

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO –
IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM
AGROQUÍMICA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ANTIOXIDANTE E INIBITÓRIA
ENZIMÁTICA DAS FOLHAS DE *Eugenia punicifolia*

Autora: Joema Rodrigues Cardoso Santos

Orientador: Dr. Paulo Sérgio Pereira

Coorientadora: Dra. Cássia Cristina Fernandes Alves

RIO VERDE- GO

Março-2018

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO –
IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM
AGROQUÍMICA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ANTIOXIDANTE E INIBITÓRIA
ENZIMÁTICA DAS FOLHAS DE *Eugenia punicifolia*

Autora: Joema Rodrigues Cardoso Santos

Orientador: Dr. Paulo Sérgio Pereira

Coorientadora: Dra. Cássia Cristina Fernandes Alves

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Agroquímica.

Rio Verde- GO

Março-2018

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ANTIOXIDANTE E
INIBITÓRIA ENZIMÁTICA DAS FOLHAS DE *Eugenia
punicifolia*

Autora: Joema Rodrigues Cardoso Santos
Orientador: Paulo Sérgio Pereira

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 09 de março de 2018.



Prof.^a Dra. Alessandra Rodrigues
Duarte
Avaliadora externa
IF Goiás - Goiânia



Prof.^a Dra. Cibele Silva Minafra
Avaliadora externa
IF Goiano/RV



Prof.^a Dra. Cássia Cristina Fernandes
Alves
Avaliadora interna
IF Goiano/RV



Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira
Presidente da banca
IF Goiano/RV

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

SJ64c Santos, Joema Rodrigues Cardoso Santos
Composição Química, Antioxidante e Inibitória
Enzimática das folhas de *Eugenia punicifolia* / Joema
Rodrigues Cardoso Santos Santos; orientador Paulo
Sérgio Pereira Pereira; co-orientadora Cássia
Cristina Fernandes Fernandes. -- Rio Verde, 2018.
70 p.

Dissertação (Mestrado em Mestrado em Agroquímica) --
Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2018.

1. acetilcolinesterase. 2. antioxidante. 3.
cereja do cerrado. 4. eugenia punicifolia. I.
Pereira, Paulo Sérgio Pereira, orient. II.
Fernandes, Cássia Cristina Fernandes, co-orient.
III. Título.

AGRADECIMENTOS

O mínimo que posso fazer, é agradecer. À Deus, pelo dom da vida, pelo amor dedicado à mim, mesmo sendo tão imerecedora. Pai, obrigada por predestinar meu caminho e as pessoas que nele estão. Obrigada por me amar tanto e enviar seu único filho para morrer em meu lugar. Obrigada por cuidar de mim, em todos os momentos, em tantas estradas, e de todas as formas. Eu o amo, de todo o meu coração e de todo meu entendimento. Se estou aqui, é porque o Senhor teve misericórdia de mim. A Ti, toda a honra e toda a Glória.

Ao Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde, instituição ímpar, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado em agroquímica.

A CAPES, pelo tempo de bolsa concedida.

A minha família, minha amada mãe Edicássia e meu precioso pai João, meus maiores incentivadores, sem a qual não seria possível a realização deste mestrado. Obrigada por exatamente tudo: todo o sacrifício financeiro, todo investimento educacional para o meu crescimento profissional. Vocês nunca pouparam esforços. Vocês sempre estiverem ao meu lado, acreditando! Por muitas vezes, mais que eu. Esse título é de vocês, é por vocês e pra vocês! As minhas amadas irmãs, que com zelo sempre cuidaram de mim e dos meus pais, principalmente quando o fardo não esteve leve. Fabíola, obrigada pelas constantes orações, Jaína por ser tão companheira e. Juara, por toda dedicação dispensada. Cuidou dos nossos “velhinhos” quando não pude estar presente. Cuidou de cada detalhe, sempre tão eficiente, assim como as Rodrigues são. Aos meus cunhados Alcides, Lucas e Alex. Aos meus sobrinhos lindos Felipe, Max e a que está por vir: a Dinda ama muito vocês.

Ao Prof. e orientador Dr. Paulo Sérgio Pereira, que tanto me ensinou. Talvez ele não tenha conhecimento da tamanha contribuição que gerou a minha vida. Não apenas o tão desejado título, mas a ética com que trata as coisas e as pessoas, a justiça com que aplica seus conhecimentos, o zelo com que cuida e busca o melhor, foram o melhor incentivo para continuar a enfrentar essa dura estrada da vida. O senhor me fez acreditar novamente na educação e a mudança através dela. Muito obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntos, mas obrigada ainda por confiar no meu trabalho. Não é a toa que continuaremos, se Deus assim permitir, a caminhada juntos.

A Profa e coorientadora Dra . Cássia Cristina Fernandes Alves, pela intensa colaboração, incentivo, amor pela pesquisa, mas principalmente pelo zelo com que trata seus alunos. Professora, tenho certeza que Deus mandou a senhora para ser luz em nosso caminho. Nos momentos mais difíceis, a senhora estava lá, pegando em nossa mão e dizendo: vamos juntos. Nunca esquecerei tudo o que fez por mim.

Aos Professores Dr. Allan Costa e Fabiano Silva pelos empréstimos dos laboratórios, pela organização e disponibilidade dos mesmos. É notório o cuidado com que este patrimônio é gerido e disponibilizado à comunidade científica.

As queridas secretarias do programa de pós graduação em Agroquímica, Pâmella e Renata, que sempre me atenderam tão bem, com tanta paciência e prestatividade.

Aos professores do Programa de Agroquímica pela dedicação e bom trabalho realizado.

Aos meus colegas da Agroquímica, aos quais dividimos disciplinas, lanches, experiências científicas e risos, Giovani, Mailon, WMarley, Valéria, . Aos queridos do laboratório de Química de Produtos Naturais que sempre me auxiliaram com tanto carinho, Wendel, Alline, Flávia, Rodrigo, Isa, Hellen. Mas o mais especial de tudo, é que em meio à disciplinas e desesperos, Deus me permitiu encontrar também a amizade verdadeira, personificada em Anna Carolina Valadares e Josemar Filho. Talvez eles não saibam, mas por tantas vezes trouxeram conforto ao meu coração, por tantas vezes não me deixaram só, almoçando ou realizando experimentos, por tantas vezes foram meu esteio, meu incentivo. O Pai Celestial me deu de presente, e eu só posso agradecer a Ele pela vida da Carol e do Zeca.

As minhas queridas colegas de Laboratório de Biomoléculas e Bioensaios, nosso LABIBI, que por muitas vezes foi a minha casa. Altina, Taciane, Cinthia, obrigada por dividir momentos. Ana Cláudia, talvez uma das melhores pessoas que já conheci em minha vida, que nunca hesitou em nos ajudar nos experimentos, e ainda disponibilizar seu tempo conosco. O que é seu está guardado: e eu tenho certeza que é o melhor. Sarah, um anjo que simplesmente me acolheu. Desprendeu manhãs para me mostrar o caminho mais fácil, não me deixou sofrer com a “acetilcolinesterase”, e com toda calma, foi a melhor professora que alguém poderia ter. Não tenho palavras para agradecer. E Deus ainda me reservaria, duas novas irmãs, Marcela e Silvania, companheiras de luta, de chuva, de coleta de material, de laboratórios, de comidas, de artigos e apresentações quase impossíveis. Muito obrigada por todo o companheirismo. Muito obrigada por deixarem o experimento de vocês para outro momento, para priorizar o meu, para que eu pudesse estar no Doutorado com vocês! E principalmente, muito obrigada por tudo.

À minha colega de casa e amiga Sarah Lopes, por todo cuidado comigo e com a nossa casa e a Dona Maria por permitir que fizéssemos um lar.

À minha família, primos queridos que são irmãos. Camila, Carla, Celso Filho, Victor, Sandro, Nathalia, meus sobrinhos Amanda, Rodrigo e Isabela. Aos meus tios e incentivadores Miron e Marly, àquelas que não estão mais conosco, Tio Celso e Tia Fátima, que sempre acreditou em mim, sempre viu o melhor, sempre disse que eu seria a primeira doutora da família: estamos no caminho, Tia amada!

As minhas “best friends” Joyce e Lílian, que sempre estiveram comigo, em todos os bons e maus momentos. Choraram comigo e hoje podem “vibrar” também. Essa conquista também é de vocês.

Aos meus amigos “Preguicinhas” Allan, Ricardo, Emanuel, Tiago, Barretos, Hellena, Gabriel, Juliana, Maicon e Renildo por todo apoio e principalmente, Isabella Emerick,

amiga e companheira, que me ensinou, através da sua garra, que não se pode desistir tão fácil. E com o nosso jeito “patrola”, chegamos e fazemos.

Aos meus amados irmãos e amigos da Igreja Presbiteriana do Setor Universitário, que sempre andaram junto comigo. Aos pastores e amigos Wellington e Israel, que riram meu riso e choraram meu pranto. Em especial, aos meus conselheiros, Alberto e Elisene, que sempre me indicaram o caminho, com muita sensatez. Vocês são exemplo para mim. Ao Ronnie, por estar ao meu lado em dias tão pesados e transformá-los em leves.

Aos meus queridos Grapes por toda amizade. De forma incondicional. Meus afilhados Bárbara, Júnior, Sandra e Lecio, que sempre foram meu ombro amigo. Karol e Thiago sempre trazendo alegria. Fernanda minha amiga e companheira. Michelle e Fabiano sempre preocupados. Marina sempre cuidadosa. E Gustavo, meu amigo e companheiro de tempos difíceis de Campus 2 da UFG. Saiba meu querido amigo, que eu nunca vou esquecer o que você já fez por mim. Se estou vencendo essa etapa agora, é porque tive vocês sempre por perto.

Aos meus colegas do Instituto Federal de Goiás, Campus Goiânia, pelos empréstimos de laboratórios, equipamentos e conhecimentos. As minhas alunas de iniciação científica, Gabriella e Beatriz, e aos técnicos do departamento de Química, em especial ao Leonardo, sempre muito prestativo e pro-ativo. Quero também agradecer aos colegas do corpo docente desta valorosa instituição. Ao Professor Sérgio Botelho que sempre foi um pai pra mim. Puxou minha orelha quando necessário, mas também cedeu o ombro quando as forças estavam por acabar. Me incentivou a buscar, me chamou de colega, me fez ver que podia mais. Muito obrigada mesmo, Botelho. Aliás, este departamento é dotado de professores que foram escolhidos a dedo, pela ética e dedicação ao trabalho. Orgulho de poder ter trabalhado com vocês. Meus colegas, que se tornaram amigos. Waléria sempre incentivando o melhor, Aline sempre acreditando e dizendo palavras que nos trazem paz, Hernane sempre realista e sensato, e ao mesmo tempo, amigo e afetuoso. Alessandra, que me auxiliou inclusive com os conhecimentos na Orgânica, que se tornou a mais competente chefe, administrando tão bem a coordenação, e mostrando ser não só eficiente, mas também humana, ética, companheira. Valores estes que desejo, sinceramente, que sejam herdados pelo seu príncipe Felipe, que amo tanto. E por último, não poderia deixar de agradecer ao meu querido Marcos dos Reis. Como Deus pode fazer um ser tão bom? Meu amigo, você é tão parecido com Cristo. Louvo a Deus por sua vida, por sua paciência com minhas lamúrias, por seu incentivo, por minimizar os problemas e dizer: só vai lá e defende, Joema! Você sempre com a razão. Obrigada por todo auxílio. Em absolutamente tudo.

A todos, que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho, e que no calor da emoção deste término de mestrado, possa ter ocultado,

BIOGRAFIA DO AUTOR

Natural de Goiânia-Goiás, filha de Edicássia Rodrigues de Moraes Cardoso e João Alcione Cardoso Santos, nasceu em 29 de janeiro de 1983. Em 2000, iniciou sua vida acadêmica, graduando em 2006 em “Engenharia de Alimentos” e em 2007 em “Química Industrial”. Trabalhou no controle de qualidade na Unilever Best Foods em 2007 e da Ambev – Companhia de bebidas das Américas em 2008. Foi professora na Escola Senai Vila Canaã de 2008 a 2012 e professora substituta no Instituto Federal de Goiás – Campus Goiânia, de 2015 a 2016. Em 2016, iniciou no curso de pós-graduação em Agroquímica no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia sob orientação do Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira e coorientação da Profa. Dra. Cássia Cristina Fernandes Alves.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1.Família Myrtaceae	17
1.2. <i>Eugenia punicifolia</i>	18
1.3. Atividade antioxidante	20
1.4.Acetilcolinesterase	22
1.5.Bioinseticidas	22
2. OBJETIVOS	24
2.1.Objetivo geral	24
2.2.Objetivos específicos	24
CAPÍTULO 1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE ACETATO DE ETILA, METANÓLICO, E AQUOSO DAS FOLHAS DE <i>Eugenia punicifolia</i> E ATIVIDADE INIBITÓRIA ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS FRENTE À ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	27
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1.Material Botânico	26
2.2.Obtenção do extrato bruto	28
2.3.Fracionamento do extrato metanólico	29
2.4.Fracionamento do extrato de acetato de etila	29
2.5.Fracionamento do extrato aquoso	30
2.6.Caracterização do perfil químico	30
2.7. Análises dos extratos brutos por HPLC	31
2.8.Análises Cromatográficas CDD – Análise Qualitativa	31
2.9. Soluções do extrato vegetal	32
	33

2.10.	Ensaio da atividade enzimática da acetilcolinesterase	33
2.11.	Análises dos resultados da inibição da enzima acetilcolinesterase	33
2.12.	Constante de KI	34
2.13.	Análise Estatística	
3.	RESULTADOS	35
3.1.	Análise Química	35
3.2.	Análise por HPLC	35
4.	CONCLUSÕES	43

**CAPÍTULO 2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FENÓIS TOTAIS DOS
EXTRATOS METANÓLICO E DE ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE
*Eugenia punicifolia***

1.	INTRODUÇÃO	51
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	52
2.1.	Material e Métodos	52
2.2.	Preparo das amostras	52
2.3.	Análise qualitativa da atividade antioxidante	53
2.4.	Análise quantitativa da atividade antioxidante pela captura de radicais livres com o teste de DPPH	53
2.5.	Determinação de fenóis totais	54
2.6.	Análise estatística	54
3.	RESULTADOS	55
3.1.	Análise de Fenóis Totais	55
3.2.	Análise de atividade antioxidante em CCD	56
3.3.	Análise de atividade antioxidante por DPPH	57

4. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
CONCLUSÃO GERAL	66
CONCLUSÃO GERAL	67

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Tabela de Atividade Antioxidante das concentrações 50 mg;mL, 25 mg;mL , 12,5 mg;mL , 6,25 mg;mL , 3,125 mg;mL , 1,625 mg;mL de Extrato Metanólico de <i>Eugenia punicifolia</i>	56
Tabela 2. Tabela de Atividade Antioxidante das concentrações 50 mg;mL, 25 mg;mL , 12,5 mg;mL , 6,25 mg;mL , 3,125 mg;mL , 1,625 mg;mL de Extrato de Acetato de Etila de <i>Eugenia punicifolia</i>	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Eugenia punicifolia</i> (cereja do cerrado)	18
Figura 2 – Frutos de <i>Eugenia punicifolia</i>	18
Figura 3 – Estrutura Química do b-Cariofileno	19
Figura 4 – Principais rotas do metabolismo secundário	19

CAPÍTULO 1

Figura 01 –Cromatograma e Espectrograma do extrato bruto de acetato de etila	36
Figura 02 –de Miricetina Cromatograma e Espectrograma do extrato bruto aquoso	37
Figura 03 – Cromatograma e Espectrograma do extrato bruto metanólico	37
Figura 04 –Molécula de Miricetina	38
Figura 05 –Representação das bandas de absorção do anel A e B da molécula	39
Figura 06 –Molécula de Rutina	38
Figura 07 –Flavona	40
Figura 08 – CCDC de inibição de acetilcolinesterase em relação aos extratos brutos aquoso, metanólico e de acetato de etila da <i>Eugenia punicifolia</i>	42
Figura 09 – CCDC inibição enzima	43
Figura 10 – Porcentagem de inibição dos extratos metanólicos	44
Figura 11 – Porcentagem de inibição dos extratos de acetato de etila	45
Figura 12 – IC50 do extrato metanólico de <i>Eugenia punicifolia</i>	46
Figura 13 – IC50 do extrato metanólico de <i>Eugenia punicifolia</i>	47

ÍNDICE DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACIONES E UNIDADES

DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
EP	<i>Eugenia punicifolia</i>
EA	Extrato de Acetato de Etila
EM	Extrato Metanólico
BHA	hidroxianisol butilado
TBHQ	terc-butilhidroquinona
BHT	hidroxitolueno butilado
PG	galato de propilo
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CH/GC	Cromatografia Gasosa
CCD/ CCDC	Cromatografia em Camada Delgada

SANTOS, JOEMA RODRIGUES CARDOSO. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, março de 2018. Composição Química e Atividades antioxidantes e inibitória enzimática das folhas de *Eugenia punicifolia* frente à acetilcolinesterase. Orientador: Dsc. Paulo Sérgio Pereira. Coorientador: DSc. Cássia Cristina Fernandes Alves.

RESUMO

O cerrado possui um grande potencial vegetal, visto que diversos estudos têm demonstrado as diversas atividades destas espécies. A família Myrtaceae é, sem dúvida, uma das mais importantes nas diferentes comunidades neotropicais e tem sido frequentemente citada em estudos científicos realizados em quase todas as formações vegetais relacionadas ao bioma Cerrado. Dentre suas várias espécies, temos a *Eugenia punicifolia*, Myrtaceae característica da região do Cerrado, tem demonstrado efeitos colinérgicos, podendo ser utilizado como potencial inibidor da enzima acetilcolinesterase. Uma alternativa em relação aos problemas da grande utilização de agrotóxicos no Brasil e suas consequências, seria o uso de inseticidas botânicos, visto que o país possui um grande potencial fitoquímico. Os carbamatos e organofosforados são classes de inseticidas utilizadas em todo o mundo, e são inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima hidrolisa a acetilcolina (ACh), um neurotransmissor colinérgico, responsável pela propagação de impulsos nervoso no Sistema Nervoso Central. Desta forma, este projeto tem por objetivo analisar e identificar o potencial químico, antioxidante e atividade inibitória do extrato de *Eugenia punicifolia* sobre a enzima acetilcolinesterase. O efeito inibidor dessa enzima foi avaliado a partir do método de cromatografia de camada delgada de forma qualitativa, e o método de microplaca para análise quantitativa, bem como as características fitoquímicas dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Os extratos de acetato de etila e metanólico das folhas de *E. punicifolia* demonstraram ter um elevado potencial antioxidante, podendo ser justificado pela presença de compostos fenólicos analisados a partir do HPLC. Foi possível identificar também um elevado potencial inibidor no extrato de acetato de etila e um moderado potencial inibidor do extrato metanólico, ambos em relação à acetilcolinesterase e, podendo ser sugerido como um possível inseticida botânico.

Palavras chave: acetilcolinestare, Antioxidante, *Eugenia punicifolia*.

SANTOS, JOEMA RODRIGUES CARDOSO. Instituto Federal Goiano - Rio Verde Campus - GO, March 2018. Chemical composition and antioxidant activities and enzymatic inhibition of leaves of *Eugenia punicifolia* against acetylcholinesterase. Advisor: Dsc. Paulo Sérgio Pereira. Co-orientator: DSc. Cássia Cristina Fernandes Alves.

ABSTRACT

The cerrado has a great vegetal potential, since many studies have demonstrated the diverse activities these species. The Myrtaceae family is undoubtedly one of the most important in the different Neotropical communities and has been frequently cited in scientific studies conducted in almost all plant formations related to the Cerrado biome. Among its various species, we have *Eugenia punicifolia*, Myrtaceae characteristic of the Cerrado region, has shown cholinergic effects, and can be used as a potential inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase. An alternative to the problems of the great use of agrochemicals in Brazil and its harmful consequences would be the use of botanical insecticides, since the country has a great phytochemical potential. Carbamates and organophosphates are classes of insecticides used worldwide, and are inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). This enzyme hydrolyzes acetylcholine (ACh), a cholinergic neurotransmitter responsible for the propagation of nerve impulses in the Central Nervous System. In this way, this project aims to analyze and identify the chemical potential, antioxidant and inhibitory activity of *Eugenia punicifolia* extract on the enzyme. The inhibitory effect of these enzymes was evaluated by the qualitative method of thin layer chromatography, and the microplate method for quantitative analysis, as well as their phytochemical characteristics by High Performance Liquid Chromatography. The ethyl acetate and methanolic extracts of *E. punicifolia* have been shown to have a high antioxidant potential and can be justified by the presence of phenolic compounds analyzed from HPLC. It was also possible to identify a high inhibitory potential in the ethyl acetate extract and a moderate inhibitory potential of the methanolic extract, both in relation to acetylcholine and can be suggested as a possible botanical insecticide.

Key words: acetylcholine, Antioxidant, *Eugenia punicifolia*.

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho justifica-se pela diversidade do Bioma Cerrado, frente à inovação dos nossos lançados no mercado. Verifica-se um grande potencial de desenvolvimento de novos produtos e tecnologias, além da necessidade de referencial bibliográfico sobre a utilização do potencial das espécies do Cerrado. O Cerrado que ocupa 25% do território brasileiro e é o segundo maior bioma da América do Sul, perdendo em tamanho somente para a Floresta Amazônica (PROENÇA, OLIVEIRA e SILVA; 2010). Diversas estimativas revelam que o Cerrado Brasileiro é uma das áreas de vegetação com um dos maiores índices de biodiversidade vegetal (LORENZI, 2000). Conforme dados do Ministério do Meio Ambiente, ocupa uma área de 22% do território nacional, compreendendo áreas pelos estados de Goiás e Tocantins, Distrito Federal, parte dos estados, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia (INSTITUTO CHICO MENDES, 2017).

Depois da Mata Atlântica, o Cerrado é o ecossistema brasileiro que mais alterações sofreu com a ocupação humana sendo que nos últimos anos, contudo, a expansão da agricultura e da pecuária representa o maior fator de risco para o Cerrado (WWF, 2017). Devido à crescente necessidade de valorização e preservação das espécies nativas, aliada a necessidade de novas fontes alternativas de nutrientes a custos acessíveis, maiores esforços têm sido feitos para estudar o potencial de várias espécies do Cerrado (FERNANDES *et al.*, 2012).

No contexto desse cerrado, encontram-se espécies pouco conhecidas e utilizadas, como é o caso da Cereja do cerrado (*Eugenia punicifolia*). Ela é conhecida como um pequeno arbusto que produz frutos ovalados e avermelhados, com leve sabor adocicado. Alguns estudos já apontam características químicas, físicas e biológicas referentes a esta planta, tanto para folhas quanto frutos, indicando um elevado potencial para aplicações biológicas e biotecnológicas à cereja do cerrado.

1.1. Família Myrtaceae

A família Myrtaceae apresenta espécies nativas e exóticas de grande importância para o país, as quais se distribuem em todas as formações brasileiras. O estudo da distribuição geográfica e a classificação taxonômica são de fundamental importância para ser utilizado como base em estudos científicos, bem como a utilização das espécies a nível econômico-comercial (SIQUEIRA *et al.*, 2013).

Entre as famílias de plantas investigadas até o momento, uma das que apresenta um enorme potencial fitoquímico é a família Myrtaceae, dentro da ordem Myrtales, compreende pelo menos 133 gêneros e 3.800 espécies. Os gêneros principais são *Eucalyptus*, *Eugenia*, *Leptospermum*, *Melaleuca*, *Myrtus*, *Pimenta*, *Psidium* e *Syzygium* (STEFANELLO, PASCOAL e SALVADOR, 2011).

As espécies da família Myrtaceae fornecem muitos produtos valiosos, incluindo madeira (*Eucalyptus spp*), óleos essenciais e especiarias (por exemplo, *Melaleuca spp*), e plantas hortícolas (tais como *Callistemon spp*, *Leptospermum spp*) e frutas comestíveis (como *Eugenia spp*, *Myrciaria Spp.* e *Syzygium spp*). Vários membros desta família são utilizados na medicina popular, principalmente como antidiarréico, antimicrobiano, antioxidante, antireumático e agente anti-inflamatório e para diminuir o colesterol no sangue (EBADOLLAHI, 2013).

1.2. *Eugenia punicifolia* (Cereja do Cerrado)

No cerrado encontra-se a *Eugenia punicifolia*, conhecida também como cereja do cerrado. Da família da Myrtaceae, de origem largamente distribuída em vários ambientes, tais como restingas e Cerrados e na Região Sudeste. Em relação ao cultivo, é uma planta rústica, adapta-se a vários tipos de solo e climas e aprecia iluminação solar direta. Normalmente é arbusto ou árvoreta de 1-4 m, de folhas muito variáveis no formato (de oblongo a lanceoladas) e na cor (verde-claras a verde-escuras), como observado na Figura 01, com floração exuberante que ocorre de agosto a outubro e frutificação de novembro a janeiro, como identificado na Figura 02, sendo excepcional planta melífera, além de ótima ornamental. (MUNIZ, 2017). Grangeiro *et al.* (2006), descreve a *Eugenia punicifolia* como sendo espécie de boa adaptação e com grande potencial fitoquímico.



Figura 1 – *Eugenia punicifolia* (Cereja do Cerrado) – Joema Rodrigues Cardoso Santos



Figura 2 – Frutos de *Eugenia punicifolia* (Cereja do Cerrado) – Fonte:Google Imagens, 2017.

São repetidas as referências populares verbais acerca da ação hipoglicemiante de *Eugenia punicifolia*, porém não foram encontrados estudos farmacológicos que comprovassem cientificamente esse efeito (JORGE, AGUIAR e SILVA, 2000 e BASTING, 2014).

Miresmailli e Isman (2014) relatam que esses vegetais apresentam em sua composição metabólitos secundários (Figura 3) que tem sido usado no combate às pragas, assim como este estudo objetiva com caracterização química, a atividade biológica e estudo frente à enzimas, para a *Eugenia punicifolia*.

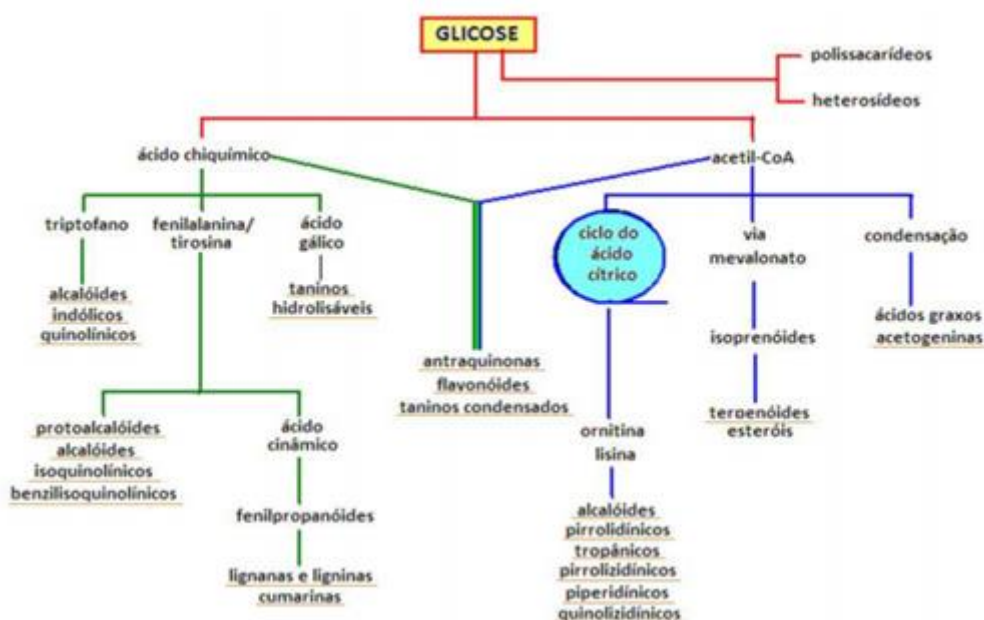


Figura 03 – Principais rotas do Metabolismo secundário

Fonte: Simões, 2001.

A rota do ácido chiquímico é a responsável pela produção de metabólitos especiais como componentes fenólicos (DUARTE, 2012). Os flavonoides, por exemplo, são numerosa classe de polifenóis encontrados em plantas, com propriedades antioxidantes. A ação antioxidante está relacionada com a eliminação de radicais (KLEIN *et al.*, 2016)

Maia, Zoghbi e Luz (2012) relataram que o óleo essencial das folhas de *Eugenia punicifolia*, coletadas em duas localidades diferentes da Amazônia, foram examinados por GC e GC / MS, possuíam como componentes majoritários o β -cariofileno (Figura 04), de 23,6-32,9%, também descrito em pesquisa de Júnior, Pinto e Maciel (2005), e mono- e sesquiterpenos em baixa porcentagem.

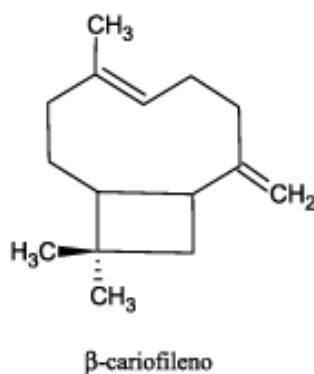


Figura 04. – Estrutura química do b-cariofileno

Fonte: JÚNIOR, PINTO e MACIEL, 2005.

Júnior, Pinto e Maciel (2005), em seus estudos, descrevem ainda que os extratos das folhas de *Eugenia puniceifolia* possuem atividade bactericida, antitumoral e anti-inflamatório, entre outras atividades biológicas descritas em literatura.

1.3 Atividade antioxidante

Entre outras atividades, a *Eugenia puniceifolia* é conhecida por possuir atividade antioxidante. Os principais antioxidantes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenóides e os compostos fenólicos, especialmente os Flavonóides. Esses antioxidantes absorvem radicais livres e inibem a cadeia de iniciação ou interrompem a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais (SILVA *et al.*, 2012).

Os antioxidantes são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-redutores desencadeados pelos radicais livres. Frequentemente, o termo “antioxidante” é implicitamente restrito aos compostos inibidores da lipoperoxidação. Entretanto, podem ser definidos mais amplamente como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações (comparadas a outras que oxidam um substrato), previnem significativamente sua oxidação (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2000 e MEZZA *et al.*, 2018).

Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para obter uma medição, seja qualitativa ou quantitativa, da capacidade antioxidante de diversos compostos, sendo a primeira, por exemplo, por CCD usando rutina como padrão positivo de comparação, e a segunda, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, tanto em teste *in vitro* quanto testes *in vivo* utilizando culturas celulares. Dentre os testes *in vitro* existentes, a capacidade de varredura do radical DPPH (1,1-difenil 2-picrilhidrazil) vem sendo cada vez mais utilizada (SPADA *et al.*, 2008; DANI *et al.* 2009; SCOLA *et al.*, 2010). O DPPH é um radical livre estável que pode ser reduzido por um antioxidante, resultando na perda de coloração que é determinada em 517 nm (YAMAGUCHI *et al.*, 1998; ESPIN *et al.*, 2000; FUKUMOTO e MAZZA, 2000).

Por terem a possibilidade de provocar efeitos toxicológicos e até mesmo efeitos carcinogênicos, o uso desses antioxidantes é limitado e tem-se observado uma busca por antioxidantes de origem natural ou a substituição parcial os sintéticos, permitindo a diminuição em produtos, sendo os mais citados: tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas. Em muitos estudos têm sido demonstrado o potencial dos óleos essenciais e de extratos, como antioxidantes de origem vegetal. No Brasil, BHA, BHT, PG e TBHQ

são os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos. A estrutura fenólica destes compostos permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (RAMALHO, 2006).

1.4. Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase é uma enzima que pertence à família das esterases, está localizada em fibras sensoriais, neurônios motores, tecidos musculares condutores e atua especificamente em locais que ocorre sinapses nervosas. Contém propriedades catalíticas, dois sub-sítios, um esterásico e um sítio aniônico, e sua função primordial é (SHAH *et al.*, 2016).

Ela se destaca dentre as colinesterases envolvidas nos mecanismos de resistência, específica do sistema nervoso central dos insetos, onde regula os níveis de acetilcolina nos terminais nervosos catalisando a hidrólise deste neurotransmissor. Os inseticidas organofosforados e carbamatos têm estruturas análogas à acetilcolina, ligam-se covalentemente a um resíduo de serina no sítio ativo da acetilcolinesterase, inibindo-a por fosforilação e carbamilação, respectivamente, conduzindo a um acúmulo de acetilcolina nas sinapses o que causa a morte dos insetos por hiperexcitação (KONO e TOMITA, 2006).

Os resultados dos estudos de inibição da acetilcolinesterase permitem o desenvolvimento de novos compostos naturais que substituam drogas sintéticas (inseticidas, praguicidas, fármacos, etc) (MOTA *et al.*, 2012).

1.5. Bioinseticidas

O controle de insetos tem sido realizado, quase exclusivamente, com a aplicação de inseticidas convencionais, entre eles, piretróide, neonicotinóide, carbamato, fenilpirazol e sulfona fluoralfática (BRASIL, 2018), que podem provocar impactos ao ambiente e ao homem, além de acarretar considerável aumento no custo da produção

agroflorestal nacional. Esses princípios ativos vêm sofrendo restrições de governo e órgãos certificadores de florestas plantadas (SANTOS, 2013).

Desde modo, verifica-se a necessidade de desenvolver pesquisas para atender essa demanda, como por exemplo, a obtenção de óleos essenciais e extratos vegetais que apresentem efeito tóxico a vários insetos. As substâncias extraídas de compostos naturais podem causar mortalidade de insetos, como observado com óleos de sementes de citros, de extratos de mamonas e até Eucaliptos. Esses sesquiterpenos verificados nestas pesquisas foram capazes de modificar a composição química de formigas, por exemplo, prejudicando o reconhecimento entre elas, desencadeando comportamento de alarme e de agressão (MARINHO *et al.*, 2008).

No contexto de busca por moléculas bioativas de plantas, várias abordagens podem ser empregadas, tais como o fracionamento biodirecionado com ensaios biológicos e também podem ser conduzidos fracionamentos não biodirecionados. Entretanto, ambos ensaios apresentam algumas limitações, mas tem demonstrado atividade biológica contra o controle de pragas satisfatória (ALVES, 2014).

Destacam-se ainda os diversos produtos naturais provenientes de fontes vegetais, que tem sido estudados e patenteados recentemente para o controle de pragas agrícolas, ressaltando as inúmeras famílias botânicas conhecidas por produzirem metabólitos tóxicos a insetos, merecendo destaque, de estudos com vistas a avaliar o potencial de plantas de várias famílias botânicas como inseticidas (XIE *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo analisar e identificar a atividade química e inibitória dos extratos acetato de etila, metanólico e aquoso de *Eugenia punicifolia* se verificar a atividade inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase, e atividade antioxidante do mesmo.

2.2. Objetivos Específicos

- Preparar o extrato das folhas do material vegetal em diferentes polaridades através de maceração com acetato de etila, metanol e água, em diferentes polaridades;
- Avaliar os parâmetros químicos do extrato vegetal bruto;
- Identificar a atividade da enzima acetilcolinesterase e do potencial inibitório dos extratos sobre acetilcolinesterase;
- Verificar a atividade antioxidante dos extratos das folhas da *Eugenia punicifolia*.

CAPÍTULO 1

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE ACETATO DE ETILA, METANÓLICO, E AQUOSO DAS FOLHAS DE *Eugenia punicifolia* E ATIVIDADE INIBITÓRIA ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS FRENTE À ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

RESUMO

A *Eugenia punicifolia*, também conhecida Cereja do Cerrado, é uma Myrtaceae utilizada para tratar feridas e doenças infecciosas, além de ser utilizada em doenças como reumatismo, artrite e ação anti-inflamatória. Na literatura, já é possível observar relatos de identificação de taninos, flavonoides e terpenos. Os perfis químicos das espécies de *Eugenia*, de forma geral, demonstraram uma composição química diversificada com a presença de flavonoides (quercetina, miricetina, canferol), taninos, terpenos, sendo α -pineno, β -pineno, β -cariofileno, espatulenol e limoneno os componentes majoritários. Através de análises cromatográficas, tanto por camada delgada quanto por líquida de alta eficiência, pôde-se verificar a presença de Flavonóides e ácidos fenólicos nos extratos metanólico, de acetato de etila e aquoso. A *Eugenia punicifolia* tem também demonstrado efeitos colinérgicos, podendo ser utilizado como potencial inibidor da enzima acetilcolinesterase, verificado experimentalmente neste trabalho. Desta forma, este projeto teve por objetivo analisar quimicamente e identificar atividade inibitória do extrato de *Eugenia punicifolia* sobre as enzimas acetilcolinesterase, em diferentes polaridades, afim de sugerir uma futura elaboração de um produto agroquímico, a base de fonte vegetal que substitua os carbamatos e organofosforados, que são classes de inseticidas utilizadas em todo o mundo, e também são inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE).

Palavras-chave: HPLC, acetilcolinesterase, Cereja do cerrado

CHAPTER 1

CHEMICAL COMPOSITION OF METHANOL, ETHYL ACETATE AND AQUEOUS EXTRACTS OF THE *Eugenia punicifolia*

ABSTRACT

Eugenia punicifolia, also known as Cherry of the Cerrado, is a Myrtaceae used to treat wounds and infectious diseases, in addition to being used in diseases such as rheumatism, arthritis and anti-inflammatory action. In the literature, it is already possible to observe reports of identification of tannins, flavonoids and terpenes. The chemical profiles of *Eugenia* species showed a diverse chemical composition with the presence of flavonoids (quercetin, myricetin, canferol), tannins, terpenes, being α -pinene, β -pinene, β -caryophyllene, spatulenol and limonene the most important components were the Flavonoids and phenolic acids in the methanolic, ethyl acetate and aqueous extracts. *Eugenia punicifolia* has also demonstrated cholinergic effects, and can be used as a potential inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase, verified experimentally in this work. In this way, this project aimed to analyze chemically and identify the inhibitory activity of the *Eugenia punicifolia* extract on the acetylcholinesterase enzymes, in different polarities, in order to suggest a future elaboration of an agrochemical product, the vegetal source base that replaces the carbamates and organophosphates, which are classes of insecticides used worldwide, and are also inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE).

Keywords: HPLC, acetylcholinesterase, Cerrado cherry

1. INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae apresenta espécies nativas e exóticas de grande importância para o país, as quais se distribuem em todas as formações brasileiras (SIQUEIRA *et al.*, 2013). No Brasil a família Myrtaceae, possui entre 3500 a 5000 espécies, onde apresenta uma grande diversidade de espécies desta família, a qual se inclui o gênero *Eugenia*.

Dentro do gênero *Eugenia*, a *Eugenia puniceifolia*, popularmente conhecida como cereja do cerrado, é uma espécie que pertence à família Myrtaceae, sendo os frutos pequenos e arredondados, com cor vermelho-alaranjado, ricos em carotenoides e vitamina C e podem ser consumidos *in natura*.

Existem também estudos sobre o potencial da cereja do cerrado e suas folhas. *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC, é uma das plantas medicinais tradicionais inexploradas do Brasil; e são popularmente usadas em infusões aquosas como um agente terapêutico natural para tratar inflamação (MAIA *et al.*, 2001), febre (CHAVES e BARROS, 2012; SILVA, 1998), diabetes (MAIA *et al.*, 2001; LEITE *et al.*, 2010) e em infiltrações alcoólicas para o tratamento de feridas e doenças infecciosas (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Estudos fitoquímicos realizados com o gênero *Eugenia* demonstraram a ocorrência de muitas classes de constituintes, incluindo flavonoides, taninos, terpenoides e óleos essenciais (OLIVEIRA *et al.*, 2006; GALENO *et al.*, 2014).

Para análise de constituintes de extratos, Nunes e Ribeiro (2008) descrevem a cromatografia como uma técnica de separação especialmente adequada para ilustrar os conceitos de interações intermoleculares, polaridade e propriedades de funções orgânicas, com uma abordagem ilustrativa e relevante. Os métodos cromatográficos são utilizados para separar misturas contendo duas ou mais substâncias ou íons, e baseiam-se na distribuição diferencial dessas substâncias entre duas fases: uma das quais é estacionária e a outra, móvel (FONSECA E GONÇALVES, 2004). Atualmente as diferentes modalidades de cromatografia são responsáveis por mais de 70% das análises em Química Analítica (AQUINO NETO E NUNES, 2003).

A cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel é uma das técnicas mais utilizadas para a separação e elucidação de produtos naturais, sendo amplamente

empregada para o controle de qualidade analítica de matérias-primas vegetais e fitoterápicas (CÉSAR *et al.*, 2007).

A Cromatografia de líquidos de alta eficiência - High Performance liquid Chromatography (HPLC), segundo Skoog *et al.* (2014), é um tipo de cromatografia que combina a fase móvel líquida e uma fase estacionária muito finamente dividida e aplicação pode ser escolhida com base na solubilidade e na massa molecular do analito. Argenton (2010), relata que a cromatografia é uma das mais importantes análises químicas, e ressalta que a importância da Cromatografia líquida de alta eficiência devido à sua velocidade, poder de resolução, manuseio de pequenas quantidades de amostra (10^{-9} – 10^{-15} g) e pela simplicidade da técnica.

Portanto, este trabalho teve por objetivo de elucidação da composição química dos extratos acetato de etila, metanólico e aquoso de *Eugenia punicifolia* e analisar a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase frente aos extratos da *Eugenia punicifolia*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material botânico

As folhas de *Eugenia punicifolia*, foram durante o mês de fevereiro de 2017, sendo coletadas no município de Goiânia sob a latitude 16° 68' 175" S e longitude 49° 24' 581" W e identificadas pelo herbário do IF-Goiano Campus Rio Verde, com o número de depósito 256. Foram armazenadas em sacos de papel kraft, após secarem por 7 dias ao ar livre

2.2. Obtenção do extrato bruto

Para preparação do extrato foliar de *Eugenia punicifolia* em acetato de etila, foram utilizadas folhas previamente moídas, até obter um pó fino. Inicialmente, as amostras de folhas moídas foram transferidas para frascos erlenmeyer de vidro com capacidade para 3 L, e cada amostra foi homogeneizada em 1 L de acetato de etila (AcOEt). As amostras foram mantidas em repouso em temperaturas de 20 a 25°C por 24h. Após este período, as amostras foram filtradas e as soluções obtidas então rotaevaporadas

(rotaevaoprador rotativo Tecnal, TE 210), sendo o extrato foliar bruto em acetato de etila reservado em frasco de vidro. O processo de repouso, filtragem e rotoevaporação foram repetidos por mais duas vezes para cada amostra. Após a terceira filtração, as amostras foram individualmente homogeneizadas em 1 L de metanol. Estes materiais foram mantidos por 24h em repouso, filtrados e rotaevaporados para obtenção do extrato foliar bruto metanólico. Conforme foi realizado para o extrato de acetato de etila, o metanol obtido após a rotaevaporação também foi incorporado às amostras foliares, sendo repetido por duas vezes o processo de repouso, filtragem e rotoevaporação.

Os extratos foliares de acetato de etila e metanólico foram mantidos em capela de exaustão de gases até a massa dos extratos pesada ser constante. Foram, posteriormente, liofilizados e armazenados em geladeira, aguardando a sua utilização nos ensaios bioquímicos e fracionamento.

2.3. Fracionamento do extrato metanólico

Para o fracionamento dos extratos, solubilizou 10g do extrato metanólico em 20 mL de metanol em banho maria, centrifugou-se em 1000 rpm, e a porção sobrenadante (10 mL) foi retirada e aplicada na coluna cromatográfica (45 cm x 5,5 cm) empacotada com Sephadex LH20. Utilizando como fase móvel o metanol, obtendo o esgotamento do material na coluna após 47 frascos de 20 mL, e as frações foram liofilizadas e caracterizadas de acordo com o perfil químico em CCDC, e reunidas em 4 frações – FRM1, FRM2, FRM3, FRM4 - e por ainda conter extrato, 200 mL de metanol foi adicionado à coluna e coletou-se o conteúdo em dois recipientes e denominado Fração Reunida Metanólica (FRRM1 e FRRM2).

2.4. Fracionamento do extrato de acetato de etila

O extrato acetato de etila foi fracionado por um método clássico de adsorção molecular, cromatografia em coluna. Foi utilizada Sílica Gel60 0,063-0,2mm (MACHEREY-NAGEL) como fase estacionária, coluna de 5 x 25 (diâmetro x altura) e solventes hexano, acetato de etila, metanol e etanol em diferentes concentrações como

fase móvel. A coluna foi preenchida com 150g de sílica e para homogeneizar, 3 g do extrato seco foi utilizado em 500 mL da solução hexano: acetato de etila 8:2. Após preparada, parte desta foi utilizada para montar a coluna. Por ordem crescente de polaridade, 200 mL de cada uma das soluções, foi adicionada à coluna (hexano:acetato de etila 7:3, hexano: acetato de etila 1:1 e acetato de etila: metanol 95:5). O volume morto foi de 200 mL. As frações foram coletadas em 47 frascos de aproximadamente 20 mL, denominadas 1 a 47. As frações foram liofilizadas e caracterizadas de acordo com o perfil químico em CCDC, e reunidas em 3 frações – FRA1, FRA2, FRA3, e por ainda conter extrato, 200 mL de hexano:acetato foram adicionados à coluna e coletou-se o conteúdo em um único recipiente e denominado Fração Reunida de Acetato de etila (FRRA1).

2.5. Fracionamento do extrato aquoso

Após a obtenção dos extratos bruto, metanólico e de acetato de etila, o material obtido após fracionamento, por último, foi adicionada água (1000 mL – 3x), por 24 horas, e utilizou-se 3 recipientes, onde procedimento foi repetido 3x. Os extratos foram filtrados em papel de filtro e concentrados em evaporador rotatório. Em seguida foram liofilizados e armazenados na geladeira até a sua utilização nos ensaios biológicos e fracionamento.

2.6. Caracterização do perfil químico

As frações obtidas foram caracterizadas por CCDC (Cromatografia de Camada Delgada Comparativa), em placas de sílica gel, usando como revelador reativo de vanilina sulfúrica (0,5g de vanilina + 45 mL de etanol P.A 99,8% + 5 mL de ácido sulfúrico P.A). Foram utilizadas as frações, adotando a escolha de 3 e 3, nas seguintes condições: placas de sílica gel (10 x 20 cm) para fase móvel BAW (n-butanol, ácido acético e água 4:1:5, fase superior) e para a fase móvel hexano:acetato de etila 7:3. Foram reveladas com reativo de vanilina, colocadas sobre manta para aquecimento e visualizadas por lâmpadas de UV (254 e 365 nm). O solvente ainda presente nas frações foi evaporado. As frações reunidas de acordo como o perfil fitoquímico observado para extrato metanólico (FRM 1, FRM 2, FRM 3, FRM 4, FRRM1 e FRRM2) e extrato

acetato de etila (FRA 1, FRA 2, FRA3 e FRRA1). Ao método com Fast Blue B em CCDC, foram submetidas às frações reunidas, e verificadas as que apresentaram maior inibição ao teste para posterior análise em microplaca de 96 poços.

2.7. Análise dos extratos bruto por HPLC

A avaliação dos extratos brutos foi realizada por meio de HPLC (Cromatógrafo líquido acoplado ao detector de arranjo de diodo), tanto para extratos foliares de acetato de etila, metanólico e aquoso. As amostras foram dissolvidas e filtradas para análise em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência - comparativa (Shimadzu[®]), nas condições: Coluna reversa (4,6 x 250mm), fase móvel MeOH:H₂O (ácido acético 0,1%). Os solventes utilizados na eluição serão: A - água + ác. acético (0,1%), B - metanol. O tempo total de corrida proposto de 40 minutos. Como padrões foram utilizados Rutina 0,5 e 0,05 mg/mL, Isovitexina, KAQL 0,25 mg/mL, Quercitrina, Miricetina, Ácido gálico, Ácido ferrúlico, Ácido rosmarínico, Ácido clorogênico e ácido elágico.

2.8. Ensaio em cromatografia de camada delgada (CCD) – Atividade de inibição qualitativa

Após esse procedimento, a caracterização de inibidores de acetilcolinesterase foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Marston *et al*, (2002), utilizando-se a enzima acetilcolinesterase (500 U) dissolvida em 75mL de tampão Tris-HCL 0,05 M (pH 7.8), sendo adicionado albumina de soro bovina (BSA) (75 mg) a solução para estabilização da enzima (solução preparada). As amostras preparadas anteriormente da fração de acetato de etila e metanólica das folhas de *E. puniceifolia* foram aplicadas em placas de CCDC (5 x 10 cm, Si250F[®]) com fase móveis: Hexano:AcOEt (7:3), Clorofórmio:Metanol (9:1) e BAW (n-butanol:ácido acético:água, 4:1:5).

Após a secagem das placas eluídas, elas foram borrifadas com a solução estoque da enzima e secas novamente, seguindo-se a incubação, em que as placas foram mantidas em câmara climatizada a 37 °C por 20 minutos, para estabilização da enzima. Para a detecção da enzima, soluções de 1-acetato de naftila (25 mg) em etanol (10mL) (A) e

sal Fast Blue B (100 mg) em água destilada (40mL) (B), foram utilizadas (soluções já preparadas). Logo após a incubação, 1 mL da solução A e 4 mL da solução B foram misturadas e borrifadas na placa, para a observação de halos brancos de inibição após 10 minutos. Este teste se baseia na clivagem pela acetilcolinesterase do 1 acetato de naftila, para formar o 1 naftol, o qual reage com o sal Fast Blue B, para dar a coloração púrpura de diazônio e tem por vantagem oferecer rápido acesso a informações sobre a atividade e a localização da atividade relacionada a planta, pois os constituintes separados podem ser diretamente detectados nas placas de CCDC, uma vez que as regiões da placa que contêm inibidores da acetilcolinesterase aparecem como marcas brancas no fundo púrpura (MARSTON *et al.*, 2002).

2.9. Soluções do extrato vegetal

O extrato bruto e frações utilizadas no teste de inibição foram preparados em metanol ou acetato de etila, de acordo com o solvente ao qual foi macerado para a obtenção do extrato bruto. Sendo utilizadas 7 concentrações, a solução final foi de 20µg/mL, e as demais concentrações foram obtidas a partir de diluição seriada (4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625)

2.10. Ensaio da atividade enzimática da acetilcolinesterase

O ensaio *in vitro* da atividade da acetilcolinesterase foi realizado em microplacas de 96 poços adaptado a partir do método desenvolvido por Ellman (1961). A enzima hidroliza o substrato acetiltiocolina resultando na produção de tiocolina, que reage com o DTNB para produzir 2-nitrobenzoato-5-mecaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato, que pode ser detectado na absorbância de 405 nm. A leitura da placa foi realizada na leitora Elisa. Foi realizado o controle do solvente metanólico e acetato de etila para ver se o mesmo interferia na inibição, ambos não possuem resultados significados para a inibição enzimática da acetilcolinesterase.

2.10.1. Inibidor

Adicionou-se na microplaca 88µL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.5), 2µL do inibidor e 10µL da enzima e levados à B.O.D por 10 minutos a 25°C. Após esse tempo

foi adicionados nos poços mais 70 μL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.5), 10 μL de DTNB, 25 μL ACTI e levado por 60 minutos na B.O.D.

2. 10.2. Branco do Inibidor

No branco do inibidor foi adicionado 98 μL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.5), 2 μL do inibidor e levados à B.O.D por 10 minutos a 25°C. Após esse tempo, foram adicionados nos poços 70 μL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.5), 10 μL de DTNB, 25 μL ACTI e levado por 60 minutos na B.O.D.

2. 10.3. Enzima (acetilcolinesterase do *Electrophorus electricus* 5U Sigma®)

Para o controle da Atividade 100% da enzima 160 μL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.5), 10 μL da enzima, 10 μL de DTNB, 25 μL ACTI e levado por 60 minutos na B.O.D.

2. 10. 4. Branco da enzima

Para o branco da enzima foram adicionados 170 μL de tampão 0,1M (pH 7.5), 10 μL de DTNB e 25 μL de ACTI, levado por 60 minutos na B.O.D.

2.11. Análises dos resultados da inibição enzimática da acetilcolinesterase

2.11.1. Controle positivo

Para controle positivo de inibição acetilcolinesterase foi utilizado o inibidor eserina, também conhecido como fisostigmina. A curva dose-resposta para eserina foi construída a partir da concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ realizada diluições seriadas obtendo 6 concentrações. A curva de inibição foi obtida plotando a % de inibição versus o logaritmo da concentração de eserina. Os parâmetros de regressão não linear foram traçados para cada curva e os valores de IC50 foram obtidos utilizando o software Sigmaplot.

2.11.2 Determinação da porcentagem de inibição

As porcentagens de inibição sobre as enzimas foram calculadas comparando-se a absorbância das amostras (ensaio contendo extrato + enzima+ ACTI + DTNB) com o controle da enzima (ensaio contendo tampão + enzima + ACTI + DTNB). Os valores correspondentes à absorbância da enzima forneceram o referencial da atividade máxima da enzima utilizada, para a realização dos experimentos, ou seja, refere-se à capacidade máxima da enzima para a formação dos produtos a partir dos seus substratos, tendo sido considerada a atividade da enzima igual a 100%. Dessa forma, as porcentagens de inibição das amostras foram calculadas de acordo com a seguinte equação: % inibição = $[(C-A) \times 100]/C$, em que: C representa a absorbância do controle da enzima, subtraída do branco da enzima e A representa a absorbância da amostra subtraída do branco do extrato (extrato vegetal + ACTI + tampão + DTNB).

2.12. Constante de KI

A constante de dissociação (K_i) foi obtida através das análises dos resultados da inibição enzimática da acetilcolinesterase, das frações e extrato bruto metanólico e acetato de etila. Os dados foram ajustados na equação de (K_i) e aplicados ao programa software Sigmaplot 10.0, com a média de três repetições ($n=3$) \pm desvio padrão da média. Dessa forma o valor de (K_i) pode ser determinado com valor de significância $p < 0.05$.

2.13. Análise estatística

Os resultados apresentados neste estudo correspondem à média de três repetições ($n=3$) \pm desvio padrão da média. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de $p < 0.05$, aplicado pelo teste Tukey, e todas as análises foram realizadas usando o programa Sisvar Versão 5.6 Build 86.

3. RESULTADOS

3.1. Análise química

O perfil químico dos extratos foi caracterizado por Cromatografia Camada Delgada (CCDC). Os extratos metanólico e de extrato acetato de etila obtiveram rendimento 49,9045 g e de 72,3312 g, respectivamente. Sabe-se que os extratos vegetais são constituídos por substâncias de diferentes classes de produtos naturais e funções químicas. A caracterização química destas substâncias pode ser realizada utilizando de diferentes estratégias e metodologias. Peres (2002) salienta que a polaridade do solvente deverá ser de acordo com a substância que se deseja separar. Portanto, as substâncias polares e de pesos moleculares elevados quantitativamente são as extraídas principalmente nestes em metanol e água, pois eles arrastam os compostos de mesma polaridade. Já o Acetato de etila, por ter polaridade moderada, extrai substâncias de média polaridade. Para caracterizar estes extratos, são necessárias técnicas cromatográficas, bem como reações químicas e enzimáticas, as quais foram realizadas por CCDC.

3.2. HPLC

Através dos cromatogramas dos extratos brutos em acetato de etila (AcOEt), metanólico (MeOH) e aquoso (Aq), da espécie *Eugenia punicifolia* pode-se verificar, a presença de flavonoides, segundo as Figuras 01, 02 e 03, podendo relacioná-los através dos padrões de miricetina (pico em 25,1 min), rutina (pico em 26,2 min) e quercitrina (28,6 min) e ainda sugerir a presença de ácidos fenólicos, uma vez que podem ser relacionados com os padrões (ácidos: gálico (5,8 min), ferrúlico (21,7 min), rosmarínico (24,8 min), clorogênico (14,4 min) e ácido elágico (27,9 min)). Para o extrato de AcOEt pode correlacionar com padrão da Miricetina (25,1 min). Arumugam (2014), relata em sua pesquisa com extrato de folha da Myrtaceae - *Syzygium malaccense* (L.), a identificação da miricetina, usando técnicas de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e cromatografia líquida-espectrometria de massa (LCMS) como o principal composto bioativo presente no extrato. Por outro lado, em menor proporção, foi identificado o ácido gálico, o que pode ter contribuído para suas atividades antioxidantes, demonstradas neste estudo.

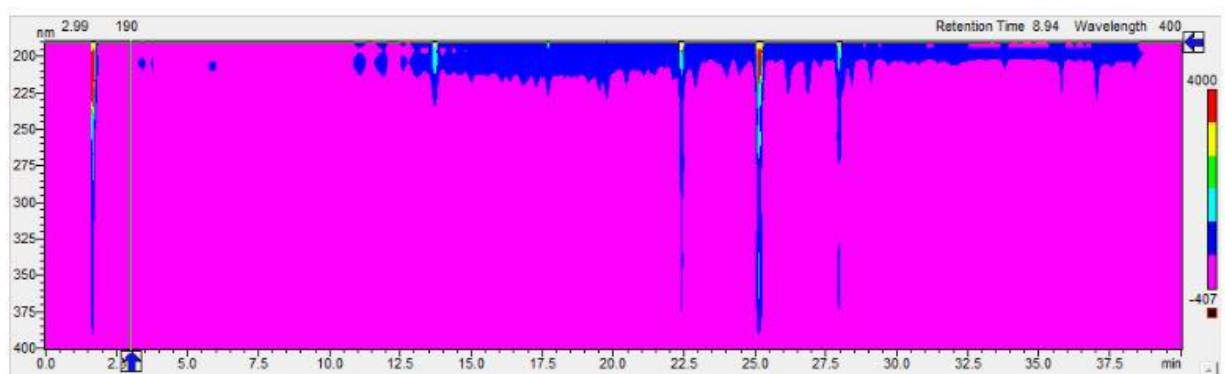
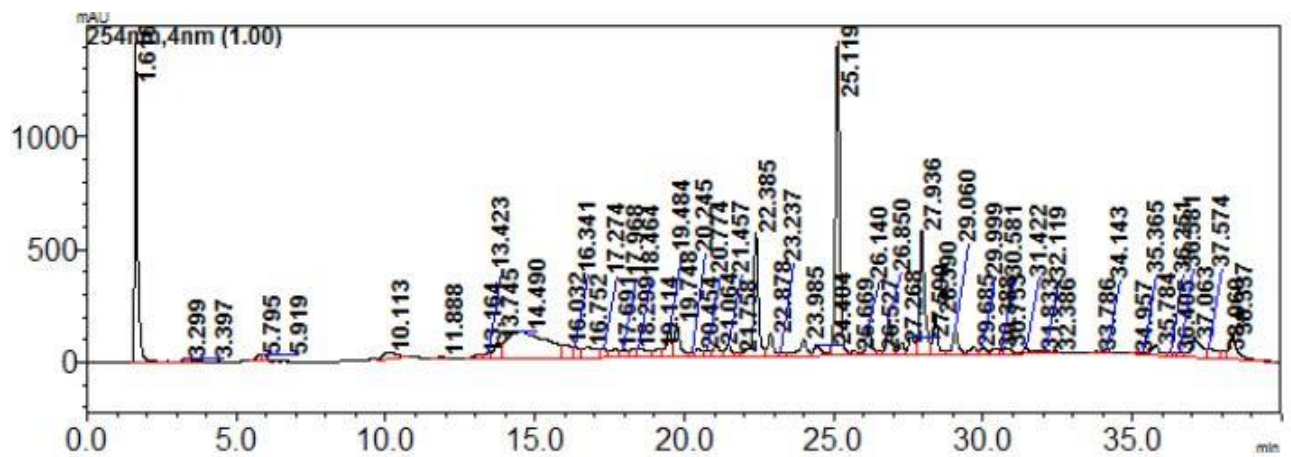
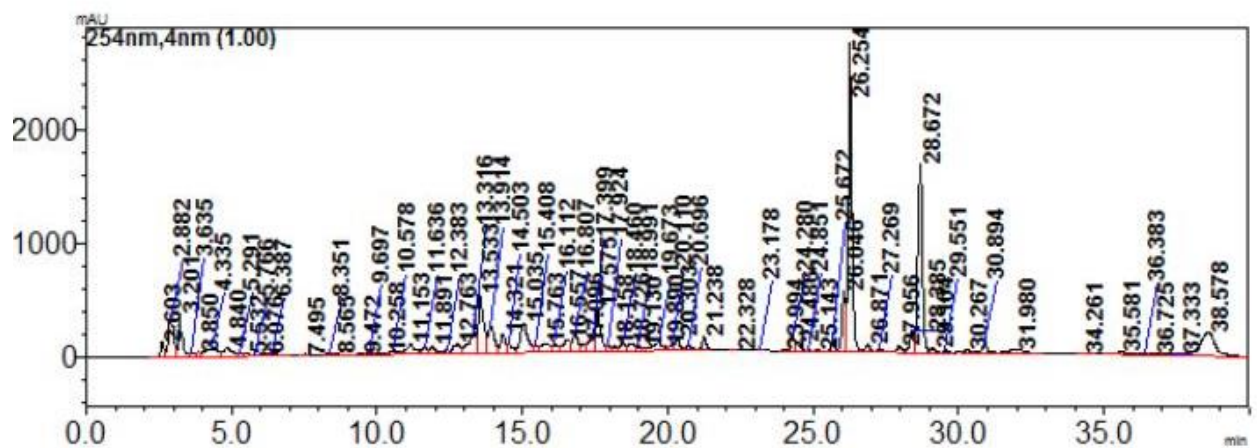


Figura 01 – Cromatograma e espectrograma do Extrato de Acetato de Etila



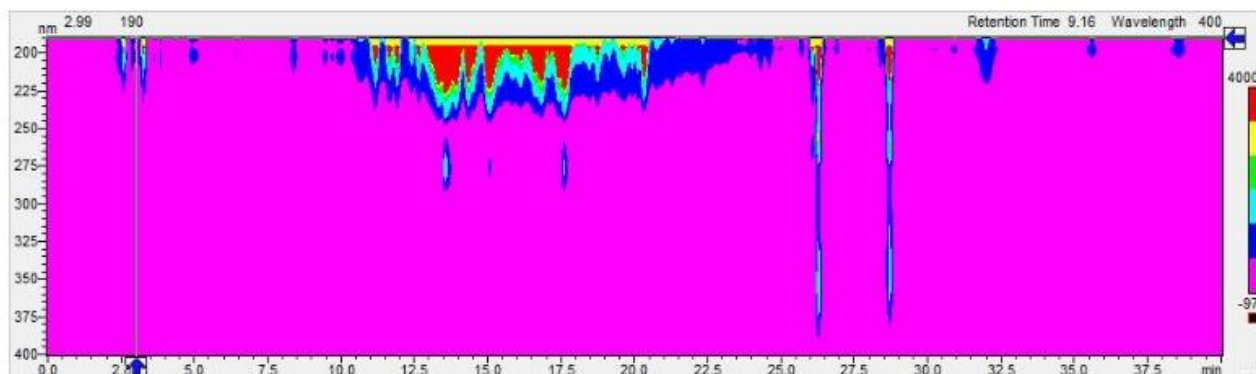


Figura 02 – Cromatograma e espectrograma do Extrato Bruto Aquoso.

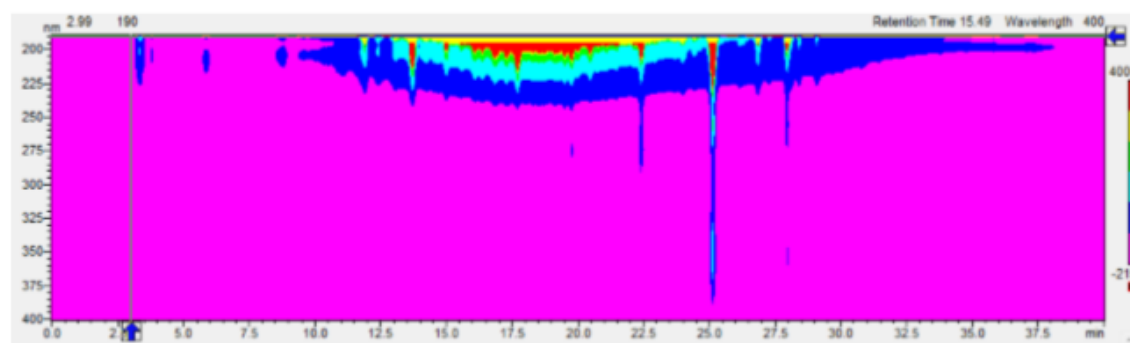
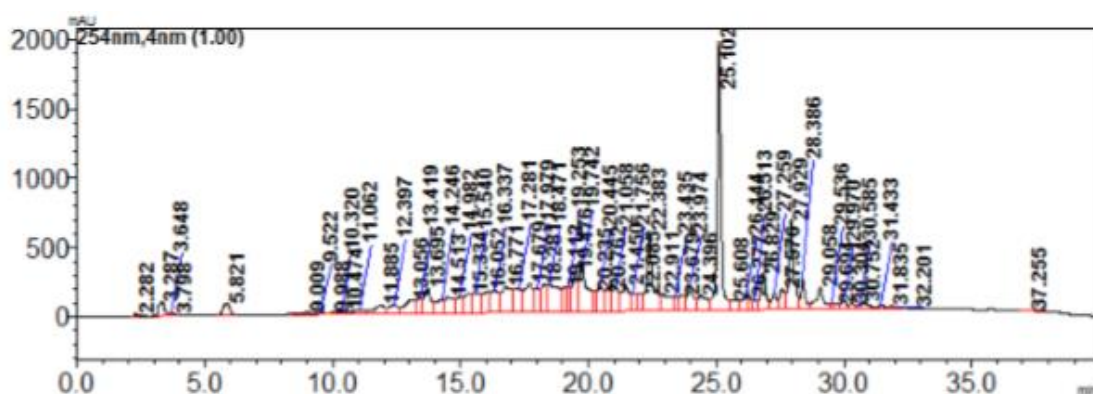


Figura 03 – Cromatograma e espectrograma do Extrato Bruto Metanólico.

Segundo Campideli (2017), as espécies de *Eugenia* apresentam uma composição química diversificada, como relatos na literatura da presença de terpenos, derivados flavonoidicos (quercetina, metoxiquercetina, miricetina) e outros fenólicos como chalconas, taninos e flavonas. Para a *E. punicifolia*, seus extratos, MeOH e de AcOet,

podem-se relacionar com os padrões de Miricetina e também Ácido Elágico. As espécies de *Eugenia* apresentam uma composição química diversificada, como relatos na literatura da presença de terpenos, derivados flavonoidicos (quercetina, metoxiquercetina, miricetina) e outros fenólicos como chalconas, taninos e flavonas. Oliveira *et al.* (2013), realizou estudo fitoquímico das folhas de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae), relatou a presença de compostos fenólicos presentes nesta Myrtaceae, coletada em Samoa (Oceania), e levou ao isolamento de quatro flavonóides: catequina, mearnsitrina (4'-O-metil-miricetina-3-O-a-L-ramnose), quercitrina (quercetrina 3-O-a-L-ramnose) e miricitrina (miricetina 3-O-a-L-ramnose), esta demonstrado na figura 04, corroborando com os resultados encontrados na análise dos extratos metanólico e de acetato de etila da *E. puniceifolia*.

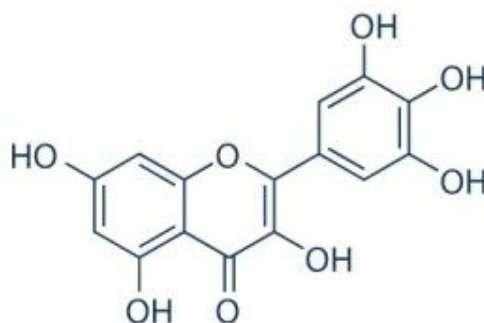


Figura 04 – Molécula da Miricetina (Crenelab, 2018).

A Miricetina é um flavonóide encontrado em muitas frutas, legumes, ervas, bem como outras plantas, que tem propriedades de antioxidante e antitumoral. Como flavonoide, possui absorção na região do ultravioleta-visível, devido ao cromóforo benzeno, e segundo Pavia *et al.* (2010), e através da ressonância entre as ligações duplas dos anéis. Os espectros de flavonóis exibem duas bandas de maior absorção na região de 240-400 nm. A região das bandas de absorção características para flavonoides são apresentadas na Figura 05, mostra o espectro de absorção do flavonol miricetina-3-O-ramnosídeo, substância da classe dos flavonoides, encontrado no trabalho de Campideli (2017), com experimento com três espécies *Eugenia*.

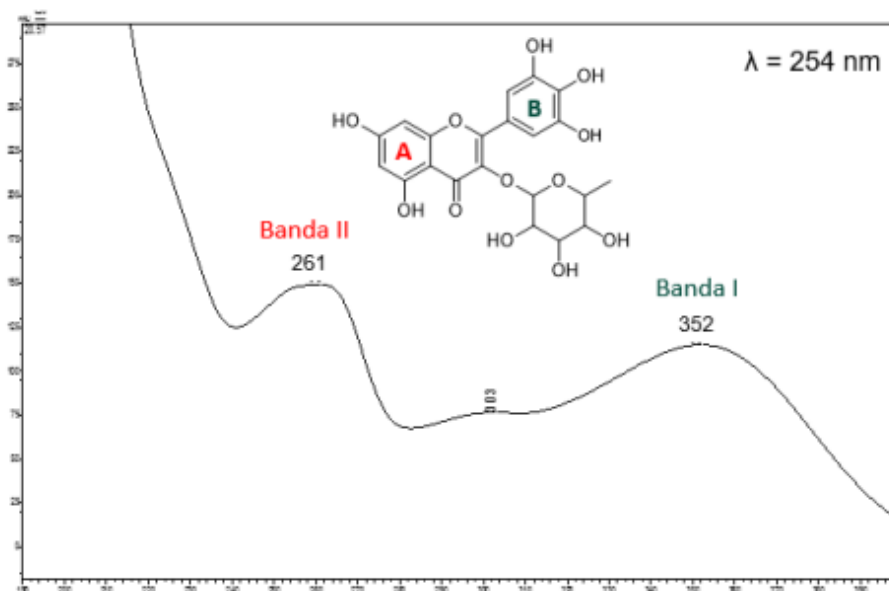


Figura 05 – Representação das bandas de absorção do anel A e B da molécula de miricetrina (CAMPIDELI, 2017).

O extrato metanólico, pode-se relacionar ao padrão de Rutina (Figura 06) e Quercitrina, corroborando com estudos de Reynertson *et al.* (2008), que trabalhou com extratos metanólicos de 14 espécies de frutas da família Myrtaceae, *Eugenia aggregata*, *E. brasiliensis*, *E. luschnathiana*, *E. reinwardtiana*, *Myrciaria cauliflora*, *M. dubia*, *M. vexator*, *Syzygium cumini*, *S. curranii*, *S. jambos*, *S. javanicum*, *S. malaccense*, *S. samarangense*, e *S. samarangense var. Taiwan rosa* e pode verificar um teor significativo dos padrões de cianidina 3-glucósido, delphinidina 3-glucósido, ácido elágico, kaempferol, miricetina, quercetina, quercitrina e rutina, método quantificado por HPLC-PDA, sugerindo assim, a presença de flavonoides, ácidos fólicos em Myrtaceae. Sabe-se que, os fenólicos, em plantas, são essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agente antipatogênico e contribuir na pigmentação.

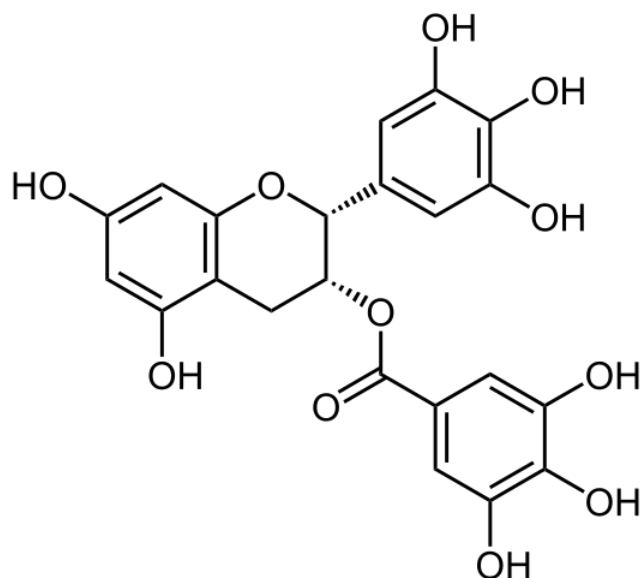


Figura 06 – Molécula de Rutina (COMMOS, 2018).

No estudo de Oliveira *et al.* (2006), verificou-se o isolamento e identificação de 5,7,3',4',5'-penta-hidroxi-flavonol, 5,7,3',5'-tetra-hidroxi-4'-metoxi-flavono, ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico e ácido 3-acetil-urs-12-en-28-óico das folhas e da casca do caule gênero *Eugenia*, corroborando com os resultados desta pesquisa. Coutinho, Muzitano e Costa (2009), destacam os grupos fenólicos como mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, quando se trata de Flavonoides ou Bioflavonoides. Essa classe de metabólitos secundários é amplamente distribuída no reino vegetal. São encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos. Assim como demonstrado na Figura 07, a flavona apresenta um núcleo característico C6-C3-C6, sendo biossintetizados a partir das vias do ácido chiquímico e do ácido acético .

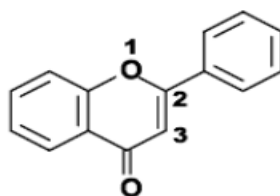


Figura 07 – Molécula da Flavona.

Em estudos de Colla *et al.* (2012), verificou-se, em ensaio de inflamação das vias aéreas, foi observado que o flavonoide isoquercitrina (quercetina-3-O-β-D-

glucopiranosídeo), também apresentou atividade anti-inflamatória, juntamente com quercetina. Dessa forma, sugere-se que estes flavonoides possuem potencial promissor no desenvolvimento de uma nova terapia antiasma.

Comparando outros artigos na literatura relataram atividades biológicas a partir de extratos, óleos essenciais e compostos isolados da *E. puniceifolia*, o óleo essencial mostrou atividade antibacteriana promissora contra *Staphylococcus aureus* (Magina et al., 2009). O extrato bruto das folhas demonstrou uma atividade antioxidante interessante, provavelmente relacionada ao conteúdo fenólico e flavonóide (Magina et al., 2010), e também exerceu um efeito semelhante ao antidepressivo no teste de suspensão da cauda em camundongos (COLLA et al., 2012).

Pode-se verificar os cromatogramas e espectros de UV para os extratos de acetato de etila, aquoso e metanólico (Figuras 5, 6 e 7), que foram comparados aos padrões de Rutina, Quercitrina e Miricetina, demonstrados em Apêndice (Apêndice A, B, e C).

Alguns flavonóides como miricetina, quercetina e rutina, bem como outros compostos fenólicos como catequina, galocatequina e ácido gálico foram identificados por PIETROVSKI et al. (2008), que também registrou triterpenos tais como a-amirina, β -amirina, betulina, ácido 29-hidroxi-oleanólico, ácido ursólico, ácido betulínico e ácido oleanólico a partir de suas folhas de *Eugenia* (FRIGHETTO et al., 2005; MAGINA et al., 2012; LIMA et al., 2014). Além disso, em estudos sobre os frutos da *Eugenia puniceifolia*, foram identificados alguns compostos fenólicos, tais como antocianinas, flavanóis, flavonóis, elagitaninas e carotenóides, utilizando técnicas que incluem HPLC-ESI-MS / MS (REYNERTSON et al., 2008; FLORES et al., 2012; SILVA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2015). A maioria das substâncias acima mencionadas provaram atividades antiinflamatórias e outras biológicas (Di Carlo et al., 1999; Huguet et al., 2000; Magina et al., 2009b).

Considerando o uso popular desta espécie *Eugenia*, atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória relatada, este estudo pode sugerir várias aplicações aos extratos da *Eugenia puniceifolia* e pelo seu potencial químico.

Através do perfil químico de cada fração, realizou a união delas, transformando os extratos metanólicos em 4 frações e os de acetato de etila em 3 frações, para a continuação do método de fracionamento e purificação. Através da CCDC, notou-se a presença do composto absorvidos sob a luz UV, sendo o flavonoide observado na luz UV 365nm. Halos brancos podem ser observados na figura 08, indicativo de inibição da acetilcolinesterase, realizada, primeiramente, com extratos brutos – aquoso (1), metanólico (2) e de acetato de etila (3), nesta ordem.



Figura 08 - CCDC de inibição da acetilcolinesterase em relação extratos brutos aquoso, metanólico e de acetato de etila da espécie *Eugenia punicifolia*.

As manchas brancas nas placas de CCDC são observadas devido à reação da enzima em converter o acetato α -naftil em α -naftol, o α -naftol irá reagir com fast blue B salt, tornando à placa em uma coloração purpura, enquanto que os inibidores da enzima acetilcolinesterase começam a formar os halos brancos (SAIKAT *et al.*, 2015).

Se houver inibição da ação Acetilconeterase - AChE, não acontece a hidrólise da ACh nas sinapses, provocando grande acúmulo anormal de ACh, conduzindo a grande estimulação que leva a alterações comportamentais, asfixia, hiperatividade e finalmente a morte. Durante o envenenamento agudo, o Sistema Nervoso Parassimpático, junções musculares e o Sistema Nervoso Central são afetados (SANTOS, 2009), conforme Figura 09.

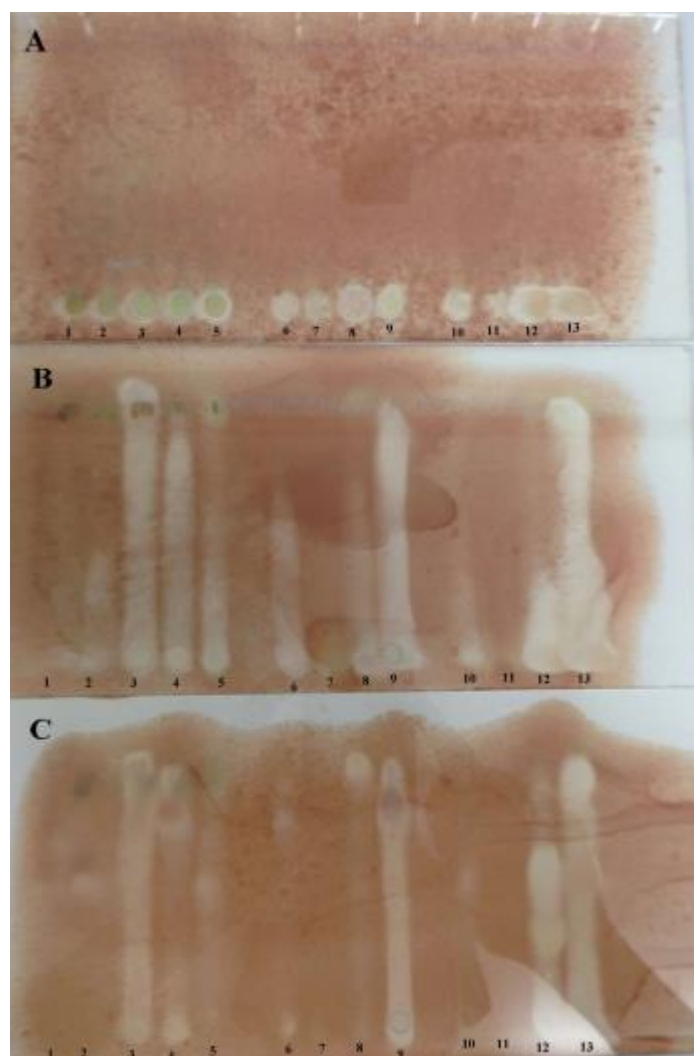


Figura 09. CCDC inibição enzimática Fast Blue B. - Espécie de *Eugenia punicifolia*. Fases Móveis: A- Hexano:AcOEt (7:3), B – CHCl₃:MeOH (9:1) e C – BAW; Revelador: AChE/Naftila/Sal Fast Blue B. Amostras: Extrato bruto aquoso (1), FRRM1 (2), FRRM 2 (3), Extrato Bruto metanólico(4), FRM1 (5), FRM2 (6), FRM3 (7), FRM4 (8), Extrato Bruto Acetato de etila (9), FRRA 1 (10), FRA1 (11), FRA2 (12) e FRA3 (13).

Através da análise da placa cromatográfica, pode-se verificar a presença de halos brancos, sugerindo então a inibição da enzima acetilcolinestare pelos extratos de acetato de etila e metanólico das folhas de *Eugenia punicifolia*. Porém, não se pode sugerir para o extrato aquoso, visto que para o mesmo não foi observada a ação desta enzima.

De acordo com Vinutha *et al.*, (2007), espécies vegetais com ação inibitória maior que 50 % são analisados como potentes inibidores da acetilcolinesterase, e valores entre 30 á 50% são classificados com atividade a moderada. Atividade de inibição menores que 30 % são avaliados como baixa atividade inibitória.

A partir dos extratos bruto de acetato de etila e metanólico pode-se afirmar que a espécie *Eugenia punicifolia* é uma potente espécie inibidora de AChE e, ainda sugerir, que esta capacidade pode estar relacionada com a presença dos ácidos fenólicos e dos flavonoides identificados por CCDC e HPLC, justificando a avaliação do potencial inibitório destes extratos, pelo teste de 96 poços. De acordo com as Figuras 10 e 11, os extratos metanólicos e de acetato apresentaram uma significativa inibição da acetilcolinesterase, podendo ser considerado em potente inibidor, diferindo significativamente entre as amostras e concentrações analisadas.

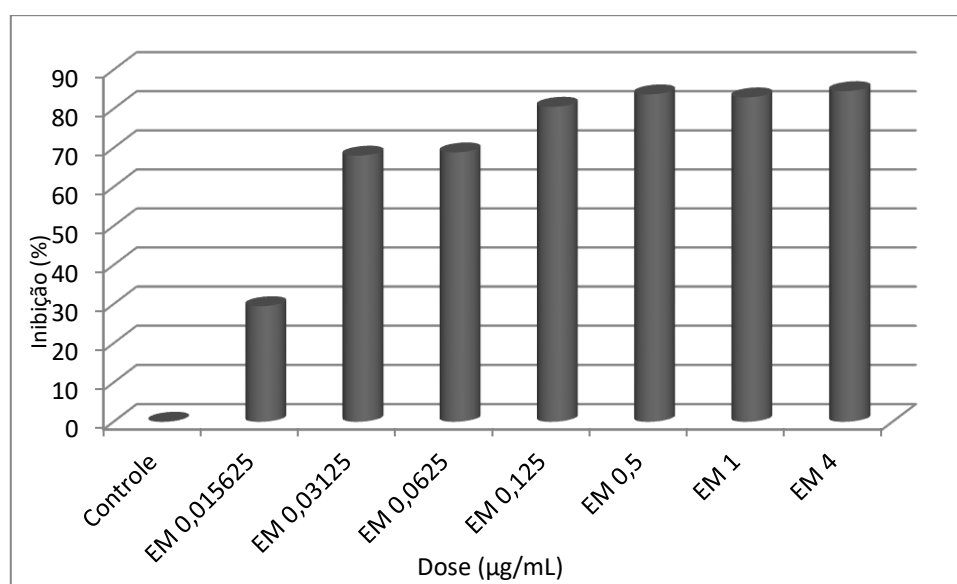


Figura 10. Porcentagem de inibição dos extratos Metanólicos de *Eugenia punicifolia* sobre a enzima acetilcolinesterase. Os valores foram expressos em média de triplicata. a e b: diferença significativa entre os extratos. A, B, C, D: diferença significativa entre as concentrações de cada extrato, $p < 0.05$ teste Tukey.

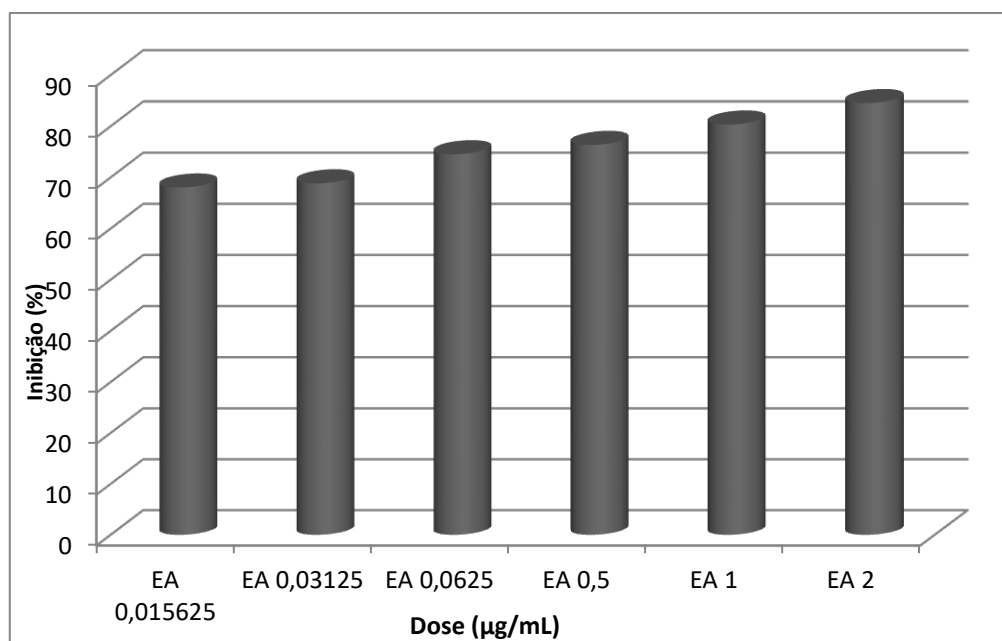


Figura 11. Porcentagem de inibição do extrato acetato de etila sobre a enzima acetilcolinesterase. Os valores foram expressos em média de todas as doses em triplicata. a e b: diferença significativa entre os extratos, $p < 0.05$ teste Tukey.

A inibição enzimática ocorre quando moléculas chamadas inibidores interferem com a catálise, interrompendo ou diminuindo as reações enzimáticas. Para a figura 10, verifica-se a porcentagem de inibição do extrato metanólico com significativa inibição a partir da dose de 0,3125 µg/mL. Eles se diferem, significativamente entre si, e entre eles, onde a maior porcentagem de inibição entre as amostras é verificada na concentração de 4 mg/mL, relativamente proporcional ao aumento da concentração.

Trabalhos de Pacual *et al.* (2012), determinaram produtos naturais, com atividade farmacológica e efeitos colinérgicos da *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae), corroborando com estudos de Grangeiro *et al.* (2006), que constataram efeitos dos extratos de *E. punicifolia* sobre neurotransmissão colinérgica na placa terminal do músculo Frênico nervo-diafragma preparação, aumentando a neurotransmissão mediada por receptores nicotínicos para acetilcolina, corroborando com os dados deste estudo.

As diferentes concentrações dos extratos de Acetato de etila da *E. punicifolia* também foram avaliadas sobre a enzima acetilcolinesterase. Os resultados mostraram que todos os extratos de acetato e suas concentrações avaliadas (0,0135 a 4 µg/mL) dessa espécie vegetal foram capazes de influenciar a ação da enzima, já em pequenas

concentrações (0,3125 µg/mL), visualizadas na Figura 11 e demonstraram inibição relevante acima de 70 %. A inibição da acetilcolinestare frente às amostras de extrato metanólico e de acetato de etila diferiram significativamente, em todas as concentrações. Ainda foi observado, uma leitura não significativa na amostra de 2 µg/mL de extrato metanólico, diferindo dos resultados observados em curva, sendo o possível erro atribuído à diluição do extrato proposto.

Segundo Vinutha *et al.* (2007), espécies vegetais apresentam inibição de AChE são classificadas em: potente (> 50% de inibição), moderada (30 a 50% de inibição) e baixa atividade inibitória (< 30% de inibição), permitindo assim, a sugestão dos extratos de acetato de etila e de metanólico (concentração superior a 0,3125 µg/mL) como potentes inibidores de AChE.

Em virtude disso, em análises de inibição, substâncias que apresentem inibição igual ou superior a 50%, calcula-se IC50 (concentração necessária para 50% de inibição) que é definido como a concentração de um inibidor requerido para reduzir 50% da atividade enzimática. Obtém-se o valor de IC50 a partir do gráfico de percentagem de inibição *versus* log na base 10 da concentração do inibidor, realiza-se uma regressão linear e os valores encontrados na equação, como pode ser visualizado nas Figuras 12 e 13.

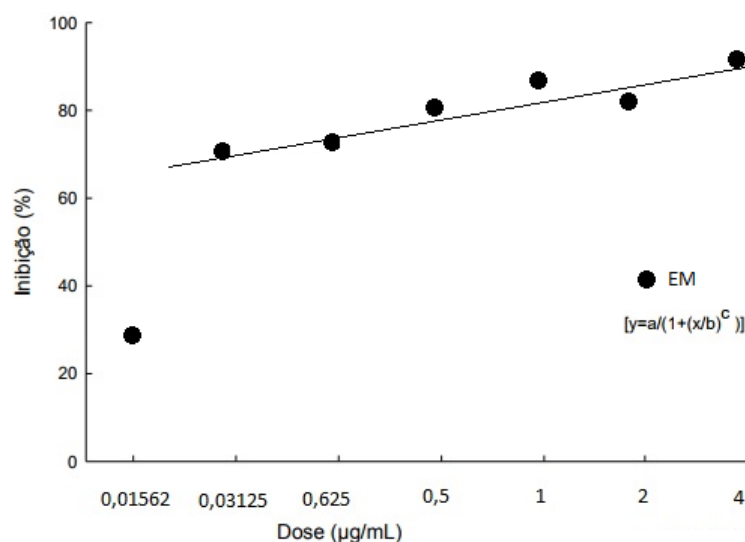


Figura 12. IC50 do extrato metanólico da *Eugenia punicifolia*.

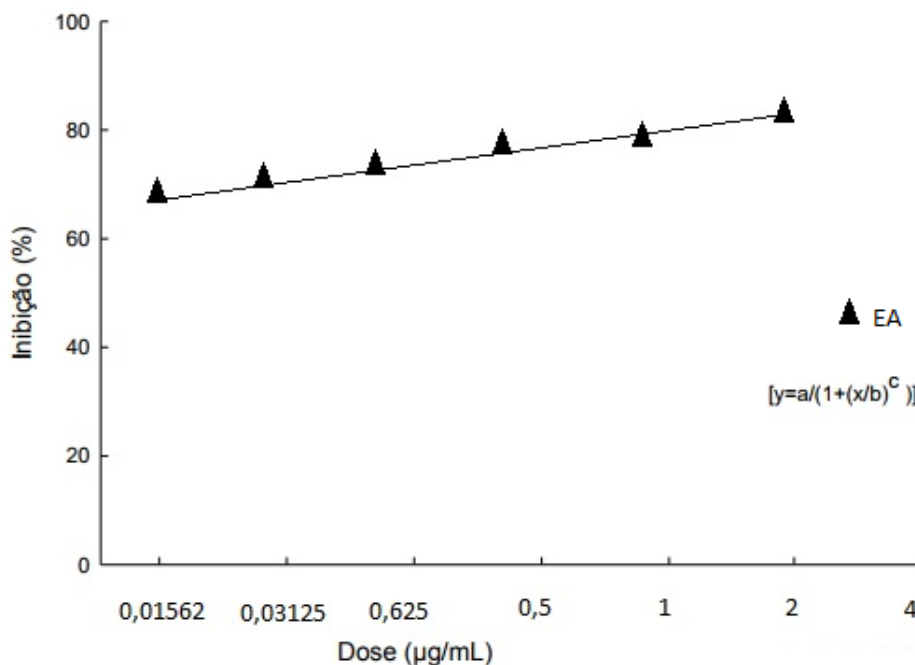


Figura 13. IC50 do extrato de acetato de etila da *Eugenia punicifolia*.

Nas respectivas figuras 12 e 13 é possível verificar a representação do IC50 da atividade anticolinesterásica dos extratos metanólico e de acetato de etila da *Eugenia punicifolia*, gráficos de percentagem versus log na base 10 da concentração do inibidor. Foi encontrado IC50 para o extrato bruto de acetato de etila de 1,18 µg/mL e para o extrato bruto metanólico de 1,68 µg/mL, diferindo de Araújo (2017) em 30,1% para acetato de etila e em 1,22% para metanólico. Apesar da diferença significativa, pode-se dizer ainda que extratos metanólicos, os resultados de Araújo (2017) corroboraram os obtidos nesta pesquisa.

Balkis *et al.* (2015), em ensaios de inibição de AChE (p maior que 0,05), apresentou IC50 de kaemferol, queretina, miricetina e baicalein valores 0,8730 µg/mL, 1,1278 µg/mL, 1,2570 µg/mL µg/mL e 1,0674, respectivamente. Segundo o autor, inibição menos acentuada de flavonoides com ordem de eficácia começando com a pigenina, perlagonidina, cianidina, Galato de epigalocatequina, crisina, galangano, melvidina, definidina e baohúsíde.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a partir dos extratos bruto, metanólico e acetato de etila e aquoso da espécie *Eugenia punicifolia* possui um considerável potencial antioxidante, podendo relacionar esta atividade à presença dos ácidos fenólicos e dos flavonóides (miricetina, rutina e quercitrina) identificados por HPLC. Sugere-se, para trabalhos futuros com a cereja do cerrado, análises mais específicas em relação ao potencial químico, como Ressonância Magnética Nuclear, a fim de quantificar este potencial

A partir dos extratos acetato de etila, Metanólico, e aquoso pode-se afirmar que a espécie *Eugenia punicifolia* é uma espécie inibidora de AChE e que possui um potencial inibitório se deve as baixas concentrações de IC50 encontradas. Sugere-se novas análises de purificação devem ser realizadas a fim de reduzir interferentes das misturas de compostos e garantir resultados com maior confiabilidade sob o modo de inibição enzimática. Sugere-se também novos testes a fim de estabelecer o potencial *in vivo* dos extratos de *E. punicifolia* frente a espécies animais, e possível aplicação e desenvolvimento de um inseticida botânico.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FENÓIS TOTAIS DOS EXTRATOS METANÓLICO E DE ACETATO DAS FOLHAS DE *Eugenia punicifolia*

RESUMO

As plantas da família da Myrtaceae tem sido investigadas no Brasil e demonstraram atividades antimicrobiana, bactericida, fungitóxica, citotóxica, anticonvulsivante e antioxidante. Entre os antioxidantes mais abundantes estão os compostos fenólicos, presentes nas plantas e estão relacionados, principalmente, com a proteção, conferindo alta resistência a microrganismos e pragas. Quando observada uma elevada atividade antioxidante, pode-se correlacioná-la à processos de inibição do risco das doenças cardiovasculares e podem atuar sobre o estresse oxidativo, relacionado com diversas patologias crônico-degenerativas, como o diabetes, o câncer e processos inflamatórios. A *Eugenia punicifolia*, é uma Myrtaceae, também considerada uma espécie frutífera nativa do cerrado. As folhas de *E. punicifolia* são popularmente utilizadas, por meio de infusão, como agente antidiarreico, depurativo do fígado, anti-inflamatório, anti-pirético, antisséptico das vias urinárias. Devido ao potencial desta planta, este trabalho teve por objetivo avaliar teor de compostos fenólicos e o potencial antioxidante da Cereja do cerrado. Os extratos da *Eugenia punicifolia* foram avaliados perante a atividade antioxidante em Cromatografia em Camada Delgada, de forma qualitativa e pelo consumo do radical estável DPPH, de forma quantitativa. Os resultados foram relevantes, tanto para extrato de acetato de etila quanto para extrato metanólico. Ambos extratos também apresentaram atividade fenólica.

Palavras-chave: antioxidante, fenólicos, Cereja do cerrado

CHAPTER 2**ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOTAL PHENOLS OF THE LEAVES OF
*Eugenia punicifolia*****ABSTRACT**

Myrtaceae have been investigated in Brazil and have demonstrated antimicrobial, bactericidal, fungitoxic, cytotoxic, anticonvulsive and antioxidant activities. Among the most abundant antioxidants are the phenolic compounds present in plants and are mainly related to protection, conferring high resistance to microorganisms and pests. When a high antioxidant activity is observed, it can be correlated to the processes of inhibition of the risk of cardiovascular diseases and can act on the oxidative stress, related to several chronic-degenerative pathologies, such as diabetes, cancer and inflammatory processes. *Eugenia punicifolia*, is a Myrtaceae, also considered a fruitful native species of the cerrado. The leaves of *E. punicifolia* are popularly used, by means of infusion, as antidiarrheal, depurative agent of the liver, anti-inflammatory, antipyretic, antiseptic of the urinary tract. Due to the potential of this plant, this work had the objective of evaluating the antioxidant potential and phenolic compounds of Cerrado cherry. It was evaluated in relation to the antioxidant activity in Thin Layer Chromatography, qualitatively and by the consumption of the stable radical DPPH, quantitatively. The results were significant for both ethyl acetate extract and methanolic extract. Both also presented phenolic activity.

Key words: antioxidant, phenolics, cherry of the cerrado

1. INTRODUÇÃO

Os antioxidantes são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-redutores desencadeados pelos radicais livres. Frequentemente, o termo “antioxidante” é implicitamente restrito aos compostos inibidores da lipoperoxidação. Entretanto, podem ser definidos mais amplamente como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações (comparadas a outras que oxidam um substrato), previnem significativamente sua oxidação (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2000) (OLIVEIRA, 2015).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química, como representado na Figura 01. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SCOLA *et al.*, 2010)

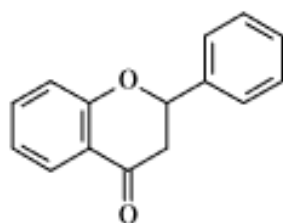


Figura 01 – Núcleo fundamental dos Flavonóides (DUARTE, 2014).

Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para obter uma medição, seja qualitativa ou quantitativa, da capacidade antioxidante de diversos compostos, tanto em teste *in vitro* quanto testes *in vivo* utilizando culturas celulares. Dentre os teste *in vitro* existentes, a capacidade de varredura do radical DPPH (1,1-difenil 2-picrilhidrazil) vem sendo cada vez mais utilizada (SPADA *et al.*, 2008; DANI *et al.* 2009; SCOLA *et al.*, 2010). O DPPH é um radical livre estável que pode ser reduzido por um antioxidante, resultando na perda de coloração que é determinada em 517 nm (YAMAGUCHI *et al.*, 1998; ESPIN *et al.*, 2000; FUKUMOTO e MAZZA, 2000).

Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com

atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (SOUZA *et al.*, 2007).

Compostos químicos que possuem atividade antioxidante geralmente são aromáticos e contêm pelo menos uma hidroxila. Podem ser sintéticos como o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT), largamente utilizados pela indústria de alimentos. Os naturais, denominados substâncias bioativas, incluem organosulfurados, os fenólicos (tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos), os terpenos, carotenóides e o ácido ascórbico que fazem parte da constituição de diversos alimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Evidências científicas permitem afirmar que a propriedade antioxidante de vegetais se deve, principalmente, a seus compostos fenólicos, encontraram uma correlação significativa e positiva ($r^2 = 0,66$, $p < 0,05$) entre a atividade antioxidante e conteúdo de fenóis totais em vegetais da dieta asiática (ROSSATO, 2010).

Com base nessas informações, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante das folhas de *Eugenia punicifolia* (cereja do cerrado).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material botânico

As folhas de *Eugenia punicifolia*, foram durante o mês de fevereiro de 2017, sendo coletadas no município de Goiânia sob a latitude 16° 68' 175" S e longitude 49° 24' 581" W e identificadas pelo herbário do IF-Goiano Campus Rio Verde, com o número de depósito 256. Foram armazenadas em sacos de papel kraft, após secarem por 7 dias ao ar livre.

2.2. Preparo dos extratos

Os extratos foram preparados com as folhas de *E. punicifolia*, que foram ao ar livre e moídos em moinho. O material moído foi extraído por maceração por 24 horas acetato de etila AcOET (1000 mL – 3x), o metanol (1000 mL – 3x), e por último a água (1000 mL – 3x), em 600 g da amostra, utilizou-se 3 recipientes, o procedimento foi

repetido 3x. Os extratos foram filtrados em papel de filtro e concentrados em evaporador rotatório. Em seguida deixados em capela até a evaporação do solvente. Após isso, foram liofilizados e armazenados na geladeira até a sua utilização nos ensaios antioxidantes e de fenóis totais.

2.3. Análise qualitativa da atividade antioxidante

Os extratos foram analisados por CCD usando rutina como padrão positivo de comparação. As placas foram eluídas em CHCl_3 / MeOH (9:1) e CHCl_3 / MeOH/ H_2O (65:30:5) e, após secagem, foram nebulizadas com solução a 0,4 mmol/L do radical DPPH em MeOH₂. As placas foram observadas até o aparecimento de manchas amarelas sob fundo de coloração púrpura, indicativo de possível atividade antioxidante.

2.4. Análise quantitativa da atividade antioxidante pela captura de radicais livres com o teste de DPPH.

As atividades de eliminação dos extratos de acetato de etila e metanólico contra os radicais DPPH foram determinadas de acordo com o método descrito por Nguyen *et al.* (2017), adaptado a um leitor de microplacas. Um volume de 100 μL de cada amostra (concentração do extrato de 50 mg/mL) foi misturado com 100 μL de solução de DPPH 2×10^{-4} M, e a partir desta concentração foi feita a de 25mg/mL, posteriormente 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,125 mg/mL e 1,5625 mg/mL. A mistura foi incubada à temperatura ambiente na ausência de luz durante 30 min e a redução dos radicais DPPH foi quantificada utilizando um espectrofotômetro UV-Visible (VersaMax Tunable™ - Molecular Devices - Sunnyvale, CA, EUA) com $\lambda = 550$ nm. O controle foi conduzido da mesma maneira, exceto que foi utilizada água destilada em vez de amostra. Uma menor absorbância da mistura reacional indica uma atividade de eliminação de radicais DPPH mais elevada.

. A atividade de eliminação de radicais DPPH foi medida utilizando a Equação 1

$$\text{Eliminação do radical DPPH (\%)} = \frac{\text{Absorbância}_{\text{controle}} - \text{Absorbância}_{\text{amostra}}}{\text{Absorbância}_{\text{controle}}} * 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

2.4. Determinação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras de extrato metanólico das espécies estudadas foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu, com modificações, adaptadas a um leitor de microplacas. O extrato metanólico (100 mg) foi dissolvido em metanol, transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume final foi completado com metanol. Uma alíquota de 7,5 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL; esta segunda solução teve seu volume acertado novamente com metanol. Uma alíquota de 100 μ L desta última solução foi agitada com 500 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo 2 mL de Na_2CO_3 a 15% foram adicionados à mistura e agitada por 30 s. Finalmente, a solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada. Após 2 h, a absorbância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos o extrato. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 350 μ g/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A Equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C = 809,0200A + 5,0827$, onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 750 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,999$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6. Análise estatística

Análise de variância (ANOVA) e comparações parciais de Tukey foram realizadas com um nível de confiança de 95% ($\alpha=0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram relatados como média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1. Análise de Fenóis Totais

Os resultados de Fenóis totais, pode-se verificar que para o extrato de acetato de etila, os valores de fenólicos 1,08 ou 108 ± 10 de AGE.100g⁻¹ de extrato e para o extrato metanólico de 0,78. ou 78 ± 10 de AGE.100g⁻¹ de extrato. Comparando com os resultados obtidos em frutos de *Eugenia punicifolia*, pode-se considerar que a mesma apresentou elevadas concentrações de compostos fenólicos totais (327 ± 10 mg de AGE.100g⁻¹ de polpa ou 390 ± 15 mg de ATE.100g⁻¹ de polpa).

Em relação à mesma família, a *E. calcyna*, apresentou menores concentrações de teores de fenólicos totais, entre 4,9 e 7,2 de AGE.100g⁻¹ e a *E. dysenterica* CFT/TC entre 15,9 e 22,5 de AGE.100g⁻¹; indicando a provável presença de compostos fenólicos simples, como os ácidos fenólicos, ou taninos hidrolisáveis (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Comparando os resultados de folhas com extratos de polpas de *Eugenia punicifolia*, a acetona a 70 % foi o melhor solvente extrator de compostos fenólicos para a maioria das frutas analisadas do que o metanol utilizado para as folhas, fornecendo teores significativamente mais elevados e melhor precisão de resultados em relação aos demais solventes avaliados; exceção para a extração de fenólicos totais em jaracatiá com etanol a 95 % e extração de taninos condensados em Guapeva com etanol a 95 %, que são de famílias diferentes e em cagaita a extração com metanol, que é da mesma família da cereja do cerrado, descritos em literatura. Os resultados finais obtidos com o solvente de eleição indicam que as frutas nativas do cerrado avaliadas neste estudo são boas fontes de compostos fenólicos (90 a 327 mg de AGE.100g⁻¹ de polpa) se comparadas com a polpa de outras frutas normalmente consumidas, tais como maracujá, abacaxi e cupuaçu (20,0 a 21,7 mg de AGE.100g⁻¹), goiaba (83 mg de AGE.100g⁻¹) uva e açaí (117,1 a 136,8 mg de AGE.100g⁻¹), morango (203-223 ATE.100g⁻¹), amora-preta (241,7 AGE.100g⁻¹), ou manga (544,9 mg de AGE.100g⁻¹) (KUSKOSKI *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2010). Canuto *et al.* 2010 encontraram teores de compostos fenólicos totais entre 0,3 e 3,5 mmol.L⁻¹ de AGE em frutas da Amazônia, sendo que algumas polpas, como a de acerola (3,5 mmol.L⁻¹ de AGE) e a de açaí (2,5 mmol.L⁻¹ de AGE) apresentaram elevado potencial antioxidante associado (ROCHA *et al.* 2010) em sua pesquisa preconiza que as plantas da Amazônia, de maneira geral, apresentam potencial antioxidante e fenólico, em seus extratos de folhas e de polpas. É observado em seus

resultados, com polpa de Eugenia, *Eugenia dysenterica* e *E. punicifolia*, os teores de compostos fenólicos totais variaram entre 90 e 327 mg de ácido gálico, conforme Curva Padrão de Ácido Gálico (Apêndice D), equivalente por 100g de polpa (ROCHA *et al.* 2010).

Para Everette *et. al.*, (2010), os compostos fenólicos presentes nas plantas estão relacionados, principalmente, com a proteção, conferindo alta resistência a microrganismos e pragas e na maioria dos vegetais, os compostos fenólicos constituem os antioxidantes mais abundantes. Rocha *et. al.* (2011), correlaciona a elevada atividade antioxidante com papel importante nos processos de inibição do risco das doenças cardiovasculares e podem atuar sobre o estresse oxidativo, relacionado com diversas patologias crônico-degenerativas, como o diabetes, o câncer e processos inflamatórios, destacando a importância da função dos antioxidantes no organismo humano.

3.2. Análise de Atividade Antioxidante em CDD – Análise Qualitativa

A avaliação preliminar qualitativa dos extratos brutos por CCD em gel de sílica, revelada com solução metanólica a 0,4 mmol/L do radical DPPH, sugeriu a existência de substâncias com atividade antioxidante, evidenciadas nas cromatoplasas pela presença de manchas amarelas sobre fundo púrpuro, resultantes da redução do radical DPPH, como pode ser observado na Figura 02.



Figura 02 - CDD da Atividade Antioxidante dos Extratos de *Eugenia punicifolia*
(1- Extrato Metanólico; 2 – Extrato de Acetato de Etila. Padrão: Rutina)

3.3. Análise de Atividade Antioxidante por DPPH

Para quantificação da atividade antioxidante dos extratos acetato de etila e Metanólico das folhas de *Eugenia punicifolia* optou-se pelo método de DPPH.

Os teores de atividade antioxidante para Extrato Metanólico da *Eugenia punicifolia* podem ser visualizados na Tabela 1, onde verifica-se que em concentração de 25 mg/mL, o extrato metanólico apresentou melhor capacidade de eliminação dos radicais livres pelo método de DPPH ($94,95 \pm 0,08$), porém, não diferença significativa se a concentração de extrato for dobrada, não justificando o uso da concentração de 50 mg/mL, Mostrou-se comparável aos controles positivos rutina ($CE_{50}=27,80 \pm 1,38 \mu\text{g/mL}$) e ácido gálico ($CE_{50}=24,27 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$), podendo ser verificado na Tabela 01.

Tabela 01 – Tabela de Atividade antioxidante das concentrações de 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,125mg/mL, 1,625mg/mL do extrato metanólico da *Eugenia punicifolia*

Amostra EM (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)
50	$91,55 \pm 0,49^a$
25	$94,95 \pm 0,08^a$
12,5	$90,62 \pm 0,18^a$
6,25	$74,42 \pm 0,02^a$
3,125	$57,41 \pm 0,12^a$
1,5625	$41,27 \pm 0,10^a$

*Diferentes letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$. Teste t)

Segundo Oliveira *et al.* (2007), em literatura estudada, verifica-se a atividade antioxidante e antifúngica correlacionado ao tipo de compostos fenólicos presentes em uma ampla variedade de vegetais. Para o extrato bruto das folhas de *Eugenia punicifolia*, em estudo de Sousa *et al.* (2007), verificou-se atividade sequestradora de radical livre com $EC_{50} = 2.538 \mu\text{g/mL}$ que é a concentração de extrato necessária para causar 50% de atividade antioxidante, essa concentração é alta se comparada com

antioxidantes comerciais como o ácido ascórbico ($IC_{50}=2,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e o BHT ($IC_{50}=5,37 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua EC_{50} e maior a sua atividade antioxidante, corroborando com os resultados obtidos para o extrato metanólico do presente estudo.

Oliveira et al. (2007), verificou a atividade antioxidante para diversos extratos vegetais de polpas de frutas como laranja e limão apresentaram os maiores potenciais de inibição do processo oxidativo do estudo, e ainda assim, menor que a atividade antioxidante da *E. puniceifolia*, na menor concentração analisada (1,5625 mg/mL).

Segundo MENSOR et al. (2001), o IC_{50} de $38,91 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato vegetal de *Ginkgo biloba* L. qualifica-o como um extrato de alta atividade antioxidante, pois apresenta a mesma magnitude que o EC_{50} de diversas plantas reconhecidamente antioxidantes como a erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). Isso demonstra que o óleo essencial de *E. puniceifolia* apresenta uma baixa atividade antioxidante quando comparado com o extrato de *G. biloba*.

Já para atividade antioxidante do extrato de acetato de etila, verificou-se valores diferentes significativamente dos valores encontrados em extrato metanólico, demonstrados na Tabela 02, onde pode ser observado, uma menor atividade antioxidante. Isto pode ser justificado pelo tipo de classe de compostos arrastados pelo solvente acetato de etila, por mesma polaridade.

Tabela 2 – Tabela de Atividade antioxidante das concentrações de 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,125mg/mL, 1,625mg/mL do extrato de acetato de etila da *Eugenia punicolia*

Amostra EA (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)
50	43,1 ± 0,09 ^a
25	41,83 ± 0,05 ^a
12,5	40,61 ± 0,06 ^a
6,25	33,48 ± 0,17 ^b
3,125	21,99 ± 0,01 ^a
1,5625	18,39 ± 0,06 ^a

*Diferentes letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$. Teste t)

Como o método eleito para as análise é o do DPPH, pode-se verificar que este baseia-se no descoramento de uma solução cor violeta de um radical livre estável quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (MARKMAN *et al.*, 2004), ou seja, baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. Tal metodologia utiliza quantidades relativamente elevadas de reagentes, padrões e amostras. Dentre esses, está o DPPH, um reagente de elevado custo. Além disso, apresentam limitações em relação ao número de análises simultâneas passíveis de serem realizadas, devido à necessidade de leitura das absorvâncias após tempo determinado (DUARTE *et al.*, 2006).

Para tanto, o método utilizado foi adaptado para que a leitura a absorvância fosse realizada em Elisa, e não em Espectrofotômetro, permitindo que a análise tivesse uma redução do gasto do reagente DPPH, e curva de calibração de DPPH foi construída no Microsoft Excel a partir das absorvâncias em 515 nm das soluções de DPPH e suas respectivas concentrações. A equação de reta $y = 0,0105x - 0,0065$ e $R^2 = 0,9996$, foram empregadas para o cálculo de % DPPH. XXs - Atividade antioxidante das concentrações de 50 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL. 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,125mg/mL, 1,625mg/mL do extrato de acetato de etila da *E. punicolia*, assim como descrita na Figura 03.

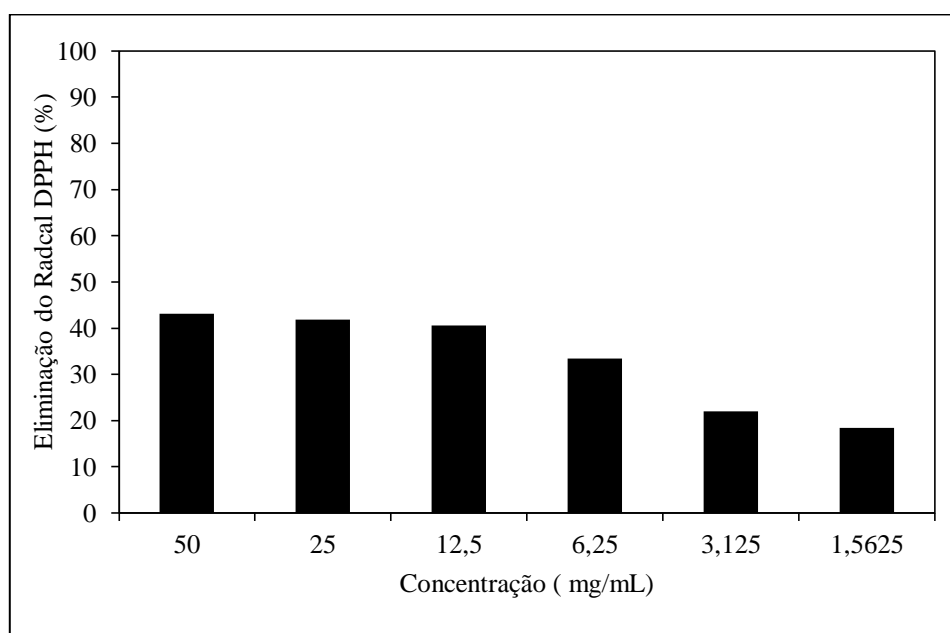


Figura 03 – Gráfico de Atividade antioxidante das concentrações de 50 mg/ mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,125mg/mL, 1,625mg/mL do extrato de acetato de etila da *Eugenia punicolia*

Levando-se em consideração a análise estatística dos dados de atividade antioxidante em todas as concentrações testadas, aplicando-se ANOVA e teste de Tukey, verificou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos.

Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua EC50 e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007). Segundo MENSOR *et al.*, (2001) o IC50 de 38,91 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato vegetal de *Ginkgo biloba*. qualifica-o como um extrato de alta atividade antioxidante, pois apresenta a mesma magnitude que o EC50 de diversas plantas reconhecidamente antioxidantes como a erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). Isso demonstra que o extrato vegetal de *E. punicifolia* apresenta uma baixa atividade antioxidante quando comparado com o extrato de *G. biloba*.

4. CONCLUSÃO

Pode verificar que tanto para extrato de acetato quanto para extrato metanólico de *Eugenia punicifolia*, tem-se resultados significativos, e condizentes com a literatura, podendo ser sugerido como um elevado potencial antioxidante e de teor de fenóis.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. Espécies de maior relevância para a região Centro-Oeste. In: Vieira, R. F.; AGOSTINICOSTA, T. S., SILVA, D. B.; SANO, S.; FERREIRA, F. R. **Frutas nativas da região centro-oeste**. Brasília: Embrapa, 2010. p. 15-30.
- ALVES, D. S. PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS DE ANONÁCEAS ATIVOS PARA *Spodoptera frugiperda* e *Tetranychus* spp. Tese de Doutorado. Programa de Entomologia. Universidade Federal de Lavras. Lavras: 2014.
- ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P. Insecticide of plant origin. Washington, DC, **American Chemical Society**. v. 387. 1990. 214p.
- BASTING, R. T., NISHIJIMA, C. M., LOPES, J. A., SANTOS, R. C. PERICO, L. L., LAUFER, S., BAUER, S., COSTA, M. F., SANTOS, L. C. ROCHA, L. R. M., VILEGAS, W., SANTOS, A. R. S., SANTOS, C. Antinociceptive, anti-inflammatory, and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 157. 2014. 257 – 267 p
- BELL, A. FELLOWS, L.E.; SIMMONDS, M.S.J. Natural products from plants for the control of insect pests. In: HODGSON, E.; KUHR, R.J. Safer insecticide development and use. New York and Basel, Marcel Dekker, 1990, p.337-383
- BELL, A. FELLOWS, L.E.; SIMMONDS, M.S.J. Natural products from plants for the control of insect pests. In: HODGSON, E.; KUHR, R.J. Safer insecticide development and use. **New York and Basel**, Marcel Dekker, 1990, p.337-383.
- BERNELF, P. Amylases, α e β . **Methods in Enzymology**, p. 1490-58. 1955.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 7 abr. 2018.
- BRITO JP, BAPTISTUSSI RC, FUNICHELO M, OLIVEIRA JEM, BORTOLI SA. Effect of essential oils of *Eucalyptus* spp. under *Zabrotes subfasciatus* (Both., 1833) (*Coleoptera: Bruchidae*) and *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (*Coleoptera: Bruchidae*) in two beans species. **Bol Sanidad Veg Plagas**. 2006; vol 32. n 4. p.573–580.
- DUARTE, A. R. Variabilidade Química dos óleos essenciais e do teor de fenóis em folhas e frutos da jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*). **Tese de Doutorado**. 73 p. Instituto de Química: Universidade Federal de Goiás. 2012.

EBADOLLAHI A. Iranian Plant Essential Oils as Sources of Natural Insecticide Agents_ a review. **Int J Biol Chem.** 2013; 5:266–90.

FERNANDES, D.; FREITAS, J. B.; CZEDER, L. P.; NAVES, M. M. V TEIXEIRA, L. Nutritional composition and protein value of the baru (*Dipteryx alata* Vog.) almond from the Brazilian Savanna. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** London, v. 90 , n. 10, p. 1650-1655, 2012.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, 2000. 48 (8): 3597-3604. Disponível em: <<http://bit.ly/1HnP80P>>. Acesso em 18 de jan. 2018. Doi: 10.1021/jf000220w.

GIGLIOLLI, A. A. S.; LUCENA, A. L. M.; LAPENTA, A. S. Identificação e caracterização das esterases em *Tribolium castaneum* (Coleoptera Tenebrionidae). **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.6, n.1, p.25-35, jan./abr., 2011.

GRANGEIRO MS, CALHEIROS-LIMA AP, MARTINS MF, ARRUDA LF, GARCEZ-DO-CARMO L, SANTOS. Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae) in cholinergic nicotinic neurotransmission. **J Ethnopharmacol.** 108: 26-30. Washington: 2006.

HALLIWELL. B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in Biology and Medicine.** 2000. 3 ed. Charendon: Oxford

INSTITUTO CHICO MENDES. **Plano de Manejo Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros.** Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs-unidades_coservacao/pm_chapada_dos_veadeiros_2.pdf> Acesso em 18 dez.2017.

JORGE, L. L, F., AGUIAR, J. P. SILVA, M. L. P. Anatomia Foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia punicifolia* - Myrtaceae). **Acta Amozônia.** Vol. 30 (1). 49-57. 2000.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova.** Vol.28 no.3 São Paulo Mai/Jun 2005.

KIST, L.W et al. Microcystin-LR acute exposure increases AChE activity via transcriptional ache activation in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 155 p.247–252, 2012.

KLEIN, E.; RIMARCIK, J.; SENAJOVÁ, E.; VAGÁNEK, A.; LENGYEL, J. Deprotonation of flavonoids severely alters the thermodynamics of the hydrogen atom transfer. **Computational and Theoretical Chemistry**, 2016.

KONO, Y.; TOMITA, T. Amino acid conferring insecticide insensitivity in Ace-paralogous acetylcholinesterase. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 85, n. 3, p.123-132, jul. 2006.

KUMARI, B.; SHARMA, P.; NATHA, A. Amylase inhibitor in local Himalyan collections of Colocasia: Isolation, purification, characterization and selectivity towards a-amylases from various sources . **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.103, p.49-55, 2012.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: **manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2 ed., Ed. Plantarum, Brasil, 2000.

MANN, J. **Secondary metabolism**. Oxford, Clarendon, 1995, 374p.

MARINHO, C.G.S. *et al.* Aggressive response of pest ant species to b-eudesmol (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, Chicago, v. 47, n. 2, p. 445-454, 2008.

MEZZA, G. N., BORGARELLO A. V., NELSON GROSSO, R., FERNANDEZ, H., PRAMPAROA, M. C., GAYOLA, M. F, Antioxidant activity of rosemary essential oil fractions obtained by molecular distillation and their effect on oxidative stability of sunflower oil. **Food Chemistry**. V 242. 2018. 9-15p.

MIRESMAILLI, S., ISMAN, M. B. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Science**. V. 10. n. 1. Canadá: 2014. 29-35p.

MOTA, W.M.; BARROS, M.L.; CUNHA, P.E.L.; SANTANA, M.V.A.; STEVAM, C.S.; LEOPOLDO, P.T.G., FERNANDES, R.P.M. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.** V. 14, n 4. 624-628p. Botucatu: 2012.

MUNIZ, H. J. T. **Myrtaceae – *Eugenia punicifolia***. Adaptado. Disponível em: <www.colecionandofrutas.org/eugeniacalypuni.htm>. Acesso em 09.dez 2017.

OLIVEIRA, R.N.; DIAS, I.J.M.; CÂMARA C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Rev. bras. farmacogn.** vol.15 no.1 João Pessoa Jan./Mar. 2005

OLIVEIRA VB, YAMADA LT, FAGG CW, BRANDÃO MGL. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**. 2012; 48(1):170-9.

PASCUAL, R.; COLMENA I.; RIOS, C.DE L; ROSA, J. M.; CORREA-LEITE, P. E.; ARAÚJO, K. G. L.; FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; GONZAGA, D.L T. G.; GARCÍA, A. G.; SANTOS, W. C.; GANDÍA, L. Augmentation of catecholamine release elicited by an *Eugenia punicifolia* extract in chromaffin cells. **Rev. Brasileira de Farmacognosia**. 22(1): 1-12, Jan./Feb. 2012.

PROENÇA, C. E. B.; OLIVEIRA, S. M.; SILVA, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 2010. 464P.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gorduroso. **Quim. Nova**. Vol. 29, No. 4, 2006, 755-760p.

RHEE, I.K.; MEENT, M.V.D.; INKANINA, K.; VERPOORTE, R. J. **Chromatography**, v. 217, p.915, 2001.

SARDI, J. C. O.; FREIRE, I. A. S, LAZARINI, J. G.; , INFANTE, J.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Espécies de frutas endêmicas inexploradas do Brasil: propriedades de antibióticos, insights sobre o modo de ação e toxicidade sistêmica de quatro *Eugenia spp.*. **Microbial Pathogenesis**. Vol. 105, abril/2017, 280-287p.

SCOLA, G.; et al. **Flavan-3-ol compounds from wine wastes with in vitro and in vivo antioxidant activity**. **Nutrients**. 1048-1059p. Disponível em: <<http://bit.ly/1gHh231>>. Acesso em: 24 de jan. 2018. Doi: 10.3390/nu2101048

SHAH, M.S., KHAN, S.U., EJAZ, S.A., AFRIDI, S., RIZVI, S.U.F. NAJAM-UL-HAQ, M., IQBAL.J Cholinesterases inhibition and molecular modeling studies of piperidyl-thienyl and 2-pyrazoline derivatives of chalcones. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 1-10, 2016.

SIMÕES, C. M.. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5º Ed. Porto Alegre – Florianópolis, 2001. Editora da Universidade UFRGS – Editora da UFSC

SIMÕES.C.A., HMIÇA, B; MARSTON, A; KURT, H. A TLC bioautographic method for the detection of α - and β -glucosidase inhibitors in plant extracts. **Phytochemical Analysis**. 20, p. 511– 515.2009.

SIQUEIRA, H. F.; SOUZA, L. F.; AMARAL, E V. E. J.; JUNIOR, V. S. Família Myrtaceae no Brasil. Anais 64º **Congresso Nacional de Botânica**. Belo Horizonte, Nov/ 2013.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR; M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: **Chemical Diversity and Biological Properties**, Vol. 8, n. 1. Jan/ 2011. p73–94.

SILVA, J. M. R.; NASCIMENTO, M. G. 2014. Epoxidação do β -cariofileno com lipases imobilizadas em gel de agar. **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 6, 1022-1027p, 2014.

SILVA, T. M. Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus*. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: 2009.

SONG, Q.; WANG, Y.; ZHANG, C.Y.X.H. LaaA, a novel high-active alkalophilic alpha-amylase from deep – sea bacterium *Luteimonas abyssi* XH031. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 90, p. 83-90, 2016.

SPADA, P.W.D.S.; et al. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. **Journal of Medicinal Food**, 2008. 11(1): 144-51. Disponível em: <<http://bit.ly/1HnRixA>>. Acesso em: 15 de fev. 2018. Doi: 10.1089/jmf.2007.598

ZORZHIN, F.M. Avaliação da atividade de inibição da alfa-amilase e padronização do extrato aquoso da folha de *Eugenia dysenterica*. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. UnB. Brasília: 2014.

WWF. **Mapa de abrangência do Cerrado brasileiro**. Disponível em: <http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/biomas/bioma_cerrado/mapa_bioma_cerrado/> . Acesso em 22 dez.2017.

XIE, H. *et al.* Natural sesquiterpene guaiol compound and medicinal application thereof. New seven-membered and five-membered framework guaiacol compound, i.e. 2-((3S,5R,8S)3,8-dimethyl-1,2,3,4,5,6,7,8- octahydroazulen-5-yl)propan-2-ol, used as insecticidal active ingredient for natural plant pesticide. **Patent Number:** CN102795969- 2013.

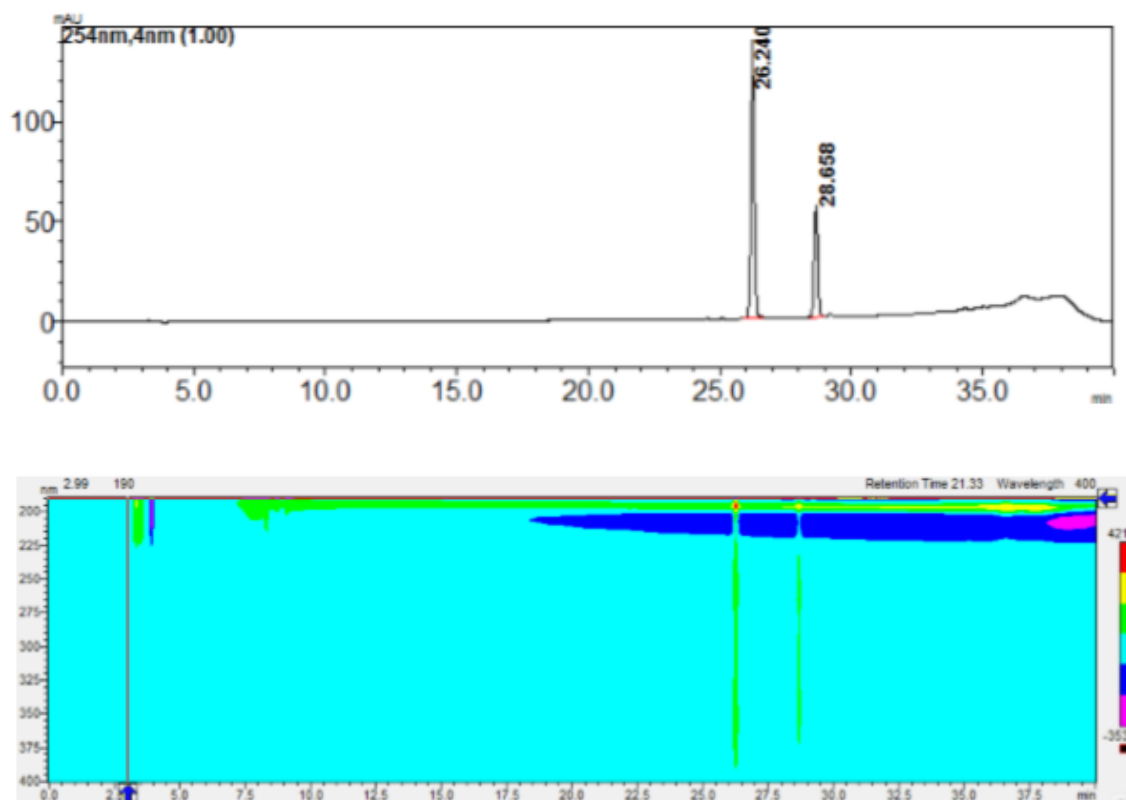
CONCLUSÃO GERAL

A partir do estudo químico e potencial da *Eugenia punicifolia*, cereja do cerrado, foi possível identificar parâmetros de atividades biológicas e enzimáticas importantes. Pode-se afirmar que, os extratos de acetato de etila, metanólico e aquoso possuem ácidos fenólicos e de flavonoides, além de um elevado potencial antioxidante e fenólico, para os extratos de acetato e metanólico.

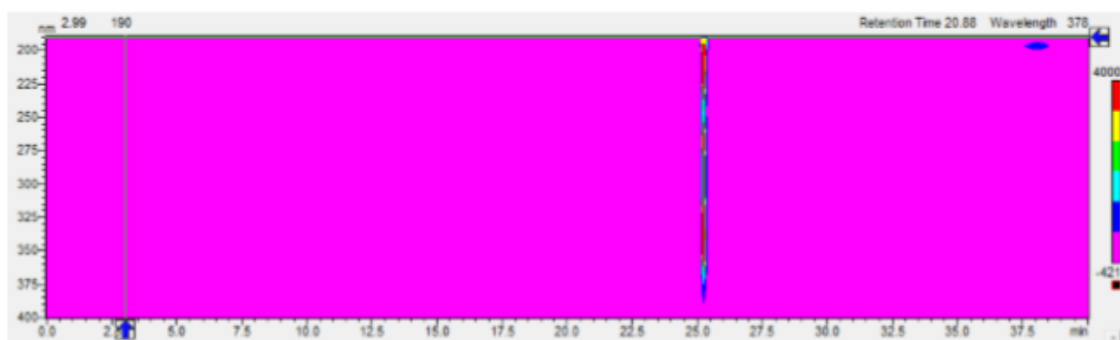
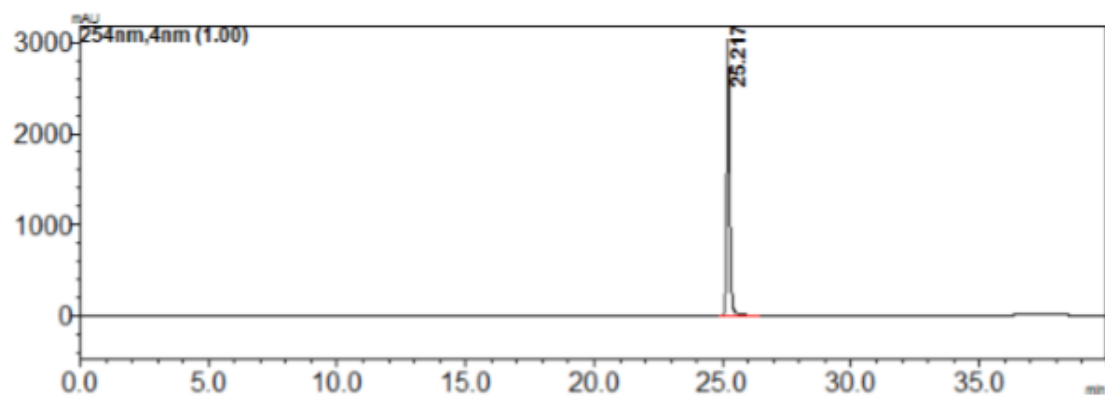
Os extratos de acetato de etila e metanólico também foram testados em relação à atividade inibitória, para a enzima acetilcolinesterase, e mostrou elevado potencial inibitório (ambos extratos acima de 80%) e IC₅₀ entre 1,18 a 1,68, podendo sugerir assim, aplicações biotecnológicas para estes extratos de Cereja do cerrado, como a utilização dos mesmos como potencial inseticida orgânico. Verifica-se também, a necessidade da continuação das pesquisas, bem como sugere-se ensaios *in vivo*, para verificação do potencial da *Eugenia punicifolia*.

APÊNDICES

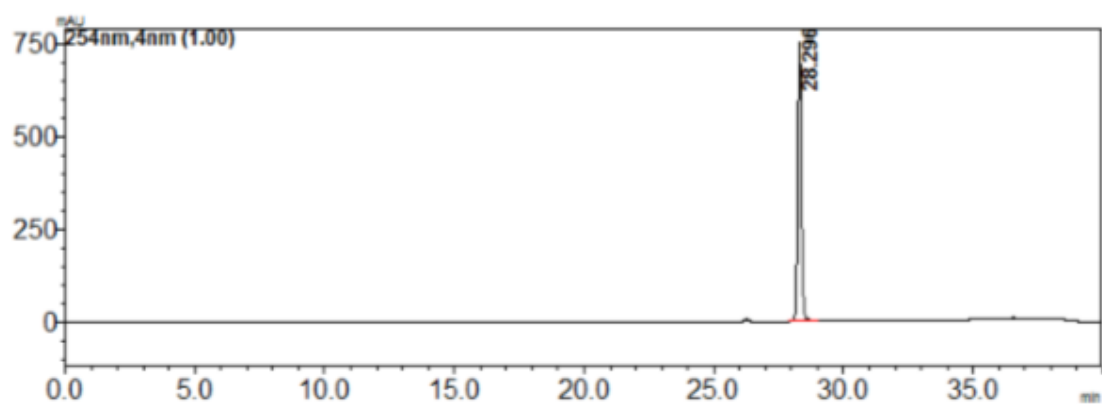
APÊNDICE A – Cromatograma e Espectrograma do Padrão Rutina (0,5 mg/mL)



APÊNDICE B – Cromatograma e Espectrograma do Padrão Miricetina



APÊNDICE C – Cromatograma e Espectrograma do Padrão Quercitrina



APÊNDICE D - Curva Padrão Ácido Gálico (ROCHA *et al.* 2010).