanhos médios de partícula, segundo os critérios especificados pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010). Para isto, foram utilizados tamises de malhas 180, 250, 355, 500, 710 e 850 µm, do menor para o maior diâmetro, e um agitador eletromagnético Bertel<sup>®</sup>.

Inicialmente foi feita a regulagem do reostato, na finalidade de calibrar a intensidade da vibração. Para isto, 60 g do pó a ser analisado foram colocados no tamis mais fino da série escolhida e efetuou-se a tamisação com o conjunto de 6 tamises selecionados, nas intensidades de vibração 1, 3, 5, 7 e 9, durante 2 minutos. De posse desses dados, a vibração foi regulada de acordo com o peneiramento que apresentou o melhor rendimento; no caso, foi escolhida a vibração de número 7. Com a vibração já pré-selecionada, 120 g da amostra foram pesados e transferidos para o tamis de malha 850 µm e submetidos à vibração por 15 minutos. Após o término do tempo, a amostra retida em cada tamis foi removida, transferida para um papel impermeável e pesada.

Em seguida, os tamanhos médios das partículas foram mensurados e a distribuição das partículas foi expressa pela referência à abertura nominal da malha dos tamises utilizados.

Para o cálculo do tamanho médio das partículas ( $T_m$ ) foi utilizada a seguinte expressão, dada por Ansel, Popovich e Allen Jr (2000):

$$T_m = [\sum (\% \text{ retida}) \times (\text{abertura média})] / 100.$$

#### 4.6 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS SECOS

O preparo do extrato seco das folhas de *Eugenia florida* DC foi realizado no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e no Laboratório de Farmacognosia da UNIFAL-MG.

O pó obtido foi submetido ao método de extração exaustivo de percolação simples, segundo Prista, Alves e Morgado (2008). O processo teve início com o intumescimento prévio do pó com etanol 70% (v/v) durante 1 hora fora do percolador. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura de pó + etanol 70% v/v da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou de caminhos alternativos dentro do percolador. O álcool foi adicionado aos poucos, até cobrir a superfície do pó, e a mistura foi deixada em maceração por 48 horas. Após este período, procedeu-se a percolação na vazão de 1-2 mL/min.

Após o término da extração por percolação, cerca de 50 g do resíduo seco (torta) foram pesados, separadamente, em erlenmeyers com tampa esmerilhada, e submetidos à maceração por 6 dias com 500 mL dos seguintes solventes: metanol, acetato de etila, acetona e hexano. Após esse período, cada uma das soluções extrativas foi filtrada sob vácuo.

Todas as soluções extrativas (percolado e macerados) foram concentradas em rotaevaporador (Fisatom<sup>®</sup> 801), à temperatura de 50°C. Posteriormente, foram congeladas e submetidas ao processo de liofilização nas condições ideais de pressão (380 mmHg), temperatura (-40°C) e tempo (72 horas).

O rendimento de cada extrato seco foi calculado pela expressão:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato seco} / \text{massa do material vegetal}) \times 100.$$

Após a obtenção dos extratos secos, os produtos foram acondicionados em frascos âmbar e mantidos em geladeira, até o momento do uso, identificados pelas seguintes

abreviaturas: EB (extrato bruto hidroetanólico 70% v/v), M-MeOH (macerado em metanol), M-EtOAc (macerado em acetato de etila), M-Acet (macerado em acetona) e M-Hex (macerado em hexano).

#### 4.7 TRIAGENS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Cada um dos extratos secos de *Eugenia florida* foram dissolvidos, separadamente, nos respectivos solventes utilizados nas extrações, a fim de se obter uma concentração de 1,0 mg/mL. As análises cromatográficas foram feitas em microplacas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (5x5 cm), utilizando uma mistura de acetato de etila, metanol e água (81:11:8) como fase móvel. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para a identificação dos compostos químicos presentes, 10 µL das soluções-amostra e de soluções de padrões autênticos (Sigma<sup>®</sup>) na mesma concentração (1 mg/mL) – quercetina, ácido gálico, catequina, antraquinona e pilocarpina – foram aplicados a cada uma das placas. Todas as placas foram submetidas à revelação por luz ultravioleta (UV). Em seguida, cada placa, separadamente, foi submetida a reveladores diferentes: anisaldeído sulfúrico com aquecimento a 100°C (flavonoides, saponinas, terpenos, taninos e catequinas), NP/PEG (flavonoides), cloreto férrico, vapores de amônia e DPPH (compostos fenólicos), solução alcoólica de KOH a 5% (m/v) (antraquinonas) e reativo de Dragendorff (alcaloides).

Todas as classes de substâncias foram determinadas pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas, quando reveladas, com as colorações das classes descritas na literatura (WAGNER, BLADT; ZGAINSKY, 2009).

#### 4.8 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (HPLC-ESI-IT-MS<sup>n</sup> E FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>)

As análises por HPLC-ESI-IT-MS<sup>n</sup> e FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> foram realizadas no Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Campus Experimental do Litoral Paulista (São Vicente-SP), sob colaboração e

supervisão dos professores Dr. Vagner Vilegas e Dr<sup>a</sup>. Cláudia Quintino da Rocha. Apenas o EB foi utilizado para as análises por espectrometria de massas.

O preparo da amostra para análise foi realizado por extração em fase sólida (SPE), conforme a metodologia descrita por Bovanová, Brandšteterová e Baxa (1998). Para isto, 5 mg do EB de *E. florida* DC foram dissolvidos em 3 mL de metanol grau analítico. Logo em seguida, a solução foi filtrada em cartucho Sepak RP-18<sup>®</sup> e, posteriormente, em um disco de membrana de Nylon (Flow Supply<sup>®</sup>), com 22,25 mm de diâmetro e 0,22 µm de tamanho de poro.

O extrato foi analisado *on-line* por HPLC-ESI-IT-MS<sup>n</sup> em um espectrômetro de massas LCQ Fleet, Thermo Scientific<sup>®</sup>. A separação por HPLC foi realizada utilizando coluna cromatográfica Waters Acquity XBridge TM BEH C<sub>18</sub><sup>®</sup> de tamanho de poro igual a 2,5 µm e dimensões de 2,1 x 100 mm. A fase móvel utilizada consistiu em água (A) e metanol (B), acrescentadas de 0,1% de ácido fórmico, em gradiente exploratório, iniciando com 5% a 100% de B em 10 minutos, em um fluxo de 0,4 mL/min. O eluente da coluna foi dividido por meio de uma junção T, onde foram analisados *on-line*, ambos por ESI-MS e por detector ultravioleta associado ao arranjo de diodos (UV-PDA), sendo 80% do efluente enviado ao detector UV-PDA e 20% do efluente analisado por ESI-MS, no modo negativo.

Os espectros de massas foram obtidos no mesmo espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Scientific<sup>®</sup>, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi ionizada por electrospray (ESI) e as fragmentações foram obtidas em múltiplos estágios (MS<sup>n</sup>), em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise de todos os espectros. As condições experimentais foram: voltagem do capilar -35 V, voltagem do spray -5000 V, temperatura do capilar a 350°C, gás de arraste (N<sub>2</sub>) e fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi de *m/z* 100-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectro.

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS

Alíquotas de cada um dos extratos secos foram diluídas em etanol absoluto, para se obter uma concentração de 250 µg/mL. A 0,5 mL de cada amostra foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteau 10% (v/v) e em seguida, foram acrescentados aos tubos 2,0

mL de carbonato de sódio a 4% (m/v). Os tubos foram agitados para a homogeneização e mantidos em repouso. Depois de transcorridas 2 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu<sup>®</sup> TCC 240 A, a 750 nm (correspondente ao pico de absorção dos óxidos de molibdênio e de tungstênio), ajustando o zero de absorbância com a solução do branco, constituída por todos os reagentes e 0,5 mL de etanol absoluto.

Os mesmos procedimentos foram realizados com o ácido gálico em solução etanólica, nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 µg/mL, a fim de se obter a curva analítica:  $A = 0,0124C + 0,0089$ , onde C é a concentração de ácido gálico e A é a absorbância a 750 nm. O coeficiente de correlação obtido foi de  $R^2 = 0,9877$ . A quantidade de polifenóis no extrato foi determinada por interpolação da absorbância das soluções-amostra contra a curva de calibração. Os valores foram expressos como equivalentes de ácido gálico – EAG (mg de ácido gálico/g de amostra). As análises foram realizadas em triplicata (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES

As alíquotas de cada um dos extratos secos foram diluídas em etanol absoluto, para se obter uma concentração de 500 µg/mL. A 0,5 mL de cada amostra, foram adicionados 1,5 mL de etanol absoluto. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL da solução de cloreto de alumínio hexaidratado 10% (m/v) e 0,1 mL de acetato de potássio 1,0 mol L<sup>-1</sup>. O volume da solução foi completado para 5 mL com 2,8 mL de água destilada. Os tubos foram agitados para a homogeneização e mantidos em repouso por 30 minutos. Por último, foram feitas as leituras em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu<sup>®</sup> TCC 240 A, no comprimento de onda de 425 nm (correspondente ao pico de absorção do complexo flavonoide-alumínio), ajustando o zero de absorbância com a solução do branco, constituída por todos os reagentes e 0,5 mL de etanol absoluto.

Os mesmos procedimentos foram realizados com a quercetina em solução etanólica, nas concentrações de 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80 e 100 µg/mL, a fim de se obter a curva analítica  $A = 0,0075C + 0,0216$ , onde C é a concentração de quercetina, A é a absorbância a 425 nm e o coeficiente de correlação foi de  $R^2 = 0,9982$ . A quantidade de flavonoides foi determinada pela interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração e os



valores foram expressos como equivalentes de quercetina – EQ (mg de quercetina/g de amostra). As análises foram realizadas em triplicata (KALIA et al., 2008).

#### 4.11 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TANINOS

A determinação do teor de taninos nos extratos secos de *Eugenia florida* DC foi feita segundo a metodologia descrita por Ferreira e colaboradores (2014). As análises foram realizadas em triplicata.

Uma alíquota de 0,01 g de cada extrato foi pesada, dissolvida em etanol e transferida para balões volumétricos de 10 mL. Completou-se o volume dos balões para 10 mL com etanol. Alíquotas de 1 mL de cada uma das soluções foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de albumina bovina 1% (m/v). Após a precipitação, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 15 min e centrifugadas a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram dissolvidos em 4 mL de laurilsulfato de sódio 0,5% (m/v). Após essa etapa, adicionou-se 1 mL de solução de cloreto férrico 0,1% (m/v) a cada um dos tubos. Os tubos foram homogeneizados e mantidos em repouso por 15 min. Logo em seguida, realizaram-se as leituras das soluções em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu<sup>®</sup> TCC 240 A, no comprimento de onda de 510 nm, ajustando o zero de absorvância com a solução do branco, constituída por todos os reagentes e 1,0 mL de etanol absoluto.

Os mesmos procedimentos foram realizados com o ácido tânico em solução etanólica, nas concentrações de 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80 e 100 µg/mL, a fim de se obter a curva analítica  $A = 0,0059C + 0,0014$ , onde C é a concentração de ácido tânico e A é a absorvância a 510 nm. O coeficiente de correlação obtido foi de  $R^2 = 0,9846$ . A quantidade de taninos foi determinada pela interpolação da absorvância das amostras contra a curva de calibração e os valores foram expressos como equivalentes de ácido tânico – EAT (mg de ácido tânico/g de amostra).

#### 4.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRRADICALAR PELO SEQUESTRO DE RADICAIS DPPH

A medida da atividade sequestrante de radicais pelos extratos secos de *Eugenia florida* DC foi feita através do monitoramento do sequestro de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) pelos componentes das amostras, com conseqüente decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações.

Foram preparadas as soluções das amostras em etanol nas concentrações de 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,625 µg/mL. Os padrões de ácido gálico e de quercetina foram utilizados nas mesmas concentrações das amostras. Para a realização das análises, foram adicionados 2,0 mL da solução das amostras a serem testadas a 0,5 mL de solução do radical DPPH 0,5 mM. A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso, sob a proteção da luz, por 30 minutos. Logo após, foram feitas as leituras das absorbâncias a 517 nm em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu<sup>®</sup> TCC 240 A. Foi preparado também um branco da amostra, constituído de todos os reagentes e 2 mL de etanol absoluto, e fez-se a leitura. O zero de absorbância foi ajustado com 2 mL de etanol absoluto. A medida das absorbâncias das soluções das amostras em etanol, por apresentarem uma determinada coloração, também foram determinadas, no intuito de eliminar as possíveis interferências.

A propriedade de captura de radicais livres foi calculada em porcentagem de radicais DPPH sequestrados, usando a seguinte equação:

$$\text{Sequestro DPPH (\%)} = [(A_b - A_a) / A_b] \times 100,$$

em que  $A_b$  é a absorbância do branco da amostra e  $A_a$  é a absorbância da solução-amostra.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em % de sequestro do radical DPPH e pela concentração que representa o sequestro de 50% de radical DPPH,  $CE_{50}$  (YEN; CHANG; DUH, 2005).

#### 4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Todos os experimentos de avaliação de atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Microbiologia da UNIFAL-MG, sob colaboração e supervisão da professora Dr<sup>a</sup>. Amanda Latércia Tranches Dias.

Na avaliação do perfil de sensibilidade, foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas de 50% do crescimento (MIC<sub>50</sub>) e de 90% do crescimento (MIC<sub>90</sub>). As determinações dos valores de concentrações inibitórias foram realizadas segundo a metodologia de microdiluição em caldo, conforme documento M7A6 (CLSI, 2003) para bactérias e conforme documento M27-S4 (CLSI, 2012) para leveduras. O meio de cultura utilizado foi o caldo Müller-Hinton.

Os ensaios foram realizados com leveduras e bactérias padrões *American Type Culture Collection* (ATCC), tanto oportunistas como patogênicos. As leveduras utilizadas no ensaio foram *Candida albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. As bactérias testadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 25922. As amostras de fungos foram mantidas em agar Sabouraud e as bactérias, em agar BHI, a 8°C, até o momento da realização dos testes. As suspensões microbianas foram preparadas em soro fisiológico com a turvação correspondente a 0,5 da Escala de Mac Farland (aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL para leveduras e  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL para bactérias).

Os extratos secos foram avaliados nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81; 3,9 e 1,95 µg/mL, em dimetilsulfóxido (DMSO). O solvente DMSO também foi acrescentado no meio de cultura, nas mesmas concentrações dos extratos, e foi utilizado no ensaio como controle negativo. Fluconazol e cloranfenicol foram utilizados como drogas padrões para os fungos e para as bactérias, respectivamente. Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### 4.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Todos os experimentos de avaliação de atividade leishmanicida foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da UNIFAL-MG, sob colaboração e

supervisão do professor Dr. Marcos José Marques. A avaliação da atividade leishmanicida foi feita segundo a metodologia descrita por Diniz (2013).

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/Br/75/Josefa) foram cultivadas, utilizando meio LIT (Liver Infusion Triptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As cepas foram mantidas em estufa BOD<sup>®</sup>, a 28°C. Para o crescimento exponencial, foi adicionado o meio de cultura, a cada 3 dias, em cada cultura, e estas foram submetidas a um repique semanal.

A contagem de formas promastigotas foi feita em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para  $1,0 \times 10^6$  parasitos/mL. 100 µL dessa suspensão foram adicionados a cada poço de uma placa de 24 poços, em triplicata, contendo 1,0 mL de meio LIT. Logo após essa etapa, 6 µL de concentrações de cada um dos extratos secos, em DMSO (1280, 640, 320, 160, 80 e 40 µg/mL) foram adicionados aos poços contendo promastigotas. Anfotericina B e pentamidina foram utilizadas como drogas de referência, nas mesmas concentrações dos extratos. Além disso, foram adicionados nas placas, em poços separados, o meio de cultura, meio + parasitos e meio + DMSO. As placas foram incubadas em estufa BOD, a 28°C, por 72 horas.

Após esse período, foram adicionados, a cada poço da placa, 100 µL de corante resazurina a 1 mg/mL em tampão fosfato PBS (1:9) e, após 3 horas, foi realizada a leitura da reação a 570 nm e a 600 nm, utilizando um leitor de microplacas. A porcentagem de inibição da proliferação foi calculada a partir da fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [ A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Tratado}} / A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Controle positivo}} ] \times 100,$$

em que  $A_{570}$  é a absorbância a 570 nm,  $A_{600}$  é a absorbância a 600 nm e  $R_0$  é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo, ou seja, apenas meio de cultura e resazurina, na ausência de parasitos [ $R_0 = (A_{570} / A_{600})$ ].

A partir do percentual de inibição de cada concentração dos fármacos, foi calculada a  $IC_{50}$  (concentração inibitória do fármaco, que induz 50% do efeito analisado), utilizando o programa Biostat 5.0.

#### 4.15 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM MODELOS MURINOS DIABÉTICOS

Todos os experimentos de avaliação dos parâmetros bioquímicos foram realizados no Laboratório de Bioquímica Clínica da UNIFAL-MG, sob colaboração e supervisão da professora Dr<sup>a</sup>. Fernanda Borges de Araújo Paula.

##### 4.15.1 Animais

A metodologia utilizada na avaliação da atividade antidiabética foi aprovada pelo Comitê de Ética, registrada sob o número 575/2014 (Anexo, CEUA – UNIFAL-MG). Os ratos utilizados foram da linhagem *Wistar*, machos, com peso médio de  $300 \pm 25$  g, obtidos no Biotério da UNIFAL-MG. Os animais foram armazenados em caixas de polietileno, contendo 5 representantes em cada uma delas, e mantidos em temperatura ambiente (25°C), em ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo água e ração comercial *ad libitum*. O peso de todos os ratos foi monitorado de 7 em 7 dias.

Para os experimentos, os animais foram, inicialmente, aclimatados ao ambiente do Biotério durante 1 semana e, em seguida, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos diferentes, descritos a seguir.

Grupo A (controle tratado – CT): Animais não-diabéticos e submetidos ao tratamento com EB de *Eugenia florida*.

Grupo B (controle não-tratado – CN): Animais não-diabéticos e não-submetidos ao tratamento com EB de *Eugenia florida*.

Grupo C (diabético tratado – DT): Animais diabéticos e submetidos ao tratamento com EB de *Eugenia florida*.

Grupo D (diabético não-tratado – DN): Animais diabéticos e não-submetidos ao tratamento com EB de *Eugenia florida*.

#### **4.15.2 Indução do diabetes *mellitus***

Para induzir o diabetes nos animais, foi administrada, por via intraperitoneal, a droga aloxano, na dose de 200 mg/kg de peso corporal, dissolvido em salina 0,9% (pH 4,5). A glicemia casual, pelo teste de glicemia capilar usando tiras reativas, foi realizada após 7 dias da indução do diabetes. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia acima de 200 mg/dL (TANG et al., 2006).

#### **4.15.3 Administração dos extratos**

O EB das folhas de *E. florida* DC foi reconstituído em água na concentração de 0,2 g/mL e administrado aos animais, por gavagem, durante 30 dias. O início do tratamento foi de uma semana após a indução e a confirmação do diabetes pelo teste de glicemia capilar. A dose de extrato administrada foi de 200 mg/kg do peso do animal. Para os grupos não-tratados com extrato (B e D), foi administrado, por gavagem, volume de água adequado aos pesos (DHANABAL et al., 2004).

#### **4.15.4 Obtenções das amostras biológicas**

Após 30 dias de tratamento, os animais foram mantidos em jejum alimentar por 10 horas, antes da eutanásia. No procedimento de eutanásia, os animais foram anestesiados e o sangue total foi colhido por punção cardíaca, para obtenção de soro. Após eutanásia, os rins e fígados foram retirados.

O sangue total foi colhido em tubos contendo gel separador de soro. Após centrifugação a 1500 g por 10 minutos, o soro foi separado em tubos Eppendorf<sup>®</sup>, identificado, congelado a 4°C e utilizado para as análises bioquímicas.

Os fígados e rins foram lavados com salina 0,9%, separados em frascos de coleta devidamente identificados e conservados a 4°C, até o momento do uso. O armazenamento dos órgãos nos frascos foi feito em solução de tampão fosfato (PBS) 0,1 M, acrescida dos

seguintes inibidores enzimáticos: fenil-metilfluoridosulfóxido (PMSF) 50 µg/mL, benzamidina 100 µM e tripsina 50 µM.

#### **4.15.5 Determinações dos parâmetros bioquímicos no soro dos animais**

Após a coleta de sangue por punção cardíaca, as dosagens de glicemia de jejum, triglicerídeos e colesterol total (CT) foram feitas pelo método enzimático-colorimétrico baseado na reação de Trinder (1969). A dosagem de creatinina foi feita pelo método de Jaffé, descrito por Fabiny e Ertinghausen (1971). A dosagem de ureia foi realizada pelo método de Chaney e Marbach (1961).

A concentração de colesterol HDL no soro foi determinada pelo método descrito por Burstein, Scholnick e Morfin (1970). As concentrações totais de partículas aterogênicas (n-HDL) foram determinadas de acordo com a equação proposta por Xavier e colaboradores (2013):

$$\text{n-HDL} = \text{CT} - \text{HDL},$$

em que CT é a concentração de colesterol total e HDL é a concentração de HDL.

As concentrações de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram determinadas pelo método cinético-UV, usando o método de Bergmeyer, Scheibe e Wahlefeld (1978). A concentração de frutossamina foi determinada pelo método cinético-colorimétrico descrito por Baker e colaboradores (1985).

As determinações de glicose, ureia, creatinina, colesterol total, HDL, triglicerídeos, AST e ALT foram determinados em aparelho automatizado LabMax Plenno<sup>®</sup>. A determinação da concentração de frutossamina foi realizada em aparelho BioPlus<sup>®</sup> Bio 2000. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

#### 4.15.6 Preparo dos homogeneizados de rim e fígado

Os tecidos renais e hepáticos, conservados sob refrigeração a  $-20^{\circ}\text{C}$ , foram utilizados para a obtenção do homogeneizado. Uma parte dos tecidos foi pesada em balança analítica (Shimadzu<sup>®</sup> AY 220) e um volume de PBS 0,1 M (pH 7,4) foi adicionado em valor equivalente a 4 vezes o peso do tecido. Os homogeneizados foram centrifugados a 3000 g, por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , em centrífuga refrigerada, sendo o sobrenadante utilizado para a determinação da atividade sobre a peroxidação lipídica (JONES; ABDALLA; FREITAS, 1995).

#### 4.15.7 Determinação da concentração proteica

A concentração de proteínas nos homogeneizados de tecido renal e hepático foi determinada pelo método de Bradford (1976), em triplicata, utilizando-se, como padrão, albumina bovina. A solução-mãe de albumina bovina foi preparada em tampão PBS e, a partir desta, foram preparadas 5 diluições com as seguintes concentrações, em  $\mu\text{g/mL}$ : 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0.

Para a construção da curva-padrão, 1 mL do reagente de Bradford foi misturado a 0,1 mL de cada uma das diluições da solução-padrão em tubos de ensaio diferentes. Após 10 minutos à temperatura ambiente, foram determinadas as leituras em 595 nm, em espectrofotômetro UV/Vis Shimadzu<sup>®</sup> TCC 240 A. Como branco, foi utilizado 1 mL de reagente de Bradford e 0,1 mL de água destilada.

Para a determinação de proteínas totais nos homogeneizados, foi adicionado 0,1 mL de cada sobrenadante com 1 mL do reagente de Bradford e procedeu-se da mesma forma que para as soluções-padrão. Os valores de concentração proteica nos homogeneizados foram obtidos, através da interpolação dos valores de absorbância de cada leitura na equação da curva-padrão, dada por  $A = 0,4631C + 0,0197$ , em que C é a concentração proteica e A é a absorbância medida a 595 nm. O coeficiente de correlação obtido foi de  $R^2 = 0,9963$ .



#### 4.15.8 Determinação da atividade sobre peroxidação lipídica

A determinação da peroxidação lipídica foi avaliada, usando os homogeneizados de fígado e rim. Após a obtenção dos homogeneizados, 1,35 mL de água destilada, 0,75 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% em ácido acético glacial foram adicionados a 0,15 mL de sobrenadante e homogeneizados por 30 segundos, em agitador de tubos Vortex<sup>®</sup>. As amostras obtidas foram incubadas em banho-maria a 95°C, durante 60 minutos. Em seguida, foram resfriadas em banho de gelo. A cada 0,2 mL de amostra, foram adicionados 1,8 mL de metanol e 1,0 mL de NaOH 1,0 M. Os tubos foram homogeneizados e a leitura foi realizada em fluorímetro, nos comprimentos de onda de 515 nm (excitação) e 553 nm (emissão).

Os mesmos procedimentos foram realizados com o malonaldeído (MDA) em solução metanólica, nas concentrações de 0,6; 1,2; 2,4; 4,8; 9,6; 24; 48 e 96 µM, a fim de se obter a curva analítica:  $A = 12,255C + 33,367$ , onde C é a concentração de MDA, A é a absorbância a 532 nm e o coeficiente de correlação foi de  $R^2 = 0,9970$ . A quantidade de MDA das amostras foi determinada pela interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração. Os valores foram subtraídos da concentração de proteínas e expressos em µM de MDA/mg de proteínas. As análises foram realizadas em triplicata (CHEN; TAPPEL, 1996).

#### 4.16 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sisvar Versão 5.3/DEX-UFLA (Copyright, 1999-2010), onde se realizou a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Scott e Knott (1974), em nível de significância de 5%.

As análises de correlação foram realizadas no software BioEstat, Versão 5.0, e os resultados foram obtidos pelo coeficiente de correlação de Spearman (r).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As seções a seguir mostram os resultados e a discussão pertinente de todos os experimentos realizados no presente trabalho.

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA PERDA POR SECAGEM

A determinação da perda de água e/ou substâncias voláteis nas folhas de *Eugenia florida* DC foi feita segundo a metodologia descrita por Mello e Petrovick (2000), em que cerca de 20 g do material vegetal foram colocados para secagem em estufa a 45°C e a massa total foi monitorada em balança analítica, de 6 em 6 horas, até que as folhas adquirissem peso constante, após 3 pesagens consecutivas. O ensaio foi realizado em triplicata.

Após o tempo de 72 horas, obteve-se um peso constante do material vegetal, que teve uma média igual a 10,11 g. A perda percentual de massa, por secagem, foi igual a 50,00%, o que indica uma redução de, aproximadamente, metade do peso inicial das folhas.

A determinação do teor de água e/ou substâncias voláteis em um material vegetal representa um parâmetro da qualidade do processo de secagem e da garantia de sua conservação. O valor encontrado no presente estudo encontra-se dentro dos valores estabelecidos por códigos oficiais, o que indica uma secagem eficiente da matéria-prima vegetal (COSTA et al., 2009).

A importância da determinação da perda por secagem está intimamente relacionada à estabilidade microbiológica da matéria-prima vegetal, pois este parâmetro expressa a susceptibilidade do material em permitir o crescimento de fungos e bactérias. Além disso, deve-se considerar também a estabilidade química, representada principalmente pelos processos de hidrólise, que podem degradar os metabólitos secundários presentes na composição do material vegetal (NUNES et al., 2009; PEIXOTO, 2012).

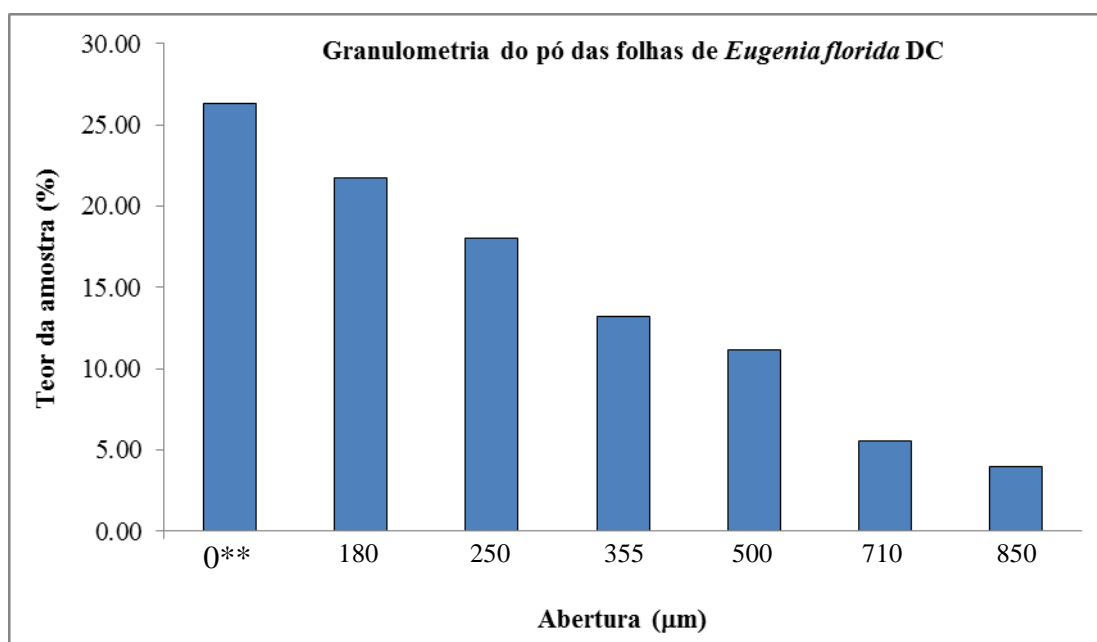
Sob o ponto de vista tecnológico, é importante conhecer o conteúdo de água e/ou substâncias voláteis em uma matéria-prima vegetal, para que este valor seja considerado nos cálculos de rendimento. Assim, a determinação da perda por secagem é um ensaio de grande relevância para a produção de fitoterápicos (NUNES et al., 2009).

Este parâmetro, então, deve ser adequadamente avaliado na seleção das operações produtivas, na manipulação e na seleção das condições de armazenamento do material vegetal, bem como do material de acondicionamento (MENDEZ et al., 2011; PEIXOTO, 2012).

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA

Foi feita a análise granulométrica do pó obtido das folhas de *Eugenia florida* DC. Os resultados, mostrados no histograma abaixo (Figura 4), mostram que a maioria das partículas encontra-se na faixa granulométrica de 180 a 355  $\mu\text{m}$ .

Figura 4 – Distribuição da porcentagem do pó das folhas de *Eugenia florida* DC retido em cada tamis.



Fonte: Do autor.

Nota: \*\* Fundo coletor.

Sabe-se que, de acordo com os dados descritos na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010), o pó obtido das folhas de *Eugenia florida* DC pode ser classificado como um pó moderadamente grosso, definido por apresentar partículas que passam, em quase sua

totalidade, pelo tamis com abertura nominal de malha de 710  $\mu\text{m}$  e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250  $\mu\text{m}$ .

O pó obtido, após a moagem no moinho de facas, apresentou partículas não homogêneas. Dessa forma, procedeu-se à determinação do tamanho médio das partículas do pó das folhas de *Eugenia florida* DC, através da granulometria. Os resultados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 – Cálculo do tamanho médio das partículas das folhas pulverizadas de *Eugenia florida* DC.

Abertura da malha ( $\mu\text{m}$ )	Abertura média (mm)	Peso retido* (g)	Peso retido (%)	% retida x abertura média
0**	0,090	31,623	26,350	2,372
180	0,215	26,064	21,720	4,670
250	0,303	21,672	18,060	5,472
355	0,423	15,828	13,190	5,579
500	0,675	13,380	11,150	7,526
710	0,780	6,624	5,520	4,306
850	0,850	4,809	4,010	3,409
		<b>120</b>	<b>100</b>	<b>33,334</b>

Fonte: Do autor.

Nota: \*Média de três determinações; \*\*Fundo coletor.

Com base nos dados da Tabela 1, calculou-se o tamanho médio da partícula, através da equação de Ansel, Popovich e Allen Jr (2000), e o tamanho médio encontrado para as partículas do pó vegetal foi de 0,333 mm.

A granulometria de pós, juntamente com outras propriedades físico-químicas, interfere diretamente na qualidade do processo extrativo e do produto final. O pó obtido para as folhas de *Eugenia florida* DC classifica-se como moderadamente grosso e, por conseguinte, apresenta partículas de tamanho maior e bastante homogêneas. Isto favorece o processo extrativo, pois o pó apresenta menor quantidade de partículas finas, o que diminui a aderência e a viscosidade do meio, permitindo uma maior penetração do solvente dentro das células vegetais (MIGLIATO et al., 2007; MENDEZ et al., 2011).

O pó moderadamente grosso demonstra também a vantagem de apresentar menor propensão à adsorção de umidade, diminuindo, desta maneira, a formação de aglomerados de partículas (BELLAMY; NORDON; LITTLEJOHN, 2008; MENDEZ et al., 2011).

### 5.3 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS SECOS

Primeiramente, o pó obtido das folhas de *Eugenia florida* DC foi submetido ao método de extração exaustivo de percolação simples, segundo Prista, Alves e Morgado (2008). Após o término da percolação, 50 g do resíduo seco foi submetido à maceração por 6 dias com 500 mL dos seguintes solventes, separadamente: metanol, acetato de etila, acetona e hexano. Os rendimentos dos extratos obtidos (EB, M-MeOH, M-EtOAc, M-Acet e M-Hex) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Rendimentos dos extratos obtidos das folhas de *Eugenia florida* DC.

Material	Quantidade inicial de material vegetal (g)	Quantidade de extrato seco (g)	Rendimento (%)
EB	440,55	105,27	23,89
M-MeOH	50,01	1,18	2,37
M-EtOAc	50,11	1,16	2,32
M-Acet	50,10	1,17	2,33
M-Hex	50,02	1,13	2,26

Fonte: Do autor.

Legenda: EB – extrato bruto hidroetanólico 70% v/v; M-MeOH – macerado em metanol; M-EtOAc – macerado em acetato de etila; M-Acet – macerado em acetona; M-Hex – macerado em hexano.

Dentre todas as amostras, o extrato bruto hidroetanólico 70% v/v (EB), obtido por percolação, foi o que apresentou maior rendimento (23,89%). Isso sugere que os compostos majoritários presentes nesse extrato sejam os mais polares, já que o solvente utilizado apresenta um grau de polaridade suficiente para extrair tais compostos. Dentre esses compostos, pode-se sugerir a presença de taninos, flavonoides, ácidos fenólicos e saponinas, que são os mais comuns no gênero *Eugenia* sp (OKOH-ESENE et al., 2011).

O processo de obtenção de extratos, em outros solventes, possibilita a obtenção de compostos ativos que, muitas vezes, não são extraídos pelos líquidos extratores convencionais, como o etanol 70% v/v. Desta forma, muitos compostos de polaridades distintas e que favorecem a atividade biológica podem ser extraídos do material vegetal (SIMÕES et al., 2010). Desta forma, procederam-se às preparações dos macerados em metanol, acetato de etila, acetona e hexano (M-MeOH, M-EtOAc, M-Acet e M-Hex, respectivamente), utilizando a torta obtida após a percolação.

Os macerados, de acordo com a Tabela 2, apresentaram rendimentos bem menores do que o apresentado pelo EB, variando de 2,26 a 2,37%, aproximadamente. Isto indica que a maior parte dos compostos ativos existentes no material vegetal foi previamente extraída pelo processo de percolação, resultando em uma menor quantidade, em massa, dos macerados. Além disso, a quantidade, em massa, de material vegetal utilizada no processo de maceração foi bem menor, se comparada à quantidade usada no processo de percolação.

No entanto, ao analisarmos o rendimento obtido pelo M-MeOH, pode-se verificar que uma pequena quantidade de compostos polares, não extraídos com etanol 70%, está presente neste macerado. Desta forma, pode-se prever que as composições químicas do EB e do M-MeOH serão bastante semelhantes entre si, mesmo em se tratando de solventes diferentes.

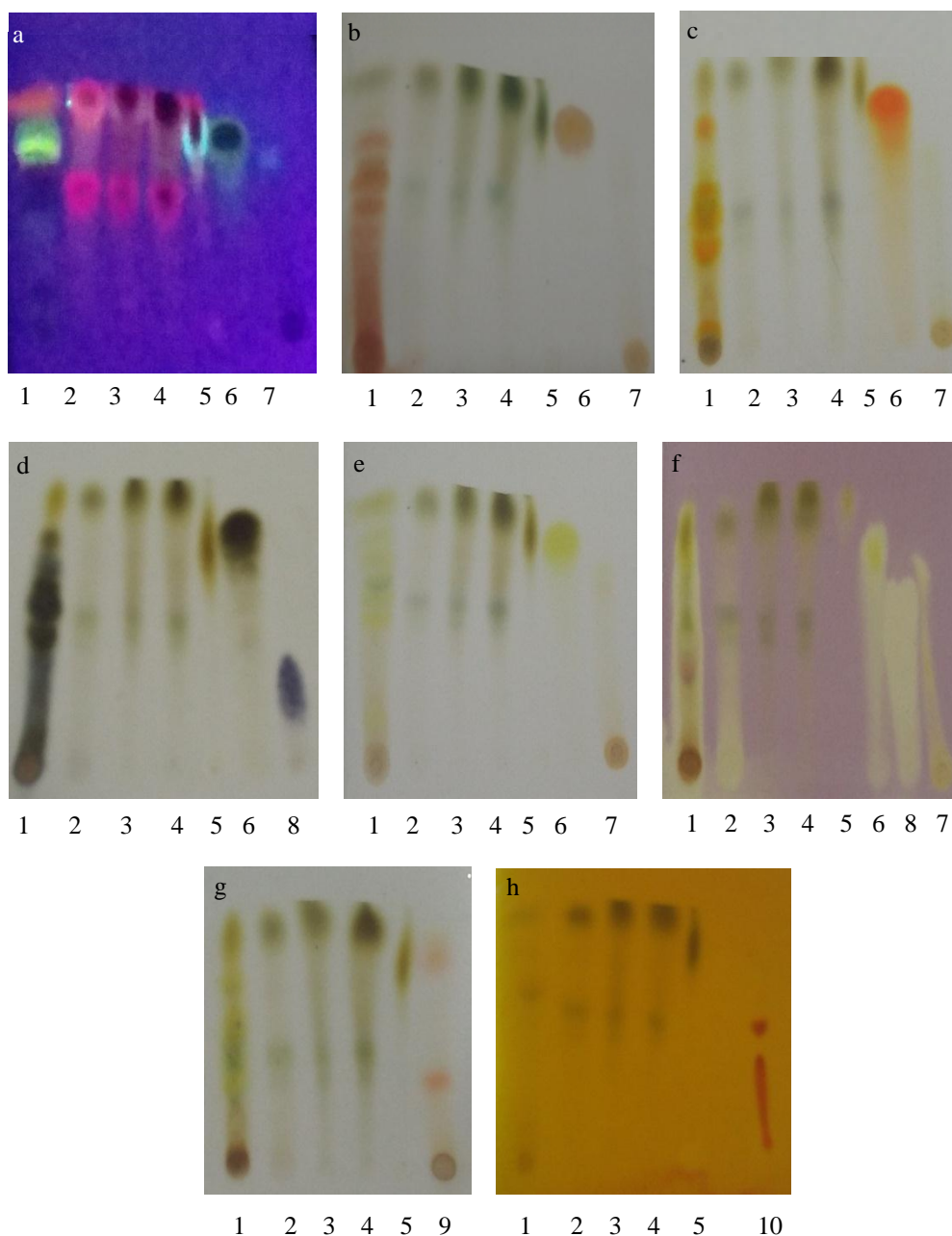
Os macerados M-EtOAc e M-Acet apresentaram rendimentos bastante semelhantes, iguais a 2,32% e 2,33%, respectivamente. Os solventes usados na preparação destes extratos, acetato de etila e acetona, apresentam uma polaridade intermediária que favorece a extração de compostos como agliconas de flavonoides e ácidos fenólicos de baixo peso molecular (RODRIGUES; GONÇALVES; SILVA, 2004).

Pode-se observar que, dentre todos os macerados, o M-Hex foi o que apresentou o menor rendimento, igual a 2,265%. O hexano é um solvente bastante apolar e, com isso, favorece a extração dos componentes mais apolares presentes no material vegetal de *Eugenia florida* DC. Porém, segundo Simões e colaboradores (2010), o solvente hexano pode extrair alguns compostos como pigmentos, lipídios e ceras, que não apresentam interesse biológico relevante. Assim, o valor desse rendimento, mesmo sendo baixo, pode estar sobrestimado, devido à presença dessas substâncias na composição do extrato.

## 5.4 TRIAGENS FITOQUÍMICAS

A análise fitoquímica por CCD caracterizou a presença dos constituintes majoritários nos extratos de *Eugenia florida* DC, conforme a Figura 5.

Figura 5 – Perfis cromatográficos dos extratos secos obtidos das folhas de *E. florida* DC.



Fonte: Do autor.

Legenda: 1 – EB; 2 – M-MeOH; 3 – M-EtOAc; 4 – M-Acet; 5 – M-Hex; 6 – padrão de quercetina; 7 – padrão de catequina; 8 – padrão de ácido gálico; 9 – padrão de antraquinona; 10 – padrão de pilocarpina; a – UV (365 nm); b – anisaldeído sulfúrico; c – NP/PEG; d – FeCl<sub>3</sub>; e – vapores de NH<sub>3</sub>; f – DPPH; g – KOH alcoólico; h – reativo de Dragendorff.

Nas análises por CCD, utilizou-se uma fase móvel, constituída por uma mistura de acetato de etila, metanol e água (81:11:8), e fase estacionária de sílica-gel F<sub>254</sub>.

A verificação dos perfis cromatográficos foi realizada pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas, após a aplicação do revelador, com as colorações das classes descritas na literatura (WAGNER; BLADT; ZGAINSKY, 2009).

Quanto às classes de metabólitos presentes no EB, pode-se observar, por análise no UV (Figura 5a), uma mancha fluorescente azulada e uma verde amarelada, que sugerem a presença de ácidos fenólicos, e uma mancha alaranjada próxima ao final da eluição, que sugere a presença de flavonoides. Em relação aos extratos M-MeOH, M-EtOAc e M-Acet, observaram-se manchas avermelhadas intensas no centro e no final da placa, que podem sugerir a presença de antocianidinas e saponinas, respectivamente, além de algumas manchas alaranjadas menores, que podem indicar a presença de flavonoides. O M-Hex apresentou uma mancha azul intensa próxima ao ponto final da corrida, que pode sugerir a presença de triterpenos.

Na revelação por anisaldeído sulfúrico e posterior aquecimento a 100°C (Figura 5b), o EB apresentou manchas de coloração vermelho-tijolo próximas ao ponto de aplicação, que sugerem a presença dos taninos condensados, duas manchas amareladas, que correspondem aos flavonoides, e várias manchas avermelhadas, que podem indicar a presença de catequinas e taninos hidrolisáveis. Os extratos M-MeOH, M-EtOAc e M-Acet apresentaram manchas esverdeadas no centro e no final da placa, que pode sugerir a presença de antocianidinas e saponinas, respectivamente.

Com o revelador NP/PEG (Figura 5c), pode-se observar que o EB apresentou algumas manchas amareladas e alaranjadas, que sugerem a presença de flavonoides da classe dos flavonóis e das flavonas, respectivamente. Nos extratos M-MeOH, M-EtOAc e M-Acet, observaram-se algumas manchas azuladas pequenas no centro da placa, que podem sugerir a presença das antocianidinas. No M-Hex, não foi possível a detecção de manchas características dos flavonoides.

O cloreto férrico (Figura 5d) forma manchas de colorações escuras na presença de compostos fenólicos. No EB, podem-se observar manchas de coloração acizentada próximas ao ponto de aplicação, que sugerem a presença de taninos condensados; e manchas acastanhadas, que podem indicar a presença dos flavonoides. Nos extratos M-MeOH, M-EtOAc e M-Acet, houve a detecção de manchas castanho-esverdeadas, que podem sugerir a presença de alguns flavonoides.



Na revelação com vapores de  $\text{NH}_3$  (Figura 5e), o EB apresentou algumas manchas de coloração amarela, que podem indicar a presença de flavonoides, uma mancha vermelha no ponto de aplicação, que pode sugerir a presença de taninos, e uma mancha azulada, que pode indicar a presença de antocianidinas. Os extratos M-MeOH, M-EtOAc e M-Acet também apresentaram manchas azuladas no centro da placa, indicativas da presença das antocianidinas.

A triagem fitoquímica por CCD, usando o revelador de DPPH, sugere a presença de substâncias fenólicas antirradicais, evidenciadas na placa pela presença de manchas amareladas sobre um fundo de coloração violeta. De acordo com a Figura 5f, pode-se notar que os compostos fenólicos ficaram mais concentrados no EB e no M-MeOH.

Na revelação com solução alcoólica de KOH (Figura 5g), não se observou, em nenhum dos extratos analisados, a presença de manchas vermelho alaranjadas, características das antraquinonas. Isto sugere ausência desta classe de compostos. Além disso, a revelação por Dragendorff (Figura 5h) também não mostrou a presença de manchas vermelhas intensas nos extratos, características dos alcaloides, o que indica ausência destes compostos nos extratos analisados.

## 5.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Considerando as amostras utilizadas nesse estudo (EB, M-MeOH, M-EtOAc, M-Acet e M-Hex das folhas de *E. florida* DC), apenas o EB foi utilizado para a análise do perfil químico, por espectrometria de massas, no intuito de propor possíveis moléculas responsáveis pelas atividades biológicas citadas. Esta escolha foi devido ao fato de EB apresentar os melhores resultados nos ensaios biológicos.

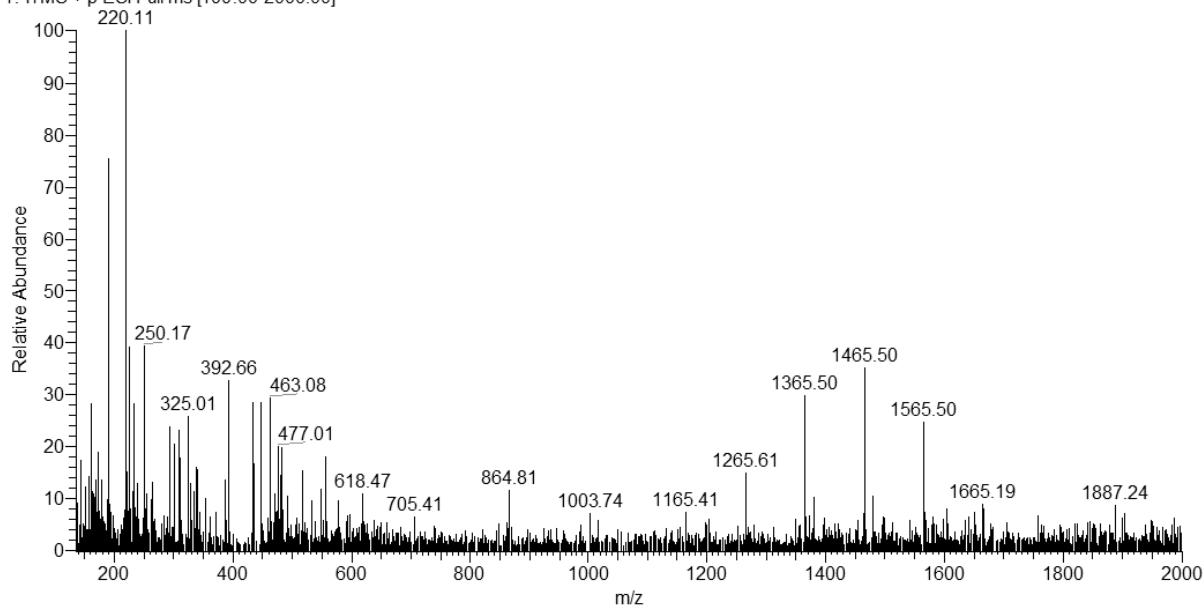
O modo negativo foi escolhido para o desenvolvimento do trabalho por haver um favorecimento da ionização dos compostos fenólicos, que, de acordo com a literatura, estão em maior proporção nas espécies do gênero *Eugenia* sp (OKOH-ESENE et al., 2011). Estes compostos, ao perderem um próton, são registrados como seus respectivos íons ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ). Para esses íons, foram obtidas as  $\text{MS}^n$  (fragmentações em múltiplos estágios), o que possibilitou a sugestão das estruturas de algumas moléculas, baseando-se em mecanismos de fragmentação.

O cromatograma dos íons obtidos pela análise por HPLC-ESI-IT- $\text{MS}^n$  (TIC-MS) está apresentado em Apêndice, Figura XXXII. O espectro de massas do EB, no modo *full scan*,

está apresentado na Figura 6. Os picos escolhidos para a sugestão das estruturas foram baseados naqueles obtidos nos tempos de retenção do TIC-MS. Os principais fragmentos encontrados estão indicados na Tabela 3. Em alguns picos selecionados, não foi possível a realização da fragmentação MS<sup>n</sup>.

Figura 6 – Espectro de massas, em modo *full scan*, obtido do EB das folhas de *Eugenia florida* DC.

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.42E3  
T: ITMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]



Fonte: Do autor.

Tabela 3 – Espectrometria de massas por injeção direta e ionização por electrospray do EB de *E. florida* DC.

(continua)					
	Composto	Massa molecular	Fragmentação por FIA-ESI-IT-MS		Referência
			[M-H] <sup>+</sup>	Íons majoritários produzidos (MS <sup>n</sup> )	
(1)	Glicose	162	161	---	ARAÚJO et al., 2005.
(2)	Ácido quínico	192	191	173, 127, 111	BASTOS et al., 2007.
(3)	Resveratrol	228	227	---	LA TORRE et al., 2006.
(4)	5-hidroiresveratrol	244	243	227, 215, 137	QIU et al., 2013.
(5)	1,2-dideidrotanshinona IIA	294	293	277, 249, 221, 207	ZHU et al., 2007.
(6)	Quercetina	302	301	---	FERREIRA et al., 2014.
(7)	4-alil-1-hidroxi-2-(2'-alil-4'-hidroxi-5'-metoxifenoxi)-benzeno	312	311	283	KATO et al., 2013.
(8)	Ácido 4- <i>O-p</i> -cumaroilquínico	338	337	191, 173, 127, 111	BARROS et al., 2012.

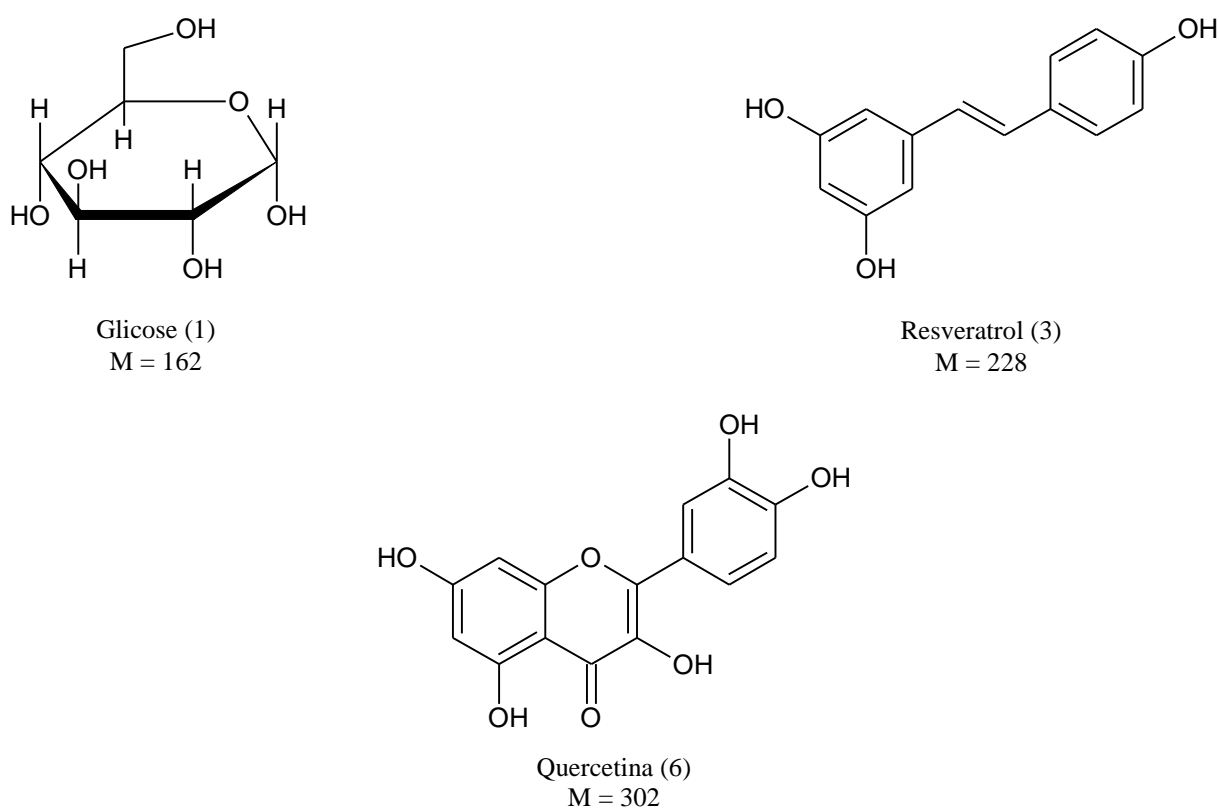
(conclusão)

	Composto	Massa molecular	Fragmentação por FIA-ESI-IT-MS		Referência
			[M-H] <sup>-</sup>	Íons majoritários produzidos (MS <sup>n</sup> )	
(9)	Ácido 5-cafeoilquínico	354	353	179	AZUMA et al., 1999.
(10)	5- $\alpha$ -hidroxieufeno	428	427	409	MISHRA; SHUKLA; KUMAR, 2000.
(11)	Quercetina- <i>O</i> -arabinose	434	433	301	CHARROUF et al., 2007.
(12)	Quercetrina	448	447	301	FERREIRA et al., 2014.
(13)	Rhododendrina pentosídeo	460	459	327, 165	MÄMMELÄ, 2001.
(14)	Quercetina- <i>O</i> -glicose	464	463	301	FERREIRA et al., 2014.
(15)	Rhamnetina- <i>O</i> -glicose	478	477	315	ENGELS et al., 2012.
(16)	Granatunflavanil- <i>O</i> -xilose	482	481	349	BAGRI et al., 2010.
(17)	Distenina	515	514	497, 485, 469, 457	HORI et al., 1998.
(18)	<i>O</i> -galoil desbenzoilpaeoniflorina	528	527	331, 169	CAO et al., 2014.
(19)	Procianidina B <sub>2</sub>	578	577	533, 427, 289	POUPARD et al., 2011.
(20)	Hyperina	596	595	433, 301	SANTOS; SCHRIPEMA; KUSTER, 2005.
(21)	Ácido betulínico heterosídeo	618	617	455, 411	VIEIRA et al., 2014.
(22)	Cimicifoetisídeo A	620	619	487	SUN et al., 2007.
(23)	Ácido 3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glicopiranosil serjânico	676	675	499, 455, 397	JAYASINGHE; WANNIGAMA; MACLEOD, 1998.
(24)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoil-4,5-di- <i>O</i> -feruoilquínico	706	705	543, 529, 367, 191, 173	JAIWAL; KUHNERT, 2010.
(25)	Kochianosídeo IV	764	763	631, 455, 411	YOSHIKAWA et al., 1997.
(26)	27- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glicopiranosil fisagulina D	784	783	621, 459	JAYAPRAKASAM; NAIR, 2003.
(27)	Procianidina C <sub>2</sub>	866	865	823, 715, 577, 533, 425, 289	HAMMERSTONE et al., 1999.
(28)	Isoastragalosídeo I	869	868	705, 489	ZHANG et al., 2007.
(29)	Clinopodisídeo E	995	994	832, 670, 523	LIU; LI; OWEN, 1995.
(30)	Aesculusídeo B	1007	1006	844, 682, 506	ZHAO; YANG; HATTORI, 2001.
(31)	Ácido fitolacagênico heterosídeo	1017	1016	854, 692, 530	MADL et al., 2006.
(32)	Guaianina D	1027	1026	880, 734, 572, 440	ALVES et al., 1996.
(33)	Catequina tetramérica	1155	1154	1110, 1002, 865, 823, 715, 577, 533, 425, 289	HAMMERSTONE et al., 1999.
(34)	Scillasaponina B	1267	1266	1104, 942, 780, 618, 486	MIMAKI et al., 2002.

Fonte: Do autor.

O espectro *full scan* do EB de *Eugenia florida* DC (Figura 6) apresentou alguns picos relevantes de compostos fenólicos, cujas estruturas propostas foram baseadas em dados da literatura (Figura 7). Merecem destaque os seguintes picos das moléculas desprotonadas  $[M-H]^-$ , com suas respectivas relações massa/carga:  $m/z = 161$ , correspondente ao composto (1), uma molécula de glicose (ARAÚJO et al., 2005);  $m/z = 227$ , correspondente ao composto (3), uma molécula de resveratrol (LA TORRE et al., 2006); e  $m/z = 301$ , correspondente ao composto (6), uma molécula de quercetina (FERREIRA et al., 2014).

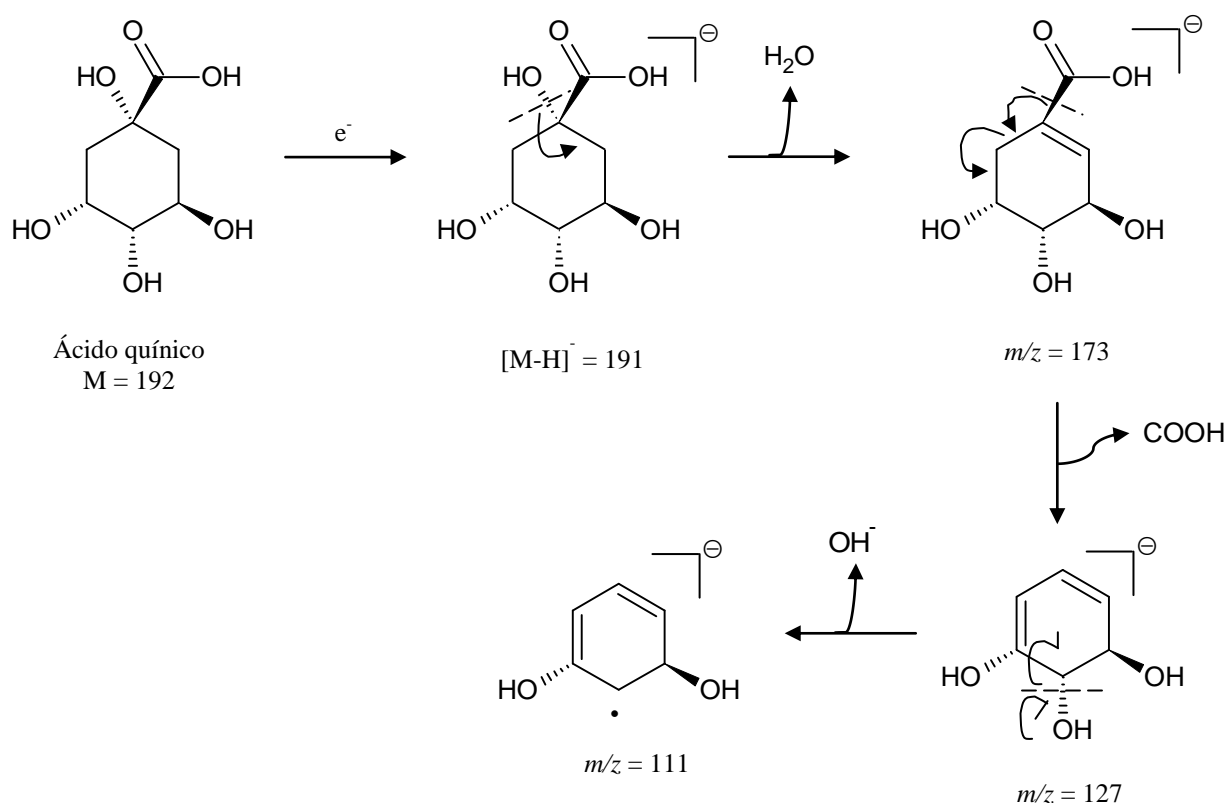
Figura 7 – Estruturas de alguns compostos fenólicos encontrados no EB de *Eugenia florida* DC.



Fonte: Do autor.

O espectro  $MS^2$  do composto (2) (Apêndice, Fig. I) mostrou o pico-base da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  em  $m/z = 191$ . Além disso, mostrou picos em  $m/z = 173$ , que corresponde à perda de uma molécula de água ( $M = 18$ );  $m/z = 127$ , que corresponde à perda de um radical carboxila ( $M = 46$ ); e  $m/z = 111$ , que corresponde à perda de um radical hidroxila ( $M = 16$ ). Com base nessas informações e de acordo com a literatura, o pico de  $m/z = 191$  sugere a presença do composto ácido quínico (BASTOS et al., 2007). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 8.

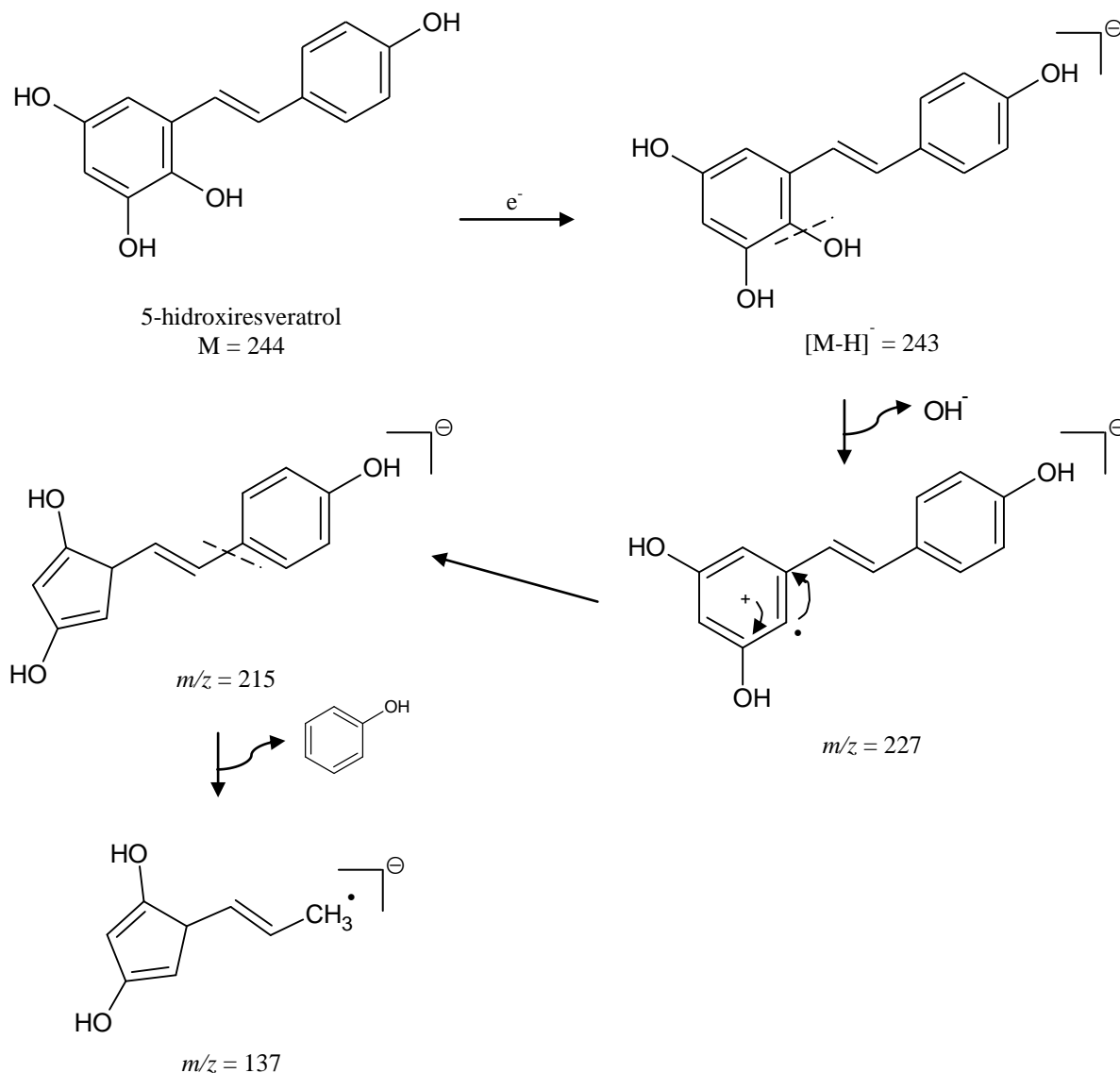
Figura 8 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (2).



Fonte: Do autor.

O espectro  $MS^2$  do composto (4) (Apêndice, Fig. II) mostrou o pico-base da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  em  $m/z = 243$ . Além disso, mostrou picos em  $m/z = 227$ , que corresponde à perda de um radical hidroxila ( $M = 16$ ) e ao pico correspondente à molécula de resveratrol;  $m/z = 215$ , que corresponde à quebra de um anel aromático, característico dos compostos fenólicos; e  $m/z = 137$ , que corresponde à perda de um grupamento fenólico ( $M = 78$ ). Com base nessas informações e de acordo com a literatura, o pico de  $m/z = 243$  sugere a presença do composto 5-hidroxi-resveratrol (QIU et al., 2013). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 9.

Figura 9 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (4).

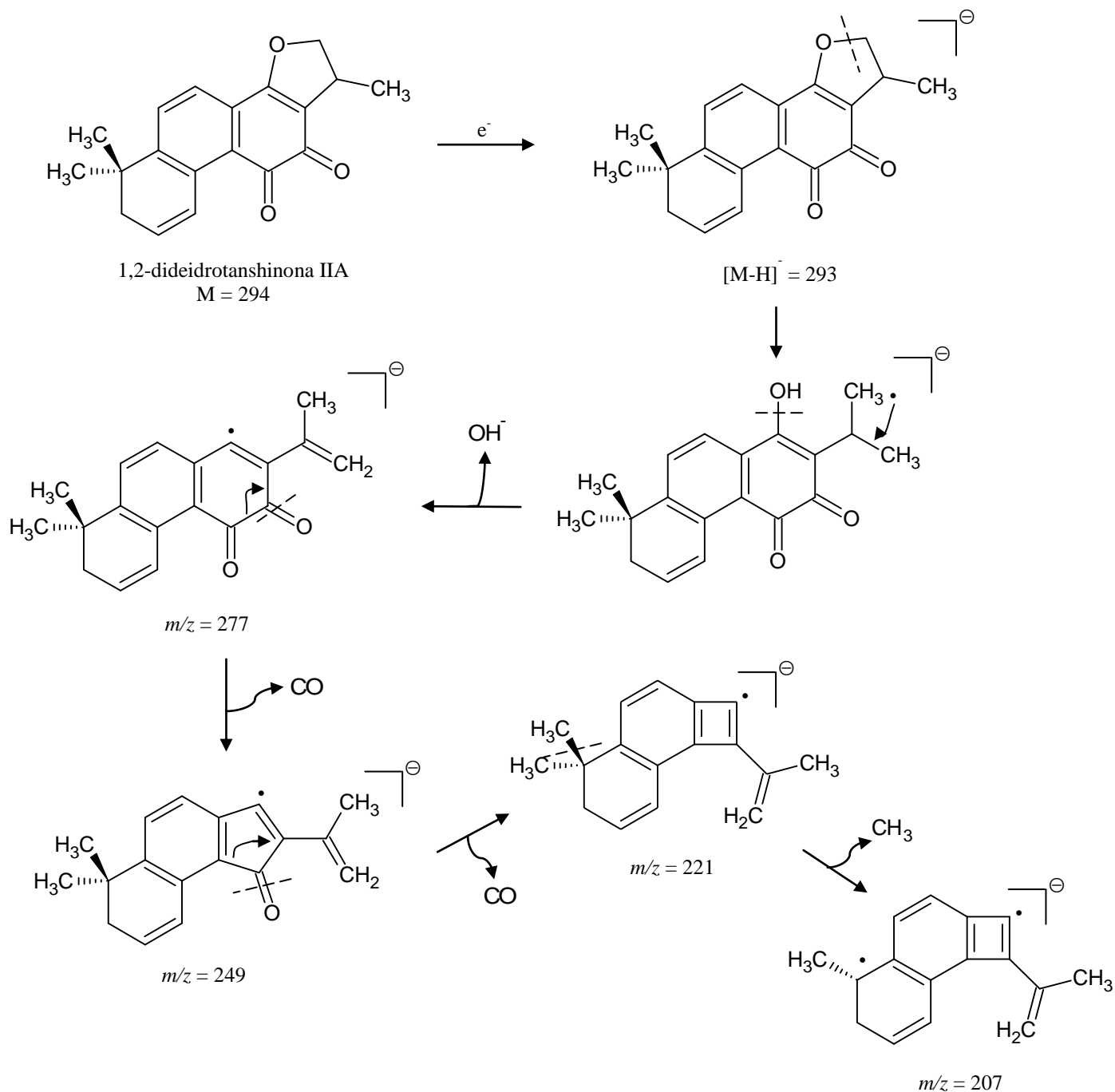


Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (5) (Apêndice, Fig. III) mostrou o pico-base da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  em  $m/z = 293$ . Além disso, mostrou um pico em  $m/z = 277$ , que corresponde ao composto intermediário formado pela abertura do anel tetraidrofurano e consequente perda do radical hidroxila (M = 16);  $m/z = 249$ , correspondente à perda de um fragmento de carbonila (M = 28) e consequente quebra do anel aromático;  $m/z = 221$ , correspondente à perda de um fragmento de carbonila (M = 28) e quebra do anel aromático; e um pico em  $m/z = 207$ , correspondente à perda de um fragmento de metila (M = 15). Com base nessas informações e de acordo com a literatura, o pico de  $m/z = 293$  sugere a presença

do terpenoide 1,2-dideidrotanshinona IIA (ZHU et al., 2007). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 10.

Figura 10 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (5).

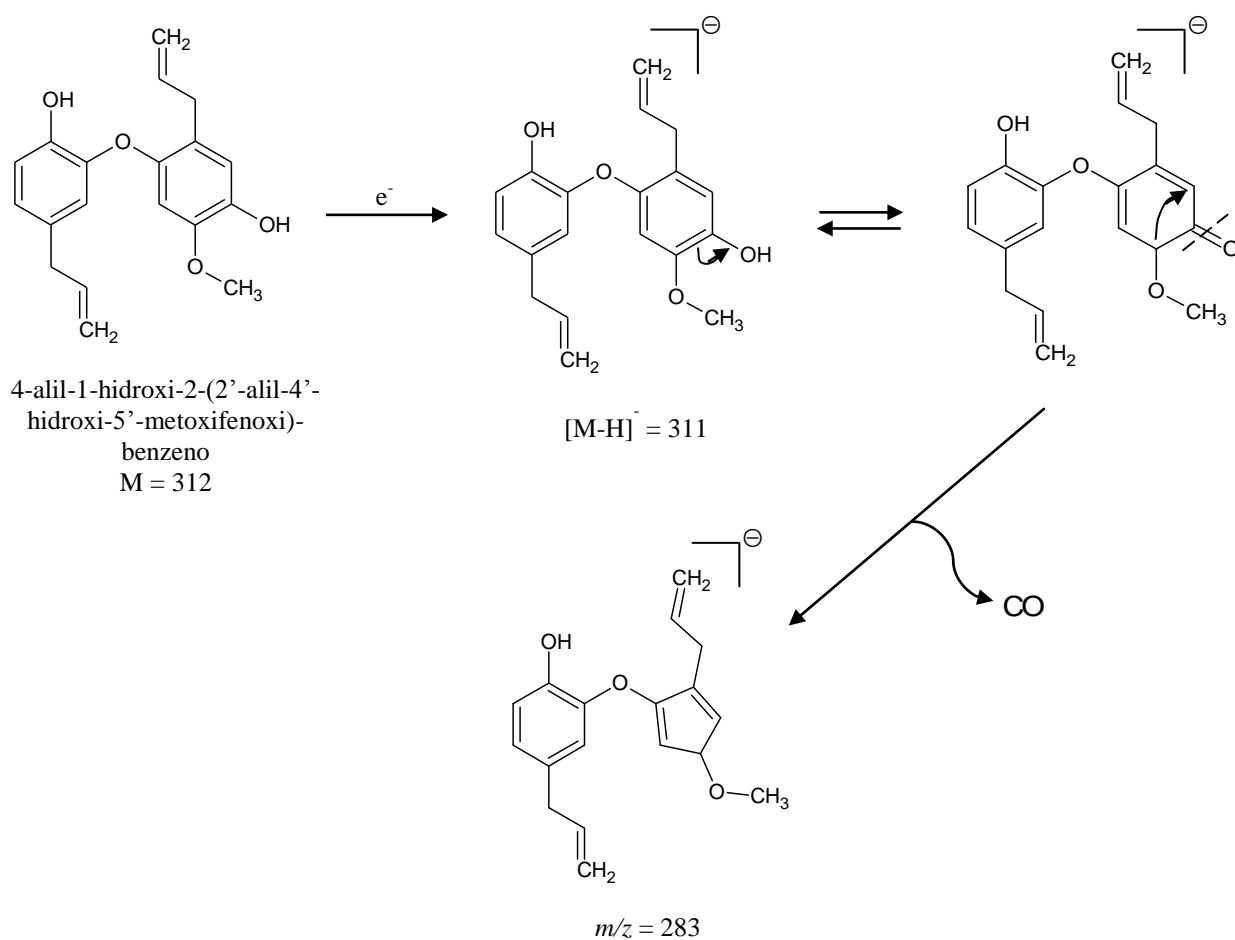


Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (7) (Apêndice, Fig. IV) mostrou o pico-base da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  em  $m/z = 311$ . Além disso, mostrou um pico em  $m/z = 283$ , que

corresponde à perda de um fragmento de carbonila ( $M = 28$ ) e consequente quebra do anel aromático. Com base nessas informações e de acordo com a literatura, sugere-se que o pico de  $m/z = 311$  corresponda ao composto fenólico 4-alil-1-hidroxi-2-(2'-alil-4'-hidroxi-5'-metoxifenoxi)-benzeno (KATO et al., 2013). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 11.

Figura 11 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (7).



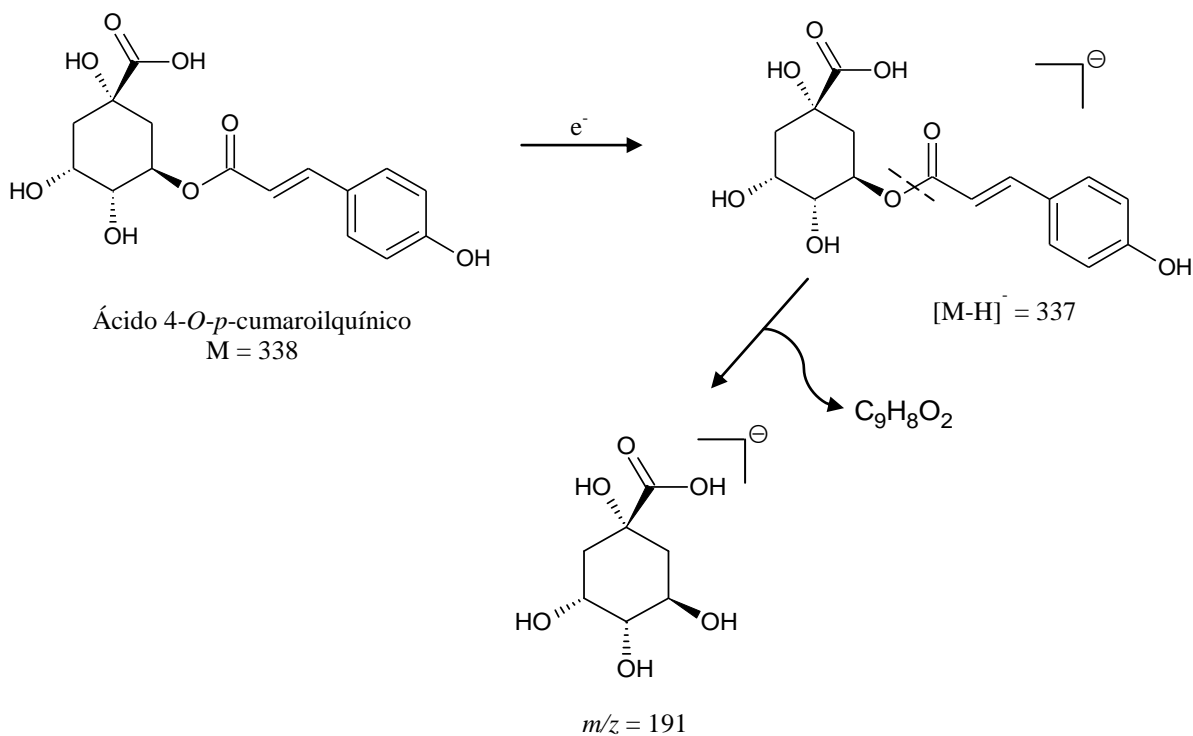
Fonte: Do autor.

O espectro  $MS^2$  do composto (8) (Apêndice, Fig. V) mostrou o pico-base da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  em  $m/z = 337$ . Além disso, mostrou um pico em  $m/z = 191$ , correspondente à perda de um fragmento de 4-*O-p*-cumaroil ( $M = 146$ ). Os demais picos obtidos foram de  $m/z = 173$ ,  $m/z = 127$  e  $m/z = 111$ , cujas fragmentações obtidas são semelhantes às do composto (2) (Fig. 9, p. 87). Com base nessas informações e de acordo com a literatura, sugere-se que o pico de  $m/z = 337$  corresponda ao composto ácido 4-*O-p*-



cumaroilquínico (BARROS et al., 2012). O mecanismo de fragmentação proposto para o pico de  $m/z = 191$  está elucidado na Figura 12.

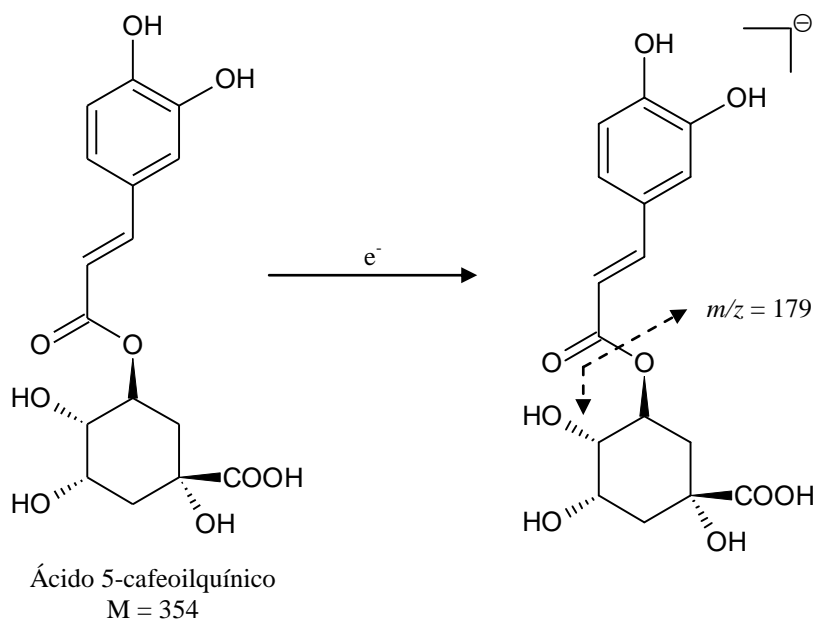
Figura 12 – Mecanismo de fragmentação proposto para o pico de  $m/z = 191$  do composto (8).



Fonte: Do autor.

O espectro  $MS^2$  do composto (9) (Apêndice, Fig. VI) mostrou o pico-base da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  em  $m/z = 353$ . Além disso, mostrou um pico em  $m/z = 179$ , correspondente à perda de um fragmento de ácido glicurônico (M = 174). Com base nessas informações e de acordo com a literatura, sugere-se que o composto de  $m/z = 353$  seja um ácido fenólico esterificado com uma molécula de ácido glicurônico, denominado de ácido 5-cafeoilquínico (AZUMA et al., 1999). O mecanismo de fragmentação proposto para o pico de  $m/z = 353$  está elucidado na Figura 13.

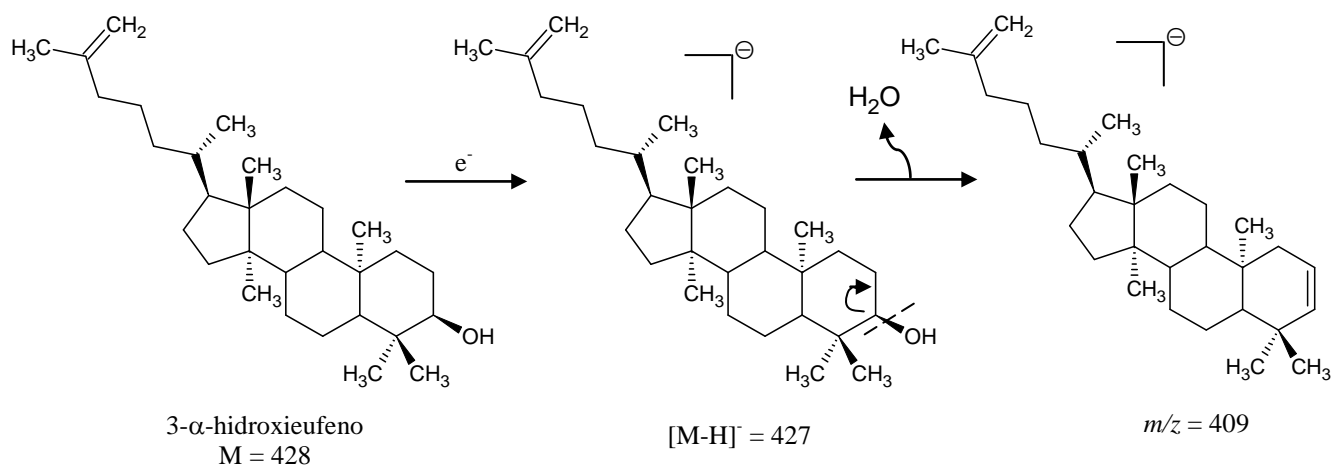
Figura 13 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (9).



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (10) (Apêndice, Fig. VII) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 427$ . Além disso, mostrou um pico também em  $m/z = 409$ , correspondente à perda de uma molécula de água (M = 18). Com base nessas informações e de acordo com a literatura, sugere-se a presença do terpenoide 3- $\alpha$ -hidroxieufeno (MISHRA; SHUKLA; KUMAR, 2000). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 14.

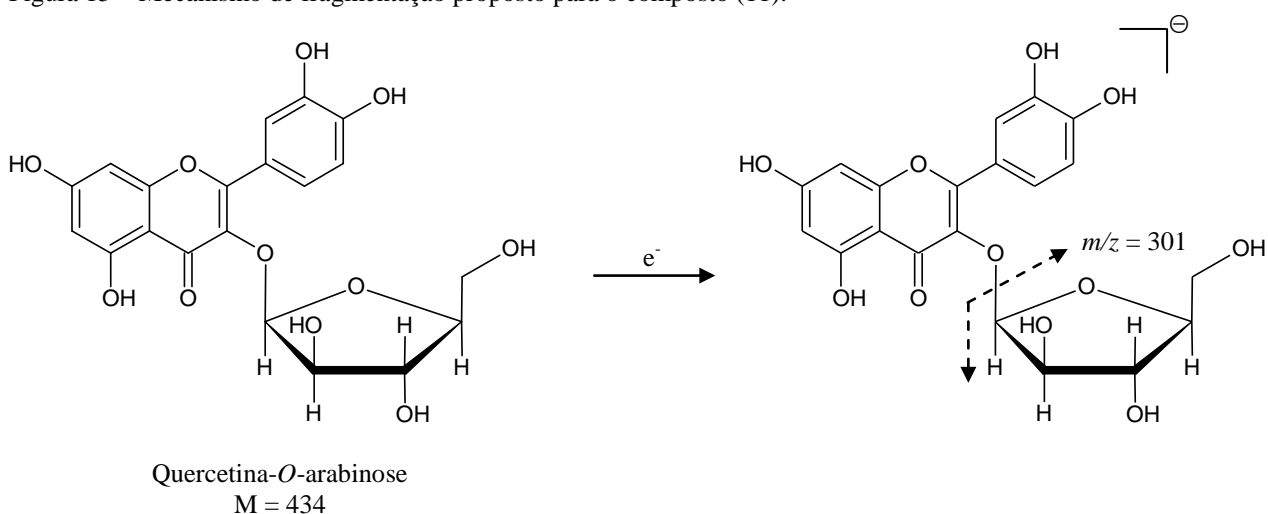
Figura 14 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (10).



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (11) (Apêndice, Fig. VIII) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 433$ . Também mostrou um pico em  $m/z = 301$ , correspondente à perda de um fragmento de massa 132, ou seja, um açúcar do tipo pentose. O pico de  $m/z = 301$  corresponde à aglicona da quercetina. Com base nessas informações e de acordo com a literatura, o pico de  $m/z = 433$  sugere a presença do flavonoide quercetina-*O*-arabinose (CHARROUF et al., 2007). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 15.

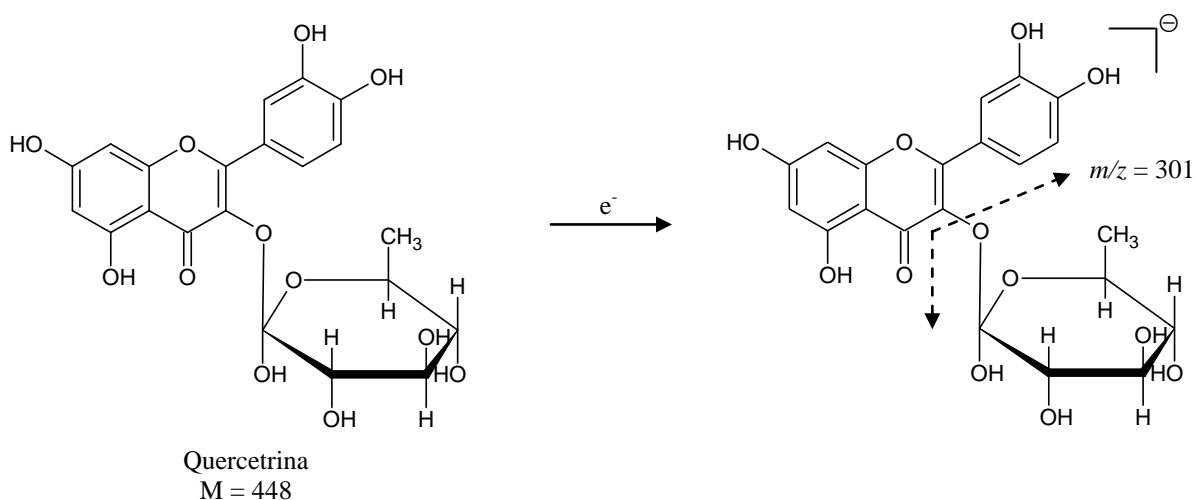
Figura 15 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (11).



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (12) (Apêndice, Fig. IX) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 447$ . Também mostrou um pico em  $m/z = 301$ , correspondente à perda de um fragmento de massa 146, ou seja, uma 6-desoxihexose. Com base nessas informações e de acordo com a literatura, o pico de  $m/z = 433$  sugere a presença do flavonoide quercetina-6-desoxihexose, também conhecido como quercetrina (FERREIRA et al., 2014). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 16.

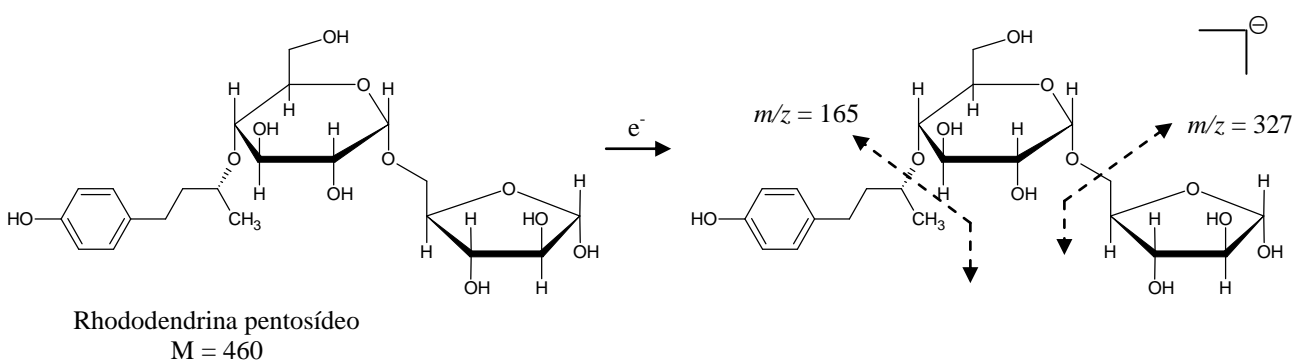
Figura 16 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (12).



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (13) (Apêndice, Fig. X) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 459$ . Mostrou também um pico em  $m/z = 327$ , correspondente à perda de um fragmento de massa 132 (arabinose). De acordo com a literatura, o pico em  $m/z = 327$  corresponde ao composto denominado de betulosídeo ou rhododendrina. Ainda observou-se um pico em  $m/z = 165$ , correspondente à perda de um fragmento de massa 162 (hexose). Portanto, sugere-se que a molécula em  $m/z = 459$  corresponda a um pentosídeo de rhododendrina (MÄMMELÄ, 2001). O mecanismo de fragmentação proposto está descrito na Figura 17.

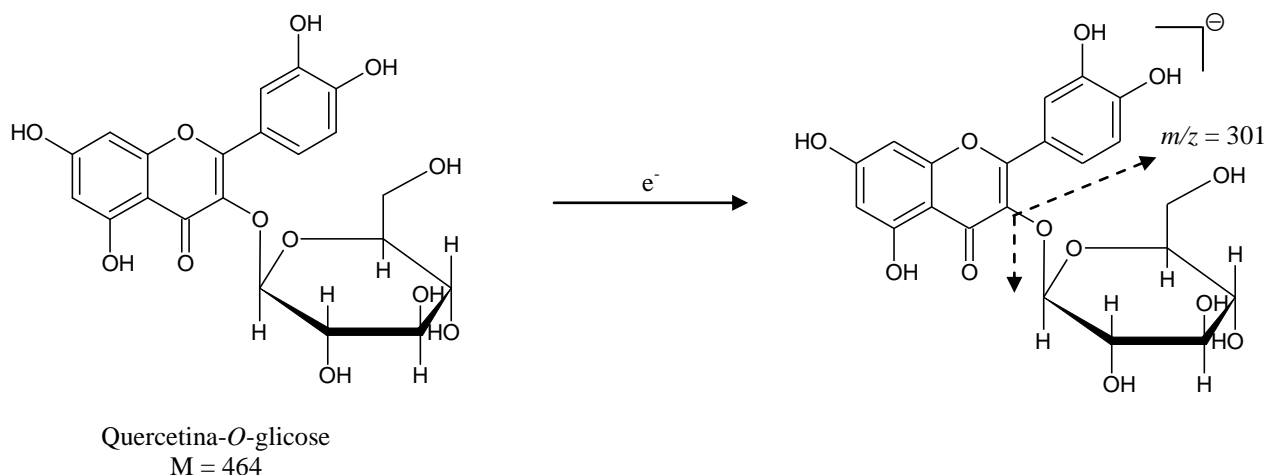
Figura 17 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto 13.



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (14) (Apêndice, Fig. XI) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 463$ . Também mostrou um pico em  $m/z = 301$ , correspondente à perda de um fragmento de massa 162, ou seja, uma molécula de hexose. Com base nessas informações e de acordo com a literatura, o pico de  $m/z = 463$  sugere a presença do flavonoide quercetina-*O*-glicose (FERREIRA et al., 2014). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 18.

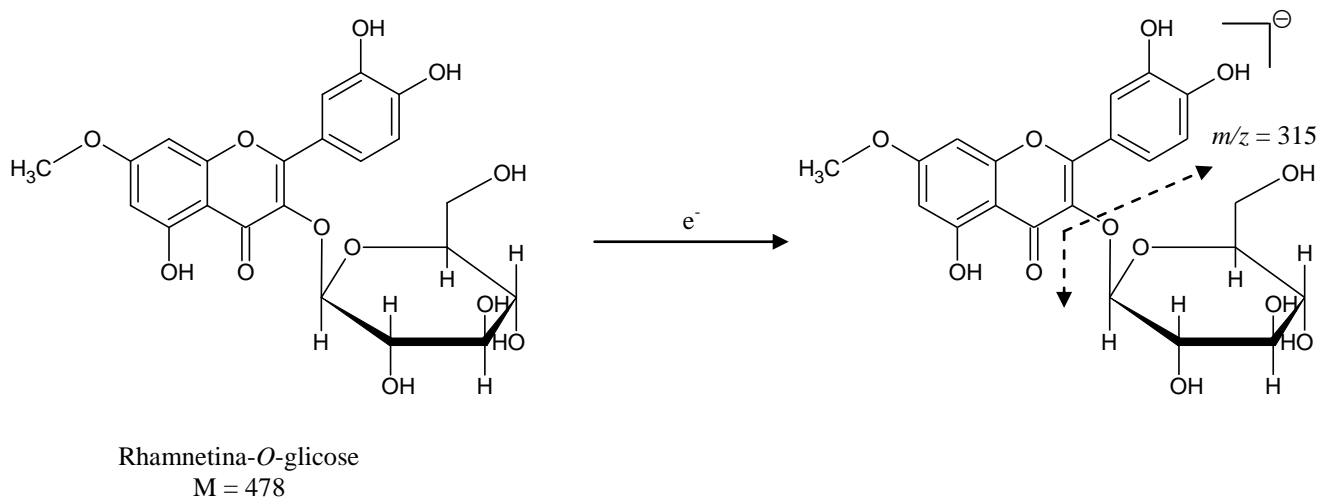
Figura 18 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto 14.



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (15) (Apêndice, Fig. XII) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 477$ . Também mostrou um pico em  $m/z = 315$ , correspondente à perda de um fragmento de massa 162, ou seja, uma molécula de hexose. O pico de  $m/z = 315$  corresponde à aglicona da rhamnetina. Com base nessas informações e de acordo com a literatura, o pico de  $m/z = 477$  sugere a presença do flavonoide rhamnetina-*O*-glicose (ENGELS et al., 2012). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 19.

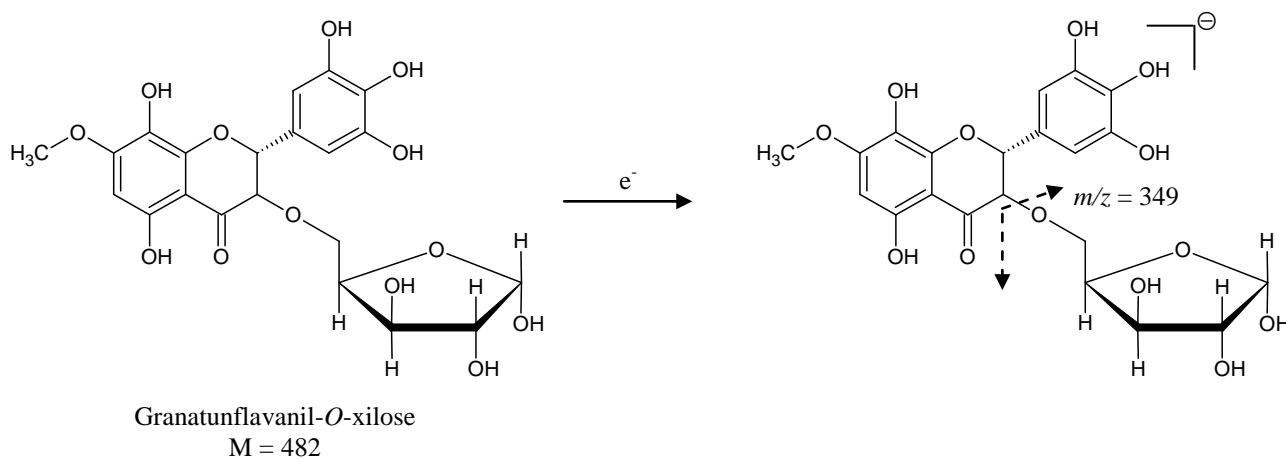
Figura 19 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto 15.



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (16) (Apêndice, Fig. XIII) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 481$ . Também mostrou um pico em  $m/z = 349$ , correspondente à perda de um fragmento de massa 132, ou seja, um açúcar do tipo pentose. O pico de  $m/z = 349$  corresponde à aglicona do flavonoide granatunflavanil. Com base nessas informações e de acordo com a literatura, o pico de  $m/z = 481$  sugere a presença do flavonoide granatunflavanil-*O*-xilose (BAGRI et al., 2010). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 20.

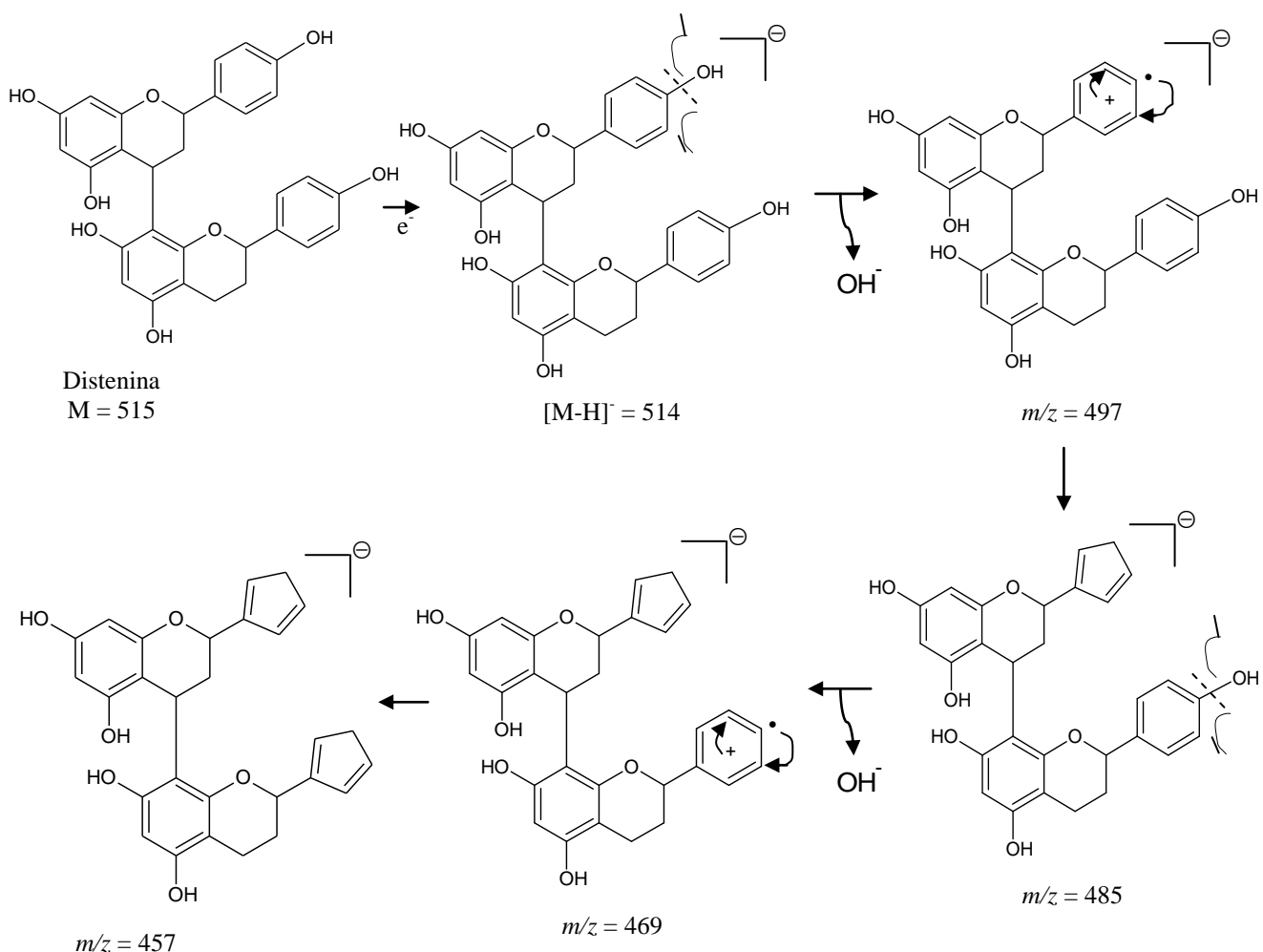
Figura 20 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto 16.



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (17) (Apêndice, Fig. XIV) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 514$ . Notou-se, também, a presença de picos em  $m/z = 497$ , correspondente à perda de um radical hidroxila (M = 16);  $m/z = 485$ , correspondente ao íon formado pela quebra do anel aromático do composto de  $m/z = 497$ ;  $m/z = 469$ , correspondente à perda de mais um radical hidroxila; e  $m/z = 457$ , correspondente ao íon formado pela quebra do anel aromático do composto de  $m/z = 469$ . Com base nessas informações e de acordo com a literatura, sugere-se que o pico de  $m/z = 514$  corresponda ao tanino condensado conhecido como distenina (HORI et al., 1998). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 21.

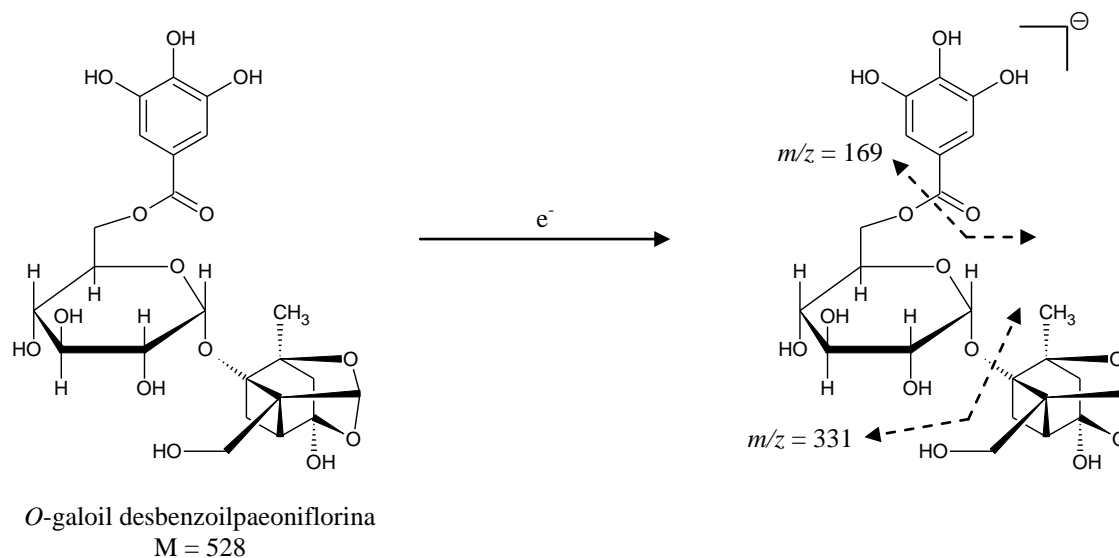
Figura 21 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto 17.



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (18) (Apêndice, Fig. XV) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 527$ . Além disso, mostrou um pico em  $m/z = 331$ , correspondente à perda de um fragmento de massa 196, que, segundo a literatura, corresponde a um núcleo monoterpênico do tipo pinano interligado; e um pico de grande intensidade em  $m/z = 169$ , devido à perda de um fragmento de hexose. O pico em  $m/z = 169$  corresponde à molécula de ácido gálico. Com base nessas informações e de acordo com a literatura, sugere-se que a molécula de  $m/z = 527$  seja o composto fenólico *O*-galoil desbenzoilpaeoniflorina (CAO et al., 2014). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 22.

Figura 22 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (18).

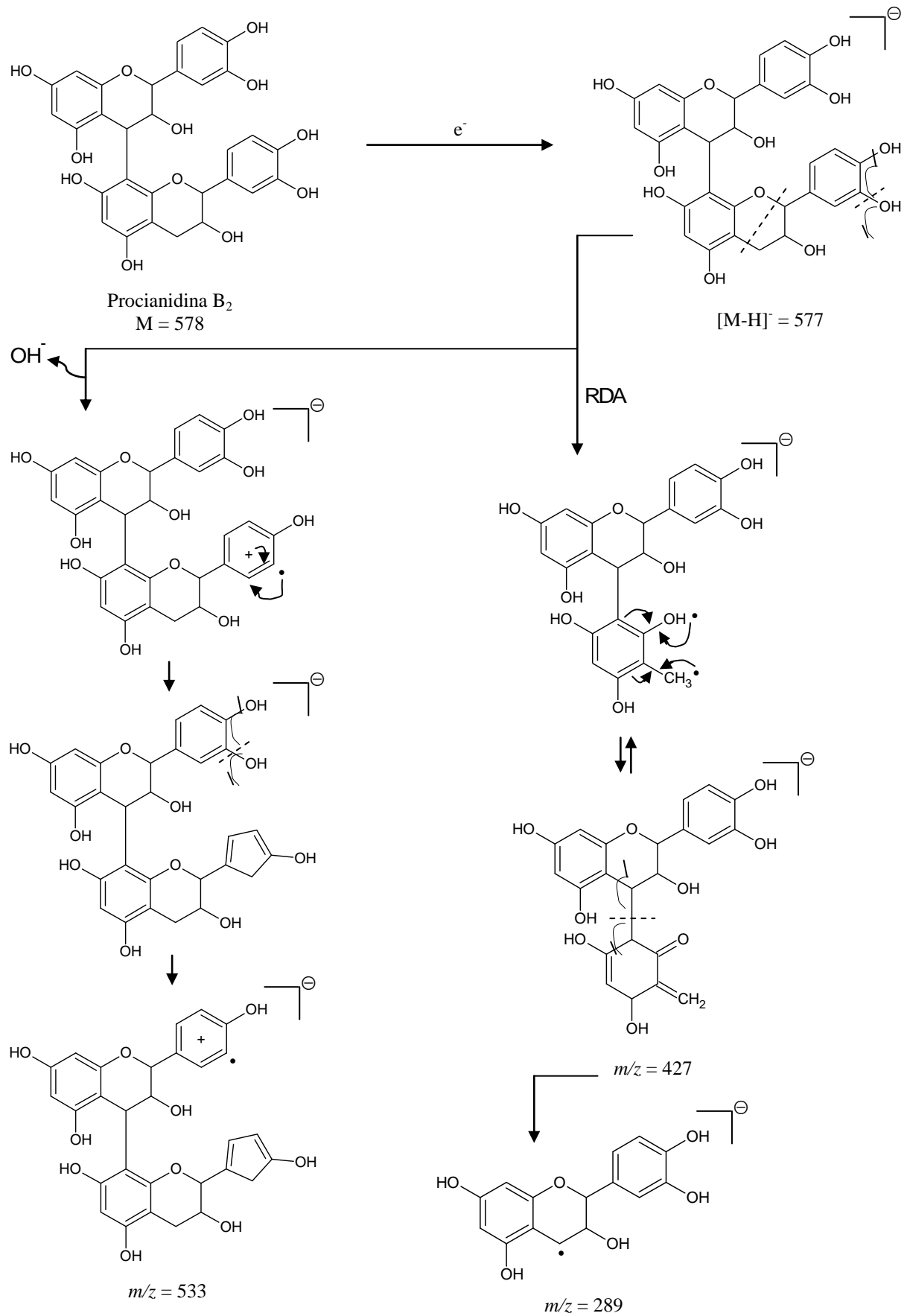


Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (19) (Apêndice, Fig. XVI) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 577$ . Notou-se, também, a presença de um pico de baixa intensidade em  $m/z = 533$ , devido à perda de dois radicais hidroxila e consequente quebra de um dos anéis aromáticos. O pico obtido em  $m/z = 427$  foi devido à formação do dienófilo, a partir da quebra de um dos anéis insaturados da molécula, pelo mecanismo da reação conhecida como retro-Diels-Alder. Por fim, o pico em  $m/z = 289$  foi devido à quebra da ligação carbono-carbono entre as unidades de flavan-3-ol, correspondente à molécula de catequina. Com base nessas informações e de acordo com a literatura, o pico em  $m/z = 577$  sugere a presença do tanino condensado procianidina B<sub>2</sub> (POUPARD et al., 2011). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 23.



Figura 23 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (19).

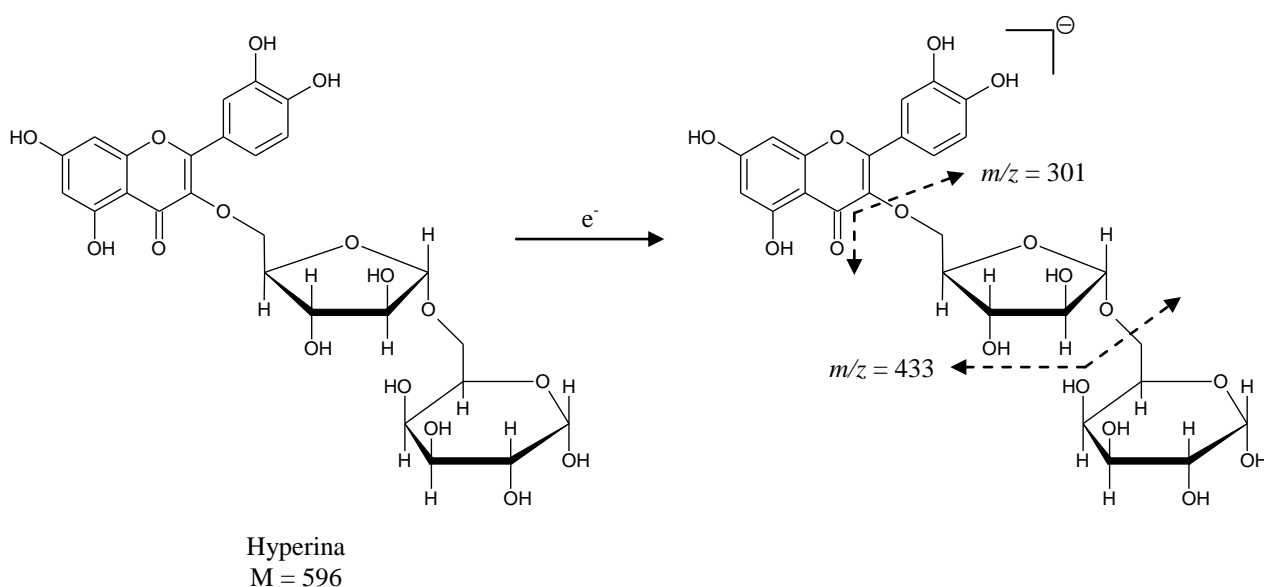


Fonte: Do autor.

Legenda: RDA – retro-Diels-Alder.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (20) (Apêndice, Fig. XVII) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 595$ . Observou-se, também, um pico em  $m/z = 433$ , devido à perda de um açúcar de massa 162, ou seja, uma hexose; e um pico em  $m/z = 301$ , sugestivo da aglicona da quercetina, formado após a perda de um açúcar de massa 132 (pentose). Com base nessas informações e de acordo com a literatura, o pico de  $m/z = 595$  sugere a presença do flavonoide hyperina (SANTOS; SCHRIPEMA; KUSTER, 2005). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 24.

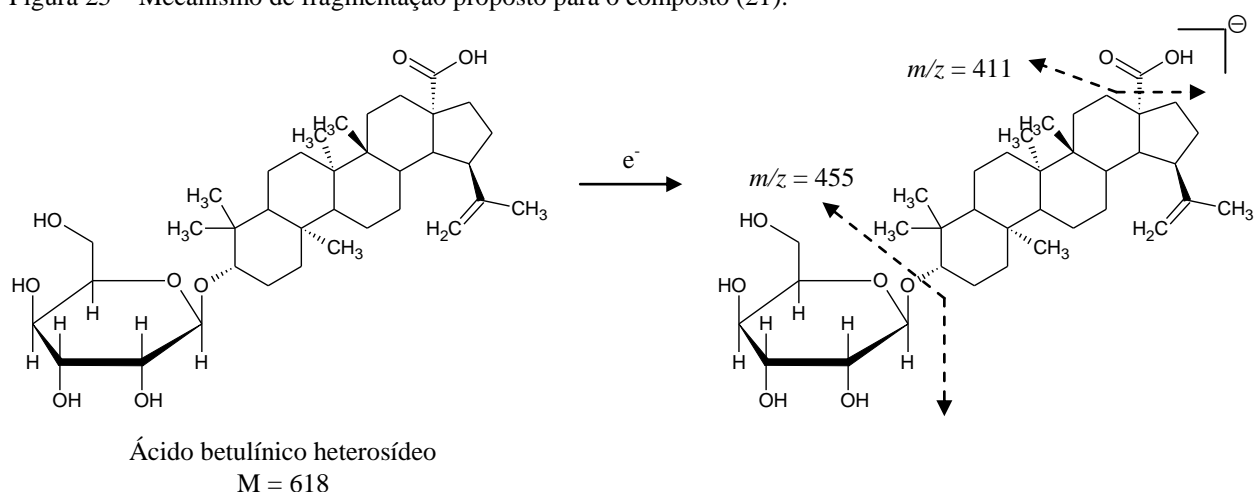
Figura 24 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (20).



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (21) (Apêndice, Fig. XVIII) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 617$ . Mostrou também um pico em  $m/z = 455$ , devido à perda de um açúcar de massa 162 (hexose), correspondente à aglicona do ácido betulínico; e um pico em  $m/z = 411$ , correspondente à perda de um fragmento de massa 44 (carboxila). Com base nesses dados e de acordo com a literatura, sugere-se que o pico de  $m/z = 455$  corresponda a um heterosídeo do ácido betulínico (VIEIRA et al., 2004). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 25.

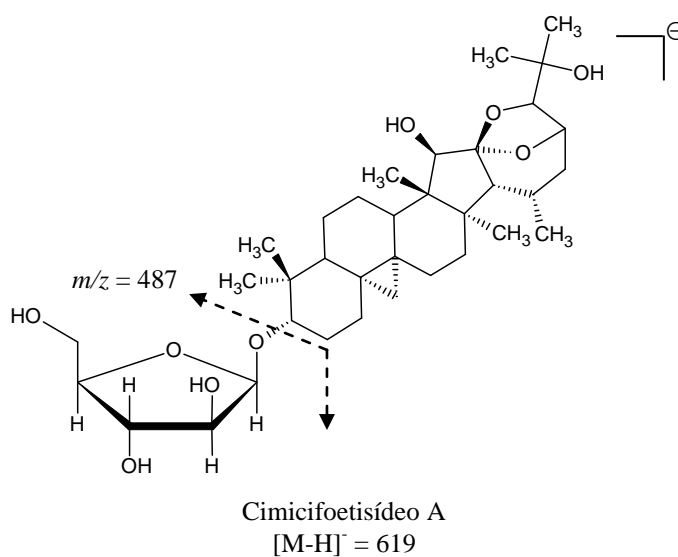
Figura 25 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (21).



Fonte: Do autor.

O espectro  $MS^2$  do composto (22) (Apêndice, Fig. XIX) mostrou o pico-base da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  em  $m/z = 619$ . Além disso, mostrou um pico em  $m/z = 487$ , correspondente à perda de um açúcar do tipo pentose ( $M = 132$ ). Com base nesses dados e de acordo com a literatura, o pico de  $m/z = 619$  sugere a presença da saponina cimicifoetisídeo A (SUN et al., 2007). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 26.

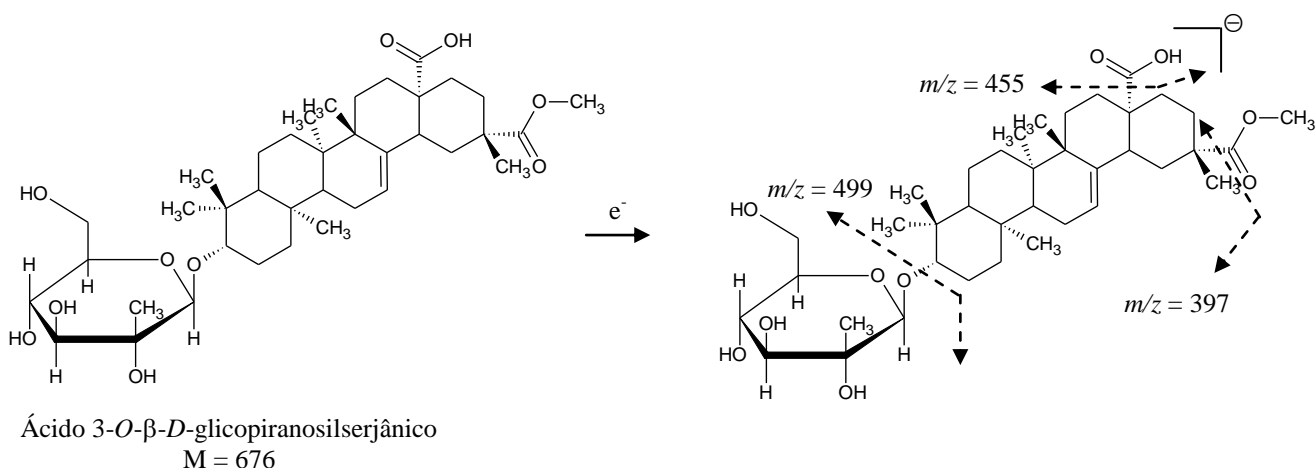
Figura 26 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (22).



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (23) (Apêndice, Fig. XX) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 675$ . Observou-se, também, a presença de picos de  $m/z = 499$ , correspondente à perda de um açúcar de massa igual a 146 (6-desoxihexose);  $m/z = 455$ , correspondente à perda de um fragmento de massa 44 (carboxila); e  $m/z = 397$ , correspondente à perda de um fragmento de massa 58. Com base nessas informações e nos dados da literatura, sugere-se a presença da saponina denominada de ácido 3-*O*-β-*D*-glicopiranosilserjânico (JAYASINGHE; WANNIGAMA; MACLEOD, 1998). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 27.

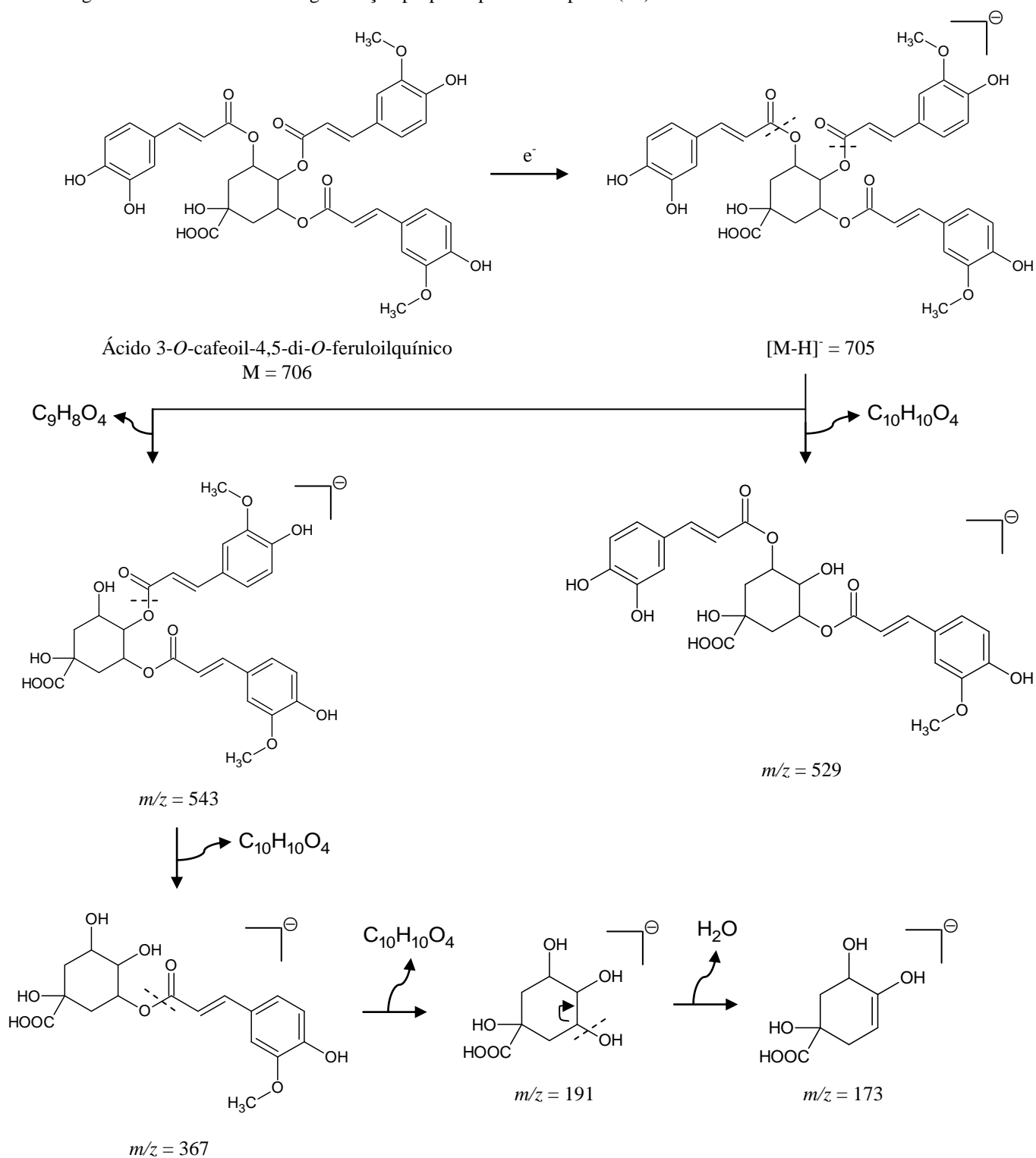
Figura 27 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (23).



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (24) (Apêndice, Fig. XXI) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 705$ . Além disso, mostrou picos em  $m/z = 543$ , correspondente à perda de um fragmento de massa 162 (grupo feruloil);  $m/z = 529$ , correspondente à perda de um fragmento de massa 176 (grupo cafeoil);  $m/z = 367$ , correspondente à perda de um grupo feruloil e um grupo cafeoil;  $m/z = 191$ , correspondente à perda de mais um grupo cafeoil; e  $m/z = 173$ , correspondente à perda de uma molécula de água (M = 18). Com base nesses dados e de acordo com a literatura, sugere-se a presença do composto fenólico ácido 3-*O*-cafeoil-4,5-di-*O*-feruloilquínico (JAISWAL; KUHNERT, 2010). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 28.

Figura 28 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (24).

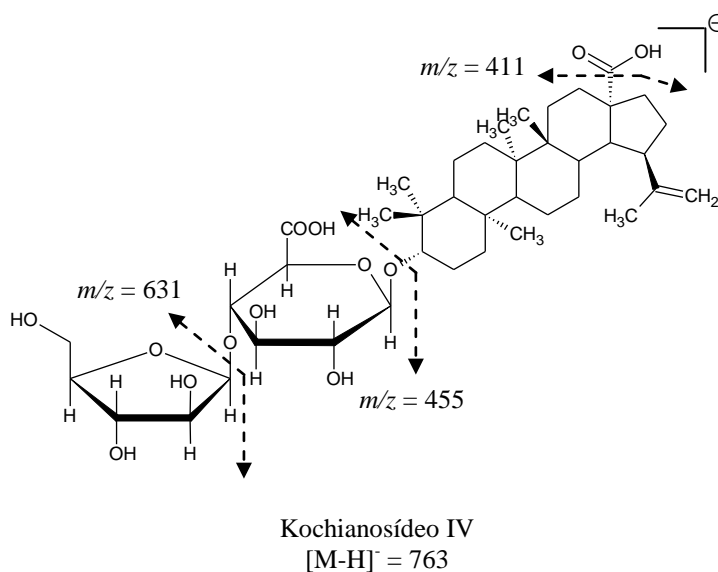


Fonte: Do autor.

O espectro  $MS^2$  do composto (25) (Apêndice, Fig. XXII) mostrou o pico-base da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  em  $m/z = 763$ . Além disso, mostrou picos em  $m/z = 631$ ,

devido à perda de um açúcar de massa 132 (pentose);  $m/z = 455$ , devido à perda de um fragmento de massa 176 (ácido glicurônico); e  $m/z = 411$ , devido à perda de um fragmento de massa 44 (carboxila). Somando-se estas informações e de acordo com a literatura, sugere-se que o pico de  $m/z = 763$  corresponda à saponina denominada de kochianosídeo IV (YOSHIKAWA et al., 1997). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 29.

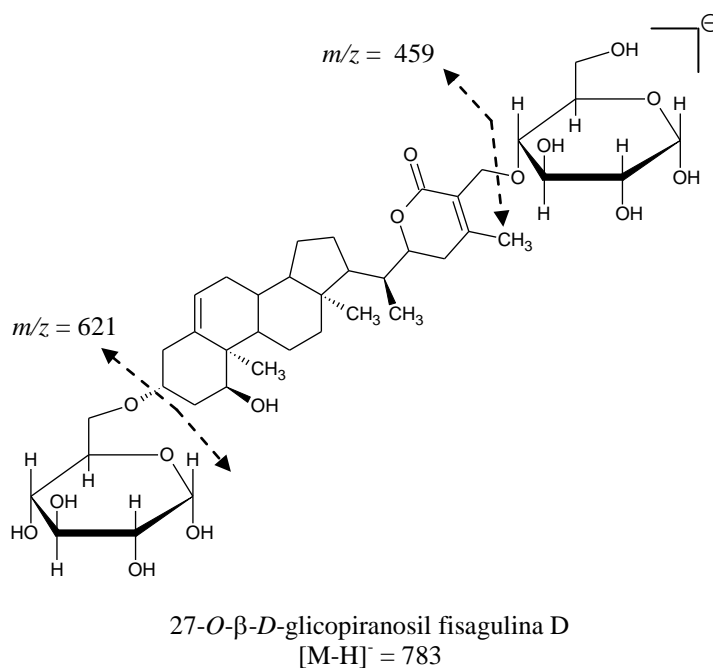
Figura 29 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (25).



Fonte: Do autor.

O espectro  $MS^2$  do composto (26) (Anexo, Fig. XXIII) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H] em  $m/z = 783$ . Além disso, mostrou picos em  $m/z = 621$ , correspondente à perda de uma molécula de hexose ( $M = 162$ ), e em  $m/z = 459$ , devido à perda de outro fragmento de hexose. Com base nessas informações e de acordo com a literatura, o pico em  $m/z = 783$  sugere a presença da saponina 27-O- $\beta$ -D-glicopiranosil fisagulina D (JAYAPRAKASAM; NAIR, 2003). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 30.

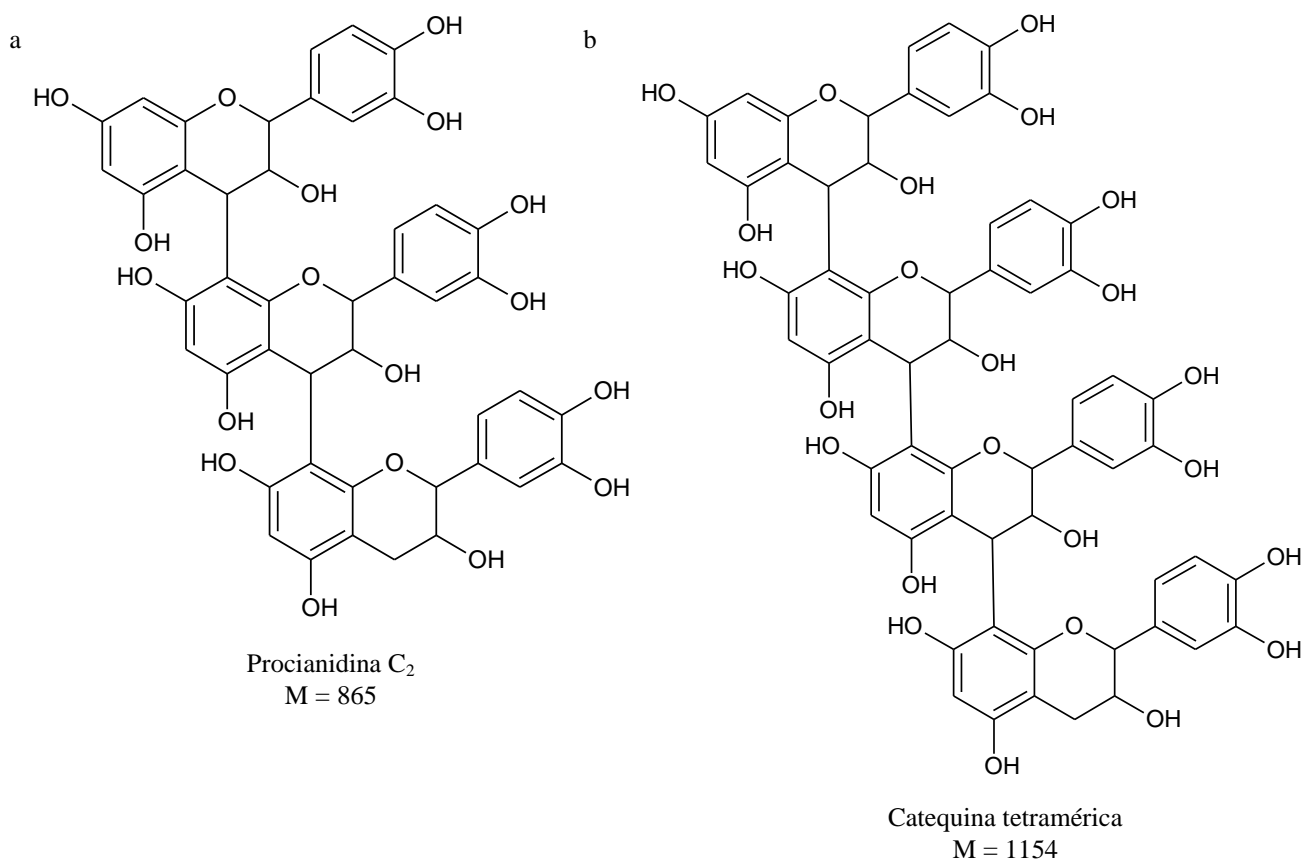
Figura 30 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (26).



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (27) (Apêndice, Fig. XXIV) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 865$ . Além disso, mostrou picos em  $m/z = 837$ , devido à perda de um radical hidroxila ( $M = 16$ ) e consequente rearranjo conformacional de um dos anéis aromáticos;  $m/z = 809$  e  $m/z = 781$ , devido ao mesmo mecanismo descrito anteriormente;  $m/z = 659$ , devido à formação de um dienófilo pelo mecanismo de retro-Diels-Alder;  $m/z = 521$ , devido à perda de um fragmento de massa 138;  $m/z = 399$ , devido à formação de outro dienófilo;  $m/z = 261$ , devido à perda de outro fragmento de massa 138; e, por último, um pico em  $m/z = 139$ , devido à formação do terceiro dienófilo. O espectro MS<sup>2</sup> do composto (33) (Anexo, Fig. XXX) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 1154$ . Os picos obtidos nos valores de  $m/z = 1126$ , 1098, 1069, 1041, 919, 781, 659, 521, 399, 261 e 139 apresentaram mecanismos de fragmentação semelhantes aos descritos para o composto (27). Com base nessas informações e de acordo com a literatura, sugere-se que os picos em  $m/z = 865$  e em  $m/z = 1154$  correspondam aos compostos procianidina C<sub>2</sub> e catequina tetramérica, respectivamente (HAMMERSTONE et al., 1999). As estruturas destes dois compostos estão elucidadas na Figura 31.

Figura 31 – Estruturas químicas dos compostos (27) e (33).



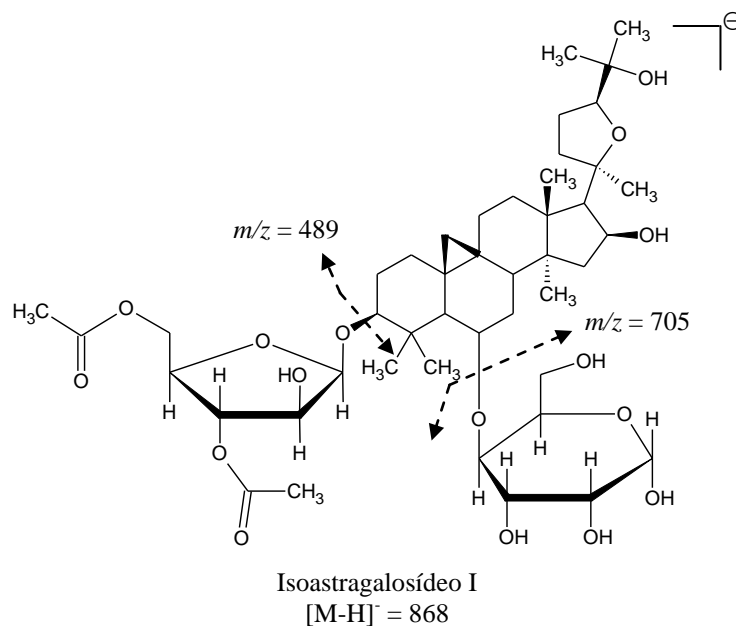
Fonte: Do autor.

Legenda: a – composto (27); b – composto (33)

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (28) (Apêndice, Fig. XXV) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 868$ . Além disso, mostrou picos em  $m/z = 705$ , devido à perda de um açúcar de massa 162 (hexose), e em  $m/z = 489$ , devido à perda de um fragmento de massa 216, correspondente a um açúcar di-esterificado do tipo pentose. Com base nessas informações e de acordo com a literatura, sugere-se que o pico de  $m/z = 868$  corresponda à saponina denominada de isoastragalosídeo I (ZHANG et al., 2007). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 32.



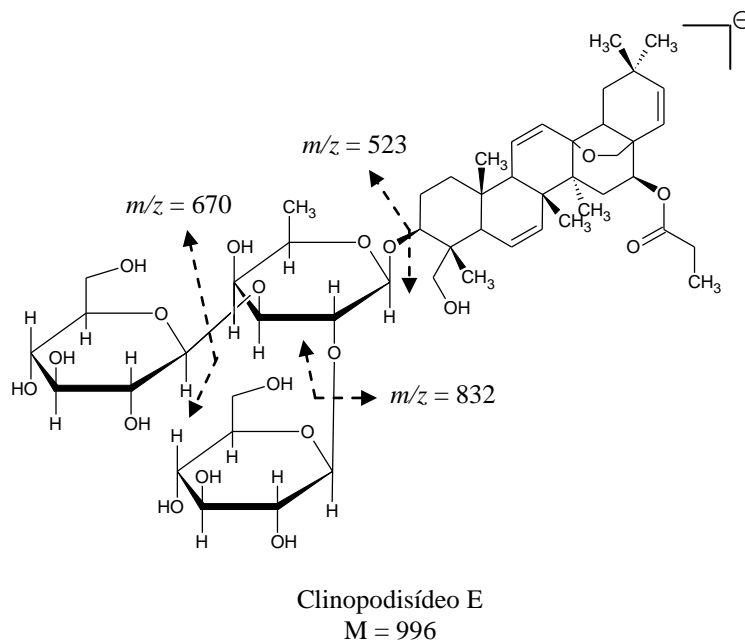
Figura 32 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (28).



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (29) (Apêndice, Fig. XXVI) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 995$ . Além disso, mostrou picos em  $m/z = 832$ , devido à perda de um açúcar do tipo hexose ( $M = 162$ );  $m/z = 670$ , devido à perda de outro açúcar do tipo hexose; e  $m/z = 523$ , devido à perda de um açúcar do tipo desoxi-hexose ( $M = 146$ ). Somando-se estas informações e de acordo com a literatura, sugere-se que o pico de  $m/z = 995$  corresponda à saponina denominada de clinopodisídeo E (LIU; LI; OWEN, 1995). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 33.

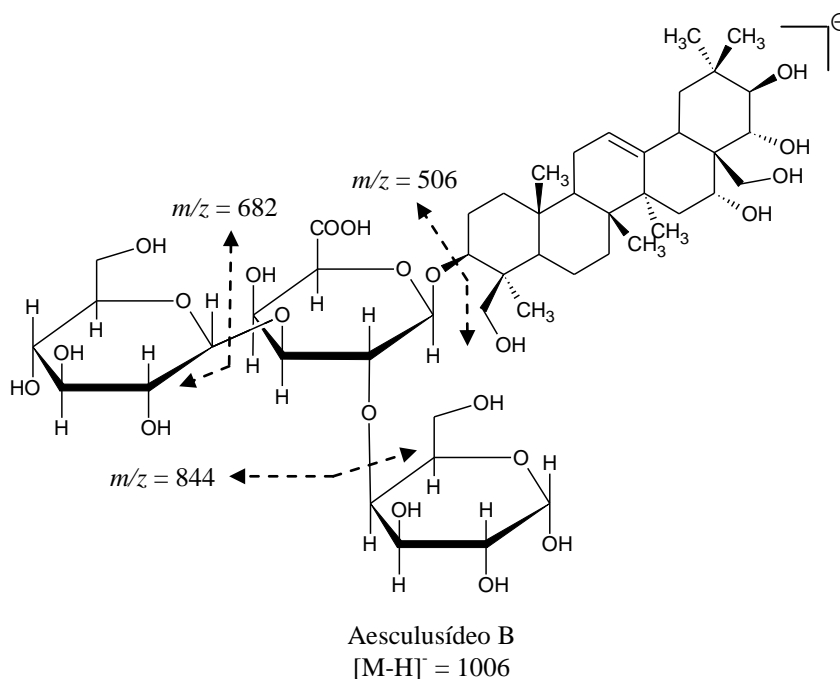
Figura 33 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (29).



Fonte: Do autor.

O espectro  $MS^2$  do composto (30) (Apêndice, Fig. XXVII) mostrou o pico-base da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  em  $m/z = 1006$ . Observaram-se, também, picos em  $m/z = 844$ , devido à perda de um açúcar do tipo hexose ( $M = 162$ );  $m/z = 682$ , devido à perda de outro açúcar do tipo hexose; e  $m/z = 506$ , devido à perda de um fragmento de ácido glicurônico ( $M = 176$ ). Com base nesses dados e de acordo com a literatura, sugere-se que o pico de  $m/z = 1006$  corresponda à saponina denominada de aesculusídeo B (ZHAO; YANG; HATTORI, 2001). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 34.

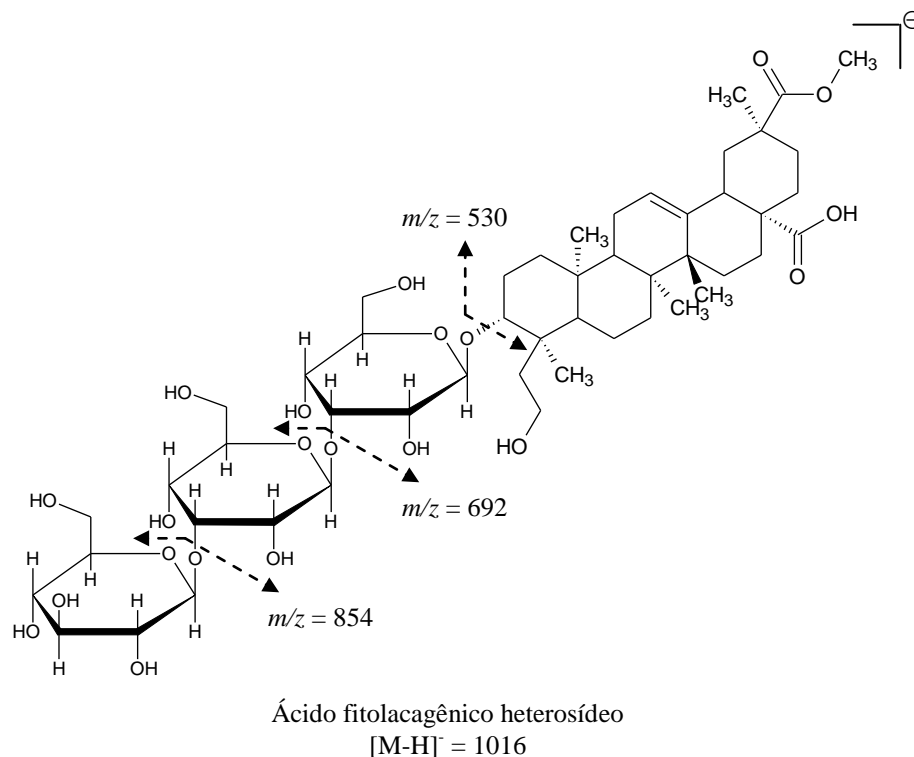
Figura 34 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (30).



Fonte: Do autor.

O espectro MS<sup>2</sup> do composto (31) (Apêndice, Fig. XXVIII) mostrou o pico-base da molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z = 1016$ . Observaram-se, também, picos em  $m/z = 854$ , 692 e 530, correspondentes à perda sequencial de açúcares do tipo hexose ( $M = 162$ ). O pico em  $m/z = 530$  corresponde à aglicona do ácido fitolacagênico. Com base nessas informações e de acordo com a literatura, sugere-se que o pico em  $m/z = 1016$  corresponda a um heterosídeo do ácido fitolacagênico (MADL et al., 2006). O mecanismo de fragmentação proposto está descrito na Figura 35.

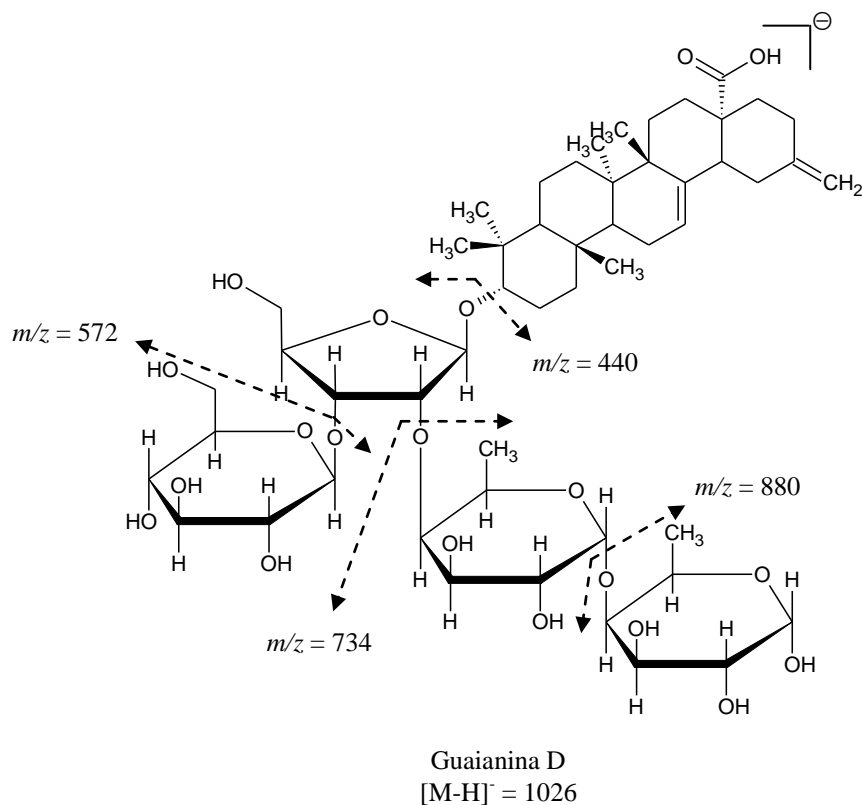
Figura 35 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (31).



Fonte: Do autor.

O espectro  $MS^2$  do composto (32) (Apêndice, Fig. XXIX) mostrou o pico-base da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  em  $m/z = 1026$ . Além disso, mostrou picos em  $m/z = 880$ , devido à perda de um açúcar do tipo desoxi-hexose ( $M = 146$ );  $m/z = 734$ , devido à perda de outra molécula de desoxi-hexose;  $m/z = 572$ , devido à perda de um açúcar do tipo hexose ( $M = 162$ ); e  $m/z = 440$ , devido à perda de um açúcar do tipo pentose ( $M = 132$ ). Com base nesses dados e de acordo com a literatura, sugere-se que o pico de  $m/z = 1026$  corresponda à saponina denominada de guaianina D (ALVES et al., 1996). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 36.

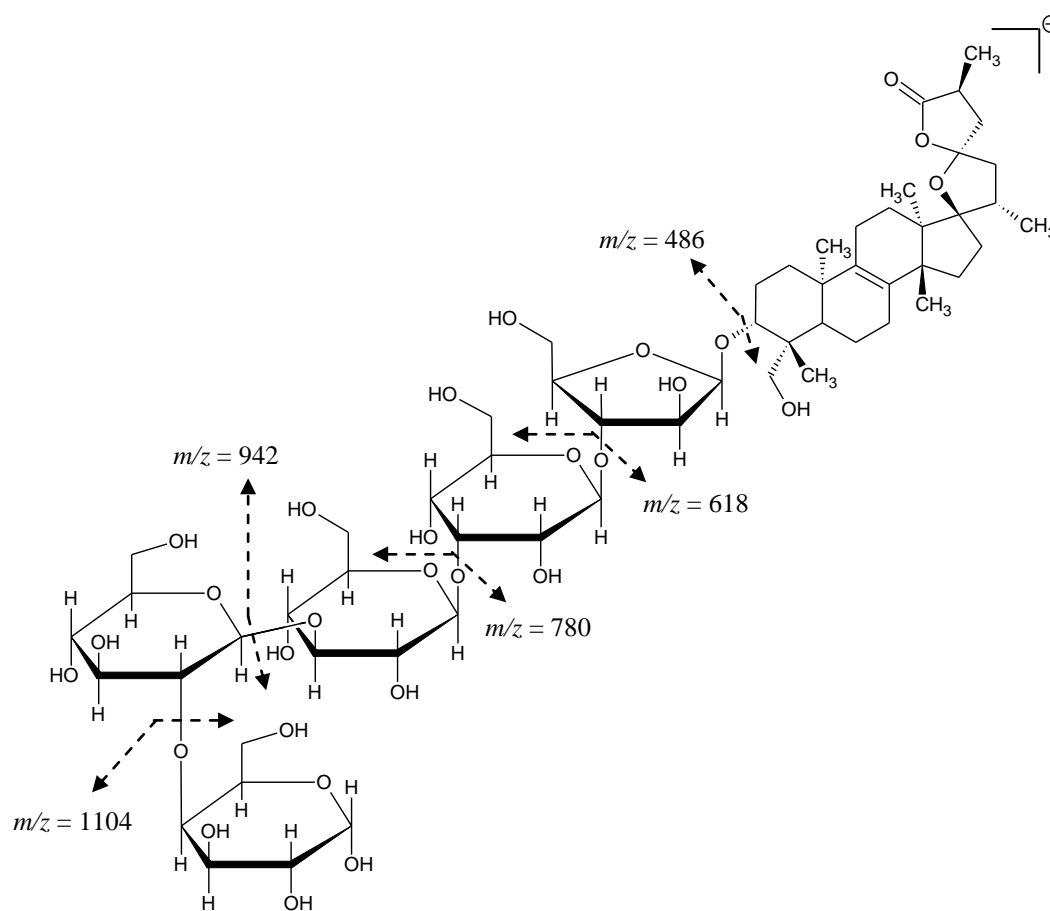
Figura 36 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (32).



Fonte: Do autor.

O espectro  $MS^2$  do composto (34) (Apêndice, Fig. XXXI) mostrou o pico-base da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  em  $m/z = 1266$ . Além disso, mostrou picos em  $m/z = 1104$ , 942, 780 e 618, correspondentes às perdas sequenciais de açúcares do tipo hexose ( $M = 162$ ); e em  $m/z = 486$ , correspondente à perda de um açúcar do tipo pentose ( $M = 132$ ). Somando-se estas informações e de acordo com dados da literatura, sugere-se que o pico de  $m/z = 1266$  corresponda ao composto denominado de scillasaponina B (MIMAKI et al., 2002). O mecanismo de fragmentação proposto está elucidado na Figura 37.

Figura 37 – Mecanismo de fragmentação proposto para o composto (34).



Scillasaponina B  
[M-H]<sup>-</sup> = 1266

Fonte: Do autor.

Ao se comparar o MS em modo *full scan* com a triagem fitoquímica e com os cromatogramas em CCD, pode-se dizer que há concordância entre as classes e moléculas sugeridas, como os flavonoides, os taninos, os ácidos fenólicos, os triterpenoides e as saponinas.

## 5.6 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONOIDES E TANINOS

Considerando todos os dados apresentados na literatura e através dos dados evidenciados nos espectros de massas (MS) obtidos para os extratos de *Eugenia florida* DC, foram realizadas as quantificações dos teores de fenóis totais, flavonoides e taninos, em cada um dos extratos preparados. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Teores de fenóis totais, flavonoides e taninos nos extratos das folhas de *Eugenia florida* DC.

<b>Amostra</b>	<b>Fenóis totais (mg EAG/g extrato)</b>	<b>Flavonoides (mg EQ/g extrato)</b>	<b>Taninos (mg EAT/g extrato)</b>
EB	25,82 ± 0,85 <sup>c</sup>	8,42 ± 1,13 <sup>c</sup>	7,30 ± 1,06 <sup>d</sup>
M-MeOH	20,57 ± 0,43 <sup>c</sup>	7,21 ± 0,97 <sup>c</sup>	3,66 ± 0,33 <sup>c</sup>
M-EtOAc	23,91 ± 0,82 <sup>d</sup>	5,90 ± 1,34 <sup>b</sup>	2,24 ± 0,68 <sup>b</sup>
M-Acet	17,20 ± 0,64 <sup>b</sup>	5,32 ± 1,42 <sup>b</sup>	2,64 ± 0,61 <sup>b</sup>
M-Hex	9,26 ± 1,03 <sup>a</sup>	3,95 ± 1,22 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,32 <sup>a</sup>

Fonte: Do autor.

Legenda: Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Os resultados de cada teste foram analisados separadamente. Médias com letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott e Knott, (1974), sendo  $p < 0,05$ . EB – extrato bruto hidroetanólico 70% v/v; M-MeOH – macerado em metanol; M-EtOAc – macerado em acetato de etila; M-Acet – macerado em acetona; M-Hex – macerado em hexano; EAG – equivalentes em ácido gálico; EQ – equivalentes em quercetina; EAT – equivalentes em ácido tânico.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, observou-se que os extratos EB e M-EtOAc foram os que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos (25,82 ± 0,85 e 23,91 ± 0,82 mg EAG/g, respectivamente), seguidos pelo M-MeOH (20,57 ± 0,43 mg EAG/g) e M-Acet (17,20 ± 0,64 mg EAG/g). O macerado em hexano, M-Hex, foi o que apresentou o menor teor de fenóis totais, equivalente a 9,2 ± 1,0 mg EAG/g.

Em relação ao teor de flavonoides, os extratos EB e M-MeOH apresentaram concentrações bastante próximas entre si, com valores equivalentes a 8,42 ± 1,13 e 7,21 ± 0,9 mg EQ/g, respectivamente, assim como os extratos M-EtOAc e M-Acet, cujas concentrações foram um pouco menores, equivalentes a 5,90 ± 1,32 e 5,32 ± 1,4 mg EQ/g, respectivamente.

O M-Hex foi, da mesma forma como para polifenóis totais, o que apresentou a menor concentração, dada por  $3,95 \pm 1,22$  mg EQ/g.

Na determinação do teor de taninos, o EB foi novamente o que apresentou a maior concentração ( $7,30 \pm 1,06$  mg EAT/g), seguido por M-MeOH ( $3,66 \pm 0,33$  mg EAT/g), M-Acet ( $2,64 \pm 0,61$  mg EAT/g), M-EtOAc ( $2,24 \pm 0,68$  mg EAT/g) e, por último, M-Hex ( $0,72 \pm 0,32$  mg EAT/g).

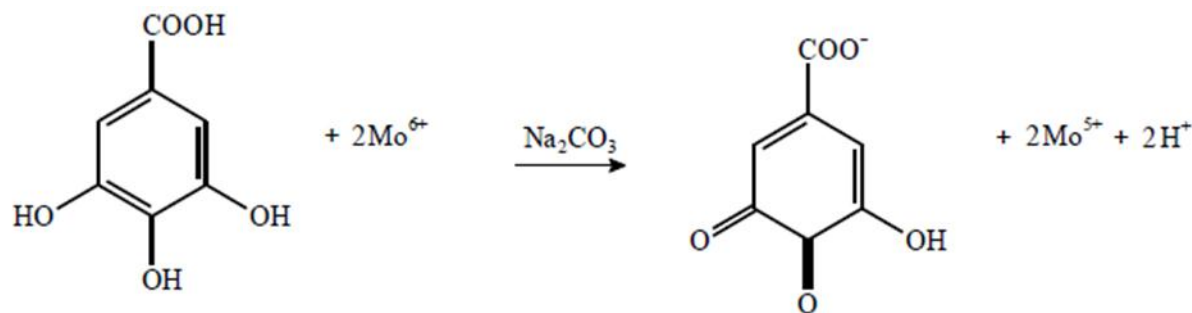
Os compostos fenólicos são largamente distribuídos nas plantas e têm várias atividades biológicas comprovadas, destacando-se a prevenção e tratamento de muitas doenças, como diabetes, estresse oxidativo, infecções microbianas e leishmaniose, dentre outras (FANG et al., 2015).

Trata-se de um grupo quimicamente heterogêneo, em que a maioria dos compostos é solúvel em solventes polares, como água e etanol, porém muitos deles solubilizam-se apenas em solventes orgânicos de média polaridade, como o acetato de etila. De acordo com os resultados, pode-se justificar, desta forma, a maior concentração desses compostos nos extratos EB e M-EtOAc, já que a eficiência do processo extrativo desses compostos, usando os dois solventes relacionados, foi relativamente maior (SIMÕES et al., 2010).

A quantificação espectrofotométrica de substâncias fenólicas é realizada por várias técnicas, entretanto a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu é uma das mais utilizadas. Este reagente consiste da mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstênico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação VI, com coloração amarela. Na presença de compostos fenólicos e solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), ocorre uma reação ácido-base e formam-se os ânions fenolatos; estes, na presença do reagente de Folin-Ciocalteu, geram complexos de molibdênio e tungstênio, de coloração azul, cuja intensidade de cor determina um valor de absorvância específico, conforme a Figura 38 (OLIVEIRA et al., 2009).



Figura 38 – Reação do ácido gálico com o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al., 2009.

Vale ressaltar que, apesar do método de Folin-Ciocalteu ser muito utilizado para estimar conteúdo de compostos fenólicos em diversos extratos vegetais, ele é capaz de interagir também com compostos não fenólicos, como açúcares e metais, podendo resultar em valores superestimados de fenóis totais. Sendo assim, alguns autores sugerem que os resultados obtidos por meio desta metodologia devem ser interpretados como uma estimativa da capacidade redutora total das amostras analisadas (IKAWA et al., 2003).

Correlacionando-se os resultados para fenóis totais, com o tipo de solvente utilizado na extração e com as caracterizações químicas realizadas neste estudo, sugere-se a presença de compostos fenólicos bastante polares em EB, com destaque para aqueles que estão na forma heterosídica, ou seja, ligados a cadeias de açúcares, e que, por isso, apresentam uma solubilidade bem maior em solventes mais polares, como o etanol 70% (v/v). Porém, em M-EtOAc, que apresenta uma polaridade intermediária, sugere-se a presença de agliconas e ácidos fenólicos de baixo peso molecular em maiores concentrações. Segundo Omar e colaboradores (2012), os compostos fenólicos das classes dos heterosídeos e dos ácidos orgânicos são abundantes nas espécies do gênero *Eugenia* sp.

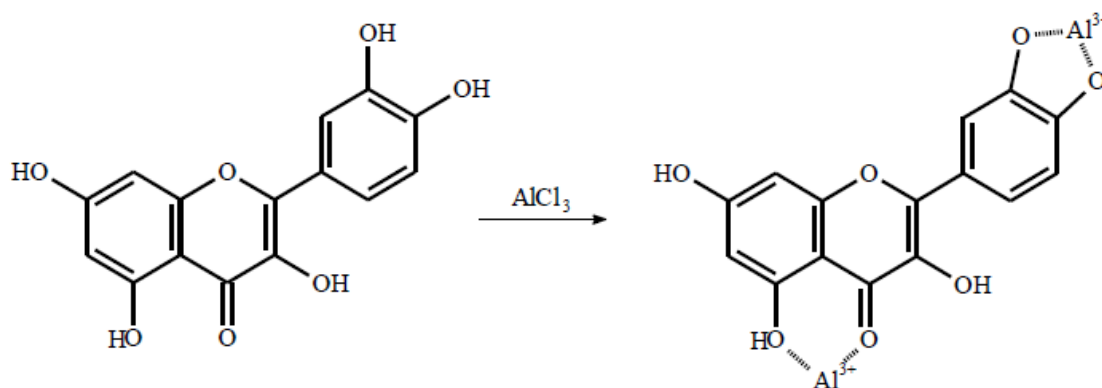
Um dos fatos que justificam a expressiva presença dos flavonoides dentre os compostos presentes naturalmente no reino vegetal é a sua capacidade de proteção das plantas contra a radiação ultravioleta. Os flavonoides, devido à presença de anéis aromáticos associados a hidroxilas em suas estruturas químicas, têm a capacidade de captação da radiação e estabilização da mesma, evitando, assim, danos no material genético do vegetal (WU et al., 2015).

Os flavonóides também são relevantes, no que se refere a seus benefícios à saúde, decorrente das expressivas atividades antioxidantes. Os grupos funcionais hidroxila em flavonoides medeiam os efeitos antioxidantes por eliminação dos radicais livres e/ou por

quelação de íons metálicos, o que pode ser crucial na prevenção de danos a biomoléculas (KUMAR; PANDEY, 2013).

O método espectrofotométrico para determinar o teor de flavonoides baseia-se na propriedade do cátion alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ) de formar complexos estáveis com os flavonoides em etanol ou metanol, conforme a Figura 39. Na análise, ocorre o desvio da absorbância para comprimentos de onda maiores (desvio batocrômico), bem como a intensificação da absorção (desvio hiperacrômico). A leitura é feita em espectrofotômetro a 425 nm, onde os ácidos fenólicos e outras substâncias fenólicas, diferentes dos flavonoides, não absorvem em presença de cloreto de alumínio,  $\text{AlCl}_3$  (WOLLENWEBER et al., 1998; KALIA et al., 2008).

Figura 39 – Formação do complexo entre flavonoide (quercetina) e o alumínio.



Fonte: Adaptado de WOLLENWEBER et al., 1998.

Quando os extratos obtidos das folhas de *Eugenia florida* DC são comparados, quanto ao teor de polifenóis totais, a extratos de plantas ricas como o chá-verde (*Cammelia sinensis*), que apresenta em torno de 30 a 55 mg/g desses compostos, pode-se observar que EB, M-MeOH e M-EtOAc apresentaram teores não muito inferiores de fenóis, cujos valores variaram entre 25,8, 20,1 e 23,9 mg/g, respectivamente (PEREIRA et al., 2014).

Ramful e colaboradores (2011) realizaram estudos de determinação do teor de fenóis totais e flavonoides do extrato acetônico 70% (v/v) das folhas de “boi-de-Clous” (*Eugenia pollicina*), uma planta típica das Ilhas Maurício, continente Africano. Os pesquisadores obtiveram um teor de 77 mg EAG/g para fenóis totais e 12 mg EAG/g para flavonoides, cujos valores foram bem superiores aos encontrados no presente trabalho, para o M-Acet, e também

nos trabalhos com plantas ricas em polifenóis, como o de Pereira e colaboradores, (2014), citado anteriormente.

Neri-Numa e colaboradores (2013) obtiveram um teor de fenóis totais igual a 18,40 mg EAG/g no extrato hidroetanólico 95% (v/v) dos frutos do araçá-boi (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh). O líquido extrator, utilizado no presente trabalho, foi o etanol 70%, que foi responsável por uma maior eficiência de remoção dos compostos fenólicos; porém, no estudo de Neri-Numa, foi utilizada uma solução hidroetanólica 95% como solução extrativa. Outro dado importante a ser mencionado é a parte da espécie utilizada na extração. No presente estudo foram utilizadas as folhas, enquanto no de Neri-Numa foram utilizados os frutos.

Galeno e colaboradores (2014) determinaram os teores de polifenóis totais e flavonoides existentes no extrato aquoso obtido das folhas de pedra-ume-caá (*Eugenia punicifolia*) e obtiveram um valor de 21,6 mg EAG/g e 2,62 mg EQ/g, respectivamente. O resultado encontrado para o teor de polifenóis totais mostrou-se bastante próximo aos encontrados no presente estudo para EB, M-MeOH, M-EtOAc e M-Acet, porém o teor de flavonoides se mostrou bastante inferior, em comparação a todos os valores encontrados para os extratos estudados. Porém, deve-se levar em consideração que o extrato utilizado pelos pesquisadores acima relatados foi de natureza aquosa, sugerindo que os líquidos extratores usados no preparo dos extratos de *Eugenia florida* DC foram mais eficientes na remoção dos flavonoides do tipo heterosídeos, associada ao processo de aquecimento da água durante a extração.

John e colaboradores (2014) realizaram a determinação do teor de fenóis totais e flavonoides nos extratos em etanol, metanol, aquoso e acetato de etila das folhas do katukorandi (*Eugenia singampattiana*), uma espécie encontrada na Índia e usada por tribos indígenas no tratamento de reumatismos e doenças do aparelho respiratório. Os pesquisadores verificaram que o extrato etanólico apresentou teor de polifenóis igual a 21,58 mg EAG/g, seguido pelos extratos metanólico (17,84 mg EAG/g), aquoso (15,00 mg EAG/g) e acetato de etila (4,09 mg EAG/g). Os resultados encontrados para os extratos etanólico e metanólico foram bem próximos aos encontrados para EB e M-MeOH no presente estudo, porém estes últimos se mostraram um pouco superiores. No caso do M-EtOAc, os resultados encontrados foram bem maiores, se comparados ao trabalho destes pesquisadores. Com relação aos teores de flavonoides, no entanto, os extratos etanólico e metanólico apresentaram teores de flavonoides bem maiores do que para EB e M-MeOH (9,10 e 12,91 mg EQ/g, respectivamente).

Os taninos têm sido alvo de diversos estudos, sendo que a maioria deles abordam as diferentes interações ecológicas entre taninos de vegetais e herbívoros. Algumas pesquisas sobre atividade biológica dos taninos evidenciaram importante ação contra determinados microrganismos. Além disso, podem agir como anti-inflamatórios, cicatrizantes e inibidores da transcriptase reversa em vírus HIV (MONTEIRO et al., 2005).

O conteúdo total de taninos em uma determinada amostra pode ser determinado experimentalmente de diversas formas. Porém, o que apresenta menor interferência e que reflete biologicamente a ação desses compostos é o método de Hagerman, baseado na reação de precipitação desses compostos com albumina e subsequente complexação com uma solução de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ). A intensidade de coloração da solução é, então, medida em espectrofotômetro a 510 nm, sob uma curva padrão de ácido tânico (FERREIRA et al., 2014).

Ferreira e colaboradores (2014) determinaram os teores de taninos totais em amostras de extratos etanólicos de folhas e cascas do caule de *Eugenia calycina*. Os autores encontraram concentrações de 2,43 mg EAT/g no extrato das folhas e 1,18 mg EAT/g no extrato da casca dos caules. O valor apresentado para o teor de taninos no extrato das folhas mostrou-se bem inferior ao demonstrado para o EB, no presente estudo.

As diferenças encontradas nos teores de fenóis totais, flavonoides e taninos do presente trabalho, em relação aos diversos estudos, devem-se às modificações de diversos parâmetros empregados na obtenção dos extratos. Como parâmetros, podem-se destacar os processos de coleta do material vegetal (data, horário, local), o método extrativo usado, o solvente extrator, os processos de interação ecológica da planta com o ambiente, a idade e o estágio de desenvolvimento do vegetal (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MARTINS, 2012).

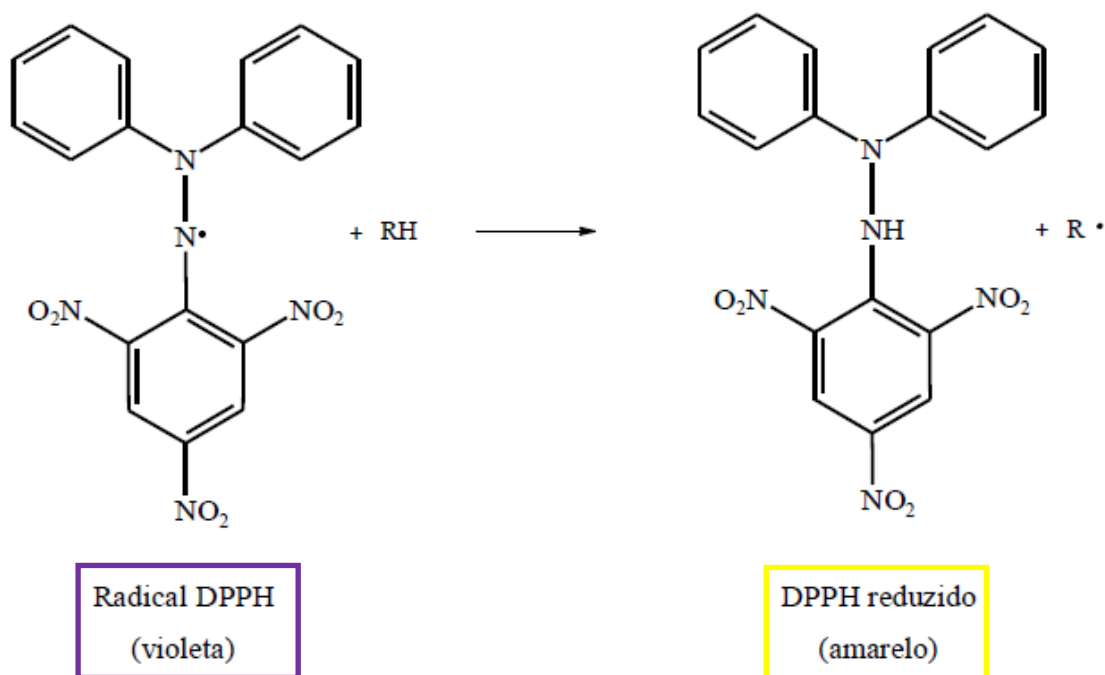
Além disso, as condições ambientais, como luminosidade, temperatura, pluviosidade, radiações, altitude, sazonalidade, disponibilidade de água e composição atmosférica, interferem diretamente na produção dos metabólitos secundários de interesse biológico e farmacológico (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MARTINS, 2012).

Deve-se destacar também que as diferenças encontradas nos teores de taninos, nos diferentes trabalhos da literatura, também estão relacionadas com as diferentes metodologias quantitativas empregadas no doseamento desses compostos nos extratos vegetais (SIMÕES et al., 2010).

## 5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRRADICALAR PELO SEQUESTRO DE RADICAIS DPPH

O método de avaliação da atividade antirradicalar, usando DPPH, é um dos mais utilizados. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical estável de cor púrpura, que, após ser reduzido pelo composto antirradicalar, forma o difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela. A capacidade de sequestro do radical livre DPPH pela amostra é determinada pela capacidade de transferência de hidrogênio para o radical livre estável DPPH. A reação característica deste teste está indicada na Figura 40 (SILVA, 2014).

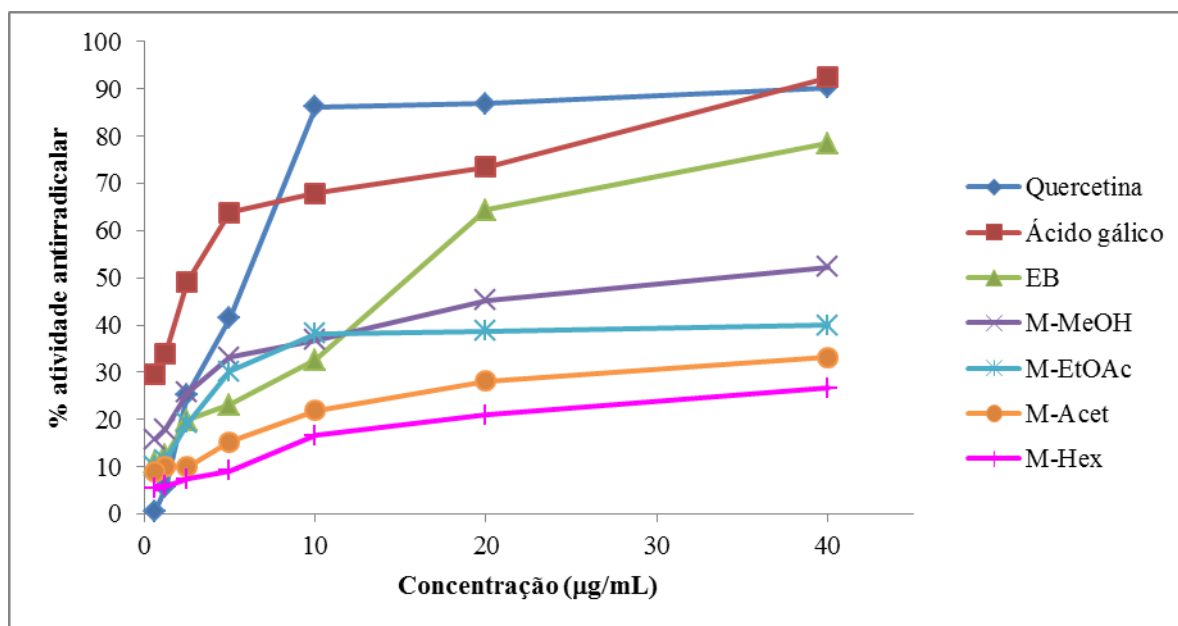
Figura 40 – Reação de oxidorredução entre a molécula antirradicalar (RH) e a substância sequestradora de radicais (DPPH).



Fonte: Adaptado de SILVA, 2014.

Os resultados de avaliação da atividade sequestrante de radicais DPPH, pelos extratos de *Eugenia florida* DC, estão apresentados na Figura 41.

Figura 41 – Atividade sequestrante de radicais DPPH com os extratos das folhas de *Eugenia florida* DC.



Fonte: Do autor.

Legenda: EB – extrato bruto hidroetanólico 70% v/v; M-MeOH – macerado em metanol; M-EtOAc – macerado em acetato de etila; M-Acet – macerado em acetona; M-Hex – macerado em hexano.

As amostras foram analisadas nas concentrações de 0,625 a 40 µg/mL. Quercetina e ácido gálico foram utilizados como padrões, nas mesmas concentrações das amostras.

Por meio da análise do gráfico, pode ser observado que o EB apresentou um potencial de atividade sequestrante de radicais DPPH bem próximo aos padrões de quercetina e ácido gálico, considerados compostos que apresentam uma alta atividade antirradicalar. Porém, a atividade mostrou-se decrescente, à medida que a concentração de EB diminuiu. Na concentração de 40 µg/mL, o EB conseguiu atingir quase 80% de sequestro de radicais DPPH.

Os demais extratos (M-MeOH, M-EtOAc, M-Acet e M-Hex) apresentaram potenciais de sequestro de radicais DPPH bem menores do que o EB e do que os padrões de quercetina e ácido gálico, o que indica uma menor atividade antirradicalar dessas amostras. Semelhante ao EB, a atividade dos demais extratos mostrou-se decrescente, à medida que as concentrações foram diminuindo. Nos resultados da Figura 41, pôde-se observar que EB apresentou a maior atividade antirradicalar e, conseqüentemente, foi o que apresentou o maior conteúdo de fenóis totais, flavonoides e taninos, conforme descrito na Tabela 4, p. 109. Esta correlação, no entanto, não foi observada para com M-MeOH e M-EtOAc, pois M-EtOAc apresentou

maiores conteúdos de fenóis totais e flavonoides do que M-MeOH e uma menor atividade antirradicalar.

De acordo com a literatura, a concentração de compostos fenólicos e/ou flavonoides em um determinado extrato pode ter ou não relação direta com a atividade antirradicalar do mesmo. Segundo Cabello-Hurtado, Gicquel e Esnault (2012), existem grandes dificuldades de se estabelecerem regras para essas correlações, pois os compostos fenólicos podem interagir entre si ou com outros metabólitos secundários existentes na composição do material vegetal. Essas interações podem levar ao sinergismo desses metabólitos, aumentando ou diminuindo o potencial antirradicalar.

A atividade antirradicalar dos flavonoides depende do arranjo dos grupos funcionais sobre a estrutura molecular do composto. A configuração dos anéis, o grau de substituição e o número de grupos hidroxila influenciam substancialmente nos mecanismos de atividade antioxidante, como na eliminação de radicais livres e na capacidade de complexação com alguns metais (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; PANDEY; MISHRA; MISHRA, 2012).

A melhor interpretação dos resultados do método do DPPH é por meio da  $EC_{50}$  (concentração efetiva necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH da solução). Esse método foi introduzido por ser de fácil interpretação e preciso, sendo muito utilizado na análise de compostos antirradicalares obtidos de frutos e extratos vegetais. Quanto menor o valor de  $CE_{50}$ , maior a atividade antirradicalar (ATMANI et al., 2009).

Neste sentido, foram determinados os valores de concentração necessários para exercer 50% ( $CE_{50}$ ) da atividade antirradicalar nos extratos secos de *E. florida* DC. Os resultados estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtidos na avaliação de atividade antirradicalar dos extratos das folhas de *Eugenia florida* DC, utilizando o método de DPPH.

Amostra	% sequestro de radical DPPH (a 20 $\mu\text{g/mL}$ )	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
EB	$64,41 \pm 1,48^e$	12,77
M-MeOH	$45,25 \pm 0,60^d$	35,18
M-EtOAc	$38,76 \pm 1,12^c$	77,98
M-Acet	$28,14 \pm 0,89^b$	832,31
M-Hex	$21,01 \pm 0,73^a$	3094,51
Quercetina	$86,86 \pm 0,43^g$	5,40
Ácido gálico	$73,51 \pm 0,72^f$	2,79

Fonte: Do autor.

Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). Os resultados de cada teste foram analisados separadamente. Médias com letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott e Knott, (1974), sendo  $p < 0,05$ . EB – extrato bruto hidroetanólico 70% v/v; M-MeOH – macerado em metanol; M-EtOAc – macerado em acetato de etila; M-Acet – macerado em acetona; M-Hex – macerado em hexano.

Considerando as análises estatísticas dos resultados obtidos com a concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ , verificou-se que as amostras e os padrões apresentaram diferenças significativas no potencial como sequestradores de radicais livres. Merece destaque o valor de  $CE_{50}$  para EB, que apresentou valor um pouco superior (12,77  $\mu\text{g/mL}$ ), ao obtido com o padrão de quercetina (5,40  $\mu\text{g/mL}$ ), indicando uma excelente atividade antirradicalar do extrato.

Quando os macerados (M-MeOH, M-EtOAc, M-Acet e M-Hex) são comparados ao EB e aos padrões, verifica-se que os mesmos apresentam atividade antirradicalar bem menor. Observa-se também que os valores de  $CE_{50}$  para M-EtOAc, M-Acet e M-Hex (77,98, 832,31 e 3094,51  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) são maiores do que as soluções mais concentradas utilizadas no ensaio para todas as amostras (40  $\mu\text{g/mL}$ ), o que indica uma ação antirradicalar não tão expressiva.

De acordo com a identificação química, sugerida pela CCD e pela análise por espectrometria de massas, é possível afirmar que a diferença nos perfis de atividade antirradicalar, entre os diferentes extratos analisados, pode ser devido às diferentes composições químicas e concentrações de flavonoides, taninos, ácidos fenólicos, terpenos, dentre outros compostos, nessas amostras. Isto demonstra que o presente estudo está em conformidade com os dados da literatura, que confirma a presença dessas classes de



metabólitos antioxidantes na família Myrtaceae, especificamente nas espécies do gênero *Eugenia* sp (OKOH-ESENE et al., 2011).

Siddiqi e colaboradores (2013) realizaram o ensaio de atividade antirradicalar, pelo método do DPPH, em 3 frações acetato de etila e em 1 fração metanólica, obtidas do extrato metanólico 80% (v/v) dos frutos de *Eugenia jambolana*. Os autores denominaram as frações de Ia (acetato de etila e rica em flavanóis), Ib (acetato de etila e rica em flavonóis), Ic (acetato de etila e rica em ácidos fenólicos) e II (metanólica e rica em antocianidinas). Os valores de porcentagem de sequestro de DPPH para cada uma das frações, na concentração de 20 µg/mL, foram, respectivamente, de 62%, 85%, 78% e 70%, sendo considerados resultados mais significativos do que os obtidos para os extratos das folhas de *Eugenia florida* DC. Com isso, é possível estabelecer que o fracionamento em acetato de etila e/ou metanol dos extratos de *E. florida* DC poderia, neste caso, concentrar os compostos antioxidantes e, desta maneira, permitir a obtenção de resultados mais expressivos.

Carvalho Júnior e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antirradicalar, pelo método de DPPH, dos extratos metanólicos das folhas e dos galhos da planta *Eugenia copacabanensis* Kiaersk, popularmente conhecida como “princesinha de Copacabana”, e encontraram valores de CE<sub>50</sub> iguais a 2,77 e 0,92 µg/mL, respectivamente, sendo bem mais expressivos do que os resultados encontrados para todas as amostras, no presente trabalho. Os autores concluíram que a alta atividade antirradicalar demonstrada em seus estudos foi devida à presença de substâncias fenólicas, como os flavonoides, que também foram isolados.

Galeno e colaboradores (2014) avaliaram o perfil antirradicalar do extrato aquoso de *Eugenia puniceifolia*, através da determinação do CE<sub>50</sub> pelo método de DPPH, e encontraram um valor correspondente a 28,84 µg/mL, bem menos significativo que o encontrado pelo EB no presente trabalho, porém mais expressivo, em comparação aos demais extratos preparados.

Veber e colaboradores (2015) determinaram os valores de CE<sub>50</sub>, para a atividade antirradicalar por sequestro de radicais DPPH, dos extratos aquoso, etanólico 25% e etanólico 50% das folhas e dos frutos verdes do jambolão (*Syzygium cumini* L.), uma espécie pertencente à família Myrtaceae. Para as folhas, os valores de CE<sub>50</sub> foram, respectivamente, de 56,09, 32,92 e 23,07 µg/mL, em que todos foram bem menos significativos comparados ao EB no presente trabalho (12,77 µg/mL) e mais significativos, com relação aos demais extratos. Os extratos obtidos com os frutos verdes apresentaram valores de CE<sub>50</sub> iguais a 2,27, 2,93 e 3,75 µg/mL, respectivamente, que também foram mais significativos em relação a todas as amostras do presente trabalho.

A maior atividade antirradicalar demonstrada pelo EB, no presente estudo, em comparação aos demais extratos, é possivelmente devido à presença de maiores concentrações de compostos fenólicos, que foram majoritariamente extraídos pelo etanol 70% (v/v), no método de percolação.

Por fim, sabe-se que a atividade antirradicalar de um extrato e/ou composto está intimamente relacionada com a ação positiva sobre a melhora do quadro clínico de diversas doenças, principalmente o diabetes *mellitus* (PALIYATH; BAKOVIC; SHETTY, 2011). Pelo fato de o EB ter mostrado uma maior atividade antirradicalar, foi o único extrato avaliado no presente trabalho quanto ao perfil de atividade antidiabética. Além disso, tal escolha foi feita por apresentar uma menor toxicidade quando administrado a modelos animais, conforme está estabelecido em alguns trabalhos da literatura, com destaque para o desenvolvido por Jelastin, Tresina e Mohan (2011).

## 5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os testes laboratoriais de sensibilidade aos antimicrobianos são indicados para qualquer microrganismo que cause um processo infeccioso e exija uma terapia antimicrobiana associada a ele. O método da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) é o mais indicado. Neste ensaio, que é realizado *in vitro*, inicialmente são feitas microdiluições sucessivas das amostras a serem analisadas, em meios de cultura sólidos ou líquidos. Em seguida, fazem-se sementeiras do microrganismo a ser testado e incubação a temperaturas definidas, para verificar a menor concentração do composto que inibiu o crescimento microbiano. A avaliação é sempre comparada frente a um padrão de referência (CLSI, 2003).

Após incubação, o crescimento do microrganismo pode ser determinado de três formas: pela leitura visual direta, leitura turbidimétrica com uso de espectrofotômetro em comprimentos de onda apropriados ou através da análise da viabilidade celular por corantes indicadores, como o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (MTT) (DUARTE et al., 2005; SILVEIRA et al., 2009). As vantagens deste método é proporcionar mais informações quantitativas, ele pode ser aplicado a uma variedade mais ampla de compostos, requerem uma pequena quantidade de amostra, apresenta custo baixo, gera alta reprodutibilidade e sensibilidade e possibilita um registro permanente (OSTROKSY et al., 2008).

Os microrganismos mais utilizados nos testes de determinação da CIM incluem leveduras do gênero *Candida* e bactérias das espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* (CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004).

Desta forma, as concentrações inibitórias de 50% do crescimento (MIC<sub>50</sub>) e 90% (MIC<sub>90</sub>) dos extratos de *Eugenia florida* DC foram determinadas sobre leveduras do gênero *Candida* sp, bem como sobre *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva) e *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa). Todos os extratos exibiram atividade antimicrobiana frente a pelo menos um dos microrganismos testados e em concentrações que variaram entre 1,95 a 1000 µg/mL. As concentrações correspondentes aos valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>, bem como as concentrações imediatamente superior e inferior, quando plaqueadas em meio de cultura agar Müeller-Hinton, apresentaram efeitos bacteriostáticos/fungistáticos de 50% e 90% dos microrganismos, respectivamente.

A Tabela 6 mostra os valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> obtidos para cada uma das amostras testadas, frente às leveduras do gênero *Candida* sp.

Tabela 6 – Avaliação do perfil de sensibilidade de leveduras do gênero *Candida* sp frente aos extratos das folhas de *Eugenia florida* DC.

Amostra		<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. glabrata</i> ATCC 900300	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
EB (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	---	<b>62,5</b>	250	---
	MIC <sub>90</sub>	500	500	500	500
M-MeOH (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	---	<b>62,5</b>	250	500
	MIC <sub>90</sub>	---	250	1000	---
M-EtOAc (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	500	125	---	1000
	MIC <sub>90</sub>	1000	500	500	---
M-Acet (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	250	250	---	---
	MIC <sub>90</sub>	500	1000	1000	---
M-Hex (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	500	250	500	500
	MIC <sub>90</sub>	1000	500	---	---
Fluconazol (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	0,5	32	16	1

Fonte: do autor.

Legenda: EB – extrato bruto hidroetanólico 70% v/v; M-MeOH – macerado em metanol; M-EtOAc – macerado em acetato de etila; M-Acet – macerado em acetona; M-Hex – macerado em hexano; MIC<sub>50</sub> – concentração inibitória de 50% do crescimento microbiano; MIC<sub>90</sub> – concentração inibitória de 90% do crescimento microbiano; ATCC – *American Type Culture Collection*; --- – ausência de atividade nas concentrações testadas.

Os extratos que apresentam MIC<sub>50</sub> menor do que 100 µg/mL são considerados com excelente atividade antimicrobiana, os que têm MIC<sub>50</sub> entre 100-500 µg/mL são moderadamente ativos, MIC<sub>50</sub> entre 500-1000 µg/mL são pouco ativos e MIC<sub>50</sub> maior que 1000 µg/mL são inativos (HOLETS et al., 2002).

De acordo com a Tabela 6, os extratos apresentaram valores de MIC<sub>50</sub> entre 62,5-1000 mg/mL. Com isso, pode-se perceber que o M-MeOH foi o que se mostrou mais ativo contra *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, com valores de MIC<sub>50</sub> iguais a 62,5, 250 e 500 µg/mL, respectivamente.

O EB apresentou valores de MIC<sub>50</sub> iguais ao M-MeOH para *C. krusei* e *C. glabrata*, porém não demonstrou atividade nesta concentração para *C. parapsilosis*. Com relação à *C. krusei*, os dois extratos demonstraram uma excelente atividade antimicrobiana e, para com as demais espécies, foram moderadamente ativos. Os valores de MIC<sub>50</sub> para *C. krusei*, iguais a 62,5 µg/mL, quando obtidos para EB e M-MeOH, têm uma importância relevante, pois esta levedura é bastante resistente aos antifúngicos convencionais, como o fluconazol (MIC<sub>50</sub> = 32 µg/mL), o que mostra um expressivo potencial destes extratos no combate a este microrganismo.

A levedura *C. parapsilosis* foi a que se apresentou mais resistente à ação dos extratos testados, sendo que apenas o EB apresentou um MIC<sub>90</sub> considerável, calculado em 500 µg/mL. Observa-se, também, que o EB foi o que apresentou maior potencial inibitório de 90% do crescimento (MIC<sub>90</sub>) referente às leveduras do gênero *Candida* sp. Os demais extratos apresentaram perfis variáveis para MIC<sub>90</sub> frente às diferentes leveduras testadas, desde moderadamente ativos até inativos.

Apenas os extratos M-EtOAc, M-Acet e M-Hex apresentaram atividades na inibição de 50% do crescimento de *C. albicans*, com valores de MIC<sub>50</sub> iguais a 500, 250 e 500 µg/mL, respectivamente, sendo todos eles moderadamente ativos contra a espécie em questão. Apesar de M-Hex ter apresentado um caráter moderadamente ativo para as leveduras, foi o único que apresentou atividade de inibição de 50% do crescimento para todos os fungos testados.

A família Myrtaceae possui, na constituição química da maioria de suas espécies, compostos pertencentes às classes dos flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, além de outros, como as saponinas (OMAR et al., 2012). A capacidade da espécie *E. florida* DC de exibir um potencial de atividade antimicrobiana pode ser devida à presença desses compostos, em diferentes graus de distribuição. Isto pode ser evidenciado quando se analisam os resultados obtidos com EB e M-MeOH, que concentraram, nesta ordem, os maiores teores de

flavonoides e taninos (Tabela 4, p. 109) e, conseqüentemente, apresentaram relação direta com a atividade antimicrobiana demonstrada.

As infecções fúngicas em seres humanos são ocasionadas, principalmente, por reações alérgicas às proteínas dos fungos ou a toxinas produzidas pelos mesmos. Essas infecções são responsáveis pelo aumento da taxa de morbidade e mortalidade em pacientes graves e imunocomprometidos, sendo que as espécies de *Candida* sp são as principais leveduras que causam micoses oportunistas em todo o mundo (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

*C. albicans* e *C. krusei* são os principais patógenos responsáveis pela maior parte das infecções nosocomiais. As leveduras *C. glabrata* e *C. parapsilosis* podem crescer como biofilmes em materiais de uso hospitalar, como cateteres, agulhas e outros dispositivos médicos, sendo consideradas fatores de risco adicionais ao uso de antibióticos (PIRES, 2010; SILVA et al., 2012).

Deve-se levar em consideração, também, que o tratamento das micoses não é sempre efetivo, pois os antifúngicos causam recidiva das infecções, apresentam resistência aos microrganismos e podem gerar toxicidade. Por conta disto, os extratos e compostos naturais têm sido investigados pelos pesquisadores como novas alternativas no tratamento dessas doenças (PANDEY; KUMAR, 2013).

A Tabela 7, a seguir, evidencia os valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> obtidos para cada uma das amostras, frente às bactérias testadas (*S. aureus* e *E. coli*).

Tabela 7 – Avaliação do perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* frente aos extratos das folhas de *Eugenia florida* DC.

Amostra		<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 25922
EB (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	250	500
	MIC <sub>90</sub>	500	1000
M-MeOH (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	500	500
	MIC <sub>90</sub>	---	---
M-EtOAc (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	250	1000
	MIC <sub>90</sub>	1000	---
M-Acet (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	---	---
	MIC <sub>90</sub>	1000	1000
M-Hex (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	1000	500
	MIC <sub>90</sub>	---	---
Cloranfenicol (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	0.975	0,975

Fonte: Do autor.

Legenda: EB – extrato bruto hidroetanólico 70% v/v; M-MeOH – macerado em metanol; M-EtOAc – macerado em acetato de etila; M-Acet – macerado em acetona; M-Hex – macerado em hexano; MIC<sub>50</sub> – concentração inibitória de 50% do crescimento microbiano; MIC<sub>90</sub> – concentração inibitória de 90% do crescimento microbiano; ATCC – *American Type Culture Collection*; --- – ausência de atividade nas concentrações testadas.

Com relação às bactérias testadas, *S. aureus* e *E. coli*, a maioria dos extratos testados mostrou-se pouco ativa (MIC<sub>50</sub> entre 250-1000 µg/mL), e o M-Acet mostrou-se inativo neste parâmetro para as duas bactérias. Observa-se que ambas as bactérias são agentes patogênicos e têm a capacidade de produzir toxinas e enzimas extracelulares responsáveis por infecções alimentares e deterioração de alimentos, respectivamente (KUMAR; MURALI; BATRA 2009).

Os extratos das folhas da espécie *E. florida* DC demonstraram pouca atividade sobre *E. coli*, que é uma bactéria do tipo Gram-negativa, em comparação à bactéria Gram-positiva *S. aureus*. Este fato pode ser devido às diferentes composições da membrana dessas bactérias. As bactérias Gram-negativas apresentam um componente adicional em sua estrutura, que se trata de uma bicamada lipídica mais externa, constituída de lipopolissacarídeos (LPS) que se aderem firmemente à camada de peptidoglicanos da parede celular. Isto torna a membrana

celular bacteriana com caráter mais lipofílico em relação a uma substância exógena, cujo poder de penetração e/ou ação sobre a membrana determina a sua capacidade antibiótica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2011).

Sabe-se que os flavonoides e os taninos apresentam a habilidade de se complexarem e/ou inativarem enzimas, proteínas extracelulares, proteínas solúveis e paredes celulares bacterianas, o que configuram os prováveis mecanismos de ação antimicrobiana (SILVA et al., 2012).

Dessa forma, os componentes do extrato poderão atravessar ou agir sobre a membrana de *E. coli*, desencadeando a diminuição do crescimento bacteriano. Somente o EB apresentou potencial de inibir 50% e 90% do crescimento de *E. coli*, com valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> iguais a 500 e 1000 µg/mL, sugerindo a presença, neste extrato, de algumas substâncias com maior poder de penetração e/ou ação sobre a membrana da bactéria, como as saponinas, detectadas pela análise por MS (ARANTES, 2005).

Auricchio e colaboradores (2007) realizaram o ensaio de determinação da atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico 70% (v/v) das folhas de *Eugenia uniflora* sobre cepas de *S. aureus* e *C. albicans*. Os autores encontraram valores de concentração inibitória mínima de 90% do crescimento microbiano (MIC<sub>90</sub>) iguais a 80 e 500 µg/mL para os microrganismos citados, respectivamente. Os valores obtidos neste trabalho foram mais significativos para *S. aureus* e iguais para *C. albicans* em comparação com os valores de MIC<sub>90</sub> do EB, no presente estudo.

Azevedo e colaboradores (2012) realizaram a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos das folhas de *Eugenia brejoensis* contra cepas de *S. aureus* e *E. coli*, e os autores verificaram que os valores de MIC<sub>90</sub> para as duas bactérias foram, respectivamente, de 25 mg/mL. Este valor, de acordo com Holets e colaboradores, (2002), indica inatividade de ação biológica, pois a concentração encontrada foi maior do que 1000 µg/mL ou 1 mg/mL.

Ferreira e colaboradores (2014) determinaram a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das folhas de *Eugenia calycina* contra *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*, encontrando valores de MIC<sub>50</sub> iguais a 1000, 2000, 500 e 250 µg/mL. Os valores encontrados para MIC<sub>50</sub> neste trabalho foram menos significativos do que para os valores de EB do presente estudo, com relação às bactérias; no entanto, foi mais expressivo para as leveduras citadas, em que o EB não apresentou MIC<sub>50</sub> considerável.

Nesse contexto, os estudos das atividades antifúngicas e antibacterianas *in vitro* de extratos de *Eugenia florida* DC, no presente trabalho, auxiliarão no aprimoramento da triagem de plantas medicinais que exercem ação antimicrobiana e contribuiu na identificação de uma potencial fonte vegetal para terapias futuras mais eficazes e menos tóxicas (CHIARI, 2011).

## 5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

O ciclo biológico de *Leishmania* sp é facilmente reproduzido *in vitro*, permitindo a utilização de qualquer uma das formas evolutivas do parasito para a avaliação da sensibilidade a diferentes compostos. O modelo de avaliação da atividade sobre formas amastigotas *in vivo* é considerado o melhor indicador da atividade. Entretanto, devido ao menor custo, facilidade de cultivo e possibilidade de testar de um grande número de compostos, as formas promastigotas são mais amplamente utilizadas para triagem *in vitro* (DINIZ, 2013).

Dentre os métodos mais usados para a avaliação do perfil de sensibilidade de parasitos a um determinado composto, destacam-se aqueles que utilizam as medidas de viabilidade celular, através da utilização do corante resazurina. Trata-se de um indicador colorimétrico de proliferação, que se baseia na redução química do reagente devido à atividade metabólica das células. Através de reações de oxidorredução, o corante passa da cor azul (forma oxidada e não fluorescente) para rosa (forma reduzida e fluorescente), sendo esta mudança de cor medida pela leitura espectrofotométrica ou fluorimétrica (AHMED et al., 1998).

Desta forma, os extratos das folhas de *Eugenia florida* DC foram testados contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*, nas concentrações de 40 a 1280 µg/mL. Os resultados contra as formas promastigotas não foram promissores para nenhum dos extratos testados, pois eles não se mostraram efetivos contra o parasita na maior concentração analisada (1280 µg/mL), utilizando as condições experimentais desse estudo, conforme descrito na Tabela 8. Frente a este resultado, não se prosseguiram os testes contra as formas amastigotas.



Tabela 8 – Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) obtidos na avaliação da atividade leishmanicida com os extratos das folhas de *Eugenia florida* DC.

Amostra	% inibição da proliferação (a 1280 µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
EB	3,53 ± 0,23 <sup>a</sup>	2913,08
M-MeOH	16,16 ± 0,59 <sup>d</sup>	1433,83
M-EtOAc	6,26 ± 0,43 <sup>c</sup>	1956,98
M-Acet	6,34 ± 0,35 <sup>c</sup>	2843,99
M-Hex	4,40 ± 0,41 <sup>b</sup>	3811,90
Anfotericina B	94,66 ± 0,05 <sup>e</sup>	0,90
Pentamidina	90,45 ± 0,08 <sup>e</sup>	0,83

Fonte: Do autor.

Legenda: Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Os resultados de cada teste foram analisados separadamente. Médias com letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott e Knott, (1974), sendo p < 0,05. Valores de IC<sub>50</sub> determinados no software BioEstat, Versão 5.0.

Sabe-se que, nos ensaios com as formas promastigotas, o extrato entra em contato direto com o parasita; porém, com as formas amastigotas, é necessário que as moléculas presentes na amostra rompam as membranas dos macrófagos para atingi-las (VALADARES et al., 2011).

É importante salientar que, apesar dos extratos testados não terem apresentado atividade leishmanicida, esses resultados não excluem a ação leishmanicida da espécie *Eugenia florida* DC, uma vez que pode existir uma variabilidade significativa no conteúdo de metabólitos biologicamente ativos contra espécies de *Leishmania* em outras partes da planta, como frutos, raízes e cascas do caule, por exemplo, além de outros fatores extrínsecos e intrínsecos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Existem poucos trabalhos na literatura de avaliação da atividade leishmanicida de extratos vegetais provenientes de espécies da família Myrtaceae.

Luize e colaboradores, (2005), avaliaram a atividade leishmanicida contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, utilizando os extratos hidroetanólicos 90% v/v de duas espécies pertencentes à família Myrtaceae, *Eugenia uniflora* e *Psidium guajava*. Os autores encontraram um percentual de inibição, para *E. uniflora*, de 38,0% e 51,6% para as formas promastigotas e amastigotas, respectivamente, e de 65,4% e 52,0% para *P. guajava*, utilizando concentrações dos extratos a 100 µg/mL.

Braga e colaboradores, (2007), determinaram a atividade leishmanicida dos extratos metanólicos das partes aéreas de *Eugenia uniflora* e *Syzygium cumini* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*, encontrando valores de MIC<sub>50</sub> maiores que 250 µg/mL para todos os ensaios, sendo os extratos, desta forma, classificados como moderadamente ativos contra os parasitos.

Santos e colaboradores, (2013), testaram a atividade leishmanicida do extrato etanólico 95% (v/v) das folhas de *Eugenia uniflora* contra formas promastigotas, sendo que o extrato apresentou um relevante potencial leishmanicida, inibindo 65% do crescimento da cepa de *L. brasiliensis*, testada a uma concentração de 100 µg/mL.

## 5.10 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM MODELOS MURINOS DIABÉTICOS

A seção a seguir mostra os resultados obtidos para a análise dos efeitos de EB nos parâmetros bioquímicos de ratos diabéticos.

### 5.10.1 Determinação do perfil glicêmico – glicemia de jejum e frutossamina

Os compostos naturais podem ser alternativas viáveis para o tratamento de diabetes *mellitus* ou, então, como reforços para os tratamentos convencionais atualmente utilizados, diminuindo o risco da doença. Existe uma grande variedade de plantas e biomoléculas naturais que têm sido discutidas na literatura com relação a seus efeitos antidiabéticos. Compostos polifenólicos, especialmente os flavonoides, estão entre as classes que têm recebido a maior atenção, no que diz respeito às suas propriedades antidiabéticas (BALDEA et al., 2010).

Estudos *in vivo* e *in vitro* realizados por Ahmed e colaboradores, (2010), foram capazes de demonstrar que a rutina tem capacidade de influenciar positivamente a atividade da insulina e a resistência à insulina em ratos diabéticos tipo 2. Os resultados mostraram que a rutina diminuiu a glicemia e as concentrações séricas de insulina, aumentando a expressão do receptor específico para insulina, levando à melhoria da sensibilidade à insulina muscular e de

sua sinalização. A catequina, um flavan-3-ol, também foi identificada neste estudo como um modulador da secreção de insulina.

Vários estudos também têm demonstrado que as desordens metabólicas e complicações crônicas, oriundas de pacientes com diabetes *mellitus*, têm relação direta com a hiperglicemia sérica, além da alta concentração dos produtos finais de glicação não avançada (AGEs) no sangue. Desta forma, alguns produtos iniciais da reação de Maillard, como a frutossamina, têm sido úteis para a determinação do controle metabólico, em indivíduos com diabetes descompensado (RONDEAU; BOURDON, 2011).

Desta forma, o presente estudo avaliou as alterações do perfil glicêmico em ratos *Wistar* machos diabéticos. O EB das folhas de *E. florida* DC foi dissolvido em água na concentração de 200 mg/kg e administrado aos animais, por gavagem, durante 30 dias.

Para a indução do diabetes, foi utilizada a droga aloxano, na dose de 200 mg/kg de peso corporal, dissolvido em salina 0,9% (pH 4,5). Sabe-se que o aloxano é uma droga que causa uma redução drástica dos níveis de insulina plasmáticos, devido à sua alta toxicidade contra as células-beta das ilhotas pancreáticas (SHANKAR; SUTHAKARAN, 2014).

Os dados apresentados na Tabela 9 demonstram o efeito diabetogênico do aloxano, confirmado pelo estado de hiperglicemia do Grupo D (diabético não tratado – DN), em comparação com o Grupo B (controle não tratado – CN), que não recebeu tratamento com aloxano. Além disso, os dados mostram os efeitos ocasionados pelo EB no perfil glicêmico dos grupos A (controle tratado – CT) e C (diabético tratado – DT).

Tabela 9 – Avaliação do perfil glicêmico em ratos *Wistar* submetidos ou não ao tratamento com EB de *Eugenia florida* DC.

Grupo	Glicemia de jejum (mg/dL)	Frutossamina ( $\mu\text{mol/L}$ )
A (controle tratado – CT)	136,58 $\pm$ 18,46 <sup>a</sup>	103,86 $\pm$ 9,00 <sup>a</sup>
B (controle não tratado – CN)	156,89 $\pm$ 20,93 <sup>a</sup>	109,40 $\pm$ 5,71 <sup>a</sup>
C (diabético tratado – DT)	382,11 $\pm$ 34,72 <sup>b</sup>	126,24 $\pm$ 6,01 <sup>b</sup>
D (diabético não tratado – DN)	619,88 $\pm$ 53,21 <sup>c</sup>	183,41 $\pm$ 5,85 <sup>c</sup>

Fonte: Do autor.

Legenda: As determinações foram realizadas em amostra de soro, obtidas após a eutanásia dos ratos. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo, com valor de n = 10. Os resultados de cada teste foram analisados separadamente. Médias com letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott e Knott, (1974), sendo p < 0,05. EB – extrato bruto hidroetanólico 70% v/v.

Avaliando-se os efeitos do EB de *Eugenia florida* DC sobre a glicemia de jejum nos ratos do Grupo C (Tabela 9), foi observado que os resultados foram estatisticamente menores do que os apresentados pelo Grupo D, que, naturalmente, se mostraram bem mais elevados. Isto sugere que o extrato administrado foi capaz de reduzir os níveis de glicose sérica nos ratos diabéticos tratados. Pelos dados apresentados, observa-se que o nível de glicose diminuiu aproximadamente 38% no grupo C, em comparação aos ratos do Grupo D. Diferentemente do que ocorreu nos grupos de ratos diabéticos, nos grupos controles (A e B), não foi observada uma diferença significativa nos níveis de glicose, quando os resultados foram comparados entre si.

A administração do EB demonstrou resultados semelhantes aos de outros estudos da literatura, citados a seguir, pois o tratamento resultou em um efeito hipoglicêmico e manteve os níveis de glicose plasmática em valores estatisticamente diferentes ao grupo controle sem tratamento.

Nos estudos de Jelastin, Tresina e Mohan (2012), os pesquisadores avaliaram o perfil glicêmico em ratos *Wistar* tratados com aloxano (150 mg/kg) e extrato etanólico das folhas de *Eugenia floccosa* Bedd, em grupos diferentes nas doses de 150 e 300 mg/kg, durante 14 dias. Os ratos diabéticos tratados com extrato exibiram decréscimo da glicose no sangue, a uma taxa aproximada de 47,5% para a dose de 150 mg/kg e 62,0% para a dose de 300 mg/kg. O resultado encontrado para o decréscimo da glicose de jejum, no tratamento dos ratos do presente estudo com EB, na dose de 200 mg/kg (38%), se mostrou bem próximo, porém um pouco inferior, aos resultados dos pesquisadores acima citados. Deve-se levar em consideração, também, que alguns parâmetros utilizados pelos pesquisadores foram diferentes, como o solvente extrator, as doses de aloxano usada na indução do diabetes e de extrato nos tratamentos e o tempo de tratamento dos animais.

Shankar e Suthakaran (2014) avaliaram o perfil glicêmico em ratos *Wistar* tratados com aloxano (150 mg/kg) e extrato etanólico 50% (v/v) das folhas de *Eugenia jambolana*, nas doses de 200 e 400 mg/kg, durante 20 dias. Os pesquisadores observaram uma redução significativa nos níveis de glicose plasmática dos animais, com valores aproximados de 34,7% e 43,96% para cada uma das doses administradas, respectivamente. Os resultados para os valores obtidos com a dose de 200 mg/kg foram inferiores aos do presente estudo com EB de *E. florida* DC. Isto pode ser justificado pelo fato de que EB foi preparado com etanol 70% (v/v), que pode ter concentrado uma maior quantidade de compostos com atividade antidiabética do que o extrato preparado pelos pesquisadores deste trabalho.

De acordo com os resultados obtidos pelas triagens fitoquímicas, pela identificação por MS e pela quantificação dos compostos, esses mecanismos podem estar correlacionados com a presença dos flavonoides e outros polifenóis, atuando de forma separada ou em sinergia para provocar o efeito hipoglicêmico (BALIGA et al., 2013). Segundo Negri (2005), tal efeito hipoglicêmico pode ser devido a diversos mecanismos de ação destes compostos como, por exemplo, aumento na metabolização da glicose, diminuição da perda de glicogênio, resistência hormonal ao aumento da glicose, correção de desordens metabólicas, dentre outros.

Além disso, o efeito hipoglicemiante observado com EB, neste estudo, não exclui a possibilidade de se obter uma atividade antidiabética com amostras da mesma espécie, coletadas em outras regiões do país e em outra época do ano. Também existe a possibilidade dos princípios ativos de ação hipoglicemiante estarem concentrados em outras partes da planta, como os frutos, flores, cascas do caule e raízes (PEPATO et al., 2001).

A frutossamina é o nome genérico dado a todas as proteínas séricas que foram glicadas, sendo que, dentre estas, a albumina é o componente majoritário. O objetivo da dosagem deste parâmetro em soro remete-se à mensuração do processo de glicação proteica, que resulta da interação entre a glicose plasmática e o aminoácido lisina, presente nas moléculas de proteínas. A albumina apresenta um tempo de meia-vida bastante pequeno, em torno de 2 a 4 semanas aproximadamente. Por isso, em indivíduos diabéticos, os níveis de frutossamina refletem o controle glicêmico dos últimos 20 dias anteriores à coleta do sangue (COHEN et al., 2003).

Com os resultados obtidos pela dosagem de frutossaminas (Tabela 9), pode-se observar que, no período de 30 dias de tratamento com EB de *Eugenia florida* DC, ocorreu uma ligeira glicação das proteínas, observada no grupo D (diabético não tratado – DN), com valor dosado em 183,41  $\mu\text{mol/L}$ . Comparando-se os valores obtidos para os grupos C e D, nota-se que são estatisticamente diferentes, sendo que ocorreu uma diminuição equivalente a 31% dos níveis de frutossamina no grupo dos diabéticos tratados (Grupo C).

Estes resultados demonstram um grande interesse, pois estão de acordo com a maioria dos estudos que demonstram uma correlação positiva entre níveis de proteínas glicadas em amostras sanguíneas e a prevalência de complicações crônicas induzidas pelo diabetes *mellitus* (RONDEAU; BOURDON, 2011).

### 5.10.2 Avaliação da função renal – ureia e creatinina

Considerada como o principal produto oriundo do metabolismo das proteínas, a ureia é sintetizada no fígado, a partir do gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e da amônia, sendo filtrada nos rins, onde a maior parte é excretada na urina. Trata-se de um marcador de grande importância em situações que envolvem alterações primárias das funções e condições renais. Entretanto, a dosagem de ureia não é tão específica para avaliar a função renal de um indivíduo, pois os teores deste metabólito são influenciados por fatores extrarrenais, tais como o grau de hidratação e a dieta (BURTIS; ASHWOOD, 2008).

Desta maneira, a dosagem de creatinina tem sido utilizada, com maior frequência e com maior exatidão, para avaliar a função renal de um indivíduo. A creatinina é um produto originário do metabolismo muscular, obtido através da decomposição da fosfocreatina, sendo produzida no organismo, a uma taxa constante, e excretada pela urina em pequenas quantidades. Os níveis de creatinina no sangue e na urina podem ser utilizados para calcular a depuração da creatinina, que reflete a taxa de filtração glomerular (TFG), clinicamente importante para a função renal (PONHONG et al., 2015).

Dessa forma, foram avaliados os níveis de ureia e creatinina no soro dos animais pertencentes aos diferentes grupos estudados. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Avaliação da função renal em ratos *Wistar* submetidos ou não ao tratamento com EB de *Eugenia florida* DC.

<b>Grupo</b>	<b>Ureia (mg/dL)</b>	<b>Creatinina (mg/dL)</b>
A (controle tratado – CT)	37,33 ± 3,50 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,05 <sup>a</sup>
B (controle não tratado – CN)	40,05 ± 3,45 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,07 <sup>a</sup>
C (diabético tratado – DT)	82,12 ± 20,07 <sup>b</sup>	0,43 ± 0,06 <sup>a</sup>
D (diabético não tratado – DN)	90,89 ± 33,02 <sup>b</sup>	0,47 ± 0,11 <sup>a</sup>

Fonte: Do autor.

Legenda: As determinações foram realizadas em amostra de soro, obtidas após a eutanásia dos ratos. Os resultados representam a média ± desvio padrão de cada grupo, com valor de n = 10. Os resultados de cada teste foram analisados separadamente. Médias com letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott e Knott, (1974), sendo p < 0,05. EB – extrato bruto hidroetanólico 70% v/v.

Pode-se observar, pelos dados da Tabela 10, que não houve diferença significativa entre os níveis de ureia no soro dos animais controles (grupos A e B), bem como entre os grupos de animais diabéticos (grupos C e D). Porém, os valores obtidos para os grupos diabéticos foram estatisticamente diferentes (maiores) dos grupos não-diabéticos, indicando que a indução do diabetes nos ratos causou o aumento de ureia na corrente sanguínea dos mesmos. Não foi observada uma diminuição significativa na concentração de ureia, após o tratamento dos animais diabéticos com EB de *E. florida* DC, indicando que o extrato não foi capaz de diminuir os valores deste parâmetro.

A desidratação foi observada durante todo o tempo de tratamento dos ratos diabéticos e, por isso, este parâmetro, associado com a alta poliúria e hiperglicemia dos animais diabéticos, pode ter contribuído no aumento da reabsorção tubular e/ou na síntese de ureia nestes animais (BURTIS; ASHWOOD, 2008).

A lesão renal é um parâmetro clínico, de caráter crônico, muito frequente em indivíduos acometidos por diabetes *mellitus* e em modelos de animais diabéticos induzidos por aloxano. Os danos causados pela lesão renal têm associação direta com as altas taxas de glicose e/ou de proteínas glicadas, como a frutossamina, na corrente sanguínea. Sabe-se também que, em casos de lesão renal, os níveis de ureia e creatinina apresentam-se elevados. (BASTOS; BREGMAN; KIRSZTAJN, 2010; MORESCO et al., 2013).

No presente estudo, observamos que, mesmo com a indução do diabetes e com a administração do EB de *E. florida* DC, não houve alterações significativas nos níveis de creatinina entre os grupos de animais. Isto pode sugerir ausência de lesão renal severa nos ratos durante os 30 dias de análise. É conhecido que a hiperglicemia pode levar ao aumento do catabolismo protéico e desidratação, sendo que estes fatores poderiam justificar o aumento dos níveis séricos de ureia observados nos animais diabéticos (MORESCO et al., 2013).

Além disso, como os efeitos do extrato não se mostraram significativos nos grupos em que este foi administrado (grupos A e C) em comparação aos demais grupos, pode ter ocorrido ausência de toxicidade dos constituintes das plantas, evidenciada pela não elevação da creatinina plasmática nos animais. Outro fator que também deve ser levado em consideração é que os níveis séricos de ureia são elevados de forma bem mais rápida do que os de creatinina em animais diabéticos (BWITITI; MUSABAYANE; NHACHI, 2000).

Os resultados encontrados no presente trabalho divergem daqueles encontrados nos poucos trabalhos da literatura, que realizaram a avaliação da função renal (teores de ureia e creatinina) em ratos diabéticos tratados com extratos de plantas da família Myrtaceae.

Jelastin, Tresina e Mohan (2012) avaliaram os teores de ureia e creatinina em ratos *Wistar* tratados com aloxano (150 mg/kg) e extrato etanólico das folhas de *Eugenia floccosa* Bedd, em grupos diferentes nas doses de 150 e 300 mg/kg, durante 14 dias. O extrato administrado aos ratos diabéticos, após o período estabelecido, reverteu o nível de uréia e creatinina para próximo dos valores encontrados para os grupos controles.

Lin e Yin (2012) avaliaram as alterações na função renal (níveis de ureia e creatinina) de ratos diabéticos, induzidos com estreptozotocina, após o tratamento com os extratos aquoso e etanólico 50% (v/v) dos frutos de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae), nas dosagens de 1% e 2%. Os autores observaram que apenas a administração dos dois extratos, na concentração de 2%, nos grupos de tratamento, geraram resultados nos teores de ureia e creatinina estatisticamente menores do que os apresentados pelo grupo de ratos diabéticos não-submetidos aos tratamentos. Estes resultados se mostraram divergentes aos encontrados no presente trabalho, em que os teores de ureia e creatinina não foram alterados significativamente nos grupos de tratamento.

### **5.10.3 Avaliação da função hepática – AST e ALT**

A determinação da atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) permite avaliar a presença de alterações na permeabilidade e na função dos hepatócitos, uma vez que a ALT é encontrada principalmente no citoplasma, enquanto que, aproximadamente, 80% da AST estão localizadas principalmente no interior das mitocôndrias destas células (TOLEDO et al., 2013).

Qualquer lesão tissular ou doença que afeta o parênquima hepático, irá liberar uma maior quantidade das enzimas para a corrente sanguínea, elevando os níveis séricos da AST e da ALT. Em geral, as causas mais comuns de elevação dos valores de ALT no sangue ocorrem por disfunção hepática. Desta maneira, a ALT, além de ser sensível, é também bastante específica para o diagnóstico de doença hepatocelular. A relação ALT/AST tem sido empregada, algumas vezes, para auxiliar no diagnóstico diferencial das hepatopatias (BURTIS; ASHWOOD, 2008).

Assim, foi avaliado também o efeito do EB de *E. florida* DC sobre a atividade das enzimas AST e ALT, cujos resultados estão expressos na Tabela 11.



Tabela 11 – Avaliação da função hepática em ratos *Wistar* submetidos ou não ao tratamento com EB de *Eugenia florida* DC.

<b>Grupo</b>	<b>AST (U/L)</b>	<b>ALT (U/L)</b>
A (controle tratado – CT)	119,67 ± 20,80 <sup>a</sup>	49,00 ± 6,25 <sup>a</sup>
B (controle não tratado – CN)	121,33 ± 16,42 <sup>a</sup>	48,00 ± 8,37 <sup>a</sup>
C (diabético tratado – DT)	170,63 ± 14,25 <sup>b</sup>	64,86 ± 5,67 <sup>b</sup>
D (diabético não tratado – DN)	170,80 ± 11,86 <sup>b</sup>	66,57 ± 8,37 <sup>b</sup>

Fonte: Do autor.

Legenda: As determinações foram realizadas em amostra de soro, obtidas após a eutanásia dos ratos. Os resultados representam a média ± desvio padrão de cada grupo, com valor de n = 10. Os resultados de cada teste foram analisados separadamente. Médias com letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott e Knott, (1974), sendo  $p < 0,05$ . EB – extrato bruto hidroetanólico 70% v/v; AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase.

Como descrito na Tabela 11, nos grupos de ratos diabéticos tratados e normais (C e D, respectivamente), verificou-se uma elevação das enzimas hepáticas AST e ALT, em comparação com os grupos controles (A e B), indicando disfunção hepática, que pode ter sido induzida pela ação do aloxano. Esta droga, de um modo geral, provoca o rompimento ou a ação permeativa à membrana dos hepatócitos (AGBAI; NWANEGWOE, 2013).

Observou-se também que o extrato administrado ao grupo C (diabéticos tratados) não interferiu estatisticamente nos valores de ALT e AST, uma vez que não demonstrou uma tendência em reduzir os níveis destas enzimas. Dessa forma, sugere-se que a ingestão do EB de *E. florida* DC, durante o período de 30 dias, não exerceu ação deletéria no tecido hepático dos ratos diabéticos.

#### **5.10.4 Determinação do perfil lipídico – colesterol total (CT), HDL, n-HDL e triglicerídeos**

O colesterol é o principal esteroide do organismo, estando presente em todas as células como um componente estrutural das membranas e das lipoproteínas (HDL, VLDL e principalmente LDL). É também o precursor na formação dos hormônios esteróides pelas gônadas e córtex adrenal. Cerca de 70 a 75% do colesterol plasmático encontra-se na forma de éster e 25 a 30% existe como colesterol livre. O colesterol endógeno é produzido pelo

fígado e outros tecidos. Valores aumentados de colesterol são encontrados em diversas síndromes metabólicas, como nas doenças cardiovasculares e no diabetes *mellitus* (BURTIS; ASHWOOD, 2008).

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) exercem uma ação importante na concentração do colesterol nos tecidos. Atuam, ainda, no retorno do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado. As lipoproteínas de baixa densidade e de muito baixa densidade (LDL e VLDL, respectivamente) são as principais proteínas de transporte do colesterol. São as partículas mais aterogênicas do sangue, pois elas contêm cerca de dois terços de todo o colesterol plasmático (BURTIS; ASHWOOD, 2008).

Os triglicerídeos são ésteres de glicerol e ácidos graxos provenientes da dieta ou sintetizados no fígado. São transportados no plasma pelas lipoproteínas até o tecido adiposo, músculo e outros locais, onde são utilizados como fonte de energia celular. Os seus valores estão elevados em distúrbios metabólicos, como o diabetes *mellitus* (BURTIS; ASHWOOD, 2008).

Segundo Brouillette e colaboradores, (2001), o metabolismo de lipoproteínas em ratos é muito diferente daquele dos seres humanos, pois o HDL é a principal fração da lipoproteína no plasma murino, o HDL murino é monodisperso, enquanto nos humanos é polidisperso, e os níveis de LDL no plasma de ratos são muito baixos. Por conta desta afirmação, não se utiliza a fórmula clássica proposta por Friedewald, Levy e Fredrickson (1972),

Desta maneira, foi avaliado o efeito do EB de *E. florida* DC sobre o perfil lipídico dos ratos, cujos resultados estão expressos na Tabela 12.

Tabela 12 – Avaliação do perfil lipídico em ratos *Wistar* submetidos ou não ao tratamento com EB de *Eugenia florida* DC.

Grupo	CT (mg/dL)	HDL (mg/dL)	n-HDL (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
A (controle tratado – CT)	57,92 ± 4,54 <sup>a</sup>	41,50 ± 3,06 <sup>a</sup>	16,42 ± 3,87 <sup>a</sup>	62,25 ± 14,83 <sup>a</sup>
B (controle não tratado – CN)	57,44 ± 6,95 <sup>a</sup>	39,22 ± 4,06 <sup>a</sup>	18,22 ± 3,53 <sup>a</sup>	77,11 ± 20,76 <sup>a</sup>
C (diabético tratado – DT)	74,33 ± 5,07 <sup>b</sup>	54,63 ± 6,74 <sup>c</sup>	25,33 ± 7,43 <sup>b</sup>	126,80 ± 19,23 <sup>b</sup>
D (diabético não tratado – DN)	76,88 ± 11,63 <sup>b</sup>	49,00 ± 6,06 <sup>b</sup>	22,25 ± 7,19 <sup>b</sup>	157,83 ± 26,23 <sup>c</sup>

Fonte: Do autor.

Legenda: As determinações foram realizadas em amostra de soro, obtidas após a eutanásia dos ratos. Os resultados representam a média ± desvio padrão de cada grupo, com valor de n = 10. Os resultados de cada teste foram analisados separadamente. Médias com letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott e Knott, (1974), sendo p < 0,05. EB – extrato bruto hidroetanólico 70% v/v; CT – colesterol total; HDL – lipoproteína de alta densidade; n-HDL – lipoproteínas aterogênicas.

De acordo com a Tabela 12, pode-se perceber que os níveis de CT, HDL, n-HDL e triglicerídeos no soro dos animais diabéticos (C e D) se apresentaram significativamente maiores do que nos grupos controles (A e D), indicando que a indução do diabetes pelo aloxano foi relativamente suficiente para alterar o perfil lipídico.

Nos ratos diabéticos, sugere-se que ocorre aumento da atividade enzimática da lipase lipoproteica, que, ao mesmo tempo, proporciona um aumento na lipólise e, com isso, a concentração de ácidos graxos na corrente sanguínea torna-se mais elevada. Esse aumento da concentração dos ácidos graxos favorece o processo de  $\beta$ -oxidação, produzindo mais acetil-CoA e, conseqüentemente, uma maior concentração de colesterol no sangue. Associando-se esses fenômenos com a hiperglicemia apresentada pelos animais dos grupos diabéticos (C e D), é possível sugerir também que ocorreu diminuição da atividade da insulina, responsável por promover a remoção dos receptores mediadores de partículas aterogênicas (JELASTIN; TRESINA; MOHAN, 2012).

Por outro lado, sabe-se que o glucagon, as catecolaminas e outros hormônios também podem aumentar a lipólise. Assim, a hiperlipidemia está intimamente relacionada com o quadro clínico do diabetes *mellitus* e pode, portanto, ser considerada como uma consequência das ações desinibidas de hormônios lipolíticos sobre os depósitos de gordura (RAVI; RAJASEKARAN; SUBRAMANIAN, 2005).

Shanmugam e colaboradores, (2009), relataram que a hipertrigliceridemia é um achado comum em pacientes com diabetes *mellitus* e responsável por complicações vasculares. Além disso, a deficiência da atividade da lipase lipoproteica (LPL) pode contribuir de forma significativa para a elevação dos níveis de triglicerídeos no diabetes.

Porém, observa-se, pelos dados da Tabela 16, que, no tratamento dos ratos diabéticos do grupo C com EB de *E. florida* DC, não houve diferenças estatisticamente significativas nos níveis de CT e n-HDL, comparadas ao grupo de diabéticos não tratados (grupo D), mas houve uma diferença significativa nos níveis de HDL e triglicerídeos, em que os valores de HDL tiveram um ligeiro aumento no grupo C, enquanto os níveis de triglicerídeos se apresentaram diminuídos.

Segundo Grundy e colaboradores (1999), o aumento do nível de HDL e a diminuição de triglicerídeos no soro de animais, através de uma terapia dietética, administração de fármaco ou de algum extrato vegetal, parece estar associado a uma diminuição no risco de uma possível doença cardiovascular, devido à diminuição do efluxo de colesterol sobre a parede do vaso e o seu conseqüente transporte no sentido reverso.

De acordo com o trabalho de Tchoua e colaboradores (2008), uma das principais estratégias que sugerem o aumento dos níveis de HDL em ratos diabéticos é através da inibição da proteína plasmática transportadora de ésteres de colesterol (CETP), responsável por mediar a transferência de moléculas de colesterol HDL para as lipoproteínas aterogênicas, ricas em triglicerídeos. Porém, sabe-se que um pequeno percentual de CETP está presente no interior das células e não é conhecido se a inibição da CETP plasmática ocasiona também a inibição da CETP intracelular, além de que é desconhecido se o desempenho desta última é superior ao da primeira. Outra possibilidade é que a inibição de CETP pode ter um efeito positivo, através da elevação do nível de HDL, e um efeito negativo, através do bloqueio de uma via importante de eliminação de colesterol pelos receptores de LDL. O resultado final seria um equilíbrio entre esses dois parâmetros.

Apesar da dose administrada aos ratos não apresentar efeito sobre o CT e sobre a concentração total de partículas aterogênicas (n-HDL), ainda é possível sugerir que o EB obtido das folhas de *E. florida* DC apresentou efeito benéfico sobre o perfil lipídico no soro de animais diabéticos, evidenciadas pela diminuição do teor de triglicerídeos e do aumento de colesterol HDL plasmáticos. Este efeito poderia ser atribuído à presença de compostos fenólicos, identificados nas análises fitoquímicas do presente estudo.

Sharma, Balomajumder e Roy (2008), estudando o extrato etanólico das sementes de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) sobre a lipemia de ratos diabéticos, também observaram redução nos níveis de triglicerídeos e aumento dos níveis de HDL, porém, diferentemente do presente estudo, os pesquisadores observaram também diminuição no teor de colesterol total e LDL.

#### **5.10.5 Determinação da peroxidação lipídica**

O controle da peroxidação lipídica *in vivo* é importante, pois contribui para a prevenção do desenvolvimento da aterosclerose. Os produtos de peroxidação lipídica, em particular os aldeídos citotóxicos, como o MDA, devem ser monitorados, pois eles podem causar danos ao DNA das células (GWARZO et al., 2014).

A peroxidação lipídica pode ser prevenida na fase inicial por ações dos compostos antioxidantes, através da inibição da cadeia de peroxidação. Na investigação fitoquímica de *E. florida* DC, do presente trabalho, obteve-se informações importantes de componentes ativos

da planta, como os compostos fenólicos da classe dos taninos, flavonoides e ácidos fenólicos, sugerindo, então, o envolvimento destes compostos na diminuição dos teores de MDA em fígado e rins de ratos diabéticos tratados (GWARZO et al., 2014).

Os resultados dos efeitos do EB de *E. florida* DC sobre a peroxidação lipídica no fígado e rins dos animais são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Concentrações de proteínas totais e malondialdeído nos homogeneizados de fígado e rins de ratos *Wistar* submetidos ou não ao tratamento com EB de *Eugenia florida* DC.

Grupo	Proteínas totais-F ( $\mu\text{g/mL}$ )	Proteínas totais-R ( $\mu\text{g/mL}$ )	MDA-F ( $\eta\text{mol/mg proteína}$ )	MDA-R ( $\eta\text{mol/mg proteína}$ )
A (controle tratado – CT)	$0,31 \pm 0,06^a$	$0,20 \pm 0,05^a$	$3,29 \pm 0,76^a$	$3,45 \pm 0,68^a$
B (controle não tratado – CN)	$0,27 \pm 0,04^a$	$0,26 \pm 0,04^b$	$3,26 \pm 0,58^a$	$3,51 \pm 0,53^a$
C (diabético tratado – DT)	$0,25 \pm 0,05^a$	$0,31 \pm 0,09^b$	$10,93 \pm 0,76^b$	$21,52 \pm 0,62^b$
D (diabético não tratado – DN)	$0,24 \pm 0,03^a$	$0,25 \pm 0,02^{ab}$	$13,27 \pm 0,59^c$	$24,98 \pm 0,54^c$

Fonte: Do autor.

Legenda: As determinações foram realizadas em amostra de soro, obtidas após a eutanásia dos ratos. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo, com valor de  $n = 10$ . Os resultados de cada teste foram analisados separadamente. Médias com letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott e Knott, (1974), sendo  $p < 0,05$ . EB – extrato bruto hidroetanólico 70% v/v; F – fígado; R – rins; MDA – malondialdeído.

Uma das técnicas laboratoriais mais utilizadas para se avaliar a peroxidação de lipídios é o teste do TBARS, em que o malondialdeído (MDA) é formado como um produto secundário, durante a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI). Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), o MDA reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos, para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível. A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos, que podem ser determinados por absorção no visível (532 nm) ou por fluorescência ( $\lambda_{\text{excitação}} = 515 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{emissão}} = 553 \text{ nm}$ ) (LIMA; ABDALLA, 2001).

A manutenção de níveis normais de MDA hepático e renal é de grande interesse, pois se trata de um importante aldeído, resultante da peroxidação dos tecidos biológicos, sendo um indicador de danos histológicos (ANSARI et al., 2014)

Neste estudo, foram quantificados os teores de MDA no fígado e nos rins dos grupos de ratos. De acordo com a Tabela 13, observou-se que os níveis deste composto nos grupos diabéticos (C e D) aumentaram em relação aos grupos controles (A e B). Esse aumento pode ser decorrente de uma produção exagerada de espécies oxidantes, comumente observada no diabetes *mellitus* (ANSARI et al., 2014).

O consumo, durante 30 dias, do EB das folhas de *E. florida* DC foi ligeiramente efetivo na redução da produção de MDA nos fígados e nos rins de ratos, conforme a Tabela 13, o que indica que os extratos hidroetanólicos desta espécie vegetal pode conferir certa proteção à membrana celular contra o ataque oxidativo.

## 6 CONCLUSÕES

A análise granulométrica da droga vegetal, obtida das folhas de *E. florida* DC, permitiram estabelecer especificações de qualidade, servindo de referência para assegurar a reprodutibilidade de estudos posteriores.

O estudo químico (triagem e caracterização por MS) do extrato bruto (EB) das folhas de *E. florida* DC revelou a presença de compostos fenólicos, terpenoides e saponinas, de acordo com a literatura relatada para o gênero *Eugenia* sp.

Foram verificados que os extratos EB e M-EtOAc foram os que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos, e EB e M-MeOH foram os que demonstraram conter a maior quantidade de flavonoides e taninos. A importância dessas determinações foi correlacionar os teores encontrados com o tipo de extrato, com a triagem fitoquímica e com as diversas atividades biológicas comprovadas destes compostos.

Na determinação da atividade antirradicalar, o valor de CE<sub>50</sub> para EB apresentou-se aproximado ao obtido com o padrão de quercetina, indicando uma excelente atividade. Os macerados apresentaram atividade bem menor, sendo que, em nenhum deles, a porcentagem de sequestro de radicais DPPH foi alta.

O M-MeOH foi o que se mostrou mais ativo contra *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. O EB apresentou valores de MIC<sub>50</sub> iguais ao M-MeOH para *C. krusei* e *C. glabrata*, porém não demonstrou atividade para *C. parapsilosis*. *C. parapsilosis* foi a que se apresentou mais resistente à ação dos extratos testados. Todos os extratos foram pouco efetivos para as bactérias usadas no ensaio.

Nenhum dos extratos foi efetivo para inibir o crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* utilizadas no teste, porém os resultados não excluem a ação leishmanicida da espécie *Eugenia florida* DC.

O tratamento de ratos diabéticos reduziu os teores de glicemia, frutossamina e triglicerídeos, bem como proporcionou o aumento dos níveis de HDL. A administração do EB não apresentou efeito benéfico sobre a função renal nos animais diabéticos, na atividade de AST e ALT e nos níveis de colesterol e n-HDL. Porém, ocorreu melhora nos danos oxidativos hepáticos e renais nos animais diabéticos tratados, observada pela redução do nível de MDA.

Em função dos resultados encontrados, pode-se concluir que a espécie *E. florida* DC apresenta metabólitos secundários com potenciais ações biológicas, como os flavonoides, os taninos e as saponinas.

## REFERÊNCIAS

- AGBAI, E. O.; NWANEGWO, C. O. Effect of methanolic extract of *Annona muricata* seed on liver function enzymes in alloxan-induced diabetic male mice. **Journal of Science and Multidisciplinary Research**, v. 5, n. 2, p. 74-83, 2013.
- AHMED, A. A. et al. *In vitro* *Leishmania* major promastigote-induced macrophage migration is modulated by sensory and autonomic neuropeptides. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 48, n. 1, p. 79-85, 1998.
- AHMED, O. M. et al. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects and the probable mechanisms of action of *Ruta graveolens* infusion and rutin in nicotinamide-streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetologia Croatica**, v. 39, n. 1, p. 15-35, 2010.
- AJAO, M. Y.; AKINDELE, A. J. Anxiolytic and sedative properties of hydroethanolic extract of *Telfairia occidentalis* leaves in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 301-309, 2013.
- ALI, M. A. et al. Antidiabetic and antioxidant activities of ethanolic extract of *Semecarpus anacardium* (Linn.) bark. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2015.
- ALMEIDA, F. M.; ALVES, M. T. S. S. B.; AMARAL, F. M. M. Uso de plantas com finalidade medicinal por pessoas vivendo com HIV/AIDS em terapia antirretroviral. **Saúde e Sociedade**, v. 21, n. 2, p. 424-434, 2012.
- ALVES, T. M. A. et al. Molluscicidal saponins from *Guaiacum officinale* (Zygophyllaceae). **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, n. 2, p. 81-86, 1996.
- ANSARI, A. et al. *Emblica officinalis* improves glycemic status and oxidative stress in STZ induced type 2 diabetic model rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 1, p. 21-25, 2014.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Premier, 2000, 177 p.
- ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Contribuições das plantas medicinais para o cuidado e a promoção da saúde na atenção primária à saúde. **Interface – Comunicação, Saúde, Educação**, v. 17, n. 46, p. 615-633, 2013.



ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Fitoterapia na atenção primária à saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 3, p. 541-553, 2014.

ANTUNES, M. V. et al. Estudos pré-analíticos e da validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 187-279, 2008.

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 402-407, 2006.

ARANTES, V. P. **Estudo da atividade antimicrobiana de extratos vegetais do cerrado brasileiro**. 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2005.

ARAÚJO, A. S. et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. **The Analyst**, v. 130, n. 6, p. 884-889, 2005.

ARAÚJO, I. S. **Atividade antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no Estado do Pará**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

ARDILES, A. E. et al. Studies of naturally occurring friedelane triterpenoids as insulin sensitizers in the treatment type 2 diabetes *mellitus*. **Phytochemistry**, v. 84, n. 1, p. 116-124, 2012.

ATMANI, D. et al. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 303-309, 2009.

AURICCHIO, M. T. et al. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 76-81, 2007.

AZEVEDO, L. F. P. et al. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) S.w. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 209-215, 2014.

AZEVEDO, P. R. et al. Antimicrobial activity and phytochemical screening of branches, fruits and leaves of *Eugenia brejoensis*. **Scientia Plena**, v. 8, n. 5, p. 1-4, 2012.

AZUMA, K. et al. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3963-3966, 1999.

BAG, A. et al. *In vitro* antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens. **Microbiological Research**, v. 167, n. 6, p. 352-357, 2012.

BAGRI, P. et al. New flavonoids from *Punica granatum* flowers. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 2, p. 201-204, 2010.

BAKER, J. R. et al. Use of protein-based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. **Clinical Chemistry**, v. 31, n. 9, p. 1550-1554, 1985.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALDEA, L. A. N. et al. Inhibition of intestinal glucose absorption by anti-diabetic medicinal plants derived from the James Bay Cree traditional pharmacopeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 2, p. 473-482, 2010.

BALIGA, M. S. et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 1776-1789, 2011.

BALIGA, M. S. et al. Scientific Validation of the Antidiabetic Effects of *Syzygium jambolanum* DC (Black Plum), a Traditional Medicinal Plant of India. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 19, n. 3, p. 191-197, 2013.

BARONE, B. et al. Cetoacidose diabética em adultos: atualização de uma complicação antiga. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 9, p. 1434-1447, 2007.

BARROS, L. et al. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1576-1582, 2012.

BASTOS, D. H. M. et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423-432, 2007.

BASTOS, M. G.; BREGMAN, R.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 248-253, 2010.

BEAN, D. C.; LIVERMORE, D. M.; HALL, L. M. C. Plasmids imparting sulfonamide resistance in *Escherichia coli*: implications for persistence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 1088-1093, 2009.

BELÉM LIMA, A. M. **Extração seletiva de ácidos triterpênicos de folhas de espécies de Myrtaceae utilizando etanol alcalinizado**. 2014. 128 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

BELLAMY, L. J.; NORDON, A.; LITTLEJOHN, D. Effects of particle size and cohesive properties on mixing studied by non-contact NIR. **International Journal of Pharmaceutics**, 361, n. 1-2, p. 87-91, 2008.

BERGMEYER, H. U.; SCHEIBE, P.; WAHLEFELD, A. W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. **Clinical Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 58-73, 1978.

BOKESCH, H. R. et al. HIV-1 ribonuclease H inhibitory phenolic glycosides from *Eugenia hyemalis*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1634-1636, 2008.

BOVANOVA, L.; BRANDŠTETEROVÁ, E.; BAXA, S. HPLC determination of stevioside in plant material and food samples. **European Food Research & Technology**, v. 207, n. 5, p. 352-355, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed, v. 1, p. 92. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de junho de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 de maio de 2006.

BROUILLETTE, C. G. et al. Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1531, n. 1-2, p. 4-46, 2001.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-820, 2001.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2675-2685, 2012.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2012, 2112 p.

BÜNGER, M. O. **Myrtaceae na Cadeia do Espinhaço**: A flora do Parque Estadual do Itacolomi (Ouro Preto/Mariana) e uma análise das relações florísticas e da influência das variáveis geoclimáticas na distribuição das espécies. 2011. 150 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

BURSTEIN, M.; SCHOLNICK, H. R.; MORFIN, R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. **Journal of Lipid Research**, v. 11, n. 6, p. 583-595, 1970.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry**. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2008.

BWITITI, P; MUSABAYANE, C. T.; NHACHI, C. F. B. Effects of *Opuntia megacantha* on blood glucose and kidney function in streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 3, p. 247-252, 2000.

CABELLO-HURTADO, F; GICQUEL, M.; ESNAULT, M. Evaluation of the antioxidant potential of cauliflower (*Brassica oleracea*) from a glucosinolate content perspective. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 1003-1009, 2012.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131-134, 2005.

CAO, G. et al. Investigation of the chemical changes from crude and processed *Paeoniae Radix alba-atractylodis macrocephalae* rhizoma herbal pair extracts by using Q exactive high-performance benchtop quadrupole-orbitrap LC-MS/MS. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, n. 1, p. 1-14, 2014.

CARVALHO JÚNIOR, A. R. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 477-482, 2014.

CASTRO, M. M.; MACHADO, S. R. Células e tecidos secretores. In: APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2003, p. 17-203.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 105-108, 2004.

CHANEY, A. L; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 130-132, 1961.

CHARROUF, Z. et al. Separation and characterization of phenolic compounds in argan fruit pulp using liquid chromatography–negative electrospray ionization tandem mass spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1398-1401, 2007.

CHATTERJEE, K. et al. Antidiabetic and antioxidative activity of ethyl acetate fraction of hydromethanolic extract of seed of *Eugenia jambolana* Linn through *in vivo* and *in vitro* study and its chromatographic purification. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 1, p. 21-30, 2012.

CHAVES, E. M. F.; BARROS, R. F. M. Diversidade e uso de recursos medicinais do carrasco na APA da Serra da Ibiapaba, Piauí, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 476-486, 2012.

CHEN, H.; TAPPEL, A. L. Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidations induced by CBrCl<sub>3</sub> in liver, lung, heart, and spleen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 854-858, 1996.

CHIARI, B. G. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L.** 2011. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard-Sixth edition. M7-A6.** Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard-Third edition. M27-S4.** Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

COHEN, R. M. et al. Discordance between HbA<sub>1c</sub> and fructosamine. **Diabetes Care**, v. 26, n. 1, p. 163-167, 2003.

COSTA, R. S. et al. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (*spray-drying*) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 169-174, 2009.

COUTINHO, H. D. et al. Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 4, p. 1024-1026, 2010.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** New York: Columbia Univ. Press., 1991.

CUNHA, A. M. et al. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia fortificata* Link. **Phytomedicine**, v. 17, n. 1, p. 37-41, 2010.

DASGUPTA, S. et al. Nosocomial infections in the intensive care unit: Incidence, risk factors, outcome and associated pathogens in a public tertiary teaching hospital of Eastern India. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 19, n. 1, p. 14-20, 2015.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99-109, 2015.

DHANABAL, S. P. et al. Hypoglycemic effect of alcoholic extract of various species of *Passiflora* on alloxan induced diabetes *mellitus* in albino rats. **Nigerian Journal of Natural Products and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 19-21, 2004.

DINIZ, L. F. **Avaliação do efeito do tratamento com benzimidazol em combinação com derivados azólicos na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi***. 2013. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 759-770, 2009.

DORNAS, W. C. et al. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUNBAR, L. M. Current issues in the management of bacterial respiratory tract disease: the challenge of antibacterial resistance. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 326, n. 6, p. 360-368, 2003.

EL-BENNA, J. et al. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 53, n. 3, p. 199-206, 2005.

ENGELS, C. et al. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 557-562, 2012.

EZATPOUR, B. et al. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial effects of *Pistacia khinjuk* against *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. 1, p. 1-6, 2015.

FABINY, D. L.; ERTINGHAUSEN, G. Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the Centrifichem. **Clinical Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 696-700, 1971.

FAN, L. et al. Chemical constituents from the roots and stems of *Erycibe obtusifolia* and their *in vitro* antiviral activity. **Planta Medica**, v. 79, n. 16, p. 1558-1564, 2013.

FANG, X. et al. Simultaneous extraction, identification and quantification of phenolic compounds in *Eclipta prostrata* using microwave-assisted extraction combined with HPLC–DAD-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 188, n. 1, p. 527-536, 2015.

FEILY, A. et al. *In vitro* activity of green tea extract against *Leishmania* major promastigotes. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 50, n. 3, p. 233-236, 2012.

FERNÁNDEZ-NATAL, M. I. et al. Draft genome sequences of *Corynebacterium krippenstedtii* CNM633/14 and CNM632/14, multidrug-resistant and antibiotic-sensitive isolates from nodules of granulomatous mastitis patients. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, p. 515-525, 2015.

FERREIRA, F. P. S. et al. *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 99, n. 1, p. 89-96, 2014.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. 1, p. 90-95, 2011.

FOULADVAND, M.; BARAZESH, A.; TAHMASEBI, R. Evaluation of *in vitro* antileishmanial activity of curcumin and its derivatives. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 24, p. 3306-3308, 2013.

FRANZON, R. C. et al. **Araçás do gênero *Psidium***: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Embrapa Cerrados: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, p. 325-345, 2009.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

FRIGHETTO, N. et al. Purification of betulinic acid from *Eugenia florida* (Myrtaceae) by high-speed counter-current chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 6, p. 411-414, 2005.

GALENO, D. M. L. et al. Extract from *Eugenia puniceifolia* is an antioxidant and inhibits enzymes related to metabolic syndrome. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 311-324, 2014.



GARMUS, T. T. et al. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, n. 1, p. 4-14, 2014.

GEMIN, C. A. B. **Estudo fitoquímico e avaliação de atividades biológicas do extrato etanólico de *Acicarpa spathulata* R.Br. (Calyceraceae)**. 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010.

GINGRAS, V. et al. Association between cardiometabolic profile and dietary characteristics among adults with type 1 diabetes *mellitus*. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2015.

GIORDANI, E. et al. Selected primary and secondary metabolites in fresh persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.): A review of analytical methods and current knowledge of fruit composition and health benefits. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1752-1767, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRUNDY, S. M. et al. Diabetes and cardiovascular disease – a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. **Circulation**, v. 100, n. 10, p. 1134-1146, 1999.

GU, J. et al. Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventive activity. **Phytochemistry**, v. 58, n. 1, p. 121-127, 2001.

GWARZO, M. Y. et al. Serum glucose and malondialdehyde levels in alloxan induced diabetic rats supplemented with methanolic extract of *Tacazzea apiculata*. **International Journal of Biomedical Science**, v. 10, n. 4, p. 236-242, 2014.

HAMMERSTONE, J. F. et al. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 490-496, 1999.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HOLETS, F. B. et al. Screening of some slants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HORI, K. et al. Chemical and chemotaxonomical studies of filices. LXXVII.: isolation and structure of novel catechin and proanthocyanidins from *Dennstaedtia distenta* Moore. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 11, p. 4301-4306, 1998.

IKAWA, M. et al. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the decoction of certain compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1811-1815, 2003.

JAISWAL, R; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for liquid chromatography/multi-stage spectrometric identification of 3,4,5-triacyl chlorogenic acids in green Robusta coffee beans. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 15, p. 2283-2294, 2010.

JASMINE, R. et al. Activity of *Eugenia jambolana*, an ethnomedical plant, against drug-resistant bacteria. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p. 405-410, 2010.

JAYAPRAKASAM, B.; NAIR, M. G. Cyclooxygenase-2 enzyme inhibitory withanolides from *Withania somnifera* leaves. **Tetrahedron**, v. 59, n. 6, p. 841-849, 2003.

JAYASINGHE, U. L. B.; WANNIGAMA, G. P.; MACLEOD, J. K. Glucuronides of *Diploclisia glaucescens*. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 20, n. 2, p. 131-137, 1998.

JELASTIN, K. S.; TRESINA, P. S.; MOHAN, V. R. Antioxidant, antihyperlipidaemic and antidiabetic activity of *Eugenia floccosa* Bedd. leaves in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 3, n. 1, p. 235-240, 2011.

JOHN, K. M. M. et al. Metabolic variations, antioxidant potential, and antiviral activity of different extracts of *Eugenia singampattiana* (an endangered medicinal plant used by Kani Tribals, Tamil Nadu, India) leaf. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 1, p. 1-11, 2014.

JONES, L. H.; ABDALLA, D. S. P.; FREITAS, J. C. Effects of indole-3-acetic on croton oil and arachidonic acid-induced mouse ear edema. **Inflammation Research**, v. 44, n. 9, p. 372-375, 1995.

JUNG, C. H. et al. The population-based risk of need for coronary revascularization according to the presence of type 2 diabetes *mellitus* and history of coronary heart disease in the Korean population. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. 1-12, 2015.

KALIA, K. et al. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosan-guinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 1129-1134, 2008.

KATO, E. et al. Identification of hydroxychavicol and its dimers, the lipase inhibitors contained in the Indonesian spice, *Eugenia polyantha*. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1239-1242, 2013.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, v. 90, n. 2, p. 55-62, 2013.

KC, K.; SHAKYA, S.; ZHANG, H. Gestational diabetes *mellitus* and macrosomia: a literature Review. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 66, n. 2, p. 14-20, 2015.

KOCEVSKI, D. et al. Antifungal effect of *Allium tuberosum*, *Cinnamomum cassia*, and *Pogostemon cablin* essential oils and their components against population of *Aspergillus* species. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 5, p. 731-737, 2013.

KRYSTON, T. B. et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 711, n. 1-2, p. 193-201, 2011.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, n. 1, p. 1-16, 2013.

KUMAR, T. D. K.; MURALI, H. S.; BATRA, H. V. Simultaneous detection of pathogenic *B. cereus*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* by multiplex PCR. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 283-289, 2009.

LA TORRE, G. L. et al. Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 640-650, 2006.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223-227, 2009.

LEITÃO, F. et al. Urban ethnobotany in Petrópolis and Nova Friburgo (Rio de Janeiro, Brazil). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, p. 333-342, 2009.

LIMA, G. S. **Estudo da atividade tripanossomicida e leishmanicida de extrato, frações e terpenos de *Croton cajucara* Benth.** 2014. 76 f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária) – Instituto de Patobiologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

LIMA, P. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMA, V. B. S. **Estado nutricional relativo ao zinco e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes diabéticos tipo 2.** 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

LIN, C.; YIN, M. Renal protective effects of extracts from guava fruit (*Psidium guajava* L.) in diabetic mice. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 3, p. 303-308, 2012.

LIU, Z.; LI, D.; OWEN, N. L. Oleanane triterpene saponins from the Chinese medicinal herb *Clinopodium chinensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 10, p. 1600-1604, 1995.

LUIZE, P. S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.

MA, W. et al. A review on adstringency and bitterness perception of tannins in wine. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, n. 1, p. 6-19, 2014.

MACHADO, K. E. et al. Antifungal activity of *Eugenia umbelliflora* against dermatophytes. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 9, p. 1181-1184, 2009.

MADDULURI, S.; SITARAM, B.; BALASEKHARAN, C. *In vitro* evaluation of anti-inflammatory activity of methanolic and ethanolic leaf extracts of five indigenous plants in South India. **International Journal of PharmTech Research**, v. 6, n. 2, p. 569-574, 2014.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. São Paulo: Artmed, 2010, 1128 p.

MADL, T. et al. Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of *Chenopodium quinoa*. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, n. 6, p. 795-806, 2006.

MAFIOLETI, L. et al. Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 576-582, 2013.

MAGINA, M. D. A. **Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero *Eugenia***. 2008. 199 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MÄMMELÄ, P. Phenolics in selected European hardwood species by liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry. **The Analyst**, v. 126, n. 9, p. 1535-1538, 2001.

MANSUETO, P. et al. Leishmaniasis in travelers: a literature review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, n. 6, p. 563-581, 2014.

MARKUSZEWSKI, L. et al. Usefulness of measurement of glucose and glycosylated hemoglobin levels in patients with acute coronary syndrome as predictors of number of stenotic coronary arteries as shown in coronary arteriography. **Polski Merkurusz Lekarski**, v. 20, n. 117, p. 270-273, 2006.

MARTINS, F. M. M. **Estudo da Influência de Fatores Ambientais na Composição Química e Atividades Biológicas de *Xylopia sericea* St. Hill**. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2012.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hidroalcoholic extracts. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

MENDEZ, A. S. L. et al. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 105-111, 2011.

MIGLIATO, K. F. et al. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MIMAKI, Y. et al. Scillasaponins A, B, and C, new triterpenoid oligosaccharides from the plants of the subfamily Scilloideae. **Chemistry Letters**, v. 21, n. 9, p. 1863-1866, 2002.

MIN, L. et al. Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 22, p. 9469-9474, 2014.

MISHRA, M.; SHUKLA, Y. N.; KUMAR, S. Euphane triterpenoid and lipid constituents from *Butea monosperma*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 8, p. 835-838, 2000.

MISHRA, P.; KUMAR, A.; KHARE, P. Pro-apoptotic effect of landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* in *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 1058-1066, 2009.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORESCO, R. N. et al. Diabetic nephropathy: traditional to proteomic markers. **Clinica Chimica Acta**, v. 421, n. 1, p. 17-30, 2013.

MOSAVAT, M.; OOI, F. K.; MOHAMED, M. Stress hormone and reproductive system in response to honey supplementation combined with different jumping exercise intensities in female rats. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 1, p. 1-6, 2014.

NAKAMURA, M. J. et al. Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 6, p. 1170-1175, 2010.

NASCIMENTO, N. N. **Avaliação dos efeitos do extrato de *Baccharis trimera* (carqueja) sobre parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo em modelo de diabetes melito tipo 1 induzido por aloxano em ratas**. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Nutrição) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

NEGRE-SALVAYRE, A. et al. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 12, p. 3071-3109, 2009.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

NERI-NUMA, I. A. et al. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh – Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 70-76, 2013.

NUNES, K. M. et al. Padronização da tintura de *Calendula officinalis* L. para seu emprego em formulações semi-sólidas fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmaceutics**, v. 28, n. 3, p. 344-350, 2009.

OKOH-ESENE, R. U. et al. Proximate and phytochemical analysis of leaf, stem and root of *Eugenia uniflora* (Surinam or Pitanga cherry). **Journal of Natural Product and Plant Resources**, v. 1, n. 4, p. 1-4, 2011.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, A. L. et al. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 1-5, 2006.

OLIVEIRA, E. R.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte – MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 311-320, 2012.

OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; MOITA NETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 282-301, 2010.

OMAR, R. et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory hydrolyzable tannins from *Eugenia jambolana* seeds. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 8, p. 1505-1509, 2012.

OSTROKSY, E. A. et al. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PALHARES, R. M. et al. Medicinal plants recommended by the World Health Organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. 1-29, 2015.

PALIYATH, G.; BAKOVIC, M.; SHETTY, K. **Functional Foods, Nutraceuticals and Degenerative Disease Prevention**. 1 ed. Ontario: Wiley-Blackwell, 2011, 424 p.

PAN, H. Z. et al. The oxidative stress status in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. **Acta Diabetologica**, v. 47, n. 1, p. 71-76, 2010.

PANDEY, A. K.; MISHRA, A. K.; MISHRA, A. Antifungal and antioxidative potential of oil and extracts derived from leaves of Indian spice plant *Cinnamomum tamala*. **Cellular and Molecular Biology**, v. 58, n. 1, p. 142-147, 2012.

PEIXOTO, M. S. **Obtenção, caracterização e avaliação toxicológica de extrato seco padronizado à base de *Bauhinia fortificata* Link.** 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

PEPATO, M. T. et al. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 389-395, 2001.

PEREIRA, V. P. et al. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of green, black and white teas of *Cammelia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 490-498, 2014.

PIRES, R. H. **Formação de biofilmes e resistência a antifúngicos e biocidas em *Candida parapsilosis* e *C. orthopsilosis* isoladas de águas usadas para hemodiálise.** 2010. 172 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2010.

PONHONG, K. et al. Successive determination of urinary bilirubin and creatinine employing simultaneous injection effective mixing flow analysis. **Talanta**, v. 133, n. 1, p. 71-76, 2015.

POUPARD, P. et al. Characterization of procyanidin B2 oxidation products in an apple juice model solution and confirmation of their presence in apple juice by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 46, n. 11, p. 1186-1197, 2011.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Tecnologia Farmacêutica.** 6 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 2008.

QIU, X. et al. Profiling of phenolic constituents in *Polygonum multiflorum* Thunb. by combination of ultra-high-pressure liquid chromatography with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, n. 1, p. 121-131, 2013.



QUIDEAU, S. et al. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie**, v. 50, n. 3, p. 586-621, 2011.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 5, p. 567-575, 2011.

RAMFUL, D. et al. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract *in vitro* and in model emulsion systems. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1190-1196, 2011.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale – Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, 808 p.

RATTMANN, Y. D. et al. Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against murine sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n. 1, p. 1-9, 2012.

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

REVILLA, J. **Plantas úteis da bacia amazônica**. Rio de Janeiro: Inpa, v. 44, p. 87-89, 2002.

RODRIGUES, K. A. F. et al. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-*Leishmania* agent: effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 1, p. 1-10, 2013.

RODRIGUES, P. O.; GONÇALVES, T. C.; SILVA, W. B. Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 1, p. 27-31, 2004.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 529-548, 2006.

RONDEAU, P.; BOURDON, E. The glycation of albumin: structural and functional impacts. **Biochimie**, v. 93, n. 4, p. 645-658, 2011.

ROWAN, D. D. Volatile metabolites. **Metabolites**, v. 1, n. 1, p. 41-63, 2011.

RUBIO-MORAGA, A. et al. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 287-296, 2013.

SALES, D. S. et al. *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC. as an adjuvant treatment for type-2 diabetes mellitus: a non-controlled, pilot study. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 12, p. 1816-1821, 2014.

SALES, M. D. C. **Avaliação e caracterização de insumos bioativos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com potencial econômico para o desenvolvimento tecnológico de bioprodutos**. 2013. 134 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

SÁNCHEZ, E.; GARCÍA, S.; HEREDIA, N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 20, p. 6888-6894, 2010.

SÁNCHEZ-TENA, S. et al. Hamamelitannin from witch hazel (*Hamamelis virginiana*) displays specific cytotoxic activity against colon cancer cells. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 1, p. 26-33, 2012.

SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 20, n. 9, p. 462-470, 2002.

SANTOS, K. K. A. et al. Atividade leishmanicida *in vitro* de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 47-50, 2013.

SANTOS, M. M.; NUNES, M. G. S.; MARTINS, R. D. Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 327-334, 2012.

SANTOS, P. M. L.; SCHRIPEMA, J.; KUSTER, R. M. Flavonoides *O*-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 321-325, 2005.

SASIDHARAN, S.; DARA, I.; JAIN, K. *In vitro* and *in situ* antiyeast activity of *Gracilaria changii* methanol extract against *Candida albicans*. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 9, p. 1020-1026, 2011.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SENTANDREU, E.; NAVARRO, J. L.; SENDRA, J. M. Identification of new coloured anthocyanin-flavanol adducts in pressure-extracted pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 4, p. 702-709, 2012.

SEPAHVAND, R. et al. Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial effect of essential oil of the aerial parts of *Salvia sclareoides*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 1, p. 491-496, 2014.

SHANKAR, M.; SUTHAKARAN, R. Anti-diabetic activity of hydroalcoholic extract of *Eugenia jambolana* leaves in alloxan induced diabetic rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 10, p. 138-140, 2014.

SHANMUGAM, K. R. et al. Perturbation in kidney lipid metabolic profiles in diabetic rats with reference to alcoholic oxidative stress. **Indian Journal of Nephrology**, v. 19, n. 3, p. 101-106, 2009.

SHARMA, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2376-2383, 2008.

SHARMA, I. et al. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant activity of phenolic rich extract of *Brassica oleraceae* var. *gongylodes* on streptozotocin induced Wistar rats. **SpringerPlus**, v. 212, n. 4, p. 1-7, 2015.

SIDDIQI, R. et al. Antioxidant potential of the polyphenolics in *Grewia asiatica*, *Eugenia jambolana* and *Carissa carandas*. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 3, p. 217-223, 2013.

SILVA, A. F. **Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades biológicas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.** 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2014.

SILVA, C. V. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 355-360, 2010.

SILVA, M. J. D. et al. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, p. 267-274, 2012.

SILVA, V. G. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1071-1077, 2013.

SILVEIRA, L. M. S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: Ed. UFSC, 2010.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1, p. 152–178, 1999.

SOFIATI, F. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de *Polygonum acre* (Polygonaceae) H.B.K. e *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae)**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2009.

SOOD, R. et al. Antiviral activity of crude extracts of *Eugenia jambolana* Lam. against highly pathogenic avian influenza (H5N1) virus. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 50, n. 3, p. 179-186, 2012.

SOUZA, A. M. **Avaliação do potencial antimicrobiano de *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae, e estudo da associação sinérgica com agentes antibacterianos e antifúngicos de uso clínico**. 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

STANKOV, K.; BENC, D.; DRASKOVIC, D. Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes *mellitus* type 1. **Pediatrics**, v. 132, n. 1, p. 1112-1122, 2013.

STANKOV-JOVANOVIĆ, V. P. et al. Secondary metabolites of *Seseli rigidum*: chemical composition plus antioxidant, antimicrobial and cholinesterase inhibition activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, n. 1, p. 78-90, 2015.

STEBUT, E. V. Leishmaniasis. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 13, n. 3, p. 191-201, 2015.

SUN, L. et al. Cimicifoetisides A and B, two cytotoxic cycloartane triterpenoid glycosides from the rhizomes of *Cimicifuga foetida*, inhibit proliferation of cancer cells. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 1-7, 2007.

TADESSE, D. A. et al. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 741-749, 2012.

TANG, L. et al. Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 109-115, 2006.

TAUCH, A. et al. Ultrafast pyrosequencing of *Corynebacterium kroppenstedtii* DSM44385 revealed insights into the physiology of a lipophilic corynebacterium that lacks mycolic acids. **Journal of Biotechnology**, v. 136, n. 1-2, p. 22-30, 2008.

TCHOUA, U. et al. The effect of cholesteryl ester transfer protein overexpression and inhibition on reverse cholesterol transport. **Cardiovascular Research**, v. 77, n. 4, p. 732-739, 2008.

TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382-390, 2005.

TOLEDO, R. C. L. et al. Efeito da ingestão da polpa de manga (*Mangifera indica* L.) sobre os parâmetros bioquímicos séricos e integridade hepática em ratos. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 516-525, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011, 827 p.

TOSCAN, C. M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2010.

TRESINA, P. S.; KALA, S. M. J.; MOHAN, V. R. HPTLC finger print analysis of phytocompounds and *in vitro* antioxidant activity of *Eugenia singampattiana* Bedd. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 12, p. 112-124, 2012.

TRESINA, P. S.; MOHAN, V. R. Preliminary phytochemical, FT-IR and antibacterial assessment of leaf of *Eugenia singampattiana* Bedd (Myrtaceae). **International Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 3, p. 780-786, 2014.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen receptor. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, n. 2, p. 158-161, 1969.

TRIPOLI, E. et al. *Citrus* flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 466-479, 2007.

UETANABARO, A. P. T.; GÓES-NETO, A. Segurança alimentar: transferência horizontal de genes e alimentos transgênicos. **Sitientibus**, v. 35, n. 1, p. 111-124, 2006.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 41-54, 2003.

VALADARES, D. G. et al. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology International**, v. 60, n. 4, p. 357-363, 2011.

VEBER, J. et al. Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de jabolão (*Syzygium cumini* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 267-273, 2015.

VENDRAMETTO, M. C. et al. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*. **Parasitology International**, v. 59, n. 2, p. 154-158, 2010.

VIEIRA, T. R. et al. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 536-539, 2004.

VIEIRA JÚNIOR, G. M. et al. New steroidal saponins and antiulcer activity from *Solanum paniculatum* L. **Food Chemistry**, v. 186, n. 1, p. 160-167, 2015.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. **Plant Drug Analysis**. 2 ed. Berlin: Springer-Verlag, 2009.

WILSON, P. G. et al. Relationships within Myrtaceae *sensu lato* based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, n. 1, p. 3-19, 2005.

WOLLENWEBER, E. J. M. et al. Flavones and flavonols. In: HARBORNE, J. B. **The Flavonoids: advances in research since 1980**. 1 ed. London: Chapman and Hall, p. 233-302, 1998.

WU, P. et al. Investigation of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. **Food Chemistry**, v. 173, n. 1, p. 194-202, 2015.

XAVIER, H. T. et al. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, p. 1-20, 2013.

XIE, J. et al. Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja leaves. **Food Chemistry**, v. 186, n. 1, p. 97-105, 2015.

YADAV, M. K. et al. Antimicrobial activities of *Eugenia caryophyllata* extract and its major chemical constituent eugenol against *Streptococcus pneumoniae*. **APMIS**, v. 121, n. 2, p. 1198-1206, 2012.

YEN, W. J.; CHANG, L. W.; DUH, P. D. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **LWT – Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 193-200, 2005.

YOO, J. I. et al. Gene Expression and identification related to fluconazole resistance of *Candida glabrata* strains. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 1, n. 1, p. 36-41, 2010.

YOSHIDA, T.; AMAKURA, Y.; YOSHIMURA, M. Structural features and biological properties of ellagitannins in some plant families of the order Myrtales. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 1, p. 79-106, 2010.

YOSKIKAWA, M. et al. Studies on *Kochia fructus*. II. On the saponin constituents from the fruit of Chinese *Kochia scoparia* (Chenopodiaceae): chemical structures of kochianosides I, II, III, and IV. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, n. 6, p. 1052-1055, 1997.

ZHANG, X. et al. Simultaneous characterization of isoflavonoids and astragalosides in two *Astragalus* species by high-performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 13, p. 2059-2069, 2007.

ZHAO, J.; YANG, X.; HATTORI, M. Three new triterpene saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 5, p. 626-628, 2001.

ZHU, Z. et al. Rapid separation and identification of phenolic and diterpenoid constituents from Radix *Salvia miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography diode-array detection, electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 12, p. 1855-1865, 2007.

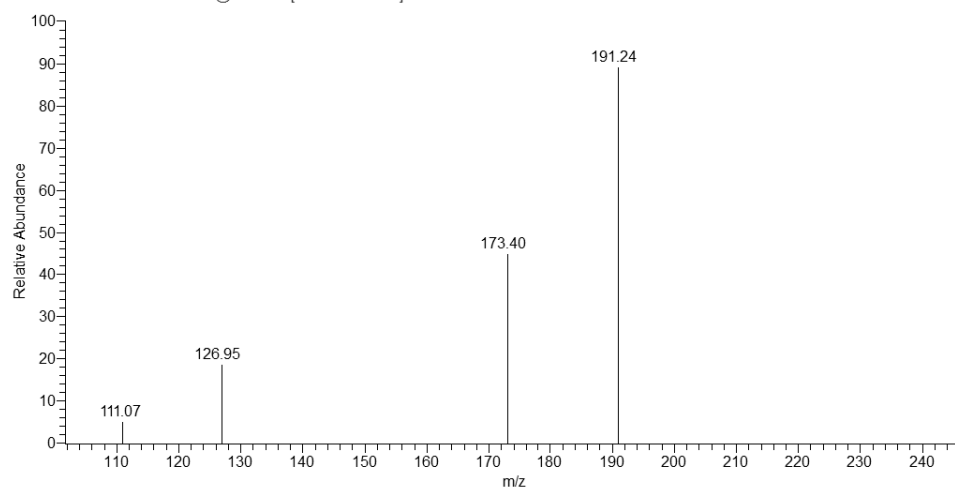
ZUCCHI, M. R. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Ipameri – GO. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 273-279, 2013.





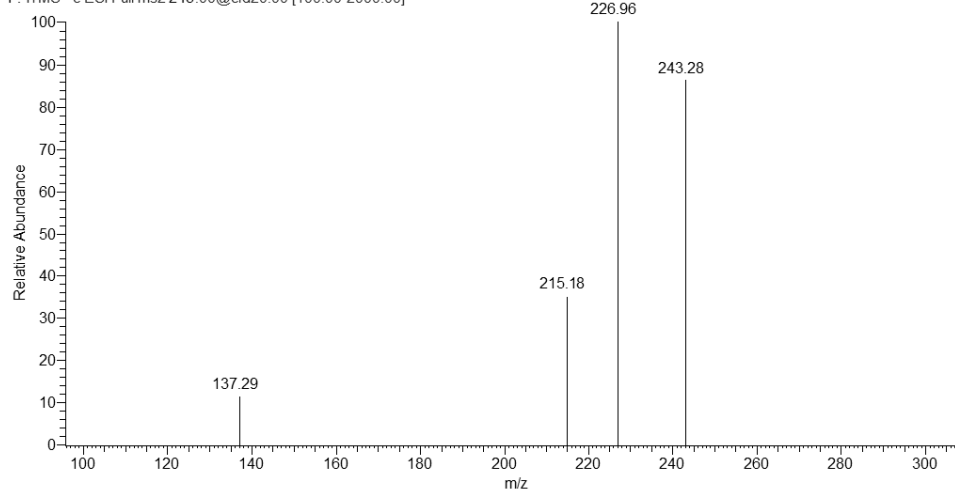
### Figura I – Composto (2) – Ácido quínico

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2304 RT: 11.82 AV: 1 NL: 1.36E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2 191.00@cid20.00 [100.00-2000.00]



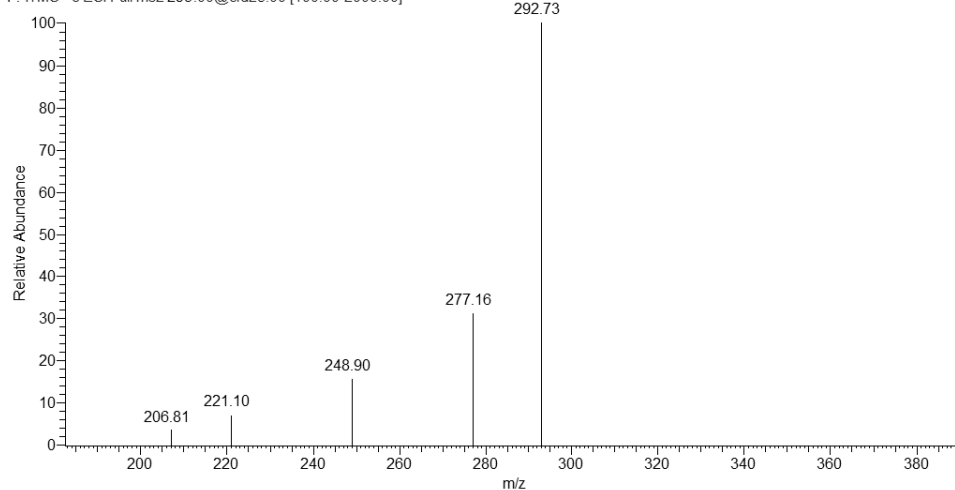
### Figura II – Composto (4) – 5-hidroxi-resveratrol

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2304 RT: 3.68 AV: 1 NL: 4.00E2  
F: ITMS - c ESI Full ms2 243.00@cid20.00 [100.00-2000.00]



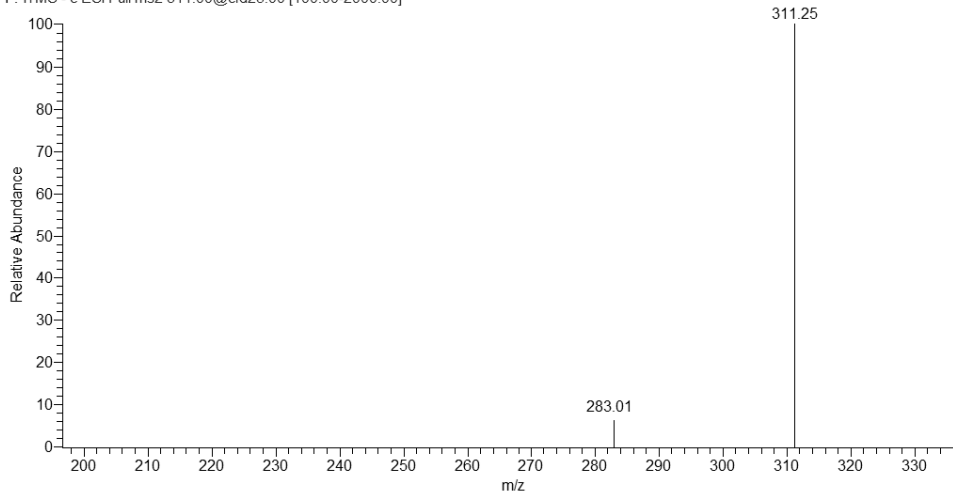
### Figura III – Composto (5) – 1,2-dideidrotanshinona IIA

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2304 RT: 5.21 AV: 1 NL: 1.07E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2 293.00@cid25.00 [100.00-2000.00]



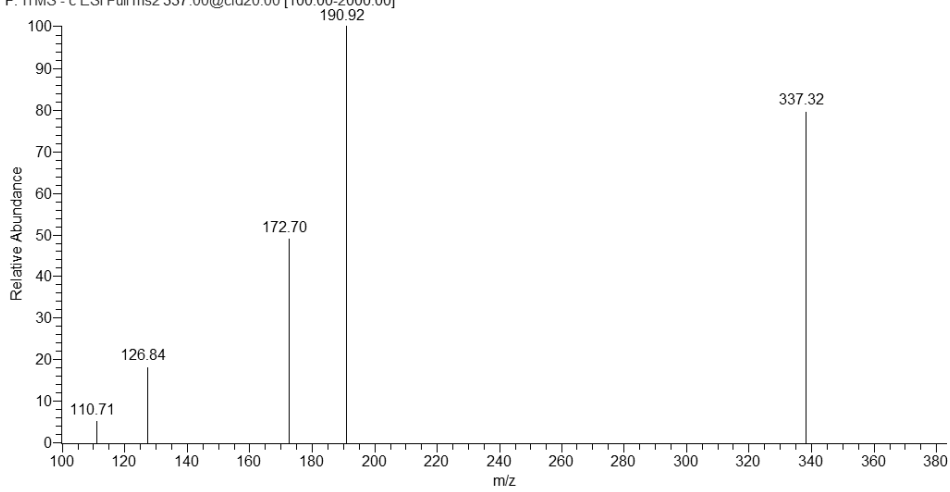
**Figura IV – Composto (7) – 4-alil-1-hidroxi-2-(2'-alil-4'-hidroxi-5'-metoxifenoxi)-benzeno**

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2304 RT: 4.38 AV: 1 NL: 9.17E1  
F: ITMS - c ESI Full ms2 311.00@cid25.00 [100.00-2000.00]



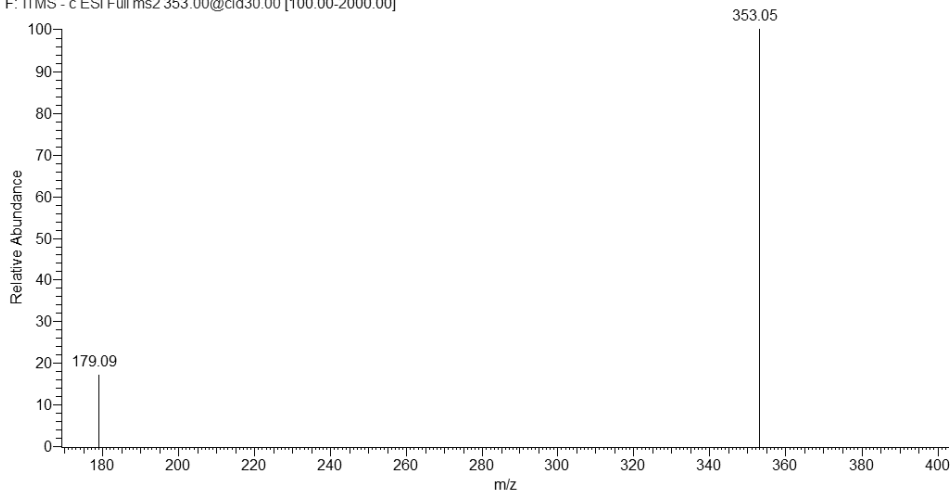
**Figura V – Composto (8) – Ácido 4-O-p-cumaroilquínico**

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2333 RT: 4.17 AV: 1 NL: 2.55E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2 337.00@cid20.00 [100.00-2000.00]



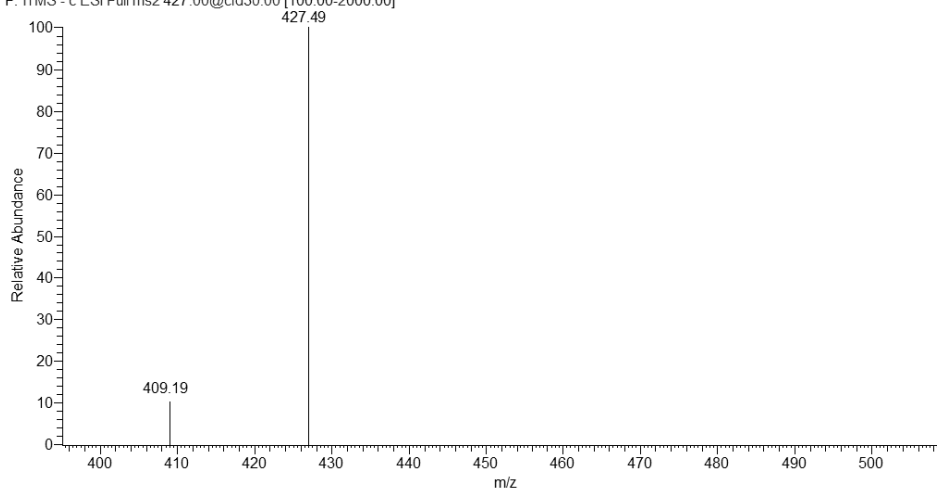
**Figura VI – Composto (9) – Ácido 5-cafeoilquínico**

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2333 RT: 3.70 AV: 1 NL: 4.40E2  
F: ITMS - c ESI Full ms2 353.00@cid30.00 [100.00-2000.00]



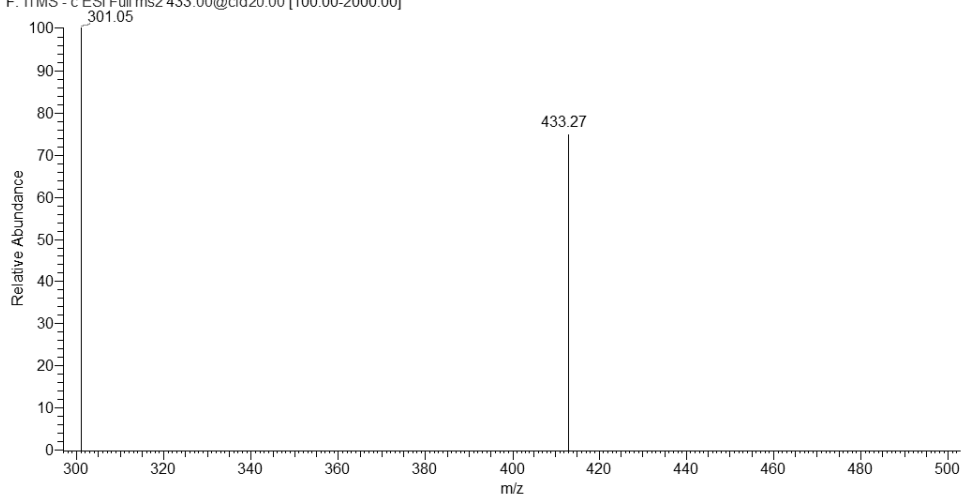
### Figura VII – Composto (10) – 3- $\alpha$ -hidroxieufeno

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2333 RT: 5.46 AV: 1 NL: 6.47E2  
F: ITMS - c ESI Full ms2 427.00@cid30.00 [100.00-2000.00]



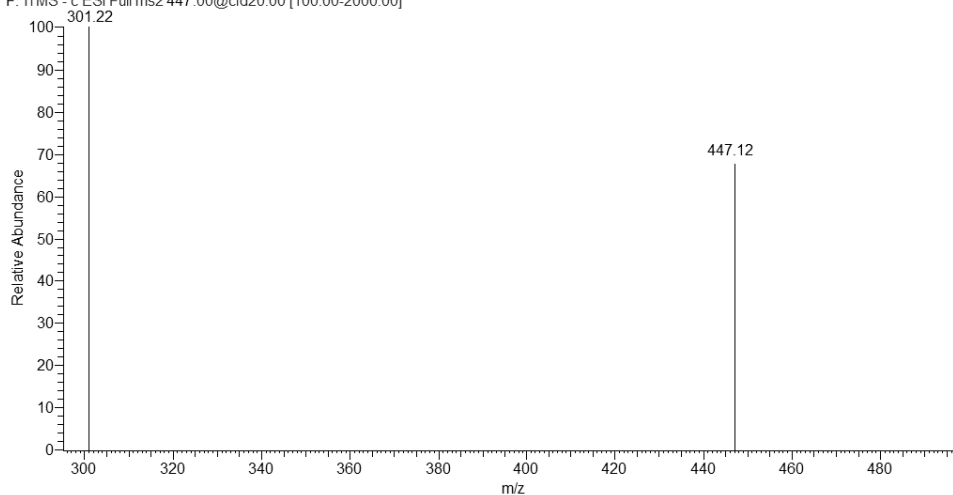
### Figura VIII – Composto (11) – Quercetina-O-arabinose

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2333 RT: 4.70 AV: 1 NL: 3.93E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2 433.00@cid20.00 [100.00-2000.00]



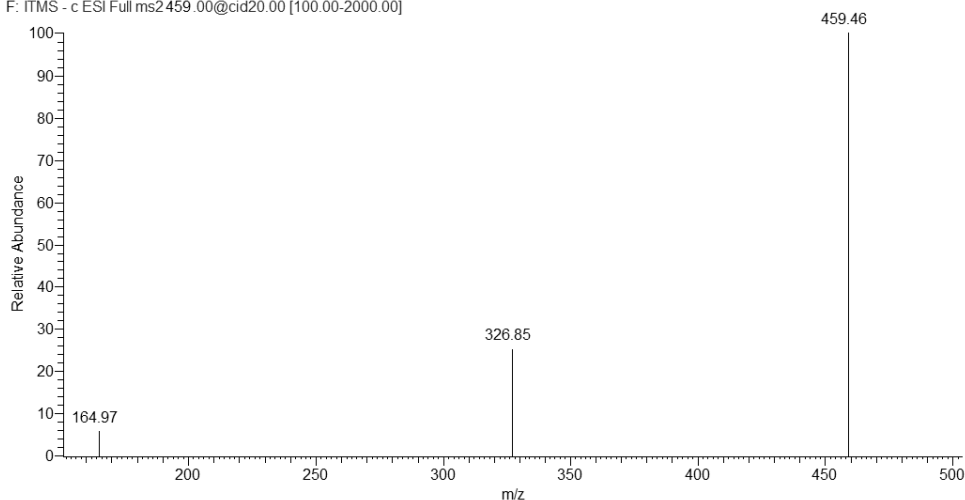
### Figura IX – Composto (12) – Quercetrina

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2304 RT: 3.91 AV: 1 NL: 7.70E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2 447.00@cid20.00 [100.00-2000.00]



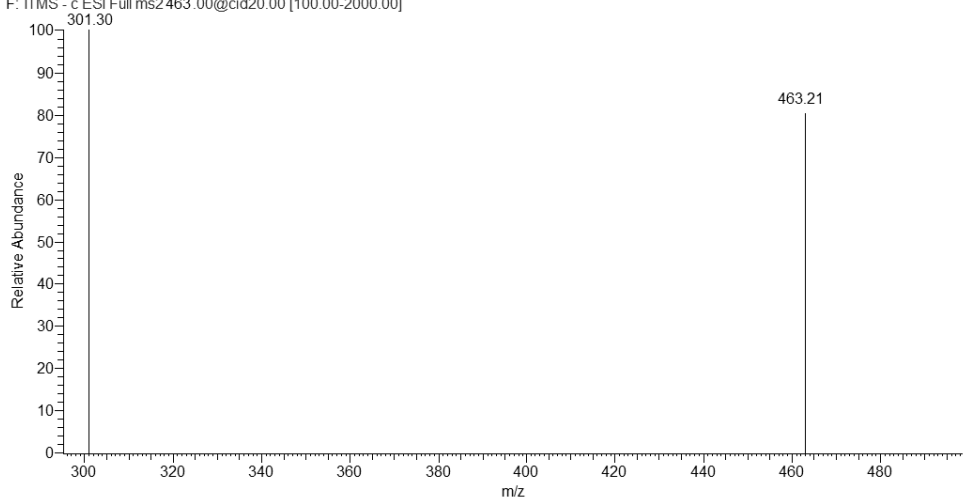
### Figura X – Composto (13) – Rhododendrina pentosídeo

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2304 RT: 5.01 AV: 1 NL: 2.02E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2459.00@cid20.00 [100.00-2000.00]



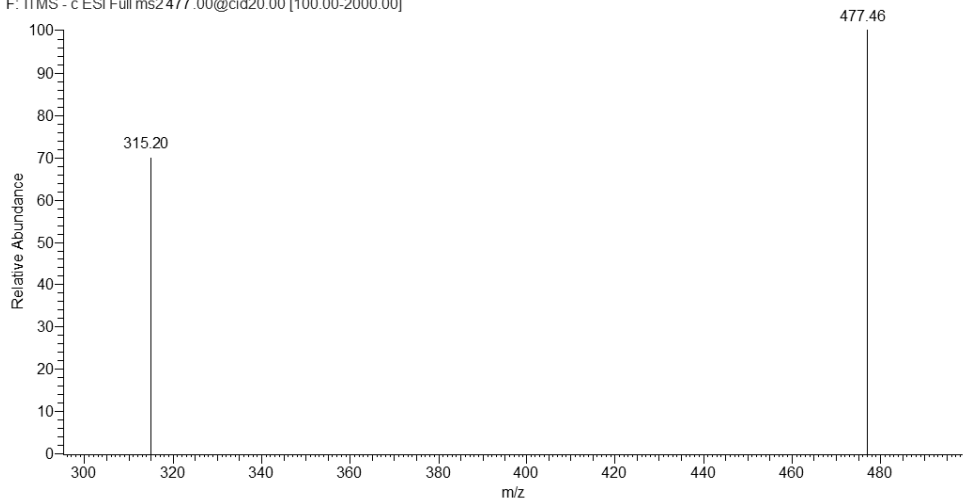
### Figura XI – Composto (14) – Quercetina-O-glicose

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2304 RT: 3.44 AV: 1 NL: 1.37E4  
F: ITMS - c ESI Full ms2463.00@cid20.00 [100.00-2000.00]



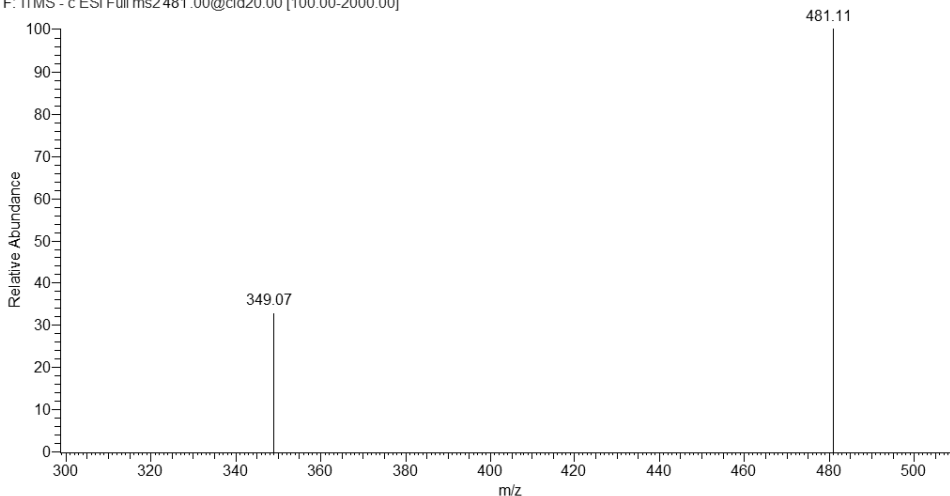
### Figura XII – Composto (15) – Rhamnetina-O-glicose

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2304 RT: 9.69 AV: 1 NL: 1.11E4  
F: ITMS - c ESI Full ms2477.00@cid20.00 [100.00-2000.00]



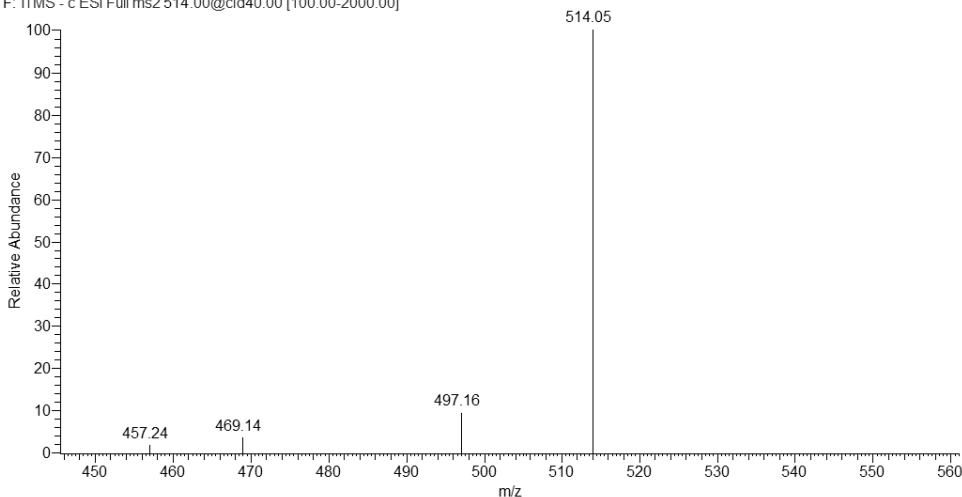
**Figura XIII – Composto (16) – Granatunflavanil-O-xilose**

Ex\_hidro\_folha\_eugenia #3675 RT: 8.66 AV: 1 NL: 5.03E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2481.00@cid20.00 [100.00-2000.00]



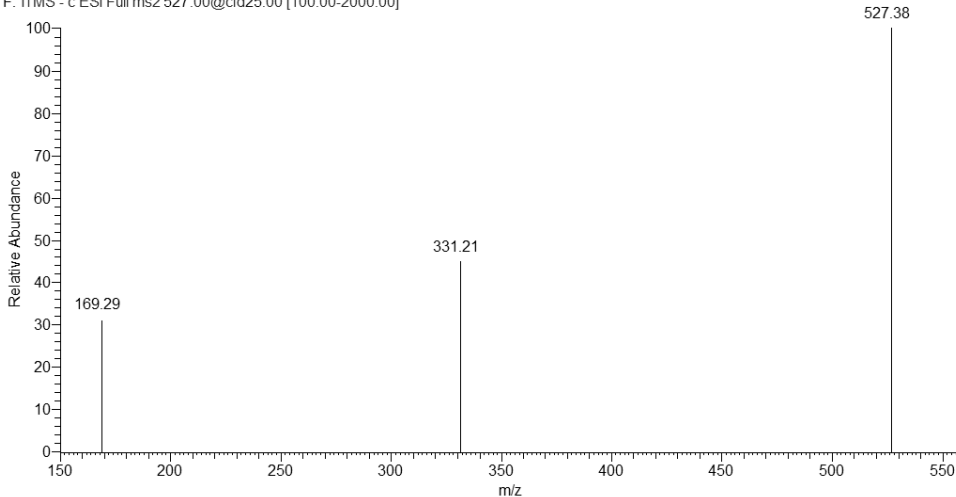
**Figura XIV – Composto (17) – Distenina**

Ex\_hidro\_folha\_eugenia #3675 RT: 3.99 AV: 1 NL: 6.69E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2514.00@cid40.00 [100.00-2000.00]



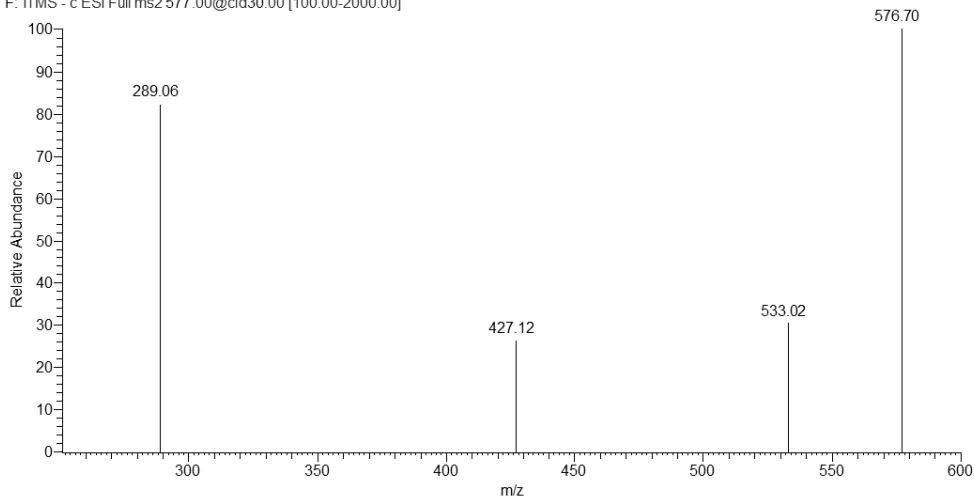
**Figura XV – Composto (18) – O-galoil desbenzoilpaeoniflorina**

Ex\_hidro\_folha\_eugenia #1021 RT: 2.77 AV: 1 NL: 1.57E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2527.00@cid25.00 [100.00-2000.00]



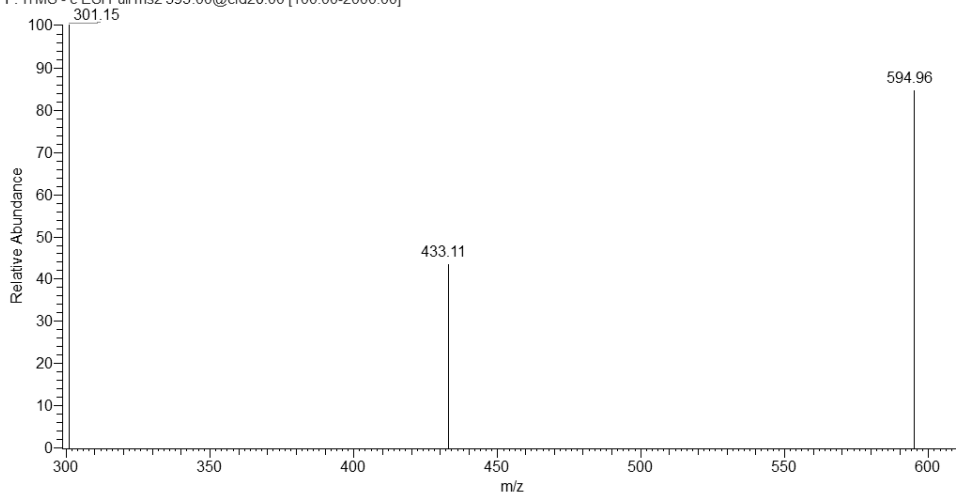
### Figura XVI – Composto (19) – Procianidina B<sub>2</sub>

Ex\_hidro\_folha\_eugenia #1402 RT: 3.62 AV: 1 NL: 3.84E4  
F: ITMS - c ESI Full ms2.577.00@cid30.00 [100.00-2000.00]



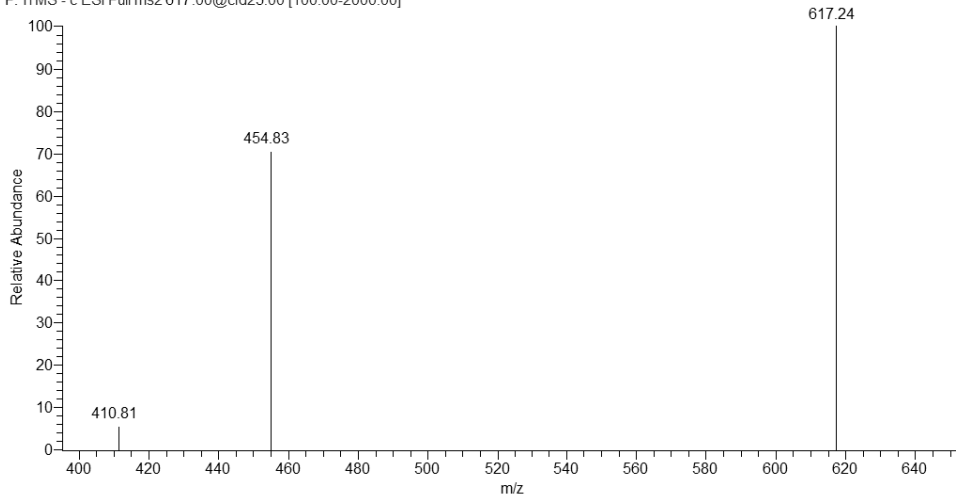
### Figura XVII – Composto (20) – Hyperina

Ex\_hidro\_folha\_eugenia #3303 RT: 7.84 AV: 1 NL: 3.36E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2.595.00@cid20.00 [100.00-2000.00]



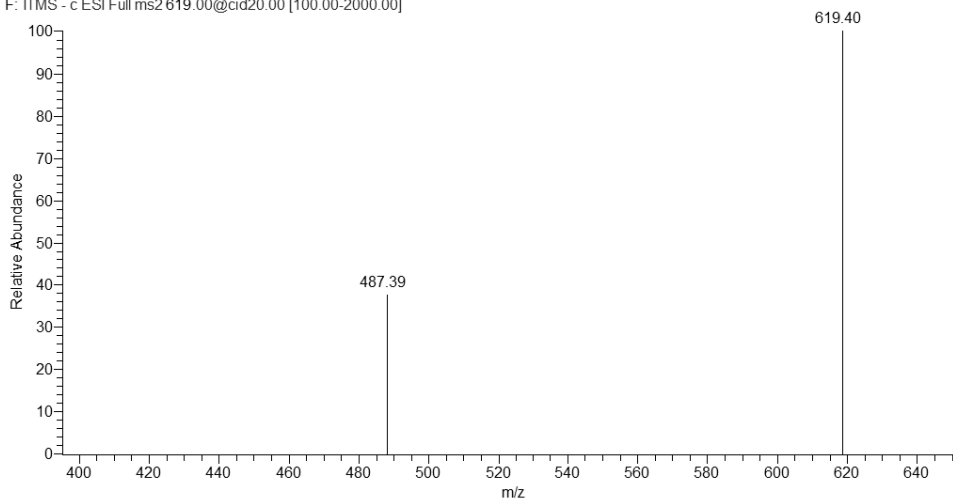
### Figura XVIII – Composto (21) – Ácido betulínico heterosídeo

Ex\_hidro\_folha\_eugenia #1993 RT: 4.93 AV: 1 NL: 7.99E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2.617.00@cid25.00 [100.00-2000.00]



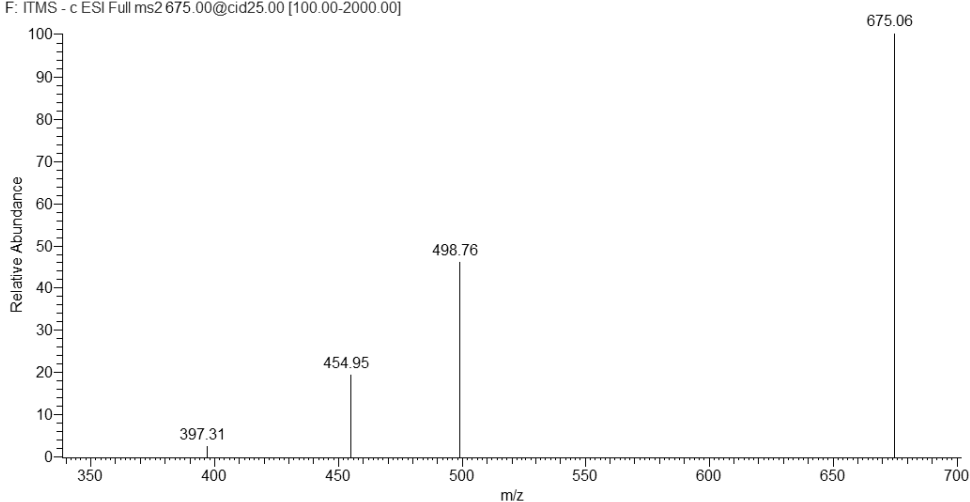
### Figura XIX – Composto (22) – Cimicifoetisídeo A

Ex\_hidro\_folha\_eugenia #1993 RT: 14.11 AV: 1 NL: 2.07E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2.619.00@cid20.00 [100.00-2000.00]



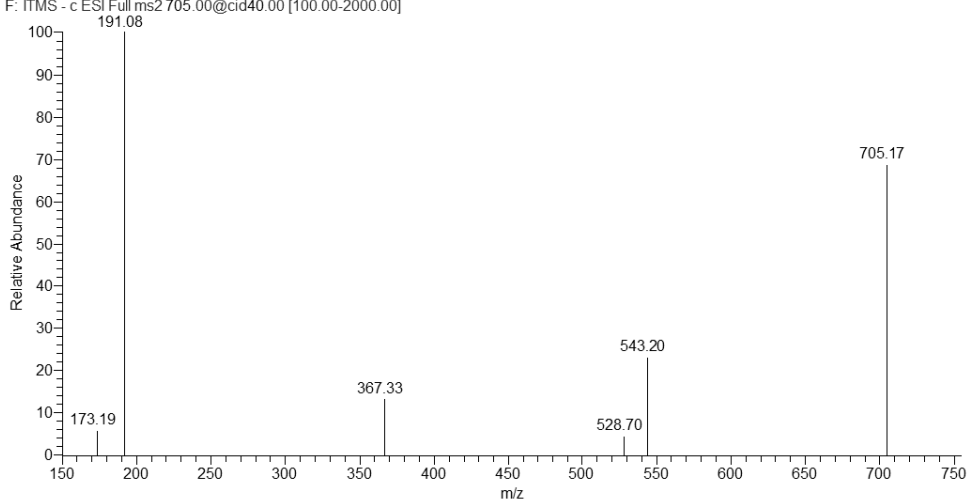
### Figura XX – Composto (23) – Ácido 3-O-β-D-glicopiranosil serjânico

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2104 RT: 10.80 AV: 1 NL: 1.91E4  
F: ITMS - c ESI Full ms2.675.00@cid25.00 [100.00-2000.00]



### Figura XXI – Composto (24) – Ácido 3-O-cafeoil-4,5-di-O-feruolquínico

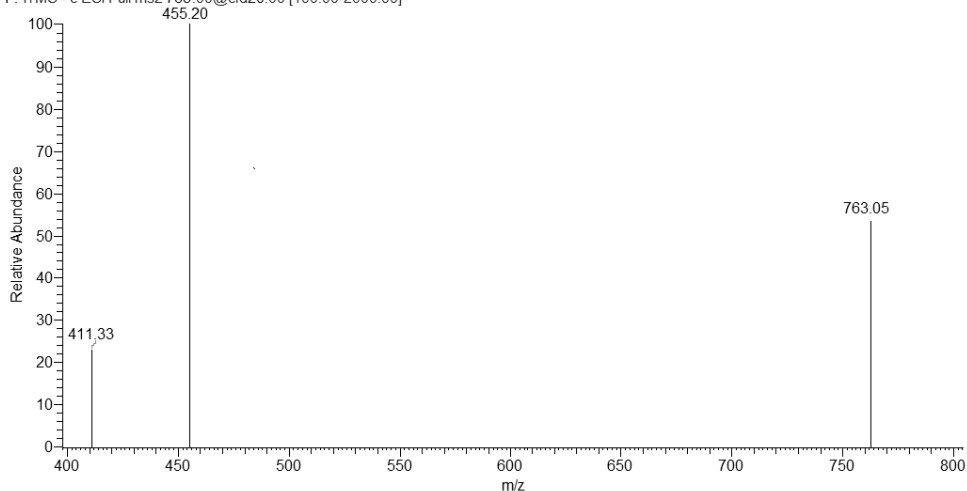
Ex\_hidro\_folha\_eugenia #3331 RT: 7.90 AV: 1 NL: 8.36E2  
F: ITMS - c ESI Full ms2.705.00@cid40.00 [100.00-2000.00]





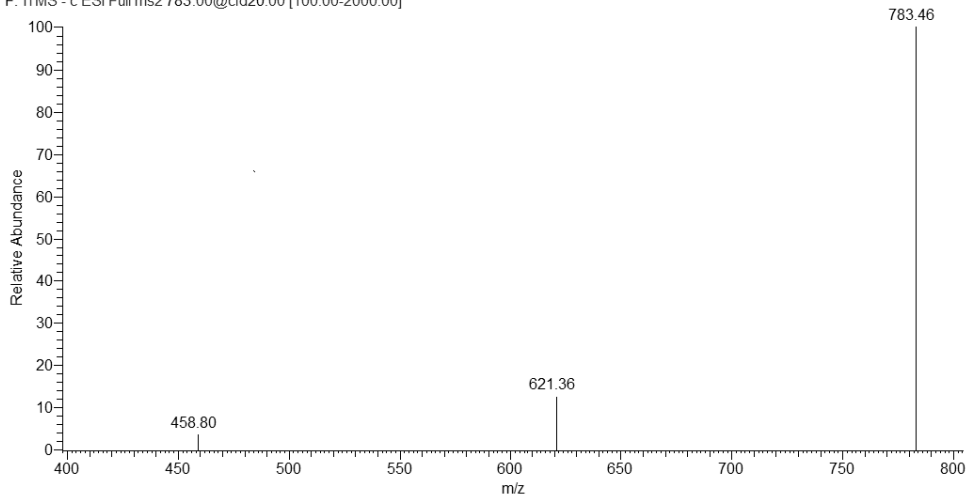
**Figura XXII – Composto (25) – Kochianosídeo IV**

Ex\_hidro\_folha\_eugenia #2530 RT: 6.12 AV: 1 NL: 3.07E2  
F: ITMS - c ESI Full ms2.763.00@cid20.00 [100.00-2000.00]



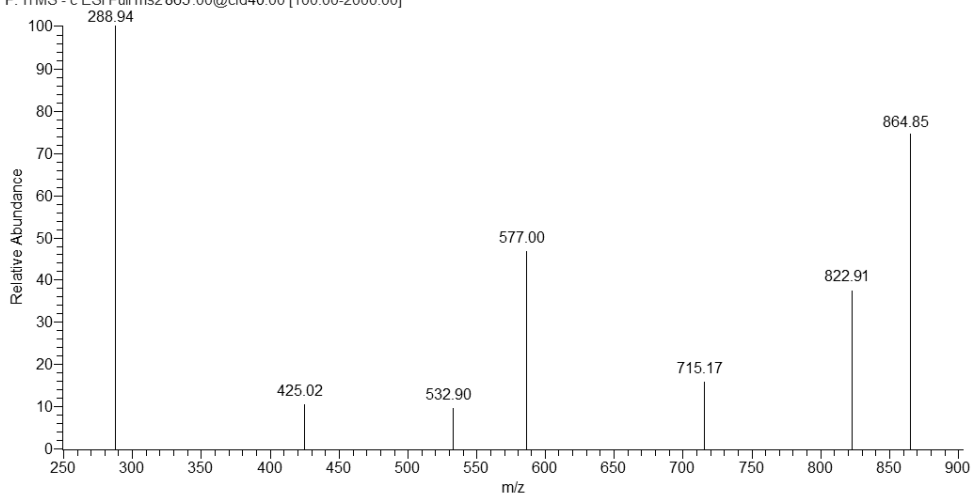
**Figura XXIII – Composto (26) – 27-O-β-D-glicopiranosil fisagulina D**

Ex\_hidro\_folha\_eugenia #1505 RT: 3.84 AV: 1 NL: 8.99E2  
F: ITMS - c ESI Full ms2.783.00@cid20.00 [100.00-2000.00]



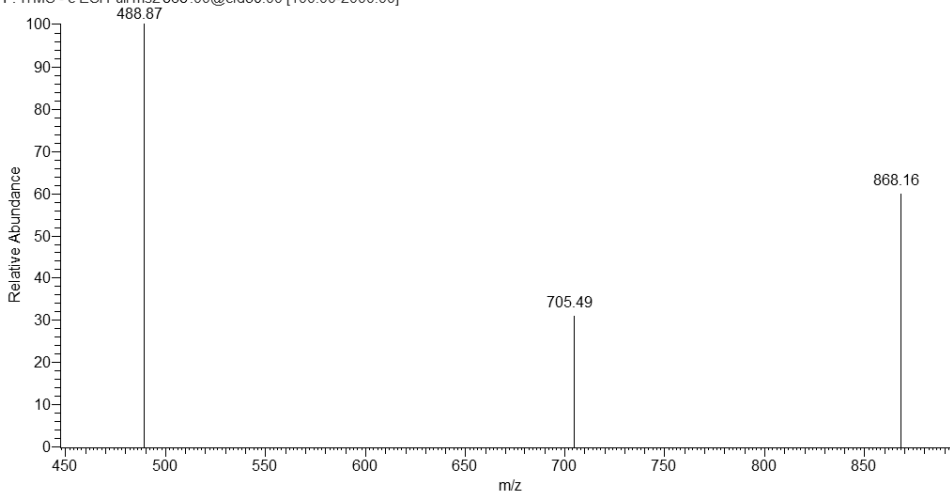
**Figura XXIV – Composto (27) – Procianidina C<sub>2</sub>**

Ex\_hidro\_folha\_eugenia #2163 RT: 5.31 AV: 1 NL: 7.93E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2.865.00@cid40.00 [100.00-2000.00]



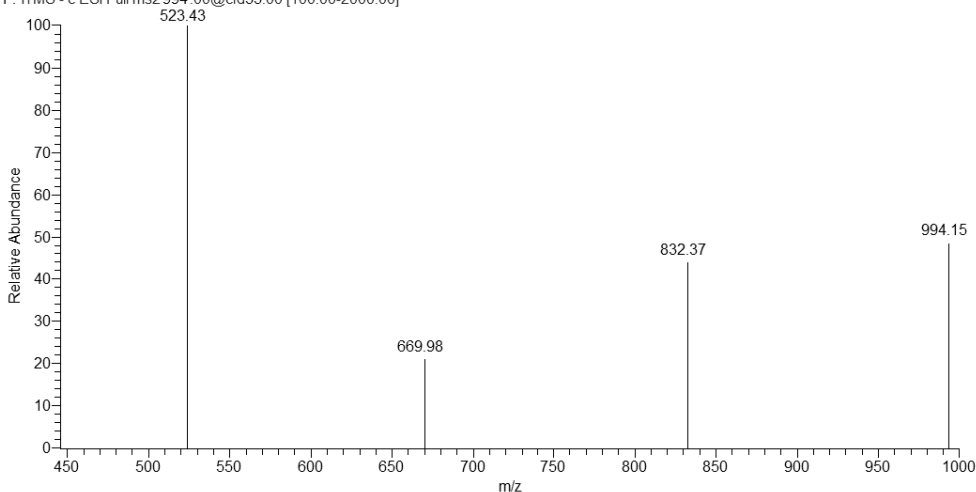
**Figura XXV – Composto (28) – Isoastragalosídeo I**

Ex\_hidro\_folha\_eugenia #1129 RT: 3.01 AV: 1 NL: 2.79E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2868.00@cid30.00 [100.00-2000.00]



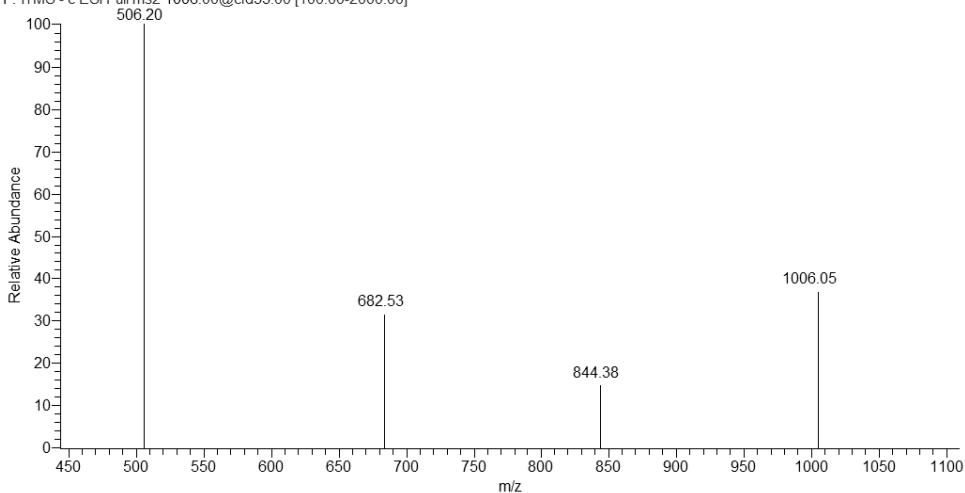
**Figura XXVI – Composto (29) – Clinopodisídeo E**

Ex\_hidro\_folha\_eugenia #4004 RT: 9.39 AV: 1 NL: 1.29E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2994.00@cid35.00 [100.00-2000.00]



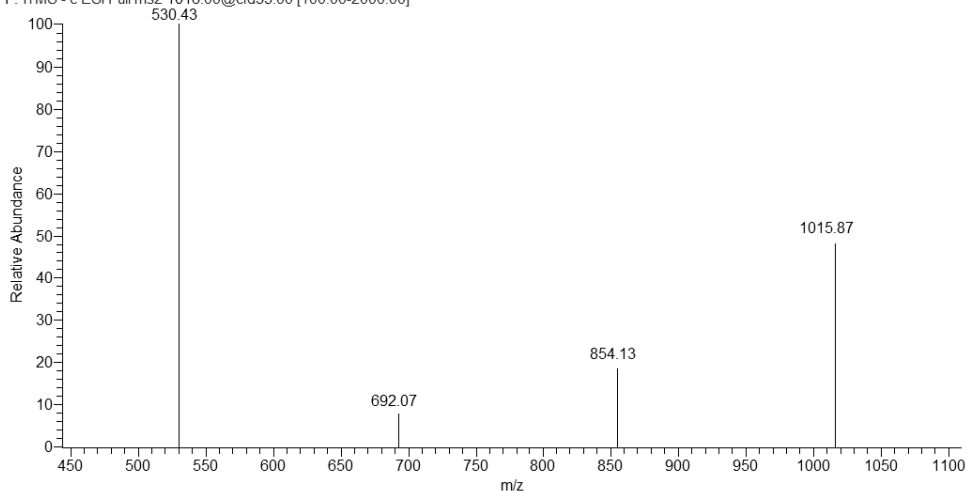
**Figura XXVII – Composto (30) – Aesculusídeo B**

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #814 RT: 13.07 AV: 1 NL: 6.14E2  
F: ITMS - c ESI Full ms21006.00@cid35.00 [100.00-2000.00]



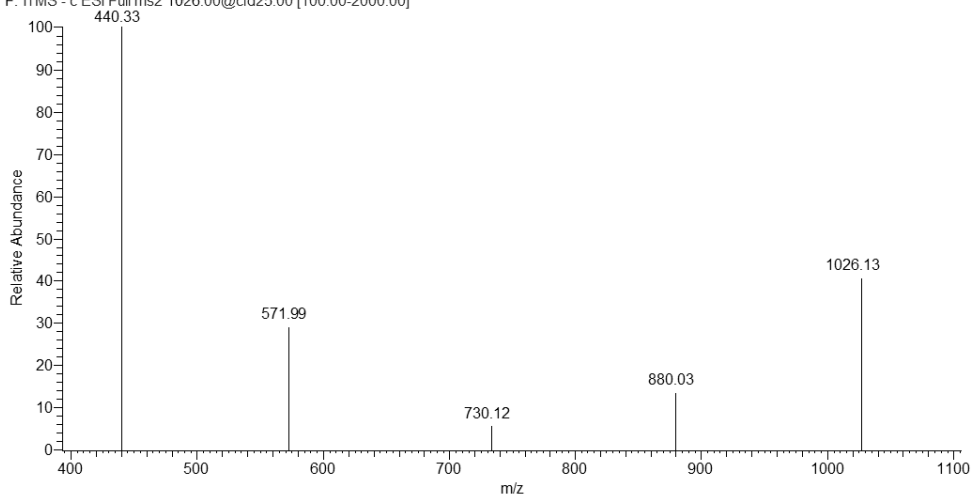
**Figura XXVIII – Composto (31) – Ácido fitolacagênico heterosídeo**

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #814 RT: 13.07 AV: 1 NL: 6.14E2  
F: ITMS - c ESI Full ms2 1016.00@cid35.00 [100.00-2000.00]



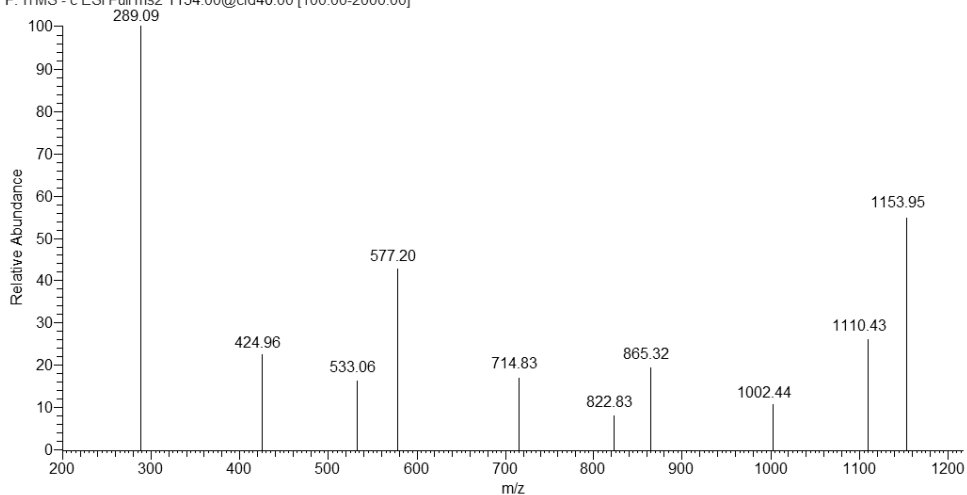
**Figura XXIX – Composto (32) – Guaianina D**

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2047 RT: 10.44 AV: 1 NL: 2.02E4  
F: ITMS - c ESI Full ms2 1026.00@cid25.00 [100.00-2000.00]



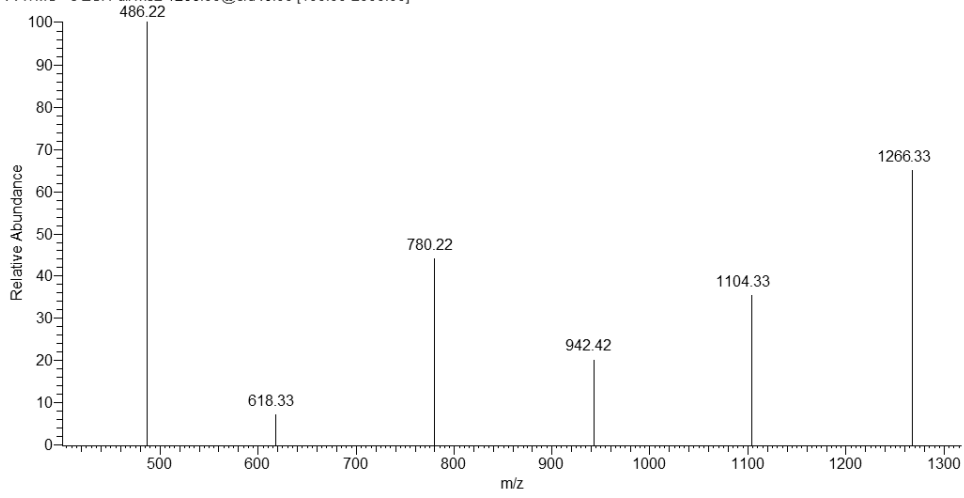
**Figura XXX – Composto (33) – Catequina tetramérica**

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #1281 RT: 6.59 AV: 1 NL: 5.19E2  
F: ITMS - c ESI Full ms2 1154.00@cid40.00 [100.00-2000.00]

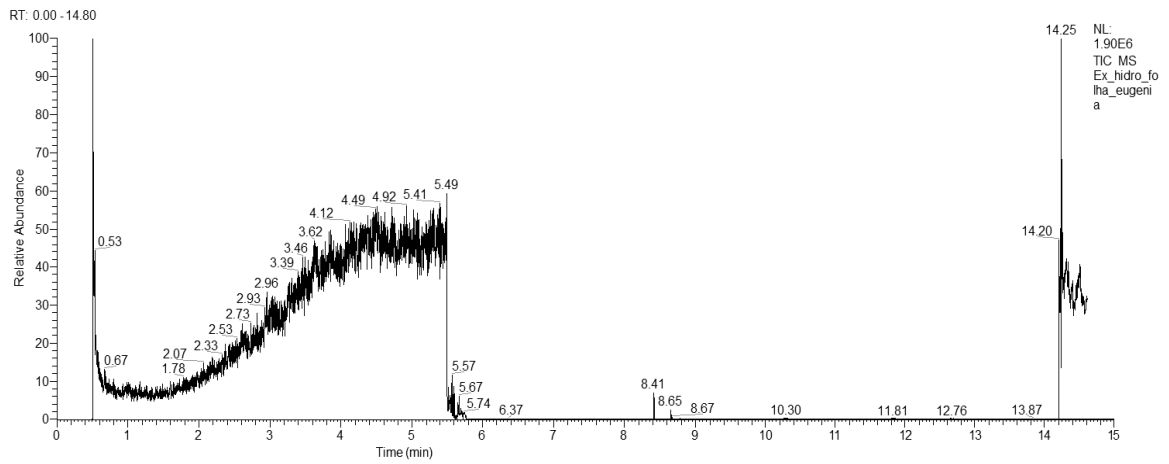


### Figura XXXI – Composto (34) – Scillasaponina B

Ex\_Hidro\_folha\_eug\_neg #2199 RT: 11.36 AV: 1 NL: 3.49E2  
F: ITMS - c ESI Full ms2 1266.00@cid40.00 [100.00-2000.00]



### Figura XXXII – Cromatograma TIC-MS dos íons obtidos







MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 28 de agosto de 2014.

Prof. Marcelo Aparecido da Silva

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 575/2014, intitulado “Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades antidiabética, antimicrobiana e leishmanicida dos extratos obtidos das folhas de *Eugenia florida*” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento  
Presidente da CEUA – Unifal-MG