

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO-
PROPEP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS
(PPGCTRA).**

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO DAS
FOLHAS DE *Syzygium cumini* (L.) Skeels.**

FRANCIMAURO SOUSA MORAIS

**ITACOATIARA-AM
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO-
PROPEP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS
(PPGCTRA).**

FRANCIMAURO SOUSA MORAIS

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO DAS
FOLHAS DE *Syzygium cumini* (L.) Skeels.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
**Ciência e Tecnologia para
Recursos Amazônicos**, da
Universidade Federal do
Amazonas, ICET-Itacoatiara como
pré-requisito para obtenção do
título de Mestre.

Área: Desenvolvimento Científico
de Recursos Amazônicos.

Orientadora Prof^a Dr^a. Renata Takeara

**ITACOATIARA- AM
2015**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M827e	Morais, Francimauro Sousa ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels. / Francimauro Sousa Morais. 2015 113 f.: 31 cm. Orientadora: Renata Takeara Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas. 1. Myrtaceae. 2. Óleo essencial. 3. Atividade antioxidante . 4. HPCCC. I. Takeara, Renata II. Universidade Federal do Amazonas III. Título
-------	--

FRANCIMAURO SOUZA MORAIS

Estudo Químico e Avaliação da Atividade
Antioxidante do Óleo Essencial e Extrato das Folhas
de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia para Recursos Amazônicos
da Universidade Federal do Amazonas,
como parte do requisito para obtenção
do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia para Recursos Amazônicos,
área de concentração Desenvolvimento
Científico e Tecnológico em Recursos
Amazônicos.

Aprovado em 30 de julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Dra. Fabiana Maria Monteiro Paschoal, Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Dr. Geoné Maia Corrêa
Universidade Federal do Amazonas



Dr. Adrian Martin Pohlit
Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas

Á Deus por ter permitido que eu nascesse com Saúde.

Minha Mãe, pelo amor que me dedicou e pelos ensinamentos que me permitiram ser o que sou.

Meus filhos, que são a fonte e motivação para minhas conquistas.

Minha esposa, que em todas as horas me oferece, além de seu amor, o apoio que preciso para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo da minha vida, e não somente nestes anos como universitário, mas que em todos os momentos sendo o maior mestre que alguém pode conhecer. Pois Muitas vezes lutamos por sonhos que nos levam a crer que a maior conquista são suas realizações, sem saber que as coisas mais importantes que os sonhos nos trazem é justamente a possibilidade de compartilharmos, com os amigos as conquistas e os sacrifícios necessários para sua concretização. Mesmo temendo ser injusto com alguns.

A minha mãe, Teresinha Sousa Morais, por ter ensinado bons princípios como honestidade, compaixão, fé e amor, me oportunizando as condições, mesmo com muito sacrifício, para que eu continuasse estudando.

A minha esposa, Maria do Socorro Morais e meus filhos Francimauro Filho e Mayrton Morais, que hoje representam o motivo principal para que eu busque sempre o melhor para minha vida.

Aos meus irmãos, Jefferson, Alba, Bethânia e Francileide (pessoas fortes que conseguem lutar pelo que querem com muita lealdade e delicadeza que me dão muito orgulho).

A minha orientadora Professora, Dr^a. Renata Takeara, mulher forte e delicada, que ainda consegue agregar às suas múltiplas qualidades, as virtudes do trabalho e da competência e mais recente o papel de Mãe.

Ao Professor, Dr. Anderson Cavalcante Guimarães que, além de professor, é um amigo, que me ensinou muito contribuindo para a definição do rumo de nossa pesquisa mesmo em momentos difíceis de sua vida.

Ao professor Dr. Geone Maia Corrêa pelas contribuições na qualificação e por participar desta banca, à Professora Dr^a. Fabiana Maria Monteiro Paschoal, por ter aceitado participar e presidir esta banca e ao Professor Dr. Adrian Martin Pohlit, que tão prestativamente aceitou o convite para a avaliação deste trabalho.

A Universidade Federal do Amazonas que a cada dia vem se constituindo num espaço de formação intelectual de profissionais éticos e competentes, tão necessários para a defesa e preservação de nossa região Amazônia, além da valorização daqueles que nela habitam.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 PLANTAS MEDICINAIS	16
1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS	17
1.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS DE PLANTAS	18
1.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	20
1.5 <i>SYZYGIUM CUMINI</i>	21
1.5.1 CARACTERÍSTICAS E DESCRIÇÃO BOTÂNICA	21
1.5.2 TAXONOMIA.....	22
1.5.3 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS.....	22
1.5.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>S. CUMINI</i>	23
1.6 CROMATOGRAFIA CONTRA CORRENTE – CCC	25
1.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA – CLAE/EM	27
2. JUSTIFICATIVA:	30
3. OBJETIVOS:.....	31
3.1. OBJETIVO GERAL:.....	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	31
4. MATERIAL E MÉTODOS:	32
4.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	32
4.2. COLETA DO VEGETAL	33
4.3. EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	33
4.4. EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS FOLHAS DE <i>S. CUMINI</i>	34
4.5. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PARA CARACTERIZAÇÃO DE FENÓIS E TANINOS.....	36
4.6. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PARA CARACTERIZAÇÃO DE TRITERPENOS E ESTEROIDES (LIEBERMAN-BURCHARD).....	36
4.7. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PARA CARACTERIZAÇÃO DE SAPONINAS...	36
4.8. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PARA CARACTERIZAÇÃO DE ALCALOIDES.	37
4.9. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PARA ANTOCIANINAS, ANTOCIANIDINAS E FLAVONOIDES.	37
4.10. PROSPECÇÃO PARA LEUCOANTOCIANIDINAS, CATEQUINAS E FLAVANONAS.	38
4.11. AVALIAÇÃO EM PLACAS CROMATOGRÁFICAS.....	38

4.12. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	39
4.13. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	39
4.13.1. QUALITATIVO	39
4.13.2. QUANTITATIVO	39
4.14. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS.....	40
4.15. DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS	40
4.16. SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS POR CROMATOGRAFIA EM CONTRA CORRENTE DE ALTO DESEMPENHO – HPCCC (HIGH PERFOR- MANCE COUNTER CURRENT CHROMATOGRAPHY)	41
4.17. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA - CL/EM	48
4.18. CROMATOGRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR "PHOTODIODEARRAY" – CLAE / DAD.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>S. CUMINI</i>	52
5.1.1 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL E EFEITO DA SAZONALIDADE NO RENDIMENTO.....	52
5.1.2 EFEITO DO REGIME HÍDRICO E TEMPERATURA NO RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>S. CUMINI</i>	53
5.1.3 COMPARAÇÃO DO RENDIMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL ENTRE FOLHAS FRESCAS E SECAS DE <i>S. CUMINI</i>	55
5.1.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).	55
5.1.5 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS E SECAS DE <i>S. CUMINI</i>	62
5.2 FITOQUÍMICA	68
5.2.1. RENDIMENTO DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES.....	68
5.2.2 FITOQUÍMICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>S.</i> <i>CUMINI</i>	68
5.2.2.1. REAÇÕES CROMÁTICAS EM TUBOS.....	68
5.2.2.1.1 TESTE PARA FENÓIS E TANINOS	69
5.2.2.1.2. TESTE PARA ANTOCIANIDINAS, ANTOCIANINAS E FLAVONOIDES. ...	69
5.2.2.1.3 TESTE PARA FLAVONA, FLAVONÓIS E XANTONAS.....	69
5.2.2.1.4. TESTE PARA LEUCOANTOCIANIDINAS, CATEQUINAS E FLAVANONAS.	70
5.2.2.1.5. TESTE PARA ESTEROIDES E TRITERPENOS	70
5.2.2.1.6. TESTE PARA SAPONINAS.....	71

5.2.2.1.7. TESTE PARA ALCALOIDES	71
5.2.2.2. CCD	71
5.2.2.2.1. TESTE PARA TERPENOS	71
5.2.2.2.2. TESTE PARA FLAVONOIDES.....	72
5.2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSEN- CIAL, DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DAS FOLHAS DE S. CUMINI.....	72
5.2.3.1. TESTE QUALITATIVO	72
5.2.3.1.1. EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES	72
5.2.3.1.2. SUBFRAÇÕES DE FAAZ.....	72
5.2.3.2. TESTE QUANTITATIVO	74
5.2.3.2. 1. ÓLEO ESSENCIAL.....	74
5.2.3.2. 2. EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES	75
5.2.3.2.3. SUBFRAÇÕES DE FAAZ.....	77
5.3. PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DAS SUSBTÂNCIAS POR CLAE/EM.....	77
6. CONCLUSÃO	98
7. REFERÊNCIAS:.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Constituintes químicos de <i>S. cumini</i>	24
Tabela 2– Identificação dos constituintes em pH 3, 8,5 e 11	37
Tabela 3– Identificação dos constituintes em pH 2 e 11	38
Tabela 4 -Sistemas HEMWats e EBWats.....	42
Tabela 5- Sistemas modificados HEMWats.....	45
Tabela 6 - Sistemas modificados EBWats.....	45
Tabela 7- Reunião subfrações de FAAZ oriundas da pré-purificação do HPCCC.	50
Tabela 8- Rendimento de óleo essencial de <i>S. cumini</i> (%).	52
Tabela 9 - Rendimento de óleo essencial de folhas secas e frescas de <i>S. cumini</i> (%)...	54
Tabela 10- Área (%)) das substâncias majoritárias do óleo essencial das folhas de <i>S. cumini</i> no período de 2013-2014.	57
Tabela 11 - Área (%) das substâncias majoritárias do óleo essencial de folhas frescas e secas de <i>S.cumini</i>	63
Tabela 12 - Rendimento do extrato bruto e frações.....	68
Tabela 13- Testes para fenóis e taninos.....	69
Tabela 14 - Teste para Antocianinas e Antocinidinas	69
Tabela 15 - Teste para Triterpenos e esteroides	70
Tabela 16- AA de óleo essencial <i>S. cumini</i> , n=3	74
Tabela 17 - Atividade Antioxidante do Extrato Bruto e Frações <i>S. cumini</i>	75
Tabela 18 - CI ₅₀ (µg/mL) <i>S. cumini</i> - Benherlal (2007)	76
Tabela 19 - Concentração de FET e FLT no Extrato Bruto e Frações <i>S. cumini</i>	76
Tabela 20 - Atividade antioxidante, CI ₅₀ e concentração de FET e FLT das subfrações de FAAZ	77
Tabela 21 - Substâncias Propostas encontradas em Folhas de <i>S. cumini</i> , realizada em equipamento CLAE-DAD-IQPA/EM modo de ionização negativo 35 eV.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos. Fonte: Filho e Yunes, 1998.	19
Figura 2 - <i>S. cumini</i>	21
Figura 3- Classificação dos diferentes instrumentos de CCC. Fonte: Hostettmann, 2001	26
Figura 4- Esquema de funcionamento de HPCCC modificado. Fonte: COLEGATE E MOLYNEUX, 2007.	27
Figura 5 - Esquema de Funcionamento de CLAE/PDA-EM (fonte: COLEGATE, e MOLYNEUX, 2007).	29
Figura 6- Folhas (A) e Inflorescência e frutos (B) de <i>S. cumini</i>	33
Figura 7- Fluxograma da coleta e processamento do material vegetal, extrato bruto e frações de <i>S. cumini</i> (AZ).	35
Figura 8– Placa dos sistemas testados revelados com NP/PEG.	43
Figura 9- Cromatoplaça das subfrações de FAAZ fracionada em HPCCC.	43
Figura 10- Fluxograma de obtenção das subfrações de FAAZ por HPCCC.	43
Figura 11- CCD de FAAZ de 1200,00 mg corrida em HPCCC.	44
Figura 12- CCD de FAAZ de 1200,00 mg corrida em HPCCC.	44
Figura 13- Fluxograma obtenção das subfrações de FAAZ por HPCCC.	Erro!
Indicador não definido.4	
Figura 14 -Fracionamento da subfração FAAZ3.	45
Figura 15- Cromatoplaça da subfração FAAZ3a à FAAZ3h eluída em diclorometano: acetona: metanol (DAM)(6,5: 1,5: 3) e revelada com NP/PEG.	456
Figura 16- Fracionamento da subfração FAAZ4.	46
Figura 17– Cromatoplaça das subfrações FAAZ4a à FAAZ4i eluída em diclorometano: acetona: metanol (DAM) (6,5: 1,5: 3) e revelada com NP/PEG.	4546
Figura 18 - Fracionamento da subfração FAAZ5.	467
Figura 19 - Cromatoplaça das subfrações FAAZ5a à FAAZ5c eluída em diclorometano: acetona: metanol (DAM) (6,5: 1,5: 3) e revelada com NP/PEG.	47
Figura 20– Fracionamento da subfração FAAZ6.	468
Figura 21- Cromatoplaça da Subfração FAAZ6a à FAAZ6h eluída em diclorometano: acetona: metanol (DAM) (6,5: 1,5: 3) e revelada com NP/PEG.	48

Figura 22 - Cromatoplaça eluída em BAW (4:1:5) subfrações IFAAZ1a – IFAAZ10a revelada em NP/PEG.....	51
Figura 23- Cromatoplaças das subfrações IFAAZ1a – IFAAZ10a eluídas nos sistemas 5 e 6, reveladas com NP/PEG.....	51
Figura 24 - Rendimento Óleo essencial (%) das folhas de <i>S.cumini</i> x Volume de precipitação (mm).....	54
Figura 25- Rendimento óleo essencial (%) das folhas de <i>S.cumini</i> . x Temperatura média (°C).	54
Figura 26 - Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de <i>S. cumini</i> (17 /10 / 2013).....	56
Figura 27 - Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de <i>S. cumini</i> (18 /06/ 2014).....	56
Figura 28 - Área (%) de α – pineno e canfeno..	58
Figura 29 - Rota da biossíntese do α – pineno e β – pineno, fonte: Dewick 2002.	59
Figura 30 - Espectro de massas e estrutura do α – pineno.....	59
Figura 31- Espectro de massas e estrutura do canfeno.....	60
Figura 32- Área (%) do (Z) β - ocimeno e (E) β - ocimeno do óleo essencial de <i>S. cumini</i> no período de Ago/2013 – Ago/2014.	61
Figura 33 - Espectro de massas e estrutura do (Z) β - ocimeno	61
Figura 34- Espectro de massas e estrutura do (E) β - ocimeno (17/10/2013).	62
Figura 35 - Espectro de massas do β - pineno	64
Figura 36- Espectro de massas do β - mirceno.....	64
Figura 37-Espectro de massas e estrutura do <i>trans</i> -cariofileno.....	65
Figura 38- Espectro de massas e estrutura do α -humuleno	65
Figura 39 - Espectro de massas e estrutura do <i>p</i> -cimeno	65
Figura 40 - Espectro de massas e estrutura do limoneno.	65
Figura 41 - Espectro de massas e estrutura do α -terpineol.....	66
Figura 42 - Espectro de massa e estrutura do acetato de bornila.....	66
Figura 43 - Substâncias majoritárias do óleo essencial das folhas de <i>S. cumini</i>	67
Figura 44 - Cromatoplaça para terpenos eluída em BAW (4: 1: 5) revelada com vanilina sulfúrica.	71
Figura 45 - Teste qualitativo de atividade antioxidante subfrações FAAZ – DPPH.....	73
Figura 46 - Atividade antioxidante das IFAAZ1a – IFAAZ10a	74
Figura 47 - Espectro de massas da substância 1	78

Figura 48 - Espectro de massas da substância 2	79
Figura 49 - Cromatograma CLAE- EM da fração FAAZ3b	79
Figura 50 -Espectro de massas da amostra 12	79
Figura 51 - Espectro UV de comprimento de onda 200- 600 nm da amostra 12	80
Figura 52 - Estruturas básicas das flavonas e flavonóis.	80
Figura 53 - Estrutura do ácido caféico.....	85
Figura 54 - Estrutura da metil miricetina glicosídico	85
Figura 55 - Estrutura do ácido <i>trans</i> -cinâmico	86
Figura 56- Estrutura do metil galato.....	86
Figura 57 - Estrutura do ácido gálico	86
Figura 58 - Estrutura do metóxi metil galato.....	87
Figura 59 - Estrutura do ácido protocatecuico.....	87
Figura 60 - Estrutura da miricetina 3-O- 3''- acetil-raminosídica.....	88
Figura 61 - Estrutura da miricetina 3,4'-di-O- α -L-raminopiranosídico	88
Figura 62 - Estrutura da floridzina	89
Figura 63 - Estrutura da miricetina 3-O- 2''- acetil- raminosídica.....	89
Figura 64 - Estrutura da miricetina.....	90
Figura 65 - Estrutura da miricetina 3-O- 4''- acetil-raminosídica.....	91
Figura 66 - Estrutura da miricetina 3-O- 3''- acetil-raminosídica.....	91
Figura 67- Cromatograma dos isômeros da miricetina 3-O- 2''- acetil-raminosídica ...	91
Figura 68 - Espectros de massas dos isômeros da miricetina 3-O- 2''- acetil-raminosídica.....	92
Figura 69 - Espectros em comprimentos de onda UV dos isômeros da miricetina 3-O- 2''- acetil-raminosídica.....	93
Figura 70 - Estrutura da mearnsetin 3-O-(4''-O-acetil)- α -L-1C4-raminopiranosídica (substância 24).....	94
Figura 71 - Espectro de massas da mearnsetin 3-O-(4''-O-acetil)- α -L-1C4-raminopiranosídica (substância 24).....	94
Figura 72 - Espectro de UV da mearnsetin 3-O-(4''-O-acetil)- α -L-1C4-raminopiranosídica (substância 24)..	95
Figura 73 - Estrutura do galoil glicosídico	96
Figura 74 - Estrutura da isoquercetrina	96
Figura 75 - Estrutura do hiperosídeo	96

Figura 76 - Espectros de massas da hiperosídeo (26) e da isoquercetrina (27).....	97
Figura 77 - Espectros UV do hiperosídeo (26) e da isoquercetrina (27).....	887

LISTA DE SIGLAS e SÍMBOLOS

AA – Atividade antioxidante	DPPH - 2,2-difenil-picril-hidrazil
AC – Antocianinas	EBWat – Acetato de etila : butanol : água
ACN-Acetonitrila	FAAZ – Fração acetato de etila
AL – Alcaloides	FAZ – Extrato bruto de <i>S. cumini</i>
AZ – Folhas de <i>S. cumini</i>	FBAZ – Fração butanólica
BAW – Butanol: ácido acético glacial: água	FCAZ – Fração clorofórmica
BHA - Hidroxianisol butilada	FET – Fenóis totais
CBM –20A – Controlador de sistema	FHAAZ – Fração hidroalcóolica
CCC – Cromatografia de contra corrente	FHAZ – Fração hexânica
CCD - Cromatografia em camada delgada	FL - Flavonoides
CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	FLT - Flavonoides totais
CL-EM - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas	FN – Fenóis
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência	HEMWat- Hexano: acetato de etila: metanol: água
CPC - Cromatografia de partição centrifuga	HPCCC - Cromatografia em contra corrente de alto desempenho
DAW – Diclorometano: acetona: água	HSCCC - Cromatografia em contra corrente de alta velocidade
DAAA – Diclorometano: acetonitrila: água: ácido acético glacial	I – Fase inferior
DCCC - Cromatografia em contra corrente de gotejamento	CI ₅₀ – Concentração que inibe 50% (de DPPH)
DNA – Ácido desoxirribonucleico	IFAAZ – Substâncias isoladas da fração acetato de etila
	INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

KI – Índice de Kovats

NP – Difenilborato

OMS- Organização Mundial da Saúde.

RLCCC - Cromatografia em contra corrente de rotação locular

RMN – Ressonância magnética nuclear

Rpm – Rotações por minuto

S - Fase superior

SN – Saponinas

TN – Taninos

PEG – Polietileno glicol

Rf – Fator de retenção.

TP – Terpenois e ou esteroides

Tr – Tempo de retenção

USP – Universidade de São Paulo

UV – Ultravioleta

v/m – Volume dividido pela massa

v/v – Volume dividido pelo volume

RESUMO

Syzygium cumini (L.) Skeels pertence à família Myrtaceae e sub família Myrtoideae. Vários estudos demonstram as atividades farmacológicas de *S. cumini* tais como antidiabética, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante. Resultados encontrados na literatura reporta a presença de compostos fenólicos nesta espécie. As folhas de *S. cumini* foram coletadas de uma única planta a cada dois meses no período de 08/2013 a 08/2014 para obtenção de óleos essenciais por hidrodestilação de folhas frescas e secas. O extrato foi obtido sob refluxo com etanol 70%. O extrato bruto foi fracionado por partição líquido-líquido obtendo-se fração hexânica (FHAZ), fração clorofórmica (FCAZ), fração acetato de etila (FAAZ), fração butanólica (FBAZ) e fração hidroalcóolica (FHAAZ). FAAZ foi fracionada por cromatografia contra corrente de alto desempenho (HPLC) utilizando sistemas de solventes HEMWats (hexano: acetato de etila: metanol: água) e EBWats (acetato de etila: butanol: água). O rendimento de óleo essencial das folhas frescas foi maior no período que a planta estava no estágio de inflorescência e ocorreu uma diminuição logo após o período de final de produção de frutos e nas amostras seguintes uma ligeira estabilização no rendimento. O resultado da influência da temperatura demonstrou um aumento de rendimento de óleo essencial das folhas de *S. cumini* em períodos de temperaturas mais elevadas. Os rendimentos dos óleos essenciais das folhas secas foram sempre superiores aos valores encontrados nas folhas frescas. Foi observado ainda mudança das concentrações dos metabólitos secundários, por exemplo, o α -pineno em jun/2014 folhas secas 46,34 % e folhas frescas 39,40 %. Em relação aos ensaios de atividade antioxidante, foi verificado atividade para todas as frações e extrato testados frente ao radical DPPH (2,2-difenilpicril-hidrazil). O valor de CI_{50} das frações FAAZ, FBAZ e FHAAZ foram próximos ao do padrão de ácido gálico. O resultado de CI_{50} da fração FAAZ $9,40 \pm 0,40 \mu\text{g/mL}$ foi menor do que os encontrados na literatura. Os valores de CI_{50} das subfrações obtidas em HPLC foram: FAAZ81 $22,13 \pm 1,12 \mu\text{g/mL}$, FAAZ82 $8,60 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$, FAAZ83 $14,17 \pm 0,60 \mu\text{g/mL}$ e FAAZ84 $2,87 \pm 1,25 \mu\text{g/mL}$. Foi verificado por CLAE/EM a presença de 36 substâncias na fração em acetato de etila (FAAZ). Sendo 19 primeiramente, identificadas como pertencente à classe dos flavonoides e outros compostos fenólicos, apresentando atividade antioxidante, frente ao radical DPPH.

Palavras Chaves: Myrtaceae, Óleo essencial, Atividade antioxidante e HPLC.

ABSTRACT

Syzygium cumini (L.) Skeels belongs to the Myrtaceae family and sub Myrtoideae family. Several studies have shown pharmacological activity *S. cumini* such as anti-diabetic, anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant. Results found in the literature reports the presence of phenolic compounds in this species. The leaves of *S. cumini* were collected from a single plant every two months during the period from 08/2013 to 08/2014 to obtain essential oils by hydrodistillation of fresh and dried leaves. The extract obtained was refluxed with 70% ethanol. The crude extract was fractionated by liquid-liquid partition obtaining hexane fraction (FHAZ), chloroform fraction (FCAZ), ethyl acetate fraction (FAAZ), butanol fraction (FBAZ) and hydroalcoholic fraction (FHAAZ). FAAZ was fractionated by chromatography high performance against current (HPCCC) HEMWats using solvent systems (hexane: ethyl acetate: methanol: water) and EBWats (ethyl acetate: butanol: water). The yield of essential oil of fresh leaves was higher in the period that the plant was in inflorescence stage and a decrease occurred shortly after the end of season fruit production and the following samples a slight stabilization in revenue. The result of the influence of temperature essential oil showed a yield increase of sheets *S. cumini* periods in higher temperatures. Proceeds essential oils from dried leaves were always higher than the values found in the fresh leaves. It was also observed change in concentration of secondary metabolites, e.g., α -pinene in June / 2014 dry leaves 46.34% and 39.40% fresh leaves. In relation to the antioxidant activity assays, activity was observed for all tested against the fractions and extract the radical DPPH (2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl). The IC₅₀ value of FAAZ fractions, FBAZ and FHAAZ were close to the standard of gallic acid. The result of IC₅₀ fraction FAAZ $9.40 \pm 0.40 \mu\text{g} / \text{mL}$ was lower than those found in the literature. The IC₅₀ values obtained for the subfractions were HPCCC: FAAZ81 $22.13 \pm 1.12 \mu\text{g} / \text{mL}$, FAAZ82 $8.60 \pm 0.26 \mu\text{g} / \text{mL}$, FAAZ83 $14.17 \pm 0.60 \mu\text{g} / \text{ml}$ and FAAZ84 $2.87 \pm 1.25 \mu\text{g} / \text{mL}$. This was shown by HPLC / MS the presence of substances in the fraction 36 in ethyl acetate (FAAZ). 19 first being identified as belonging to the class of flavonoids and other phenolic compounds, with antioxidant activity against DPPH radical.

Key Words: Myrtaceae, essential oil, antioxidant activity and HPCCC.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Considera-se como planta medicinal, qualquer planta que possui, em um dos órgãos ou em toda planta, substâncias com propriedades terapêuticas ou que sejam ponto de partida na síntese de produtos químicos ou farmacêuticos (WHO, 1998). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (AKERELE, 1993), por causa da pobreza e falta de acesso à medicina moderna, cerca de 65 - 80% da população do mundo que vive em países em desenvolvimento dependem essencialmente de plantas para os cuidados primários de saúde. Segundo a OMS, o uso de plantas medicinais para o tratamento das mais diversas enfermidades tem levado países como a China a consumir dentre o total de medicamentos cerca de 30-50% de drogas de origem vegetal. Na Europa e América do Norte 50% da população já fez uso de fitoterápicos. Na Alemanha destaca-se um índice de 90% de uso de formas farmacêuticas contendo algum componente de origem vegetal (OMS, 2003).

Os primeiros relatos do uso das plantas medicinais datam de 2.600 A.C. tais espécies utilizadas na Mesopotâmia ainda são mencionadas pelas sociedades atuais para tosse, febre e inflamação (GURIB - FAKIM, 2006). As plantas medicinais têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de várias enfermidades. Sua aplicação é vasta e abrange desde o combate ao câncer até os microrganismos patogênicos (CALIXTO, 2000). Atualmente, as grandes empresas farmacêuticas têm demonstrado um interesse renovado na investigação de plantas superiores como fontes de novas estruturas e também para o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados com comprovada eficácia, segurança e qualidade (CALIXTO, 2000).

O Brasil contribui com 120 mil espécies, a grande maioria na região amazônica, das quais o saber popular selecionou cerca de duas mil como medicinais. Dessas, apenas 10% foram cientificamente investigadas do ponto de vista químico-farmacológico (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

No estudo de plantas úteis no Brasil gravadas por Saint-Hilaire em seu livro de campo, mostra que metade das informações nunca foram publicadas, onde dados de uso

da planta foram obtidos, quando a vegetação nativa do Brasil ainda estava preservada e a medicina tradicional era praticada com base em plantas nativas. Poucas espécies foram investigadas em detalhes através de estudos de laboratório (BRANDÃO et al., 2012).

1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Dentre os produtos naturais empregados em abordagens terapêuticas, os óleos essenciais, utilizados frequentemente na aromaterapia, são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico. (EDRIS, 2007).

Óleos essenciais são naturais, voláteis e complexos. São caracterizados por um forte odor sendo sintetizados por plantas aromáticas durante o metabolismo secundário e normalmente extraídas de plantas encontradas em países quentes, como as do mediterrâneo e dos trópicos, onde representam parte importante da farmacopeia tradicional (MACHADO, 2011).

Os gêneros botânicos que elaboram os compostos que constituem os óleos essenciais são distribuídos em um número limitado de famílias, como Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae e Zingiberaceae (BRUNETON, 1999).

Alguns óleos essenciais têm alta toxicidade, ação repelente, inibidores da alimentação, além de exercerem influência no desenvolvimento de organismos vivos, como os insetos (SAITO e LUCCHINI, 1998).

A composição química dos óleos essenciais pode ser dividida em duas classes. A primeira, com base na biossíntese, na qual se encontram os derivados dos terpenoides, formados pela via do ácido mevalônico-acetato; e a segunda, na qual se situam derivados do fenilpropanoide, compostos aromáticos formados pela via do ácido chiquímico (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais são extraídos de diferentes partes das plantas, por exemplo, folhas, cascas, flores, brotos, sementes, frutos e raízes. Podem-se utilizar vários métodos de extração dentre eles, a destilação a vapor, expressão, hidrodifusão, extração com solvente, CO₂ supercrítico, água subcritical e microondas livre de solvente. O método de destilação a vapor tem sido amplamente utilizado, especialmente para produção em escala comercial (CASSEL et al., 2009).

Os óleos essenciais sofrem variações no rendimento e composição química, as quais são causadas por diversos fatores e condições ambientais, tais como temperatura, precipitação, umidade, duração e intensidade das irradiações solares, interações com polinizadores e predadores (SANGWAN et al., 2001).

Os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados como condimentos e aditivos em alimentos, pois possuem atividades antioxidante e antimicrobiana (BURT, 2004).

As flores, folhas, cascas e rizomas também são matérias-primas para extração de importantes óleos para o comércio, com destaque para os óleos essenciais de rosas, eucalipto, canela e gengibre. Estes óleos apresentam grande aplicação nas indústrias de perfumaria, cosméticos, alimentos e são coadjuvantes em medicamentos. (BIZZO et al., 2009).

Existem 17.500 espécies de plantas aromáticas entre plantas superiores e cerca de 3.000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes para produtos farmacêuticos, cosméticos e indústrias de perfume (VAN de BRAAK e LEIJTEN, 1999). Tem sido reconhecido desde há muito tempo que alguns óleos essenciais têm propriedades antimicrobianas (SARTORATTO et al., 2004; MARI et al., 2003; MOUREY e CANILLAC, 2002; JUGLAL et al., 2002), antiviral (BISHOP, 1995), antiparasitários (PESSOA et al., 2002), e inseticida (COITINHO et al., 2006). Estas propriedades estão possivelmente relacionadas com a função destes compostos nas plantas (MAHMOUD e CROTEAU, 2002).

1.3 OBTENÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS DE EXTRATOS DE PLANTAS

Para obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos que deve ser observado consiste nas informações da medicina popular. Pois é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso (BRASILEIRO et al., 2008).

Algumas etapas básicas podem ser seguidas quando se procura obter princípios ativos de plantas. O procedimento deve basear-se no fato de que toda substância, independente de sua proporção na planta, e de ser conhecida ou não, pode ser um princípio ativo (HAMBURGER E HOSTETTMANN, 1991), conforme mostrado na figura 1.

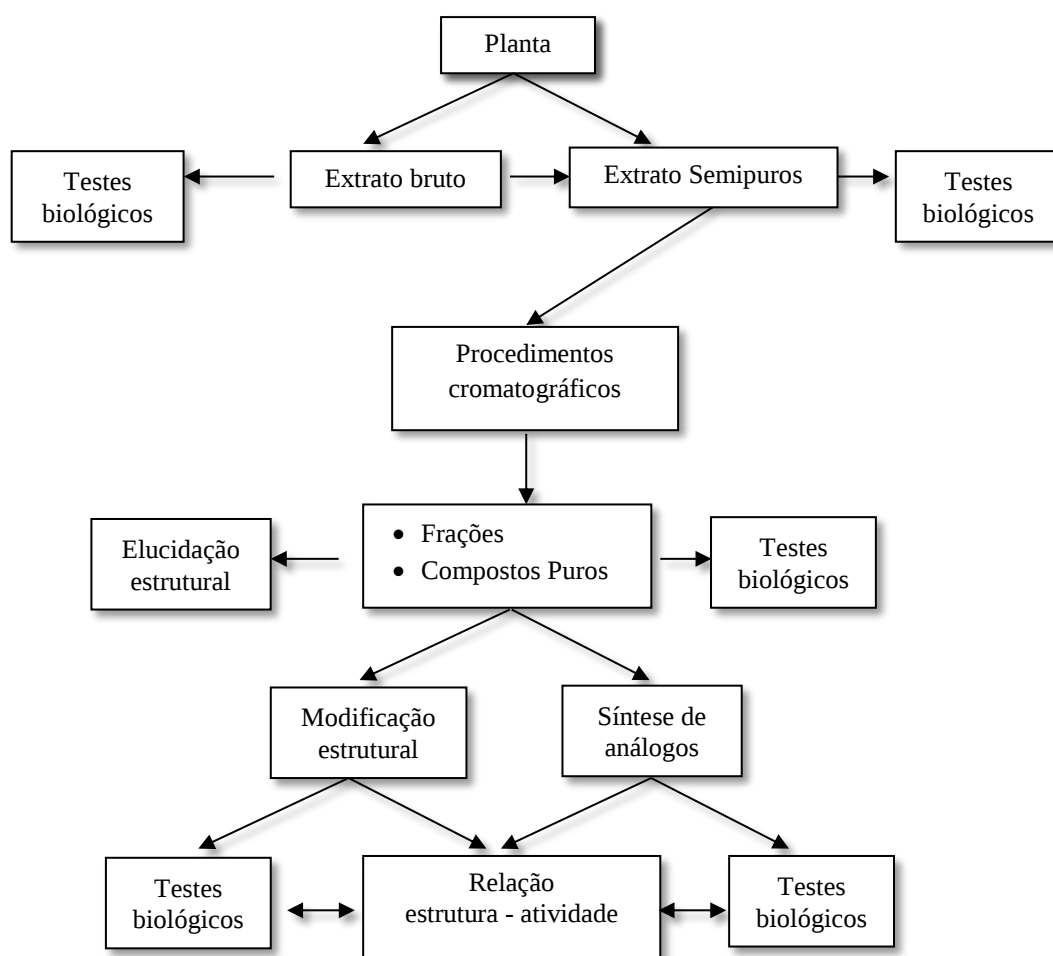


Figura 1 - Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos.
Fonte: Filho e Yunes, 1998.

Os métodos de extração de plantas mais utilizados são, percolação, maceração, decocção, em aparelho de Soxhlet e a destilação por arraste (BRAZ-FILHO, 1994).

Os solventes mais comuns que são incompatíveis com a água na extração de compostos orgânicos são: éter etílico, clorofórmio, diclorometano e hexano. Pois, são relativamente insolúveis em água e formam, portanto, duas fases distintas. A seleção do solvente dependerá da solubilidade da substância a ser extraída e da facilidade com que o solvente possa ser separado do soluto (SARKER et al., 2006).

1.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993). Os principais alvos de ataque dos radicais livres são os lipídios (peroxidação lipídica), proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (DNA) (HENRIQUES et al., 2001) comprometendo desta forma a integridade celular.

Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES & STAHL, 1995). Dentre os vários compostos com efeitos benéficos ao organismo, destacam-se os antioxidantes, um grupo de compostos químicos possuidores de múltiplas funções que permitem ao organismo combater eficientemente o excesso dos radicais livres, retardando ou prevenindo a oxidação celular (SUHAJ, 2006).

São encontrados inúmeros compostos naturais em frutas, cereais e vegetais que apresentam atividade antioxidante. Entre os mais importantes antioxidantes naturais estão os compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e taninos), compostos nitrogenados (alcaloides, aminoácidos, peptídeos, aminas e derivados da clorofila), carotenoides, tocoferóis e ácido ascórbico (AMAROWICZ et al., 2004). Vários estudos estão voltados para pesquisa de frutos de *Syzygium cumini* que possui essa propriedade, bem como o desenvolvimento de novos produtos que também proporcionem essa ação ao organismo humano (AYYANAR e SUBAHS-BABU, 2012).

1.5 SYZYGIUM CUMINI

1.5.1 CARACTERÍSTICAS E DESCRIÇÃO BOTÂNICA

A família Myrtaceae se divide em duas subfamílias Myrtoideae e Leptospermoideae, que se distinguem pelos frutos carnosos e folhas opostas na primeira e frutos secos e folhas alternas na segunda (SOBRAL et al., 2010).

Syzygium cumini (L.) Skeels (figura 2) pertence à família Myrtaceae e subfamília Myrtoideae. É originária, da Índia e Java (LIBERATO, 2007) e foi introduzida em muitos países tropicais na África e América Latina. No Brasil é encontrada em diversos Estados das regiões Sudeste, Nordeste e Norte. Pode também ser encontrada em algumas regiões subtropicais como a Flórida e a Califórnia nos Estados Unidos, Argélia e Israel (ROSS, 1999). É uma árvore perenifólia, com até 18 m de altura, totalmente glabra, copa irregular, tronco de ritidoma espesso, rugoso e cinzento na parte inferior, destacando-se em pequenas placas, raminhos pendentes e roliços, folhas opostas, floração em outubro e novembro, frutificação em dezembro e janeiro (LIBERATO, 2007).



Figura 2 - *S. cumini*.

1.5.2 TAXONOMIA

Syzygium cumini (L.) Skeels é conhecida no Norte e Nordeste do Brasil por azeitona roxa, jabolão e jamelão em outras regiões do país. Esta espécie apresenta outras sinonímias, como *Eugenia cumini* (L.) Druce, *Eugenia jabolana* Lam., *Syzygium jabolanium* DC (DUKE, et al., 2002).

Reino: Plantae

Sub reino: Tracheobionta

Super divisão: Spermatophyta

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sub classe: Rosidae

Família: Myrtaceae

Gênero: *Syzygium*

Espécie: *Syzygium cumini* (L.) Skeels

1.5.3 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

S. cumini é cultivada no Brasil como planta ornamental e o chá de suas folhas é normalmente utilizado por pacientes diabéticos (TEIXEIRA et al., 1990; SOARES et al., 2000). Tanto a casca como as folhas e as sementes são bastantes adstringentes. O suco dos frutos é utilizado como adstringente, diurético, antidiabético e estomáquico. As cascas, devido às propriedades adstringentes, são utilizadas contra diarreias crônicas, disenteria e menorragia. A decocção da casca é um eficaz enxaguante bucal no tratamento de aftas, estomatites, afecções da garganta e outras doenças das vias orais (KHARE, 2007).

Vários estudos demonstram as atividades farmacológicas e biológicas de *S. cumini* tais como antidiabética (KUMAR et al., 2008a; PATEL et al., 2009), anti-inflamatória (LIMA et al., 2007; KUMAR et al., 2008b), antimicrobiana (MIGLIATO et al., 2010; SHAFI et al., 2002; BRAGA et al., 2007), antioxidante (KANERIA & CHANDA. 2013; RUAN et al., 2008; VEIGAS et al., 2007; SULTANA et al., 2007; BANERJEE et al., 2005; KANERIA et al., 2009), antigenotóxica (BARTOLOME et al., 2006), leishmanicida (BRAGA et al., 2007), citotóxica em larvas de *Artemia salina*

(KRISHNARAJU et al., 2006), anti-hiperlipidêmica (PATEL et al., 2009), no sistema nervoso central (KUMAR et al., 2007), antialérgica (BRITO et al., 2007), antifertilidade (RAJASEKARAN et al., 1988), gastroprotetora (RAMIREZ e RAO 2003) e radioprotetora (JAGETIA e BALIGA 2008).

1.5.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *S. cumini*.

Diversos constituintes químicos (Tabela 1.) de *S. cumini* já foram identificados tais como, quercetina, kaempferol, dihidroquercetina, miricetina, malvidina, petunidina, ácido elágico, ácido gálico, ácido oleanólico, isoquercetina, vitamina C, eugenol, α -pineno e terpineno (AYYANAR & SUBASH-BABU, 2012).

Tabela 1- Constituintes químicos de *S. cumini*.

Partes da Planta	Constituintes químicos	Referências
	Quercetina, miricetina, miricetina 3-O-4-acetil-L- rhamnopiranosídeo.	Timbola et al., (2002)
	Ácido gálico, metil galato, campenferol, miricetina, ácido elágico, ácido 3-O-metil elágico, miricetina 3-O-(4"-O-acetil) - α -L-rhamnopiranosídeo (miricetrin 4"-O-acetato), miricetina éter 4'-metil-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo, miricetrina, ácido clorogênico, quercetrina 4"- O-acetato, quercetina 3-O- α -L-raminopiranosídeo, campenferol 3-O- β -D-glucuronopiranosídeo, miricetina 3-O- β -D-glocuronopiranosídeo, elagitanino, nilocitina, 3-O-(4"-O-acetil)- α -L-rhamnopiranosídeo e miricetrin 4"-O-acetil-2"-O-galato.	Mahmoud et al., (2001)
Folhas (Fo)	Ácido betulínico, ácido cratególico.	Gupta, Sharma, (1974)
	β -sitosterol, ácido betulínico, micaminose, ácido cratególico, n-hepatcosano, n-nonacosano, n-hentriacontano, noctacosanol, n-triacontanol, n-dotricontanol, quercetina, miricetina.	Sagrawat et al., (2006)
	Pinocarveol, α -terpeneol, mirtenol, eucarvono, murolol, α -mirtenal, cineole, geranil acetona, α -cadinol e pinocarvona.	Shafi et al., (2002)
Sementes (Se)	Ácido gálico, elágico, corilágico, α - e β -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, cis e trans- ocimeno, γ -terpineno, terpinoleno, acetato de bomila, α -copaeno, α -humuleno e candineno.	Sengupta (1965); Bhargava (1974)
Flores (Fl)	Campenferol, quercetina, miricetrina, isoquecercetina, ácido acetil oleanoico, antocianidinas.	Subramanian, (1972)
Frutos (Fr)	α - e β -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, cis e trans- ocimeno, γ -terpineno, terpinoleno, acetato de bomila, α -copaeno, α -humuleno, candineno, malvidina- 3- glicosídeo, petunidina -3-glicosídeo. malvidina, petunidina e cianidina.	Venkateswarlu (1952); Lewis, (1956); Veigas (2007); Priya (2013)

1.6 CROMATOGRAFIA CONTRA CORRENTE – CCC

Cromatografia em contra corrente (CCC) é um processo cromatográfico de partição líquido-líquido em que a fase móvel e estacionária são líquidas (BERTHOD, 2002). A "coluna" é constituída de um longo tubo dentro de um tambor (bobina), que é voltado para o rotor principal de tal forma que ele gira simultaneamente a duas vezes a velocidade do rotor (movimento planetário). Esse duplo movimento configura um flutuante campo de força que obriga uma fase (a fase menos densa ou leve) mover-se para o fim que por definição chama-se de "cabeça" da bobina ou coluna e a outra (a mais densa, fase mais pesada) vai deslocando-se para a extremidade oposta da bobina / coluna chamada "cauda". Mudando a direção do movimento simplesmente muda a notação cabeça / cauda ao redor (SUTHERLAND et al., 2009).

Através da medição do deslocamento da fase superior (estacionária) da coluna durante o equilíbrio do processo, é possível calcular a quantidade de fase estacionária esquerda na coluna e prever exatamente quando os compostos irão eluir com base na sua razão de distribuição (por vezes referido como o coeficiente de partição). A razão de distribuição é normalmente definida como a concentração de um composto na fase estacionária dividida pela concentração na fase móvel (COSTA e LEITÃO, 2010).

Os tipos de CCC utilizados são: Cromatografia em contra corrente de gotejamento (DCCC), Cromatografia em contra corrente de rotação locular (RLCCC), Cromatografia em contra corrente de alta velocidade (HSCCC), Cromatografia em contra corrente de alto desempenho (HPCCC) e Cromatografia de partição centrífuga (CPC). A figura 3 mostra a classificação dos diferentes instrumentos de CCC segundo Hostettmann et al., (2001).

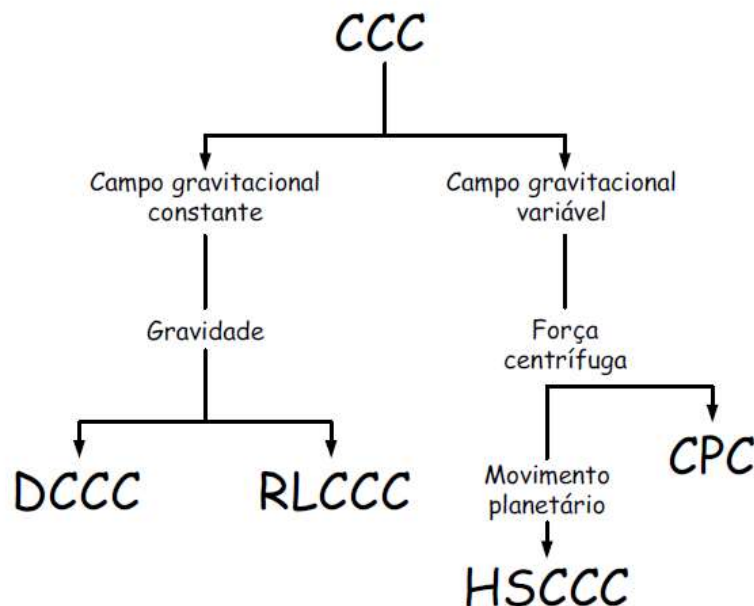


Figura 3- Classificação dos diferentes instrumentos de CCC. Fonte: Hostettmann, 2001

Nesta técnica cromatográfica, a composição do sistema bifásico de solventes a ser utilizado como fase estacionária e como fase móvel foi, primeiramente, estabelecido através de cromatografia em camada delgada (CCD), buscando-se condições otimizadas para uma boa resolução do material a ser separado e purificado na coluna (bobina) (SILVA et al., 2008). Além disso, como um dos critérios de eficiência do sistema bifásico, as fases resultantes devem ser susceptíveis de uma imediata separação e recomposição, após agitação intensa (CONWAY, 1990). O processo requer ainda que a amostra a ser analisada apresente boa solubilidade no sistema bifásico de solventes e, fundamentalmente, alcance uma distribuição equitativa, o mais próximo possível da unidade (1:1) em ambas as fases (HOSTETTMANN e MARSTON, 2001).

Um sistema de HPCCC típico modificado consiste de um reservatório de fase móvel, uma bomba, uma válvula de injeção, uma coluna, um detector, um coletor de frações, e um processador ou registador de dados, conforme figura 4 (COLEGATE e MOLYNEUX, 2007).

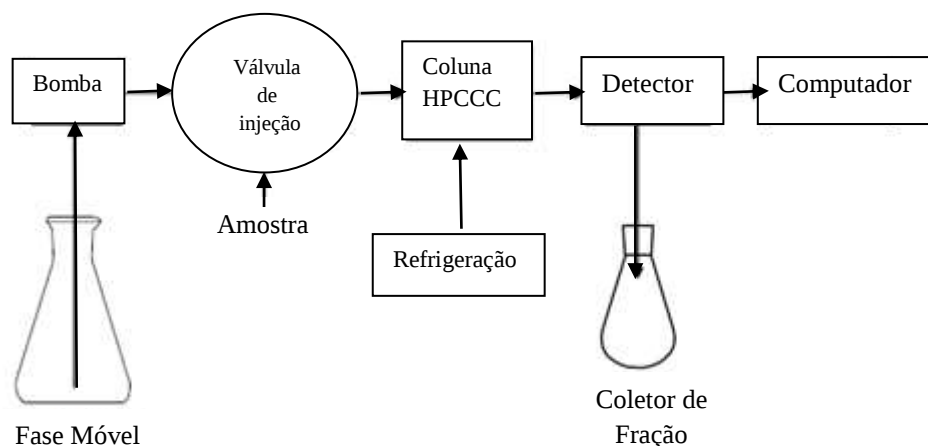


Figura 4- Esquema de funcionamento de HPCCC modificado. Fonte: COLEGATE E MOLYNEUX, 2007.

A utilização da HPCCC quase não há perda de massa da amostra injetada, segundo Ito et al., (1969) a cromatografia contracorrente de alto desempenho (HPCCC) é uma técnica cromatográfica de partição líquido-líquido livre de suporte, que opera sob condições suaves e elimina o risco de adsorção irreversível da amostra sobre suporte sólido.

1.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA – CLAE/EM

Em associação com a pesquisa de produtos naturais, inúmeras ferramentas analíticas foram desenvolvidas para a separação e caracterização de compostos naturais. Dentre as quais a espectrometria de massa (EM) e o seu acoplamento a técnicas de separação em fase líquida, em especial cromatografia líquida (CL), foram reconhecidas como um avanço revolucionário na análise e caracterização de produtos naturais. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é capaz de realizar separação dos metabolitos secundários de uma variedade de amostras (ARDREY, 2003).

O acoplamento de cromatografia líquida é mais delicado porque os íons em fase gasosa devem ser produzidos por espectrometria de massa. A cromatografia líquida é normalmente usada para os compostos que não são voláteis e não são adequados para a cromatografia em fase gasosa. Existe uma série de métodos de acoplamento de CLAE/EM tais como termopulverização (PTS), electrospray (ESI), ionização química à pressão atmosférica (IQPA) e fotoionização pressão atmosférica (FIPA) podem tolerar caudais de cerca de 1 ml.min^{-1} sem a necessidade de uma divisão do fluxo (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Com efeito, os métodos utilizados quando a CLAE é acoplada a um detector de UV não são sempre compatíveis com estas várias fontes de ionização. Mudanças significativas para os métodos de cromatografia líquida são muitas vezes necessários adaptá-las às CLAE / EM, mesmo se fontes modernas são mais tolerantes e requerem menos ajustes (ARDREY, 2003).

Uma variedade de técnicas tem sido desenvolvida para medições em razão da massa-carga (m/z) de íons em fase gasosa. Os métodos incluem a separação em decorrência do tempo em que a velocidade dos íons da base e a distância de fuga (TOF); onde a transmissão ocorre através de um campo eletro-dinâmico (quadruplo filtro de massa); dispersão com base no impulso de íons ou de energia cinética (magnética e instrumentos do setor elétrico); e quadrupolo íon trap (QIT) (ARDREY, 2003).

A espectrometria de massa é apenas uma de muitas variedades de detector que pode ser ligada a CLAE. Vias alternativas de detecção que são comumente utilizadas incluem métodos de radiação visível tais como a medição de dispersão da luz ou do índice de refração e a absorbância, tais métodos como espectroscopia de UV ou fluorescência e detecção de arranjo de fotodiodos (PDA) (SNYDER et al., 1997; MEYER, 2004). Estes últimos métodos podem ser extremamente úteis para a detecção de certas classes de compostos que absorvem luz na região do UV ou fluorescentes (por exemplo, kaempferol, quercetina, espermidina); de fato detectores PDA têm sido frequentemente ligados online para CLAE antes do EM, em estudos de produtos naturais para proporcionar uma maior dimensão para ajudar na caracterização do analito detectando espécies (CLAE / PDA-EM) (VORST et al., 2005).

Os métodos de ionização que podem ser utilizados em CLAE/EM incluem ionização de elétrons (IE), ionização química (IQ), por bombardeamento atômico rápido (BAR), termo pulverização (TSP), por electrospray (ESI) e de ionização química à pressão atmosférica (IQPA) (ARDREY, 2003). Neste trabalho foi utilizado o IQPA, qual pode ser aplicável igualmente a compostos mais polares ou com baixa e moderada polaridade.

O regime de ionização IQPA é muito mais longo e isso impede a sua utilização para o estudo de biomoléculas grandes, considerando como o limite de massa por IQPA valores inferiores a 2000 Da (ARDREY, 2003).

Vantagens de Utilizar IQPA (ARDREY, 2003).

- Produz íons a partir da solução enquanto que o analito recebe mais calor do que com electropulverização, os compostos com um grau de instabilidade térmica pode ser estudada sem a sua decomposição.
- É melhor aplicada a compostos com baixa, moderada e alta polaridades.
- É uma técnica de ionização que é geralmente utilizada na análise de substâncias em estudo a ser determinado seu peso molecular.
- É capaz de lidar com taxas de fluxo de até 2 ml /min e é, por conseguinte, diretamente compatível com colunas de CLAE de 4,6 milímetros.
- É mais tolerante à presença de tampões no fluxo de fase móvel que ESI.
- É mais tolerante a alterações nas condições experimentais do que ESI e uma gama de fases celulares, incluindo o gradiente de eluição, pelo que podem ser acomodados utilizando um único conjunto de condições experimentais.

Segue esquema (figura 5) de funcionamento de CLAE/PDA-EM utilizado neste trabalho.

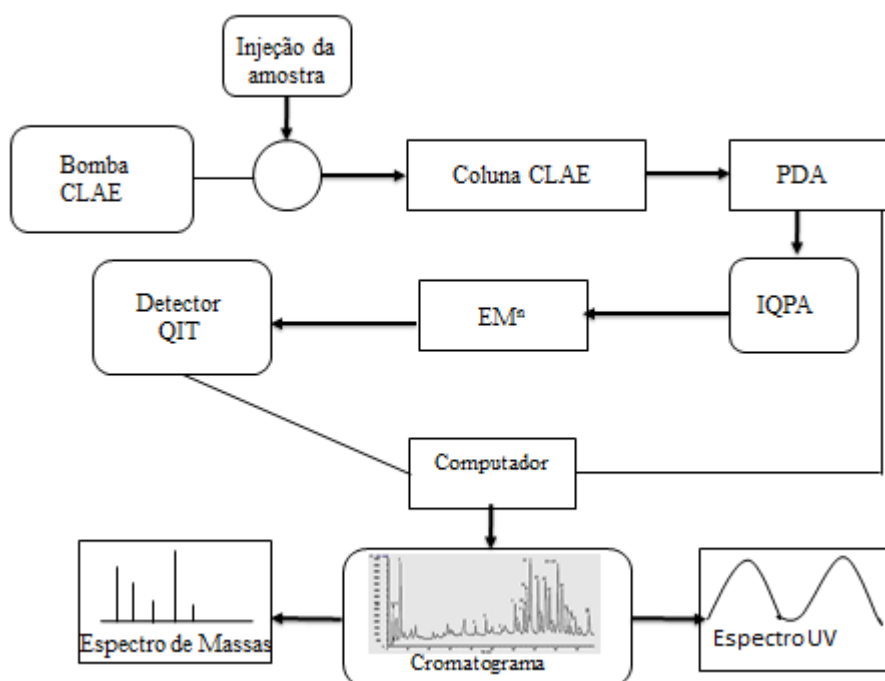


Figura 5 - Esquema de Funcionamento de CLAE/PDA-EM (fonte: COLEGATE, e MOLYNEUX, 2007).

2. JUSTIFICATIVA:

Devido à grande procura por medicamentos fitoterápicos que são mais acessíveis à população mais carente, torna-se cada vez mais importante a busca de substâncias com ação antioxidante. Alguns exemplos de substâncias com ação antioxidantes obtidas de plantas são: compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e taninos), nitrogenados (alcaloides, aminoácidos, peptídeos, aminas e derivados da clorofila), carotenoides, tocoferóis e ácido ascórbico (AMAROWICZ et al., 2004), que podem atrasar ou inibir as lesões causadas pelos radicais livres (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Devido a várias ações farmacológicas relatadas na literatura de *S. cumini* torna-se importante buscar a identificação de constituintes químicos das folhas de *S. cumini* com atividade antioxidante a qual pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

3. OBJETIVOS:

3.1. OBJETIVO GERAL:

Caracterizar os constituintes químicos e determinar a ação antioxidante do óleo essencial, extrato e frações das folhas de *Syzygium cumini*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a composição química do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).
- Determinar atividade antioxidante do óleo essencial, extrato e frações.
- Caracterizar grupos químicos dos extratos e frações ativas por cromatografia e ensaios cromáticos.
- Purificar e isolar as substâncias da(s) fração(ões) mais ativas.
- Identificar as substâncias isoladas da(s) fração(ões) mais ativas.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Acetato de etila P.A. (Dinâmica), n-hexano P.A. (Vetec), clorofórmio P.A. (Vetec), álcool butílico normal P.A. (Dinâmica), álcool etílico anidro (Cinética), álcool metílico P.A. (*Synth*), sulfato de sódio anidro P.A. (Vetec), cloreto férrico P.A. (Dinâmica), anidrido acético P.A. (Vetec), ácido sulfúrico P.A. (*Synth*), ácido clorídrico P.A. (*synth*), hidróxido de sódio em lentilhas P.A. (*Synth*), Nitrato de bismuto P.A. (Merck), ácido acético glacial P.A. (Vetec), iodeto de Potássio P.A. (*Synth*), cloreto de mercúrio P.A. (*Synth*), vanilina P.A. (Vetec), diclorometano P.A. (Dinâmica), polietilenoglicol 400 U.S.P. (*Synth*), 2-aminoetildifenilborinato (Sigma-Aldrich), acetonitrila P.A. (Vetec), acetona P.A. (*Synth*), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila –DPPH P.A. (Sigma-Aldrich), ácido gálico P.A. (Sigma-Aldrich), reagente de folin-ciocalteu (Sigma-Aldrich), carbonato de sódio P.A. (*Synth*), dimetilsulfóxido P.A. (Nuclear), quercetina 98% (Sigma-Aldrich), cloreto de alumínio P.A. (*Synth*), Acetato de potássio (*Synth*), álcool metílico grau hplc (Panreac), acetonitrila grau HPLC (Panreac), placas cromatográficas de sílica Gel 60 F254 (Merck), balança semi analítica (Marte), balança analítica (Shimadzu), manta aquecedora 12000ML (Fisaton), rotoevaporador (Fisaton), ultrassom (Quimis), Capela (Quimis), liofilizador L101 (Liotop), bomba de vácuo - sl 061 (Solab), câmara escura UV (Biothec), centrífuga 80-2b (Centribio), banho maria sl 150 (Solab), banho ultratermostato (Quimis), agitador Vortex (Nova), Moinho de Facas (Solab), estufa TTL (THOLZ), Cromatografo gasoso GC-2010 Plus (Shimadzu), espectrômetro de massas QP2010 (Shimadzu), coluna DB-5MS (Agilent), detector multimodo DTX 800 (Beckman Coulter), HPLC Spectrum (Dinâmica Extração), Chiller Smart H150-1500 (Lab Tec), Bomba Isocrática 10 plus (Alpha), detector de UV SPD-M20A (Shimadzu), controlador CBM-20A (Shimadzu), computador (DELL), Equipamento CLAE (Thermo Scientific), espectrômetro de massa íon trap LCQ Fleet (Thermo Scientific), software Xcalibur, software LC Solution 1.21 SP1, coluna de guarda Drop-in Hypersil ODS C18 (LUNA), LC-20AT HPLC (Shimadzu), coluna analítica Prep-ODS Coluna C18 (Shim – Pack).

4.2. COLETA DO VEGETAL

Folhas de *Syzygium cumini* (figura 6A) foram coletadas na estrada AM-010, Km 26, sentido Itacoatiara-Manaus (3°03'48.50" S; 58°37'14.01" O), para o preparo de extrato bruto e óleos essenciais. As coletas foram realizadas de uma única árvore, às 07h30 a cada dois meses para análise da variação sazonal do rendimento e constituintes químicos dos óleos essenciais. As folhas foram coletadas no período em que a planta possuía inflorescência, frutos e sem frutos (figura 6B) com o objetivo de avaliar o efeito da sazonalidade no rendimento do óleo essencial.

As folhas frescas (3000 g) foram particionados em duas partes no qual 2000 g foi para extração de óleo essencial de folhas frescas e 1000 g passou por um processo de secagem em estufa de ar circulante a 40 °C por um período de 72 horas para obtenção de folhas secas.

4.3. EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais das folhas frescas da mesma árvore foram obtidos por hidrodestilação do material fresco (1000 g) realizando-se extrações em duplicata em aparelho de Clevenger (6 h). O material seco (350 g) foi extraído em duplicata em aparelho de Clevenger (6 h). As folhas foram colocadas inteiras dentro do balão de destilação juntamente com 7,0 litros de água. Em seguida, foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rotações por minuto (rpm), para separação e retirada da água onde o óleo essencial obtido é menos denso que a água. Os óleos essenciais obtidos foram mantidos em frascos âmbar tampados sob refrigeração até o momento de serem analisados. Os rendimentos obtidos dos óleos essenciais foram calculados baseados no volume obtido de óleo essencial das folhas dividido pela massa de amostra utilizada (v/m).



A



B

Figura 6- Folhas (A) e Inflorescência e frutos (B) de *S. cumini*.

4.4. EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS FOLHAS DE *S. cumini*

As folhas frescas de *S. cumini* (2450,52 g) foram coletadas no dia 27/08/2013 às 07h30 para preparo de extrato bruto (figura 7). O material foi seco em estufa de ar quente circulante a 40°C por 72 horas obtendo-se 920,10 g. Posteriormente, foi triturado em moinho de facas, obtendo-se 897,77 g de material pulverizado. Foram utilizados 501,44 g de material para extração sob refluxo com etanol 70%. O sobrenadante foi filtrado em sistema a vácuo obtendo-se um total 2500 ml de extrato bruto. O extrato foi concentrado em rotaevaporador a 45 °C para remoção do etanol, obtendo-se 1000 mL de extrato bruto, em seguida, 500 mL foi separado para fracionamento, que após concentrado em rotaevaporador obteve-se as frações hexânica (FHAZ) (2,00 g), clorofórmica (FCAZ) (1,66 g), acetato de etila (FAAZ) (31,21 g), butanólica (FBAZ) (4,05 g) e hidroalcoólica (FHAAZ) (6,52 g). Os 500 mL restante foi liofilizado obtendo-se 47,40 g extrato bruto para estoque.

O fracionamento do extrato bruto (FAZ) (500 mL) foi realizado pelo processo de partição líquido-líquido utilizando solventes de polaridade crescente fazendo-se 4 extrações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol) (figura 7).

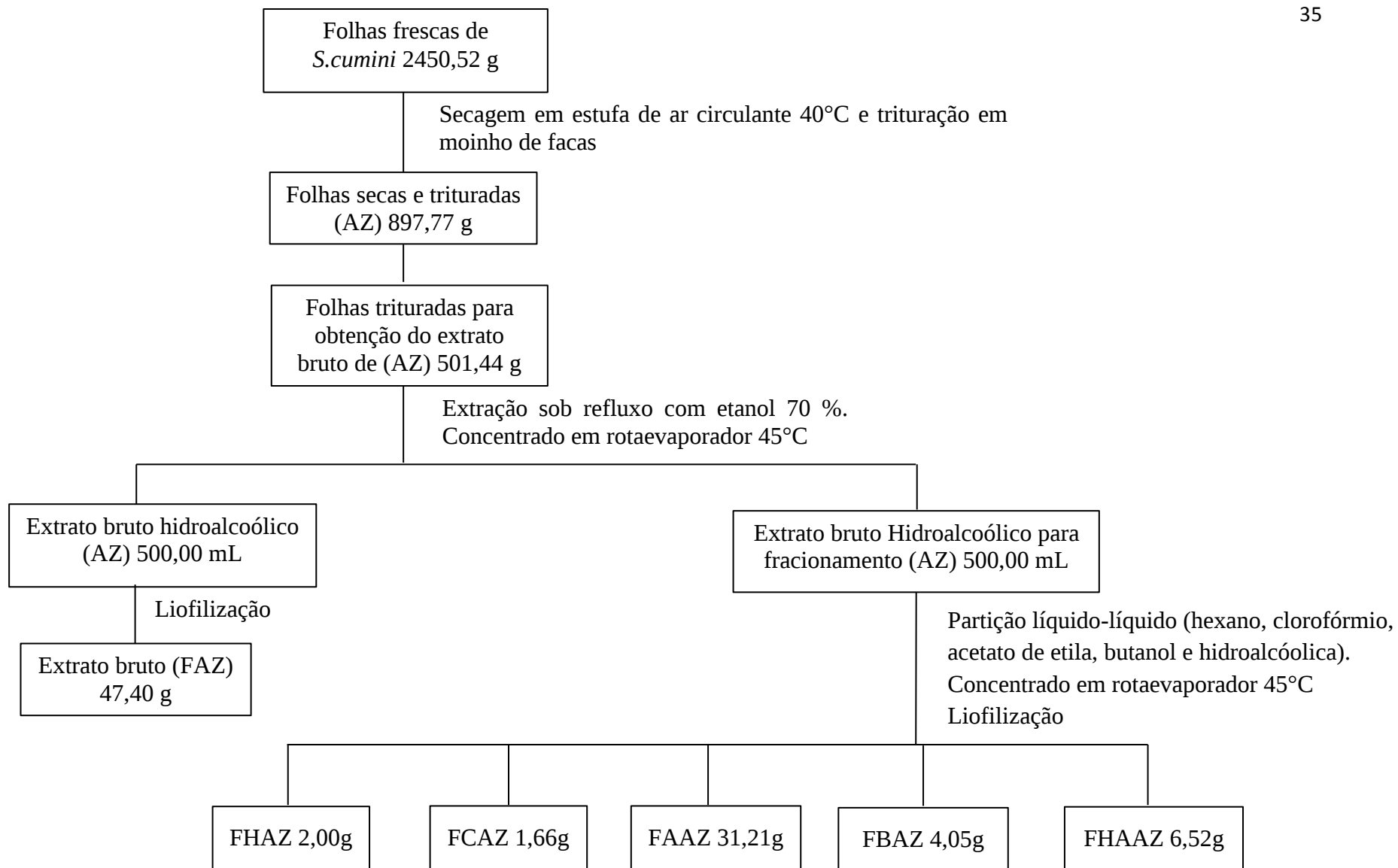


Figura 7- Fluxograma da coleta e processamento do material vegetal, extrato bruto e frações de *S. cumini* (AZ).

4.5. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PARA CARACTERIZAÇÃO DE FENÓIS E TANINOS

15 mg de extrato e frações foram dissolvidos em 30 mL de metanol, gerando 6 soluções. Posteriormente, foram medidos com o auxílio de uma pipeta, o volume de 3 mL de cada solução para tubos de ensaio. Em seguida foram adicionados 3 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1% a cada tubo de ensaio. Esses ensaios foram realizados em triplicata, acompanhado pela comparação com os testes em branco (água + solução de FeCl_3). A coloração variando entre o azul e vermelho, é indicativo da presença de fenóis, em comparação com o branco. Precipitado escuro de tonalidade azul indica presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis), coloração verde indica presença de taninos catéquicos (MATOS 2009).

4.6. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PARA CARACTERIZAÇÃO DE TRITERPENOS E ESTEROIDES (LIEBERMAN-BURCHARD).

15 mg de extrato e frações foram dissolvidos em 30 mL de Clorofórmio, posteriormente foram transferidos e filtrados em papel filtro. O material insolúvel de cada amostra foi guardado em bequer e as soluções geradas foram acondicionadas em béqueres de 50 mL. Em seguida foi retirado 4 mL de cada solução, transferindo para tubos de ensaio completamente secos. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de anidrido acético e agitado suavemente. Em seguida, adicionou-se cuidadosamente, três gotas de H_2SO_4 concentrado a cada tubo, tornando a agitar suavemente, esse procedimento foi realizado em triplicata. O desenvolvimento de cores, que varia do azul evanescente, ao verde persistente indica resultado positivo. (MATOS, 2009).

4.7. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PARA CARACTERIZAÇÃO DE SAPONINAS.

Em um béquer, foi dissolvido o resíduo insolúvel do item 4.5 em 10 mL de água destilada. Após filtração, foram transferidos 3 mL de cada solução para tubos de ensaio os quais posteriormente foram fortemente agitados por 3 min. A formação de espuma abundante e persistente de dois a três minutos é indicativo de resultado positivo. Esse teste foi realizado em triplicata. Para confirmação adicionou-se 2 mL de ácido clorídrico concentrado ao filtrado e levou para banho-maria por 1h. Após esfriar a temperatura ambiente, a solução foi neutralizada com hidróxido de sódio 0,5

N e após filtração e agitação, observou-se a não formação de espuma e formação de precipitado, sendo resultado afirmativo para saponinas (MATOS, 2009).

4.8. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PARA CARACTERIZAÇÃO DE ALCALOIDES.

15 mg de extrato e frações foram dissolvidos em 20 ml de ácido sulfúrico 1%. Em seguida cada solução obtida foi levada para fervura por 2 min em placa aquecedora, após resfriamento a temperatura ambiente, cada solução foi filtrada através de funil com papel de filtro diretamente para um tubo de ensaio. Distribuiu-se o volume obtido igualmente em três tubos menores e gotejou-se 3 gotas do reagente de Mayer ou de Dragendorff. A formação de precipitado em dois dos três tubos o teste é positivo para alcaloides; (MATOS, 2009).

4.9. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PARA ANTOCIANINAS, ANTOCIANIDINAS E FLAVONOIDES.

15 mg do extrato e frações foram dissolvidos em 60 mL de Metanol. Em seguida foram transferidos 3 mL de cada solução para tubos de ensaio. Essa análise foi realizada em triplicata. A solução do primeiro foi acidulado a pH 3 com ácido clorídrico 0,1 N. Em seguida as soluções dos dois tubos restantes foram alcalinizadas a pH 8,5 e 11 com hidróxido de sódio 0,1 N confirmando com papel indicador.

Os resultados são considerados positivos caso haja mudança de coloração de acordo com a tabela 2.

Tabela 2– Identificação dos constituintes em pH 3, 8,5 e 11

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido pH 3	Alcalino pH 8.5	Alcalino pH 11
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul Púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	--	--	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	--	Vermelha púrpura
Flavanonóis			Vermelha laranja

Fonte: Matos, 2009

4.10. PROSPECÇÃO PARA LEUCOANTOCIANIDINAS, CATEQUINAS E FLAVANONAS.

15 mg do extrato e frações foram dissolvidos em 40 mL de Metanol. Em seguida foram transferidos 3 mL de cada solução para dois tubos de ensaios. Essas análises foram realizadas em triplicata. Posteriormente a solução do primeiro tubo foi acidulada com solução de HCl 0,1 N a pH 2 e a solução do outro tubo foi alcalinizada a pH 11 com solução de NaOH 0,1 N. Aqueceu-se os tubos cuidadosamente com auxílio de bico de bunsen durante 3 min. observando-se modificações nas colorações, de acordo com a tabela 3.

Tabela 3– Identificação dos constituintes em pH 2 e 11

Constituintes	Cor em meio	
	Ácido pH 2	Alcalino pH 11
Leucoantocianidinas	Vermelho	--
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo amarela	--
Flavanonas	--	Vermelho alaranjado

4.11. AVALIAÇÃO EM PLACAS CROMATOGRÁFICAS

Pesou-se 30 mg de extrato bruto e frações e dissolveu-se em 2 mL de metanol. Em seguida 10 µL de cada solução foi aplicada em forma de banda em placas cromatográficas de sílica Gel 60 F254. Para determinação de terpenos foi utilizado como fase móvel uma solução clorofórmio e metanol (95:5) e revelado com vanilina sulfúrica (WAGNER, 2001).

Para detecção de flavonoides usou-se como fase móvel butanol, ácido acético e água (BAW) (4: 1: 5), diclorometano: metanol (96: 4) e revelado com NP/PEG, em seguida, a placa foi exposta a luz ultravioleta - UV em um comprimento de onda de 365 nm (WAGNER, 2001). Foram desenvolvidos também três sistemas novos de eluentes para os flavonoides glicosilados encontrados neste trabalho onde a fase móvel foi composta por Diclorometano: Acetonitrila: Água: Ácido acético glacial (DAAA) nas seguintes proporções (55:70: 5: 1.3), (60: 60: 10: 1.3) e um sistema Diclorometano: Acetona: Metanol (DAM) (6,5: 1,5: 3).

Para determinação de compostos fenólicos utilizou-se como fase móvel BAW (4: 1: 5) e revelado com cloreto férrico 1% (GUIMARÃES, 2005).

4.12. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O óleo extraído foi submetido à análise em CG-EM em equipamento SHIMADZU acoplado a um espectrômetro de massas SHIMADZU QP2010. Para cromatografia dos componentes foi empregada coluna DB-5MS, com 30 m x 0,25 mm, espessura do filme interno de 0,25 µm. A identificação dos constituintes foi feita por interpretação de seus respectivos espectros de massas, cálculo do Índice de Kovat's e por comparação com dados da literatura (ADAMS, 2007). Para realização dessas análises, foi utilizado equipamento da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

4.13. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.13.1. QUALITATIVO

15 mg de extrato e frações foram dissolvidos em 2 mL de metanol. Em seguida 10 µL de cada amostra foram aplicados em forma de banda em placas cromatográficas de sílica Gel 60 F254 eluindo-se em BAW (4: 1: 5), DAAA (55:70: 5: 1.3), (60: 60: 10: 1.3), DAM (6,5: 1,5: 3) revelado com DPPH 0,2% em metanol e deixando-se à temperatura ambiente durante 30 min. A atividade antioxidante (AA) é positiva quando manchas amarelas são formadas a partir de branqueamento da cor púrpura do reagente DPPH. (Tepe et al., 2005).

4.13.2. QUANTITATIVO

As análises foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM em Manaus sob supervisão do professor Emerson Silva Lima, onde as soluções de amostras (1,0 mg / mL) foram diluídas até às concentrações finais de 250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg / mL, em etanol. 1 mL de uma solução de etanol a 0,3 mM DPPH foi adicionado a 2,5 mL de soluções de diferentes concentrações da amostra, deixando reagir à temperatura ambiente em uma câmara escura. Após 30 min, os valores de absorbância foram medidos em 518 nm em um detector multimodo DTX 800, em seguida foi convertida a atividade antioxidante para percentagem (AA) com a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade Antioxidante} = 100 \left[1 - \frac{(A_0 - A_t)}{(A_0^0 - A_t^0)} \right]$$

Onde :

A_0 = Absorbância inicial da amostra

A_t = Absorbância final da amostra

A_0^0 = Absorbância inicial do branco

A_t^0 = Absorbância final do branco

Etanol (1,0 ml) e solução de extrato da amostra (2,5 mL) foi usado como branco. Solução de DPPH (1,0 ml; 0,3 mM) mais etanol (2,5 mL) foi utilizada como um controle negativo. Os controles positivos foram aqueles que utilizam as soluções padrão. Os valores de CI_{50} foram calculados por regressão linear de parcelas onde a abscissa representa a concentração das amostras testadas e ordenada a porcentagem média de atividade antioxidante de três testes separados (MENSOR et al., 2001).

4.14. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

Foram preparadas soluções das amostras e padrão de ácido gálico com concentrações de (1 mg/mL) dissolvidos em DMSO. 10 μ L das amostras e do padrão de ácido gálico, foram diluídos em 50 μ L de reagente de Folin Ciocalteu 10 % e acondicionados em micro placas, posteriormente foram incubadas em câmara escura por 8 min. Em seguida, adicionou-se 240 μ L de carbonato de sódio a cada amostra, sendo incubada novamente por 3 min. A leitura foi feita em detector multimodo DTX 800 em 620 nm. Os resultados foram expressos em μ g de ácido gálico/mL conforme descrito McDONALD et al., (2001) com modificações.

4.15. DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

Foram preparadas soluções das amostras e padrão de ácido gálico com concentrações de (1 mg/mL) dissolvidos em DMSO. Adicionou-se 30 μ L das amostras e padrão de quercetina, foram diluídas em 90 μ L de etanol em micro placas, em seguida foi feito a leitura no detector multimodo DTX 800 em 405 nm. Posteriormente adicionou-se 6 μ L de cloreto de alumínio, 6 μ L de acetato de potássio e 168 μ L de etanol incubado por 30 min em câmara escura. A leitura final foi feita em 405 nm. Os resultados foram expressos em μ g de quercetina/mL, conforme descrito por CHANG et al., (2002) com modificações.

4.16. SEPARAÇÃO DOS CONSTITUENTES QUÍMICOS POR CROMATOGRAFIA EM CONTRA CORRENTE DE ALTO DESEMPENHO – HPCCC (HIGH PERFORMANCE COUNTER CURRENT CHROMATOGRAPHY)

A cromatografia preparativa foi realizada em equipamento de cromatografia em contra corrente de alto desempenho modelo HPCCC Spectrum da Marca Dinâmica Extração. O aparelho consiste em duas bobinas com colunas de 22 – 132 mL de volume, com fluxo de injeção variando de 0,5 – 10 mL/min., com uma carga máxima de até 2 g/corrida, com uma velocidade de rotação de até 1600 rpm e com um tempo de eluição de 20 minutos para um coeficiente de partição de 1 mantendo-se a temperatura em 30 °C. O HPCCC foi conectado a um Chiller da marca Lab Tec modelo Smart H150-1500 mantendo a temperatura da água em 8 °C, com uma bomba da marca Alpha onde o fluxo pode variar de 0-10 mL/min. Foram utilizados um detector de UV SPD-M20A e um controlador CBM-20A da Marca SHIMADZU interligado a um computador da marca DELL e um programa LC Solution 1.21 SP1.

A fração FAAZ foi escolhida para ser fracionada e purificada, pois apresentou maior concentração de flavonoides (Tabela 17), menor valor de CI_{50} no ensaio de atividade antioxidante e maior massa 31,21 g. O método utilizado foi de eluição por gradiente em fase normal com os sistemas HEMWats e EBWats. Costa e Leitão (2010) descrevem que a presença de flavonoides livres e glicosilados na mesma amostra implica em uma situação ideal para o uso de eluição por gradiente com um sistema solvente apropriado devido a grande diferença de polaridade desses grupos.

Utilizou-se 20 mg de FAAZ para determinar quais os sistemas de eluição HEMWats (hexano: acetato de etila: metanol: água) e EBWats (acetato de etila: butanol: água) que forneceria melhor separação, conforme descrito tabela 4 (BERTHOD et al., 2005.; GARRARD, 2005).

Os sistemas testados em bancada foram 8, 10, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 24 e 26. Recomenda-se escolher o sistema que ocorra a melhor separação entre as fases inferior (I) e superior (S) (COSTA e LEITÃO, 2010). Observou-se que a fase onde ocorre uma melhor partição é a partir do sistema 17, mas para confirmar a escolha do sistema 17 foi utilizada CCD dos sistemas testados tanto a fase inferior como a fase superior (figura 8).

Para primeira corrida no HPCCC, pesou-se 20 mg de amostra de FAAZ e diluiu-se em 1 mL de fase inferior e superior na proporção de (1:1) do sistema HEMWat 17 da Tabela 4 (hexano: acetato de etila: metanol: água) (1: 1: 1: 1). Em seguida injetou-se 1 mL de amostra na coluna analítica para observar o comportamento da amostra. O fluxo de injeção foi de 1 mL/min., em fase normal com uma eluição gradiente onde utilizou-se os sistemas 20, 18, 17, 16, 14, 13, 11, 10, 8 e 6, coletando-se 43 subfrações de acordo com o espectro de absorção acompanhado nos comprimentos de ondas de 254 e 365 nm. Visto o comportamento da fração FAAZ no equipamento, partiu-se para fazer uma corrida preparativa pesando-se 301,3 mg e diluindo-se em 6 mL de fase inferior e fase superior do sistema 17 na proporção de (1:1 v/v) onde preparam-se os sistemas 17, 15, 14, 13, 4 e 3 de acordo com a tabela 4, após a corrida no HPCCC obteve-se 72 subfrações. Com auxílio da CCD (figura 9), obteve-se o perfil das substâncias presentes na amostra, as quais foram reunidas conforme (figura 10).

Tabela 4 -Sistemas HEMWats e EBWats.

Sistema	Polaridade	Hexano	acetato de etila	Metanol	Butanol	Água
1		0	0	0	5	5
2		0	1	0	4	5
3		0	2	0	3	5
4		0	3	0	2	5
5		0	4	0	1	5
6		0	1	0	0	1
7		1	19	1	0	19
8		1	9	1	0	9
9		1	6	1	0	6
10		1	5	1	0	5
11		1	4	1	0	4
12		1	3	1	0	3
13		2	5	2	0	5
14		1	2	1	0	2
15		2	3	2	0	3
16		5	6	5	0	6
17		1	1	1	0	1
18		6	5	6	0	5
19		3	2	3	0	2
20		2	1	2	0	1
21		5	2	5	0	2
22		3	1	3	0	1
23		4	1	4	0	1
24		5	1	5	0	1
25		6	1	6	0	1
26		9	1	9	0	1
27		19	1	19	0	1
28		1	0	1	0	0

Fonte: Berthold/Garrard (2005).

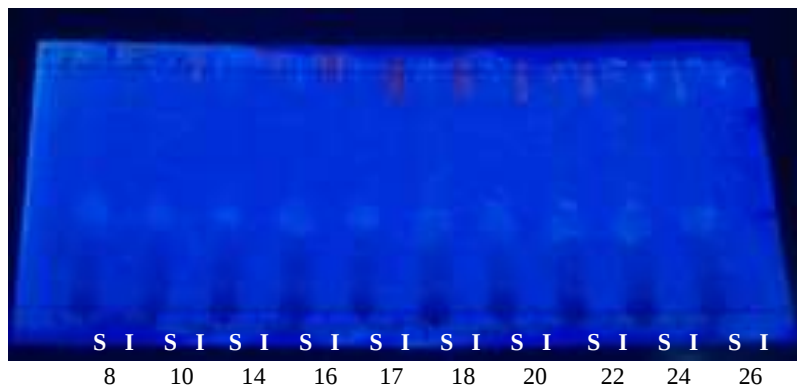


Figura 8- Placa dos sistemas testados revelados com NP/PEG.

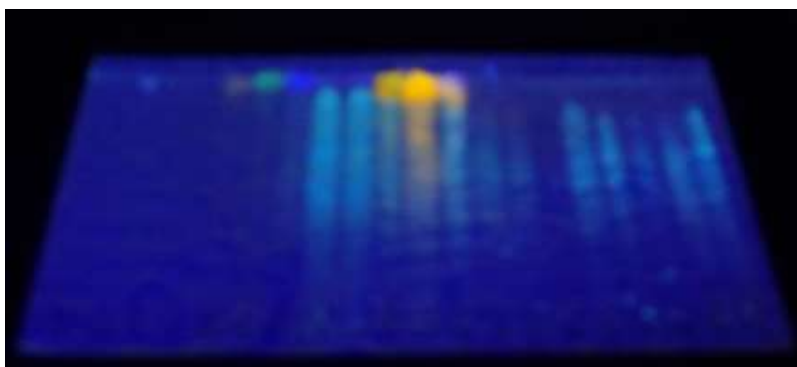


Figura 7- Cromatoplaça das subfrações de FAAZ fracionada em HPCCC.

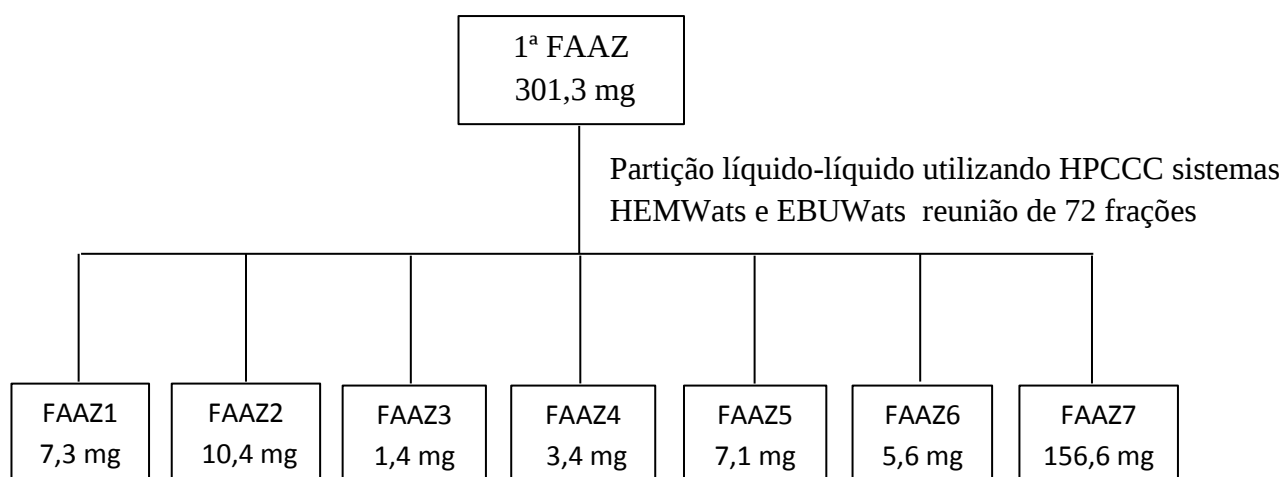


Figura 8– Fluxograma de obtenção das subfrações de FAAZ por HPCCC.

Foram feitas novas injeções de amostras aumentando a massa gradativamente até quantidade máxima de solubilização na fase móvel e estacionária, utilizando-se 1200 mg de FAAZ em 6 ml de solvente, observou-se que o perfil das amostras foi o mesmo da análise anterior (figura 11).

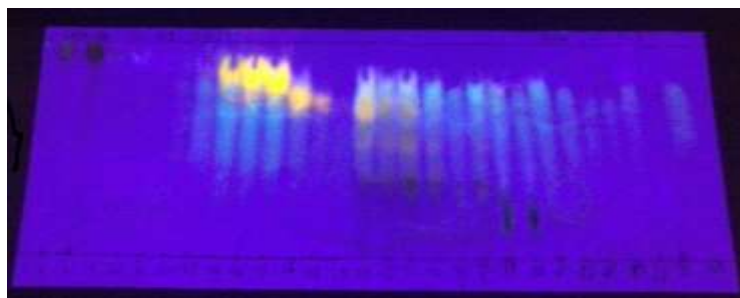


Figura 9 - CCD de FAAZ de 1200,00 mg corrida em HPCCC.

Depois de 12 injeções de massas de FAAZ no HPCCC foi obtido 7,2515 g, após reuniões das 844 subfrações um total de 7 sub frações (figura 12). Os valores das somas das subfrações FAAZ1 à FAAZ7 totalizaram 6,7371 g o que corresponde a um rendimento de 92,91%. As frações obtidas foram reunidas com o auxílio de CCD (PAULI et al., 2008), observando os grupos com os mesmos Rfs, coloração e qual tipo de sistema de eluição em que foram coletadas as amostras, podendo ser visualizado na figura 13.

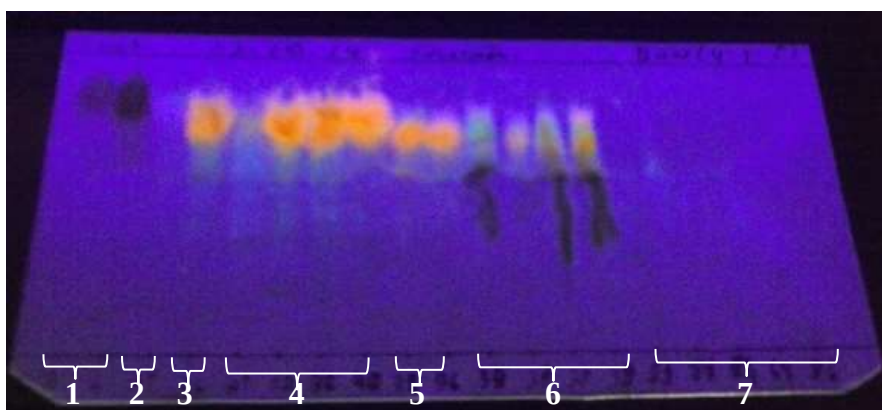


Figura 10 - CCD de FAAZ de 1200,00 mg corrida em HPCCC.

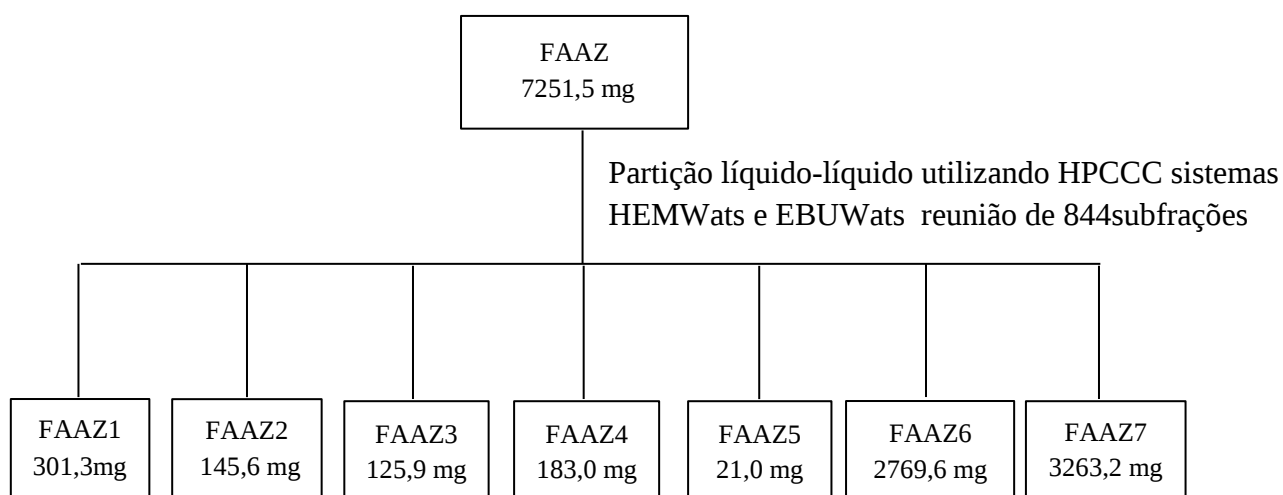


Figura 11– Fluxograma obtenção das subfrações de FAAZ por HPCCC.

Para separação das subfrações obtidas foram desenvolvidos sistemas HEMWat (tabela 5) e EBWat (tabela 6) modificados especificamente para as frações FAAZ3, FAAZ4, FAAZ5 e FAAZ6, levando-se em conta a polaridade das frações em estudo.

Tabela 5 - Sistemas modificados HEMWats

Polaridade	Sistemas	Hexano	Acetato		Metanol	Água
			de	etila		
↑ aumenta	14.1	0.8	2.2	0.8	2.2	
	14	1	2	1	2	
	14.3	1.2	1.8	1.2	1.8	
	14.4	1.4	1.6	1.4	1.6	
	14.5	1.6	1.4	1.6	1.4	
	14.6	1.8	1.2	1.8	1.2	

Tabela 6- Sistemas modificados EBWats

Polaridade	Sistemas	Hexano	Acetato		Metanol	Água
			de	etila		
↓ aumenta	4.1	3.5	1.5	5		
	4.2	3.2	1.8	5		
	4	3	2	5		
	3.1	2.8	2.2	5		
	3.2	2.4	2.6	5		
	3	2	3	5		

Foi realizado nova injeção no HPLC da amostra FAAZ3 (125,9 mg), utilizando sistemas HEMWats modificados (17, 14.3, 14 e 14.1) de acordo com as tabelas 4 e 5, para separar as substâncias presentes nesta subfração, obtendo-se 8 subfrações (figuras 14 e 15).

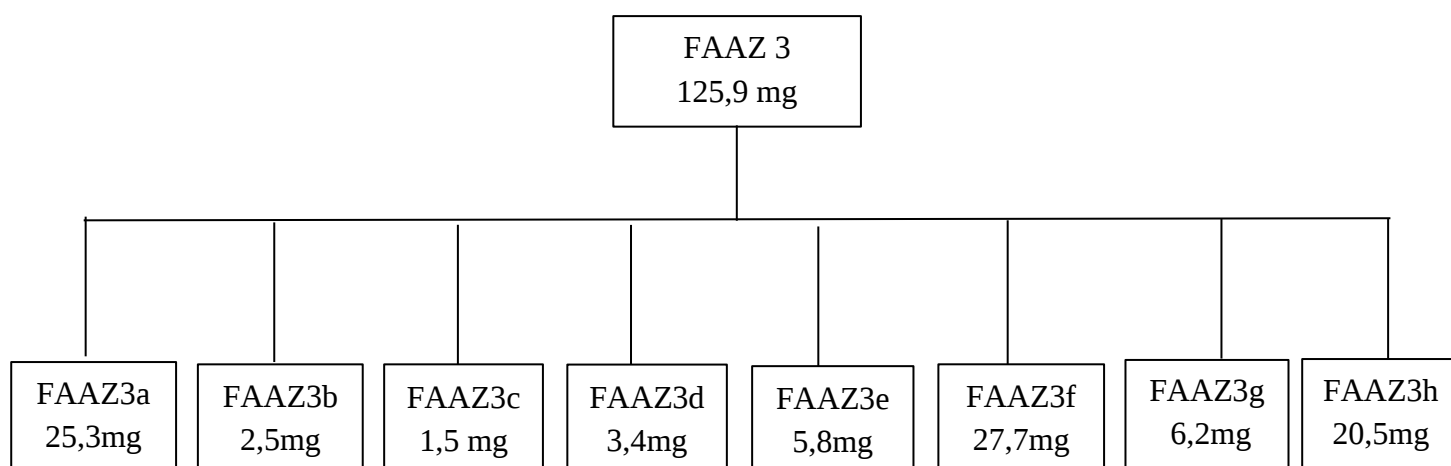


Figura 14- Fracionamento da subfração FAAZ3

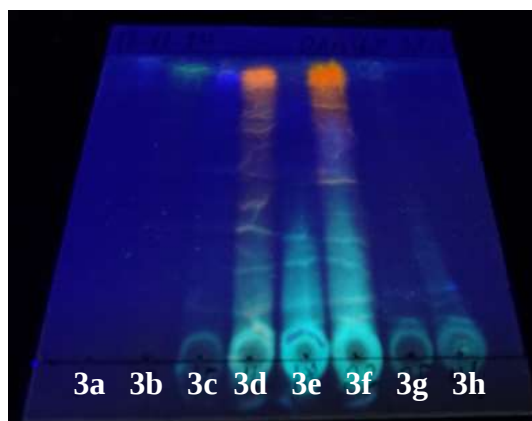


Figura 15 - Cromatoplate da subfração FAAZ3a à FAAZ3h eluída em diclorometano: acetona: metanol (DAM)(6,5: 1,5: 3) e revelada com NP/PEG.

A amostra FAAZ4 foi injetada novamente no HPCCC utilizando-se sistemas HEMWats modificados (17, 14.3, 14 e 14.1) obtendo-se 9 subfrações (figuras 16 e 17).

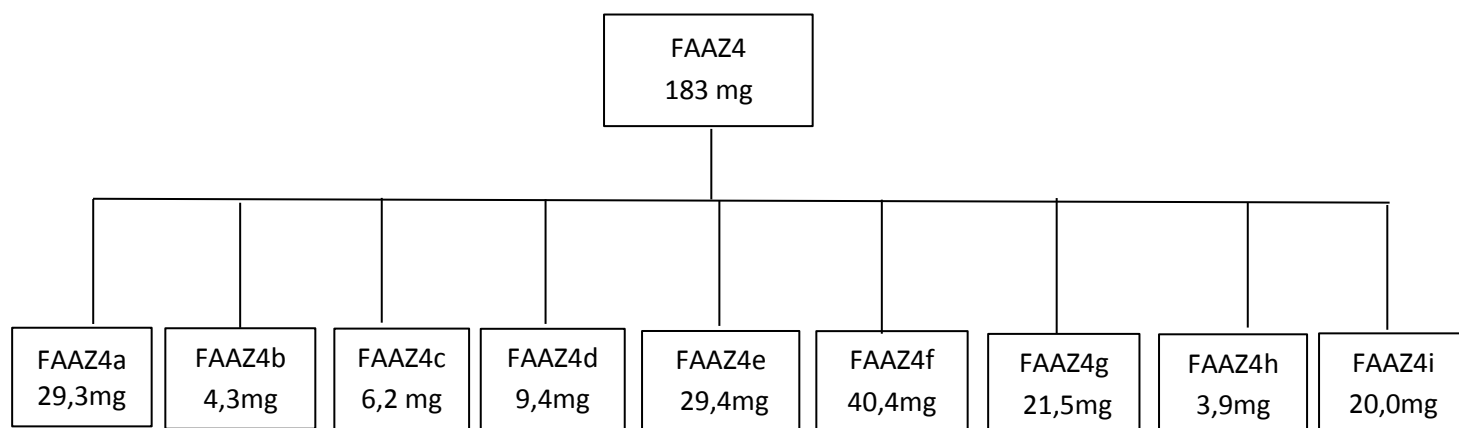


Figura 16- Fracionamento da subfração FAAZ4

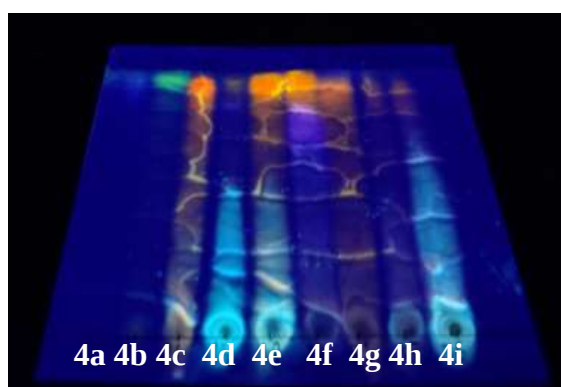


Figura 17 - Cromatoplate das subfrações FAAZ4a à FAAZ4i eluída em diclorometano: acetona: metanol (DAM) (6,5: 1,5: 3) e revelada com NP/PEG.

A amostra FAAZ5 foi injetada novamente no HPCCC, utilizando os sistemas de eluição HEMWats e EBWats modificados (17, 14.3) e (4.1) respectivamente de acordo com a tabela 5 e 6. Foucault (1994) descreve que em um sistema de solvente gradiente

é interessante realizar eluições na fase normal, elevando a quantidade de butanol no sistema de solvente, pois ocasiona fortes variações na fase orgânica, mas tem um menor impacto sobre a fase aquosa facilitando assim a extração de compostos mais polares. Foram obtidas 3 subfrações, podendo ser visto nas figuras 18 e 19.

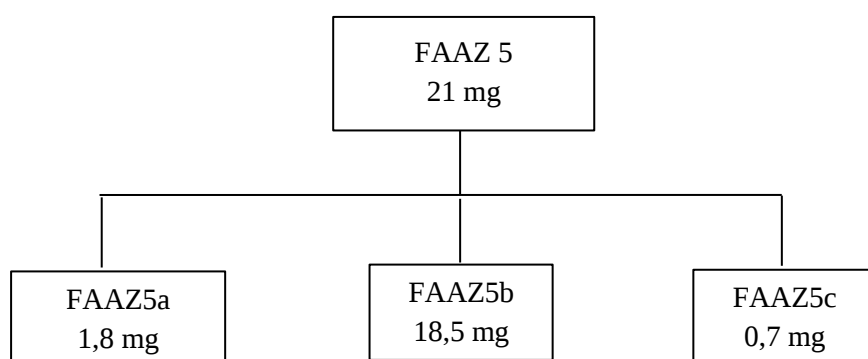


Figura 18- Fracionamento da subfração FAAZ5

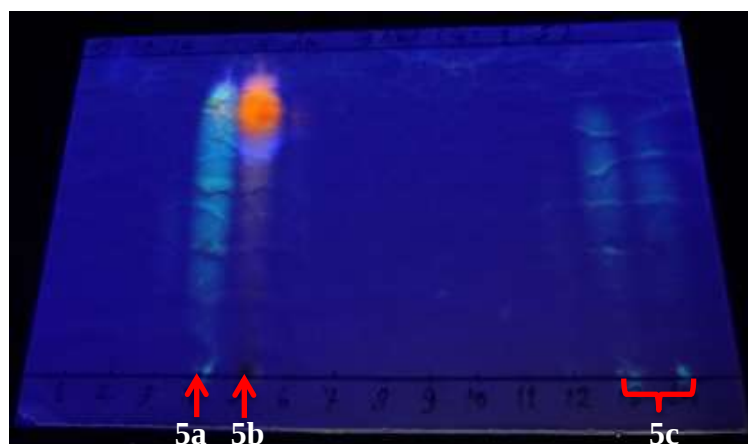


Figura 12 - Cromatoplaça das subfrações FAAZ5a à FAAZ5c eluída em diclorometano: acetona: metanol (DAM) (6,5: 1,5: 3) e revelada com NP/PEG.

A amostra FAAZ6 foi injetada novamente no HPLCC utilizando os sistemas HEMWat (17) e o EBWat modificado (4.1 e 3.4) de acordo com as tabelas 5 e 6. Foram obtidas 8 subfrações (figuras 20 e 21).

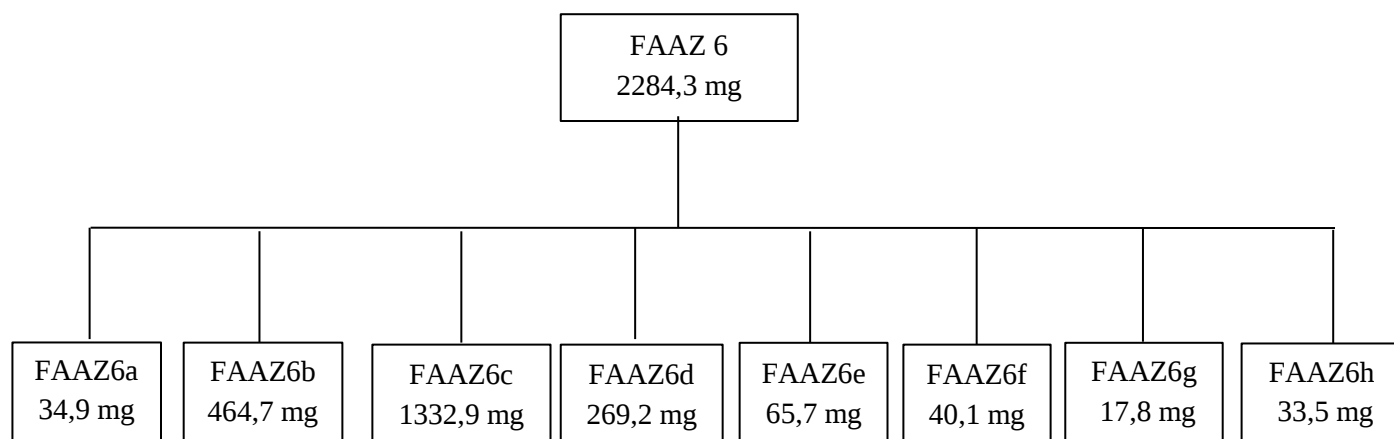


Figura 13 - Fracionamento da subfração FAAZ6

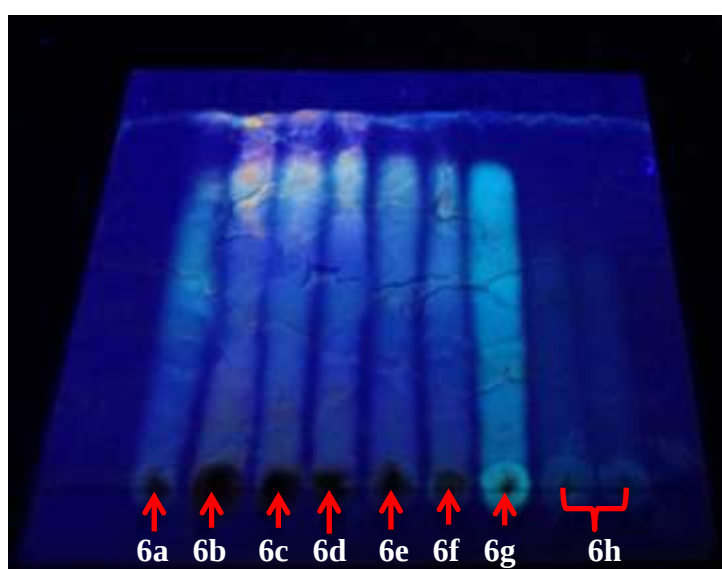


Figura 14 - Cromatoplaqueta da subfração FAAZ6a à FAAZ6h eluída em diclorometano: acetona: metanol (DAM) (6,5: 1,5: 3) e revelada com NP/PEG.

4.17. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA - CL/EM

As amostras foram analisadas usando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da Thermo Scientific, composta por uma bomba quaternária com um desgaseificador, um compartimento de colunas termostaticado, um amostrador automático e um detector de matriz de diodo ligado ao LCQ Fleet espectrômetro de massa íon trap (Thermo Scientific, Madison, WI, USA) equipado com electropulverização ionização aquecida. Foi utilizado para o controle do instrumento,

aquisição de dados e análise de dados o software Xcalibur (versão 2.2 SP1. 48) e software LCQ Fleet (versão 2.7.0.1103 SP1). As separações foram realizadas em uma coluna Luna 5 μ C18 (2) de 100 Å (150 x 4,6 mm).

A Análise CLAE/DAD-EM foi realizada no laboratório da central analítica do departamento de química da UFAM-Manaus em fase reversa, protegida por uma coluna de guarda Drop-in Hypersil ODS C18, (10 x 4,6 mm, tamanho de partícula 3 μ m). O volume de amostra injetado foi de 10 μ L. O sinal foi monitorizado a 254, 272, 294, 308 e 360 nm. A temperatura da coluna foi mantida a 25 °C, os compostos separados foram detectados no comprimento de onda de 272, 294, 308 e 360 nm e cada espectro foi registrado on-line dentro da gama de 100-1000 nm. O espectrômetro de massa foi operado num modo negativo e positivo. Parâmetros IQPA foram como se segue: a fonte de tensão de 4,00 kV, tensão no capilar 35,00 V, a tensão da lente do tubo 85,00 V, temperatura capilar de 240 °C, O fluxo de gás na bainha (He) 35 e o fluxo de gás auxiliar (N₂) 10 (unidades arbitrárias). Espectros EM foram adquiridos pela aquisição completa em gama 150-700 m/z. Para o estudo de fragmentação, foi realizada por meio da implantação da colisão-dissociação induzida (CID). A energia de colisão normalizada de dissociação foi induzida por colisão (CID) a célula foi fixada em 35 eV. Um programa de gradiente linear foi usado com um fluxo de 1,0 ml / min, utilizando como fase móvel água ultrapura eluente A (água) e eluente B (Metanol), a curva gradiente foi 0-20 min de 30-100 % (B), 20-30 min de 100% (B), 30-36 min 100 - 30% (B), 36-46 min 30% (B).

4.18. CROMATOGRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR "PHOTODIODEARRAY" – CLAE / DAD

O método analítico para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é composto por aparelho LC-20AT Shimadzu (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão) equipado com controlador de sistema CBM-20A, detector SPD-M20A UV-vis, bomba LC- 6AD, auto injector SIL 20A, degaseificador DGU-20A5, e estação de trabalho Shimadzu LC-solução.

Todas as frações obtidas na CCC e CLAE foram analisadas em aparelho Shimadzu LC-20AT HPLC e coluna analítica Shim – Pack Prep-ODS Coluna C18 (4,6 mm DI x 250 mm, tamanho da partícula 5 μ m) mantida a 28 °C. O sistema de eluição foi realizado no modo de gradiente em modo reverso, o eluente (A) formado pela mistura

Metanol: Acetonitrila na proporção de (75 %: 25 %) respectivamente e eluente (B) constituído de água ultra pura acidificada com ácido fórmico a pH 2 com um fluxo de 1,0 mL / min e injeção de 10µL da amostra. Todas as amostras da fração FAAZ, foram analisadas em um sistema gradiente como se segue: 0-1 min (25% de A), 1-3 min (25-55% de A), 3-6 min (55-60% de A), 6 -7 min (60-95% de A), 7-9 min (95-99% de A), 11-18 min (100 % de A) 18 -34 min (100% de A) 34 – 38 min (100 -25% de A) e 38 - 45 min (25% de A). O comprimento de onda do detector foi regulado para 254 e 364 nm.

A análise de CLAE/EM possibilitou verificar a presença de várias substâncias iguais em diferentes subfrações, mostrando que não estavam isoladas. Foram feitas reuniões de algumas subfrações para isolamento da fração em acetato de etila - (IFAAZ) das substâncias em CLAE/DAD apresentadas conforme tabela 7.

Tabela 5- Reunião subfrações de FAAZ oriundas da pré-purificação do HPLC.

Novo código subfrações	Reunião das subfrações de FAAZ	Massa (mg)
IFAAZ1	FAAZ3d + FAAZ3f + FAAZ4c + FAAZ4e + FAAZ4f + FAAZ4g	128,6
IFAAZ2	FAAZ3e + FAAZ3g + FAAZ3h + FAAZ4d + FAAZ4h + FAAZ4i + FAAZ5a + FAAZ5c	43,7
IFAAZ3	FAAZ5b	18,5
IFAAZ4	FAAZ6a	34,9
IFAAZ5	FAAZ6b, FAAZ6c, FAAZ6d	2066,8
IFAAZ6	FAAZ6e + FAAZ6f	105,8
IFAAZ7	FAAZ3a + FAAZ3b + FAAZ3c + FAAZ3g+ FAAZ3h+ FAAZ4a +FAAZ4b	62,9

Através das injeções no CLAE- DAD em coluna semi preparativa em fase reversa em sistema por gradiente descrito acima, foram obtidas 10 subfrações possivelmente isoladas da fração em acetato de etila-(IFAAZ), (IFAAZ1a, IFAAZ2a, IFAAZ3a, IFAAZ4a, IFAAZ5a, IFAAZ6a IFAAZ7a, IFAAZ8a, IFAAZ9a, IFAAZ10a) podendo ser visualizadas na Figura 22. Foi observado na placa cromatográfica separação de algumas substâncias possivelmente isoladas (figura 22). Foram desenvolvidos dois sistemas novos de eluição para flavonoides glicosilados e livres, propostos através dos resultados obtidos na CLAE/EM. O novo sistema de eluição foi capaz de separar as substâncias que eluíam juntas no topo da placa (figura 22), sendo possível observar que a subfração IFAAZ1a está possivelmente isolada e as outras

subfrações apresentaram misturas de flavonoides livres e glicosilados (figura 23) e suas massas foram IFAAZ1a (29,4 mg), IFAAZ2a (18,1 mg), IFAAZ3a (22,5 mg), IFAAZ4a (10,1 mg), IFAAZ5a (6,6 mg), IFAAZ6a (16,0 mg), IFAAZ7a (14,9 mg), IFAAZ8a (14,6 mg), IFAAZ9a (9,4 mg) e IFAAZ10a (17,2 mg). Essas amostras foram enviadas para análises de RMN de ^1H e ^{13}C para confirmação e identificação das substâncias propostas na tabela 22.

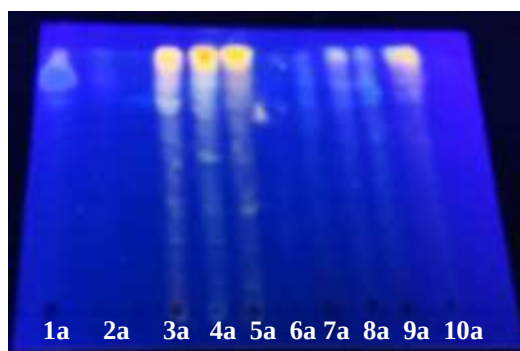
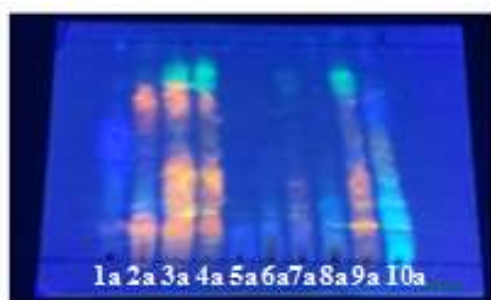
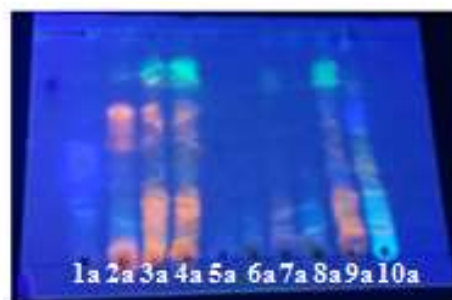


Figura 22 - Cromatoplaça eluída em BAW (4:1:5) Subfrações IFAAZ1a – IFAAZ10a revelada em NP/PEG



Sistema 5: CH_2Cl_2 : ACN : H_2O : HAc
(55: 70: 5: 1.3)



Sistema 6: CH_2Cl_2 : ACN : H_2O : HAc.
(60: 60: 10: 1.3)

Figura 23- Cromatoplaças das Subfrações IFAAZ1a – IFAAZ10a eluídas nos sistemas 5 e 6, reveladas com NP/PEG.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *S. cumini*.

5.1.1 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL E EFEITO DA SAZONALIDADE NO RENDIMENTO.

Os resultados dos rendimentos (%) obtidos no período avaliado podem ser vistos na tabela 8.

Tabela 6- Rendimento de óleo essencial de *S. cumini* (%).

Nº da Amostra	Data	Massa de folhas Utilizadas (g)	Volume de óleo essencial (mL)	Rendimento (%) (V/M)	Observações
1	27/08/2013	2014,13	1,46	0,072	Sem frutos
2	17/10/2013	2113,35	1,69	0,080	Frutos verdes e inflorescência
3	11/12/2013	2009,41	2,06	0,102	Frutos verdes e maduros
4	18/02/2014	2006,04	1,73	0,086	Frutos maduros
5	25/04/2014	2000,94	1,44	0,072	Sem frutos
6	18/06/2014	2032,54	1,81	0,089	Sem frutos
7	23/08/2014	2055,82	1,75	0,085	Sem frutos
8	24/10/2014	2000,26	1,82	0,091	Frutos verdes e inflorescência
9	05/12/2014	2035,04	2,65	0,130	Frutos verdes e maduros

Pode-se observar que as amostras 2 e 8 foram as que apresentaram aumento no rendimento de óleo essencial no período avaliado que foi de 0,80 e 0,91%, o qual coincidiu com o período onde a planta estava no início da inflorescência (tabela 8). Os resultados de rendimento das amostras 3 e 9 de 0,102 e 0,130 % respectivamente foram os maiores valores referentes ao período avaliado, correspondendo à época em que a planta estava no início de amadurecimento de frutos. Ocorreu uma diminuição no rendimento logo após o período final de produção de frutos e nas amostras seguintes uma ligeira estabilização no rendimento.

Estudos realizados por Saeb e Gholamrezaee (2012) demonstraram que o rendimento de óleo essencial das folhas de *Melissa officinalis* foi afetado por diferentes etapas de colheita, sendo que folhas coletadas antes e durante a floração forneceram os melhores rendimentos. Os resultados de *S. cumini* são semelhantes com os dados

obtidos por Saeb e Gholamrezaee (2012), pois há um aumento no rendimento sempre no período de inflorescência.

No trabalho de Shafi et al., (2002), o rendimento obtido de óleo essencial das folhas de *S. cumini* coletadas em junho no estado de Kerala, sul da Índia foi de 0,04% valor inferior aos obtidos neste trabalho em comparação como todos os valores do período analisado. No estudo de Sobral-Souza et al., (2014) em que folhas de *S. cumini* foram coletadas no Horto Botânico de Plantas Medicinais do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri (URCA) no estado do Ceará às 09h30 min., o valor obtido de rendimento foi de 0,08% o que coincide com o valor da amostra 2 deste trabalho mas o valores das amostras 3, 4, 6, 7, 8, e 9 foram superiores aos valores relatados por Sobral-Souza et al., (2014), que demonstra que o horário de coleta, localização geográfica da planta, período da coleta e variações sazonais e climáticas interferem no rendimento do óleo essencial (SANGWAN et al., 2001).

5.1.2 EFEITO DO REGIME HÍDRICO E TEMPERATURA NO RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *S. cumini*.

Verificou-se a relação do rendimento do óleo essencial de *S. cumini* com o volume de precipitação de água na região de Itacoatiara no período de 08/2013 a 10/2014, dados coletados do Instituto Nacional de Meteorologia- INMET (figura 24). A análise do gráfico de rendimento de óleo essencial x volume de precipitação (figura 24) mostrou que em Fev/2013 e Fev/2014, Abr/2013 e Abr/2013, Jun/2013 e Jun/2014, Ago/2013 e Ago/2014 ocorreu diminuição no rendimento do óleo essencial enquanto os volumes de precipitação aumentaram, fato observado também nos meses de Dez/2013 e Dez/2014, em que ocorre uma diminuição dos volumes de precipitação e consequentemente um aumento no rendimento do óleo essencial, podendo sugerir que este fenômeno seja em decorrência da diminuição do volume de precipitação, com exceção nos meses de Out/2013 e Out/2014 onde ocorre um aumento de rendimento de óleo essencial e um aumento do volume de precipitação. Essa variação do rendimento em função do regime hídrico pode ocorrer, pois Andrade e Casali (1999) mostraram que o estresse hídrico severo pode aumentar a concentração de óleo essencial, no entanto, a redução de biomassa verde leva à diminuição no teor de óleo em plantas medicinais principalmente em relação aos produtos do metabolismo secundário,

podendo variar bastante com o tipo, a intensidade e a duração do estresse, podendo aumentar ou diminuir o teor de óleos essenciais.

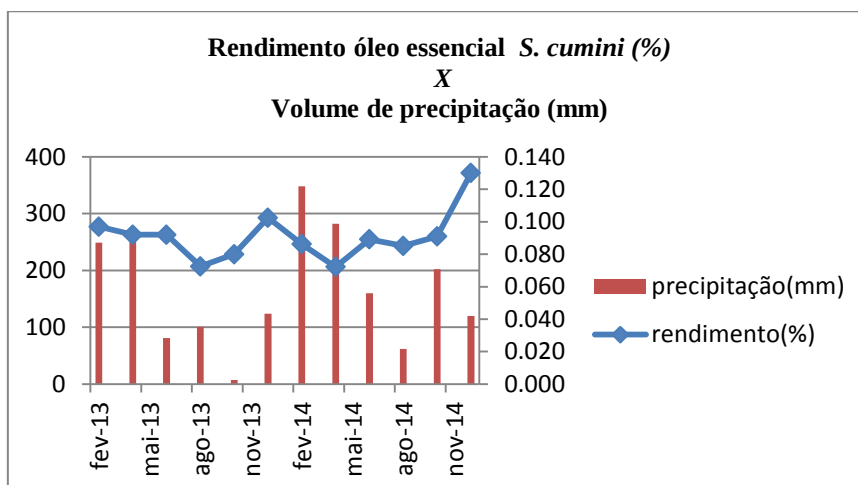


Figura 24- Rendimento Óleo essencial (%) das folhas de *S.cumini* x Volume de precipitação (mm)

Na figura 25 observa-se o resultado da influência da temperatura no rendimento de óleo essencial de *S. cumini*. Com o aumento da temperatura o rendimento de óleo essencial de *S.cumini* aumenta também. Resultados semelhantes foram observados em várias espécies de plantas onde parece aumentar o rendimento do óleo essencial em períodos de temperaturas mais elevadas, onde dias muito quentes ocasiona uma perda excessiva destes metabólitos (Telci et al., 2004).

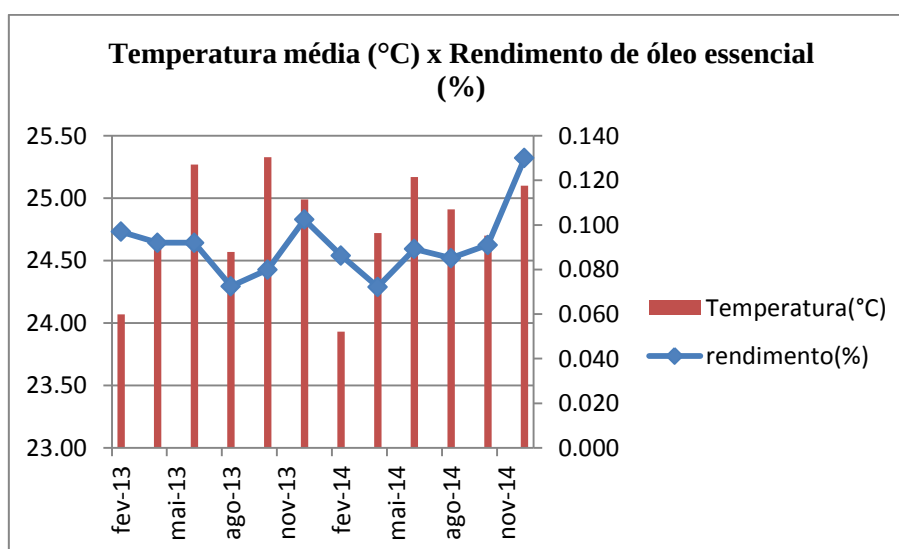


Figura 25 - Rendimento óleo essencial (%) das folhas de *S.cumini*. x Temperatura média (°C).

5.1.3 COMPARAÇÃO DO RENDIMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL ENTRE FOLHAS FRESCAS E SECAS DE *S. cumini*.

Pode-se verificar na tabela 9 que a relação de rendimento entre folhas frescas e secas em porcentagens foram 31,0, 60,6 e 68,3 % sempre em proporções menores para amostras de folhas frescas (massa seca + água) em todo período analisado. No estudo feito por Borges et al., (2012) há uma comparação entre as espécies Alfavaca, Orégano e Tomilho, sendo que para Alfavaca e Tomilho, o valor de rendimento de óleo essencial foi superior nas amostras de folhas secas enquanto que na de orégano o valor foi menor nas folhas secas. Segundo Bampouli et al., (2014) estes rendimentos podem variar de acordo com as espécies. Estes valores relatados na literatura mostram que o rendimento varia de espécie para espécie. Para *S.cumini* o rendimento do óleo manteve-se sempre maior para as folhas secas mesmo em períodos diferentes do ano.

Tabela 7 - Rendimento de óleo essencial de folhas secas e frescas de *S. cumini* (%)

Data	Massa de folhas utilizadas(g)	Volume de óleo (mL)	Rendimento (V/M) (%)	Folhas	Umidade das folhas (%)
18/06/2014	2032,54	1,813	0,089	Frescas	
18/06/2014	351,60	0,455	0,129	Secas	51,63
23/08/2014	2055,82	1,750	0,085	Frescas	
23/08/2014	259,08	0,560	0,216	Secas	60,36
24/10/2014	2000,26	1,820	0,091	Frescas	
24/10/2014	346,13	0,992	0,287	Secas	69,69

5.1.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).

A identificação das substâncias presentes nos óleos essenciais que foram extraídos no período de Agosto de 2013 à Agosto de 2014 foi realizada por análise em CG/EM, utilizando o índice de Kovats (I.K) e comparação dos espectros obtidos com os espectros de massa de cada substância conforme descrito por Adams (2007). Segue fórmula de cálculo do I.K.

- Índice de Kovats

$$IK_X = 100n + 100 \times \frac{(t_X - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)}$$

Onde,

IK_X = índice de Kovats (IK)

tx = tempo de retenção da Substância analisada

tn = tempo de retenção do hidrocarboneto padrão de menor cadeia que elui antes da substância analisada

t_{n+1} = tempo de retenção do hidrocarboneto padrão de maior cadeia que elui depois da substância analisada

n= número de átomos de carbono do padrão de menor cadeia que elui antes da substância analisada

A figura 26 mostra o cromatograma do óleo essencial das folhas de *S. cumini* coletada em 17/10/2013. A análise do cromatograma, junto com cálculo do índice de Kovats, espectro de massas e comparação com dados da literatura permitiram identificar 37 substâncias. Na figura 27 mostra outro cromatograma de óleo essencial de *S. cumini* coletadas em 18/06/2014, onde foi detectada a presença de 22 substâncias.

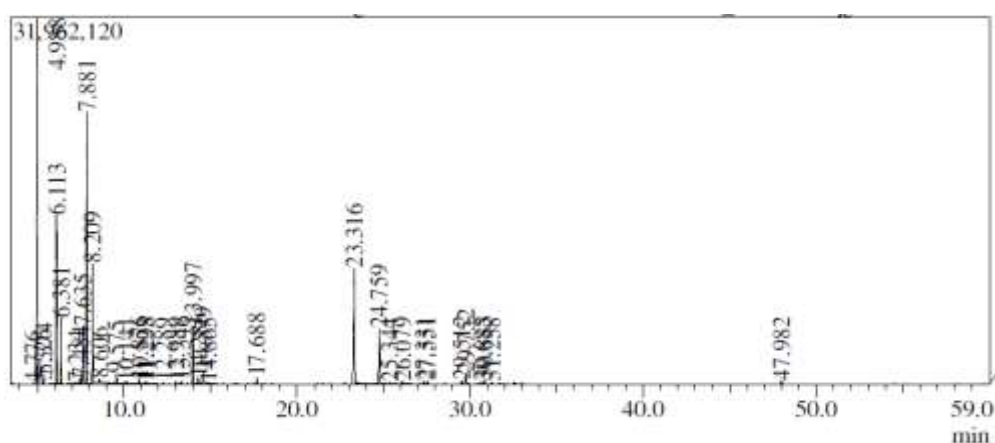


Figura 26- Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de *S. cumini* (17/10/2013).

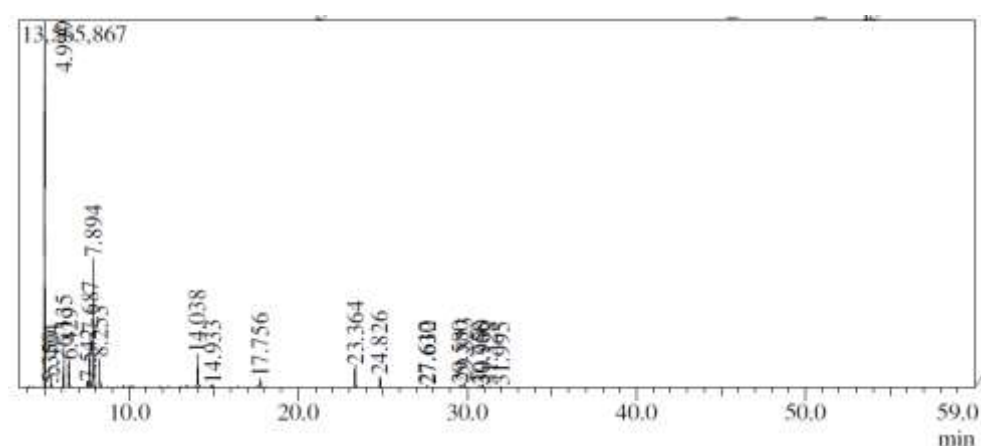


Figura 27 - Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de *S. cumini* (18/06/2014).

Os resultados da composição química das substâncias majoritárias dos óleos essenciais de *S. cumini* obtidos no período de Agosto/2013 – Agosto/2014 está apresentado na tabela 10 em ordem crescente de tempo de retenção das substâncias.

Tabela 8- Área (%) das substâncias majoritárias do óleo essencial das folhas de *S. cumini* no período de 2013-2014.

Nº	Substância	27/08/13 área %	17/10/13 área %	11/12/13 área %	18/02/14 área %	25/04/14 área %	18/06/14 área %	23/08/14 área %	Sobral - Souza et al., (2014)	Dias et al., (2013)	Craveiro et al., (1982)	KI _a	KI _b
1	α -pineno	28,87	17,99	28,33	56,14	47,41	39,40	40,32	30,04	31,85	30,10	931	939
2	Canfeno	1,07	0,45	0,63	1,02	1,23	1,28	1,15	1,17	1,56	-	947	954
3	β - pineno	4,35	10,24	9,83	13,89	7,40	5,01	6,74	8,26	5,57	20,50	976	979
4	β - mirceno	3,63	3,79	3,92	2,98	3,84	3,67	3,27	2,78	2,98	-	987	990
5	<i>p</i> -cimeno	0,81	0,37	0,45	1,04	0,89	0,85	0,74	0,38	-	-	1023	1024
6	Limoneno	7,65	3,94	4,73	7,14	7,32	7,67	7,50	6,52	4,47	8,50	1027	1029
7	(Z) β - Ocimeno	18,23	23,92	23,40	nd	14,63	17,98	17,10	26,85	28,98	9,50	1033	1037
8	(E) β - Ocimeno	6,55	8,1	6,40	nd	2,66	4,59	4,14	11,13	11,71	9,00	1043	1050
9	α -terpineol	7,05	5,15	6,78	5,63	5,38	6,47	6,09	0,56	4,00	-	1194	1188
10	Acetato de bornila	2,45	0,57	0,60	0,98	1,42	1,82	1,57	1,31	1,34	2,20	1281	1289
11	<i>Trans</i> -cariofileno	6,54	12,38	6,44	1,95	3,15	4,63	5,24	2,10	5,02	2,50	1413	1418
12	α -humuleno	3,3	5,57	3,13	1,24	1,72	2,48	2,77	1,17	2,50	2,80	1449	1454
13	Óxido de cariofileno	1,34	1,14	0,49	5,94	1,27	1,19	1,35	-	-	-	1574	1583
	Total	91,84	93,61	95,13	97,95	98,32	97,04	97,98	92,27	99,98	85,10		

KI_a – Índice de Kovats CalculadoKI_b – Índice de Kovats Literatura (Adams, 2007)

Nd – Não detectado

Na figura 28 podemos observar a variação das substâncias α – pineno e canfeno.

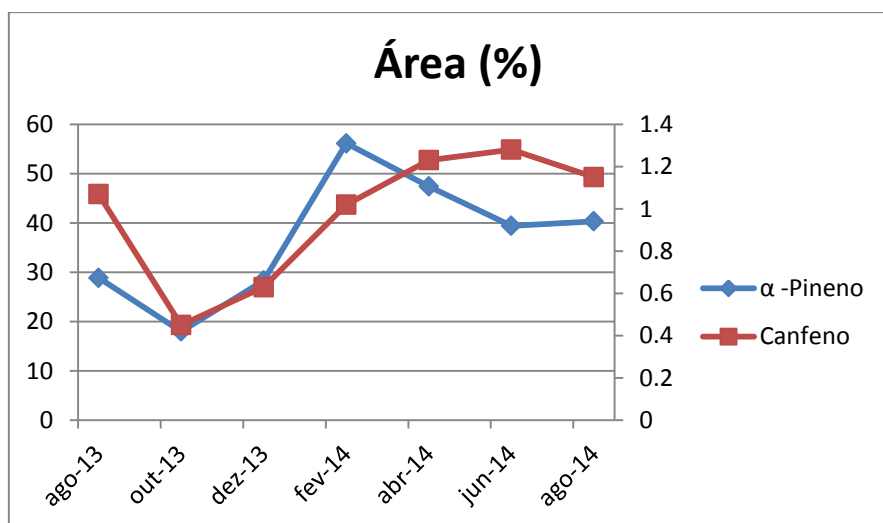


Figura 28- Área (%) de α – pineno e canfeno.

O α – pineno é a substância com maior porcentagem em área dentre aquelas identificadas no óleo essencial das folhas de *S. cumini* durante o período de avaliação, com exceção do mês de Outubro de 2013, onde o majoritário foi Z- β -ocimeno. O canfeno tem o mesmo comportamento do α – pineno quanto à variação da sua composição no período de Agosto/2013 à Fevereiro/2014 ocorrendo uma mudança de comportamento apenas nos meses de Abril /2014 e Junho de 2014, este fato pode ser devido à substância precursora na rota Biosintética (figura 29) das duas substâncias, o α – terpenil. O valor mínimo de canfeno foi de 0,45 % em área no período de Outubro de 2013 e seu valor máximo 1,28% em área foi em Junho/2014. Resultados apresentados da substância canfeno por Sobral-Souza et al., (2014) 1,17 %, Dias et al., (2013) 1,56% demonstram que o efeito da sazonalidade influencia na % em área. Segue espectro obtido por CG/EM do α – pineno (figura 30) e canfeno (figura 31). O íon molecular do α – pineno $[C_{10}H_{16} + H^+]$ $m/z = 137$, fragmentos $[C_9H_{13}^+]$ $m/z = 121$ e o pico base $[C_7H_9^+]$ $m/z = 93$ referentes à perda de três radicais metilas.

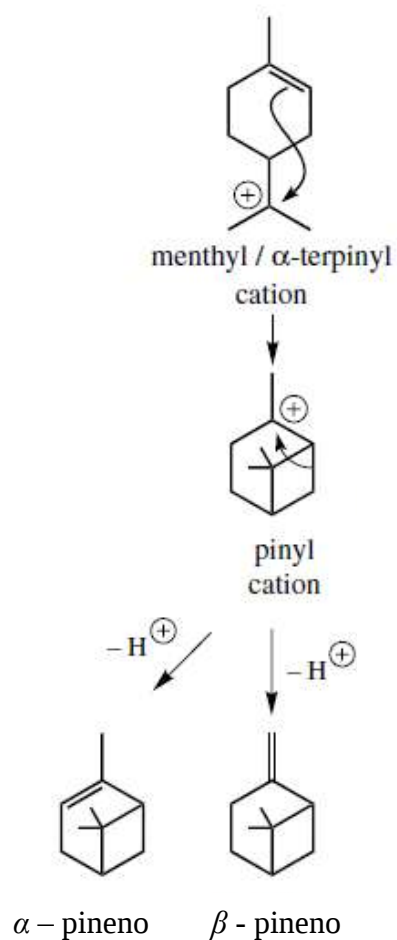


Figura 29- Rota da biossíntese do α -pineno e β -pineno, fonte: Dewick 2002.

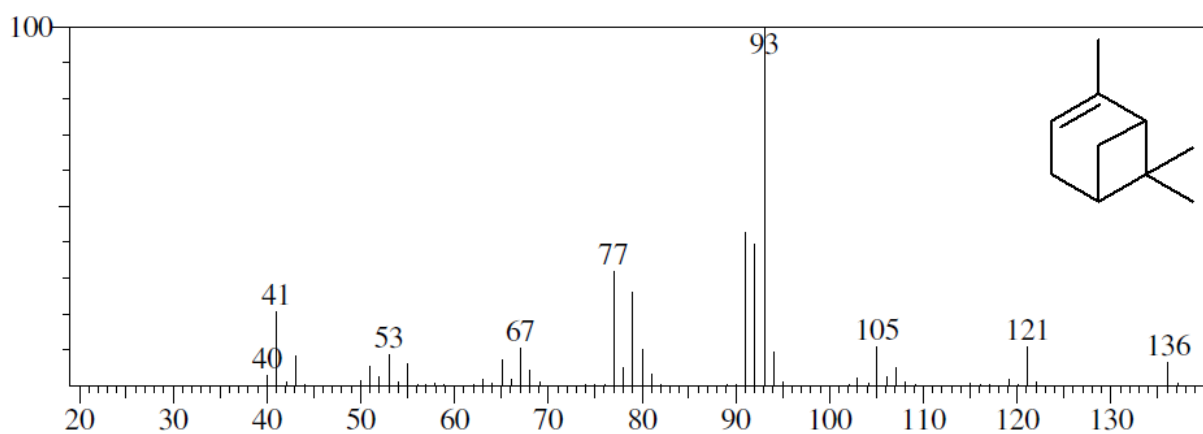


Figura 30- Espectro de massas e estrutura do α -pineno

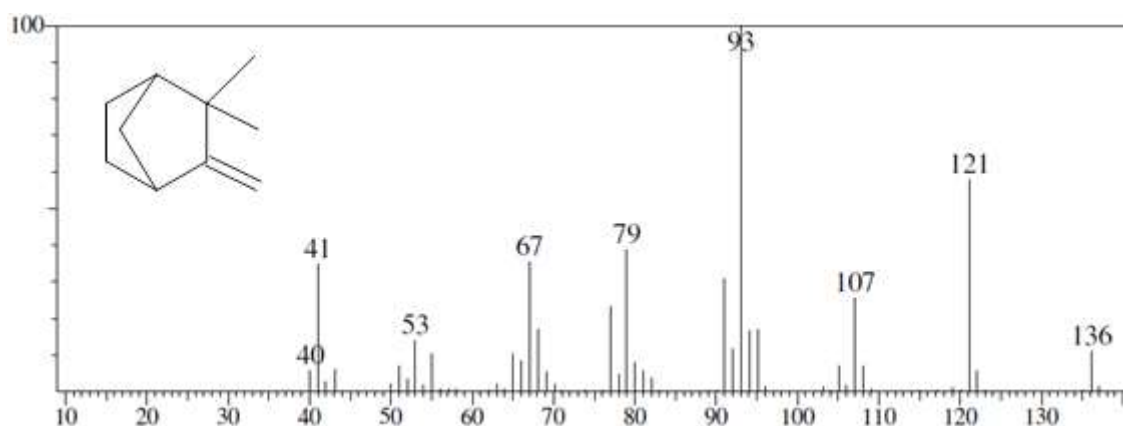


Figura 15 - Espectro de massas e estrutura do canfeno

Os valores de área de α – pineno variaram de 17,99% em 10/2013 e máximo de 56,14% 02/2014. No trabalho de Sobral-Souza et al., (2014) o valor de área de α – pineno foi de 30,04 % e no estudo de Dias et al., (2013) foi de 31,85%. No estudo realizado com óleo essencial das folhas de *S. cumini* por Craveiro et al., (1982) o valor de área de α – pineno foi de 30,10% e na análise da composição do óleo essencial do fruto de *S. cumini* de Vijayanand et al., (2001) o percentual de α – pineno foi de 4,56%. A diferença entre os valores obtidos e os da literatura são devidos aos fatores tais como, temperatura, regime hídrico, condições climáticas e geográficas, estágio vegetativo, radiação solar, partes das plantas e a sazonalidade que podem influenciar na composição química do óleo desta espécie (LAHLOU, 2004).

Os resultados de área do β - pineno e β - mirceno tiveram variações durante o período analisado, entre 4,35 - 13,89% para o β – pineno, entre 2,98 – 3,92% para o β - Mirceno conforme tabela 10. O valor máximo de β - pineno 13,89 % obtido neste trabalho é inferior ao relatado por Craveiro et al., (1982) 20,50% e superior em relação ao de Sobral-Souza et al., (2014) 8,26%. O valor β - mirceno 3,92 % é maior do que os valores apresentados por Sobral-Souza et al., (2014) 2,78 %. Os resultados obtidos mostram que uma mesma planta produz quantidades diferenciadas de metabólitos secundários, mesmo sendo da mesma parte da espécie, que nos casos dos trabalhos apresentados são das folhas de *S. cumini*, só que coletadas em regiões diferentes e mesmo neste trabalho onde as folhas foram coletadas da mesma planta só que em períodos diferentes apresentaram variação no teor (%) dos seus constituintes.

O (Z) β - ocimeno e (E) β - ocimeno, não foram detectados em Fevereiro/2014 (figura 32). No óleo essencial de *Lippia alba*, Barros et al., (2009) não foi detectada a presença de (E) β - Ocimeno no período de Janeiro e Julho do ano de 2005, sendo encontrado apenas nos meses de abril e outubro de 2005. Possivelmente a não detecção dessas substâncias em fevereiro/2014 seja em função da maior quantidade de precipitação na região que foram de 348 mm em Fevereiro e 486 mm em março/2014. Segue espectros de massas do (Z) β - Ocimeno (figura 33) e (E) β - Ocimeno (figura 34).

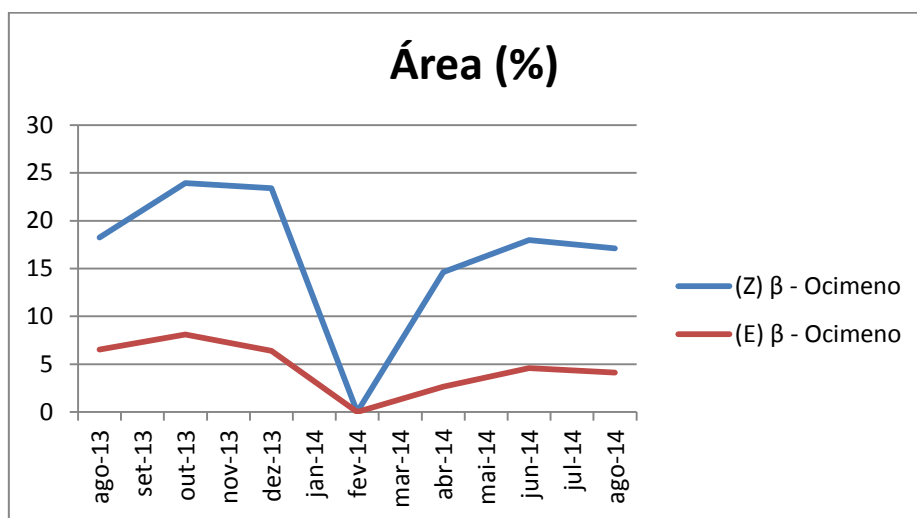


Figura 32 - Área (%) do (Z) β - ocimeno e (E) β - ocimeno do óleo essencial de *S. cumini* no período de Ago/2013 – Ago/2014.

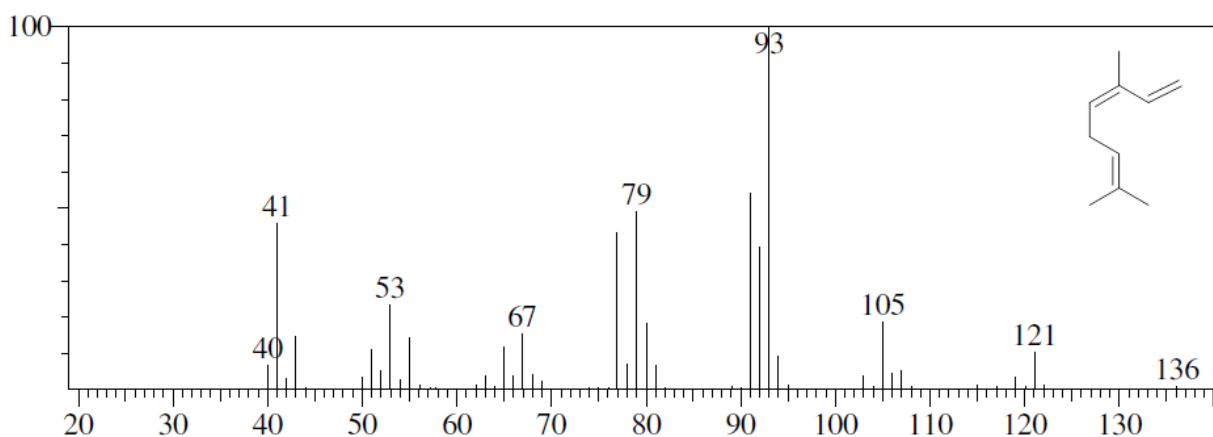


Figura 33 - Espectro de massas e estrutura do (Z) β - ocimeno

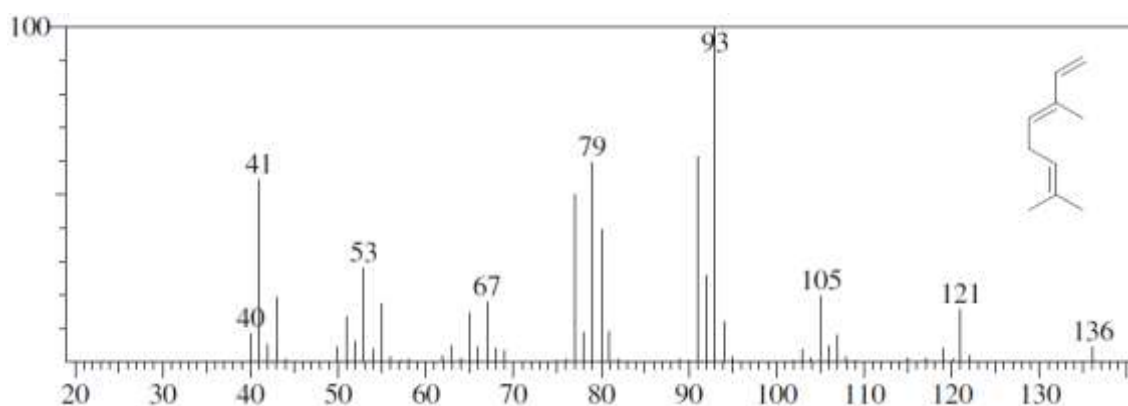


Figura 34 - Espectro de massas e estrutura do (E) β - ocimeno

Por serem isômeros o (Z) β - ocimeno e (E) β - ocimeno apresentaram as mesmas variações no decorrer do período avaliado. Sobral-Souza et al., (2014) encontraram valores de área 26,85% para (Z) β - ocimeno e 11,13% para (E) β - ocimeno, enquanto Craveiro et al., (1982) obteve 9,00 % de (Z) β - Ocimeno e 9,50%, de (E) β - ocimeno. Os valores encontrados neste trabalho em outubro/2013 são inferiores 23,95% de (Z) β - ocimeno e 8,1 % de (E) β - ocimeno em relação ao trabalho de Sobral-Souza, mas são maiores do que valores encontrados por Craveiro et al., (1982), demonstrando que o efeito da sazonalidade influencia nos valores em % em área dessas substâncias. Os maiores valores dessas substâncias foram encontrados em outubro/2013. Dados estes devem estar associados ao período da coleta das amostras, período que o volume de precipitação foi o menor (apenas 7 mm).

5.1.5 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS E SECAS DE *S. cumini*.

O α - pineno permanece sendo o composto majoritário presente no óleo essencial de *S. cumini* (tabela10), mesmo após passar por processo de secagem para eliminação da água das folhas. Observa-se que o aumento da composição do α - pineno em folhas secas segue uma porcentagem constante de aproximadamente 15% a mais em relação a folhas frescas nos dois resultados analisados (tabela 11). Em relação ao β - pineno, no óleo essencial das folhas secas ocorreu uma diminuição de aproximadamente 30% em relação às folhas frescas, provavelmente pelo fato do α - pineno e β - pineno serem obtidos pela mesma via metabólica (figura 36). O contrário ocorre no estudo de Orio et al., (2012) com óleo essencial de *Mentha. spicata* L. onde o valor de área de α - pineno nas folhas frescas foi de 4,0% e ocorreu aumento para 7,4% em folhas secas. Em relação ao β - pineno o valor de área obtido no óleo essencial de folhas frescas foi de 7,2% e ocorreu um aumento no óleo essencial das folhas secas para 10,8%.

Tabela 9 - Área (%) das substâncias majoritárias do óleo essencial de folhas frescas e secas de *S.cumini*.

Nº	Substância	Jun/14		Ago/14		KI _a	KI _b
		Secas área %	Frescas área %	Secas área %	Frescas área %		
1	α -pineno	46,34	39,40	47,78	40,32	931	939
2	Canfeno	2,19	1,28	1,57	1,15	947	954
3	β - pineno	3,54	5,01	3,59	6,74	976	979
4	β - mirceno	2,50	3,67	2,49	3,27	987	990
5	<i>p</i> -cimeno	1,20	0,85	0,75	0,74	1023	1024
6	Limoneno	11,10	7,67	8,11	7,50	1027	1029
7	(Z) β - ocimeno	11,01	17,98	13,49	17,10	1033	1037
8	(E) β - ocimeno	3,55	4,59	4,49	4,14	1043	1050
9	α -terpineol	6,98	6,47	4,90	6,09	1194	1188
10	Acetato de bornila	2,10	1,82	1,41	1,57	1281	1289
11	<i>Trans</i> -cariofileno	2,82	4,63	3,96	5,24	1413	1418
12	α -humuleno	1,71	2,48	2,28	2,77	1449	1454
13	Óxido de cariofileno	1,27	1,19	0,87	1,35	1574	1583

KI_a - CalculadoKI_b – Literatura (Adams, 2007)

No mesmo estudo com óleo essencial de *Mentha piperita* L., os valores de área de α - pineno e β - pineno foram menores nas folhas secas sendo 7,7% e 5,2% para o α - pineno e 9,0% para o β - pineno nas folhas frescas e secas, respectivamente. No estudo de Teles et al., (2013) com óleo essencial das folhas frescas de *Mentha villosa*, os valores de área de α - pineno (0,77%) e β - pineno (1,07%) foram menores que aqueles obtidos com óleo essencial de folhas secas naturalmente α - pineno (1,33%) e β - pineno (1,47%) e secas artificialmente α - pineno (0,87%) e β - pineno (1,07%) de amostras coletadas na cidade de Cruz das Almas do estado da Bahia. A metodologia aplicada para secagem natural consistiu em colocar as folhas bem espalhadas em bandejas na sombra e o método artificial foi aplicado um desumidificador (capacidade de circulação de 500 m³) numa sala com temperatura e umidade controlada.

As substâncias β - pineno, β - mirceno, (Z) β - ocimeno, *trans*-cariofileno e α -humuleno apresentaram o mesmo comportamento nas duas análises realizadas, onde os valores em folhas frescas são maiores que nas folhas secas não sendo afetado pelo período da coleta. Abaixo segue os espectros obtidos do óleo essencial de folhas secas de β - pineno (figura 35), β - mirceno (figura 36), *trans*-cariofileno (figura 37) e α -humuleno (figura 38).

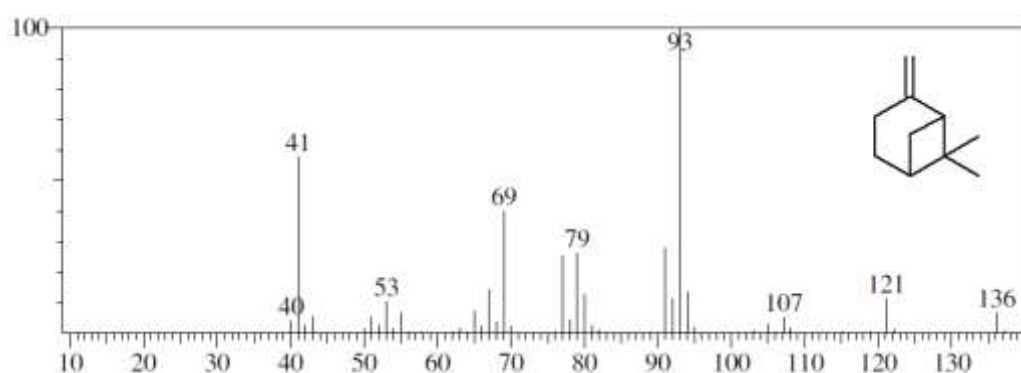


Figura 35 - Espectro de massas do β - pineno

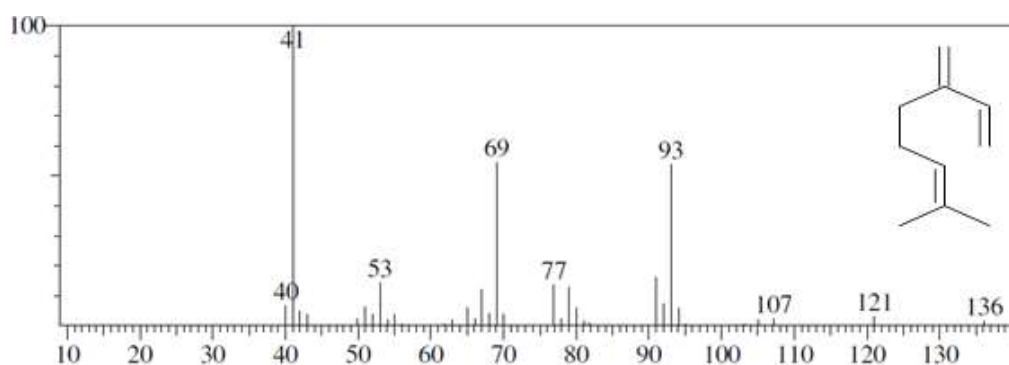


Figura 36 - Espectro de massas do β - mirceno

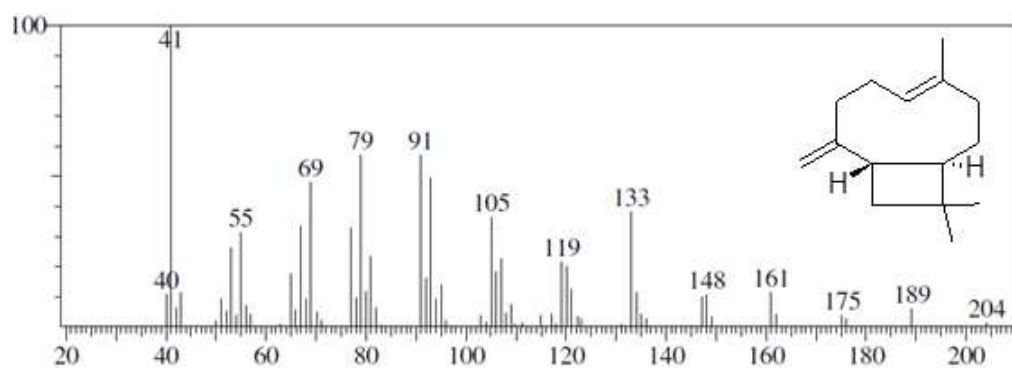


Figura 37 - Espectro de massas e estrutura do *trans*-cariofileno

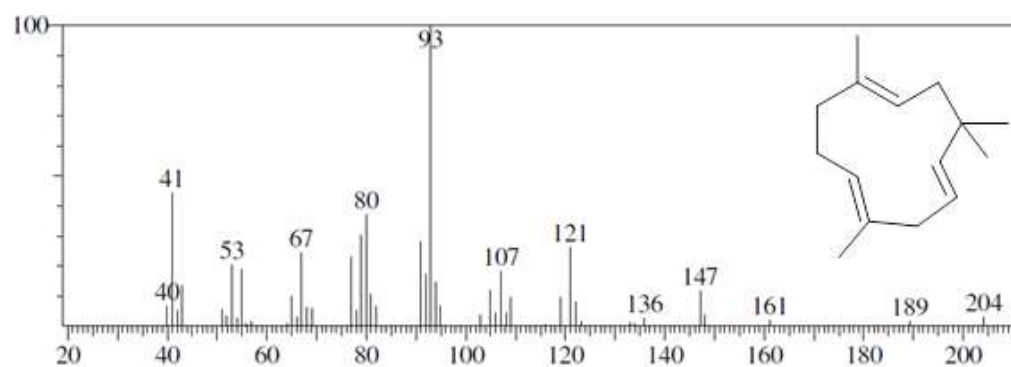


Figura 38 - Espectro de massas e estrutura do α -humuleno

Em relação às substâncias canfeno, *p*-cimeno (figura 39) e limoneno (figura 40) os valores são maiores nas folhas secas não sendo afetados pelo período da coleta.

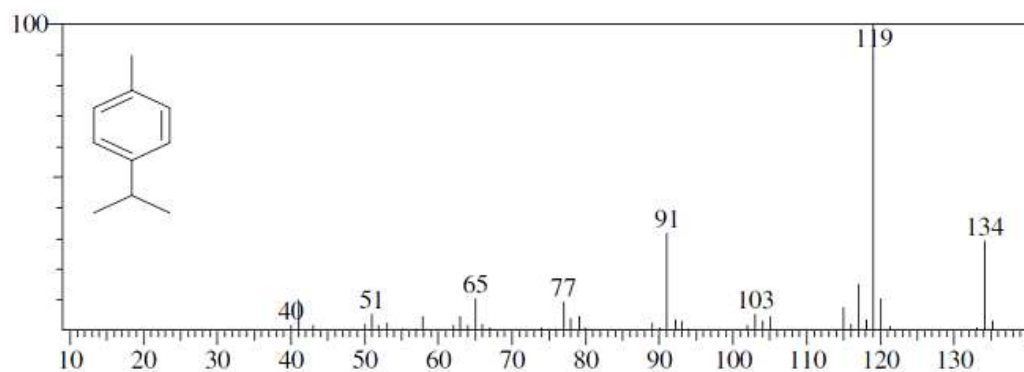


Figura 39 - Espectro de massas e estrutura do *p*-cimeno

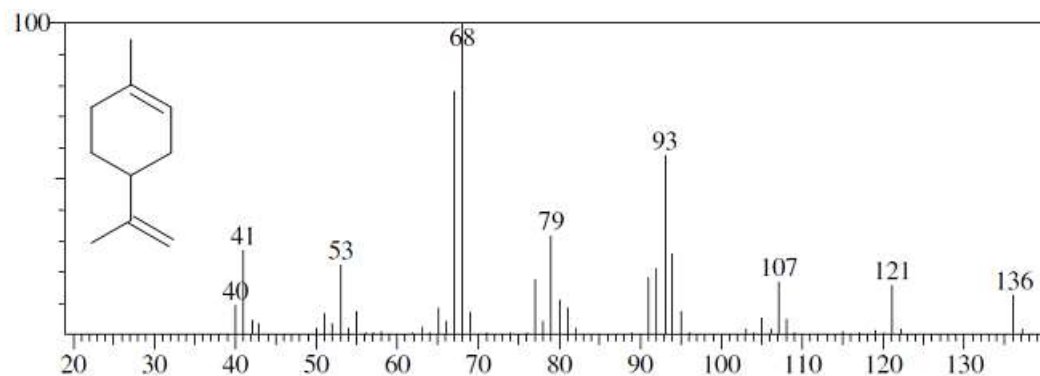


Figura 40 - Espectro de massas e estrutura do limoneno

Para as substâncias (E) β - ocimeno, α -terpineol (figura 41) e acetato de bornila (figura 42) o período da coleta afetou os valores em relação às folhas secas e frescas ocorrendo inversão do maior constituinte dependendo do período.

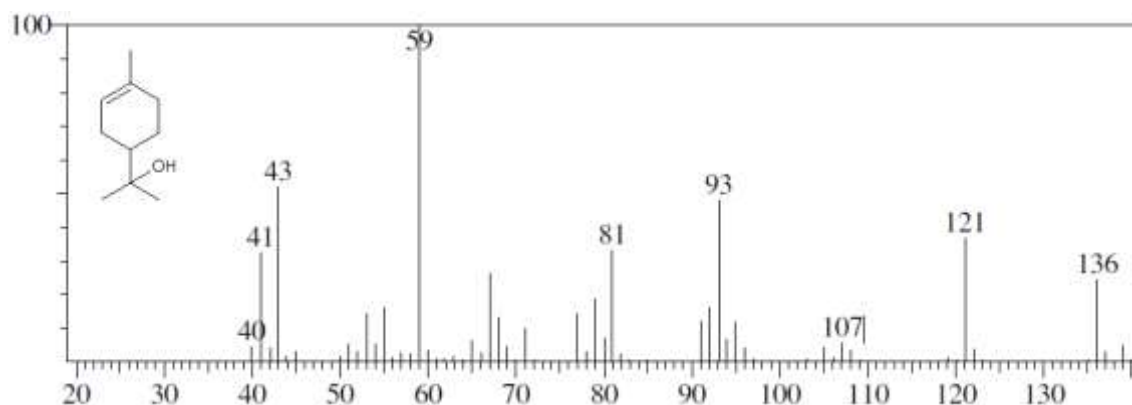


Figura 41 - Espectro de massas e estrutura do α -terpineol

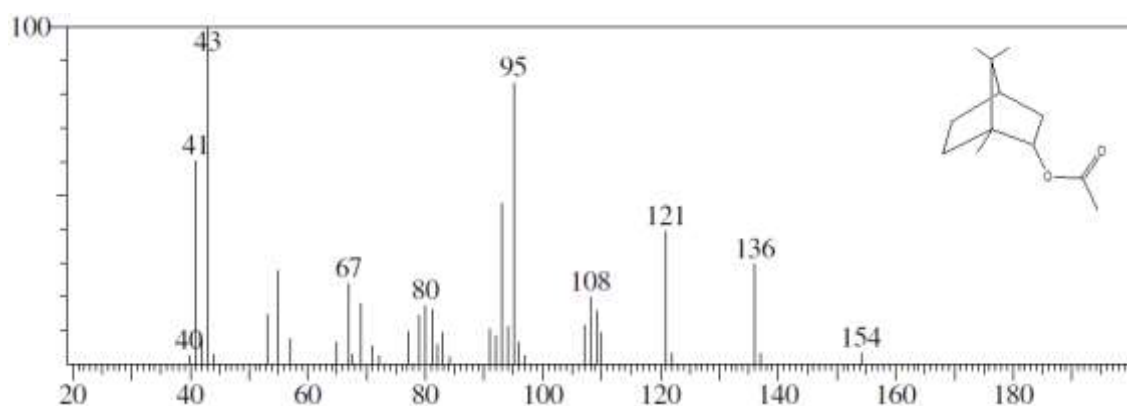


Figura 42 - Espectro de massa e estrutura do acetato de bornila

Os valores de área de *trans*-cariofileno foram maiores em folhas frescas do que nas secas. No trabalho de Bampouli et al., (2014) com óleo essencial de *Pistacia lentiscus* os valores foram o inverso, em folhas frescas 5,03% e em folhas secas 6,32%.

Sharopov et al., (2012) analisou a composição química do óleo de *Mentha longifolia* e o valor de α -humuleno foi menor (0,20%), que os valores encontrados neste estudo, onde os valores variaram de 2,48 a 2,77%.

Na figura 43 verificam-se as estruturas das substâncias majoritárias obtidas do óleo essencial das folhas de *S. cumini*.

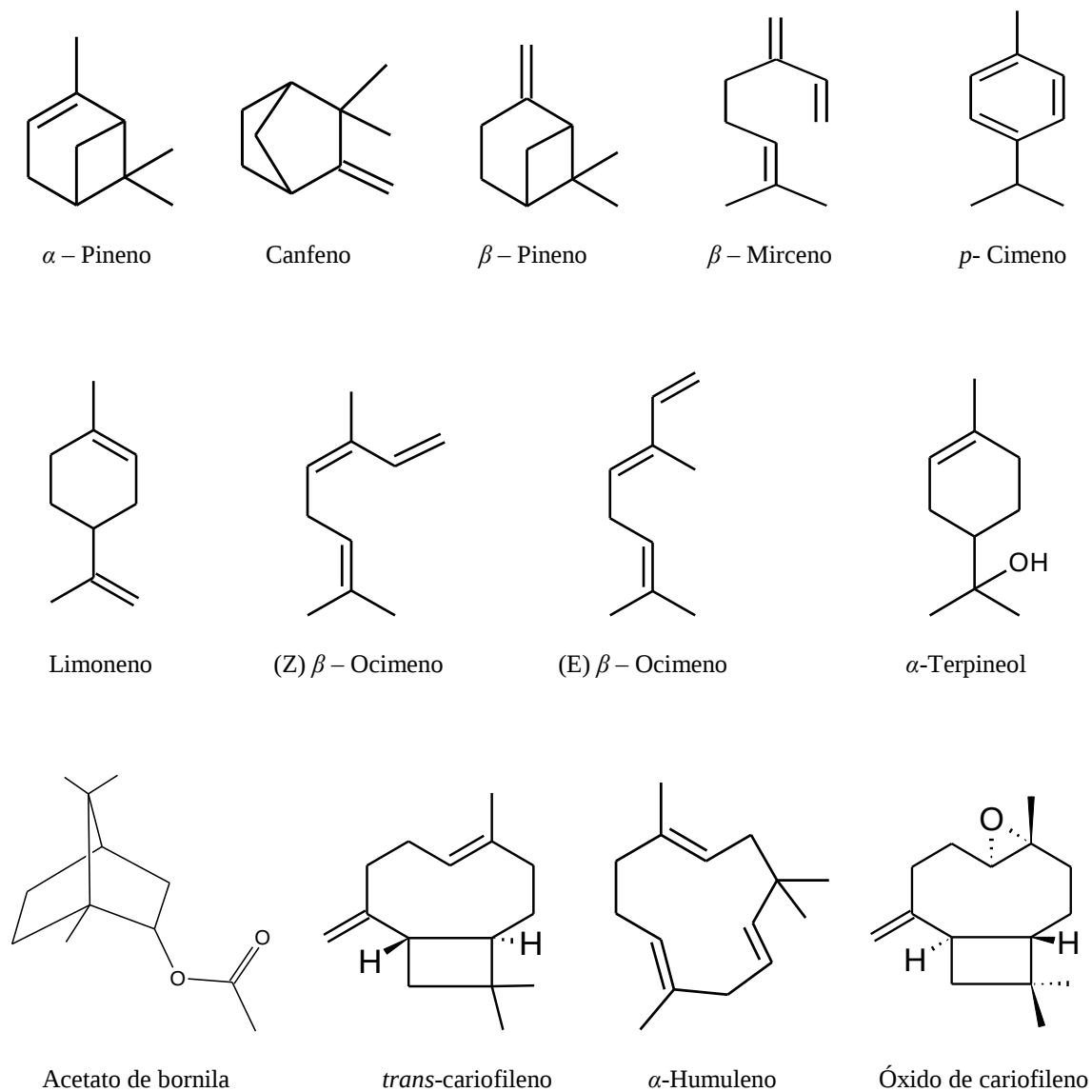


Figura 43 - Substâncias majoritárias do óleo essencial das folhas de *S. cumini*.

5.2 FITOQUÍMICA

5.2.1. RENDIMENTO DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

O rendimento (m/m) do extrato bruto (FAZ) e das frações hexânica (FHAZ), clorofórmica (FCAZ), acetato de etila (FAAZ), butanólica (FBAZ) e hidroalcolica (FHAAZ) podem ser vistos na tabela 12. A prospecção fitoquímica do extrato bruto e frações de *S.cumini* buscou investigar as principais classes de metabólitos secundários presentes nesta espécie. O fracionamento do extrato bruto das folhas de *S. cumini* com solventes de polaridade crescente resultou na separação de classes de metabólitos secundários de acordo com sua afinidade com o solvente utilizado.

Tabela 10 - Rendimento do extrato bruto e frações

Código da Amostra	Rendimento (%)
FAZ	11,06
FHAZ	4,40
FCAZ	3,65
FAAZ	68,68
FBAZ	8,91
FHAAZ	14,35

Os resultados do fracionamento mostra que os maiores rendimentos foram obtidos nas frações mais polares, sendo a fração FAAZ de maior rendimento. Resultados obtidos por Ruan et al., (2008) em folhas de *S.cumini* foram diferentes dos obtidos neste trabalho, pois, obteve-se rendimento em maiores quantidades na fração hidroalcolica (37,33%) e na fração hexânica (24,67%).

5.2.2 FITOQUÍMICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *S. cumini*.

5.2.2.1. REAÇÕES CROMÁTICAS EM TUBOS

5.2.2.1.1 TESTE PARA FENÓIS E TANINOS

Neste teste o extrato bruto (FAZ) e frações (FAAZ, FBAZ, FHAAZ) apresentaram resultados positivos para taninos pirogálicos, pois houve formação de precipitado escuro de tonalidade azul o que indica a presença de taninos pirogálicos (MATOS, 2009). A fração FBAZ apresentou resultado positivo para taninos flobabênicos, formando precipitado de coloração verde (MATOS, 2009). As frações FHAAZ e FCAZ apresentaram resultado negativo (tabela 13).

Tabela 11- Testes para fenóis (fen) e taninos (Tan)

Amostra	FAZ	FHAZ	FCAZ	FAAZ	FBAZ	FHAAZ
Resultados	+	-	-	+	+	+
Classe	fen	nd	nd	tan	fen	tan

nd = não detectado

5.2.2.1.2. TESTE PARA ANTOCIANIDINAS, ANTOCIANINAS E FLAVONOIDES.

Os resultados para antocianinas e antocianidinas estão representados na tabela 14. O extrato FAZ e frações FFAAZ, FBAZ e FHAAZ apresentaram mudança de coloração em pH 8,5 em comparação com o branco da amostra nos testes cromáticos para antocianidinas, antocianinas o que demonstra a presença dessas substâncias (Matos, 2009).

Tabela 12 - Teste para antocianinas e antocianidinas

Amostras	Antocianinas e Antocianidinas		
	pH 3	pH 8,5	pH 11
FAZ	-	+	-
FHAZ	-	-	-
FCAZ	-	-	-
FAAZ	-	+	-
FBAZ	-	+	-
FHAAZ	-	+	-

5.2.2.1.3. TESTE PARA FLAVONA, FLAVONÓIS E XANTONAS.

Nos testes realizados para flavona, flavonóis e xantonas, os resultados foram positivos, pois houve mudança de coloração com presença da coloração amarela nos pHs testados, sendo positivo para estes constituintes (Matos, 2009).

O extrato FAZ e frações FAAZ FBAZ e FHAAZ apresentaram mudança de coloração em pH 11, sendo detectada a cor vermelho púrpura que é indicativo da presença de chalconas e auronas (Matos, 2009).

Os flavonóis foram detectados no extrato FAZ e frações FAAZ, FBAZ e FHAAZ em pH 11, apresentando coloração vermelho laranja, pois de acordo com Matos (2009) esta coloração é indicativa da presença destes constituintes.

5.2.2.1.4. TESTE PARA LEUCOANTOCIANIDINAS, CATEQUINAS E FLAVANONAS.

Segundo Matos (2009), a presença de catequinas é indicada pelo surgimento da cor pardo-amarelada. O extrato e frações testadas não desenvolveram a coloração amarelo-claro, sugerindo que o teste é negativo para este constituinte.

Os resultados de cores observadas nas análises para a presença de leucoantocianidinas é indicada pelo desenvolvimento de coloração vermelha em pH 2, após aquecimento (Matos, 2009). Os resultados demonstraram a presença dessa classe de constituinte químico no extrato FAZ e frações FAAZ, FBAZ e FHAAZ com coloração vermelha em pH 2.

O extrato FAZ e frações FAAZ, FBAZ e FHAAZ apresentaram coloração vermelho-intenso em pH 11, sugerindo a presença de flavanonas.

5.2.2.1.5. TESTE PARA ESTEROIDES E TRITERPENOS

Foi observada mudança de coloração no extrato FAZ e frações FAAZ, FBAZ e FHAAZ para verde evanescente (Matos, 2009) que é indicativo da presença de esteroides livres. As frações FHAZ e FCAZ apresentaram coloração parda indicando a presença de triterpenoides pentacíclicos livres, (Matos, 2009) conforme tabela 15.

Tabela 13 - Teste para Triterpenos e esteroides

Amostra	Triterpenos	Esteroides
FAZ	-	+
FHAZ	+	-
FCAZ	+	-
FAAZ	-	+
FBAZ	-	+
FHAAZ	-	+

5.2.2.1.6. TESTE PARA SAPONINAS

O resultado do teste de saponinas foi positivo para o extrato FAZ e frações FCAZ, FAAZ, FBAZ e FHAAZ, pois houve formação de espuma persistente e abundante por mais de três minutos. Durante o teste confirmativo (hidrólise ácida) não houve formação de espuma quando agitado, além disso, foi observada a presença de precipitado, devido à quebra da ligação da aglicona com a parte apolar (Matos, 2009).

5.2.2.1.7. TESTE PARA ALCALOIDES

O extrato FAZ e frações FAAZ, FBAZ e FHAAZ apresentaram indicativos da presença de alcaloides. Quando adicionadas 3 gotas de reagente Dragendorff ocorreu a formação de material floculoso pesado em pelo menos dois tubos da mesma fração (Matos 2009).

5.2.2.2. CCD

5.2.2.2.1. TESTE PARA TERPENOS

Foram obtidos perfis cromatográficos em CCD utilizando cromatoplaças contendo gel de sílica para o extrato bruto etanólico (FAZ) e frações (FHAZ), (FCAZ), (FAAZ), (FBAZ), (FHAAZ). Os terpenos foram detectados em todas as amostras testadas, o qual pode ser visualizado na figura 44, apresentando manchas violeta, vermelha e marrom (Wagner, 2001).

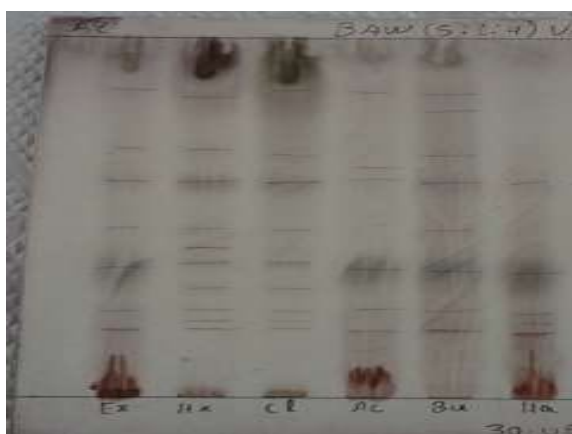


Figura 44 - Cromatoplaça para Terpenos eluída em BAW (4: 1: 5) revelada com Vanilina Sulfúrica.

5.2.2.2. TESTE PARA FLAVONOIDES

O teste para flavonoides em CCD foi realizado utilizando-se NP/PEG como revelador. O extrato FAZ e as frações FAAZ, FBAZ e FHAAZ apresentaram manchas de cor amarela, verde claro e azul, que são características de flavonoides (Wagner, 2001). Além disso, foram observadas manchas fluorescentes de cor azul e verde brilhante, sugerindo a presença de outras substâncias fenólicas.

Soni et al., (2011) e Ruan et al., (2008) encontraram taninos, alcaloides, flavonoides, glicosídeos e fitosteróis no extrato etanólico das folhas de *S. cumini*. Brito et al., (2007) encontraram taninos e flavonoides e Mahmoud et al., (2001) encontraram uma mistura de polifenóis dentre os que se destacaram foram os flavonóis glicosilados e ácidos fenólicos. Portanto os resultados obtidos estão de acordo com dados da literatura.

5.2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL, DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DAS FOLHAS DE *S. cumini*.

5.2.3.1. TESTE QUALITATIVO

5.2.3.1.1. EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

A atividade antioxidante (AA) foi determinada por meio do teste qualitativo segundo método de Tepe et al., (2005). O resultado de AA mostrou que tanto o extrato bruto como as frações de *S. cumini* apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH, principalmente as frações FAAZ, FBAZ E FHAAZ, ocorrendo aparecimento de manchas amarelas nas cromatoplacas depois de 30 min.

5.2.3.1.2. SUBFRAÇÕES DE FAAZ

Foi realizado teste qualitativo em 7 subfrações obtidas do fracionamento por HPLC da fração FAAZ, o qual pode ser visto na figura 45. O resultado de AA mostrou que as subfrações FAAZ3, FAAZ4, FAAZ5 e FAAZ6 apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH, sendo possível visualizar manchas amarelas após 30 min.

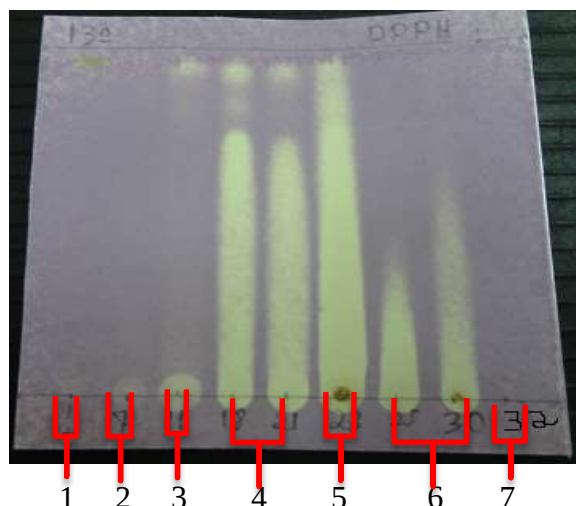


Figura 45 - Teste qualitativo de atividade antioxidante subfrações FAAZ – DPPH

Foi realizado o teste qualitativo de atividade antioxidante (AA) em CCD eluída em diclorometano: acetona: metanol (DAM) (6,5: 1,5: 3) das subfrações obtidas da subfração FAAZ3 obtidas por nova injeção no HPCCC utilizando os sistemas HEMWat (17, 14,6, 14,3, 14 e 14,1) obtidas conforme fracionamento demonstrado na figura 14 (página 45). As amostras FAAZ3c, FAAZ3d, FAAZ3e, FAAZ3f e FAAZ3h apresentaram atividade antioxidante, sendo as amostras FAAZ3c, FAAZ3d, FAAZ3f mais ativas.

Foi realizado o teste qualitativo de atividade antioxidante para as subfrações obtidas da subfração FAAZ4 em CCD eluída em diclorometano: acetona: metanol (DAM) (6,5: 1,5: 3) das subfrações obtidas da subfração FAAZ4 obtidas por nova injeção no HPCCC utilizando os sistemas HEMWat (17, 14,6, 14,3, 14 e 14,1) obtidas conforme fracionamento demonstrado na figura 16 (página 46). As subfrações FAAZ4c, FAAZ4d, FAAZ4e, FAAZ4f, FAAZ4g, FAAZ4h e FAAZ4i apresentaram atividade antioxidante, sendo as amostras FAAZ4c, FAAZ4d, FAAZ4e, FAAZ4f, FAAZ4g e FAAZ4i as mais ativas.

Foi realizado o teste qualitativo de atividade antioxidante em CCD eluída em diclorometano: acetona: metanol (DAM) (6,5: 1,5: 3) das subfrações obtidas da subfração FAAZ5. Foi feita nova injeção no HPCCC utilizando os sistemas HEMWats (17, 14,6, 14,3, 14 e 14,1) obtidas conforme fracionamento demonstrado na figura 18 (página 47). As amostras FAAZ5a e FAAZ5b apresentaram atividade antioxidante.

Foi realizado teste qualitativo de atividade antioxidante em CCD eluída em diclorometano: acetona: metanol (DAM) (6,5: 1,5: 3) das subfrações obtidas da subfração FAAZ6. Foi feita nova injeção no HPCCC utilizando os sistemas HEMWat

(17) e EBWat (4.1 e 3.4) obtidas conforme fracionamento demonstrado na figura 20 (página 48). As subfrações FAAZ6a, FAAZ6b, FAAZ6c, FAAZ6d, FAAZ6e, FAAZ6f, FAAZ6g e FAAZ6h apresentaram atividade antioxidantes, sendo observado que todo radical DPPH aplicado na cromatoplaça foi consumido.

Foi realizado teste qualitativo de atividade antioxidante em CCD eluída em CH₂Cl₂: ACN: H₂O: HAc (60: 60: 10: 1.3), das subfrações IFAAZ1a, IFAAZ2a, IFAAZ3a, IFAAZ4a, IFAAZ5a, IFAAZ6a, IFAAZ7a, IFAAZ8a, IFAAZ9a e IFAAZ10a podendo ser visualizado na figura 46, onde todas as substâncias apresentaram atividade antioxidante.

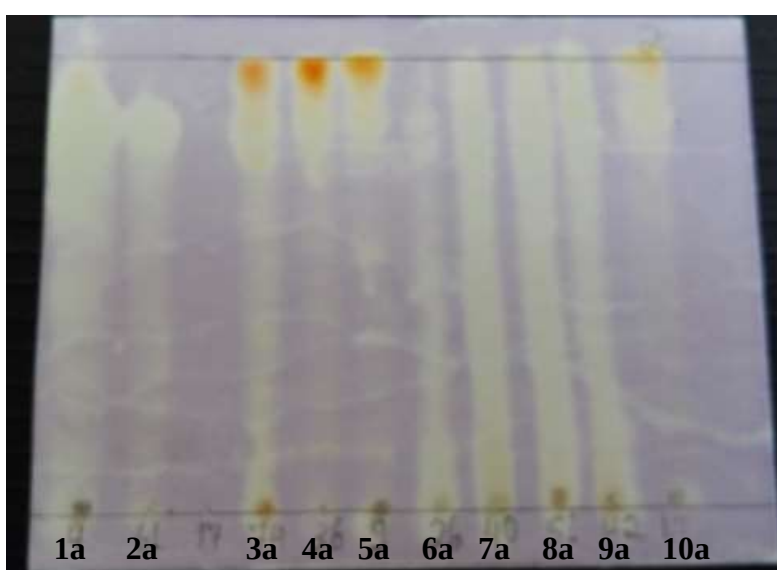


Figura 16 - Atividade antioxidante das IFAAZ1a – IFAAZ10a

5.2.3.2. TESTE QUANTITATIVO

5.2.3.2. 1. ÓLEO ESSENCIAL

Foi realizado teste para determinação da atividade antioxidante (AA) do óleo essencial de *S. cumini* com amostras de períodos diferentes do ano. Os resultados podem ser vistos na tabela 16.

Tabela 14- AA de óleo essencial *S. cumini*, n=3.

Data	% inibição DPPH	Desvio padrão
27/08/2013	39,56	± 1,15
17/10/2013	39,67	± 0,56
11/12/2013	39,06	± 0,59

Os resultados obtidos de inibição de DPPH nas amostras de óleo essencial no período avaliado se mantiveram constante, mesmo com a composição das substâncias majoritárias variando no período avaliado conforme tabela 9. Os resultados obtidos são inferiores a 50% o que mostra baixa atividade de inibição frente ao radical DPPH. Djouahri et al., (2015) analisou atividade antioxidante do óleo essencial de *Tetralinis articulata* e obteve valores de CI_{50} de $88,44 \pm 3,27$ a $119,44 \pm 5,25$ $\mu\text{g/mL}$, devido à presença de timol e carvacrol na composição do óleo essencial. Estas substâncias não foram detectadas no óleo essencial de *S. cumini*. Segundo Politeo et al., (2011), o óleo essencial de *Pinus nigra* Arnould ssp. *dalmatica* apresenta baixa atividade antioxidante devido à presença dominante de monoterpenos e ausência de grupos fenólicos que são responsáveis pelo grande efeito do sequestro de radical DPPH, como é o caso do óleo essencial de *S. cumini*. Adiguzel et al., (2009) analisou óleo essencial de *Nepeta cataria* e o mesmo não foi ativo, devido à ausência das substâncias 1,8-cineol e linalol.

5.2.3.2. 2. EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

Baseado nos resultados obtidos nos testes qualitativos, foi realizado o teste quantitativo pelo método de inibição do radical DPPH (Mensor et al., 2001) onde os resultados de inibição de radical DPPH e o valor de CI_{50} podem ser vistos na tabela 17.

Tabela 15 – Inibição de radical DPPH do Extrato Bruto e Frações *S. cumini*

Amostras	% inibição	$CI_{50}(\mu\text{g/mL})$
FAZ	$66,34 \pm 2,11$	$9,87 \pm 0,18$
FHAZ	$69,66 \pm 1,91$	$64,07 \pm 3,19$
FCAZ	$66,28 \pm 0,04$	$65,17 \pm 3,33$
FAAZ	$87,71 \pm 0,15$	$9,40 \pm 0,40$
FBAZ	$89,72 \pm 0,04$	$10,17 \pm 0,12$
FHAAZ	$88,53 \pm 0,24$	$10,70 \pm 0,36$
Ácido Gálico	$93,45 \pm 0,57$	$3,20 \pm 0,46$

Os valores de CI_{50} das frações polares foram próximos ao valor do padrão de ácido gálico. Quando comparados o valor de CI_{50} do extrato bruto de *S. cumini* com resultado encontrado no trabalho de Mensor et al., (2001) do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* ($CI_{50} = 40,72 \pm 0,19$ $\mu\text{g/mL}$), verifica-se que o valor de CI_{50} do extrato bruto de *S. cumini* é quatro vezes menor, o que indica que tem boa atividade antioxidante, confirmando as observações do teste qualitativo. No trabalho de Ruan et al., (2008) com folhas de *S. cumini* os valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) foram: extrato bruto ($125 \pm 7,55$), fração hexânica ($479,56 \pm 9,31$), fração clorofórmica ($149,33 \pm 4,43$),

fração em acetato de etila ($112,79 \pm 2,51$), fração hidroalcóolica ($150,66 \pm 6,95$) e em comparação com os padrões de vitamina C ($71,30 \pm 1,66$) e hidroxianisol butilada (BHA) ($114,69 \pm 1,95$) os valores de CI_{50} do extrato bruto e de suas frações são maiores do que os encontrados neste trabalho. Benherlal (2007) comparou a atividade antioxidante de diferentes partes do fruto de *S.cumini* e os resultados estão apresentados na tabela 18. Os valores de CI_{50} obtidos para extratos e frações encontrados neste estudo das folhas de *S. cumini* (FAZ, FAAZ, FBAZ e FHAAZ) são menores que os valores encontrados por Benherlal (2007) com polpa e semente o que representa uma boa atividade antioxidante. O valor de CI_{50} da fração FAAZ ($9,40 \pm 0,40 \mu\text{g/mL}$) foi menor que o valor obtido por Chatterjee et al., (2012) no estudo da atividade antioxidante e antidiabética da fração em acetato de etila do extrato hidrometanólico da semente de *S. cumini* onde o valor do CI_{50} foi de $10,46 \mu\text{g/mL}$ de atividade antioxidante.

Tabela 16 – AA dos frutos de *S. cumini* $CI_{50}(\mu\text{g/mL})$ - Benherlal (2007)

Amostras	$CI_{50}(\mu\text{g/mL})$
Polpa	$158,0 \pm 5$
Núcleo	$8,6 \pm 3$
Semente	$48,0 \pm 9$
Ácido Gálico	$1,3 \pm 0,05$
Quercetina	$2,4 \pm 2,3$
Trolox	$4,3 \pm 1$
Catequina	$6,0 \pm 0,2$

Os resultados obtidos e a literatura mencionada anteriormente mostram que em diferentes partes de *S. cumini*, CI_{50} da atividade antioxidante tem valores diferentes, e que a referida atividade deve-se provavelmente à presença de flavonoides totais (FLT) e fenóis totais (FET) como pode ser visto pelos resultados obtidos na tabela 19. Os maiores valores de FLT estão nas frações polares (FAAZ, FCAZ e FHAAZ), confirmando os melhores resultados de atividade antioxidantes destas frações conforme tabela 19. O resultado da prospecção fitoquímica mostrou a presença de flavonoides e fenóis totais, onde de acordo com Barreiros et al., (2006) os flavonoides atuam como agentes antioxidantes devido ao poder de oxidação dos mesmos.

Tabela 17 - FET e FLT no extrato bruto e frações de *S. cumini*.

Amostras	FET (μg Ácido Gálico/ml)	FLT (μg Quercetina/ml)
FAZ	174,18 $\pm$ 0,78	25,42 $\pm$ 0,40
FHAZ	155,49 $\pm$ 3,17	3,43 $\pm$ 3,57
FCAZ	57,63 $\pm$ 0,65	12,20 $\pm$ 3,30
FAAZ	63,19 $\pm$ 0,33	71,25 $\pm$ 0,42
FBAZ	254,26 $\pm$ 3,36	63,64 $\pm$ 0,84
FHAAZ	246,41 $\pm$ 4,31	45,42 $\pm$ 2,37

5.2.3.2.3. SUBFRAÇÕES DE FAAZ

Os resultados do teste quantitativo de atividade antioxidante das subfrações da fração acetato de etila podem ser observados na tabela 20. Todas as subfrações testadas apresentaram atividade antioxidante.

Tabela 18 - Atividade antioxidante, CI_{50} e Concentração de FET e FLT das subfrações de FAAZ

Amostras	% AA	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$	FET (μg Ácido Gálico/ml)	FLT (μg Quercetina/ml)
FAAZ3	84,09 $\pm$ 0,10	22,13 $\pm$ 1,12	111,64 $\pm$ 1,21	7,12 $\pm$ 5,69
FAAZ4	84,44 $\pm$ 0,37	8,60 $\pm$ 0,26	262,59 $\pm$ 0,78	2,71 $\pm$ 2,28
FAAZ5	85,76 $\pm$ 0,14	14,17 $\pm$ 0,60	216,86 $\pm$ 0,40	4,51 $\pm$ 3,70
FAAZ6	72,03 $\pm$ 2,51	2,87 $\pm$ 1,25	590,64 $\pm$ 1,62	1,44 $\pm$ 0,70

Foi feito o teste quantitativo para flavonoides totais e fenóis totais para estas subfrações. Os resultados mostram a presença dos grupos fenólicos assim como os flavonoides nas subfrações avaliadas, o qual pode justificar os valores de atividade antioxidante e o CI_{50} da tabela 20.

5.3. PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DAS SUSBTÂNCIAS POR CLAE/EM

Os resultados obtidos na análise de CLAE/EM das subfrações FAAZ3b, FAAZ3c, FAAZ3d, FAAZ3e, FAAZ3f, FAAZ3g, FAAZ3h, FAAZ4b, FAAZ4c, FAAZ4d, FAAZ4e, FAAZ4f, FAAZ4g, FAAZ4h, FAAZ4i, FAAZ5a, FAAZ5b,

FAAZ5c, FAAZ6a, FAAZ6b, FAAZ6c, FAAZ6d, FAAZ6e, FAAZ6f, podem ser observados na tabela 21 a qual mostra as substâncias propostas.

Os resultados obtidos na CLAE-EM possibilitou propor a identificação de compostos fenólicos, flavonoides livres e glicosilados nas frações analisadas, resultando num total de 36 substâncias, sendo possível propor através da comparação dos tempos de retenção, comprimento de onda e fragmentações descritas nas referências. Não foi possível propor a identificação das substâncias de números 1, 2, 9, 12, 16, 19, 20, 21, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 sendo possível apenas sugerir que algumas são derivadas de compostos fenólicos, pois seriam necessários outros métodos analíticos, tais como de RMN de ^{13}C e ^1H para elucidação das suas estruturas. As substâncias 1 e 2 mostraram espectros de massas (figura 47 e figura 48, respectivamente) similares e espectros de absorção de luz UV na mesma região, mas tempos de retenção diferentes 1,23 e 1,36 min, respectivamente. O íon precursor das duas substâncias foi $[\text{M} - \text{H}]^- m/z$ 373 podendo ser atribuído a um derivado do ácido gálico ligado a um grupo glicosil acilado, apresentando uma fragmentação nas duas substâncias de $[\text{M} - \text{H} - 204]^- m/z$ 168 característico desse grupo e como pico base $[\text{M} - \text{H} - 260]^- m/z$ 113 para substância 1 e um pico base de $[\text{M} - \text{H} - 204]^- m/z$ 168 para substância 2 sugerindo que são substâncias isoméricas pertencente a classe dos compostos fenólicos (Greco e Bruno, 2008). A substância 12 foi detectada no cromatograma (figura 49) com tempo de retenção 8,88 minutos apresentando espectro de massas (figura 50), com fragmentação característica de flavonoides glicosilados com íon precursor $[\text{M} - \text{H}]^- m/z$ 553, pico base $[\text{M} - \text{H} - 62]^- m/z$ 491 e um pico em $[\text{M} - \text{H} - 174]^- m/z$ 317 fragmento este correspondente à massa de um açúcar acil glicosil pertencente aos grupos das pentoses e aglicona remanescente corresponde a íon molecular derivado da miricetina (Greco e Bruno, 2008) apresentando absorção de luz UV nos comprimentos de ondas 206, 254, 352 e 395 nm (figura 51) característicos das flavonas e flavonóis (figura 52) (Merken e Beecher, 2000).

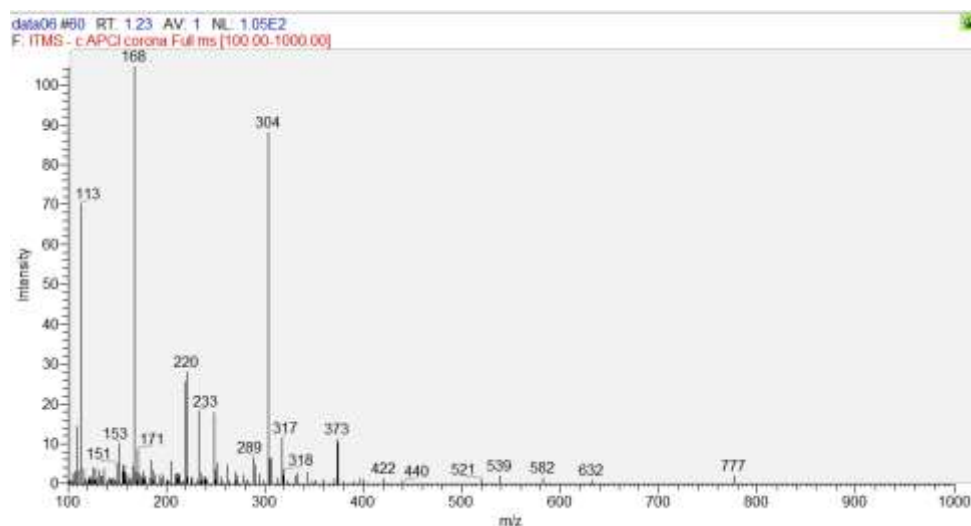


Figura 17- espectro de massas da substância 1

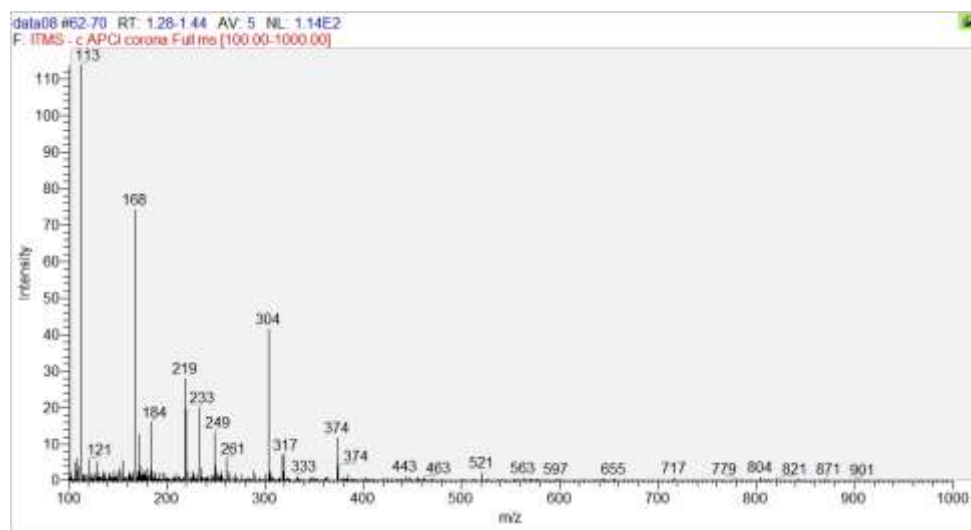


Figura 18 - espectro de massas da substância 2

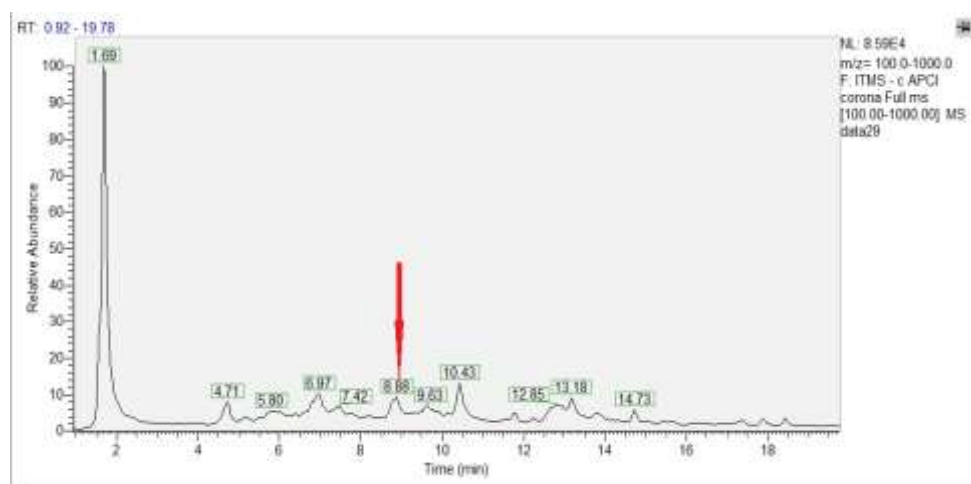


Figura 19 - Cromatograma CLAE- EM da Fração FAAZ3b

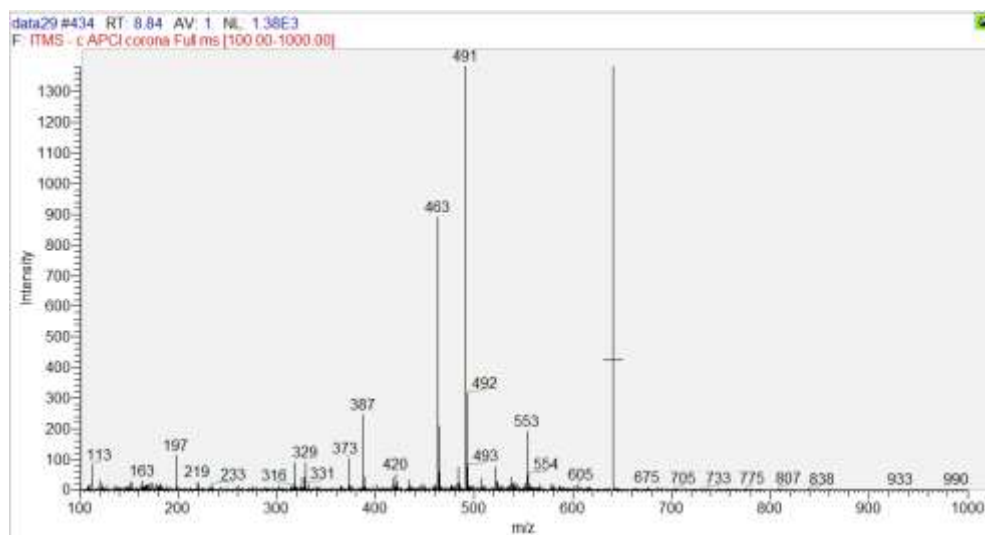


Figura 20 - Espectro de massas da Amostra 12

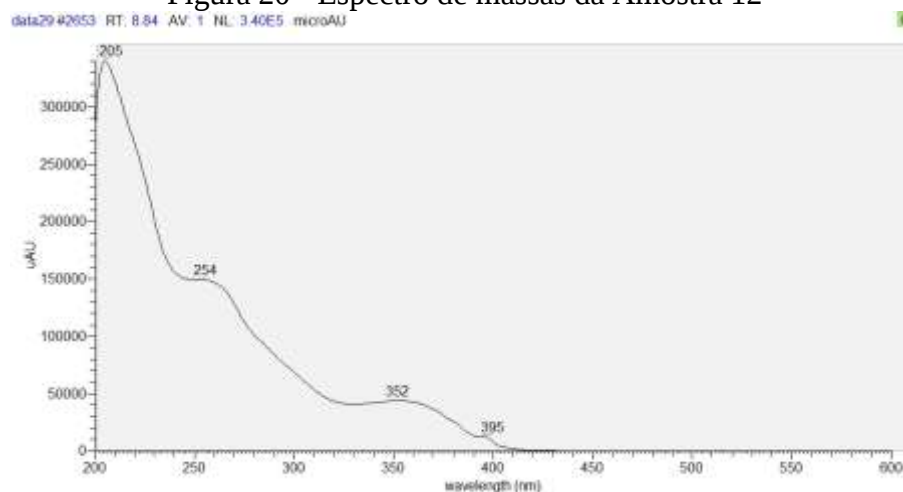


Figura 21 - Espectro UV de comprimento de onda 200- 600 nm da amostra 12

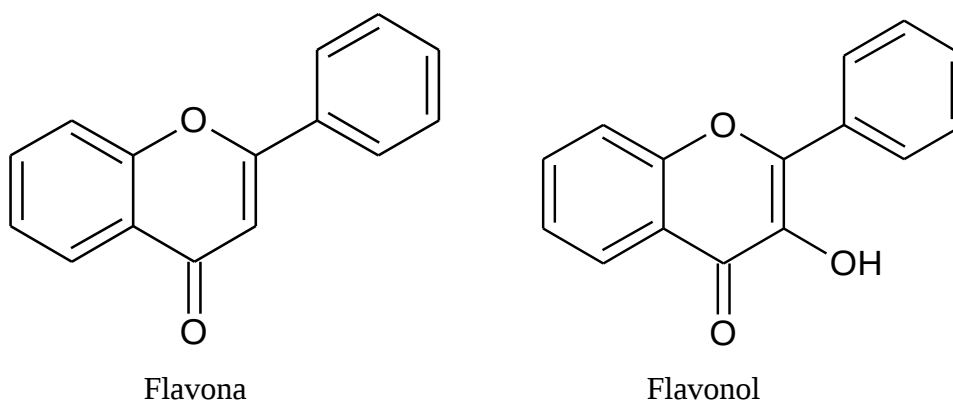


Figura 22 - Estruturas básicas das Flavonas e Flavonóis.

Tabela 19 - Substâncias propostas encontradas em folhas de *S. cumini* realizada em equipamento CLAE-DAD-IQPA/EM modo de ionização negativo 35 eV.

Número da Substância	Tempo de retenção	Substâncias Propostas	Íon Molecular [M - H] ⁻	Pico Base	Fragmentações (%)	Comprimento de onda λ _{max} (nm)	Referências
1	1,23	Não identificada	373	168	373(19,65), 317(8,22), 304(82,12), 250(10,79), 249(18,63), 233(20,91), 220(35,00), 219(38,90), 171(9,81), 168(100), 113(88,44) e 109(11,85)	204	
2	1,36	Não identificada	373	113	373(16,25), 317(9,67), 304(81,25), 249(14,38), 233(16,45), 220(24,30), 219(32,99), 171(16,68), 168(65,36), 167(13,04), 113(100)	206	
3	1,57	Ácido Caféico	179	179	161(6,33), 135(4,02), 113(68,06), 109(7,22)	203, 282	Saldanha et al., 2013.
4	1,68	Metil miricetina glicosídica	493	481	493(3,50), 483(24,52), 482(24,05), 481(100), 463(8,35), 331(45,22), 301(21,69), 193(15,14), 191(15,86), 179(11,77), 173(30,31), 169(13,59), 147(5,65)	220, 262, 320	Gordon et al., 2011.
5	1,69	Ácido <i>trans</i> -Cinâmico	148	147	148(6,09), 147(100), 129(6,44), 113(63,64), 101(6,87)	207, 273, 285	Kivrak et al., 2013.
6	4,71	Metil galato	184	183	184(9,65), 183(100), 182(42,06), 173(6,58), 169(8,74), 125(5,23), 113(10,54)	217, 272	Santos et al., 2013.
7	6,3	Ácido gálico	170	169	170(7,95), 169(100), 168(23,79), 125(12,92), 113(53,27)	213, 261	Herculano et al., 2014.
8	6,97	Metóxi metil galato	198	197	198(9,49), 197 (100), 196(36,28), 169(6,51), 168(8,10), 125(6,94), 113(1,42)	218, 273	N. Nuengchamnon, K. Ingkaninan, 2009
9	6,97	Não identificada	565	537	565(9,29), 538(26,37), 537(100), 521(7,12), 331(2,01), 191(6,21)	214, 272	
10	7,01	Ácido protocatecuico	154	153	154(8,33), 153(100), 152(22,43), 113(11,88) 109(23,35), 108(21,15)	208, 254, 292	Santos et al., 2013
11	7,84	Isômero da Miricetina 3-O- (3"-acetil-raminosídico)	507	505	507(5,14), 506(29,17), 505(100), 373(14,86), 317(5,95), 233(16,90), 220(18,49), 219(40,12), 187(7,07), 179(5,59), 113(72,27)	203, 261, 280	Faria et al., 2011.

Continua

Continuação

12	8,88	Não identificada	553	491	553(24,05), 521(14,92), 492(23,32), 491(100), 483(12,86), 464(14,54), 463(62,99), 387(27,13), 373(7,27), 329(7,09), 317(7,51), 197(13,17), 113(11,49)	205, 260, 355, 396	
13	9,03	Miricetina 3,4'-di-O- α -L-raminopiranosídico	609	463	609(3,50), 465(5,08), 464(21,19), 463(100), 317(5,09)	213, 256, 352	Braca et al., 1999.
14	9,92	Floridzina	436	435	436(19,15), 435(100), 273(10,22), 167(1,52), 113(1,42)	204, 220, 284	Liang et al., 2015
15	10,11	Miricetina 3-O-(2''-acetil-raminosídico)	507	505	507(5,71), 506(20,32), 505 (100), 477(0,56), 447 (0,50), 433(1,28), 317 (1,17), 316(2,67)	209, 256, 302, 352,395	Faria et al., 2011
16	10,19	Não identificada	419	417	419(3,38), 418(22,03), 417(100), 401(2,96), 373,5(2,92), 317(1,18), 233(3,26), 220(4,99), 219(7,45), 181(3,92), 168(3,25), 151(1,14), 113(16,68)	207	
17	10,31	Miricetina	318	317	318(13,1), 317(100), 316(4,63), 219(0,72), 179(1,83), 151(1,34), 137(0,80), 113(2,06)	208, 253, 303, 373	Faria et al., 2011.
18	10,39	Miricetina 3-O-(3''-acetil-raminosidico)	507	505	507(5,47), 506(20,86), 505(100), 463(1,50), 433(0,22), 317 (1,56), 316(2,62)	210, 257, 352, 395	V.K. Agnihotri et al., 2008
19	10,52	Não identificada	551	343	551(4,89), 542(5,63), 541(13,91), 538(25,61), 521(6,06), 507(12,05), 491(34,23), 478(13,85), 477(57,62), 344(18,66), 343(100), 331(4,62), 328(7,30), 317(9,58), 151(2,03), 113(2,05)	206, 248, 366, 396	
20	10,48	Não identificada	419	401	417(7,52), 402(21,25), 401(100), 373,5(9,88), 233(11,61), 220 (16,68), 219(24,45), 113(48,71)	206	

continua

Continuação

21	10,61	Não identificada	543	343	543(13,36), 538(12,93) 491(12,88), 373,5(10,06), 344(16,78), 343(100), 328(5,72), 317(3,83), 261(4,99), 233(10,90), 220(11,40), 219(16,06), 113(38,07)	203, 245, 285,366	
22	10,62	Miricetina 3-O-(4''-acetil-raminosídico)	507	477	507(0,52), 506(2,06), 505(8,02), 483(0,89), 479 (5,12), 478(21,33), 477(100), 447(11,75), 331(6,92), 317 (0,83), 316(2,03),	210, 263, 340, 395	Timbola et al., 2002
23	10,82	Miricetina acetil-raminosídico (isômero)	507	505	507(5,35), 506(22,02), 505(100), 478(2,91), 477(13,56), 448(1,37), 447(6,37), 316(3,60),	209, 257, 304, 352, 395	A.F. Faria et al., 2011.
24	11,56	Mearnsetin 3-O-(4''-O-acetil)- α -L- ¹ C ₄ -raminopiranosídico	520	519	522(16,85), 520(12,72), 519(100), 333(22,41), 331(5,27), 316(1,43), 219(1,23), 113(1,42)	204, 262, 302, 319, 335, 397	Mahmoud et al., 2001
25	12,2	Galoil-glicosídico ester	332	331	332(19,19), 331(100), 316(4,19), 219(5,16), 113(13,66), 109(1,25)	204, 248, 326, 365	A.F. Faria et al., 2011.
26	12,85	Hiperosídeo	463	301	463(2,93), 447(4,17), 331(2,66), 302(14,73), 301(100), 179(0,98), 113(4,75)	204, 254, 365	Anderson e Markham, 2006.
27	13,18	Isoquercetrina	463	329	463(1,60), 477(6,76), 331(4,38), 330(16,75), 329(100), 314(8,23), 302(8,52), 301(55,52), 113(4,85)	205, 253, 366, 396	Anderson e Markham, 2006.
28	14,87	Não identificada	373	343	373(5,57), 344(19,45), 343(100), 328(8,14), 304(3,13), 219(12,55), 168(2,81), 113(29,31)	205, 285	
29	17,42	Não identificada	835	471	836(22,98), 835(52,22), 834(14,85), 485(30,68), 473(14,00), 472(26,19), 471(100), 470(31,80), 459(12,32), 413(24,00), 220(10,18), 219(12,96), 113(30,19)	207	
30	19,05	Não identificada	490	487	490(0,76), 488(26,52), 487(100), 219(2,05)	207, 280	

continua

Continuação

31	20,76	Não identificada	342	341	342(18,59), 341(100), 304(4,08), 220(9,70), 219(10,03), 179(2,28), 168(7,15), 113(15,40)	205
32	22,05	Não identificada	700	350	700(9,13), 669(10,35), 668(38,26), 651(39,97), 621(80,66), 447(12,70), 351(27,64), 350(100), 219(10,06), 205(11,92), 113(6,18)	207
33	22,06	Não identificada	701	621	701(5,15), 700(18,83), 668(26,23), 667(26,53), 652(14,39), 651(44,44), 622(28,59), 621(100), 219(5,16), 205(10,34), 113(3,52)	207
34	25,15	Não identificada	343	255	343(9,79), 281(17,88), 256(16,45), 255(100), 143(7,98), 113(3,44)	207
35	26,58	Não identificada	955	283	955(3,30), 497(9,32), 284(19,10), 283(100), 255(15,67), 171(15,50), 143(14,50), 113(4,23)	207
36	29,54	Não identificada	955	473	474(30,64), 473(100), 205(6,62), 168(5,52), 113(3,40)	207

A substância 3 foi proposta como sendo o ácido caféico (figura 53), o qual apresentou pico base $[M - H]^-$ m/z 179, fragmentação característica desta substância (Santos et al., 2013). Estudos realizados por Saldanha et al., (2013) sobre a caracterização de flavonoides e ácidos fenólicos em *Myrcia bella* Cambess, pertencente à família das Myrtaceae mostraram a presença do ácido caféico assim como no estudo feito por Herculano et al., (2014) em extrato Hidroalcoólico de frutos de *S. cumini* apresentaram resultados de fragmentações com íon precursor de m/z 179 e fragmento m/z 135 referente à perda 44u correspondendo a molécula de CO_2 e absorção de luz UV na região de 206 e 282 nm idênticos aos encontrados neste trabalho.

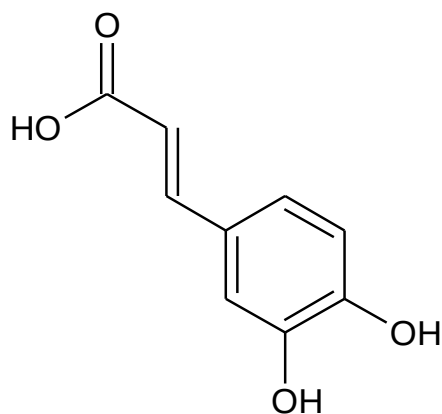


Figura 23 - Estrutura do Ácido caféico

A substância 4 foi proposta como sendo a metil miricetina glicosídica (figura 54) devido à presença de íon precursor $[M - H]^-$ m/z 493 e com fragmentos de íons m/z 481 correspondendo à perda de um radical metila e outra fragmentação $[M - H - 162]^-$ m/z 331 característico da perda de 162 u massa essa correspondente à quebra da ligação do grupo glicosil com a aglicona. Gordon et al., (2011) em extrato de frutos de *S. cumini* propôs a presença desta substância com fragmentações iguais aos obtidos neste trabalho.

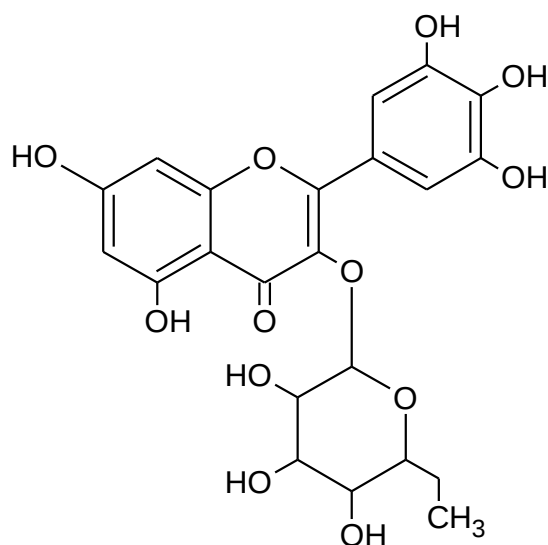


Figura 24 - Estrutura da metil miricetina glicosídico

A Substância 5 foi sugerida como sendo o ácido *trans*-cinâmico (figura 55), pois o íon precursor foi de m/z 147 e absorção luz UV na região de 273nm (Kıvrak et al., 2013).

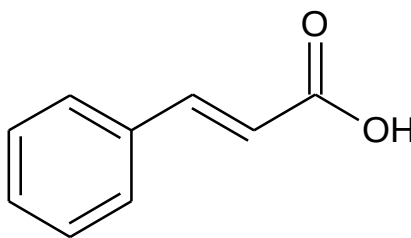


Figura 25 - Estrutura do ácido *trans*-cinâmico

O metil galato (figura 56) foi proposto como sendo a substância 6, o qual apresentou íon precursor $[M - H]^-$ m/z 183 e fragmentos com $[M - H - 15]^-$ m/z 169 referente à perda de um radical metila e $[M - H - 15 - 44]^-$ m/z 125 característico da perda de (CO_2), assim com no estudo realizado por Santos et al., (2013) em que extratos etanólicos obtidos de madeiras de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urograndis* e *Eucalyptus maidenii* pertencentes à família Myrtaceae apresentaram esta substância.

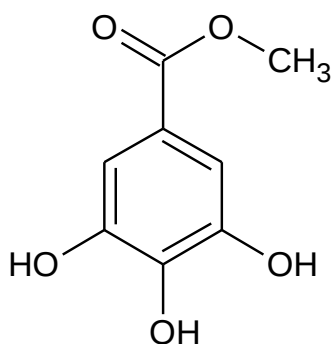


Figura 26 - Estrutura do metil galato

A substância 7 foi proposta como sendo o ácido gálico (figura 57) com íon precursor $[M - H]^-$ m/z 169 e fragmento $[M - H - CO_2]^-$ m/z 125 em decorrência da perda CO_2 , resultado semelhante ao encontrado no estudo de Herculano et al., (2014) em extrato hidroalcoólico de frutos de *S. cumini*.

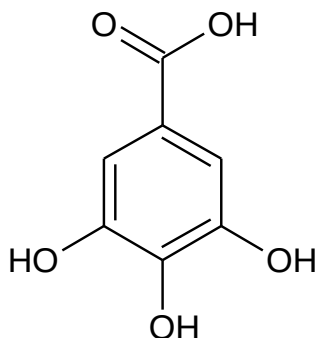


Figura 27 - Estrutura do ácido gálico

A substância 8 foi sugerida como sendo o metóxi metil galato (figura 58) com pico base de $[M - H]^-$ m/z 197, com fragmentações $[M - H-30]^-$ m/z 169 referente à $(2CH_3)$ e $[M - H-30-44]^-$ de m/z 125 característico da perda de CO_2 , corroborando com resultados obtidos por Nuengchamnong e Ingkaninan (2009) com vinho de frutos de *S. cumini* comprados na cidade de Maehongson localizado no norte da Tailândia produzidos em 2004 e analisados em 2006.

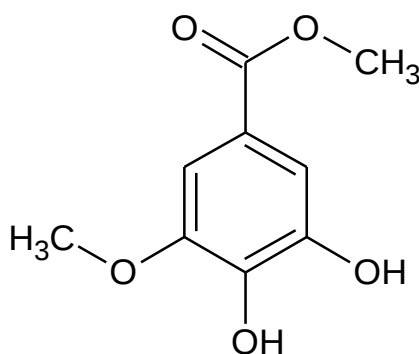


Figura 28 - Estrutura do metóxi metil galato

A substância 10 apresentou como pico base $[M - H]^-$ m/z 153 que sugere que seja o ácido protocatecuico (figura 69) e fragmento $[M - H-44]^-$ m/z 109, decorrente da perda de CO_2 resultado este igual ao obtido por Santos et al., (2013) em madeira de espécies de *Eucalyptus*.

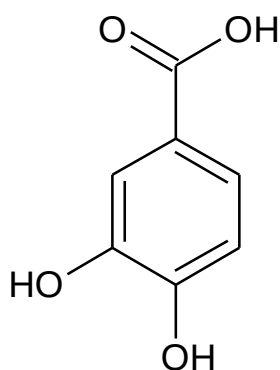


Figura 29 - Estrutura do ácido protocatecuico.

A substância 11 foi proposta como sendo um isômero da miricetina 3-O- (3"-acetil-rhaminosídico) (figura 60), com íon precursor $[M - H]^-$ m/z 507 e pico base m/z 505 e fragmento de $[M - H-188]^-$ m/z 317 característico da quebra do raminosídeo acilado da aglicona (Faria et al., 2011).

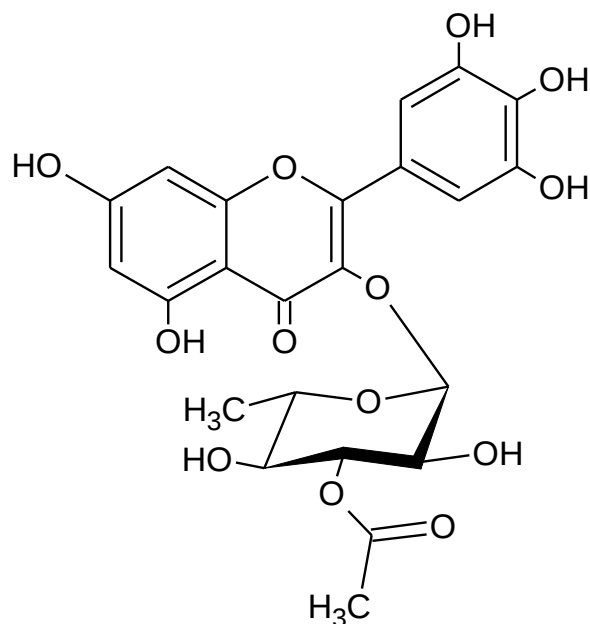


Figura 30 - Estrutura da miricetina 3-O- 3''- acetil-raminosídica

A substância 13 apresentou como íon precursor $[M - H]^-$ m/z 609 e fragmentações $[M - H-146]^-$ m/z 463 e $[M - H-146-146]^-$ m/z 317 característico da quebra de duas ligações de unidades raminosídicas de massa 146 com a miricetina $[M - H]^-$ m/z 317 sugerindo a presença da miricetina 3,4'-di-O- α -L-raminopiranosídico (figura 61) substância relatada no trabalho de Braca et al., (1999), o qual foi isolada do extrato metanólico de partes áreas da *Licania heteromorpha* var. *heteromorpha* coletada na cidade porto Ayacucho, Venezuela no mês de Julho de 1996.

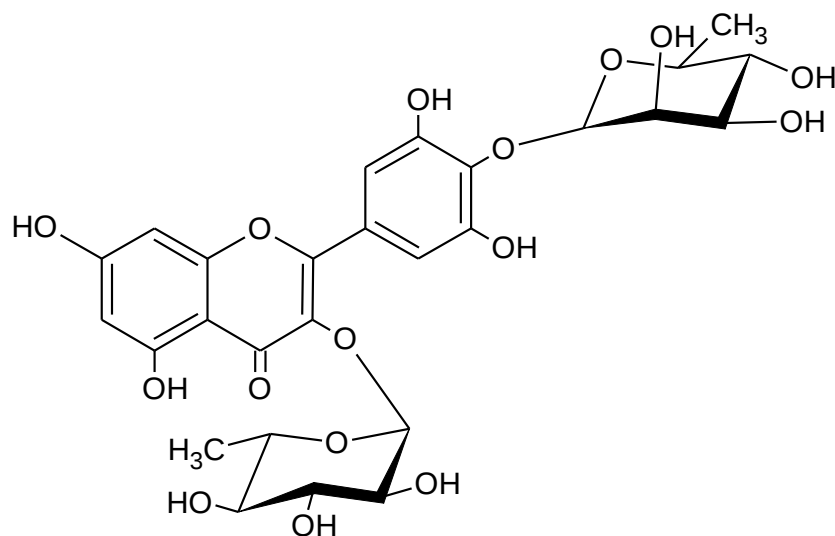


Figura 31 - Estrutura da miricetina 3,4'-di-O- α -L-raminopiranosídico

A substância 14 foi proposta como pertencendo à classe das auronas evidenciada no teste realizado de prospecção fitoquímica do item 5.2.2.1.2 deste trabalho, sendo sugerida como floridzina (figura 62) a qual apresentou pico base $[M - H]^-$ m/z 436 e $[M - H - 162]^-$ m/z 273 correspondendo à perda de uma unidade glicosídica ligada a aglicona. Liang et al., (2015) analisou a fração em acetato de etila de *Malus doumeri* e identificou esta substância através das técnicas de espectroscopia de massa de alta resolução por ionização de electropulverização e ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

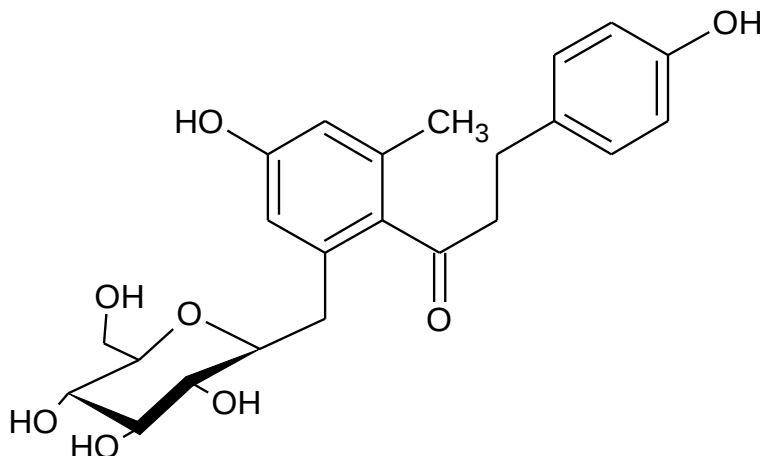


Figura 32 - Estrutura da Floridzina

A substância 15 foi proposta como sendo a Miricetina 3-O-2''-acetil-raminosídica (figura 63) com pico base $[M - H]^-$ m/z 505 e fragmento m/z 317 $[M - H - 188]^-$ que corresponde à quebra da ligação da unidade raminosídica acetilada (146 + 42 u) ligada a aglicona. Faria et al., (2011) analisou extrato de frutos de *S. cumini* e identificou esta substância na sua composição.

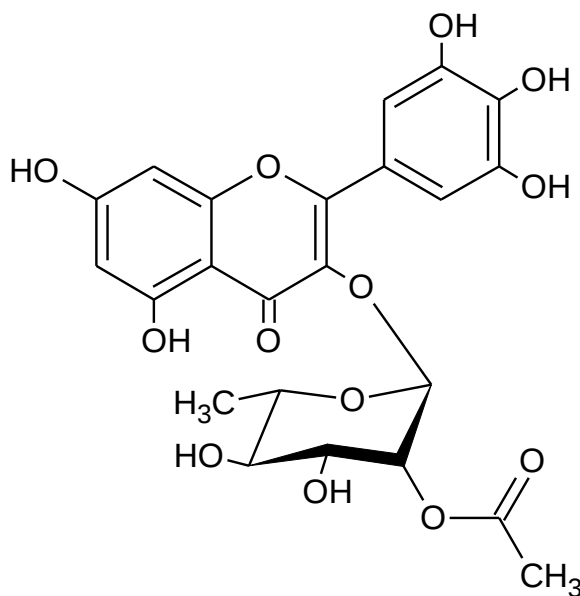


Figura 33 - Estrutura da miricetina 3-O- 2'' - acetil- raminosídica

A substância 17 foi proposta como sendo a miricetina (figura 64) apresentando pico base $[M - H]^-$ m/z 317 resultado igualmente encontrado no trabalho de Faria et al., (2011) em extrato metanólico de frutos de *S. cumini*.

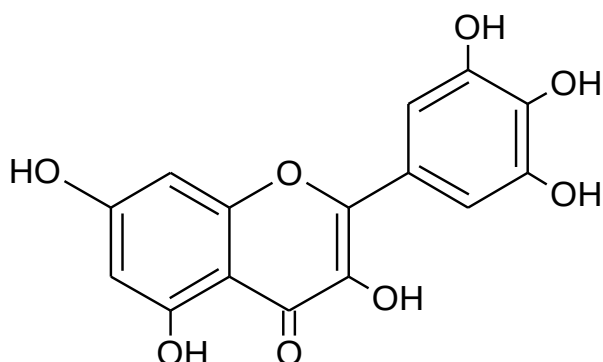


Figura 34 - Estrutura da miricetina

As substâncias 18, 22 e 23 foram sugeridas com sendo os isômeros da substância miricetina 3-O-2''-acetil-raminosídica (figura 63), pois possuem tempos de retenção diferentes e fragmentações iguais, a diferença é na abundância relativa dos picos e na absorção da luz UV em regiões próximas. Para identificação destes isômeros é necessário ser feita uma corrida cromatográfica CLAE/DAD-EM comparando os dados individuais dos tempos de retenção dos seus padrões e os comprimentos de onda máximos de UV (Greco e Bruno, 2008). Em geral, CLAE-DAD-APCI / EM não tem a capacidade para identificar alguns isômeros, tais como as flavonas metoxiladas e as suas funções metoxilo nas posições diferentes no anel A ou B além dos sacarídios isoméricos dos flavonoides. Normalmente é necessário para identificar o ponto de ligação, padrões autênticos ou RMN. Assim as substâncias 15, 18, 22 e 23 já foram identificadas na literatura. No trabalho realizado por Timbola et al., (2002) com folhas de *S. cumini* coletadas na cidade de Florianópolis no estado de Santa Catarina o isômero miricetina 3-O-4''-acetil-raminosídica (figura 65) foi identificado. No trabalho realizado por Agnihotri et al., (2008) com flores de *Nymphaea caerulea* foi identificado na fração acetato de etila o isômero miricetina 3-O-3''-acetil-raminosídica (figura 66). O cromatograma dos isômeros derivados da miricetina 3-O-2''-acetil-raminosídica (figura 67) evidencia tempos de retenção diferentes nos espectros de massas das substâncias 15, 18, 22 e 23 (figura 68) e os espectros de comprimentos de ondas UV destas substâncias estão representados na figura 69.

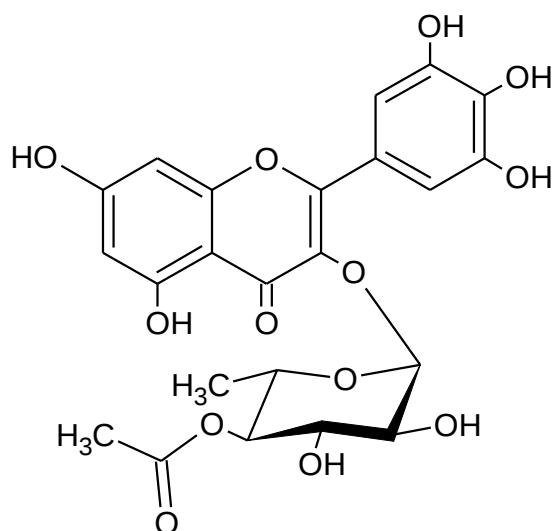


Figura 35 - Estrutura da miricetina 3-O- 4''- acetil-raminosídica

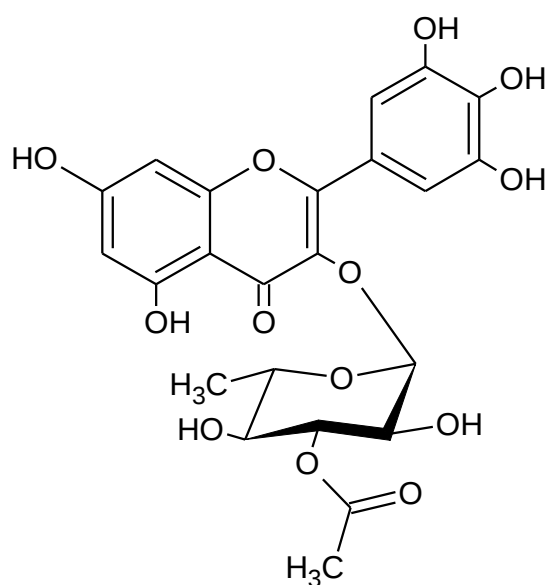


Figura 36 - Estrutura da miricetina 3-O- 3''- acetil-raminosídica

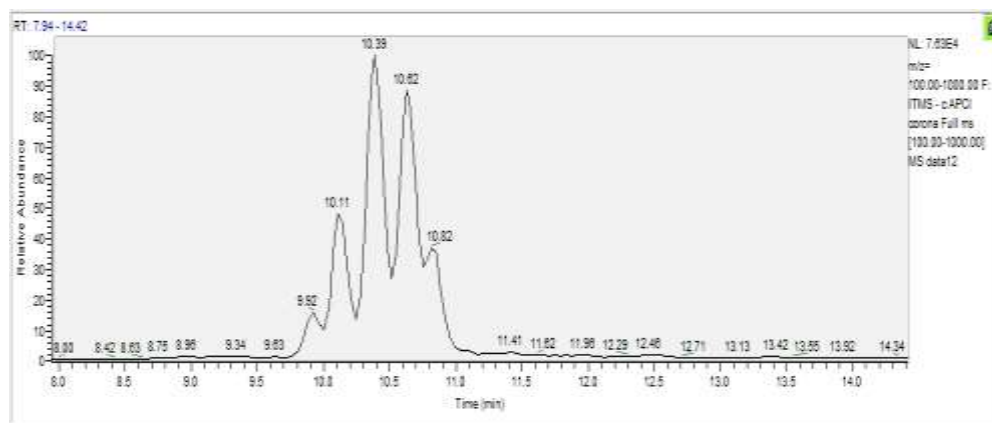


Figura 37 - Cromatograma dos isômeros da miricetina 3-O- 2''- acetil-raminosídica

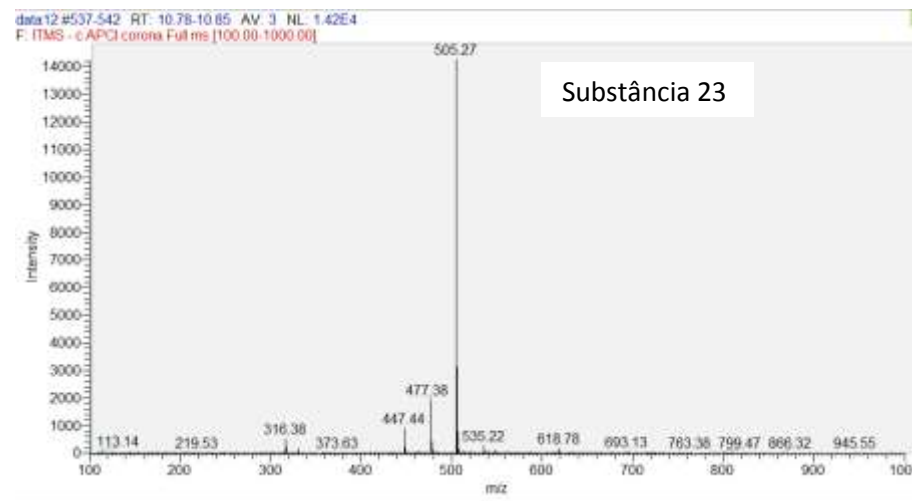
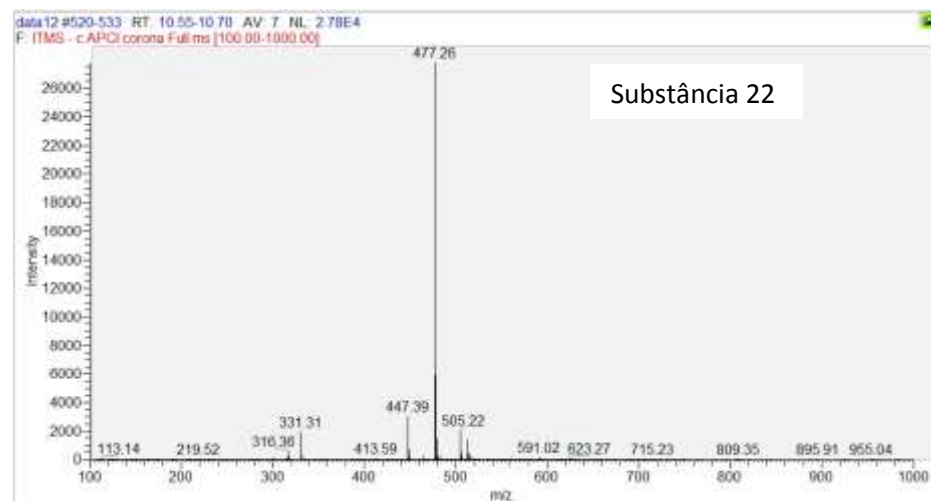
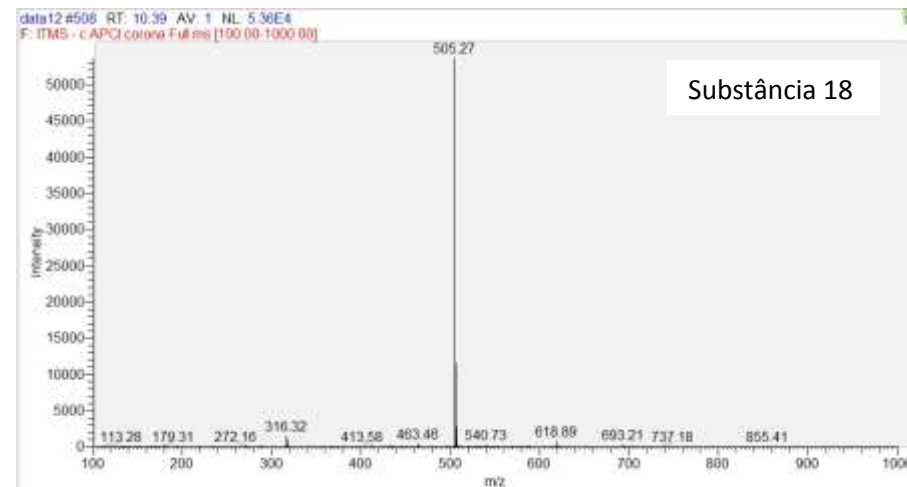
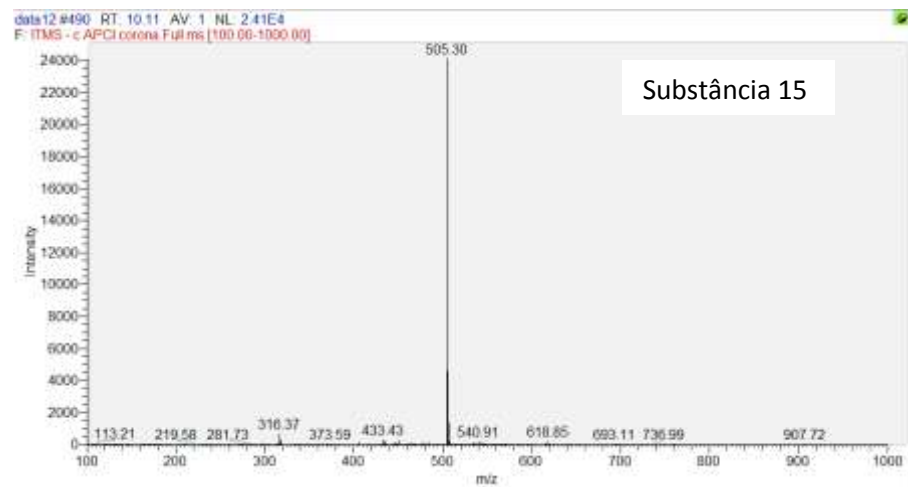


Figura 38 - Espectros de massas dos isômeros da miricetina 3-O- 2''- acetil-raminosídica

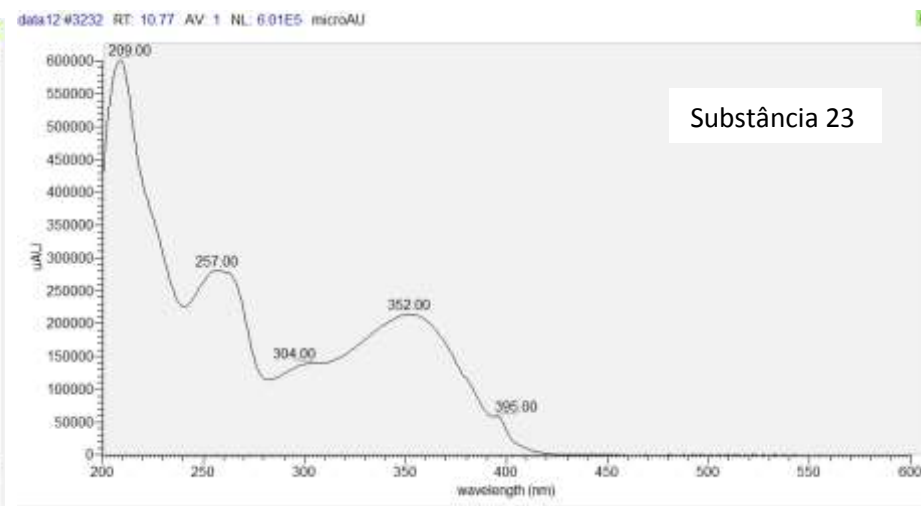
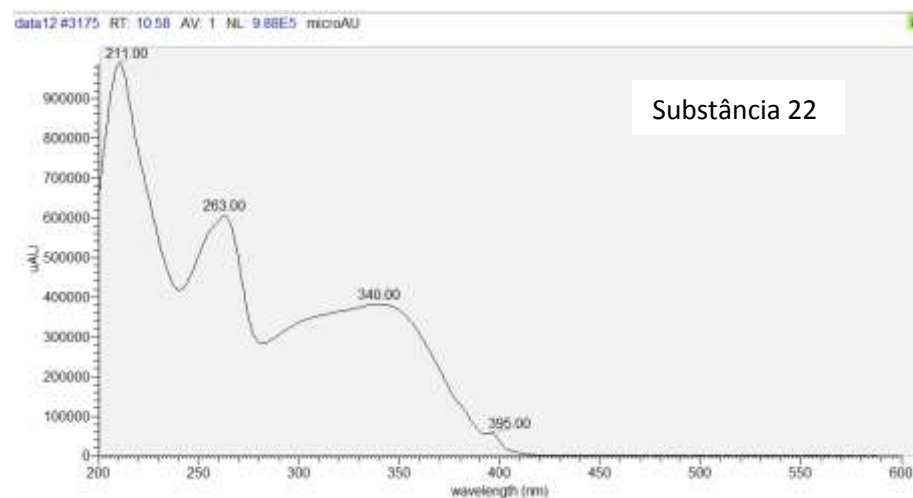
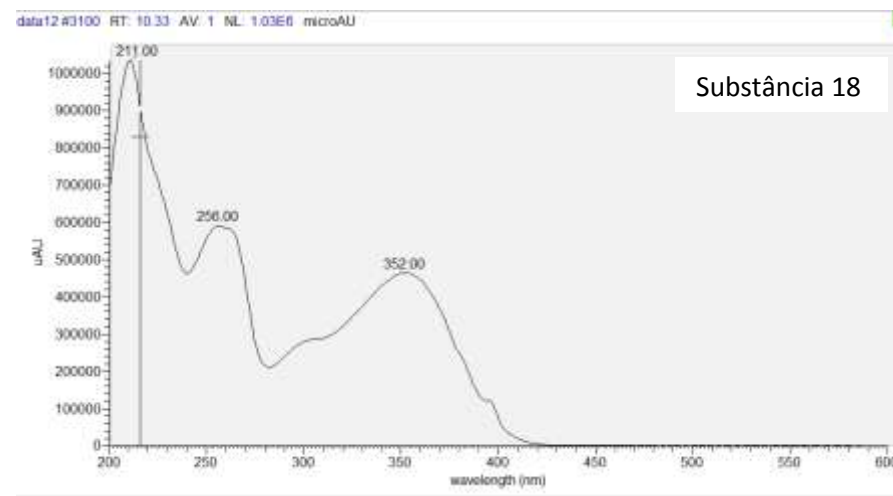
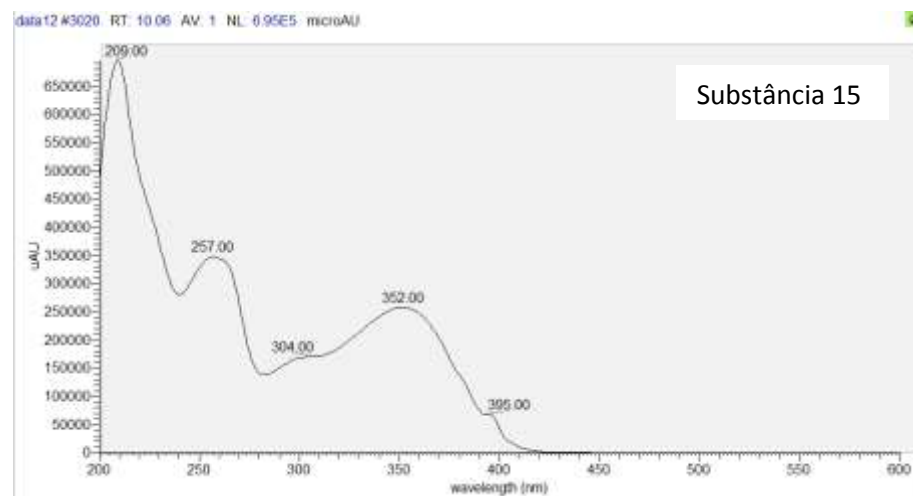


Figura 39 - Espectros em comprimentos de onda UV dos isômeros da miricetina 3-O- 2'' - acetil-raminosídica

A substância 24 foi proposta com sendo a mearnsetin 3-O-(4''-O-acetil)- α -L-¹C₄-raminopiranosídica (figura 70), apresentando pico base [M - H]⁻ *m/z* 519 e fragmentos [M - H-188]⁻ *m/z* 331 correspondendo à quebra da ligação do grupo raminosil acilado com a aglicona e [M - H-188 - 15]⁻ *m/z* 316 referente à quebra do grupo metila no anel B do aromático ligado ao carbono oxigenado na posição 4' da miricetina de acordo com o espectro de massa (figura 71) confirmado pelo espectro UV (figura 72), corroborando com o resultado evidenciado no trabalho realizado por Mahmoud et al., (2001) na identificação de flavonol glicosídico acilado em extrato de folhas de *S. cumini* identificado por CLAE-DAD-ESI-EM e RMN ¹H e ¹³C .

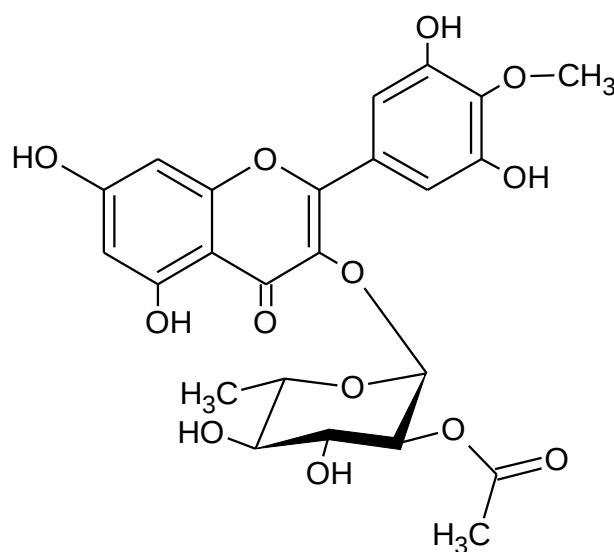


Figura 70 - Estrutura da mearnsetin 3-O-(4''-O-acetil)- α -L-¹C₄-raminopiranosídica (substância 24).

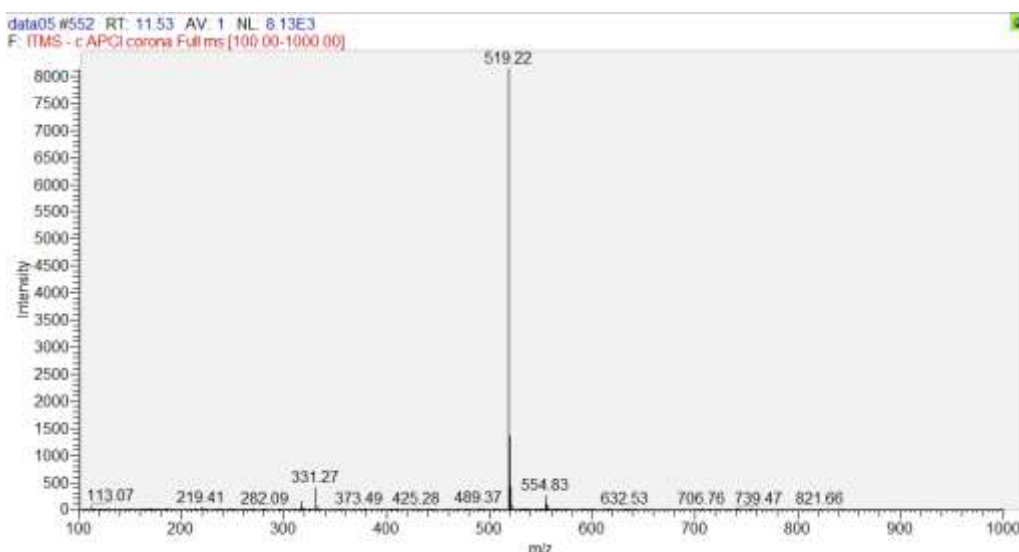


Figura 71 - Espectro de massas da mearnsetin 3-O-(4''-O-acetil)- α -L-¹C₄-raminopiranosídica (substância 24).

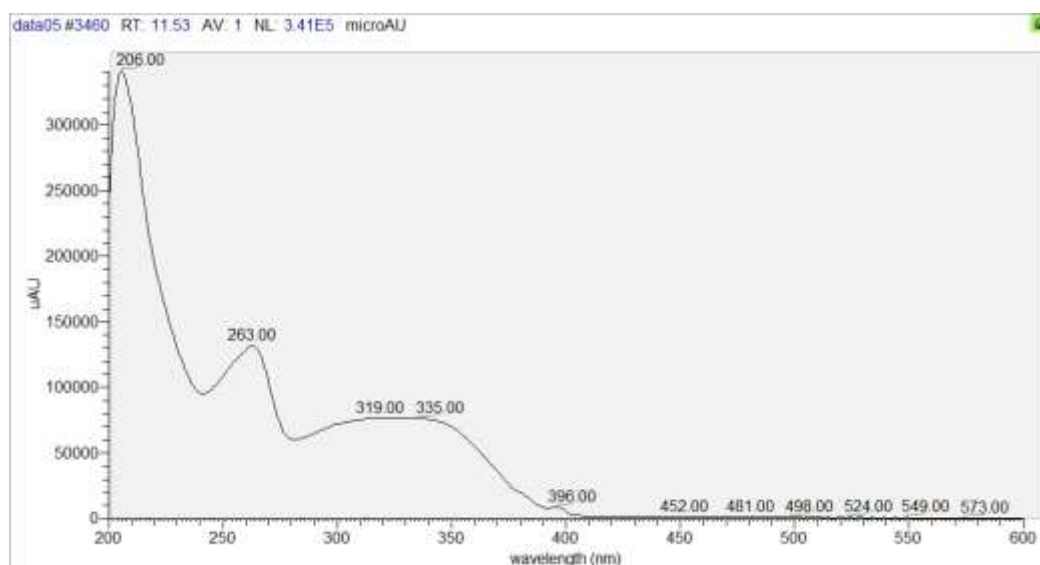


Figura 72 - Espectro de UV da mearnsetin 3-O-(4''-O-acetil)- α -L-¹C₄-raminopiranosidica (substância 24).

O espectro de massas da substância 25 apresentou pico base $[M - H]^-$ m/z 331 característico do galoil glicosídico (figura 73) e fragmentação $[M - H-162]^-$ m/z 168 referente à quebra da ligação da glicose com a aglicona. Nuengchamnong e Ingkaninan (2009) analisou vinhos produzidos de frutos de *S. cumini* e identificou por CLAE-EM galoil glicosídico, também sendo identificado por Faria et al., (2009) o qual determinou a identificação de compostos bioativos de *S. cumini* e a avaliação da capacidade antioxidante de frutos maduros em diferentes condições de pH os quais foram colhidos em 2008, obtidos diretamente de produtores da região de Pelotas, Rio Grande do Sul.

As substâncias 26 e 27 são sugeridas com sendo o hiperosídeo (figura 74) e a isoquercetrina (figura 75), substâncias isoméricas (Andersen e Markham, 2006). Elas apresentaram o mesmo íon precursor $[M - H]^-$ m/z 463 e fragmentações $[M - H-162]^-$ m/z 301 (figura 76) correspondendo à quebra da ligação da glicose com a aglicona e outra fragmentação com m/z 331. Estes isômeros podem ser identificados pelos tempos de retenção e a intensidade das abundancias relativas (Figura 77) diferentes, pois para identificação exata destas substâncias deve-se fazer uma corrida em CLAE-DAD-EM com seus respectivos padrões e uma posterior análise de RMN segundo Greco e Bruno (2008).

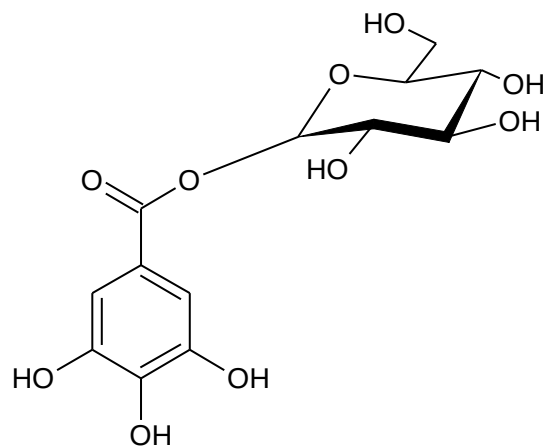


Figura 73 - Estrutura do galoil glicosídico

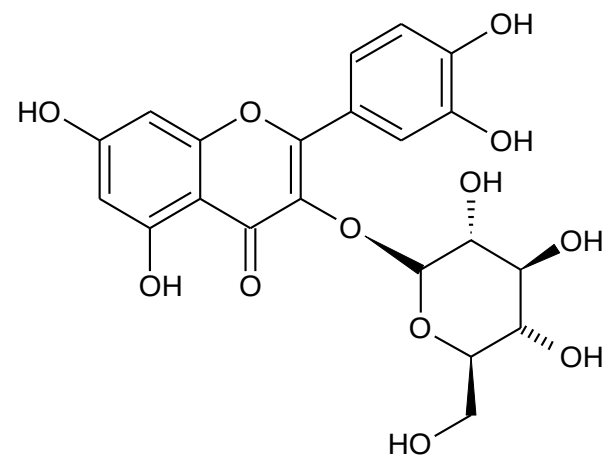


Figura 74 - Estrutura da isoquercetrina

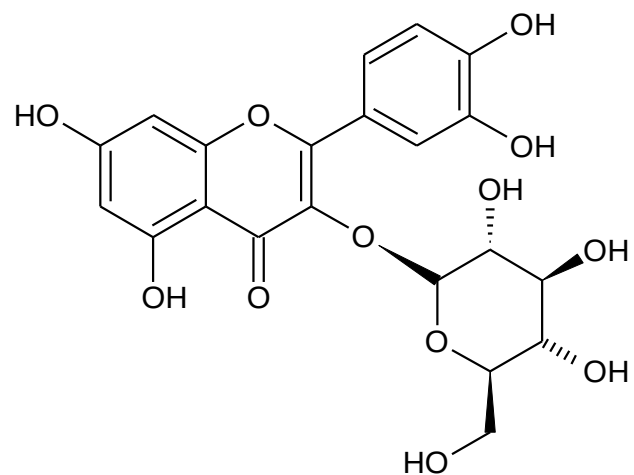


Figura 75 - Estrutura do hiperosídeo

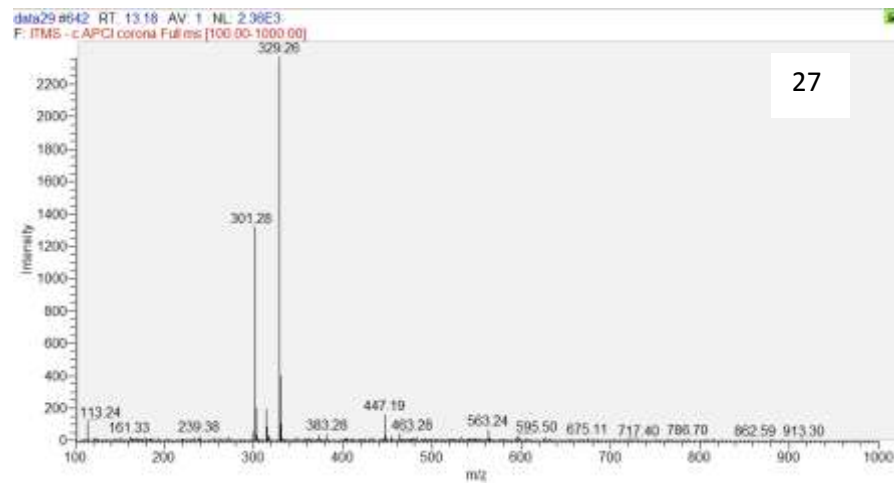
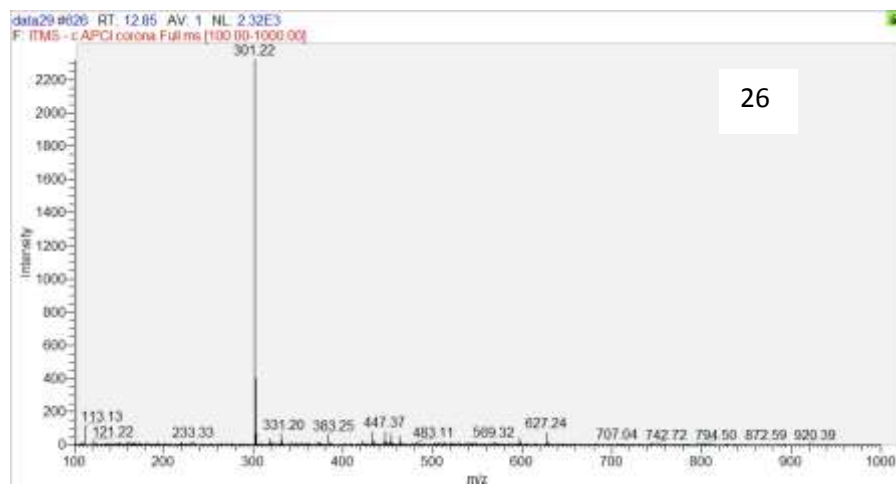


Figura 76 - Espectros de massas da hiperosídeo (26) e da isoquercetrina (27)

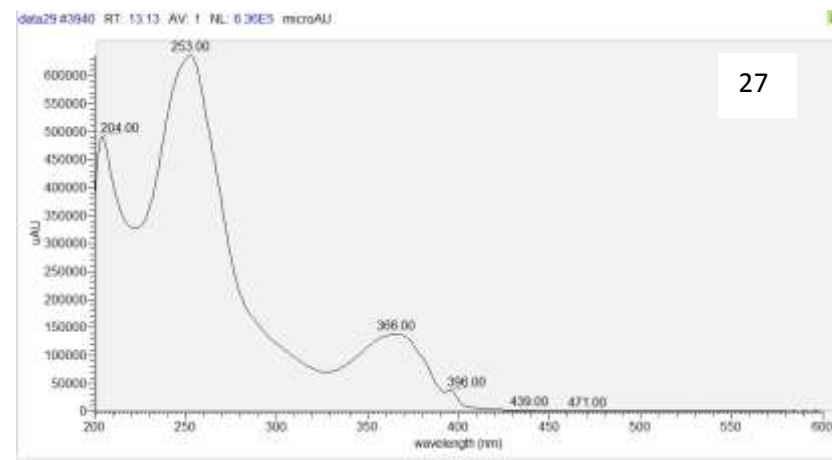
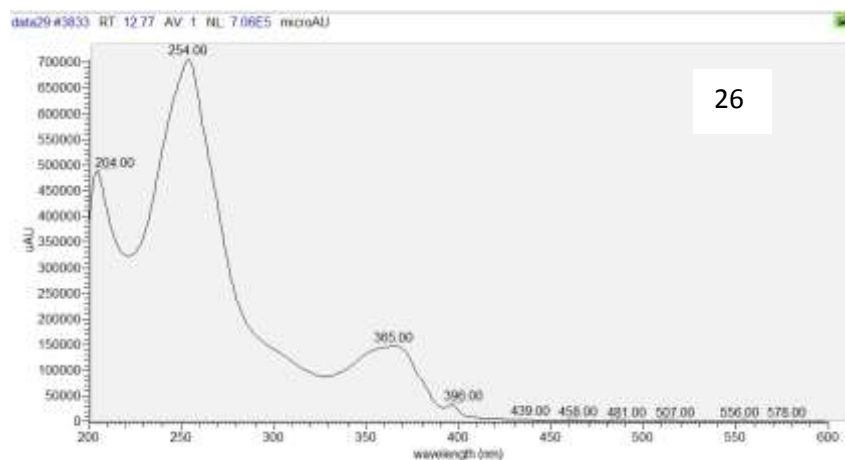


Figura 77 - Espectros UV do hiperosídeo (26) e da isoquercetrina (27)

6. CONCLUSÃO

Verificou-se que o período de coleta das folhas frescas e secas de *S. cumini* influencia no rendimento do óleo essencial, ocorrendo um aumento do rendimento principalmente no período de inflorescência e produção de frutos.

Os fatores de sazonalidade tais como temperatura e volume de precipitação afetam o rendimento de óleo essencial das folhas frescas de *S. cumini*. Em períodos de maiores temperaturas e baixo volume de precipitação ocorreu um aumento no rendimento do óleo essencial.

A composição química do óleo essencial de folhas frescas e secas de *S. cumini* sofre variações nos valores de % em área das substâncias majoritárias dependendo da época em que forem coletadas, sendo o α -pineno a substância majoritária em quase todos os períodos analisados e os valores de % em área de α -pineno em folhas secas foi maior em comparação às folhas frescas.

O óleo essencial de *S. cumini* apresentou baixa atividade antioxidante inibindo 39,43 % do radical DPPH.

O extrato bruto (FAZ) apresentou atividade antioxidante e o CI_{50} foi de $9,87 \pm 0,18$ $\mu\text{g/mL}$ frente ao radical DPPH. As frações FHAZ, FCAZ, FAAZ, FBAZ e FHAAZ apresentaram atividade antioxidante e o valor de CI_{50} da fração FAAZ (mais ativa) foi de $9,40 \pm 0,40$ $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados obtidos na análise de prospecção fitoquímica associado à análise de CLAE/EM da fração FAAZ possibilitou detectar a presença de 36 substâncias das quais 19 foram propostas as suas identificações, ácido caféico (3), metil miricetina glicosídica (4), ácido *trans*-Cinâmico (5), metil galato (6), ácido gálico (7), metóxi metil galato (8), ácido protocatecuico (10), isômero da miricetina 3-O-3"-acetil-raminosídico (11), miricetina 3,4'-di-O- α -L-raminopiranosídico (13), floridzina (14), miricetina 3-O-2''-acetil-raminosídico (15), miricetina (17), miricetina 3-O-3''-acetil-raminosídico, miricetina 3-O-4''-acetil-raminosídico (18), isômero miricetina acetil-raminosídico (23), mearnsetin 3-O-4''-O-acetil)- α -L- 1C_4 -raminopiranosídico (24), galoil-glicosídico ester (25), hiperosídeo (26), isoquercetrina (27). É necessário análise de RMN de ^1H e ^{13}C em 1D e 2D para confirmação dos resultados obtidos.

As substâncias propostas, ácido caféico, ácido *trans*-cinâmico, ácido protocatecuico, miricetina 3,4'-di-O- α -L-raminopiranosídico, floridzina, galoil-

glicosídico ester e hiperosídeo estão sendo propostas pela primeira vez em extrato de folhas *S. cumini*.

As substâncias encontradas demonstraram, através do teste qualitativo possuir atividade antioxidante frente ao radical DPPH.

7. REFERÊNCIAS:

- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography / quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation. (2007).
- ADIGUZEL, A.; OZER, H.; SOKMEN, M.; GULLUCE, M.; SOKMEN, A.; KILIC, H.; SAHIN, F.; BARIS, O. Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extract of *Nepeta cataria*. **Pol. J. Microbiol.** v. 58(1), p. 69-76, (2009).
- AGNIHOTRI, V. K.; ELSOHLY, H. N.; KHAN, S. I.; SMILLIE, T. J.; KHAN, I. A., WALKER, L. A.; Antioxidant constituents of *Nymphaea caerulea* flowers; **Phytochemistry**. v. 69, 2061–2066, (2008).
- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **HerbalGram**. v. 28: p. 13-19 (1993).
- AMAROWICZ, R., PEGG, R.B. P., RAHIMI-MOGHADDAM, BARL, B., WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chem.** v 84, p. 551–562, (2004).
- ANDERSEN, M. Ø.; MARKHAM, K. R.; Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications; CRC Press Taylor & Francis, (2006).
- ANDRADE, F.M.C.; CASALI, V.W.D. *Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia, (1999).
- ARDREY, R.E. *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, Inc., New York, (2003).
- AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.**, p. 240-246, (2012).
- BAMPOULI, A.; KYRIAKOPOULOU, K.; PAPAEFSTATHIOU, G.; LOULI, V.; KROKIDA, M.; MAGOULAS, K. Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**. v.1, p. 81–91, (2014).
- BANERJEE A, DASGUPTA N and DE B, *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chem.**, v. 90, p.727–733, (2005).

BARREIROS, A. L. B. S.; E JORGE M. DAVID, J. M.; DAVID, J.P. estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, No. 1, p. 113-123, (2006).

BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O.; HEINZMANN, B.M. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Quím. Nova**, Vol. 32, No. 4, 861-867, (2009).

BARTOLOME, A., MANDAPA, K., DAVID, K.J., SEVILLA, I.I.I. and VILLANUEVA, J. SOS-red fluorescent protein (RFP) bioassay system for monitoring of antigenotoxic activity in plant extracts. **Biosens. Bioelectron.** v. 21, p. 2114–2120, (2006).

BENHERLAL, P.S., Arumugan, C., Chemical composition and *in vitro* antioxidant studies on *Syzygium cumini* fruit. **J. Sci. Food Agric.** v. 87, p. 2560–2569 (2007).

BERTHOD, A. Counter-current Chromatography—The Support-free Liquid Stationary Phase (Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. 38), Elsevier, Amsterdam, (2002).

BERTHOD, A.; HASSOUN, M.; RUIZ-ANGEL, M.J. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography **Anal. Bioanal. Chem.** v.383, p. 327, (2005).

BHARGAVA, K.K.; DAYA, L. R.; SESHADRI, T.R.; Chemical components of *Eugenia jambolana* stem bark. **Curr Sci.** 43: 645-646, (1974).

BIANCHI, M. de L. P. & ANTUNES, L. M. G., Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, May/Aug. v. 12, n.2, p.123-130. (1999).

BISHOP, C.D., Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betcher) Cheell (tea tree) against tobacco mosaic virus. **J. Essent. Oil Res.** v.7, p. 641– 644, (1995).

BIZZO, H.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo. v. 32, n. 3, p. 588-594, (2009).

BORGES, A.M.; PEREIRA, J.; CARDOSO, M.G.; ALVES, J.A.; LUCENA, E.M.P. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano

(*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.14, n.4, p.656-665, (2012).

BRACA, A.; TOMMASI, N.; MENDEZ, J.; MORELLI, I.; PIZZA, C.; Three flavonoids from *Licania heteromorfa*.; **Phytochemistry**. v. 51, 1121-1124, (1999).

BRAGA, F.G., BOUZADA, M.L.M., FABRI, R.L., MATOS, M.O., MOREIRA, F.O., SCIO, E. and COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J. Ethnopharmacol.** v. 111, p. 396–402, (2007).

BRANDÃO, MARIA G.L.; PIGNAL, MARC.; ROMANIUC, SERGIO.; GRAEL, CRISTIANE F. F.; FAGG, CHRISTOPHER W. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779–1853). **J. Ethnopharmacol.** v. 143, p. 488–500, (2012).

BRASILEIRO B.G., PIZZIOLO V.R., MATOS D.S., GERMANO A.M., JAMAL C.M. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. **Rev. Bras. Cien. Farmac.** v.44, p. 629-636, (2008).

BRAZ-FILHO, R.; Química de produtos naturais: Importância, Interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas; A peregrinação de um Pacatubano. **Quím. Nova**, v.17, p. 405, (1994).

BRITO, F.A., LIMA, L.A., RAMOS, M.F.S., NAKAMURA, M.J., CAVALHER-MACHADO, S.C., SIANI, A.C., HENRIQUES, M.G.M.O. and SAMPAIO, A.L.F. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 40, p. 105–115, (2007).

BRUNETON, J. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants: Essential Oils*. New York, Lavoisier Publishing, 1119 p., (1999).

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **Int. J. Food Microbiol.** v. 94: p. 223– 253, (2004).

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 33, p. 179-189, (2000).

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DELLACASSA E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Ind. Crops Prod.** 29: p. 171–6, (2009).

CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **J. Food Drug Anal.**, v. 10 (3), p. 178-18, (2002).

CHATTERJEE, K.; ALI, K. M.; DE, D.; PANDA, D. K.; GHOSH, D. 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 Antioxid.** v. 2 / Issue 1 / Jan-Mar, (2012).

COITINHO, C.B.L.R.; OLIVEIRA, V.O.; GONDIM, J.C.G.M.; CÂMARA, G.A.C. Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. **Caatinga**, v.19, p. 176-182, (2006).

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. Bioactive natural products : detection, isolation, and structural determination.. – 2^a ed. 269 pag. (2007).

CONWAY W.D. *Countercurrent chromatography: Apparatus, theory and applications*. New York: VCH Publishers Inc., J. Wiley & Sons. (1990).

COSTA, F. N.; G. G. LEITÃO, G. G. Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. **J. Sep. Sci.** v. 33, p. 336–347, (2010).

CRAVEIRO, A.A.; ANDRADE, C. H.S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M.I.L. Essential oil of *Eugenia jambolana*. **J. Nat. Prod.** v. 46, No. 4. p. 591-592, (1982).

DEWICK, P. M. Medicinal natural products : a biosynthetic approach. – 2nd ed.(2002)

DI STASI, L. C., HIRUMA-LIMA, C. A., Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica; 2. ed. rev. e ampl. - São Paulo: Editora UNESP, (2002).

DIAS, C. N.; RODRIGUES, K. A. F.; CARVALHO, F. A.A.; CARNEIRO, S. M. P.; MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E.H.A.; MORAES, D. F. C. Molluscicidal and Leishmanicidal Activity of the Leaf Essential Oil of *Syzygium cumini* (L.) Skeels from Brazil. **Chem. Biodiversity** – v. 10, p. 1133 -1141, (2013).

- DJOUAHRI, A.; SAKA BOUALEM, S.; LYNDIA BOUDARENE, L.; AOUMEUR BAALIOUAMER, A. Geographic's variation impact on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils from wood and leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. **Ind. Crops Prod.** v. 63, p.138–146, (2015).
- DUKE, J. A., GODWIN, J. B., DUCCELLIER, J., DUKE, P.A.K., Handbook of medicinal herbs, CRC PRESS Boca Raton London New York Washington, D.C. 2nd ed. p.422, (2002).
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytother. Res.**, v. 21, n. 4, p. 308-323, Apr. (2007).
- FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z.; Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions; **Food Chem.** v. 126, 1571–1578, (2011).
- FILHO, V. C., YUNES, R. A., Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade, **Quím. Nova**, v. 21, p. 99-105, (1998).
- FOUCAULT, A. P., *Centrifugal Partition Chromatography*, Chromatographic Science Series, Marcel Dekker, NY. (1994).
- GARRARD, J. I. J. Simple Approach to the Development of a CCC Solvent Selection Protocol Suitable for Automation. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** v.28, p. 1923, (2005).
- GORDON, A.; JUNGFER, E.; SILVA, B.A.; MAIA, J. G. S.; FRIEDHELM MARX, F.; Phenolic Constituents and Antioxidant Capacity of Four Underutilized Fruits from the Amazon Region; **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, 7688–7699, (2011).
- GRECO, L.V.; BRUNO, M.N.; *Food science and technology: new research*. Nova Science Publishers, Inc. (2008).
- GUPTA, G.S., SHARMA D.P., Triterpenoid and other constituents of *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**; v. 13, 2013-2014, (1974).
- GURIB-FAKIM, A.; Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, **Mol. Aspects Med.**, v. 27, 1–93, (2006).

GUIMARÃES, A.C. **Estudo químico e biológico de *Cladoclea micrantha* (Loranthaceae), uma planta medicinal da região Amazônica.** Tese de Doutorado em Ciências. Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, p. 305, (2005).

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K.; Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**. v. 30, p. 3864, (1991).

HENRIQUES, J. A. P.; DAFRÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI L. A., DE BARROS N. M., AZEVEDO J. L. (Eds.), Biotecnologia na agricultura e na indústria. **Guaíba: Agropecuária**, v 1: p. 227-256. (2001).

HERCULANO, E. A.; COSTA, C. D. F.; RODRIGUES, A. K. B. F.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; SANTANA, A. E. G.; FRANÇA, P. H. B.; GOMES, E. A.; SALVADOR, M. J.; MOURA, F. B. P.; RIBEIRO, E. A. N.; Evaluation of Cardiovascular Effects of Edible Fruits of *Syzygium cumini* Myrtaceae (L) Skeels in Rats; **Trop. J. Pharm. Res.**, v. 13(11): 1853 November; (2014).

HOFFMANN, E., STROOBANT, V., Mass spectrometry : principles and applications. – 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd, (2007).

HOSTETTMANN, K., WOLFENDER, J-L., TERREAUX, C., Modern screening techniques for plant extracts. **Pharm. Biol.** v. 39, p. 18–32 (2001).

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Countercurrent chromatography in the preparative separation of plant-derived natural products. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** v. 24: p. 1711-1721, (2001).

ITO, Y., AOKI, I., KIMURA, E., NUNOGAKI, K., NUNOGAKI, Y., Micro liquid-liquid partition techniques with the coil planet centrifuge. **Anal. Chem.** v. 41, p. 1579–1584, (1969).

JAGETIA, G.C. and BALIGA, M.S. Treatment of mice with leaf extract of jamun (*Syzygium cumini* linn. skeels) protects against the radiationinduced damage in the intestinal mucosa of mice exposed to different doses of γ -radiation. **Pharmacologyonline** v. 1, p. 169-195, (2008).

JUGLAL, S., GOVINDEN, R., ODHAV, B. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. **J. Food Prot.** v. 65 (4), p. 683–687, (2002).

KANERIA, M., BARAVALIA, Y., VAGHASIYA, Y. and CHANDA, S. Determination of antibacterial and antioxidant potential of some medicinal plants from Saurashtra region India. **Indian J. Pharm. Sci.** v. 71, p. 406–412. (2009).

KANERIA, M; CHANDA, S. Evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of *syzygium cumini* l. Leaves extracted sequentially in different solvents. **J. Food Biochem.**, v.37, p. 168–176. (2013).

KHARE, C. P. **Indian Medicinal Plants**, An Illustrated Dictionary. Springer Science + Business Media, LLC. p. 638, (2007).

KIVRAK, I.; KIVRAK, S.; HARMANDAR, M.; CETINTAS, Y.; Phenolic Compounds of *Pinus brutia* Ten.: Chemical Investigation and Quantitative Analysis Using an Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry with Electrospray Ionization Source. **Rec. Nat. Prod.** 7:4, 313-319, (2013).

KRISHNARAJU, A.V., RAO, T.V.N., SUNDARARAJU, D., VANISREE, M., TSAY, H.S. and SUBBARAJU, G.V. Biological screening of medicinal plants collected from Eastern Ghats of India using *Artemia salina* (brine shrimp test). **Int. J. Appl. Sci. Eng.** v. 4, p.115–125, (2006).

KUMAR, A., ILAVARASAN, R., JAYACHANDRAN, T., DEECARAMAN, M., ARAVINDAN, P., PADMANABHAN, N. and KRISHAN, M.R.V. Anti-diabetic activity of *Syzygium cumini* and its isolated compound against streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Med. Plant Res.** v. 2, p. 246–249, (2008a).

KUMAR, A., ILAVARASAN, R., JAYACHANDRAN, T., DEECARAMAN, M., KUMAR, R.M., ARAVINDAN, P., PADMANABHAN, N. and KRISHAN, M.R.V. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* seed. **Afr. J. Biotechnol.** v. 7, p. 941–943, (2008b).

KUMAR, A., PADMANABHAN, N. and KRISHNAN, M.R.V. Central nervous system activity of *Syzygium cumini* seed. **Pak. J. Nutr.** v. 6, p. 698–700, (2007).

LAHLOU, M. Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. **Phytother. Res.** v.18, 435–448 (2004).

LEWIS, Y.S.; DWARAKANATH, C.T.; JOHAR, D.S. Acids and sugars in *Eugenia jambolana*. **J. Sci. Ind. Res.** v.15C: p. 280-281, (1956).

- LIANG, X.; ZHANG, Y.; CHEN, W.; CAI, P.; ZHANG, S.; CHEN, X.; SHUYUN SHI, S.; High-speed counter-current chromatography coupled online to high performance liquid chromatography–diode array detector–mass spectrometry for purification, analysis and identification of target compounds from natural products; **J. Chromatogr. A**, 1385. 69–76, (2015).
- LIBERATO, M. C., Estudo taxonômico de plantas do jardim botânico tropical. dicotiledóneas dialipétalas de ovário ínfero. **Rev. de Ciências Agrárias**. v. 31, p. 256, (2008).
- LIMA, L.A., SIANI, A.C., BRITO, F.A., SAMPAIO, A.L.F., HENRIQUES, M.G.M.O. and RIEHL, C.A.S. Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae). **Quím. Nova**. v. 30, p. 860–864, (2007).
- MACHADO, B. F. M. T.; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cad. acad., Tubarao**, v. 3, n. 2, p. 105-127, (2011).
- MAHMOUD, I. I.; MARZOUK, M.S.A.; FATMA A. MOHARRAM, F. A.; EL-GINDI, M. R.; HASSAN, A. M.K. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**. v.58, p. 1239–1244, (2001).
- MAHMOUD, S.S., CROTEAU, R.B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends Plant Sci**. v.7 (8), p. 366– 373, (2002).
- MARI, M., BERTOLINI, P., PRATELLA, G.C. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. **J. Appl. Microbiol**. v. 94, p. 761– 766, (2003).
- MATOS, F.T. **Introdução à Fitoquímica Experimental** Fortaleza: UFC (2009).
- MCDONALD, S.; PRENZLER, D. P.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, K. Phenolic contend and antioxidante of olive extracts. **Food Chem**. v. 73, p. 73-84, (2001).
- MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; dos SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother. Res.**, v.15, p.127-130, (2001).
- MERKEN, H.M. and BEECHER, G.R., Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review, **J. Agric. Food Chem.**, 48, 577, (2000).

MEYER, V. R.; *Practical High-performance Liquid Chromatography*, 2nd edn. Wiley: New York, (2004).

MIGLIATO, K. F.; MELLO, J. C. P., A. R.; HIGA, O. Z.; RODAS, A. C. D.; CORRÊA, M. A.; MENDES-GIANNINI, M. J.S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; PIZZOLITTO, A. C.; SALGADO, H. R.N., Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Fruit Extract from *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 29 (5), p.725-30 (2010).

MOUREY, A., CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**. v.13, p. 289– 292, (2002).

NUENGCHAMNONG, N.; INGKANINAN, K.; On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from Family myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection.; **LWT - Food Sci. Technol.** v. 42, 297–302, (2009).

ORIO, L.; CRAVOTTO, G.; BINELLO, A.; PIGNATA, G.; NICOLA, S.; CHEMAT, F. Hydrodistillation and *in situ* microwavegenerated hydrodistillation of fresh and dried mint leaves: a comparison study. **J. Sci. Food Agric.** v. 92: p. 3085–3090, (2012).

PATEL, S.S., SHAH, R.S. and GOYAL, R.K. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of Dihar, a polyherbal ayurvedic formulation in streptozotocin induced diabetic rats. **Indian J. Exp. Biol.** v. 47, p. 564–570, (2009).

PAULI, G. I., PRO, S. M., FRIESEN, J. P., Countercurrent Separation of Natural Products, **J. Nat. Prod.** v. 71, p.1489–1508, (2008).

PESSOA, L.M., MORAIS, S.M., BEVILAQUA, C.M.L., LUCIANO, J.H.S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Vet. Parasitol.** v. 109 (1– 2), p. 59–63, (2002).

POLITEO, O.; BOTICA, I.; BILUSIC, T.; JUKIC, M.; CAREV, I.; BURCUL, F.; MILOS, M. Chemical composition and evaluation of acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oil from Dalmatian endemic species *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* (Vis.) Franco. **J. Med. Plants Res.** v. 5(30), p. 6590-6596, (2011).

PRIYA, S. S. L.; DEVI, P. R.; EGANATHAN, P.; KINGSLEY, J. *In vitro* antimicrobial activity of *Syzygium cumini* fruitpeel and identification of anthocyanins. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.** v. 7(25), p. 1719-1728, (2013).

- RAJASEKARAN, M., BAPNA, J.S., LAKSHMANAN, S., NAIR, A.G.R., VELIATH, A.J. and PANCHANADAM, M. Antifertility effect in male rats of oleanolic acid, a triterpene from *Eugenia jambolana* flowers. **J. Ethnopharmacol.** v. 24, p. 115–121, (1988).
- RAMIREZ, R.O. and RAO, C.C. Jr. The Gastroprotective effect of tannins extracted from duhat (*Syzygium cumini* Skeels) bark on HCl/ethanol induced gastric mucosal injury in Sprague-Dawley rats. **Clin. Hemorheol. Microcirc.** v. 29, p. 253–261, (2003).
- ROSS, I.A. “*Medicinal Plants of the World: Chemical constituents, Traditional and Modern Uses*”, Human Press, Totowa, p. 283-289, (1999).
- RUAN, Z.P., ZHANG, L.L. and LIN, Y.M. Evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaves. **Molecules**, v. 13, p. 2545–2556, (2008).
- SAEB, K. GHOLAMREZAEE, S. Variation of essential oil composition of *Melissa officinalis* L. leaves during different stages of plant growth. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.** p. 547-549, (2012).
- SAGRAWAT, H., MANN, A.S., KHARYA, M.D., pharmacological potential of *Eugenia jambolana*: A review. **Pharmacogn. Mag.** v. 2, 96-104, (2006).
- SAITO, M.L.; LUCCHINI, F. *Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente*. Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, 46 p. (1998).
- SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L.; Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSⁿ and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. **Molecules**. v. 18, pag. 8402-8416, (2013).
- SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A.H.A.; SHABIH, F. AND SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regul.** v.34: p. 3–21, (2001).
- SANTOS, S. A. O.; VILELA, C.; FREIRE, C. S. R.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D.; Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from *Eucalyptus* wood. **J. Chromatogr. B.** 938, 65–74, (2013).

SARKER, S. D., LATIF, Z., GRAY, A. I., Natural products isolation. – 2nd ed. p. cm. – (Methods in biotechnology; 20) (2006).

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, G.M. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v. 35, p. 275-280, (2004).

SENGUPTA, P.; DAS, P.B. Terpenoids and related compounds part IV triterpenoids the stem-bark of *Eugenia Jambolana* Lam. **J. Indian Chem. Soc.** v.42. p.255-258, (1965).

SHAFI, P. M., ROSAMMA, M. K., JAMIL, K., & REDDY, P. S. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. **Fitoterapia**, v. 73, p. 414–416, (2002).

SHAROPOV, F. S.; SULAIMONOVA, V.A.; SETZER, W. N. Essential oil composition of *Mentha longifolia* from wild populations growing in Tajikistan. **Journal of Medicinally Active Plants.** v. 1 (2), p. 6-5, (2012).

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. Review. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, (1993).

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, (1995).

SILVA, M. A., VILEGAS, W., SANTOS, L. C., Cromatografia em contra corrente, 1ª ed. Araraquara; Instituto de química, Universidade Estadual Paulista, 2008.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. et al. Farmacognosia: da Planta ao medicamento. 6. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p. 1104, (2007).

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.; *Practical HPLC Method Development*, 2nd edn. Wiley: New York, (1997).

SOARES, J.C.M. et al. Níveis glicêmicos de colesterol em ratos com *Diabetes Mellitus* aloxano induzido, tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium jambolanum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.113-118, (2000).

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E., *Myrtaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em, <http://reflora.jbrj.gov.br/downloads/vol2.pdf>. (2010).

- SOBRAL-SOUZA, C. E.; LEITE, N. F.; CUNHA, F. A.B.; PINHO, A. I.; ALBUQUERQUE, R. S.; CARNEIRO, J. N.P.; MENEZES, I. R.A.; COSTA, J. G.M.; FRANCO, J. L.; COUTINHO, H.D.M. Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam. **Arabian J. Chem.** v. 7, p. 165–170 (2014).
- SONI, H.; NAYAK, G.; PATEL, S.S.; MISHRA, K.; SINGHAI, A.K.; Pharmacognostic Studies of the Leaves of *Syzygium cumini* Linn. **Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.** v. 2 (2) Apr – Jun (2011).
- SUBRAMANIAN, S.S.; NAIR, R.A.G. Flavonoids of the flowers of *Eugenia jambolana*. **Curr. Sci.** v. 41, p. 703-704, (1972).
- SUHAJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **J. Food Compos. Anal.** v. 19, p. 531-537, (2006).
- SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica* and *Eugenia jambolana* Lam. trees. **Food Chem.**, v. 104, p. 1106-1114, (2007).
- SUTHERLAND, I. A.; DEREK, F.; Role of counter-current chromatography in the modernisation of Chinese herbal medicines. **J. Chromatogr. A.** v. 1216, p. 740–753, (2009).
- TEIXEIRA, C.C., PINTO, L. P., KESSLER, F. H. P., KNIJNIK, L., PINTO, C. P., GASTALDO, G. J., FUCHS, F. D., Effect of tea prepared from leaves of *Syzygium jambos* on glucose tolerance in non-diabetes subjects. **Diabetes Care**, Alexandria, v.13, n.8, p.907-908, (1990).
- TELCI I.; SAHBAZ NI; GUNGOR Y; TUGAY ME. Agronomical and chemical characterization of spearmint (*Mentha spicata* L.) originating in Turkey. **Econ. Bot.** v. 58, p. 721-728, (2004).
- TELES, S.; PEREIRA, J. A.; SANTOSA, C.H.B.; MENEZESA, R. V.; MALHEIRO, R.; LUCCHESSE, A. M.; SILVA, F. Effect of geographical origin on the essential oil content and composition of fresh and dried *Mentha x villosa* Hudson leaves. **Ind. Crops Prod.** v.46. p. 1– 7, (2013).
- TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chem.** v. 90, p. 333–340, (2005).

TIMBOLA, A.K., SZPOGANICZ, B., BRANCO, A., MONACHE, F.D., PIZZOLATTI, M.G., A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*, **Fitoterapia**. v.73, p. 174 -176, (2002).

VAN de BRAAK, S.A.A.J., LEIJTEN, G.C.J.J. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Center for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116. (1999).

VEIGAS, J.M.; NARAYAN, M.S.; LAXMAN, P.M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. **Food Chem.**, v.105, p. 619-627, (2007).

VENKATESWARLU, G. On the nature of the colouring matter of the jambu fruit (*Eugenia jambolana*). **J. Indian Chem. Soc.** v.29. p. 434-437, (1952)

VIJAYANAND, P.; RAO, L.J.M.; NARASIMHAM, P. Volatile flavour components of jamun fruit (*Syzygium cumini* L). **Flavour Fragr. J.** v. 16: p. 47–49, (2001).

VORST, O. F.; DE VOS, C. H.R; LOMMEN, A.; STAPS, R.V.; VISSER, R. G.F.; BINO, R.J.; HALL, R.D.; A non-directed approach to the differential analysis of multiple LC/MS-derived metabolic profiles. **Metabolomics**. v 1: pag. 169–180 (2005).

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas, (2001).

WHO 2003. Traditional medicine. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>>, Consulta em: 27 out.(2013).

WHO, Bulletin of the World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review, Geneva, (1998).