

**CONSTITUÍNTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FOLHAS E GALHOS DE *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae)**

Almir Ribeiro de Carvalho Junior\*, Geovany Amorim Gomes, Rafaela Oliveira Ferreira e Mário Geraldo de Carvalho  
Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR-475, Km 7, 23890-000 Seropédica – RJ, Brasil

Recebido em 08/08/2013; aceito em 19/11/2013; publicado na web em 10/02/2014

CHEMICAL CONSTITUENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LEAVES AND BRANCHES OF *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae). Phytochemical investigation of *Eugenia copacabanensis* allowed for the isolation and identification of following compounds:  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-glucoside, eight triterpenes, (mixture of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyriins, ursolic acid, 30-hydroxy-ursolic acid, betulin, friedelin, friedelan-3,4-lactone, and taraxerol), a mixture of three sesquiterpenes, (clovandiol, globulol, and viridiflorol), three flavonoids (kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-rhamnoside, quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinoside, and quercetin), and a mixture of four coumaroyl esters (octacosanyl, heptacosanyl, hexacosanyl, and tetracosanyl coumarates). The structures of these compounds were assigned based on comparison with literature data and spectroscopic analysis, including analysis by two-dimensional NMR techniques. Total phenolic content and total flavonoids were evaluated. Antioxidant activities of methanol extracts and fractions were measured by the 1,2-diphenyl-2-picryl-hidrazyl free radical scavenging assay.

Keywords: *Eugenia copacabanensis*; chemical constituents; antioxidant activity.

## INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae é dividida em duas subfamílias conhecidas como Myrtoideae e Leptospermoideae.<sup>1,2</sup> Compreendendo cerca de 5500 espécies, distribuídas em aproximadamente 142 gêneros,<sup>3</sup> essa família é largamente encontrada em regiões tropicais e subtropicais e alguns de seus exemplares fazem parte da flora brasileira.<sup>4</sup> Segundo Romagnolo & Souza (2006), no Brasil, podem ser encontradas em torno de 23 gêneros com cerca de 1000 espécies.<sup>5</sup> Várias espécies desta família apresentam valor econômico, como o eucalipto (*Eucalyptus spp.*), utilizado na produção de madeira e aromatizantes, e a goiabeira (*Psidium guajava*), frutífera cujos frutos são apreciados *in natura* e industrializados.

O gênero *Eugenia*, um dos maiores da família Myrtaceae, é encontrado nas Américas Central e do Sul, sendo constituído por aproximadamente 550 espécies de árvores e arbustos. Destas, cerca de 400 podem ser encontradas no Brasil.<sup>6-9</sup> Algumas das espécies deste gênero desempenham papel socioeconômico importante em determinadas regiões, por terem frutos utilizados na alimentação (*Eugenia neonitida*, *E. rontifolia*, *E. uniflora*, *E. edulis*, *E. desynerica* e *E. candolleana*, dentre outras),<sup>10-15</sup> serem empregadas em ornamentação,<sup>16</sup> produzirem óleos essenciais de valor comercial<sup>4</sup> e serem utilizadas na medicina popular no tratamento de diversas doenças.<sup>17</sup>

Uma revisão sobre a constituição química deste gênero registra como principais constituintes, nas diferentes espécies, os óleos essenciais, ricos em monoterpênicos e sesquiterpênicos, taninos condensados e hidrolisáveis, flavonoides, triterpênicos e fenilpropanoides.<sup>18-21</sup> Além disto, alguns trabalhos destacam o valor nutricional dos frutos de *Eugenia* por serem ricos em vitamina C e carotenoides que asseguram seu potencial como fonte de antioxidantes naturais.<sup>22</sup>

*Eugenia copacabanensis* Kiaersk, popularmente conhecida como “princesinha de Copacabana”, é uma espécie encontrada na forma de arbusto com até 6 m de altura, que ocorre, principalmente, em restingas localizadas no Rio de Janeiro.<sup>23</sup> Apesar da popularidade desta espécie, sendo empregada em ornamentação e tendo seus frutos

apreciados na forma de sucos, não há relato na literatura sobre estudos de constituintes químicos da mesma. Neste contexto, descrevem-se o isolamento e caracterização dos principais constituintes químicos de extratos de folhas e galhos de *E. copacabanensis* além da quantificação do teor de fenólicos e flavonoides totais e avaliação do potencial antioxidante “*in vitro*” de extratos e frações obtidos do material estudado.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Instrumentação e procedimentos gerais

Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizaram-se placas de sílica gel 60 PF<sub>254</sub> (Merck), as quais foram observadas sob luz UV 254 e 366 nm e reveladas com solução de vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento. As separações cromatográficas em coluna (CC) foram realizadas utilizando-se gel de sílica 60 (Vetec, 70-230 mesh e 230-400 mesh) e Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences). Os experimentos de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C (uni- e bidimensionais) foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE II (500/125 MHz), utilizando-se CDCl<sub>3</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub> e CD<sub>3</sub>OD como solventes e os sinais residuais destes em relação ao TMS como referência. Os espectros no IV foram registrados em espectrômetro VERTEX-70, tendo sido as amostras preparadas sob a forma de filme sobre cela de NaCl ou pastilha de KBr. Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos no espectrômetro GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro da marca Shimadzu, com fonte ESI e analisador TOF, no modo negativo. As análises fotométricas foram registradas em espectrofotômetro UV-VIS da marca Shimadzu, modelo UV-mini 1240. Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Mel-Temp II do Laboratory Devices U.S.A., utilizando-se capilar sem correção dos valores.

### Material botânico

As folhas e galhos de *E. copacabanensis* Kiaersk foram coletados no dia 3 de junho de 2010 em Arraial do Cabo – RJ. A identificação

\*e-mail: almirribeiro@ufrj.br

botânica foi realizada pelo Dr. Marcelo de Souza (Jardim Botânico – RJ). A excisada de número 34535 está depositada no herbário RBR, da UFRRJ.

### Extração e isolamento dos constituintes

As folhas e galhos secos foram, separadamente, triturados e submetidos à extração em metanol, a temperatura ambiente, até exaustão. As soluções resultantes após filtração foram concentradas sob pressão reduzida, fornecendo os extratos brutos em metanol das folhas (EMF, 384,4 g) e galhos (EMG, 133,3 g). Parte do EMF (300,0 g) foi solubilizada em uma solução metanol/água (7:3) e submetida a partições líquido/líquido com hexano, diclorometano e butanol. Com isso, foram obtidas as frações em hexano (EMF-H, 13,0 g), diclorometano (EMF-D, 29,5 g) e butanol (EMF-B, 33,5 g). Procedimento similar foi realizado com a água mãe do extrato de galhos EMG (113,3 g), obtida após filtração do extrato para a separação de um precipitado (EMG-P, 400 mg). Nesta partição usaram-se como solventes diclorometano, acetato de etila e butanol, obtendo-se as frações EMG-D (22,3 g), EMG-AE (25,1 g) e EMG-B (27,4 g), respectivamente.

Parte da fração EMF-H (fração em hexano de folhas, 9,0 g) foi fracionada através de cromatografia em coluna (CC) (gel de sílica 60), empregando-se como eluente misturas de hexano, clorofórmio e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade, fornecendo 148 frações que foram monitoradas por CCD. A reunião 33-39 (551,0 mg) foi submetida a fracionamento em CC fornecendo 30 frações, as frações 9 e 22 foram identificadas como a mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina (**1 + 2**, 13,2 mg) e  $\beta$ -sitosterol (**3**, 28,0 mg), respectivamente. A fração 76-84 forneceu um precipitado que, após lavagem com acetona, foi identificado como betulina (**4**, 113 mg). O grupo de frações 133-134 foi submetido à CC com gel de sílica 60 (CHCl<sub>3</sub>:AcOEt) fornecendo 153 frações, sendo o grupo de frações 7-20 identificado como uma mistura dos sesquiterpenos clovandiol, globulol e viridiflorol (**5 + 6 + 7**, 14,3 mg). Parte da fração EMF-D (20 g) foi fracionada em CC com gel de sílica 60 empregando-se como eluentes, de forma isocrática, diclorometano, acetato de etila, e butanol, obtendo-se, respectivamente, as frações EMF-D<sub>1</sub> (3,2 g), EMF-D<sub>2</sub> (11,0 g) e EMF-D<sub>3</sub> (3,0 g). EMF-D<sub>2</sub> foi fracionada em CC usando como eluente misturas de clorofórmio e metanol, fornecendo 149 frações. As frações 8 e 44-48 foram identificadas como ácido ursólico (**8**, 23,0 mg) e ácido 30-hidroxi-ursólico (**9**, 13,0 mg), respectivamente. As frações 77-78 e 90-106 foram filtradas em Sephadex LH-20 usando metanol como eluente e forneceu o canferol-3-*O*- $\beta$ -*D*-ramnosídeo (**10**, 11,3 mg) e quercetina-3-*O*- $\alpha$ -*L*-arabinosídeo (**11**, 7,2 mg). A fração EMF-D<sub>3</sub> foi cromatografada em gel de sílica 60, onde se utilizaram misturas de hexano, clorofórmio e metanol como eluentes, obtendo-se 209 frações. A fração 60-63 foi lavada com acetona e identificada como  $\beta$ -sitosterol glicosilado (**12**, 28 mg). O grupo 96-114 forneceu a quercetina (**13**, 4,7 mg) após filtração em Sephadex LH-20 usando metanol como solvente.

A fração denominada EMG-P, precipitado obtido na partição do extrato em metanol de galhos, foi submetida à CC em condição análoga a fração EMF-H. As frações 63-66, 67-69, 84-100 e 126 forneceram, respectivamente, friedelina (**14**, 103 mg), friedelan-3,4-lactona (**15**, 6,2 mg), taraxerol (**16**, 8 mg) e a mistura de cumaratos de alquila (**17 + 18 + 19 + 20**, 37,2 mg). Além das técnicas analíticas IV, UV e ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, foram utilizadas técnicas acopladas para identificação dos componentes em mistura **5-7** (CG/EM) e **17-20** (EMAR-IES).

### Obtenção do derivado acetilado (**9a**)

Usando procedimentos usuais de acetilação, como o descrito por Bandeira *et al.*,<sup>24</sup> foram adicionados 10 mg de **9**, 1,0 mL de piridina

e 0,2 mL de anidrido acético em um balão de 50 mL. A mistura reacional foi mantida sob agitação constante durante 24 h. A reação foi monitorada por CCD. Após este período, foi adicionado gelo ao meio reacional e o produto foi extraído em funil de separação com CHCl<sub>3</sub> (3 repetições). O derivado obtido foi purificado por CC em sílica gel e CHCl<sub>3</sub> como eluente, obtendo-se o derivado diacetilado **9a** (9,4 mg). Com este procedimento foi possível confirmar a presença de duas hidroxilas em **9**.

### Clovandiol (**5**)

Óleo amarelo. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  (mult.; *J* em Hz; H): 3,82 (*dd*; *J*<sub>1</sub> = 10 e *J*<sub>2</sub> = 5,8; H-2), 3,35 (*sl*; H-9), 2,05 (*m*, H-10) 1,72 (*dd*; *J*<sub>1</sub> = 5,7 e *J*<sub>2</sub> = 12; H-3a), 1,55 (*t*; *J* = 13; H-7a) 1,52 (*d*; *J* = 1,5; H-3b), 1,45 (*dd*; *J*<sub>1</sub> = 3,2 e *J*<sub>2</sub> = 7,8), 1,40 (*m*; H-12), 1,30 (*m*; H-6), 1,10 (*m*; H-11), 1,05 (*s*; H-14), 0,97 (*s*; H-15), 0,95 (*sl*, H-7b) e 0,87 (*s*; H-13). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$ : 80,8 (CH-2), 75,1 (CH-9), 50,5 (CH-5), 47,5 (CH<sub>2</sub>-3), 43,9 (C-4), 37,9 (C-1), 35,5 (CH<sub>2</sub>-7), 34,7 (C-8), 33,1 (CH<sub>2</sub>-12), 31,4 (CH<sub>2</sub>-14), 28,3 (CH<sub>3</sub>-15), 26,6 (CH<sub>2</sub>-6), 25,9 (CH<sub>2</sub>-10), 25,4 (CH<sub>3</sub>-13), 20,6 (CH<sub>2</sub>-11). EM *m/z* (%): 238 [M, %]<sup>+</sup>, 220 [M-H<sub>2</sub>O, 7], 205 [M-(H<sub>2</sub>O + CH<sub>3</sub>), 10], 135 [M-(H<sub>2</sub>O + C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>O), 26].

### Ácido 30-hidroxi-ursólico (**9**)

Sólido branco (P. F.: 282-285 °C). RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C: Tabela 1.

### Derivado acetilado (**9a**)

Sólido branco (P. F.: 152-153 °C). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  (mult.; *J* em Hz; H): 5,28 (*s*; H-12), 4,52 (*m*; H-3), 4,21 (*dd*; *J*<sub>1</sub> = 10,7 e *J*<sub>2</sub> = 7,0; H-30b), 3,99 (*dd*, *J*<sub>1</sub> = 10,7, *J*<sub>2</sub> = 7,0 e; H-30a), 2,22 (*d*; 11,5; H-18), 2,05 (*s*, H-2''), 2,03 (*s*, H-2'), 1,04 (*s*; H-27), 0,94 (*s*, H-25), 0,88 (*dd*; 6,1; H-29), 0,86 (*s*, H-23), 0,83 (*s*, H-24), 0,75 (*s*, H-26). RMN de <sup>13</sup>C (BBD e DEPTQ; 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$ : 37,9 (CH<sub>2</sub>-1), 27,8 (CH<sub>2</sub>-2), 80,8 (CH-3), 39,7 (C-4), 55,2 (CH-5), 17,1 (CH<sub>2</sub>-6), 32,6 (CH<sub>2</sub>-7), 38,2 (C-8), 47,6 (CH-9), 37,1 (C-10), 23,5 (CH<sub>2</sub>-11), 126,5 (CH-12), 137,3 (C-13), 42,1 (C-14), 28,1 (CH<sub>2</sub>-15), 25,2 (CH<sub>2</sub>-16), 47,4 (C-17), 52,2 (CH-18), 34,1 (CH-19), 43,3 (CH-20), 33,0 (CH<sub>2</sub>-21), 38,7 (CH<sub>2</sub>-22), 28,3 (H<sub>3</sub>C-23), 15,8 (H<sub>3</sub>C-24), 16,8 (H<sub>3</sub>C-25), 16,9 (H<sub>3</sub>C-26), 23,8 (H<sub>3</sub>C-27), 183,2 (C-28), 17,3 (H<sub>3</sub>C-29), 67,6 (CH<sub>2</sub>-30), 171,3 (C-1'), 171,1 (C-1''), 21,3 (H<sub>3</sub>C-2'), 20,3 (H<sub>3</sub>C-2'').

### Friedelan-3,4-lactona (**15**)

Sólido branco amorfo (P. F.: 286-288 °C). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  (mult.; *J* em Hz; H): 4,22 (*q*; 6,6; H-4), 2,62 (*ddd*; *J*<sub>1</sub> = 14,0, *J*<sub>2</sub> = 7,5, e *J*<sub>3</sub> = 1,26; H-2a), 2,52 (*td*; *J*<sub>1</sub> = 14,0, *J*<sub>2</sub> = 1,26; H-2b), 1,53 (*dd*; *J*<sub>1</sub> = 14,0 e *J*<sub>2</sub> = 7,5; H-1a), 1,22 (*m*, H-1b), 1,19 (*d*; 6,3; H-23), 1,16 (*s*; H-28), 1,0 (*s*, H-29), 0,99 (*s*, H-30), 0,98 (*s*, H-27), 0,94 (*s*, H-26), 0,87 (*s*, H-24), 0,82 (*s*, H-25). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$ : 18,6 (CH<sub>2</sub>-1), 34,3 (CH<sub>2</sub>-2), 175,8 (C-3), 84,9 (CH-4), 40,7 (C-5), 38,4 (CH<sub>2</sub>-6), 18,0 (CH<sub>2</sub>-7), 52,7 (CH-8), 38,2 (C-9), 64,1 (CH-10), 34,3 (CH<sub>2</sub>-11), 30,6 (CH<sub>2</sub>-12), 39,3 (C-13), 38,1 (C-14), 31,7 (CH<sub>2</sub>-15), 30,6 (CH<sub>2</sub>-16), 35,3 (C-17), 42,7 (CH-18), 35,4 (CH<sub>2</sub>-19), 28,2 (C-20), 30,6 (CH<sub>2</sub>-21), 32,7 (CH<sub>2</sub>-22), 16,2 (CH<sub>3</sub>-23), 13,4 (CH<sub>3</sub>-24), 17,9 (CH<sub>3</sub>-25), 20,0 (CH<sub>3</sub>-26), 18,6 (CH<sub>3</sub>-27), 31,2 (CH<sub>3</sub>-28), 35,0 (CH<sub>3</sub>-29), 32,1 (CH<sub>3</sub>-30). EM *m/z* (%): 442 ([M]<sup>+</sup>, 10), 427 (M-CH<sub>3</sub>, 6), 398 (M-CO<sub>2</sub>, 19), 383 (M-[CO<sub>2</sub> + CH<sub>3</sub>], 8).

### Cumaratos de alquila (**17 + 18 + 19 + 20**)

Sólido branco amorfo. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  (mult.; *J* em Hz; H): 7,62 (*d*; 15,8; H-7), 7,42 (*d*; *J* = 8,2; H-2,6), 6,84 (*d*; *J* = 8,2; H-3,5), 6,30 (*d*; *J* = 15,8; H-8), 4,19 (*t*; *J* = 6,6; H-10), 1,8 (*m*, CH<sub>2</sub>), 1,24 (*m*; [CH<sub>2</sub>]<sub>n</sub>), 0,87 (*t*; *J* = 6,6; [CH<sub>3</sub>]). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$ : 167,4 (C-9), 157,5 (C-4), 144,1 (CH-7), 115,6 (CH-8), 129,9 (C-H, 2',6'), 115,5 (CH-3',5'), 64,4 (O-CH<sub>2</sub>-10),

31,9 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 28,7-29,6 ([CH<sub>2</sub>]<sub>n</sub>), 25,9 (CH<sub>2</sub>-11), 22,7 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 14,2 (CH<sub>3</sub>). EMAR-IES modo negativo: *m/z* (íon, %, componente): 500,4413 ([M]<sup>-</sup>, 20, **17**), 499,4698 ([M-H]<sup>-</sup>, 50, **17**), 528,4647 ([M]<sup>-</sup>, 50, **18**), 527,4483 ([M-H]<sup>-</sup>, 100, **18**), 541,4698 ([M-H]<sup>-</sup>, 3, **19**), 556,4988 ([M]<sup>-</sup>, 5, **20**), 555,4988 ([M-H]<sup>-</sup>, 15, **20**), e os picos detectados nos espectros EM2 de cada íon ([M-H]<sup>-</sup>) em *m/z*: 163, 145 e 118, e os correspondentes íons pai de **17** [C<sub>33</sub>H<sub>53</sub>O<sub>3</sub> (obs.: 499,4362, calc. 499,4151)], **18** [C<sub>35</sub>H<sub>59</sub>O<sub>3</sub> (obs.: 527,4599, calc. 527,4464)], **19** [C<sub>36</sub>H<sub>61</sub>O<sub>3</sub> (obs.: 541,4693, calc. 541,4620)], e **20** [C<sub>37</sub>H<sub>63</sub>O<sub>3</sub> (obs.: 555,5081, calc. 555,4777)].

### Avaliação da atividade antioxidante de extratos e frações de *E. copacabanensis*

#### Teor de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais presentes em extratos e frações de *E. copacabanensis* foi realizada utilizando-se o reagente de Folin-Dennis,<sup>25</sup> com o ácido gálico como composto padrão.

Alíquotas de 0,5 mL dos extratos e frações, provenientes de uma solução estoque de 0,2 mg/mL em MeOH, foram misturadas a 2,5 mL de reagente Folin-Dennis, agitando-se por 1 min. Em seguida, 2,0 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (14%) foram acrescentados à mistura e procedeu-se à agitação por 1 min. Após 2 h, a absorbância das amostras foi medida a 760 nm. Água Milli-Q foi usada como branco. O teor de fenólicos totais foi expresso como miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g), a partir da curva de calibração construída com o padrão de ácido gálico (0 a 22 µg/mL). As análises foram realizadas em triplicata.

#### Teor de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado empregando-se um método colorimétrico previamente descrito.<sup>26</sup> Alíquotas de 2,0 mL de uma solução de AlCl<sub>3</sub> a 2% foram adicionadas a 2,0 mL de soluções de extratos e frações (0,4 mg/mL em MeOH). Após 30 min de incubação, os valores de absorbância foram mensurados a 415 nm, empregando-se MeOH como branco. O teor de flavonoides totais foi expresso como miligrama de equivalente de quercetina por grama de amostra (mg EQ/g), a partir da curva de calibração construída com o padrão quercetina (0 a 20 µg/mL). As análises foram realizadas em triplicata.

#### Atividade sequestradora do radical DPPH

A atividade sequestradora de radical livre de extratos e frações de *E. copacabanensis* foi avaliada segundo metodologia descrita por Zhang & Hamauzu<sup>27</sup> com algumas modificações. Uma alíquota de 29 µL de solução de DPPH (0,3 mmol/L em MeOH) foi adicionada a 71 µL de diferentes concentrações de extratos e frações de *E. copacabanensis*. Após 30 min, a absorbância do DPPH remanescente foi mensurada a 517 nm em espectrofotômetro ELISA. Uma alíquota de 29 µL de extrato, fração ou padrão foi utilizada como branco, e a mistura de 29 µL de solução de DPPH com 71 µL de MeOH foi usada como controle negativo. A atividade sequestradora de radical foi calculada através da porcentagem de descoloração do DPPH usando a equação 1:

$$AA\% = 100 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) / \text{Abs}_{\text{controle}} \times 100$$

onde Abs<sub>amostra</sub> é a absorbância do radical na presença do extrato ou padrão de quercetina, Abs<sub>branco</sub> é a absorbância do branco e Abs<sub>controle</sub> é a absorbância do controle.

As medidas foram efetuadas em triplicata e os resultados expressos com média±E.P.M. A eficiência antirradicalar foi estabelecida usando-se análise de regressão linear no intervalo de confiança de

95% (p<0,05) obtido pelo programa GraphPad Prism 5.0 DEMO. Os resultados foram expressos pelo valor de CE<sub>50</sub>, que representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH. Os extratos são considerados ativos quando apresentam CE<sub>50</sub><500 µg/mL.<sup>28</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento cromatográfico de frações do extrato de folhas de *Eugenia copacabanensis* conduziu ao isolamento de uma mistura de α- e β-amirina (**1** e **2**),<sup>29</sup> β-sitosterol (**3**),<sup>30</sup> betulina (**4**),<sup>31</sup> clovandiol (**5**),<sup>32</sup> globulol (**6**),<sup>33</sup> viridiflorol (**7**),<sup>33</sup> ácido ursólico (**8**),<sup>34</sup> ácido 30-hidroxi-ursólico (**9**),<sup>35</sup> canferol-3-O-β-D-ramnosídeo (**10**),<sup>36</sup> quercetina-3-O-α-L-arabinosídeo (**11**),<sup>37</sup> β-sitosterol glicosilado (**12**)<sup>30</sup> e quercetina (**13**). O mesmo procedimento com frações do extrato de galhos da planta conduziu ao isolamento da friedelina (**14**),<sup>38</sup> friedelan-3,4-lactona (**15**),<sup>39</sup> taraxerol (**16**)<sup>40</sup> e da mistura dos ésteres cumarato de tetracosanila, cumarato de hexacosanila, cumarato de heptacosanila e cumarato de octacosanila, (**17-20**) (Figura 1). A identificação das substâncias baseou-se na análise de espectros e comparação de dados com valores descritos na literatura.

As estruturas de **5**, **9**, **15** e **17-20** foram determinadas por RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, incluindo experimentos bidimensionais (COSY, NOESY, HMQC e HMBC). Os experimentos realizados com espectros de massas de alta resolução (EMAR-IES) permitiram confirmar as fórmulas moleculares da mistura de derivados cinâmicos (**17-20**), veja experimental.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H da fração contendo **5** foram observados sinais mais intensos correspondentes a este componente majoritário, além de outros sinais compatíveis com outros terpenos em mistura. Os sinais em δ<sub>H</sub> 3,82 (*dd*; J<sub>1</sub>=10 e J<sub>2</sub>=5,8 Hz; 1H) e 3,35 (*sl*, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios 2 e 9, respectivamente. Os sinais referentes às metilas 13, 14 e 15 foram observados em δ<sub>H</sub> 0,97 (*s*; 3H), 1,05 (*s*; 3H) e 0,87 (*s*; 3H), respectivamente. O espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amostra apresentou 15 sinais, sendo três CH<sub>3</sub>, seis CH<sub>2</sub>, três CH e três C, com destaque para os sinais em δ<sub>C</sub> 80,8 (CH-2), 75,1 (CH-9), 31,6 (CH<sub>3</sub>-13), 28,4 (CH<sub>3</sub>-14) e 25,5 (CH<sub>3</sub>-15). Esses dados aliados aos valores de *m/z* detectados no espectro de massas (veja experimental) foram compatíveis com a fórmula C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>. As correlações observadas nos experimentos bidimensionais (COSY, HMQC e HMBC) e comparação com valores da literatura<sup>32</sup> permitiram identificar o componente **5** como o sesquiterpeno clovandiol e as correlações entre H-2/H-13, H-2/H-3, H-5/H-14, H-9/H-15 e H-15/H-10, observadas no espectro de NOESY, serviram como base para a proposta da configuração relativa representada na Figura 1. Esta fração apresentou-se como um óleo amarelado e, como descrito acima, foram identificados sinais compatíveis com outros componentes em mistura. Sendo assim, fez-se análise com CG/EM e detectaram três picos com tempos de retenção 14,48, 15,30 e 16,14 minutos, referentes às substâncias **6** (30,0%), **7** (26,6%) e **5** (53,4%), respectivamente. Os espectros de massas foram comparados aos da biblioteca e, além de confirmar a proposta para **5**, foram identificados os componentes **6** e **7** (Figura 1), que são compatíveis com os demais sinais observados no espectro de RMN <sup>13</sup>C.

A substância (**9**) foi obtida da fração diclorometano de folhas de *E. copacabanensis* como um sólido branco com ponto de fusão 282-285 °C. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H foram observados sinais referentes a hidrogênios metílicos em δ<sub>H</sub> 0,75 (3H, *s*, H-26), 0,83 (3H, *s*, H-24), 0,86 (3H, *s*, H-23), 0,88 (3H, *d*, J=6,1 Hz, H-29), 0,94 (3H, *s*, H-25) e 1,04 (3H, *s*, H-27), sugerindo a presença de seis metilas. Foi observado um multipeto em δ<sub>H</sub> 2,98 (1H, *m*, H-3), característico de hidrogênio carbinólico em triterpenos 3β-OH, um sinal em δ<sub>H</sub> 5,11 (1H, *sl*, H-12) típico de hidrogênio olefínico e um

sinal em  $\delta_H$  2,09 (1H, *d*,  $J=11,3$  Hz, H-18) referente ao hidrogênio do carbono metínico e alílico H-18, permitindo sugerir a presença de triterpeno com esqueleto ursano. Esses dados em conjunto com a análise do espectro de RMN de  $^{13}C$  (Tabela 1), com destaque para os sinais em  $\delta_C$  124,7 e em  $\delta_C$  138,0 referentes aos carbonos olefínicos CH-12 e C-13, e os sinais em  $\delta_C$  76,8 e 178,4 atribuídos aos carbonos carbinólico (CH-3) e carboxílico (C-28), respectivamente, permitiram sugerir a estrutura de um derivado do ácido ursólico (**8**). A presença de apenas seis metilas e o sinal em  $\delta_C$  67,8 característico de carbono oximetilênico (CH<sub>2</sub>-30), permitiram sugerir a ocorrência de oxidação em uma das metilas do ácido ursólico. No experimento de HMBC foram observadas as correlações a longa distância entre o hidrogênio oximetilênico  $\delta_H$  3,43 (2H, *m*, H-30) com os carbonos metilênicos em  $\delta_C$  33,0 (CH<sub>2</sub>-21) e 39,5 (CH<sub>2</sub>-22) e, adicionalmente, a ausência de um sinal em torno de  $\delta_C$  21, que no ácido ursólico corresponde à metila CH<sub>3</sub>-30, sugeriram a oxidação da metila nesta posição. A presença das duas hidroxilas na molécula foi confirmada a partir de análises dos espectros de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  do derivado **9a**. A análise dos dados de RMN, incluindo experimento de NOESY, permitiram identificar **9** como o ácido 30-hidroxi-ursólico, com a estereoquímica relativa como apresentada na Figura 1, e fazer o assinalamento dos dados de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  de **9** (Tabela 1) e **9a** (veja experimental). Este triterpeno foi descrito anteriormente nas espécies da família Rubiaceae, *Rubia cordifolia*<sup>35</sup> e *Randia siamensis*.<sup>41</sup>

A substância **15** foi isolada a partir de um precipitado obtido do extrato em metanol dos galhos de *E. copacabanensis*. A análise dos dados de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  sugeriu a presença de um triterpeno com esqueleto friedelano, similar a friedelina (**14**). No espectro de RMN de  $^1H$  foi observado um sinal em  $\delta_H$  4,21 (1H, *m*, H-4) característico de hidrogênio oximetínico em sistemas cíclicos e em  $\delta_H$  2,65 (1H, *dd*,  $J_1=6,9$  e  $J_2=13,9$  Hz, H-2) e 2,50 (1H, *t*,  $J=12,9$  Hz, H-2) foi observado um conjunto de sinais característicos de hidrogênios diastereotópicos de grupo metileno vizinho a carbonila. No espectro de RMN de  $^{13}C$

destacam-se os sinais em  $\delta_C$  175,9 (C-3), característico de carbonila de lactona, e em  $\delta_C$  85,2 (CH-4) que caracteriza um carbono oximetínico vizinho a carbonila. As correlações observadas no espectro de HMBC entre H-4/C-3, H-4/C-10, H-2/C-3 e H-2/C-10 confirmaram a caracterização do anel lactônico. Os dados espectroscópicos de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  desta substância, incluindo bidimensionais, estão de acordo com aqueles descritos para a friedelan-3,4-lactona isolada da espécie *Casearia vetulina* Bl. (Flacourtiaceae).<sup>42</sup> Este é o primeiro relato da ocorrência desta terpenolactona em Myrtaceae. O assinalamento dos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono-13 está descrito na parte experimental.

A mistura composta pelas substâncias **17-20** foi obtida a partir do extrato em metanol dos galhos, na forma de um sólido branco. No espectro de RMN de  $^1H$  da mistura foram observados dois dupletos em  $\delta_H$  7,45 (2H, *d*,  $J=8,3$  Hz, H-2 e H-6) e 6,84 (2H, *d*,  $J=8,3$  Hz, H-3 e H-5) com constante de acoplamento característica de hidrogênios em sistemas aromáticos *para*-disubstituídos. Os dupletos em  $\delta_H$  7,61 (1H, *d*,  $J=15,8$  Hz, H-7) e 6,63 (1H, *d*,  $J=15,8$  Hz, H-8) estão de acordo com frequência de hidrogênios olefínicos em configuração *E*. Esses dados são compatíveis com o ácido *trans*-cumárico. Esta proposta foi confirmada pelos dados de RMN de  $^{13}C$  que apresentou sinais de carbonila de éster conjugado com dupla *trans*, em  $\delta_C$  167,7 (C-9) 144,3 (CH-7), 115,8 (CH-8), e sinais de carbonos em sistema aromático em  $\delta_C$  157,7 (C-4), 127,3 (C-1), 129,9 (CH-2,6), e 115,9 (CH-3,5). Ainda no espectro de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ , destaca-se o sinal em  $\delta_H$  4,21 (2H, *t*,  $J=6,7$  Hz) e em  $\delta_C$  64,4 (O-CH<sub>2</sub>-10), e demais sinais de cadeia alquílica do éster proposto (veja experimental). A proposta de quatro componentes na mistura foi baseada nos valores de *m/z* (M - H) detectados no espectro de massas de alta resolução e valores detectados nos espectros de massas dos respectivos íons (M - H). A diferença entre os valores de *m/z* propostos para os íons quase moleculares ([M-H]<sup>-</sup>) e a unidade acila permitiu deduzir o tamanho da cadeia alquílica de cada componente, sendo as estruturas definidas

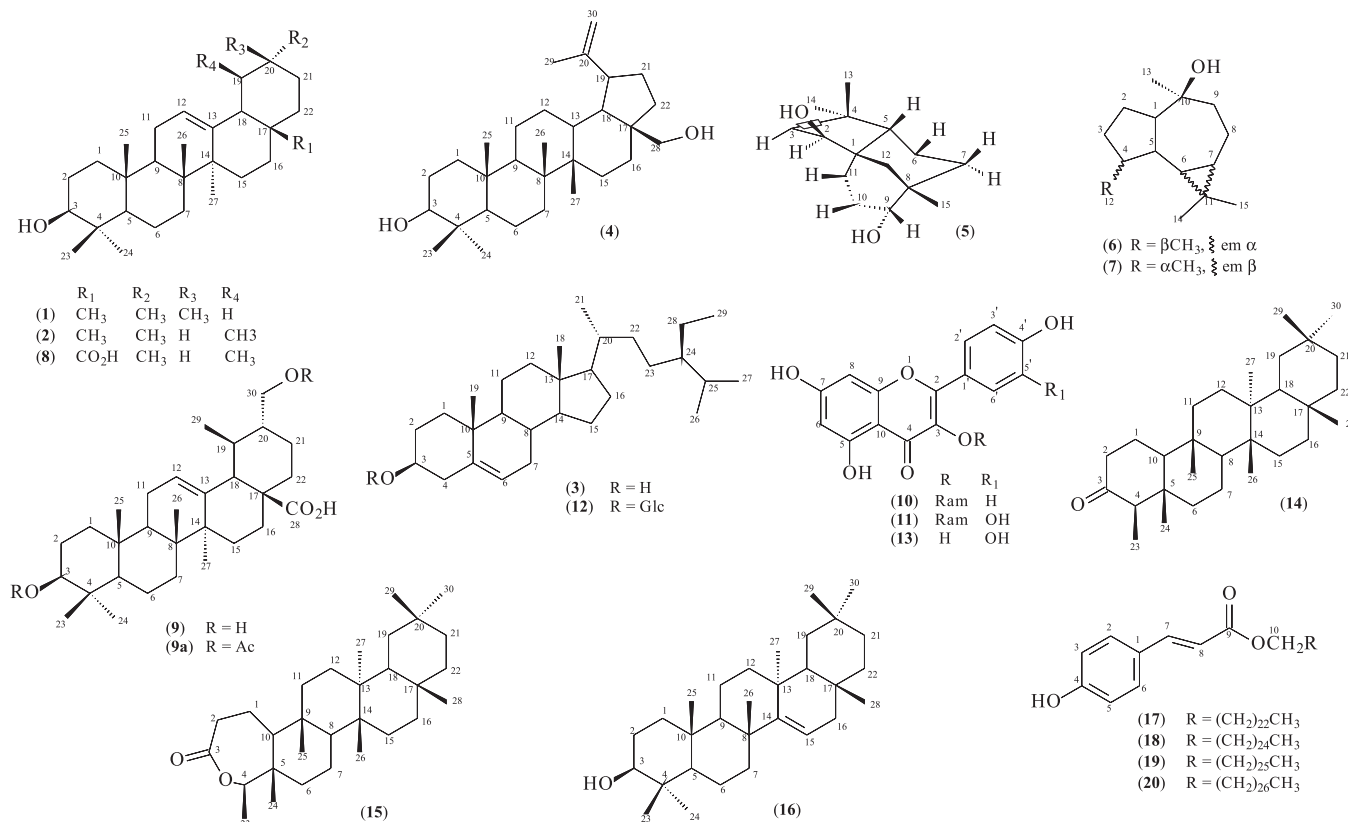


Figura 1. Estruturas dos constituintes químicos isolados de *Eugenia copacabanensis*



como: cumaratos de tetracosanila, hexacosanila, heptacosanila e octacosanila, respectivamente. Estes ésteres estão sendo descritos pela primeira vez na família Myrtaceae.

**Tabela 1.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz,  $J$  em Hz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de **9**

| C  | HMOC ( $^1J_{\text{HC}}$ ) |                           | HMBC              |                                 | NOESY               |
|----|----------------------------|---------------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------|
|    | $\delta_{\text{C}}$        | $\delta_{\text{H}}$       | $^2J_{\text{HC}}$ | $^3J_{\text{HC}}$               |                     |
| 1  | 37,9                       |                           |                   |                                 |                     |
| 2  | 27,8                       |                           |                   |                                 |                     |
| 3  | 80,8                       | 2,98 (m)                  |                   | C-23, C-24                      | H-23                |
| 4  | 39,7                       |                           |                   |                                 |                     |
| 5  | 55,2                       |                           |                   |                                 |                     |
| 6  | 17,1                       |                           |                   |                                 |                     |
| 7  | 32,6                       |                           |                   |                                 |                     |
| 8  | 38,2                       |                           |                   |                                 |                     |
| 9  | 47,6                       |                           |                   |                                 |                     |
| 10 | 37,1                       |                           |                   |                                 |                     |
| 11 | 23,5                       |                           |                   |                                 |                     |
| 12 | 126,5                      | 5,11 (s)                  |                   | C-14, C-18                      |                     |
| 13 | 137,3                      |                           |                   |                                 |                     |
| 14 | 42,1                       |                           |                   |                                 |                     |
| 15 | 28,1                       |                           |                   |                                 |                     |
| 16 | 25,2                       |                           |                   |                                 |                     |
| 17 | 47,4                       |                           |                   |                                 |                     |
| 18 | 52,2                       | 2,09<br>( $d, J = 11,3$ ) | C-13, C-17        | C-12, C-14, H-12, H-22,<br>C-28 | H-29                |
| 19 | 34,1                       |                           |                   |                                 |                     |
| 20 | 43,3                       |                           |                   |                                 |                     |
| 21 | 33,0                       |                           |                   |                                 |                     |
| 22 | 39,5                       |                           |                   |                                 |                     |
| 23 | 28,3                       | 0,86 (s)                  |                   | C-3, C-5,<br>C-24               | H-3                 |
| 24 | 15,2                       | 0,83 (s)                  |                   |                                 |                     |
| 25 | 16,1                       | 0,94 (s)                  |                   | C-5                             |                     |
| 26 | 16,7                       | 0,75 (s)                  |                   | C-14                            |                     |
| 27 | 23,3                       | 1,04 (s)                  | C-14              | C-13                            |                     |
| 28 | 178,4                      | -                         |                   |                                 |                     |
| 29 | 16,9                       | 0,88<br>( $d, J = 6,1$ )  |                   | C-18                            |                     |
| 30 | 67,6                       | 3,43 (m)                  | C-20              | C-21                            | H-20, H-21,<br>H-29 |

### Avaliação do teor de fenólicos e flavonoides totais

O ensaio de Folin-Dennis é um método rápido e simples para a determinação do teor de compostos fenólicos em amostras vegetais. A fração em *n*-BuOH das folhas de *E. copacabanensis* apresentou o maior teor de fenólicos em comparação às demais frações das folhas analisadas ( $855,76 \pm 2,71$  mEAG/g), enquanto que nos galhos foi a fração em AcOEt ( $970,32 \pm 2,72$  mgEAG/g) (Tabela 2). De uma forma geral, observou-se um maior teor de fenólicos totais nos galhos de *E. copacabanensis* em comparação às folhas desta espécie (Tabela 2).

O ensaio de determinação do teor de flavonoides totais empregou o reagente  $\text{AlCl}_3$ , que forma complexos estáveis com os flavonoides em meio metanólico, podendo ser monitorados por espectrofotometria a 415 nm.<sup>43</sup> A fração em *n*-BuOH das folhas apresentou o maior teor de flavonoides totais ( $38,69 \pm 0,55$  mgEQ/g), em comparação às demais amostras analisadas (Tabela 2). Nos galhos, o extrato em MeOH apresentou o maior teor de flavonoides ( $26,70 \pm 0,82$

mgEQ/g), seguido das frações em EMG-B ( $18,51 \pm 0,37$  mgEQ/g), EMG-AE ( $17,02 \pm 0,32$  mgEQ/g) e EMG-D ( $18,11 \pm 1,51$  mgEQ/g). Estes resultados sugerem que as folhas e galhos de *E. copacabanensis* são ricos em teores de flavonoides quando comparados a outras espécies de *Eugenia*.<sup>44,45</sup>

### Atividade sequestradora do radical DPPH

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos vegetais. Dentre estes, um dos mais empregados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), púrpura que apresenta um pico de absorção em 517 nm.<sup>46</sup>

Os extratos e frações das folhas e galhos de *E. copacabanensis* apresentaram atividade sequestradora de radical livre com  $\text{CE}_{50}$  variando de  $0,92 \pm 0,04$  a  $40,66 \pm 0,59$   $\mu\text{g/mL}$ . Desta forma, podemos afirmar que todas as amostras analisadas apresentaram promissora atividade antioxidante. O extrato em metanol dos galhos (EMG) apresentou a maior atividade antioxidante dentre as amostras analisadas ( $\text{CE}_{50} = 0,92 \pm 0,04$ ), sendo mais ativo que o padrão quercetina (Teste de Tukey,  $P < 0,05$ ). Os valores de  $\text{CE}_{50}$  dos extratos, frações e o padrão estão descritos na Tabela 2.

A correlação entre fenólicos totais e a atividade antioxidante de extratos vegetais tem sido descrita regularmente na literatura.<sup>47</sup> Os compostos fenólicos, especialmente flavonoides e proantocianidinas,<sup>48,49</sup> têm sido relatados como os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos botânicos. A boa correlação observada entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante de *E. copacabanensis*, avaliada pela atividade sequestradora do radical livre DPPH ( $R^2 = 0,72$ ), indica que as substâncias fenólicas, como os flavonoides e cumaratos isolados neste estudo, são responsáveis pela boa atividade antioxidante desta espécie.

**Tabela 2.** Teor de fenólicos totais, flavonoides e atividade sequestradora do radical livre DPPH de extratos e frações de folhas e galhos de *E. copacabanensis*

| Amostras   | Teor de fenólicos totais (mgEAG/g) | Teor de flavonoides totais (mgEQ/g) | DPPH ( $\text{CE}_{50}$ ) |
|------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| EMF        | $375,49 \pm 1,22$                  | $28,50 \pm 0,95$                    | $2,77 \pm 0,02$           |
| EMF-H      | $58,28 \pm 1,08$                   | $10,91 \pm 0,52$                    | $40,66 \pm 0,59$          |
| EMF-D      | $118,99 \pm 2,18$                  | $17,16 \pm 1,89$                    | $30,33 \pm 0,31$          |
| EMF-B      | $855,76 \pm 2,71$                  | $38,69 \pm 0,55$                    | $4,74 \pm 0,16$           |
| EMG        | $779,90 \pm 1,83$                  | $26,70 \pm 0,82$                    | $0,92 \pm 0,04$           |
| EMG-D      | $635,19 \pm 2,17$                  | $18,11 \pm 1,51$                    | $4,52 \pm 0,03$           |
| EMG-AE     | $970,32 \pm 2,72$                  | $17,02 \pm 0,32$                    | $3,66 \pm 0,02$           |
| EMG-B      | $845,57 \pm 1,09$                  | $18,51 \pm 0,37$                    | $2,42 \pm 0,01$           |
| Quercetina | -                                  | -                                   | $1,95 \pm 0,01$           |

### CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo fitoquímico da espécie *E. copacabanensis*, uma espécie popular como revelado pelo seu próprio nome vulgar, que resultou no isolamento e identificação de 20 substâncias, sendo seis inéditas na família Myrtaceae, os triterpenos ácido 30-hidroxi-ursólico (**9**) e friedelan-3,4-lactona (**15**) e a mistura de cumaratos de tetracosanila (**17**), hexacosanila (**18**), heptacosanila (**19**) e octacosanila (**20**).

Adicionalmente, relatamos o elevado teor de fenólicos totais presentes nas folhas e galhos desta espécie e a promissora atividade sequestradora de radicais livres no ensaio do DPPH. Estes resultados

sugerem que *Eugenia copacabanensis* é uma nova fonte natural de substâncias antioxidantes, que podem vir a atuar futuramente no combate a doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Os espectros de massas e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **5-7**, **9**, **9a**, **15** e **17-20**, citados no texto, estão disponíveis na forma de material suplementar em <http://quimicanova.sbq.org.br>, em formato pdf.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES, CNPQ e a FAPERJ pelas bolsas concedidas e pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Vieira, T. R.; Barbosa, L. C. A.; Maltha, C. R. A.; Paula, V. F.; Nascimento, E. A.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 536.
- Cardoso, C. M. V.; Sajo, M. G.; *Acta Bot. Bras.* **2006**, *20*, 657.
- Thornhill, A. H.; Popple, L. W.; Carter, R. J.; Ho, S. Y. W.; Crisp, M. D.; *Mol. Phylogenet. Evol.* **2012**, *63*, 15.
- De Oliveira, A. M.; Humberto, M. M. S.; Da Silva, J. M.; Rocha, R. F. de A.; Sant'ana, A. E. G.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 618.
- Romagnolo, M. B.; Souza, M. C.; *Acta Bot. Bras.* **2006**, *20*, 529.
- Da Silva, A. L. G.; Pinheiro, M. C. B.; *Acta Bot. Bras.* **2007**, *21*, 235.
- van der Merwe, M. M.; van Wyk, A. E.; Botha, A. M.; *Plant Syst. Evol.* **2005**, *251*, 21.
- Frighetto, N.; Welendorf, R. M.; Da Silva, A. M. P.; Nakamura, M. J.; Siani, A. C.; *Phytochem. Anal.* **2005**, *16*, 411.
- de Oliveira, R. N.; Dias, I. J. M.; Câmara, C. A. G.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 39.
- Magina, M. D. A.; Pietrowski, E. F.; Gomic, F.; Falkenberg, D. B.; Cabrini, D. A.; Otuki, M. F.; Pizzolatti, M. G.; Brighente, I. M. C.; *Braz. J. Pharm. Sci.* **2009**, *45*, 171.
- Defaveri, A. C. A.; Sato, A.; Boné, L. B.; Aguiar, D. L. M.; San Gil, R. A. S.; Arruda, R. C. O.; Riehl, C. A. A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1531.
- Santos, K. K. A.; Matias, E. F. F.; Tintino, S. R.; Souza, C. E. S.; Braga, M. F. B. M.; Guedes, G. M. M.; Rolón, M.; Veja, C.; Arias, A. R.; Costa, J. G. M.; Menezes, I. R. A.; Coutinho, H. D. M.; *Experimental Parasitology* **2012**, *131*, 130.
- Hussein, S. A. M.; Hashem, A. N. M.; Saliem, M. A.; Lindequist, U.; Nawwar, M. A. M.; *Phytochemistry* **2003**, *64*, 883.
- Oliveira, M. E. S.; Pantoja, L.; Duarte, W. F.; Collela, C. F.; Valarelli, L. T.; Schwan, R. F.; Dias, D. R.; *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 2391.
- Guimarães, A. G.; Melo, M. S.; Bonfim, R. R.; Passos, L. O.; Machado, S. M. F.; Ribeiro, A. de S.; Sobral, M.; Thomazzi, S. M.; Quintans-Júnior, L. J.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, *19*, 883.
- Cassaniti, C.; Leonard, C.; Flowers, T. J.; *Scientia Horticulturae* **2009**, *122*, 586.
- Yang, L. L.; Lee, C. Y.; Yen, K. Y.; *Cancer Lett.* **2000**, *157*, 65.
- Magina, M. D. A.; Dalmarco, E. M.; Wisniewski Junior, A.; Simionato, E. L.; Dalmarco, J. B.; Pizzolatti, M. G.; Brighente, M. C.; *J. Nat. Med.* **2009**, *63*, 345.
- Mahmoud, I. I.; Marzouk, M. S. A.; Moharram, F. A.; El-Gind, M. R.; Hassan, A. M. K.; *Phytochemistry* **2001**, *58*, 1239.
- Manoharan, K. P.; Song, F. J.; Benny, T. K. H.; Yang, D.; *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 279.
- Miyazawa, M.; Hisama, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6413.
- Carvalho Junior, A. R. de; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 2013.
- Souza, M. C.; Morim, M. P. *Acta bot. bras.* **2008**, *22*, 652.
- Bandeira, P. N.; Lemos, T. L. G.; Costa, S. M. O.; Dos Santos, H. S.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 204.
- Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M.; *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152.
- Meda, A.; Lamie, C. E.; Romito, M.; Millogo, J.; Nacoulma, O. G.; *Food Chem.* **2005**, *91*, 571.
- Zhang, D.; Hamazu, Y.; *Food Chem.* **2004**, *88*, 503.
- Campos, M. G.; Webby, R. F.; Markham, K. R.; Mitchell, K. A.; Da Cunha, A. P.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 742.
- Dias, M. O.; Hamerski, L.; Pinto, A. C.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 704.
- Costa, D. A.; Chaves, M. H.; Silva, W. C. S.; Costa, C. L. S.; *Acta Amaz.* **2010**, *40*, 207.
- Abreu, V. G. da C.; Corrêa, G. M.; Lagos, I. A. dos S.; Silva, R. R.; Alcântara, A. F. de C.; *Acta Amaz.* **2013**, *43*, 525.
- Delgado, G.; Cárdenas, H.; Peláez, G.; Vivar, A. R.; *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 1042.
- Hanson, J. T.; Hitchcock, P. B.; Manickavasagar, R.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1023.
- Jorge, T. C. M.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Maringá, Brasil, 2005.
- Talapatra, S. K.; Sarkar, A. C.; Talaputra, B.; *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1923.
- Correa, S. J.; David, J. M.; Da Silva, E. P.; David, J. P.; Lopes, L. M. X.; Guedes, M. L. S.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 2056.
- Liu, J.-X.; Di, D.-L.; Shi, Y.-P.; *J. Chin. Chem. Soc.* **2008**, *55*, 863.
- Almeida, M. F. O.; de Melo, A. C. R.; Pinheiro, M. L. B.; Silva, J. R. A.; de Souza, A. D. L.; Barison, A.; Campos, F. R.; Amaral, A. C. F.; Machado, G. M. C.; Leon, L. L. P.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1182.
- Patra, A.; Chaudhuri, S. K.; Achryya, A. K.; *Magn. Reson. Chem.* **1990**, *28*, 85.
- Laphookieo, S.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 883.
- Woo, W. S.; Choi, J. S.; Tovivich, P.; *Arch. Pharmacol. Res.* **1984**, *7*, 57.
- Li, F.-F.; Guo, Z.-Q.; Chai, X.-Y.; Tu, P.-F.; *J. Chin. Pharm. Sci.* **2012**, *21*, 273.
- Woisky, R. G.; Salatino, A.; *J. Apic. Res.* **1998**, *37*, 99.
- Magina, K. E.; Filho, V. C.; Cruz, R. C. B.; Meyre-Silva, C.; Cruz, A. B.; *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1181.
- Donatini, R. S.; Ishikawa, T.; Barros, S. B. M.; Baechi, E. M.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, *19*, 89.
- Alves, C. Q.; David, J. M.; David, P. J.; Bahia, M. V.; Aguiar, R. M.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 2202.
- Klimeczak, I.; Malecka, M.; Szlachta, M.; Gliszczynska, A.; *J. Food Comp. Anal.* **2007**, *20*, 313.
- Soobratte, M. A.; Neergheen, V. S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O. I.; Baharun, T.; *Mutat. Res.* **2005**, *579*, 200.
- Majo, D. D.; Guardia, M. La; Giammanco, S.; Neve, L. La; Giammanco, M.; *Food Chem.* **2008**, *111*, 45.