

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

FERNANDA PIMENTA SIMON FERREIRA

MORFOANATOMIA FOLIAR, FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE *Eugenia calycina* Cambess. – Myrtaceae

Goiânia

2014

FERNANDA PIMENTA SIMON FERREIRA

**MORFOANATOMIA FOLIAR, FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE *Eugenia calycina* Cambess. – Myrtaceae**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás como exigência parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Rezende

Co-orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula

Goiânia

2014

FERNANDA PIMENTA SIMON FERREIRA

**MORFOANATOMIA FOLIAR, FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE *Eugenia calycina* Cambess. – Myrtaceae**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás, área de concentração em Biologia Celular e Molecular, para obtenção do título de Doutor em Biologia.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Rezende
Presidente da Banca
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos
Universidade Federal do Paraná

Prof^a Dr^a Joelma Abadia Marciano de Paula
Universidade Estadual de Goiás

Prof^a Dr^a Letícia de Almeida Gonçalves
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz
Universidade Federal de Goiás

*“Se cheguei até aqui foi porque
me apoiei no ombro dos
gigantes”*

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, por permitir que eu chegasse até aqui e com o apoio dos “Gigantes” que construíram comigo este trabalho.

No momento agradeço a todos os Gigantes que me apoiaram!

A minha Orientadora Prof^a Dr^a Maria Helena pela paciência e dedicação que sempre demonstrou!

Ao meu Co-orientador Prof^o José Realino de Paula, que sempre pacientemente mostrou os caminhos das pedras a ser trilhado, tornando menos difícil a trilha destes últimos anos!

Ao Prof^o Dr^o Pedro Ferri e Prof^o Dr^o Boniek Gontijo.

A todos os colegas do Laboratório de Plantas e Produtos Naturais (LPPN) e Laboratório de Anatomia Vegetal.

As que durante esta jornada foram às donas da minha casa Laudenir, Elisangêla, Marlene.

As mães dos meus filhos Amanda, Henzo e Heitor, a Vó Ivonete, Vó Onêmia, Tia Marileze, Tia Marilze!

E ao meu marido, pela paciência, apoio e horas de abandono!

A CAPES pelo suporte financeiro concedido.

RESUMO

Espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) chamam a atenção pelo seu potencial terapêutico, apresentando atividade antiinflamatória, antibacteriana, citotóxica, antitumoral, hipoglicemiante, entre outros. Deste gênero foram isolados principalmente compostos fenólicos, além de compostos terpênicos. Porém, *Eugenia calycina* Cambess. conhecida como "pitanga vermelha" ou "pitanga do cerrado" amplamente distribuída na área de Cerrado do Brasil foi pouco estudada. Considerando o potencial terapêutico e os compostos descritos para o gênero, o presente trabalho teve como objetivo no Capítulo 1 o estudo morfoanatômico das folhas; a quantificação das substâncias fenólicas e a determinação da composição química do óleo essencial, bem como a avaliação da ocorrência de variação sazonal entre os constituintes químicos do óleo essencial das folhas e as substâncias fenólicas da casca e folhas. O material botânico foi coletado em localidades e em épocas diferentes. Parte das amostras foi utilizada para o estudo morfoanatômico e outra parte para as análises fitoquímicas e o preparo dos extratos e frações. Foram utilizadas técnicas convencionais para a caracterização morfoanatômica. Na quantificação das substâncias fenólicas utilizou-se espectrofotometria visível. E a análise qualitativa e quantitativa do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Nas análises morfoanatômicas verificou-se que as folhas são simples, coriáceas, glabras, hipoestomáticas com estômatos predominantemente anomocíticos; epiderme uniestratificada revestida por cutícula espessa e ornamentada; presença de cavidades secretoras, idioblastos contendo cristais do tipo drusa, mesófilo dorsiventral e feixe vascular bicolateral. Na prospecção fitoquímica, tanto da folha e na casca do caule, foram verificados flavonóides, taninos, triterpenos e saponinas. Verificou-se variação sazonal em fenóis totais e flavonóides nas amostras de folhas de Bela Vista e de Rio Verde, já nas amostras de cascas do caule houve variação sazonal apenas no teor de taninos. O principal fator de variabilidade dos óleos voláteis foi a localidade de coleta, sendo as substâncias majoritárias: biciclogermacreno, (*E*)-cariofileno e γ -muuroleno em Bela Vista. E o biciclogermacreno e o (*E*)-cariofileno em Rio Verde. O Capítulo 2 apresenta a determinação da atividade antimicrobiana bem como a análise da composição dos extratos etanólico das folhas e cascas do caule e suas frações utilizando Espectrometria de Massas com Ionização por eletrospray e Ressonância Ciclôtrônica de Íons por Transformada de Fourier – em modo negativo (ESI[-] FT-ICR MS). Foi utilizado o teste da microdiluição em caldo, que permitiu determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a cepas de bactérias Gram(+), Gram(-) e fungos *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp; e na avaliação da composição das principais substâncias polares presentes nos extratos das folhas e casca do caule e suas frações utilizou-se ESI [-] FT - ICR MS. A fração aquosa da casca (AFC), que contém os compostos com elevado teor de substâncias oxigenados (flavonóides, taninos e substâncias polifenólicos), apresentou boa atividade antifúngica contra *Cryptococcus* sp ATCC D (MIC = 15,62 ug/ml). A fração hexânica (HFF), que contém substâncias com um número menor de oxigênio (ácidos graxos e esteróides) também apresentou boa atividade contra *Cryptococcus gatti* L48, *Cryptococcus neoformans* L3 (CIM = 31,2 ug/ml) e *Cryptococcus* sp ATCC (CIM = 62,5 ug/ml). A composição das principais substâncias polares obtidos dos extratos de cascas e folhas de *E. calycina* avaliada por ESI (-) FT - ICR MS revelou a presença de substâncias com elevado teor de oxigênio (flavonóides, terpenos, taninos, esteróides e ácidos graxos). Os resultados encontrados abrem perspectivas para pesquisa de substâncias ativas que podem ser utilizadas no tratamento da criptococose, uma doença comum em pacientes imunossuprimidos. Os dados preliminares obtidos com esse trabalho levam a concluir que a espécie testada apresenta metabólitos secundários interessantes e grandes potenciais biológicos, o que permite a continuação do estudo em varias frentes de trabalho.

Palavra-chave: cavidade secretora, flavonóides, antifúngica, espectrometria de massa.

ABSTRACT

Species of *Eugenia* (Myrtaceae) attract attention for their therapeutic potential, presenting anti-inflammatory, antibacterial, cytotoxic, antitumor, hypoglycemic activity, among others. This genus were isolated mainly phenolic compounds, and terpene compounds. But *Eugenia calycina* Cambess. known as "cherry red" or "cherry cerrado" widely distributed in the area of Cerrado in Brazil has been little studied. Considering the therapeutic potential and the compounds described for the genus, the present study aimed to in Chapter 1 morfoanatômico the study leaves; quantification of phenolic substances and the determination of the chemical composition of the essential oil as well as evaluating the occurrence of seasonal variation in the chemical constituents of the essential oil from the leaves and phenolic substances from bark and leaves. The botanical material was collected in locations and at different times. Part of the samples was used for the study morfoanatômico and elsewhere for the phytochemical analysis and the preparation of the extracts and fractions. Conventional techniques for the morphological and characterization were used. The quantification of phenolic substances was used visible spectrophotometry. And the qualitative and quantitative analysis of the essential oil was realizadada by coupled mass spectrometry (GC / MS) gas chromatography. In morphoanatomic analyzes it was found that the leaves are simple, leathery, glabrous, with predominantly hypostomatic anomocytic stomata; uniseriate epidermis coated with thick cuticle and ornate; presence of secretory cavities idioblasts containing crystals of drusen type, dorsiventral mesophyll and vascular bundle bicolateral. A phytochemical both the leaf and stem bark, flavonoids, tannins, saponins and triterpenes were checked. There was seasonal variation in total phenolics and flavonoids in the leaf samples of Bela Vista and Rio Verde, cited in samples of stem bark showed seasonal variation only in the tannin content. The main factor of variability of the volatile oils was collecting locality, being the major compounds: biciclogermecreno, (E)-caryophyllene and γ -muuroleno in Bela Vista. And bicyclogermacrene and (E)-caryophyllene in Rio Verde. Chapter 2 presents the determination of antimicrobial activity as well as the analysis of the composition of ethanol extracts of the leaves and the stem bark and its fractions using mass spectrometry with electrospray ionization and Ion Cyclotron Resonance Fourier transform - in negative mode (ESI [-] FT-ICR MS). (-) And fungi *Candida* spp the broth microdilution test, which allowed to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against strains of Gram (+) and Gram bacteria was used. and *Cryptococcus* spp; and evaluation of the composition of the main polar substances in extracts of leaves and stem bark and its fractions was used ESI [-] FT - ICR MS. The aqueous fraction of the bark (AFC), which contains compounds with high content of oxygenated substances (flavonoids, tannins and polyphenolic substances), showed good antifungal activity against *Cryptococcus* sp ATCC D (MIC = 15.62 μ g / ml). The hexane fraction (HFF), which contains substances with a smaller number of oxygen (fatty acids and steroids) also showed good activity against *Cryptococcus gatti* L48, L3 *C. neoformans* (MIC = 31.2 μ g / ml) and *Cryptococcus* sp ATCC (CIM = 62.5 μ g / ml). The composition of the main polar substances obtained from extracts of bark and leaves of *E. calycina* evaluated by ESI (-) FT - ICR MS revealed the presence of substances with high oxygen content (flavonoids, terpenes, tannins, steroids and fatty acids). The results open perspectives for research of active substances which may be used in the treatment of cryptococcosis, a common disease in immunosuppressed patients. Preliminary data obtained in this work lead to the conclusion that the test species shows great biological potential, allowing the continuation of study in various work fronts and interesting secondary metabolites.

Keyword: secretory cavity, flavonoids, antifungal, mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	<i>Eugenia calycina</i> Cambess.	41
Figura 2	Lâmina foliar de <i>Eugenia calycina</i> – Localidades Bela Vista (BV) e Rio Verde (RV).	68
Figura 3	Lâmina foliar de <i>Eugenia calycina</i> – Localidades Bela Vista (BV) e Rio Verde (RV).	69
Figura 4	Lâmina foliar de <i>Eugenia calycina</i> – Localidades Bela Vista (BV) e Rio Verde (RV).	70
Figura 5	Pecíolo de <i>Eugenia calycina</i> – Localidades Bela Vista (BV) e Rio Verde (RV).	71
Figura 6	Lâmina foliar de <i>Eugenia calycina</i> Cambess. - Testes Histoquímicos.	72
Figura 7	Dendrograma representando os agrupamentos hierárquicos das amostras de folhas de <i>Eugenia calycina</i> , relacionando as substâncias fenólicas (FT, TPP e Fv), a distância Euclidiana das amostras de acordo com o Método de Variância Mínima de Ward.	54
Figura 8	Dendrograma representando os agrupamentos hierárquicos das substâncias fenólicas (FT, TPP e Fv) presentes nas amostras de casca do caule de <i>Eugenia calycina</i> , a distância Euclidiana das amostras de acordo com o Método de Variância Mínima de Ward.	57
Figura 9	Dendrograma representando os agrupamentos hierárquicos das amostras de folhas de <i>Eugenia calycina</i> , relacionando a composição química do óleo volátil, a distância Euclidiana das amostras foi obtida de acordo com o Método de Variância Mínima de Ward.	58

CAPÍTULO 2

Figura 1	ESI(-) FT-ICR mass spectra for the bark extract of <i>E. calycina</i> and their fractions.	93
Figura 2	ESI(-) FT-ICR mass spectra for the leaves extract of <i>E. calycina</i> and their fractions.	93
Figura 3	Class compounds profile from the bark extract of <i>E. calycina</i> and their fractions.	94
Figura 4	Class compounds profile from the leaves extract of <i>E. calycina</i> and their fractions.	94

Figura 5 Possible structures of some molecular formulas assigned from ESI(-) FT-ICR MS data using *chemspider* database.

95

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Relação de coletas de amostras de <i>Eugenia calycina</i> Cambess.	34
Tabela 2	Umidade expressa em porcentagem (p/p) ± desvio padrão nas amostras de folhas e casca do caule de <i>E. calycina</i> Cambess. coletadas nas localidades de Bela Vista (BV) e Rio Verde (RV), entre janeiro/11 a janeiro/12	46
Tabela 3	Conteúdo de substâncias fenólicas na casca do caule e folha de <i>Eugenia calycina</i> Cambess. na localidade de Bela Vista e Rio Verde durante o período de Janeiro 2011 a Janeiro 2012	48
Tabela 4	Níveis de macronutrientes na folha de <i>Eugenia calycina</i> Cambess. e condições climáticas na localidade de Bela Vista e Rio Verde durante o período de Janeiro 2011 a Janeiro 2012	49
Tabela 5	Níveis de macronutrientes na casca do caule de <i>Eugenia calycina</i> Cambess. e condições climáticas na localidade de Bela Vista e Rio Verde durante o período de Janeiro 2011 a Janeiro 2012	50
Tabela 6	Parâmetros de fertilidade e níveis de nutrientes minerais do solo e condições climáticas na localidade de Bela Vista e Rio Verde durante o período de Janeiro 2011 a Janeiro 2012	51
Tabela 7	Coeficientes de correlação de Pearson entre substâncias fenólicas (FT, TPP, Fv) presentes nas folhas de <i>E. calycina</i> e variáveis ambientais. Os valores em negrito foram considerados significantes ($p < 0,05$)	53
Tabela 8	Coeficientes de correlação de Pearson entre substâncias fenólicas (FT, TPP e Fv) presentes na casca do caule de <i>E. calycina</i> e variáveis ambientais. Os valores em negrito foram considerados significantes ($p < 0,05$)	55
Tabela 9	Porcentagem de constituintes químicos no óleo volátil da folha de <i>Eugenia calycina</i> Cambess. na localidade de Bela Vista e Rio Verde durante o período de Janeiro 2011 a Janeiro 2012	
Tabela 10	Coeficientes de correlação de Pearson entre os componentes majoritários presentes nos óleos voláteis obtidos das folhas de <i>E. calycina</i> e variáveis ambientais. Os valores em negrito foram considerados	61

significantes ($p < 0,05$)

CAPÍTULO 2

Table 1	Yield of extraction methods expressed as a percentage (w / w) and the contents of total polyphenol, flavonoids and tannins in <i>Eugenia calycina</i> Cambess. extracts and their fractions of the bark and leaves expressed in percentage (w / w) \pm standard Deviation.	96
Table 2	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$) of extracts and fractions of <i>Eugenia calycina</i> (Myrtaceae)	97

Sumário

<i>INTRODUÇÃO GERAL</i>	14
INTRODUÇÃO GERAL	15
<i>REVISÃO DE LITERATURA</i>	18
1. MYRTACEAE, GÊNERO <i>EUGENIA</i>	Erro! Indicador não definido.
2. ASPECTOS MORFOANATÔMICOS	Erro! Indicador não definido.
3. ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS	19
4. ASPECTOS QUÍMICOS	Erro! Indicador não definido.
5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTÍSSIMA RESOLUÇÃO E EXATIDÃO – ESI(±)-FT-ICR MS	23
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	26
<i>CAPÍTULO 1- Morfoanatomia Foliar, Fitoquímica e Variabilidade do Óleo volátil</i>	30
1. INTRODUÇÃO	31
2 METODOLOGIA	33
2.1 Material Botânico	33
2.2 Análise Morfoanatômica	34
2.3 Análise Fitoquímica	35
2.3.1 Prospecção Fitoquímica e Determinação da Umidade (RETIRAR)	35
2.3.2 Quantificação de Substâncias Fenólicos	36
2.3.2.1 Fenóis totais (FT)	36
2.3.2.2 Taninos precipitados por proteína (TPP)	37
2.3.2.3 Flavonóides (Fv)	37
2.3.3 Análise Química do Solo, Folhas e Casca do Caule	38
2.3.4 Dados Climáticos	38
2.3.5 Análise Estatística	39
2.4 Variabilidade do Óleo Volátil	40

2.4.1	Extração e quantificação do óleo volátil.....	40
3	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	42
3.1	Análise Morfoanatômica.....	42
3.1.1	Morfologia.....	42
3.1.2	Anatomia.....	43
3.2	Prospecção Fitoquímica e Determinação da Umidade.....	46
3.3	Quantificação de Substâncias Fenólicas.....	48
3.3.1	Substâncias Fenólicas nas Folhas.....	53
3.3.2	Substâncias Fenólicas na Casca do Caule.....	57
3.4	Variabilidade Química do Óleo volátil.....	60
4	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	68
	ILUSTRAÇÕES.....	71
	<i>CAPÍTULO 2 - Eugenia calycina Cambess extracts and their fractions: antimicrobial activity and identification of major polar compounds using Electrospray Ionization FT-ICR Mass Spectrometry (ESI FT-ICR MS).</i>	77

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores, nas quais detém aproximadamente 24% da biodiversidade. (BRASIL, 2006). Dentro desta biodiversidade brasileira está o Cerrado, um dos maiores biomas do país com mais de 4.400 espécies endêmicas, ou seja, 1,5 % do total existente do planeta (confirmar autor). Sendo o segundo bioma nacional, com 23% de extensão e ocupa a totalidade do Distrito Federal, mais da metade dos estados de Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Tocantins, além de proporções de outros seis estados (IBGE, 2004) Farmacognosia.

A biodiversidade é reconhecida como importante fonte de riqueza apresentando potencial etnofarmacológico e químico para a descoberta e desenvolvimento de novos fitofármacos e fitoterápicos (GOTTLIEB et al, 1998) Farmacognosia. Além de ser uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (SIMÕES et al., 2004).

Portanto, a busca racional de substâncias bioativas de plantas baseia-se em diversas abordagens, sendo as principais a etnofarmacológica e a quimiosistemática. Após a identificação de um extrato bioativo, este pode ser submetido a fracionamento bioguiado por testes de atividade farmacológica e/ou biológica *in vivo* ou *in vitro* e assim resultar no isolamento de substâncias bioativas.

E os produtos naturais de plantas são considerados uma fonte inesgotável de moléculas bioativas para a inovação farmacêutica, incluindo diversidade estrutural e mecanismos de ação inéditos para protótipos de novos fármacos. A grande diversidade estrutural de produtos naturais e atividades biológicas dessas substâncias pode ser explicada pela seleção evolutiva sobre os organismos produtores, resultando em substâncias capazes de interagir com uma ampla gama de proteínas e alvos biológicos para um propósito específico (KOEHL; CARTER, 2005). Uma das vantagens da triagem de produtos naturais para a

produção de novos fármacos em relação à triagem de moléculas obtidas pela química combinatória é a maior taxa de sucesso do primeiro grupo (WEISSMAN; LEADLAY, 2005).

O Brasil continua a ser um país com muitas potencialidades de estudos na área de plantas medicinais, considerando-se serem menos de 1% as espécies vegetais brasileiras que foram analisadas sob o ponto de vista químico e farmacológico (CUNHA, 2005; STEFANELLO, 2006). Visto que o uso popular de plantas medicinais ocorre de forma acentuada, sem que sejam estabelecidos e/ou comprovados seus reais benefícios ou toxicidade, portanto, muitas espécies vegetais utilizadas na medicina popular ainda não tiveram qualquer avaliação científica de seu uso medicinal para que possam continuar a serem utilizadas com segurança pela população, que em geral desconhecem quaisquer procedimentos que mantenham as propriedades farmacológicas das plantas medicinais.

E segundo Magina (2008) espécies de Myrtaceae são bastante interessantes do ponto de vista químico e farmacológico e chama a atenção pelo seu potencial terapêutico. Dentro desta família um dos maiores gêneros é *Eugenia*, com vários estudos desenvolvidos com suas espécies que mostraram resultados promissores, como atividade anti-inflamatória, antibacteriana, citotóxica e antitumoral, tripanocida, antiviral contra o vírus Epstein-Barr, hipoglicemiante e estimulante da liberação de insulina, entre outros.

Na literatura especializada não foram registrados estudos morfoanatômicos, bem como sobre a aplicação medicinal de *Eugenia calycina* Cambess., porém, por pertencer à família Myrtaceae que apresenta metabólitos secundários como flavonóides, taninos e terpênos responsáveis por várias atividades farmacológicas das plantas medicinais, torna-se importante a investigação do potencial farmacológico desta espécie. Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi realizar o estudo morfoanatômico das folhas, a análise fitoquímica e avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos, frações das folhas e casca do caule.

Os objetivos específicos foram:

- Realizar a análise morfoanatômica das folhas coletadas em indivíduos de *E. calycina* em duas localidades, Bela Vista e Rio Verde no estado de Goiás;
- Realizar a prospecção fitoquímica e determinar os teores de umidade do pó obtido das folhas e casca do caule;
- Determinar o teor de fenóis totais, taninos totais e flavonóides presentes nas folhas e cascas do caule de amostras de duas localidades e avaliar o efeito de fatores ambientais sobre a concentração destas substâncias fenólicas;
- Avaliar a composição e a variabilidade química do óleo volátil obtido das folhas, e avaliar o efeito dos fatores ambientais sobre a composição do óleo volátil;
- Avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana e antifúngica do extrato etanólico bruto e das frações das folhas e casca do caule;
- Caracterizar os extratos das folhas e casca do caule e suas frações por Espectrometria de Massas com Ionização por eletrospray e Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier – em modo negativo (ESI[-] FT-ICR MS).

Para facilitar a apresentação e discussão dos resultados, o trabalho foi dividido na Revisão de Literatura e em dois capítulos: o Capítulo 1 descreve a Morfoanatomia Foliar, Fitoquímica e Variabilidade do Óleo volátil. O Capítulo 2 é intitulado *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry.

REVISÃO DE LITERATURA

1. ASPECTOS BOTÂNICOS

Myrtaceae Juss. é uma das mais complexas famílias do ponto de vista taxonômico, inclui cerca de 130 gêneros e 4000 espécies com distribuição pantropical e subtropical, predominantemente, concentrada na região neotropical e na Austrália, incluindo espécies frutíferas e de interesse medicinal. Na flora brasileira esta representada por 22 gêneros e aproximadamente 1000 espécies, com destaque na Mata Atlântica e Floresta de Restinga (SOUZA; LORENZI, 2012).

Myrtaceae é representada por diversas espécies frutíferas, como as nativas, goiabeira (*Psidium guajava* L.), jabuticabeira (*Plinia cauliflora*), pitangueira (*Eugenia uniflora*), guabirobeira (*Campomanesia* spp.), araça (*Psidium cattleianum*), cabeludinha (*Myrciaria glazioviana*), cambuci (*Campomanesia phaea*), cereja-nacional (*Eugenia cerasiflora*), e as introduzidas, jambo (*Syzygium* spp.) e jambolão (*Syzygium cumini*) (SOUZA; LORENZI, 2012). E também por várias espécies utilizadas na medicina popular com atividades antidiarreica, antimicrobiana, antioxidante, antirreumática, anti-inflamatória e hipocolesterolemiantes (DI STASI et al, 2002). Nomes dos autores

As Myrtaceae brasileiras são árvores ou arbustos lenhosos, raramente subarbustos. Uma característica marcante é o tronco geralmente com súber esfoliante, que a cada estação de crescimento se renova separando-se todo o ritidoma. Apresenta folhas inteiras, penínérveas, de disposição alterna ou oposta, raramente verticilada, simples, margens inteiras, geralmente coriáceas ou subcoriáceas e coloração sempre verde, com estípulas vestigiais ou ausentes (JOLY, 1998; SOUZA; LORENZI, 2012).

As inflorescências são normalmente cimosas, às vezes reduzidas a uma única flor. Floresce no início da primavera, com flores vistosas geralmente de cor branca, efêmeras, hermafroditas, geralmente pentâmeras, actinomorfas, diclamídeas e raramente monoclamídeas. O fruto é do tipo baga, drupa, cápsula

ou núcula. As sementes apresentam poliembrionia e também podem ser aladas (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; JOLY, 1998; SOUZA; LORENZI, 2012).

Cavidades secretoras, também referidas como glândulas oleíferas, idioblastos secretores e cristais de oxalato de cálcio isolados ou drusas são características anatômicas ocorrentes em Myrtaceae (SOLEREDER 1908, METCALFE; CHALK 1957). Conforme Solereder (1908) as cavidades secretoras constituem a principal característica anatômica da família, bem como mesofilo com abundância de tanino. Metcalfe e Chalk (1950) citam estômatos anomocíticos como os mais comuns em Myrtaceae.

Dentre os gêneros de Myrtaceae, *Eugenia* está representado por espécies de distribuição neotropical, que são encontradas desde o México e Florida até o noroeste da Argentina, e no Brasil ocorre principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, com espécies de árvores e arbustos (McVAUGH, 1968). Das espécies desse gênero foram isolados principalmente substâncias fenólicas, incluindo os flavonóides e taninos, além de substâncias terpênicas (MAGINA, 2008)

Eugenia calycina Cambess. é uma espécie frutífera típica do Cerrado com porte arbustivo conhecida popularmente como pitanga-vermelha, pitanga-do-cerrado (BORGES et al., 2010; BULLOW et al., 1994). No Brasil foi registrada em área de Cerrado dos Estados de Goiás, Minas Gerais e no Distrito Federal. Floresce de agosto a novembro com frutos de setembro a dezembro (ARANTES; MONTEIRO, 2002).

2. ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

Espécies de Myrtaceae são empregadas principalmente em distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos, doenças infecciosas, sendo as partes mais usadas folhas, cascas e também os frutos que são comumente consumidos (CRUZ; KAPLAN, 2004).

Paula (2008) relata que espécies de Myrtaceae, por possuírem atividade consagrada na cultura popular ou por terem sido estudadas em pesquisas

científicas, fazem parte de Monografias da Farmacopeia Brasileira e/ou da World Health Organization (WHO), tais como, *Eucalyptus globulus* Labill., *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. e Perry, *Psidium guajava* L., *Eugenia uniflora* L. e *Melaleuca alternifolia* (Maiden e Betche) Cheel.

Podem ainda serem citadas, referências de diversos autores que abordaram e comprovaram atividades biológicas para espécies de gêneros de Myrtaceae, como *Campomanesia*, *Eugenia*, *Eucalyptus*, *Myrcia*, *Myrtus*, *Pimenta*, *Plinia*, *Psidium*, e *Syzygium* (DJIPA, DELMEE; QUETIN-LECLERCQ, 2000; OGUNWANDE et al., 2005; AMORIM et al., 2009; NUENGCHAMNONG; INGGANINAM, 2009; PAULA et al., 2008 ; CARDOSO et al., 2010; SÁ et al., 2012; MOHAMED et al., 2013, VILA et al., 2010). Sendo mais comumente relatadas, as atividades antimicrobiana e antifúngica (DJIPA, DELMEE; QUETIN-LECLERCQ, 2000; CERQUEIRA et al., 2007; CARDOSO et al., 2010; VILA et al., 2010; LAGO et al., 2011; SÁ et al., 2012), antioxidante (NUENGCHAMNONG; INGGANINAM, 2009; NOMI et al., 2012; MOHAMED et al., 2013), anti-inflamatória (LAGO et al., 2011), antiviral (ABAD et al., 1997), larvicida (VILA et al., 2010) e hipoglicemiante (OMAR et al., 2012). Os autores citados associam estas atividades, principalmente, com a presença de flavonóides, taninos, terpenos e saponinas como substâncias isoladas ou pelo sinergismo entre elas no caso dos extratos, frações ou óleos voláteis.

Eugenia possui várias espécies que são utilizadas como plantas medicinais e comprovadamente apresentam atividades antioxidante (VICTORIA et al., 2012), antibacteriana e antifúngica (OGUNWANDE et al., 2005; SANTOS et al., 2007; LAGO et al., 2011; VICTORIA et al., 2012), antibacteriana contra cepas multirresistentes a drogas (BAG et al., 2012), como modulador da atividade antibacteriana de agentes antimicrobianos (COUTINHO et al., 2010), antinociceptivo (AMORIM et al., 2009; SAHA et al., 2013), anti-inflamatório (SAHA et al., 2013) antipirético (AMORIM et al., 2009), hipoglicemiante (Omar et al., 2012), tripanocida (SANTOS et al., 2007), moluscicida e larvicida (OLIVEIRA et al., 2006).

Djipa et al. (2000), comprovaram que a atividade antimicrobiana dos extratos aquoso e acetônico da casca de *Eugenia jambos* L. contra *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e em cepas de estafilococos

coagulase negativa como *S. hominis*, *S. cohnii* e *S. warnei*, está relacionada diretamente com a grande quantidade de taninos presente nestes extratos.

Santos et al. (2012) ao estudarem o extrato etanólico bruto das folhas de *Eugenia jambolana* Lam, demonstraram ser esta uma fonte de produto natural com atividade tripanocida e modificador da atividade antifúngica do metronidazol, quando associado ao extrato etanólico, portanto para os autores, representa uma alternativa interessante no tratamento e combate de doenças infecciosas como a candidíase e doença de Chagas.

Omar et al (2012) isolaram e identificaram oito substâncias já conhecidas e três inéditos em *E. jambolana*. Para todas as substâncias isoladas foi avaliado o efeito hipoglicemiante, pela inibição da enzima α -glucosidase e em comparação com a droga clínica acarbose (inibidor da α -glucosidase). Os resultados revelaram que três substâncias já conhecidos: a eonoteína C, cornussino B e suertisino, apresentaram efeito inibidor maior do que a acarbose contra α -glicosidase, porém, o mais ativo foi o composto inédito, iso-eonoteína C.

O potencial antibacteriano *in vitro* do extrato aquoso, etanólico e acetato de etila das sementes de *E. jambolana* foi avaliado contra patógenos humanos multirresistentes. O extrato etanólico foi fracionado com hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. Todos os extratos mostraram variações no grau de inibição das cepas testadas, sendo que o extrato etanólico foi o mais ativo seguido do extrato acetônico e do extrato aquoso. Quanto às frações, a acetato de etila demonstrou ser a mais ativa contra as cepas testadas (BAG et al., 2012).

Recentemente o extrato etanólico da casca da raiz de *E. jambolana* e suas frações foram avaliados para a atividade antinociceptiva utilizando os métodos de contração abdominal induzida por ácido acético e nocicepção induzida por formalina; e para a atividade anti-inflamatória foram utilizados os métodos de edema da pata de rato induzido por carragenina e granuloma induzido por pellets de algodão. Estes testes demonstraram ser a fração éter de petróleo a mais potente e diante disto foi realizado bioensaio desta fração resultando no isolamento e identificação do β -sitosterol, estigmasterol e lupeol. Os autores relacionaram a atividade antinociceptiva e a anti-inflamatória a estas substâncias isoladas (SAHA, 2013).

A atividade antinociceptiva e antitérmica de *Eugenia uniflora* L. foi avaliada por Amorim et al. (2009). Nesse estudo, os autores testaram por via oral, a fração pentano e a mistura dos isolados sesquiterpenos, classificados como furanosesquiterpenos e identificados como: atractilono e 3-furanoedesmano do óleo volátil presente nas folhas. Estes inibiram as contrações abdominais induzidas por ácido acético, aumentaram o tempo de latência no teste da placa quente e mostraram efeito hipotérmico. Os resultados sugerem que os responsáveis pelo efeito antinociceptivo e hipotérmico foram os furanosesquiterpenos isolados. Estes resultados forneceram informações farmacológicas adicionais e podem contribuir para o uso de *E. uniflora*, popularmente denominada árvore de cereja brasileira, como um fitoterápico.

Oliveira et al. (2006) testaram os extratos etanólicos das cascas do caule e das folhas de *Eugenia malaccensis* L. e demonstraram a atividade moluscicida, porém, inativo como larvicida contra *Aedes aegypti*.

Estudos químicos com espécies de *Eugenia* revelaram a presença de flavonóides, taninos, terpenóides e especialmente óleos voláteis constituídos de monoterpenos e sesquiterpenos (LUNARDI et al., 2001).

A análise fitoquímica da fração acetato de etila das sementes de *Eugenia jambolana* L. revelou a presença em alta concentração de substâncias fenólicas e flavonóides, moderada concentração de saponinas e baixa concentração de terpenóides (BAG et al., 2012).

Das folhas e caule de *Eugenia moraviana* Berg. foi isolado e caracterizado um novo triterpeno como ácido 6 α -hidroxibetulínico, juntamente com três outras substâncias conhecidas, identificadas como ácido platânico, ácido betulínico e β -sitosterol (LUNARDI et al., 2001).

Omar et al. (2012), isolaram e identificaram, três novos taninos hidrolisados nas sementes de *E. jambolana*, incluindo dois galotaninos, jamutanino A e B, e um elagitanino, iso-oenoteína C. Além destes, foram isolados e identificados, com base em dados de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS), outros oito substâncias já conhecidos como o oenoteína C, cornusiin B, ácido valoneíco dilactona, filantusiina E, ácido carboxílico brevifolína, ácido elágico, ácido gálico, e suertisina.

Estudos fitoquímicos realizados com as folhas de *Eugenia malaccensis* L., resultaram no isolamento de quatro flavonóides, a catequina, mearnsitrina, miricitrina e quercitrina (NOREEN et al., 1998). Oliveira et al. (2006) isolaram e identificaram, das folhas e cascas do caule, dois composto inéditos, sendo um para a espécie o ácido gálico, e outro para o gênero o ácido 3-acetil ursólico. Além de dois flavonóides já relatados nesta espécie, a miricetina e mearnsentina.

3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Como organismos imóveis, as plantas necessitaram de produzir um vasto repertório de substâncias com significado adaptativo de forma a sobreviverem em diferentes nichos ecológicos terrestres. Estas substâncias, genericamente denominadas metabólitos secundários, têm essencialmente funções de defesa (contra herbívoros, micróbios, vírus ou plantas competidoras), de sinalização (atração de agentes polinizadores ou dispersores de sementes), de protecção da radiação ultravioleta (UV) ou de oxidantes (DAAYF; LATTANZIO, 2008). Dentre os metabólitos secundários estão às substâncias fenólicas representando um grupo fitoquímico de ampla ocorrência em plantas e com considerável importância fisiológica e morfológica, com um grande grupo de produtos químicos bioativos, com diversas funções biológicas (POPA et al., 2008). Estas substâncias são produzidas de forma a resistirem a ataques de herbívoros ou agentes patogénicos. A produção destas substâncias pode ser constitutiva, mesmo em plantas saudáveis e tem como objetivo proteger as plantas de ataques de uma vasta gama de potenciais atacantes. Pelo contrário, as substâncias defensivas induzidas, são produzidas em resposta a um stress biótico e estão geralmente restringidos ao tecido danificado (DAAYF; LATTANZIO, 2008).

As substâncias fenólicas são metabólitos secundários de plantas, que possuem um anel aromático tendo um ou mais grupos hidroxila, e as suas estruturas podem variar desde uma simples molécula fenólica como a de um polímero complexo com massa molecular elevada (BALASUNDRAM, SUNDRAM, SAMMAN, 2006). E são divididas em várias classes de acordo com o número de anéis de fenol que eles contêm e os elementos estruturais que ligam estes anéis um aos outros. Os

principais grupos de polifenóis são: flavonóides, ácidos fenólicos, taninos (hidrolisável e condensado) (D'ARCHIVIO et al., 2007).

Em particular, fenóis naturais têm sido relatados como tendo um papel importante na proteção contra um número de perturbações patológicas, tais como aterosclerose, disfunção cerebral e câncer (GORDON, 1996). Muitos pesquisadores têm sugerido que os polifenóis podem desempenhar um papel importante na prevenção da obesidade, doença cardíaca coronária, câncer cólon, desordens gastrointestinais e pode também reduzir o risco de diabetes (IGNAT; VOLF; POPA, 2011).

4. ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTÍSSIMA RESOLUÇÃO E EXATIDÃO – ESI(±)-FT-ICR MS

A espectrometria de massas é utilizada para simples determinação do peso molecular e/ou quantificação de uma substância ou mesmo em estudos de determinação estrutural (CROTTI et al., 2006).

Um espectrômetro de massas pode ser entendido, via de regra, como um instrumento contendo uma fonte de íons, um analisador de massas – na realidade, a razão massa/carga (m/z) – e um detector (MORAES; LAGO, 2003).

A Espectrometria de Massas de Altíssima Resolução e Exatidão – ESI(±)-FT-ICR MS, também denominada de Ionização por Eletrospray acoplada com a Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier (ROMÃO, 2010) ou Espectrometria de Massas com Ionização por eletrospray e Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier, é considerada atualmente como o tipo mais complexo de analisador de massas. Seu valor analítico é resultado de sua versatilidade e da combinação única de algumas características como: a) altíssimo poder de resolução e exatidão em massas, o que garante uma determinação inequívoca da fórmula química dos íons produzidos; b) capacidade de análises do tipo (MS)_n, para determinação de estrutura molecular; e c) fácil adaptação com os mais diversos tipos de fontes de ionização externas (DALMASCHIO, 2012).

Sendo os extratos de plantas um reservatório de substâncias farmacologicamente ativas, os métodos analíticos convencionais, como a cromatografia, determinam apenas uma pequena porção das substâncias presentes nos mesmos (PARK et al., 2013). A espectrometria de massa por Transformada de Fourier (FT- MS) pode substituir o uso da cromatografia para misturas complexas, tornando o problema mais tratável. É um método de escolha para adquirir simultaneamente todas as informações disponíveis contidas em amostras complexas. Devido a alta precisão em massas tipicamente alcançada com FT-MS substâncias podem frequentemente ser identificados com base na sua massa exata sozinho. Nos casos em que o analito é desconhecido, a medição da massa exata permite a atribuição inequívoca de fórmula molecular (LI et al.; 2008).

A Espectrometria de Massas com Ionização por eletrospray e Ressonância Ciclotônica de Íons por Transformada de Fourier (ESI UHR MS) é um método de análise de altíssima resolução capaz de determinar a maioria das substâncias presentes em um extrato vegetal e de fornecer suas fórmulas moleculares a partir de um único experimento. O extrato etanólico de ginseng foi analisado por UHR ESI FT-ICR MS em comparação com Cromatografia líquida (LC) / FT-ICR MS. Por UHR ESI FT-ICR MS foram detectados 405 substâncias das quais foram determinadas 123 fórmulas moleculares, incluindo 33 ginsenosídeos, enquanto que a Cromatografia líquida (LC)/FT-ICR MS detectou apenas 129 compostos, incluindo 19 ginsenosídeos. Portanto, o UHR ESI FT-ICR MS pode ser utilizado para determinar o perfil molecular de vários produtos naturais (PARK et al., 2013).

Em outro estudo utilizando (ESI-FT-ICR-MS) em modo íon-negativo, foram identificados onze substâncias como os ácidos fenólicos por medida de massa, além dos oligossacáridos rafinose, sacarose, e dos monossacarídeos glicose, galactose e frutose extrato bruto da erva chinesa Tanshen (LI et al.; 2008).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABAD, M. J. et al. Antiviral activity of medicinal plant extracts. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 3, p. 198-202, 1997.

ALTIOK, E., BAYCIN, D., BAYRAKTAR, O., ULKU S. (in press). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*.

AMORIM, A. C. L. et al. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 923-928, 2009.

ARANTES, A. A.; MONTEIRO, R. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana* v.3, n.2, p.111-127, 2002

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

BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.

BORGES, K. C. D. F. et al. Pulp yield and morphometric characters of fruit and seed of *Eugenia calycina*/Rendimento de polpa e morfometria de frutos e sementes de pitangueira-do-cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 471, 2010. ISSN 0100-2945.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p.

BULOW, J. F. W.; CARMONA, R.; PARENTE, T. V. Treatment and storage of eugenia- *calycina* seeds. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v. 29, n. 6, p. 961-970, 1994.

CARDOSO, C. A. L. et al. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 5, p. 1273-1276, 2010.

CERQUEIRA, M. D. et al. Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 998-1003, 2007.

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

CROTTI, A. E. . Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quimica Nova*, v. 29, n. 2, p.287-292, 2006

- CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. *Revista Floresta e Ambiente*, v. 11, n.1, p. 47-52, 2004.
- CUNHA, A. P. *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.
- D'ARCHIVIO, M., FILESI, C., DI BENEDETTO, R., GARGIULO, R., GIOVANNINI, C., MASELLA, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43(4), 348–361.
- DAAYF F, LATTANZIO V: *Recent Advances in Polyphenol Research*, vol I: Blackwell Publishing Ltd; 2008.
- DALMASCHIO, G. P. Caracterização de Substâncias Polares no Petróleo por Espectrometria de Massas de Altíssima Resolução e Exatidão – ESI(±)-FT-ICR MS. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2012. 87 f.
- DJIPA, C. D.; DELMEE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.*, v. 71, n. 1-2, p. 307-313, 2000. ISSN 0378-8741.
- DI STASI, L. C.; et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia** v. 73, p. 69-91, 2002.
- GORDON, M. H. (1996). Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Products Reports*, 265, 273.
- HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3ª Ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Bruxellas, Bélgica, 2007.
- IGNAT, I; VOLF, I; POPA, V.I.; A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126 (2011) 1821–1835)
- JOLY, A.B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 13 ed. São Paulo : Nacional, 2002. 777p.
- LAGO, J. H. G. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *plinia trunciflora* (O. Berg) kausel. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9827-9837, 2011.
- LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.
- LI, H; SONG, F; ZHENG, Z; LIU, Z; LIU, S. Characterization of saccharides and phenolic acids in the Chinese herb tanshen by ESI-FT-ICR-MS and HPLC. *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY*. 2008; 43: 1545–1552.
- LUNARDI, I. et al. Triterpenic Acids from *Eugenia moraviana*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 2, p. 180-183, 2001.
- LUTHRIA, D. L., PASTOR-CORRALES, M. A. (2006). Phenolic acids content of 15 dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 205–211.

- MAGINA, M. D. A. Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero *eugenia*. 178f. Tese (Doutorado em Química) Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- MARSHALL, A. G.; SCHWEIKHARD, L. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: Technique developments. *Int. J. Mass Spectrom.* **118/119**, 37-70, 1992.
- McVAUGH, R. Botany of the Guyana highland. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. New York. v. 18, n. 2, p. 55-286, 1969.
- METCALF, C.R. e CHALK L. Anatomy of the dicotyledons. Oxford, Clarendon Press, 1979.
- MOHAMED, A. A.; ALI, S. I.; EL-BAZ, F. K. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. **PLoS One**, v. 8, n. 4, 2013.
- MORAES, M.C. , LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Química Nova*,v. 26, n. 4, 556-563, 2003
- NOMI, Y. et al. Isolation and antioxidant activity of zeylaniin A, a new macrocyclic ellagitannin from *Syzygium zeylanicum* leaves. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 4CL1, p. 10263, 2012.
- NUENGCHAMNONG, N.; INGKANINAN, K. On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 297-302, 2009.
- OGUNWANDE, I. A. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, n. 3, p. 147-152, 2005.
- OLIVEIRA, A.M. et al. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae) Phytochemical studies of the extracts of stem bark and leaves of *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae) and evaluation of their molluscicidal and larvicidal activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 618, 2006.
- OLIVEIRA, R.N. de; DIAS, I.J.M.; CAMARA, C.A.G. Estudo comparativo do óleo volátil de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. *Rev. bras. farmacogn.*, v. 15, n. 1, p. 39-43, 2005.
- OMAR, R. et al. alpha-Glucosidase Inhibitory Hydrolyzable Tannins from *Eugenia jambolana* Seeds. **J. Nat. Prod.**, v. 75, n. 8, p. 1505-1509, 2012.
- PAULA, J.A.M.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F.; REZENDE, M.H.; FERREIRA, H.D. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum – Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, V.18(2), p. 265-278, 2008.
- PARK, K.H; KIM, M.S; BAEK, S.J; BAE, I.H; SE, S. W; KIM, J; SHIN, Y,K; LEE, Y.M; KIM, H.S. Simultaneous molecular formula determinations of natural compounds in a plant extract using 15 T Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Plant Methods* 2013, 9:15

- POPA, V. I., DUMITRU, M., VOLF, I., ANGHEL, N. (2008). Lignin and polyphenols as allelochemicals. *Industrial Crops and Products*, 27, 144–149.
- RODRIGUEZ, R. M. Estudo da Emissão de Íons Estáveis e Metaestáveis (LiF)_nLi⁺ Induzida por Fragmentos de Fissão do ²⁵²Cf. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003. 140 p.
- ROMÃO, W. Novas aplicações da espectrometria de massas em química forense. Tese de Doutorado. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010
- ROSS, K. A., BETA, T., ARNTFIELD, S. D. (2009). A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*, 113, 336–344
- SÁ, F. A. S. et al. Essential oils in aerial parts of *Myrcia tomentosa*: Composition and variability. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1233-1240, 2012.
- SAHA, S. et al. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and fractions of *Eugenia jambolana* root bark and isolation of phytoconstituents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 4, p. 651-661, 2013.
- SANTOS, K. K. A. et al. Cytotoxic, trypanocidal, and antifungal activities of *Eugenia jambolana* L. **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 1, p. 66, 2012.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. rev. ampl., Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 1102 p, 2004.
- SOLEREDER H. *Systematic Anatomy of the Dicotyledons*. V1. Oxford: Clarendon Press, 1908. v.1
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG III*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.
- STEFANELLO, M.E.A.; SALVADOR, M.J.; ITO, I.Y.; MACARI, P.A.T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16 (4), p.525-530, 2006.
- VESSECCHI, R. et al. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. *Química Nova*, v. 34, n. 10, 1875-1887, 2011
- VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, 2012.
- VILA, R. et al. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of α-bisabolol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2510-2514, 2010.

*CAPÍTULO 1- Morfoanatomia Foliar,
Fitoquímica e Variabilidade do Óleo
volátil de Eugenia calycina (Myrtaceae)*

1. INTRODUÇÃO

Antes do início do século XX, o uso dos produtos naturais se limitava principalmente ao uso de extratos e preparados a partir de plantas, baseado na observação empírica do efeito causado pela sua administração. Pouco se conhecia a respeito da química de plantas medicinais (MAGINA, 2008). Porém, atualmente, pesquisas na busca de novos fármacos, mostram que as descobertas com maior impacto tem origem em estudos químicos e biológicos de plantas revelando uma enorme quantidade de substâncias ativas (NEVES; CUNHA, 2006).

Frente a estas pesquisas está a Farmacognosia uma das ciências mais antiga, que tem por objetivo o conhecimento dos fármacos em particular os de origem vegetal. Sendo que três ciências encontram-se na base dos estudos da farmacognosia: a Botânica, a Química Orgânica e a Farmacologia (COSTA, 2001).

Os ensaios botânicos consistem numa avaliação rigorosa das características morfológicas e anatômicas da matéria prima vegetal. E os estudos anatômicos podem fornecer subsídios valiosos para o controle de qualidade de matéria-prima vegetal, bem como para pesquisas taxonômicas e áreas afins. Além disto, a utilização de matéria-prima vegetal, seja para fins fitoterápicos ou para o isolamento de substâncias químicas, requer como primeiro passo a sua identificação (AMARAL et al., 2003; CUNHA, 2005; KLOUCEK et al., 2005).

A análise fitoquímica preliminar indica os grupos de metabólitos secundários presentes na espécie, ou caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural da mesma (FALKENBERG et al., 2004). Portanto, a pesquisa fitoquímica baseada nas informações etnofarmacológicas é geralmente considerada uma efetiva descoberta na busca de novos agentes bioativos a partir de metabólitos secundários sintetizados pelas plantas (KLOUCEK et al., 2005).

Os metabólitos secundários, por sua vez, podem sofrer variações qualitativa e quantitativa influenciados pelos principais fatores: hereditários (composição genética), ontogênicos (estádio de desenvolvimento) e ambientais (ROBBERS et al., 1997). Além de diversos fatores extrínsecos e intrínsecos, exigindo a obediência às condições ideais de cultura, colheita, secagem, estabilização, manufatura, conservação e armazenamento (AMARAL et al., 2003).

Devido à biodiversidade brasileira muitas plantas são utilizadas como fonte de medicamentos populares, pois, antes da descoberta do Brasil povos indígenas usavam as florestas como suas farmácias e após a descoberta as práticas indígenas junto com o conhecimento trazido pelos europeus contribuíram para o desenvolvimento da medicina popular (MOURA-COSTA et al., 2012). Foram registrados aumento do uso de produtos naturais nas últimas décadas nos Estados Unidos da América e na Europa, principalmente na Alemanha que consome metade dos extratos vegetais comercializados em todo o seu continente. As plantas medicinais são utilizadas pela população para tratamento de resfriados, gripe, dores de cabeça, doenças do trato gastrointestinal, úlcera, insônia, entre outros (NEVES; CUNHA, 2006).

Atualmente, através de levantamento bibliográfico, é facilmente perceptível e comprovado o crescente número de trabalhos científicos com plantas medicinais com a finalidade de comprovação do uso medicinal popular. Para tanto, são utilizando diversos métodos biológicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos, entre outros, para a pesquisa de atividades biológicas e farmacológicas, com a elucidação das substâncias ativas, além é claro, da preocupação de assegurar a segurança toxicológica das espécies estudadas.

O presente estudo teve por objetivo acrescentar conhecimentos morfoanatômico foliar, fitoquímico e composição química do óleo volátil das folhas e casca de *Eugenia calycina* Cambess. Os dados obtidos poderão fornecer parâmetros de comparação auxiliando assim, no controle de qualidade da matéria-prima vegetal.

2 METODOLOGIA

2.1 Material Botânico

Para a realização do presente trabalho as folhas e casca do caule de *Eugenia calycina* Cambess. (Fig. 1) foram coletadas nos municípios de Bela Vista – GO (16°59'42,0"S 48°53'17,8"O 826 m altitude) e de Rio Verde – GO (18°05'17,3"S 50°55'59,3"W 748 m altitude).

Posteriormente as amostras foram transportadas ao Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) para o processamento conforme as técnicas usuais para a análise morfoanatômica e ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFG para análise fitoquímica e composição química do óleo volátil.

As amostras foram coletadas de acordo com a finalidade da análise em relação à localidade, época e órgão vegetal, conforme Tabela 01.

Tabela 01 – Relação de coletas de amostras de *Eugenia calycina* Cambess.

FINALIDADE	LOCALIDADE	ÉPOCA	ÓRGÃO VEGETAL
Morfoanatomia	Bela Vista Rio Verde	Outubro/2012	Folhas/Flores
Prospecção Fitoquímica	Bela Vista Rio Verde	Janeiro/2011	Folhas/Casca
Extrato Etanólico Bruto	Rio Verde	Janeiro/2012	Folhas/Casca
Quantificação de Substâncias Fenólicas	Bela Vista Rio Verde	Janeiro, Abril, Julho e Outubro/2011 Janeiro/2012	Folhas/Casca
Variabilidade do Óleo Essencial	Bela Vista Rio Verde	Janeiro, Abril, Julho e Outubro/2011 Janeiro/2012	Folhas
Análise de Metais	Bela Vista Rio Verde	Janeiro, Abril, Julho e Outubro/2011 Janeiro/2012	Folhas/Casca

A identificação do material botânico foi realizada pelo prof. Dr. José Realino de Paula. As exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal de Goiás sob o número UFG – 48559 (Bela Vista) e UFG-48558 (Rio Verde).

2.2 Análise Morfoanatômica

A análise morfológica da espécie foi realizada por meio de observações à vista desarmada no local de coleta, registro fotográfico e em laboratório com o auxílio de microscópio estereoscópico, considerando as características macroscópicas gerais de matéria-prima vegetal constituída de folhas.

Para a análise anatômica, do material coletado em campo, foram retiradas quatro folhas completamente expandidas provenientes do terceiro ao oitavo nó, no sentido ápice-base, de três indivíduos, em cada localidade de coleta.

Os fragmentos da região mediana do pecíolo e terço médio da lâmina foliar (nervura central, entre - nervura e bordo) foram fixados em FAA₇₀ (JONHANSEN, 1940) por um período de 24h e posteriormente armazenadas em etanol 70%. Foram realizadas secções transversais e longitudinais do pecíolo e secções longitudinais, transversais e paradérmicas da lâmina foliar a mão livre. As secções do material vegetal foram clarificadas com água sanitária, lavadas em água purificada e submetidas à dupla coloração com fucsina básica aquosa a 0,1% e azul de astra 0,3% (ROESER, 1972) na proporção 1:3 (em média 3 min.); posteriormente desidratadas em série etílica e montadas em resina sintética (PAIVA et al. 2006).

As principais classes de metabólitos presentes no material analisado foram investigadas, em secções de amostras recém-coletadas, não fixadas, obtidas a mão livre utilizando os testes hitoquímicos: Sudan III (JENSEN, 1962) para identificar substâncias lipofílicas; Steinmetz (COSTA 1970 - apud KRAUS; ARDUIN, 1997) conhecido como reagente universal, por possibilitar o reconhecimento simultâneo de amido, celulose, lignina, suberina, lipídeos diversos, látex e gomo-resinas; cloreto de zinco iodado (JENSEN, 1962) para

celulose, amido e lignina; dicromato de potássio (GABE, 1968) para substâncias fenólicas. Os controles foram realizados em secções sem qualquer tratamento ou conforme especificado pelos autores.

Para o reconhecimento de inclusões de natureza cristalina, as amostras do material vegetal foram analisadas sob luz polarizada.

As fotomicrográficas referentes às estruturas anatômicas foram realizadas em fotomicroscópio modelo ZEISS-AXIOSKOP acoplado à câmara clara, com utilização de filme fotográfico ASA 100 e em microscópio Leica - DM 500 com câmara digital ICC50, com programa de captura de imagem LAD EZ versão 1.8.1.

2.3 Análise Fitoquímica

As coletas de folhas e casca do caule foram realizadas no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012, nos meses de janeiro, abril, julho, outubro de 2011 e janeiro de 2012.

No momento da coleta das amostras de folhas, foi coletado cerca de 1 kg do solo a uma profundidade aproximada de até 20 cm, em quatro pontos ao redor de cada exemplar de *E. calycina*.

Para a análise de metais foram reservados 15 g do pó das amostras das cascas e folhas em cada uma das coletas.

As amostras de folhas e casca do caule foram dessecadas em estufa de circulação de ar a 40°C, em seguida trituradas em moinho de facas até a forma de pó sendo devidamente identificados e armazenados até sua utilização nas análises.

2.3.1 Prospecção Fitoquímica e Determinação da Umidade

A prospecção fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários presentes nas folhas e casca do caule de *E. calycina*, foi realizada em amostra pulverizada, por meio de técnicas específicas descritas por Matos

(1988), Matos e Matos (1989) e Costa (2001), para pesquisa de mucilagem, saponinas, antraquinonas, taninos, flavonóides, cumarinas, alcalóides, esteróides e triterpenóides.

Para a determinação do teor de umidade, os ensaios foram realizados em triplicata, conforme a Farmacopéia Brasileira V (2010), utilizando balança de infravermelho OHAUS. A percentagem de umidade foi calculada em relação à amostra seca ao ar.

2.3.2 Quantificação de Substâncias Fenólicas

As análises quantitativas para as classes de metabólitos secundários foram realizadas em triplicata, após prévia prospecção fitoquímica. As classes de metabólitos secundários observadas em *Eugenia calycina* pertencem ao grupo de substâncias fenólicas (fenóis totais) dentre eles os flavonóides e taninos. Estes substâncias foram doseadas nas amostras de folhas e casca do caule.

2.3.2.1 Fenóis totais (FT)

Para a quantificação dos fenóis totais utilizou-se o método de Hagerman e Butler (MOLE; WATERMAN, 1987a, 1987b), que se baseia na reação de complexação das substâncias fenólicas presentes na amostra com uma solução de cloreto férrico (FeCl_3) que pode ser medida em espectrofotômetro e utilizando-se como padrão o ácido tânico.

Foram fervidos 1,0 g de material botânico pulverizado com 250 ml de água purificada e mantidos em banho-maria entre 80 e 90°C por 30 minutos. Em seguida as soluções foram resfriadas, acrescidas de água purificada até o volume de 250 ml e depois filtradas. Alíquotas de 1 ml das soluções foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 2 ml de solução de Lauril Sulfato de Sódio (LSS)/Trietanolamina e 1 ml de solução de cloreto férrico (FeCl_3). Posteriormente, foram mantidas em repouso por 15 minutos. Em seguida foi realizada a leitura da

absorvância em 510 nm. Foi realizada curva analítica utilizando o ácido tânico como padrão.

2.3.2.2 Taninos precipitados por proteína (TPP)

Para a quantificação dos taninos totais precipitados utilizou-se o método de Hagerman e Butler (MOLE; WATERMAN, 1987a, 1987b), que se baseia na reação de precipitação dos taninos totais utilizando proteína, a albumina, e posterior complexação dos taninos precipitados presentes na amostra com uma solução de FeCl_3 , que pode ser medida em espectrofotômetro e utilizando-se como padrão o ácido tânico.

Foram fervidos 1,0 g de material botânico pulverizado com 250 ml de água purificada e mantidos em banho-maria entre 80 e 90°C por 30 minutos. Em seguida as soluções foram resfriadas, acrescidas de água purificada até o volume de 250 ml e depois filtradas. Alíquotas de 1 ml das soluções foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados 2 ml de solução de proteína, a albumina, para a precipitação dos taninos totais. Posteriormente foram mantidas em repouso à temperatura ambiente por 15 min e, então, centrifugados por 15 min a 3000 r.p.m. Os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados foram dissolvidos com 4 ml de solução de LSS/Trietanolamina, adicionados em seguida 1 ml de solução cromogênica de cloreto férrico. Os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso por 15 a 30 minutos. Em seguida foi realizada a leitura da absorvância em 510 nm. Foi realizada curva analítica utilizando o ácido tânico como padrão.

2.3.2.3 Flavonóides (Fv)

Para a determinação de flavonóides totais utilizou-se o método espectrofotométrico descrito por Rolim et al. (2005), modificado. A técnica baseia-se na propriedade dos flavonóides em absorver radiação no comprimento de onda

da luz ultravioleta (UV) de forma proporcional a sua concentração; utilizando-se como padrão a Rutina (3-O-rutinosídeo-quercetina), um flavonol O-glicosídeo.

Em 0,25 g de material botânico pulverizado foram adicionados 50 ml da solução de metanol: ácido acético 0,02M (99:1) aqueceu-se em banho-maria sob refluxo a 90-100°C por 40 minutos. Em seguida as soluções foram filtradas e alíquotas foram colocadas em tubos de ensaio para a leitura da absorvância em 361 nm.

2.3.3 Análise Química do Solo, Folhas e Casca do Caule

As análises químicas das amostras de solo, folhas e casca do caule foram realizadas no SOLOCRIA Laboratório Agropecuário Ltda, seguindo metodologia da EMBRAPA (SILVA, 1999).

Foram destinados 500 g de solo e 15 g de material vegetal pulverizado para a análise química, ambos referentes a cada localidade e época de coleta.

O pH foi obtido em um volume de água-solo na razão 1:1. O procedimento descrito por Silva (1999) foi utilizado para a análise de nutrientes no solo. Os nutrientes cálcio (Ca), magnésio (Mg) e alumínio (Al) foram extraídos com uma solução de KCl 1 mol/L, e fósforo (P), potássio (K), zinco (Zn), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) foram extraídos com solução de Mehlich. A matéria orgânica (M.O.), capacidade de troca catiônica (CTC), potencial de acidez (H+Al), saturação por bases (V) e saturação de Al (m) foram determinadas através de métodos convencionais (SILVA, 1999).

2.3.4 Dados Climáticos

Os dados climáticos (temperatura diária média e precipitação diária média) das regiões de coletas e respectivos meses analisados foram obtidos no site oficial do INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais).

2.3.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada visando encontrar possíveis relações de fatores ambientais sobre a concentração e composição química do óleo volátil presente nas folhas e cascas do caule de *E. calycina*, sendo utilizados os softwares SAS (Statistical Analysis System) versão 9.0. e STATISTICA 7.

A correlação linear de Pearson foi utilizada para estabelecer o nível de associação entre as substâncias fenólicas e componentes dos óleos voláteis e as variáveis ambientais. As correlações foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para a comparação das médias das variáveis dependentes (substâncias fenólicas e componentes químico do óleo volátil) em relação a cada exemplar e também para comparar as médias das diferentes épocas de coleta. Onde diferenças entre as médias foram detectadas, aplicou-se o teste de Tukey para comparação entre as médias. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Uma Análise de Regressão Múltipla com seleção de variáveis pelo método *stepwise* (DRAPER; SMITH, 1981) foi empregada para avaliar a influência dos fatores ambientais analisados (variáveis independentes), sobre a concentração de substâncias fenólicas e composição do óleo volátil, sendo considerado o nível de 0,05 de significância para a inclusão de variáveis independentes.

A análise de agrupamento (AA) foi utilizada para estudar as similaridades das amostras de acordo com a distribuição dos constituintes. Os agrupamentos hierárquicos foram formados de acordo com o Método de Variância Mínima de Ward (WARD, 1963), os dendrogramas foram obtidos em função da distância Euclidiana.

2.4 Variabilidade do Óleo Volátil

As coletas de folhas foram realizadas no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012, nos meses de janeiro, abril, julho, outubro de 2011 e janeiro de 2012.

No momento da coleta das amostras de folhas, foi coletado cerca de 1 kg do solo a uma profundidade aproximada de até 20 cm, em quatro pontos ao redor de cada exemplar de *E. calycina*.

Para a análise de metais foram reservados 15 g do pó das amostras das cascas e folhas em cada uma das coletas.

As amostras de folhas e casca do caule foram dessecadas em estufa de circulação de ar a 40°C, e no momento da extração do óleo volátil foram trituradas em liquidificador.

2.4.1 Extração e quantificação do óleo volátil

Para a extração do óleo volátil os pós foram submetidos à hidrodestilação, por 4 h, em aparelho tipo Clevenger modificado. O volume de óleo volátil foi medido no tubo graduado do próprio aparelho e o rendimento, em porcentagem (v/p), foi calculado em relação à quantidade inicial (g) de material botânico empregado na extração. Os óleos voláteis foram dessecados com Na₂SO₄ anidro, acondicionados em recipientes fechados e estocados a baixas temperaturas (-20°C) até a utilização.

O óleo volátil obtido foi submetido à análise cromatográfica, em fase gasosa, acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) em aparelho SHIMADZU QP5050A. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida (CBP – 5; 30m x 0,25mm x 0,25µm), com um fluxo de 1 ml/min de Hélio, como gás de arraste, aquecimento com temperatura programada (60 °C/2 min⁻¹; 3 °C/ min⁻¹/240 °C; 10 °C min⁻¹/280 °C; 280 °C /10 min), e energia de ionização de 70 eV. O volume de injeção foi de 1 µL de cada amostra diluída em diclorometano na proporção de

1:5. Os componentes químicos dos óleos voláteis foram identificados por comparação dos espectros de massas e índices de retenção com os relatados na literatura para os componentes mais comuns de óleos voláteis (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados através da co-injeção de uma mistura de hidrocarbonetos, C9 – C22, e utilização da equação de VAN DEN DOOL e KRATZ (1963).

Equação de Van Den Dool e Kratz:

$$IR = 100 \cdot N [(t_x - t_{n-1}) / (t_n - t_{n-1})] + 100 \cdot C_{n-1}$$

Onde:

$$N = C_n - C_{n-1}$$

C_n = número de carbonos do *n*-alcano que elui após a substância analisada

C_{n-1} = número de carbonos do *n*-alcano que elui antes da substância analisada

t_x = tempo de retenção da substância analisada

t_n = tempo de retenção do *n*-alcano que elui após a substância analisada

t_{n-1} = tempo de retenção do *n*-alcano que elui antes da substância analisada

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Análise Morfoanatômica

3.1.1 Morfologia

Eugenia calycina é uma espécie subarbustiva com até 2,0 m altura; Folhas pecioladas, pecíolos 3-7 x 2,5-3 mm; lâmina foliar, discolor, ovado-elíptico 4-8 x 1,5-3 cm; ápice agudo, levemente acuminado a retuso; base cuneada ou atenuada, margem lisa, coriáceas na fase adulta (Fig 1-2). Inflorescência em cimeira uniflora. Flores pediceladas, bractéolas no ápice do pedicelo, ovadas 1-3 cm, ápice acuminado, base cordada, membranáceas, glabras; cálice dialissépalo, sépalas oblongas 8-14 mm comprimento, corola branca, dialipétalas, pétalas obovadas, 10-15 mm comprimento (Fig. 2) Fruto baya 1-3 cm largura; oblongo (Fig.1—2)



Figura 1 – *Eugenia calycina* Cambess. Fonte: Prof. Dr. José Realino de Paula



3.1.2 Anatomia

As folhas de *E. calycina* são hipoestomáticas com estômatos anomocíticos e raros paracíticos (Fig. 2A). Em vista frontal, as células epidérmicas da face adaxial, das folhas provenientes do espécime de Bela Vista, mostram paredes anticlinais encurvadas a onduladas (Fig. 2B) e na face abaxial as paredes anticlinais são retas a onduladas; nas folhas do espécime de Rio Verde as células epidérmicas, na face adaxial possuem paredes anticlinais predominantemente retas (Fig.2C) e na abaxial as paredes são retas a onduladas (Fig.2A). As células epidérmicas que recobrem as cavidades secretoras diferem das demais células em relação ao formato e organização (Fig. 2B-C).

Características como folhas hipoestomáticas, estômatos anomocíticos e paracíticos também foram registradas em *E. dysenterica* (PALHARES, 2003), *Eugenia brasiliensis* Lam. (DONATO; MORRETES, 2007), *Eugenia uniflora* (LONGUI ET al., 2008), *Eugenia pyriformes* Cambess. (ARMSTRONG, 2011) e *Eugenia biflora* (L.) DC., *E. flavescens* DC., *E. patrisii* Vahl. e *E. tapacumensis*

Berg. (ALVAREZ; SILVA, 2012). Metcalfe e Chalk (1950) citam estômatos anomocíticos como os mais comuns em Myrtaceae.

Pereira (1985), Machado et al. (1988) e Neves e Donato (1989) observaram paredes sinuosas em *Eugenia neonitida* Sobral, *E. sulcata* Spring ex Mart. e *E. uniflora* L., respectivamente. Gomes e Neves (1997) constataram que em Myrtaceae, as paredes anticlinais das células epidérmicas podem ser retas ou sinuosas. Barthlot (1981) refere que o contorno das paredes e o formato das células da epiderme são características importantes, podendo ter valor taxonômico.

Em secção transversal da lâmina foliar, observa-se que a epiderme é uniestratificada revestida por cutícula espessa e ornamentada, presença de flanges cuticulares (Fig. 2D-E); na face adaxial as paredes periclinais internas das células epidérmicas são curvas (Fig. 2D). Os estômatos apresentam ampla câmara subestomática e encontram-se localizados no mesmo nível das demais células epidérmicas. O mesofilo é dorsiventral, constituído pelo parênquima paliçádico formado por uma camada de células alongadas e parênquima lacunoso com várias camadas de células (Fig. 3A). O parênquima paliçádico é conectado ao lacunoso pelas células coletoras, as quais, no espécime de Bela Vista, são alongadas anticlinalmente se assemelhando ao parênquima paliçádico (Fig.3C). Idioblastos contendo drusas ocorrem no parênquima paliçádico (Fig.3B-C), sendo mais numerosos no espécime de Bela Vista em relação ao espécime de Rio Verde; raros idioblastos foram observados no parênquima lacunoso. Cavidades secretoras de substâncias lipofílicas, com lume amplo e localização subepidérmica ocorrem em ambas às faces da lâmina foliar (Fig.3D-F). Os feixes vasculares de médio e pequeno porte são colaterais, apresentam calota esclerenquimática externamente ao floema e xilema, estão envolvidos por bainha parenquimática (Fig. 3A,G).

Mesofilo dorsiventral, cristais de oxalato de cálcio isolados ou drusas, cavidades secretoras de óleos voláteis são características frequentemente presentes em outras espécies de Myrtaceae (FONTENELLE et al.,1998, DONATO; MORRETES, 2007, ARMSTRONG, 2011, GRACIANO-RIBEIRO et al., 2009, ALVAREZ; SILVA, 2012),

Conforme Solereder (1908) as cavidades secretoras constituem a principal característica anatômica de Myrtaceae.

Donato e Morretes (2007) relataram a presença de células coletoras conectando o parênquima paliçádico ao lacunoso nas folhas de *Eugenia brasiliensis*.

A região da nervura central, em secção transversal, apresenta contorno plano-convexo (Fig.4A-B); o córtex é composto por colênquima angular com duas a três camadas de células, parênquima com células de tamanho desigual, cristais prismáticos e drusas evidenciados sob luz polarizada, ocorrem na região cortical (Fig.4 C-D); o sistema vascular é constituído por um feixe bicolateral, organizado em arco aberto, envolvido por faixa esclerenquimática (Fig. 4A-B). Cristais prismáticos e drusas também ocorrem no floema.

O bordo, em secção transversal, apresenta forma arredondada, levemente fletido em direção à face abaxial (Fig. 4E). Na região do bordo as células epidérmicas revestidas por cutícula espessa são maiores e alongadas anticlinalmente em relação àquelas das demais regiões da lâmina foliar; sob a epiderme evidencia-se colênquima com uma a duas camadas de células; entre o último feixe vascular e a epiderme ocorre parênquima clorofiliano, podendo ocorrer uma a duas cavidades secretoras (Fig.4E).

A secção transversal do pecíolo, na região mediana, apresenta contorno plano-convexo em ambos os espécimes (Fig.5B). A epiderme é uniestratificada, em posição subepidérmica ocorrem cavidades secretoras semelhantes às descritas para a lâmina foliar (Figura 5A-E). A região cortical é constituída por parênquima cujas células possuem paredes delgadas; nesta região foram registrados numerosos idioblastos contendo cristais (Fig.5A, C). O sistema vascular é constituído por feixe único bicolateral, em formato de arco (Fig.5A-B, F), presença de bainha perivascular parenquimática nas amostras provenientes de BV (Fig.5A) e bainha perivascular esclerenquimática nas amostras provenientes de RV (Fig.5B).

Metcalf e Chalk (1983) afirmam que o sistema vascular em Myrtaceae é único em forma de U, constituído por um feixe bicolateral, o mesmo padrão

verificado para *E. calycina*. Sistema vascular em forma de arco aberto, segundo Howard (1979 e 1990) é um caráter que auxilia na identificação de alguns táxons.

Na lâmina foliar de *E. calycina*, os testes histoquímicos evidenciaram a presença de substâncias lipofílicas na cutícula, células epidérmicas e cavidades secretoras (Fig. 6A), e substâncias fenólicas nas células epidérmicas tanto na face adaxial como na abaxial, nas células do parênquima clorofiliano e células epiteliais das cavidades secretoras (Fig.6 B-E). Na nervura central as substâncias fenólicas foram evidenciados em células do parênquima cortical, floema e xilema (Fig. 6F).

No pecíolo, os testes histoquímicos evidenciaram substâncias lipofílicas nas cavidades secretoras e em algumas células, adjacentes à epiderme.

Substâncias lipofílicas e fenólicas são reportadas para outras espécies de *Eugenia* como *E. sulcata* (FONTENELLE et al.,1998), *E. dysenterica* (PALHARES, 2003) e *E. brasiliensis* (DONATO; MORRETES, 2007).

Segundo Solereder (1908), mesofilo com abundância de tanino constitui uma das principais características de Myrtaceae.

Tanto na lâmina foliar quanto no pecíolo lignina foi evidenciada nas paredes dos elementos condutores do xilema e das células esclerenquimáticas.

3.2 Prospecção Fitoquímica e Determinação da Umidade

Na prospecção fitoquímica realizadas nas folhas e casca do caule de *Eugenia calycina* observou-se a presença de esteroides e/ou triterpenos, taninos, flavonóides e saponinas. Não foram encontrados na espécie estudada, através dos testes, bem como na literatura pesquisada, a presença de alcalóides, bases quaternárias, quinonas, antranóis e cumarinas.

Armstrong (2011) verificou a presença de glicosídeos flavônicos e esteroides e/ou triterpenóides particularmente no extrato hidroalcoólico de folha, enquanto que saponinas, taninos e ácidos fixos foram detectados no extrato aquoso, tanto de folha como de caule de *Eugenia pyriformis*.

Flavonóides e taninos foram constatados nas folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (PAULA, 2008). Esteróides, triterpenos, flavonóides, saponinas e taninos foram registrados nas folhas de *Eugenia uniflora* (FIUZA, 2008). A presença de taninos e terpenos, tanto nas folhas como na casca, de flavonóides nas folhas e de saponina apenas na casca de *M. tomentosa* foi relatada por Sá (2010). Os taninos e os terpenos são comuns em Myrtaceae (SOLEREDER, 1908; JUDD et al., 2009).

Os resultados obtidos com a determinação da umidade expressa em porcentagem (p/p) \pm desvio padrão para as amostras de folhas e cascas do caule entre o período de janeiro de 2011 e janeiro de 2012, se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Umidade expressa em porcentagem (p/p) \pm desvio padrão nas amostras de folhas e casca do caule de *E. calycina* Cambess. coletadas nas localidades de Bela Vista (BV) e Rio Verde (RV), entre janeiro/11 a janeiro/12.

AMOSTRAS	BV1	BV2	BV3	BV4	BV5	RV1	RV2	RV3	RV4	RV5
Folhas	7,77 \pm 0,08	7,30 \pm 0,27	7,47 \pm 0,13	6,66 \pm 0,21	5,29 \pm 0,05	7,68 \pm 0,13	8,45 \pm 0,12	8,22 \pm 0,08	9,26 \pm 0,13	6,27 \pm 0,12
Casca do Caule	9,25 \pm 0,20	9,06 \pm 0,22	9,05 \pm 0,39	10,41 \pm 0,30	6,80 \pm 0,12	9,32 \pm 0,50	9,00 \pm 0,63	9,44 \pm 0,27	9,43 \pm 0,31	7,38 \pm 0,27

BV1-Bela Vista jan 2011; BV2-Bela Vista abr 2011; BV3-Bela Vista jul 2011; BV4-Bela Vista out 2011; BV5-Bela Vista jan 2012; RV1-Rio Verde Jan 2011; RV2-Rio Verde abr 2011; RV3-Rio Verde jul 2011; RV4-Rio Verde out 2011; RV5-Rio Verde Jan 2012.

As amostras de *E. calycina* apresentaram entre 5,29 a 9,26% de umidade para as folhas e entre 6,80 a 10,41% para a casca, estando dentro do valor de umidade máximo para droga vegetal estabelecido pela Farmacopeia Brasileira IV que é de 8 a 14% (BRASIL, 2010).

Este índice está relacionado com a correta preparação e conservação das drogas vegetais, pois, segundo Farias (2004) o excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos, bactérias e insetos levando a uma conseqüente deterioração e degradação de

substâncias químicas da amostra a ser analisada. Porém, as matérias-primas vegetais contêm, naturalmente, certa quantidade de água, que se mantém desde a secagem das plantas (COSTA, 2001).

3.3 Quantificação de Substâncias Fenólicas

Os resultados obtidos na quantificação das substâncias fenólicas (fenóis totais, taninos totais e flavonoides), nas amostras de folhas e cascas do caule entre o período de janeiro de 2011 e janeiro de 2012, foram expressos como média da triplicata e se encontram na Tabela 3. Os resultados dos níveis de macronutrientes nas folhas e casca do caule de *Eugenia calycina* Cambess., bem como as condições climáticas na localidade de Bela Vista e Rio Verde durante o período de Janeiro 2011 a Janeiro 2012 encontram-se nas Tabelas 4 e 5. Os parâmetros de fertilidade e níveis de nutrientes minerais do solo e condições climáticas na localidade de Bela Vista e Rio Verde durante os períodos de coletas estão na Tabela 6.

Tabela 3. Conteúdo de substâncias fenólicas na casca do caule e folha de *Eugenia calycina* Cambess. nas localidades de Bela Vista e Rio Verde durante o período de Janeiro 2011 a Janeiro 2012.

Amostra	Composto Fenólico (%)	Bela Vista					Rio Verde				
		Jan/20011	Abr/2011	Jul/2011	Out/2011	Jan/2012	Jan/20011	Abr/2011	Jul/2011	Out/2011	Jan/2012
Casca	Fenóis Totais (FT)	3,46	2,77	3,23	2,19	2,37	3,69	2,24	2,85	2,90	3,49
	Taninos Totais Precipitados (TTP)	4,46	3,70	3,82	3,63	3,68	2,80	2,52	2,81	2,58	2,58
	Flavonóides (F)	4,17	3,00	3,37	2,53	3,27	3,34	2,39	2,53	3,02	2,59
Folha	Fenóis Totais (FT)	3,06	2,65	3,04	2,71	3,22	3,89	3,57	3,68	3,47	4,33
	Taninos Totais Precipitados (TTP)	2,64	2,58	2,57	2,46	2,60	2,61	2,43	2,62	2,30	2,52
	Flavonóides (F)	4,82	4,70	5,19	5,11	5,47	4,63	4,62	3,91	3,38	4,50

Tabela 4. Níveis de macronutrientes na folha de *Eugenia calycina* Cambess. e condições climáticas na localidade de Bela Vista e Rio Verde durante o período de Janeiro 2011 a Janeiro 2012.

Nutrientes	Bela Vista					Rio Verde				
	Jan/20011	Abr/2011	Jul/2011	Out/2011	Jan/2012	Jan/20011	Abr/2011	Jul/2011	Out/2011	Jan/2012
Ca (dag/kg)	6,70	7,50	7,10	7,80	8,20	9,90	11,50	6,00	7,60	9,20
Cu (mg/ kg)	23,00	7,00	6,00	10,00	4,00	7,00	9,00	9,00	8,00	7,00
Fe (mg/ kg)	172,00	190,00	210,00	191,00	286,00	248,00	450,00	320,00	227,00	602,00
K (dag/ kg)	6,00	8,00	7,50	10,60	8,00	5,00	5,60	3,20	10,40	8,60
Mg (dag/ kg)	3,40	2,00	1,90	2,50	3,50	2,90	2,70	3,10	4,50	2,40
Mn (mg/ kg)	113,00	12,00	11,00	17,00	17,00	39,00	42,00	28,00	21,00	28,00
N (dag/ kg)	21,60	18,00	15,00	17,00	19,00	16,00	20,40	18,00	21,00	21,20
P (dag/ kg)	1,10	1,20	1,00	1,20	1,00	1,00	1,50	1,00	1,10	1,10
S (dag/ kg)	1,20	1,30	1,20	1,30	1,20	1,20	1,20	1,00	1,00	1,00
Zn (mg/ kg)	17,00	16,00	15,00	6,00	12,00	19,00	19,00	18,00	10,00	17,00
Temperatura (°C)	30,69	31,69	31,54	30,76	29,02	29,36	29,71	29,78	30,38	27,98
Precipitação (mm)	287,80	62,30	0,00	300,30	467,40	257,00	70,40	0,00	264,10	210,10

Tabela 5. Níveis de macronutrientes na casca do caule de *Eugenia calycina* Cambess. e condições climáticas na localidade de Bela Vista e Rio Verde durante o período de Janeiro 2011 a Janeiro 2012.

Variáveis	Bela Vista					Rio Verde				
	Jan/20011	Abr/2011	Jul/2011	Out/2011	Jan/2012	Jan/20011	Abr/2011	Jul/2011	Out/2011	Jan/2012
Ca (dag/ kg)	25,30	31,00	22,00	33,00	38,00	34,00	21,00	19,00	29,00	34,00
Cu (mg/ kg)	7,00	6,00	9,00	6,00	6,00	7,00	7,00	8,00	7,00	9,00
Fe (mg/kg)	220,00	420,00	134,00	293,00	273,00	251,00	282,00	330,00	180,00	320,00
K (dag/kg)	10,20	8,00	17,50	9,60	10,00	8,00	8,40	6,60	12,00	14,00
Mg (dag/kg)	3,60	2,10	2,40	5,60	5,33	3,50	3,30	3,60	3,30	2,90
Mn (mg/kg)	28,00	17,00	28,00	14,00	22,00	40,00	33,00	81,00	20,00	26,00
N (dag/kg)	8,40	15,00	11,00	9,60	9,20	9,60	10,40	10,00	9,40	9,80
P (dag/kg)	0,50	0,90	1,10	1,00	0,80	0,60	1,00	1,00	0,80	1,10
S (dag/kg)	1,10	1,00	1,10	0,40	0,80	1,00	1,10	1,00	0,60	0,90
Zn (mg/kg)	12,00	25,00	23,00	8,00	8,00	18,00	21,00	23,00	17,00	14,00
Temperatura (°C)	30,69	31,69	31,54	30,76	29,02	29,36	29,71	29,78	30,38	27,98
Precipitação (mm)	287,80	62,30	0,00	300,30	467,40	257,00	70,40	0,00	264,10	210,10

Tabela 6. Parâmetros de fertilidade e níveis de nutrientes minerais do solo e condições climáticas na localidade de Bela Vista e Rio Verde durante o período de Janeiro 2011 a Janeiro 2012.

Variáveis	Bela Vista					Rio Verde				
	Jan/20011	Abr/2011	Jul/2011	Out/2011	Jan/2012	Jan/20011	Abr/2011	Jul/2011	Out/2011	Jan/2012
M.O. (%)	10,00	5,00	11,00	15,00	19,00	29,00	16,00	21,00	23,00	24,00
m (%)	33,90	53,33	6,71	25,32	69,77	63,16	72,73	77,42	51,28	71,43
V (%)	12,44	10,49	31,79	18,71	11,30	6,69	7,64	5,31	8,20	6,95
pH (Ca/Cl ₂)	4,60	4,30	4,60	4,00	3,70	4,10	4,10	4,10	3,80	3,90
H+Al (cmol/dm ³)	2,90	3,10	3,00	2,60	3,10	5,00	5,60	6,40	4,50	5,00
CTC (cmol/dm ³)	3,31	3,46	4,40	3,20	3,49	5,36	6,06	6,76	4,90	5,37
Al (cmol/dm ³)	0,20	0,40	0,10	0,20	0,90	0,60	1,20	1,20	0,40	0,90
Ca (cmol/dm ³)	0,20	0,20	0,90	0,30	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Cu (mg/dm ³)	1,50	1,00	0,80	0,40	0,80	1,80	0,90	0,90	0,40	0,40
Fe (mg/dm ³)	45,70	18,10	16,70	43,50	78,60	52,40	23,50	29,40	93,90	104,00
Mg (cmol/dm ³)	0,10	0,10	0,40	0,20	0,10	0,10	0,20	0,10	0,10	0,10
Mn (mg/dm ³)	8,90	3,70	7,00	6,20	12,10	5,00	5,10	5,90	8,90	6,20
K (mg/dm ³)	36,00	19,00	37,00	37,00	37,00	18,00	21,00	19,00	31,00	25,00
Zn (mg/dm ³)	1,20	0,90	1,20	0,20	1,60	0,20	1,20	0,60	0,20	1,70
Temperatura (°C)	30,69	31,69	31,54	30,76	29,02	29,36	29,71	29,78	30,38	27,98
Precipitação (mm)	287,80	62,30	0,00	300,30	467,40	257,00	70,40	0,00	264,10	210,10

M. O.: matéria orgânica; m: saturação por alumínio; V: saturação por bases; pH: potencial hidrogeniônico; (H+Al): acidez potencial; CTC: capacidade de troca iônica

3.3.1 Substâncias Fenólicas nas Folhas

As amostras de folhas de *E. calycina* apresentaram teores de fenóis totais entre 2,65 a 4,33% e taninos entre 2,43% a 2,64%, doseados segundo a metodologia de Hagerman e Butler (1978). Utilizando esta mesma metodologia, para determinar teores de taninos em outras espécies da família Myrtaceae, Fiuza et al. (2008) registram um teor de 5,08% de taninos nas folhas de *Eugenia uniflora*, enquanto Paula et al. (2008) verificaram teores que variaram de 2,68% a 5,97% nas folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*, e Sá (2010) encontrou valores de 3,41% em folhas de *Myrcia tomentosa*.

Outra classe de substâncias fenólicas, presente na espécie estudada, foram os flavonóides. Estes metabólitos foram doseados pelo método descrito por Rolim et al. (2005), e apresentou teor entre 3,38% a 5,47% (p/p) nas amostras de folhas de *E. calycina*.

Na análise de correlação de Pearson, valores em negrito são significantes ao nível de 5% (Tabela 7). Sendo que as correlações podem ser consideradas como fortes quando $r \geq 0,6$, como regulares quando $0,3 < r < 0,6$ e fracas quando $r < 0,3$. Os resultados, na Tabela 6, mostram que os fenóis totais (FT) se correlacionam fortemente com as variáveis: matéria orgânica (M.O.), percentagem de saturação por alumínio (m), acidez potencial (H + Al), capacidade de troca iônica (CTC) e concentração de alumínio (Al) do solo; a concentração de ferro (Fe) encontrados na folha e a temperatura. Já para taninos (TPP) apresentaram forte correlação com a concentração de cobre (Cu) do solo e de potássio (K) na folha. Enquanto que os flavonóides (Fv) se correlacionaram fortemente com a acidez potencial (H + Al) do solo e os níveis de enxofre encontrado nas folhas.

Foi realizado Teste t de Student para comparação das médias das localidades de coleta para Fenóis Totais (FT), Taninos Precipitados por Proteína (TPP) e Flavonóides (Fv) presentes nas folhas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. As amostras de Bela Vista e Rio Verde são significativamente diferentes ($p=0.0019$) em relação ao teor de Fenóis Totais (FT) ao nível de 1%. Em relação ao teor de Taninos Precipitados por Proteína (TPP) ($p=0.3123$) as amostras de Bela Vista e Rio Verde não diferem significativamente.

Enquanto que as amostras de Bela Vista e Rio Verde são significativamente diferentes ($p=0.0221$) em relação ao teor de Flavonóides (Fv).

Tabela 7. Coeficientes de correlação de Pearson entre substâncias fenólicas (FT, TPP, Fv) presentes nas folhas de *E. calycina* e variáveis ambientais. Os valores em negrito foram considerados significantes ($p < 0,05$).

Variáveis	FT	TPP	Fv
MO	0,81594	-0,19389	-0,39832
m	0,63359	0,019344	-0,35965
V	-0,54932	0,075555	0,5445
PH	-0,3848	0,4571	0,24087
H_Al	0,77945	-0,12634	-0,6425
Al	0,62107	0,029233	-0,23453
CTC	0,7522	-0,12774	-0,58831
Cu_s	0,025815	0,63995	0,16783
Fe_s	0,53949	-0,3482	-0,27297
Mn_s	-0,06826	-0,01606	0,19
Zn_s	0,17066	0,33077	0,46132
K_s	-0,45546	-0,09618	0,45237
Ca_s	-0,27729	0,087597	0,36003
Mg_s	-0,30472	-0,06933	0,39782
N	0,29658	-0,32735	-0,381
P_f	-0,12391	-0,47239	-0,02057
K_f	-0,33004	-0,61228	0,077782
Ca_f	0,43078	-0,30332	0,11412
Mg_f	0,18811	-0,37858	-0,53259
S	-0,74291	0,25786	0,73465
Cu_f	-0,19684	0,19709	-0,04765
Fe_f	0,78546	-0,14952	-0,14518
Mn_f	0,055103	0,30372	-0,00327
Zn_f	0,504	0,48747	-0,10987
Temperatura	-0,84774	-0,01056	0,094318
Precipitação	-0,01533	-0,05819	0,27372

M. O.: matéria orgânica; m: saturação por alumínio; V: saturação por bases; pH: potencial hidrogeniônico; (H+Al): acidez potencial; CTC: capacidade de troca iônica.

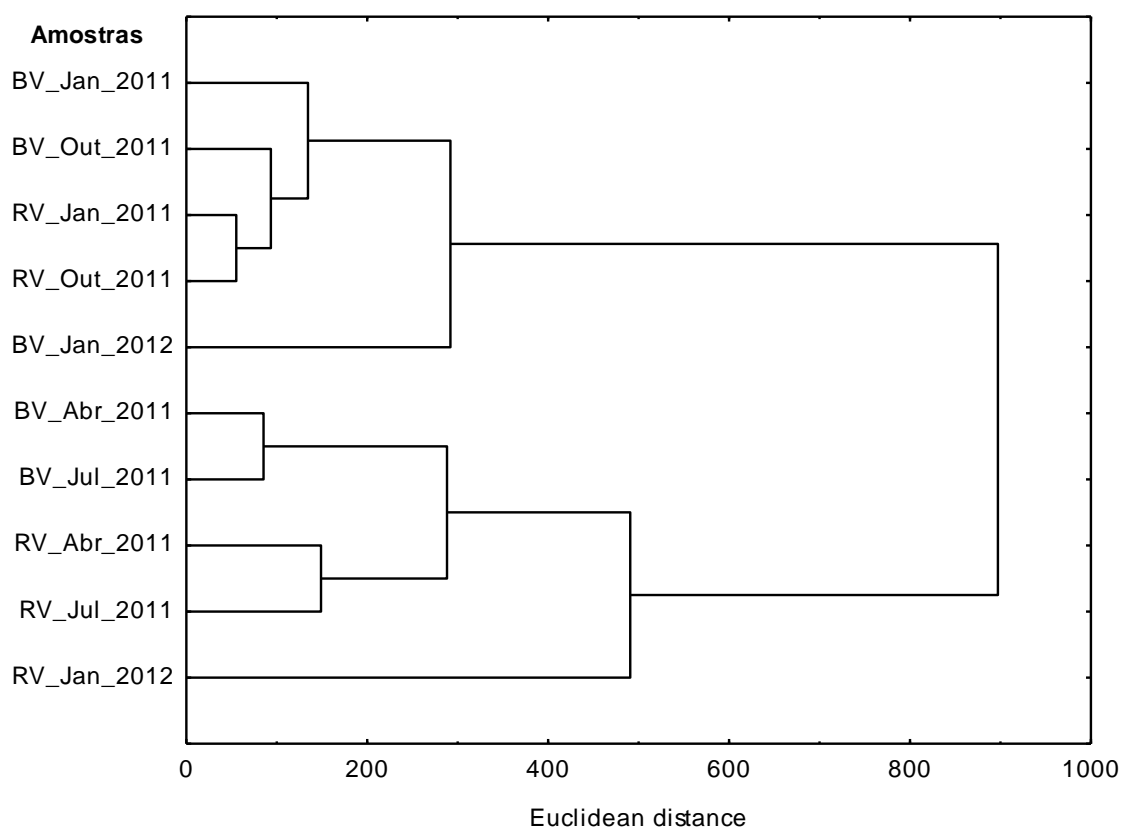
A análise de regressão múltipla pelo método *Stepwise* avaliou a influência de fatores ambientais (variáveis independentes ou preditoras) sobre a variação dos teores de substâncias fenólicas presente nas folhas (variáveis dependentes), através das três equações a seguir:

$$FT = 14,346 - 0,6437 AI + 0,3038 CTC - 0,3987 \text{ Temperatura}$$

$$TPP = 2,4018 + 0,1474 Cu_s$$

$$Fv = - 0,452 + 0,5338 Zn_s + 3,9695 S$$

Figura 7 - Dendrograma representando os agrupamentos hierárquicos das amostras de folhas de *Eugenia calycina*, relacionando as substâncias fenólicas (FT, TPP e Fv), a distância Euclidiana das amostras de acordo com o Método de Variância Mínima de Ward.



Vários fatores, tais como a composição do solo, estresse hídrico, temperatura e luz podem afetar os níveis de compostos fenólicos em plantas (KOUKI; MANETAS, 2002; TURTOLA et al., 2005) níveis de tanino são alterados durante o desenvolvimento da planta como uma resposta às mudanças ambientais (GLYPHIS; PUTTICK, 1988; SALMINEN et al, 2001, 2004.; SCOGINGS et al, 2004.; SANTOS et al., 2006). Outros fatores como brotos novos de folhas que surgem principalmente durante o tempo úmido e quente, o que também, geralmente, coincide com a proliferação de insetos e microorganismos patogênicos, sinalizam para a planta a necessidade de um

maior nível de defesas endógenas, levando a produção de taninos hidrolisáveis (EYLES et al, 2003.; BARBEHENN et al., 2009).

Para *Eugenia uniflora*, a análise de correlação canônica sugeriu que fatores ambientais podem afetar fortemente os níveis foliares de compostos fenólicos. Na estação seca, a produção de flavonóides aumenta provavelmente como resposta à combinação entre maior incidência de luz e estresse hídrico (SANTOS et al., 2011). Efeitos semelhantes foram observados em salgueiro e espécies de trigo de primavera (TURTOLA et al, 2005; FENG et al, 2007).

Observou-se que solos com baixa fertilidade química estão associados com maiores níveis de fenóis totais e taninos, para *Stryphnodendron polyphyllum*. Maiores produções desses metabólitos foram observadas no período chuvoso. A produção de fenóis totais e taninos, na estação seca estiveram positivamente correlacionados à textura arenosa dos solos; enquanto, na estação chuvosa, mostrou-se mais associada com a saturação por alumínio no solo (JACOBSON, et al., 2005).

Os níveis de todos os fenóis foram moderados no início da estação chuvosa, o que também corresponde ao intenso metabolismo devido à chegada de novas folhas, floração e frutificação. A análise de correlação canônica mostra uma correlação negativa altamente significativa entre concentração de fenol e níveis de Cu e Mn. Neste caso não foram encontradas relações significativas entre o conteúdo de Ferro (Fe) ou Calcio (Ca) e taninos ou flavonóides em folhas. Assim, neste estudo, compostos fenólicos revelaram correlação significativa com apenas três micronutrientes (Zn, Cu, e Mn) e nenhuma correlação com macronutrientes.

Em outro estudo o zinco apresentou uma correlação moderada positiva com níveis de flavonóides e taninos hidrolisáveis (GUANGQIU; CHONGLING; HAOLIANG, 2007)

No entanto, Manthey et al. (2000) detectaram que nas folhas de citrus a concentração de flavonóides aumenta com a deficiência de zinco.

Vários trabalhos têm relatado o envolvimento de Cu e Mn no ácido chiquímico via que conduz à biossíntese de vários fenóis, tais como flavonóides, taninos e lignina (GUANGQIU Q, CHONGLING Y, HAOLIANG L 2007. Influence

of heavy metals on the carbohydrate and phenolics in mangrove, *Aegiceras corniculatum* L., seedlings. *Bull Environ*)

A produção sazonal de flavonóides e taninos hidrolisáveis dependem de vários fatores bióticos e abióticos e não há uma tendência única para todos os estudos, mas em geral resultados conflitantes são observados. O equilíbrio entre os micronutrientes, tal como Zn, Cu e Mn, podem influenciar uma competição entre as diferentes classes de compostos fenólicos. Numa visão prática a otimização dos níveis de substâncias fenólicas específicas poderiam ser regulados com fertilizantes com micronutrientes.

Assim, para verificar mais informações sobre o possível papel dos metais na biossíntese de cada classe de fenóis é necessário práticas de cultivo de plantas medicinais.

3.3.2 Substâncias Fenólicas na Casca do Caule

As amostras de casca do caule de *E. calycina* apresentaram teores de fenóis totais entre 2,19 a 3,69% e taninos entre 2,52% a 4,46%, doseados segundo a metodologia de Hagerman e Butler (MOLE; WATERMAN, 1987a, 1987b).

Os flavonóides foram doseados pelo método descrito por Rolim et al. (2005), e apresentou teor entre 3,91% a 5,47% (p/p) nas amostras de casca do caule de *E. calicyna*.

Na análise de correlação de Pearson, valores em negrito são significantes ao nível de 5% (Tabela 8). De acordo com Callegari-Jacques (2003), as correlações podem ser consideradas como fortes quando $r \geq 0,6$, como regulares quando $0,3 < r < 0,6$ e fracas quando $r < 0,3$. Os resultados na Tabela 7 mostram que os Taninos por Precipitação de Proteínas (TPP) se correlacionam forte e negativamente com as variáveis: percentagem de saturação por alumínio (m), a acidez potencial (H + Al), capacidade de troca iônica (CTC) e concentração de alumínio (Al) do solo. E os flavonóides (Fv) apresentam correlação forte e negativa com a concentração de fósforo (P) encontrado na casca do caule. A

outra correlação considerada foi regular entre TPP e a saturação de bases (V) encontrada no solo. Os níveis de fenóis totais (FT) não apresentaram correlações de Pearson significativas com nenhuma variável ambiental.

Foi realizado o Teste t de Student para comparação das médias das localidades de coleta para Fenóis Totais (FT), Taninos Precipitados por Proteína (TPP) e Flavonóides (Fv). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. As amostras de Bela Vista e Rio Verde não são significativamente diferentes em relação ao teor de Fenóis Totais ($p=0.5340$) e Flavonóides ($p=0.1632$). Mas em relação ao teor de Taninos Precipitados por Proteína (TPP) ao nível de 0,1%, as amostras de Bela Vista e Rio Verde são significativamente diferentes.

Tabela 8. Coeficientes de correlação de Pearson entre substâncias fenólicas (FT, TPP e Fv) presentes na casca do caule de *E. calycina* e variáveis ambientais. Os valores em negrito foram considerados significantes ($p < 0,05$).

Variável	FT	TPP	Fv
m	-0,091679	-0,65057	-0,42876
V	-0,035404	0,57168	0,26861
PH	0,39121	0,5926	0,52239
H_Al	0,12603	-0,84308	-0,52123
Al	-0,24217	-0,65173	-0,57069
CTC	0,15017	-0,81643	-0,51683
Cu_s	0,49278	0,26268	0,60298
Fe_s	0,21064	-0,34735	-0,00837
Mn_s	-0,11447	0,31673	0,44562
Zn_s	0,046225	0,20836	0,12729
K_s	-0,17454	0,6157	0,41915
Ca_s	0,13519	0,32023	0,18084
Mg_s	-0,10044	0,22233	-0,01574
N	-0,14206	0,071673	-0,2129
P_c	-0,36416	-0,33827	-0,75599
K_c	0,3169	0,14853	0,21153
Ca_c	0,015836	0,063097	0,092669
Mg_c	-0,51695	0,1577	-0,087
S	0,44901	0,093058	0,32442
Cu_c	0,56511	-0,27625	-0,07041
Fe_c	-0,27164	-0,12223	-0,46231
Mn_c	0,17506	-0,33052	-0,20048
Zn_c	0,17819	-0,2711	-0,18009
Temperatura	-0,1531	0,57286	0,28957
Precipitação	-0,08547	0,20406	0,3257

M. O.: matéria orgânica; m: saturação por alumínio; V: saturação por bases; pH: potencial hidrogeniônico; (H+Al): acidez potencial; CTC: capacidade de troca iônica.

A análise de regressão múltipla pelo método *Stepwise* avaliou a influência de fatores ambientais (variáveis independentes ou preditoras) sobre a variação dos teores de substâncias fenólicas presente na casca do caule (variáveis dependentes), através das três equações a seguir:

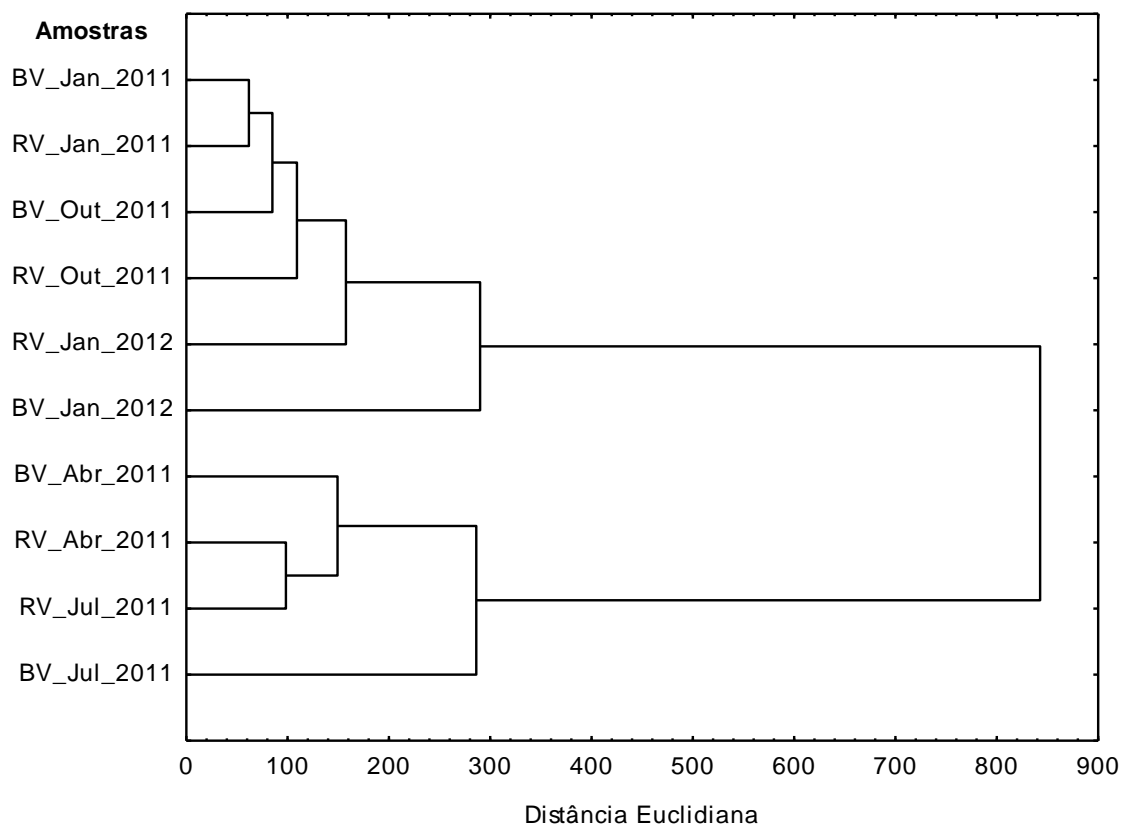
FT = sem coeficientes significantes ao nível de 5%.

TPP = 5,3163 – 0,6766 H_Al + 0,0236 Mn_c

Fv = 4,8462 + 0,2824 Zn_s + 1,437 Ca_s – 2,82 P_c

A Análise de Agrupamento (Análise de Cluster) demonstrou as similaridades entre as várias amostras analisadas. O dendrograma representado na Figura 8 mostra que o principal fator envolvido na variabilidade da concentração de substâncias fenólicas são os níveis de precipitação pluviométrica, pois, os meses de janeiro e outubro apresentam maiores índices pluviométricos em relação aos meses de abril e junho.

Figura 8 - Dendrograma representando os agrupamentos hierárquicos das substâncias fenólicas (FT, TPP e Fv) presentes nas amostras de casca do caule de *Eugenia calycina*, a distância Euclidiana das amostras de acordo com o Método de Variância Mínima de Ward.



3.4 Variabilidade Química do Óleo volátil

A constituição química do óleo volátil extraído de amostras de folhas de *E. calycina* das localidades de Bela Vista e Rio Verde em diferentes épocas do ano, estão representados na Tabela 9.

Um total de 18 constituintes foi identificado perfazendo em torno de 80% dos constituintes voláteis. Os resultados quali e quantitativos encontra-se na Tabela 9. Nas amostras de Bela Vista as substâncias majoritárias são o biciclogermacreno (7,80 a 72,87%), (*E*)-cariofileno (6,07 a 33,58) e γ -muuroleno (3,51 a 28,97%). E nas amostras de Rio Verde o componente presente em maior quantidade é o biciclogermacreno (39,66 a 65,71%), seguido do (*E*)-cariofileno (8,05 a 13,53%).

Tabela 9. Porcentagem de constituintes químicos no óleo volátil da folha de *Eugenia calycina* Cambess. nas localidades de Bela Vista e Rio Verde durante o período de Janeiro 2011 a Janeiro 2012.

RI	Componentes	Bela Vista					Rio Verde				
		Jan/20011	Abr/2011	Jul/2011	Out/2011	Jan/2012	Jan/20011	Abr/2011	Jul/2011	Out/2011	Jan/2012
1338,00	δ-Elemeno	---	0,51	0,40	---	---	1,43	0,35	0,43	0,79	---
1375,00	α-Ylangeno	4,14	2,81	1,95	2,58	---	0,57	0,77	0,48	0,39	0,61
1388,00	Bourboneno	2,06	1,60	1,74	1,10	0,22	0,86	0,96	0,98	0,48	0,60
1390,00	β-Elemeno	1,00	1,71	1,53	2,22	0,70	15,08	4,33	9,92	11,31	3,57
1409,00	α-Gurjuneno	0,30	0,24	---	0,29	0,38	0,36	0,45	0,20	0,56	0,61
1419,00	(E)-Cariofileno	33,58	24,58	26,35	17,79	6,07	13,53	10,55	10,20	11,80	8,05
1432,00	β-Copaeno	0,67	0,56	0,45	0,64	---	0,28	---	0,22	---	---
1441,00	Aromadendreno	---	0,18	0,24	0,36	0,64	0,66	0,66	0,43	0,59	0,59
1454,00	α-Humuleno	3,74	2,80	2,81	2,67	0,53	1,33	1,17	1,11	1,17	0,89
1460,00	Allo-Aromadendreno	0,22	1,22	1,77	1,23	5,75	1,65	2,34	1,36	1,56	2,95
1479,00	γ-Muuroleno	28,97	26,34	18,64	24,71	3,51	8,40	10,33	7,56	2,21	5,10
1493,00	Trans-Muurolo-4(14),5-Dieno	0,47	0,60	0,30	---	---	---	---	---	---	---
1500,00	α-Muuroleno	0,40	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1500,00	Biciclogermacreno	7,80	21,18	22,20	28,44	72,87	40,40	56,85	39,66	40,39	65,71
1508,00	Germacreno a	0,97	0,91	0,79	0,94	---	4,46	2,00	4,19	4,52	2,60
1513,00	γ-Cadineno	0,32	---	0,36	---	0,25	---	---	---	---	---
1523,00	δ-Cadineno	4,59	3,56	3,22	3,33	1,08	1,43	1,40	1,14	2,44	1,52
1534,00	Trans-Cadina1,4 Dieno	0,25	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Monoterpenos hidrogenados										
	Monoterpenos oxigenados										
	Sesquiterpenos	89,48	88,80	82,75	86,30	92,00	90,44	92,16	77,88	78,21	92,80
	Total identificado	89,48	88,80	82,50	86,30	92,00	90,44	92,16	77,88	78,21	92,80

RI: Índice de Retenção

Os óleos voláteis são misturas naturais muito complexas que podem conter cerca de 20-60 componentes em diferentes concentrações com um a três componentes majoritários em concentrações relativamente elevadas, entre 20-70%. São conhecidos pelas suas propriedades antisséptica, bactericida, virucida, fungicida, analgésica, sedativa, anti-inflamatória, espamolítica e anestésica local (BAKALLI et al., 2008).

Substâncias sesquiterpênicas com esqueleto cadinano, como γ -cadineno; cariofilano, como o β -cariofileno; humulano, como o α -humuleno (α -cariofileno); e germacrano, como o germacreno A são bastante comuns em óleos voláteis de espécies de *Eugenia* (MAGINA, 2008).

Magina (2008) em seu estudo referente à fitoquímica do gênero *Eugenia* verificou que no óleo volátil de *Eugenia brasiliensis*, as substâncias majoritárias foram o espatulenol (12,60 %) e o τ -cadinol (8,68 %); no óleo de *Eugenia beaurepaireana*, as substâncias presentes em maior quantidade foram o β -cariofileno (7,97 %) e o biciclogermacreno (7,24 %), e no óleo volátil de *Eugenia umbelliflora* as substâncias majoritárias foram o viridiflorol (17,74 %) e o aromadendreno (6,90%).

Em *Myrcia*, pertencente à Myrtaceae, Sá (2010) observou uma grande variabilidade no óleo volátil das folhas de *Myrcia tomentosa*. Foram identificados 44 constituintes, no entanto, apenas nove substâncias estiveram presentes em todas as seis amostras β -elemeno, (*E*)-cariofileno, (*E*)- β -farneseno, biciclogermacreno, germacreno B, espatulenol, globulol, α -cadinol e (2*E*, 6*E*)-metil farnesoato) e em teores variados.

Paula (2011) em estudos com o óleo volátil das folhas de doze espécimes de *Pimenta pseudocaryophyllus* que ocorrem naturalmente em três diferentes localidades do Cerrado brasileiro, através da análise estatística multivariada dos dados identificou três quimiotipos de *P. pseudocaryophyllus*, caracterizados pela predominância dos constituintes citral, (*E*)-cariofileno e (*E*)-metiliso Eugenol.

A composição química do óleo volátil de *Eugenia uniflora* L. foi avaliada por GC-MS e o componente principal do óleo foi identificado por ^1H NMR, ^{13}C

NMR e MS, depois do isolamento, tal como uma mistura de atracione e 3-furanoeudesmeno (AMORIM, 2009).

A composição do óleo volátil de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característico para o seu estágio de desenvolvimento, mas condições ambientais como época, local de coleta, insolação, temperatura, umidade do ar e composição do solo, especialmente no que diz respeito à disponibilidade de água assimilável pelas plantas, são capazes de causar interferências significativas nas variações dos constituintes químicos de espécies vegetais, (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998; FARIAS, 2004; SIMÕES; SPITZER, 2004; CUNHA, 2005).

Tabela 10. Coeficientes de correlação de Pearson entre os componentes majoritários presentes nos óleos voláteis obtidos das folhas de *E. calycina* e variáveis ambientais. Os valores em negrito foram considerados significantes ($p < 0,05$).

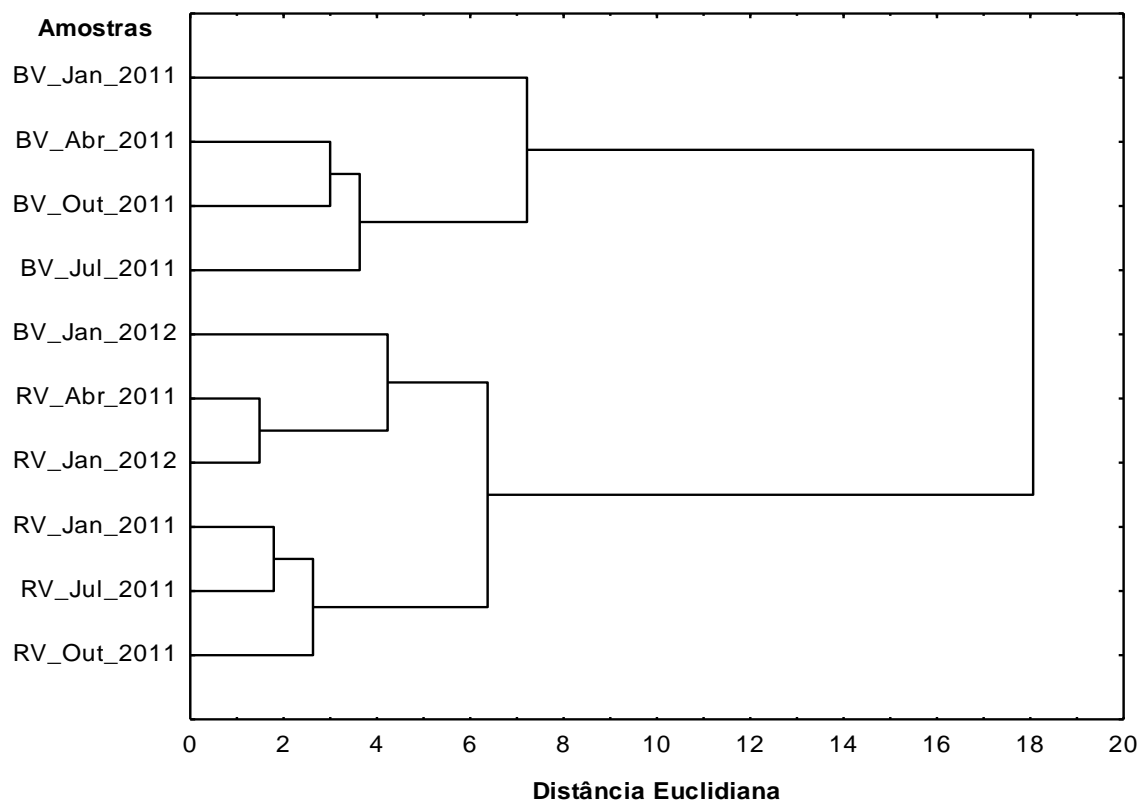
Variáveis	β_{elemeno}	$\beta_{\text{cariofileno}}$	γ_{muroleno}	Biciclogermacreno	H_sesquiterpenos
MO	0,75785	-0,73695	-0,81472	0,59861	-0,039915
m	0,38378	-0,7494	-0,65255	0,707	0,24285
V	-0,49685	0,53846	0,46388	-0,43292	-0,17216
PH	-0,2887	0,89476	0,74781	-0,8079	-0,064376
H_Al	0,66649	-0,60599	-0,64475	0,43836	-0,18379
Al	0,2453	-0,76546	-0,64824	0,74459	0,17439
CTC	0,63058	-0,54338	-0,62226	0,38559	-0,26221
Cu_s	0,28547	0,37743	0,25216	-0,34177	0,27738
Fe_s	0,18832	-0,52206	-0,61112	0,56297	0,12946
Mn_s	-0,24469	-0,13321	-0,28953	0,2735	-0,024774
Zn_s	-0,67011	-0,030123	-0,058716	0,38586	0,55488
K_s	-0,55722	0,30528	0,23909	-0,16039	-0,066001
Ca_s	-0,27944	0,40183	0,23187	-0,32291	-0,27885
Mg_s	-0,32682	0,32931	0,26018	-0,25301	-0,17663
N	-0,13184	-0,14593	-0,18853	0,25186	0,20965
P_f	-0,22911	-0,032244	0,19173	0,078873	0,33758
K_f	-0,31981	-0,0022152	0,071984	0,037353	-0,005169
Ca_f	0,16273	-0,44329	-0,33493	0,55072	0,65194
Mg_f	0,41755	-0,29442	-0,47581	0,18756	-0,32048
S	-0,46736	0,49305	0,70592	-0,38232	0,43113
Cu_f	-0,18411	0,64519	0,57859	-0,60576	0,032134
Fe_f	0,023044	-0,629	-0,55625	0,73334	0,3862
Mn_f	-0,072384	0,482	0,3582	-0,37573	0,24567
Zn_f	0,22833	0,039157	-0,098079	0,049113	0,27994
Temperatura	-0,26065	0,76933	0,73009	-0,83315	-0,41216
Precipitação	-0,078903	-0,22245	-0,17705	0,31836	0,37807

M. O.: matéria orgânica; m: saturação por alumínio; V: saturação por bases; pH: potencial hidrogeniônico; (H+Al): acidez potencial; CTC: capacidade de troca iônica.

Antes das análises de cluster, os dados foram padronizados, de modo que cada variável passou a apresentar média zero e variância igual a um (autoescalamento).

A Análise de Agrupamento (Análise de Cluster) demonstrou as similaridades entre as várias amostras analisadas. O dendrograma representado na Figura 9 mostra dois grandes grupos, sendo o principal fator envolvido na variabilidade dos óleos voláteis a localidade de coleta, Bela Vista e Rio Verde, exceto a amostra de Bela Vista Jan/2012 que apresentou mais similaridade com o grupo de Rio Verde.

Figura 9 - Dendrograma representando os agrupamentos hierárquicos das amostras de folhas de *Eugenia calycina*, relacionando a composição química do óleo volátil, a distância Euclidiana das amostras foi obtida de acordo com o Método de Variância Mínima de Ward.



4 CONCLUSÃO

As características anatômicas encontradas em *E. calycina*, como epiderme uniestratificada, presença de cavidades secretoras, feixes bicolaterais, abundância de cristais de oxalato de cálcio solitários ou agrupados, estômatos anomocíticos ou paracíticos, substâncias lipofílicas e fenólicas, são frequentes em outras espécies de *Eugenia*, dessa forma esses caracteres podem dar subsídio para a taxonomia em termos de diagnóstico genérico.

Na prospecção fitoquímica, tanto da folha quanto da casca do caule, foram encontrados flavonóides, taninos, triterpenos e saponinas. As amostras de folhas de Bela Vista e Rio Verde são significativamente diferentes em relação ao teor de fenóis totais e flavonóides, e não são significativamente diferentes em relação ao teor de taninos precipitados por proteína. As amostras casca do caule de Bela Vista e Rio Verde não são significativamente diferentes em relação ao teor de fenóis totais e flavonoides, porém, em relação ao teor de taninos precipitados por proteína as amostras são significativamente diferentes

As substâncias majoritárias encontrados no óleo volátil de Bela Vista foram o biciclogermacreno, (*E*)-cariofileno e γ -muuroleno. E nas amostras de Rio Verde o componente presente em maior quantidade é o biciclogermacreno, seguido do (*E*)-cariofileno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream – USA: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ALVAREZ, A. S., SILVA, R. J. F. Anatomia foliar de espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) oriundas da restinga de Algodual/Maiandeuá, *INSULA Revista de Botânica Florianópolis*, n. 41. p.83-94. 2012).
- AMARAL, F.M.F.; COUTINHO, D.F.; RIBEIRO, M.N.S.; OLIVEIRA, M.A. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.13 (supl.) p. 27-30, 2003.
- AMORIM, A. C. L. et al. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). *Phytomedicine*, v. 16, n. 10, p. 923-928, 2009.
- ARMSTRONG, L. Estudos Morfoanatômico, Fitoquímico e de Atividades Biológicas de Folha e Caule de *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae. 120f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARTHLOT, W. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nord J Bot* 1: 345-355, 1981.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira 5ª ed., volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. 524 p. 2010.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. *Bioestatística: Princípios e Aplicações*. Editora Artmed S. A., São Paulo, 2003, p. 90.
- COSTA, A. F. Farmacognosia. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.3
- CUNHA, A. P. Farmacognosia e Fitoquímica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian,
- DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, n.3, p.426-443, 2007.
- DRAPER, N. R., SMITH, H. Applied regression analysis. 2.ed. New York, John Wiley, 1981. 709 p.
- FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. 2004. Introdução à análise fitoquímica. Pp 229-246. In: C.M.O. Simões; E.P. Schenkel; G. Gosmann; J.C.P. de Mello; L.A. Mentz; P.R. Petrovick (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS/UFSC.

- FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 263-288.
- FIUZA, T. S.; et al, J. R. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). Revista Eletrônica de Farmácia. v. 5 n. 2 p. 21-31, 2008.
- FONTENELLE, G. B.; COSTA, C. G.; MACHADO, R. D. Foliar anatomy and micromorphology of eleven species of *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Botanical Journal of Linnean Society**, London, v. 115, p. 111-33, 1994
- GABE, M. 1968. Techniques histologiques. Paris, Masson & Cie
- GUANGQIU, Q; CHONGLING, Y; HAOLIANG, L. 2007. Influence of heavy metals on the carbohydrate and phenolics in mangrove, *Aegiceras corniculatum* L., seedlings. *Bull Environ Contam Toxicol* 78: 440-444.
- HOWARD, R.A. 1979. The petiole. In: C.R. Metcalfe; L. Chalk (Ed.). Anatomy of the dicotyledons. Clarendon Press: Oxford. p. 88-96.
- JACOBSON, T. K. B; GARCIA, J; SANTOS, S. C; FARIAS, J.B.D; KLIEMANN, H.J. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). Pesquisa Agropecuária Tropical, 35 (3): 163-169, 2005 – 165
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill Book.
- JUDD, W.S. et al. Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- KLOUCEK, P.; POLESNY, Z.; SVOBODOVA, B.; VLKOVA, E.; KOKOSKA, L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *Journal Ethnopharmacology*, v. 99, p 309-312. 2005.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal.
- MAGINA, M. D. A. Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero *Eugenia*. 178f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- MANTHEY, J.A; GROHMANN K, G; BERHOW, M.A.; TISSERAT, B. 2000. Changes in citrus leaf flavonoid concentrations resulting from blight-induced zinc-deficiency. *Plant Physiol Biochem* 38: 333-343).
- MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC, 1988.
- MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. Farmacognosia. Fortaleza: UFC, 1989.
- METCALFE, C.R.; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons. Oxford, Clarendon Press. 1983
- MOLE, S.; WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins. *Oecologia*, Berlin, v. 72, p. 137-147, 1987a.
- MOLE, S.; WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II. Techniques for biochemically defining tannins. *Oecologia*, Berlin, v. 72, p. 148-156, 1987b.
- MOURA-COSTA, G. F. et al. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on

an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 143, n. 2, p. 631-638, 2012.

NEVES L.J; DONATO AM 1989. Contribuição ao estudo de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). *Bradea* v. 5, p. 275-284.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu, 1998.

PAIVA, J.G.A.; et al. vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasílica* v. 20, p. 257-264.

PAULA, J. A. M. de. Fitoquímica e atividades biológicas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae). 246f. Tese (Doutorado em Biologia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

PAULA, J.A.M.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F.; REZENDE, M.H.; FERREIRA, H.D. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum – Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia / Brazilian Journal of Pharmacognosy*, V.18(2), p. 265-278, 2008.

Rio de Janeiro: Edur, 1997.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. *Mikrokosmos*, Stuttgart, v. 61, n. 2, p. 33-6, 1972.

ROLIM, A et al. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss. (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) commercial extract. *Journal of AOAC International*, v. 88, n. 4, p. 1015-1019, 2005.

SÁ, F.A.S. et al. Morfoanatomia, composição química do óleo volátil e atividade antimicrobiana das folhas e casca do caule de *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2010. 117f

SANTOS, R.M.; OLIVEIRA, M.S.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. Seasonal variation in the phenol content of *Eugenia uniflora* L. leaves. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.13, n.1, p.85-89, 2011)

SILVA, S. C.; *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. 1 Ed. Brasília: Embrapa, 1999.

SIMÕES, C.M.O.; SPTIZER, V. Óleos voláteis. Pp 467-496. In: C.M.O. Simões; E.P. Schenkel; G. Gosmann; J.C.P. de Mello; L.A. Mentz; P.R. Petrovick (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS/UFSC, 2004.

SOLEREDER H. *Systematic Anatomy of the Dicotyledons*.V1. Oxford: Clarendon Press,

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas – liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*. v. 11, p. 463 – 471, 1963.

WARD, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, v.58, p. 66-103, 1963.

ILUSTRAÇÕES

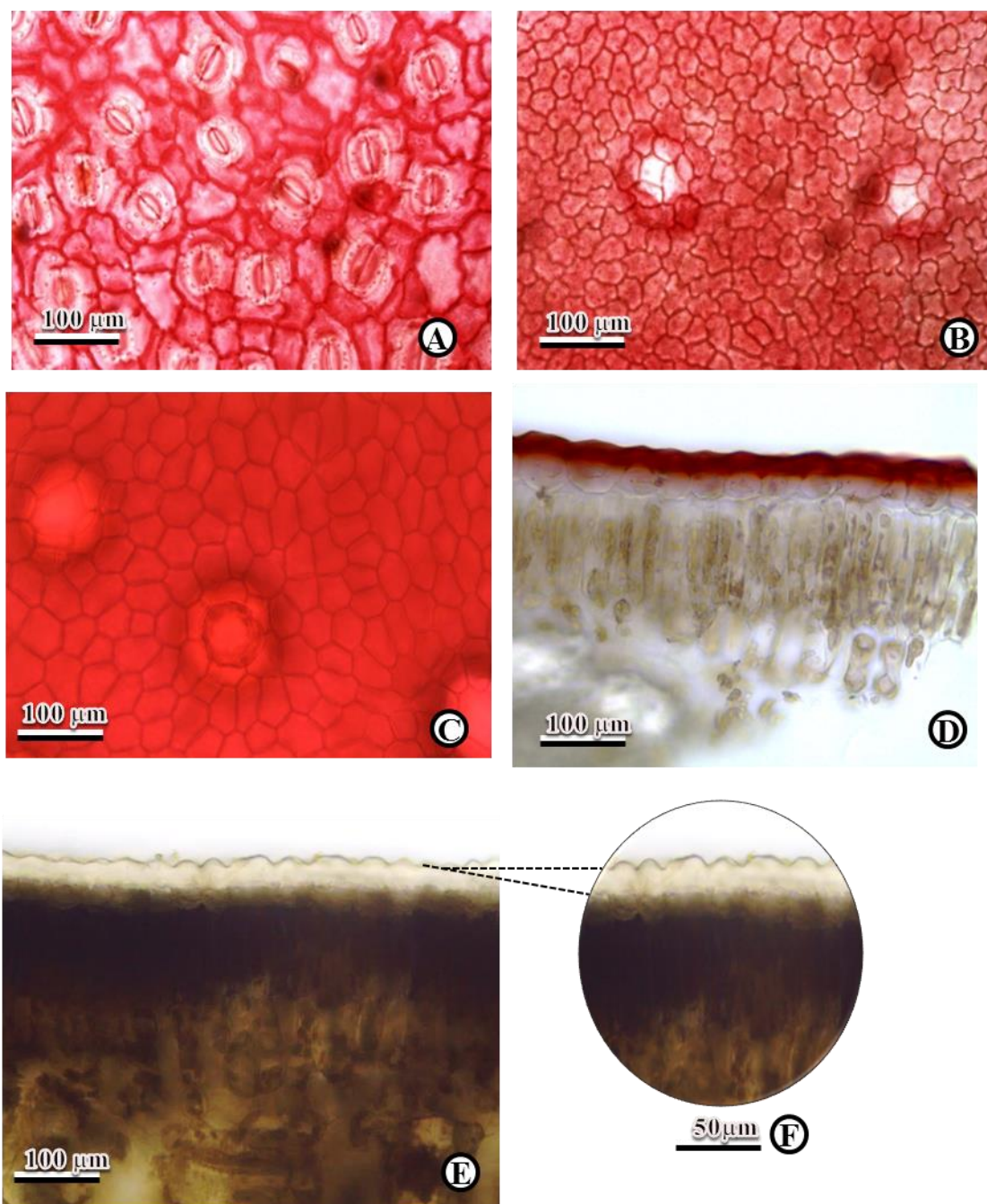


Figura 2. Lâmina foliar de *Eugenia calycina* – localidades Bela Vista (BV) e Rio Verde (RV). A-C. Secções paradérmicas. A- face abaxial, evidenciando, estômatos anomocíticos. B- face adaxial, evidenciando células epidérmicas com paredes anticlinais encurvadas a onduladas (BV). C- face adaxial, evidenciando células epidérmicas com paredes anticlinais retas (RV). D-E- Secções transversais. D- face adaxial evidenciando epiderme revestida por cutícula espessa e ornamentada. F- detalhe da epiderme.

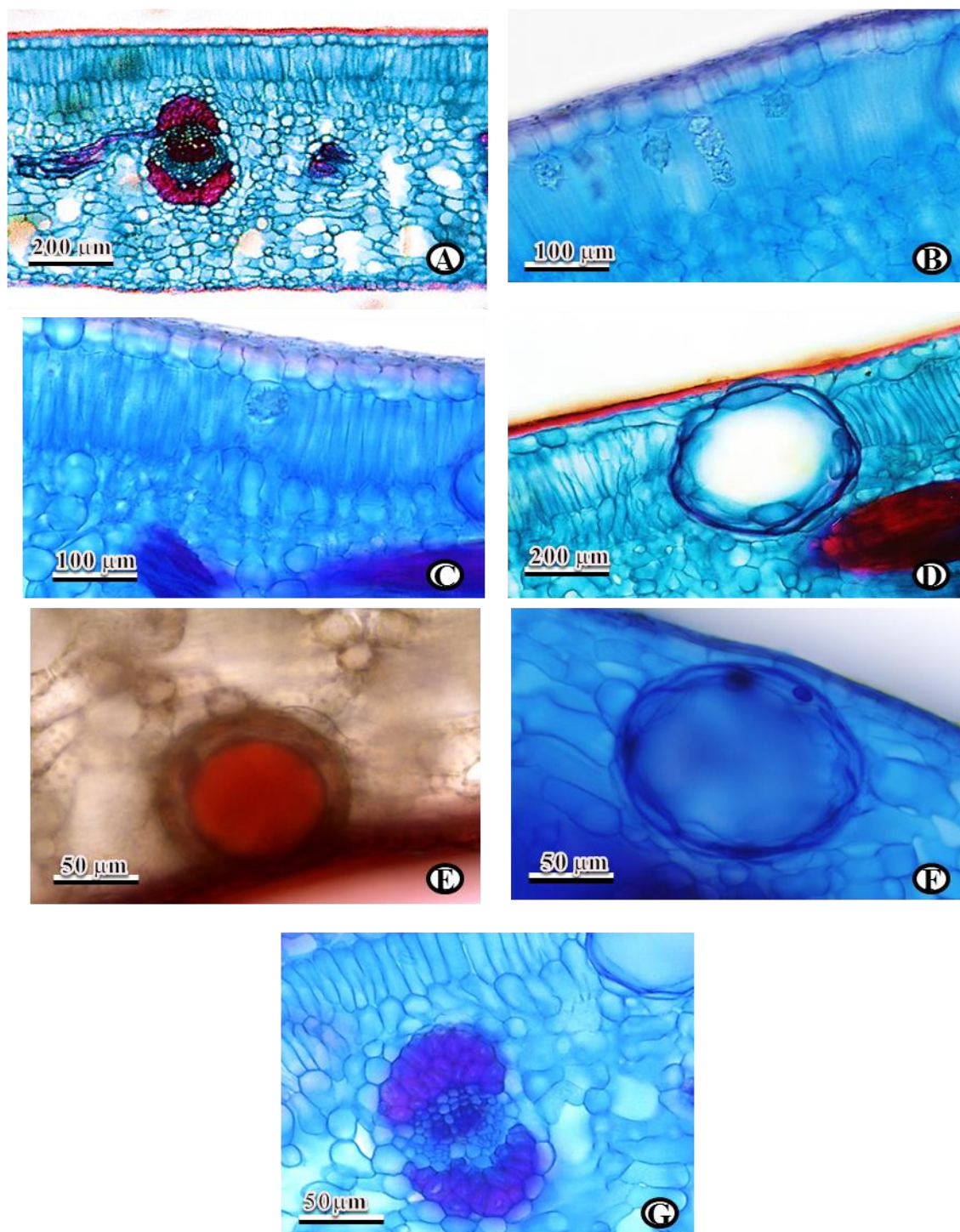


Figura 3. Lâmina foliar de *Eugenia calycina* – localidades Bela Vista (BV) e Rio Verde (RV). A-G. Secções transversais. A- Aspecto geral evidenciando epiderme uniestratificada, mesofilo dorsiventral, nervura secundária (RV). B-C. Detalhe evidenciando idioblastos com drusas de oxalato de cálcio e células coletoras (seta) - (BV). D- F. Detalhe evidenciando cavidades secretoras. E. Reação positiva para compostos lipofílicos, reagente sudan III. G. Detalhe do feixe vascular de médio porte evidenciando calotas esclerenquimáticas.

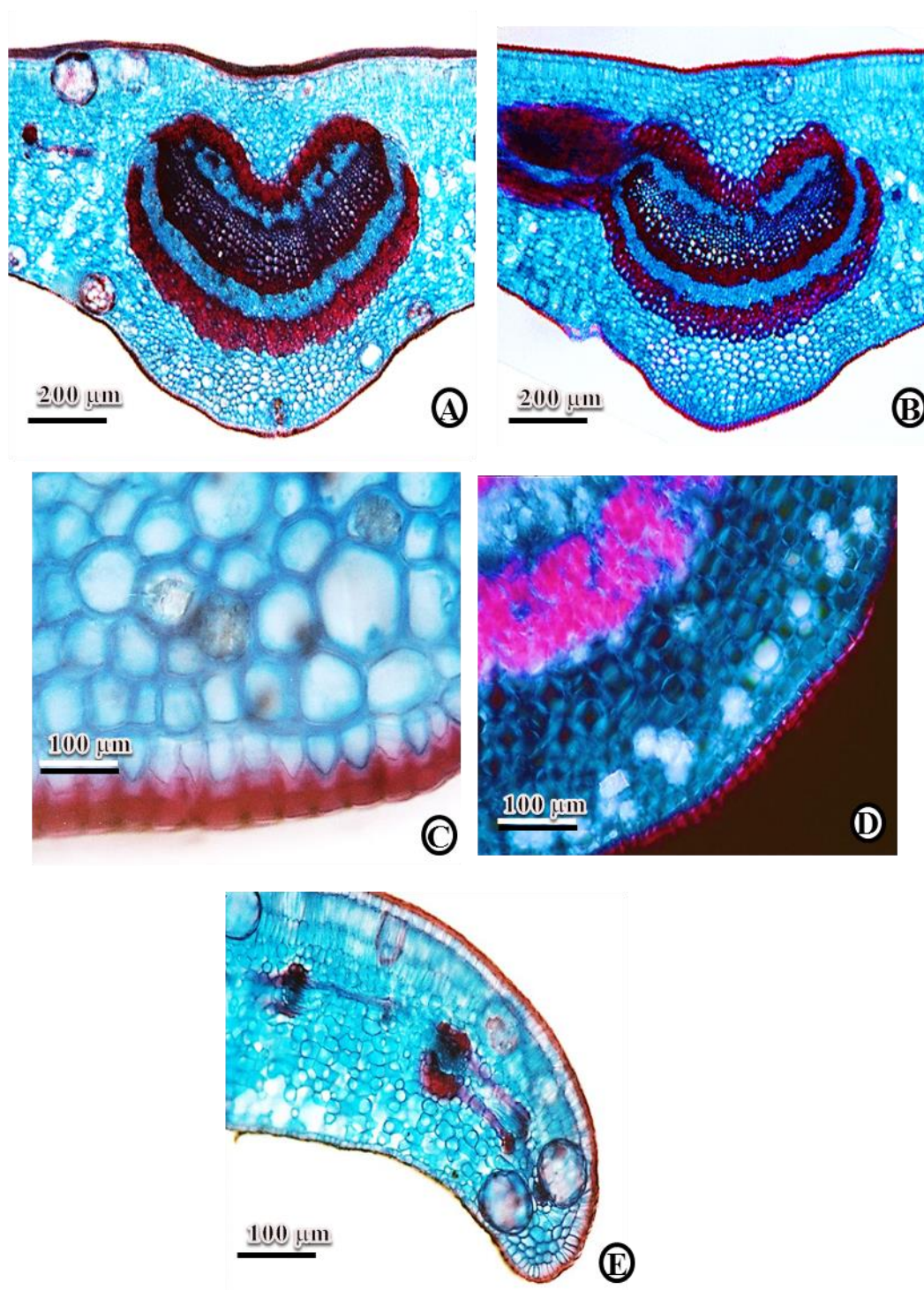


Figura 4. Lâmina foliar de *Eugenia calycina* – localidades Bela Vista (BV) e Rio Verde (RV). A-E. Secções transversais. A-B. Nervura central, contorno plano-convexo (BV) e (RV), respectivamente. C-D. Detalhe do córtex na região abaxial da nervura, epiderme com cutícula espessa e flanges cuticulares, presença de cristais isolados e drusas de oxalato de cálcio, evidenciados em luz polarizada na fig. D. E- Bordo arredondado, levemente fletido para a face abaxial.

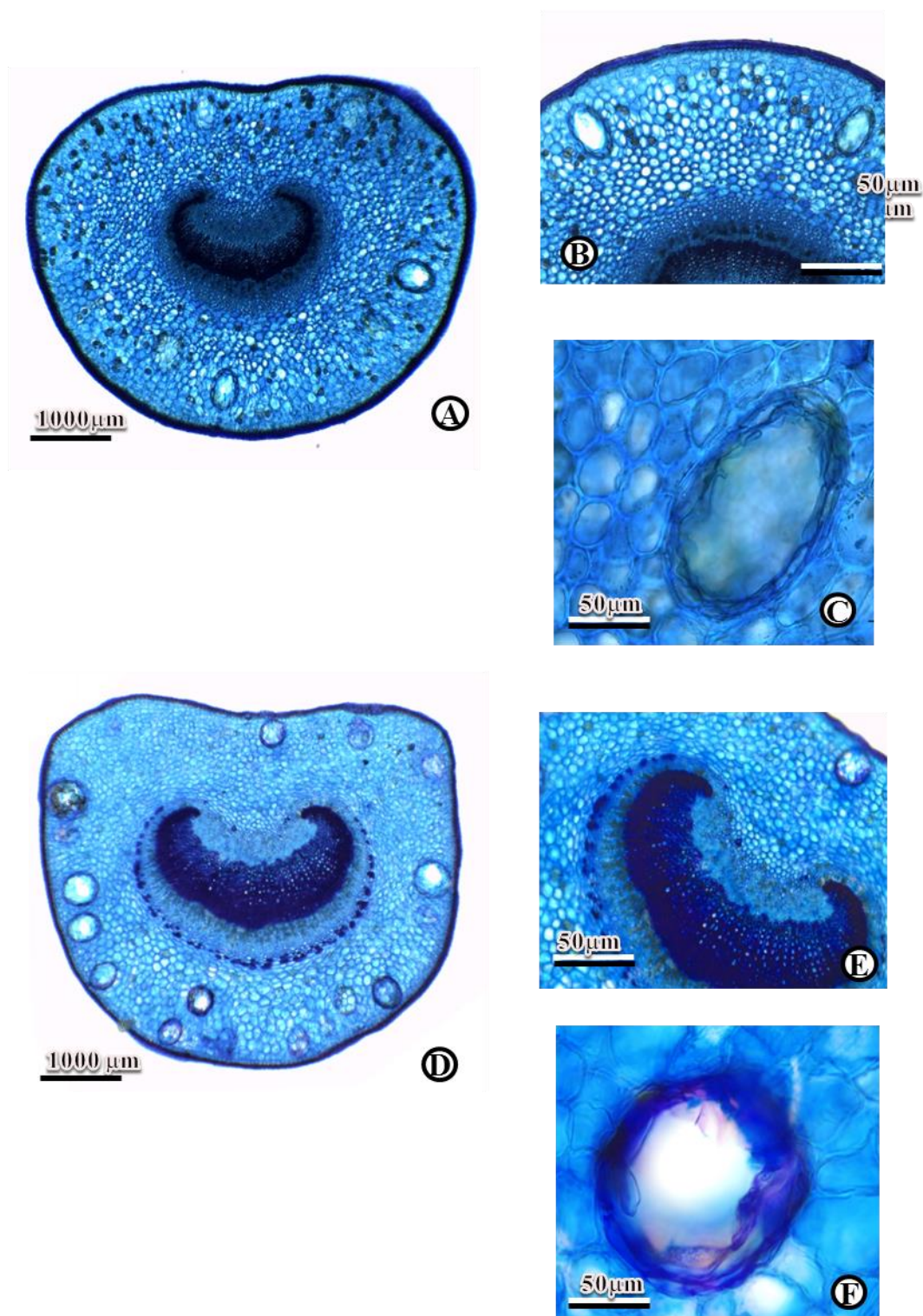


Figura 5. Pecíolo de *Eugenia calycina* – localidades Bela Vista (BV) e Rio Verde (RV). A-F. Secções transversais. A-C. *Eugenia calycina* (BV). A. Aspecto geral evidenciando contorno plano-convexo e sistema vascular em forma de arco. B. Região cortical, evidenciando cavidades secretoras e idioblastos contendo cristais. C. Detalhe da cavidade secretora. D-F. *Eugenia calycina* (RV). D. Aspecto geral evidenciando contorno plano-convexo e sistema vascular em forma de arco. E. Detalhe do sistema vascular. F. Detalhe da cavidade secretora, lume circular.

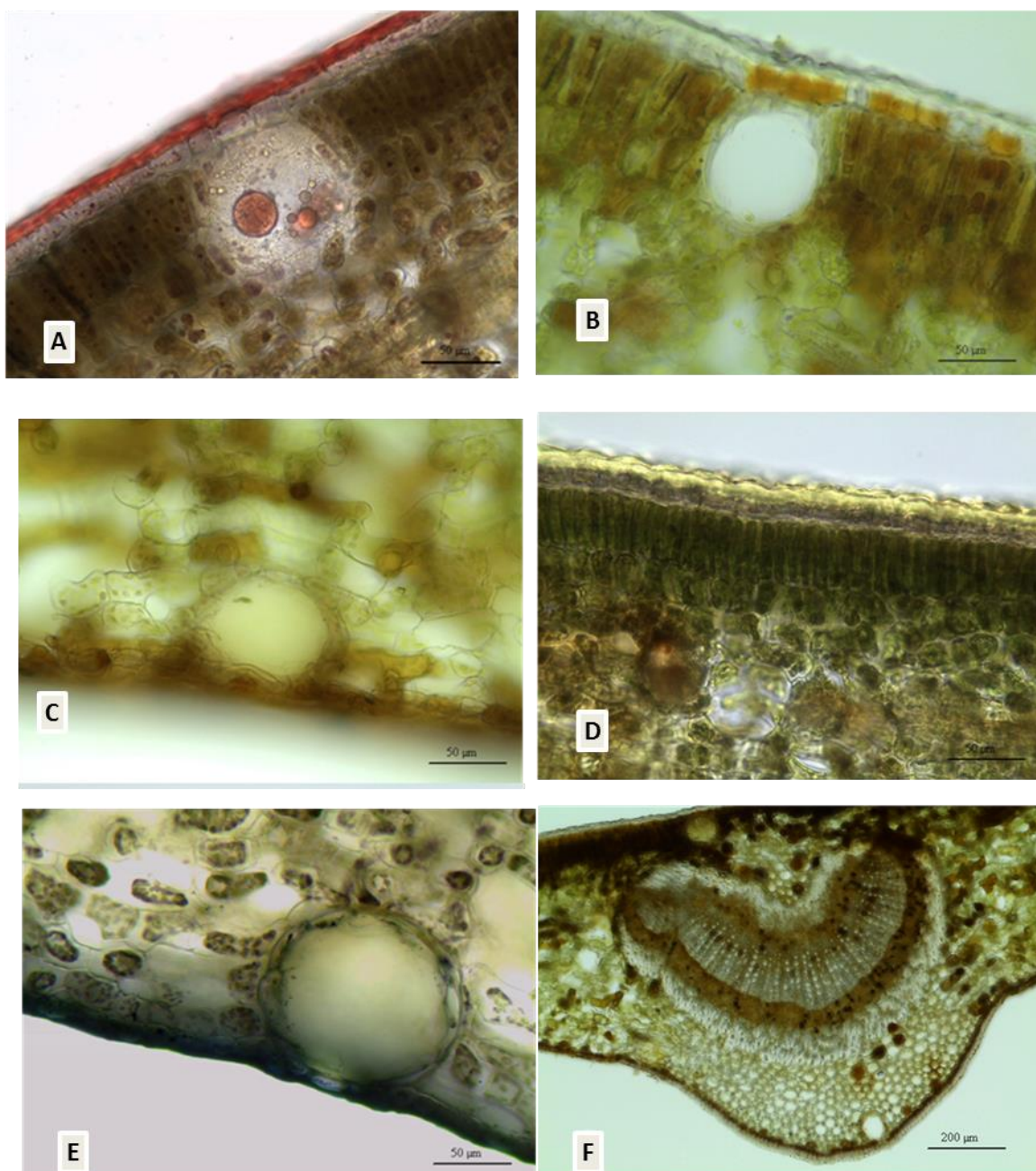


Figura 6. Lâmina foliar de *Eugenia calycina* Cambess. - Testes Histoquímicos. A. Reação positiva para compostos lipofílicos, reagente sudan IV. B-F. Reação positiva para compostos fenólicos. B-C. Reagente dicromato de potássio. D-E. Reagente cloreto férrico. F. Reagente dicromato de potássio.

*CAPÍTULO 2 - Eugenia calycina
Cambess extracts and their fractions:
Their antimicrobial activity and the
identification of major polar
compounds using electrospray
ionization FT-ICR mass
spectrometry.*

1 ***Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: Their**
2 **antimicrobial activity and the identification of major polar compounds**
3 **using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry**

4

5 Fernanda P. S. Ferreira^a, Sandra R. Morais^{a,b}, Maria T. F. Bara^d, Edemilson C.
6 Conceição^d, José R. Paula^{d*}, Thays C. Carvalho^e, Boniek G. Vaz^e, Helber B.
7 Costa^f, Wanderson Romão^{f,g}, Maria H. Rezende^c

8

9 ^a Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás,
10 Goiânia, Goiás, 74001 970, Brazil

11 ^b Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista, Campus Flamboyant,
12 Goiânia, Goiás, 74845 090, Brazil

13 ^c Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus
14 Samambaia, Goiânia, Goiás, 74001 970, Brazil

15 ^d Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, CP 131, Goiânia,
16 Goiás, 74605 220, Brazil

17 ^e Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia,
18 CP 131, Goiânia, Goiás, 74001 970, Brazil

19 ^f Laboratório de Petroleômica e Forense, Departamento de Química,
20 Universidade Federal do Espírito Santo, 29075-910, Vitória, ES, Brazil

21 ^g Instituto Federal do Espírito Santo, Av. Ministro Salgado Filho, Soteco, Vila
22 Velha- ES, CEP: 29106-010

23

24 * Corresponding author: tel +55 62 3209 6182; fax +55 62 3209 6037

25 *E-mail:* pjrpaula@gmail.com; jose_realino@ufg.br

26

27

28 Abstract

29 *Eugenia calycina*, which is described as “red pitanga or pitanga cherry of
30 cerrado,” is widely distributed in the Cerrado area of Brazil. Its leaf and bark
31 extracts are used in folk medicine for many applications. In this study, the
32 compositions of the major polar compounds of the bark and leaf extracts and
33 their fractions were obtained from a liquid-liquid extraction using hexane,
34 dichloromethane, ethyl acetate, and water. They were then evaluated using
35 electrospray ionization–negative FT-ICR mass spectrometry (ESI[-] FT-ICR
36 MS), which revealed a large number of oxygen-containing compounds, such as
37 flavonoids, terpenes, tanins, steroids, and fat acids. The biological activity of
38 these extracts towards several bacterial and fungal strains was then evaluated.
39 The highest activity was found using aqueous fractions, in which the ESI(-) FT-
40 ICR MS analysis revealed compounds with a high content of oxygen (e.g.,
41 glycosed flavonoids, tannins, and polyphenolic compounds) against
42 *Cryptococcus sp.* American Type Culture Collection (ATCC) D (minimum
43 inhibitory concentration [MIC] = 15,62 µg/mL). Strong activity was also found
44 using the hexanic fractions—in which the ESI(-) FT-ICR MS analysis revealed
45 that the compounds contained a decreased amount of oxygen (e.g., fat acids
46 and steroids)—towards *Cryptococcus gatti* L48, *Cryptococcus neoformans* L3
47 (MIC = 31,2 µg/mL), and *Cryptococcus sp.* ATCC (MIC = 62,5 µg/mL).
48 Therefore, antimicrobial assays using the bark/leaf extracts of *E. calycina*
49 present prospects for the research of active substances that may be used for
50 the treatment of cryptococcosis, a disease that is common in
51 immunosuppressed patients.

52 **Keywords:** *Eugenia calycina*, antimicrobial activity, ESI, FT-ICR MS

53 Introduction

54 In Brazil, the *Myrtaceae* genus is one of the most important families of Brazilian
55 flora, with 23 genera and approximately 130 species [1]. Among the *Myrtaceae*
56 genus, *Eugenia* is one of the largest genera and comprises a large group of
57 medicinal plants with therapeutic applications; these plants have been found to
58 decrease blood glucose [2]; they serve as a diuretic and are antirheumatic,
59 antifebrile, and anti-inflammatory; they are used to treat stomach diseases [3];
60 and they have antifungal, antibacterial, and cytotoxic [4], as well as
61 antinociceptive and hypothermic, properties [5]. Various compounds, including
62 flavonoids, triterpenes, tannins, and especially essential oils constituting of
63 monoterpenes and sesquiterpenes, have already been isolated from the genus
64 *Eugenia* [6].

65 Although several plants of the *Eugenia* genus have been the focus of scientific
66 studies, there remains a lack of knowledge regarding their biological activity and
67 chemical compositions. One example is *Eugenia calycina* Cambess. Commonly
68 referred to as “red pitanga or pitanga cherry of cerrado,” it is widely used in the
69 Cerrado area of Brazil [7].

70 This paper reports that chemical extraction of the bark and leaves of *E. calycina*
71 possesses considerable antifungal activities and describes their
72 characterization by using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry
73 (ESI FT-ICR MS).

74 MS is usually the technique of choice for natural product studies where the
75 volume of the sample material or complexity of the extracts is too limited for
76 applications employing nuclear MR spectroscopy. Currently, ultra-high
77 resolution (potentially in excess of 10^6) and accuracy mass (< 1 ppm)

78 spectrometry, such as Fourier transform ion cyclotron resonance MS (FT-ICR
79 MS), enables the identification of complex organic mixtures without prior
80 extraction or separation steps. FT-ICR MS is used in all the "omics" sciences
81 (i.e., metabolomics, proteomics, and petroleomics), thus enabling molecular
82 level analyses of complex mixtures [8-9]. Accurate mass measurements [10]
83 define a unique elemental composition ($C_cH_hN_nO_oS_s$) from singly charged ions,
84 such as $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$, and $[M + K]^+$ in the positive mode or $[M - H]^-$ and $[M$
85 $+ Cl]^-$ in the negative mode, where M corresponds to the neutral molecule [11].
86 The application of FT-ICR-MS to the area of plant metabolomics is still quite
87 rare, but it is essential for a better understanding of step-by-step methodologies.
88 In this study, the metabolomic profiles of extracts and fractions of *E. calycina*
89 were determined using FT-ICR-MS analysis. The results were then correlated to
90 their antifungal activities.

91

92 **2. Experimental Process**

93 *2.1. Plant material*

94 Bark and leaves of *Eugenia calycina* were collected in January 2012 in the town
95 of Rio Verde (18°05'17, 3" S, 50°55'59, 3 "H, 748 m altitude) in the State of
96 Goiás. Samples were dried in a forced air circulation. A voucher specimen was
97 deposited in the herbarium at the Federal University of Goiás (Universidade
98 Federal de Goiás; UFG) with the number 48,558.

99

100 *2.2. Preparation of extracts and fractions*

101 Pulverized plant materials from both samples of bark and leaves were
102 macerated at room temperature (RT) with 95% EtOH (v/v) using a proportion of

103 1:5 (p/v) three times. They were filtered and concentrated in a rotary evaporator
104 at a temperature below 40° C. The extracts were then concentrated and
105 designated as crude ethanol extract bark (EEC) and crude ethanol extract
106 leaves (EEF).

107 Fractions were prepared from the ethanolic extracts. Fifty grams of each extract
108 was dissolved separately in 100 mL of MeOH/H₂O (7:3). These solutions were
109 liquid-liquid extracted with solvents of increasing polarity (hexane,
110 dichloromethane, and ethyl-acetate), and the solvents from each fraction were
111 evaporated in a rotary evaporator. For the final MeOH/H₂O fraction, methanol
112 was eliminated in a rotary evaporator, and the resulting aqueous fraction was
113 lyophilized. Four fractions were obtained from each sample and designated as
114 follows: hexanic fractions (HFC and HFF), dichloromethane fractions (DFC and
115 DFF), ethyl-acetate fractions (EAFC and EAFF), and aqueous fractions (AFC
116 and AFF).

117 The yield of the crude ethanol extract was calculated according to the amount of
118 powdered vegetable drugs that was initially used for its preparation. The yield of
119 the fractions was calculated based on the amount of crude ethanol extract that
120 was initially obtained.

121

122 *2.3. Total phenol content*

123 The total phenols were assayed according to Hagerman and Butler [12-13]
124 based on the complexation reaction of the phenolic substances in the sample
125 with a solution of ferric chloride (FeCl₃), which was measured using a
126 spectrophotometer. A sample of 10 mg was weighed and then transferred to a
127 10-ml volumetric flask and completed the volume with methanol. Were added to

128 test tubes aliquotas of 1 ml of the solutions containing 2 ml of sodium lauryl
129 sulfate (SLS)/triethanolamine and 1 ml of ferric chloride (FeCl_3), after which they
130 rested for 15 min. The absorbance reading was taken at 510 nm. All samples
131 were analyzed in triplicate, and standard curves were constructed with tannic
132 acid (Vetec).

133

134 *2.4. Total tannins content*

135 The total tannins content was determined using the method of Hagerman and
136 Butler [12-13] based on the precipitation reaction of the tannins using protein,
137 albumin, and a subsequent complexation with a solution of FeCl_3 , which can be
138 measured in a spectrophotometer.

139 A sample of 10 mg was weighed and then transferred to a 10-ml volumetric
140 flask and completed the volume with methanol. Were transferred to the test
141 tubes aliquots of 1 ml of the solutions and 2 ml of protein solution, albumin, to
142 precipitate the tannins. They were stored at room temperature for 15 min and
143 then centrifuged for 15 min at 3,000 rpm. Supernatants were discarded, the
144 precipitate was dissolved in 4 ml of SLS/triethanolamine, and 1 ml of a
145 chromogenic solution of ferric chloride was then added. The tubes were
146 homogenized and allowed to stand for 15 min. The absorbance reading was
147 taken at 510 nm. All samples were analyzed in triplicate, and the standard curve
148 was constructed with tannic acid (Vetec).

149

150 *2.5. Total flavonoid content*

151 Total flavonoid content was measured using a modified spectrometry assay
152 [14]. This technique is based on the property of absorbing flavonoid radiation at

153 a wavelength of ultraviolet light in proportion to its concentrated form; using as
154 standard rutin.

155 Ten ml of methanol:0.02 M acetic acid (99:1), was added to the 10-mg sample:
156 and then the solutions were filtered, and aliquots were placed in test tubes for
157 reading the absorbance at 361 nm.

158

159 *2.6. Antimicrobial activity*

160 The extracts and fractions were subjected to broth microdilution to determine
161 their minimum inhibitory concentration (MIC) on sterile U-bottom 96-well
162 microplates, as recommended by the Clinical and Laboratory Standards
163 Institute [15-16]. The experiments were carried out in duplicate.

164 The microorganisms used in the assays were standard strains from the
165 American Type Culture Collection (ATCC), and the clinical isolates were
166 provided by the Bacteriology and Mycology Laboratory of the Tropical
167 Pathology and Public Health Institute (Instituto de Patologia Tropical e Saúde
168 Pública) at UFG. The microorganisms used in the assays are as follows:

169 Gram-positive bacteria: *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Bacillus subtilis* (ATCC
170 6633), *Micrococcus roseus* (1740), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341),

171 *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12229), *Staphylococcus aureus* (6538), and
172 *S. aureus* (ATCC 25923)

173 Gram-negative bacteria: *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Enterobacter*
174 *cloacae* (HMA/FT502), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Pseudomonas*

175 *aeruginosa* (ATCC 9027), *P. aeruginosa* (SPM1), *Salmonella spp.* (19430), and
176 *Serratia marcescens* (ATCC 14756)

177 Fungi: *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida parapsilosis* (86U),
178 *Candida albicans* (63U), *Cryptococcus* sp. (ATCC D), *Cryptococcus gatti* (L48),
179 and *Cryptococcus neoformans* (L3)

180 The effects of the extracts (EEC and EEF) and the fractions (HFC, DFC, EAFC,
181 AFC, HFF, DFF, EAFF, and AFF) plus 10% dimethyl sulfoxide or 0.02% Tween
182 ® 80 were tested on each of the listed microorganisms.

183 To reactivate the cultures, the bacteria were incubated in Casoy broth at 35° C
184 for 24 hours and then transferred to an inclined Casoy agar and incubated at
185 35° C for an additional 24 hours. The fungi were cultivated in Sabourad
186 dextrose agar plates and incubated at RT for either 24 hours (*Candida spp.*) or
187 48 hours (*Cryptococcus spp.*).

188 The Müller Hinton broth was used as cultivation medium for the antibacterial
189 assays. Vancomycin (Sigma-Aldrich, Brazil) at 32 µg/mL and gentamicin
190 (Sigma-Aldrich, Brazil) at 128 µg/mL were used as positive controls for the
191 Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively.

192 For the fungi, the MIC was determined using RPMI as the culture medium. The
193 positive control was obtained using itraconazole (Sigma-Aldrich, Brazil) at a
194 concentration of 16 µg/mL.

195

196 2.7. ESI(-) FT-ICR MS analysis

197 The extract and fractions samples were diluted to approximately 0.25 mg mL⁻¹
198 in a 1:1 water-to-methanol ratio that contained 0.1 % m/v of NH₄OH for ESI(-).
199 The resulting solution was directly infused at a flow rate of 5 µL min⁻¹ into the
200 ESI source. The MS (model 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Germany)
201 was set to operate over a mass range of *m/z* 150–2000. The ESI source

202 conditions were as follows: a nebulizer gas pressure of 3 bar, a capillary voltage
203 of 3.5 kV, and a transfer capillary temperature of 250° C. The ions were
204 accumulated in the hexapolar collision cell with a time of 5.10^{-3} s, followed by
205 transport to the analyzer cell (ICR) through the multipole ion guide system
206 (another hexapole). The time of flight in the hexapole was 0.7 ms. Each
207 spectrum was acquired by accumulating 32 scans of the time-domain transient
208 signals in 8 mega-point time-domain data sets. All MS data were externally
209 calibrated using NaTFA. A resolving power, $m/\Delta m_{50\%} \cong 500,000$, in which
210 $\Delta m_{50\%}$ is the full peak width at a half-maximum peak height of $m/z \cong 400$ and a
211 mass accuracy of < 1 ppm, provided unambiguous molecular formula
212 assignments for the singly charged molecular ions. The MS data were acquired
213 and processed using data analysis software (Bruker Daltonics, Bremen,
214 Germany). The MS data were processed, and the elemental compositions of
215 the compounds were determined by measuring the m/z values. The proposed
216 structures for each formula were assigned using the chemspider database
217 (www.chemspider.com).

218

219

220 **Results and Discussion**

221

222 *Total phenol, tannins, and flavonoid content*

223 Table 1 shows the amount of total phenols, tannins, and flavonoids of the *E.*
224 *calycina* extracts and their fractions, as well as their yield.

225

225 **Table 1**

226

227 *Antimicrobial assays*

228 Table 2 shows the antifungal activities of the *E. calycina* extracts and their
229 fractions. If the extracts displayed an MIC of less than 100 µg/mL, their
230 antimicrobial activity was considered good; with an MIC from 100 to 500 µg/mL,
231 their antimicrobial activity was considered moderate; with an MIC from 500 to
232 1,000 µg/mL, their antimicrobial activity was considered weak; and with an MIC
233 over 1,000 µg/mL, the extract was considered inactive [17].

234 The ethanolic extracts (EEC) had moderate antifungal activity against *C.*
235 *parapsilosis* ATCC 22019, *C. parapsilosis* 86U, and *C. gatti* L48 (MIC = 250
236 µg/mL), as well as *C. albicans* 63U and *C. neoformans* L3 (MIC = 500 µg/mL).
237 The aqueous fraction (AFC) showed good activity against *Cryptococcus sp.*
238 ATCC D (MIC = 15.62 µg/mL) and moderate antifungal activity against *C.*
239 *parapsilosis* 86U (MIC = 125 µg/mL) and *C. gatti* L48 (MIC = 500 µg/mL).

240 On the other hand, the ethanolic extract of the leaves (EEF) and their fractions
241 (DFF, EAFF, and AFF) displayed weak activity or were inactive toward the fungi
242 evaluated, except for the hexanic fraction (HFF), which exhibited good
243 antifungal activity toward *C. gatti* L48 and *C. neoformans* L3 (MIC = 31.2), as
244 well as *Cryptococcus sp.* ATCC D (MIC = 62.5 µg/mL). For *C. parapsilosis*
245 ATCC 22019 and *C. parapsilosis* 86U, this fraction displayed moderate activity
246 (MIC = 500 µg/mL).

247 The ethanolic extracts of the leaves and bark (EEC and EEF) and their
248 fractions (HFC, DFC, EAFC, AFC, HFF, DFF, EAFF, and AFF) were tested
249 against the Gram-positive and Gram-negative bacteria displayed weak activity
250 or were inactive toward the fungi evaluated (see Table 2).

251

Table 2

252

253 No studies have investigated the antimicrobial activity of *Eugenia calycina*
254 Cambess extracts, but there are many studies about the antimicrobial activity of
255 *Eugenia sp.* Holetz et al. showed that *Eugenia uniflora* L. hydroalcoholic
256 extracts have good activity against *Cryptococcus krusei* and *Cryptococcus*
257 *tropicalis* and moderate activity towards *Candida parapsilosis* [17]. Braga et al.
258 reported that *Eugenia jambolana* L. extracts have good antifungal activity (MIC
259 = 78 µg/mL) [18]. Victoria et al. found that the *E. uniflora* essential oil has
260 antifungal activity against seven strains of *Candida* and four strains of
261 *Cryptococcus* [19].

262

263 **3.2 ESI(-) FT-ICR MS analysis**

264 In this study, ESI(-) FT-ICR MS data for the bark/leaf ethanolic extracts and
265 their fractions were gathered (see Figures 1 and 2). The full mass spectrum in
266 the negative-ion mode of these extracts was moderately complicated, once
267 more than 100 peaks were detected in the mass range from 200 to 1,000 Da.
268 Hence, ultra-high resolution FT-ICR MS was necessary to resolve and identify
269 the compounds' profiles [20]. Accurate mass analysis was used to identify the
270 elemental compositions of these compounds in the deprotonated form, $[M - H]^-$,
271 and/or as a chlorine adduct, $[M + Cl]^-$, which is shown for the most abundant
272 ions in Figures 1 and 2.

273

Figure 1

274

Figure 2

275 Although basically the same sets of ions were detected for both the bark (EEC)
276 and leaf extracts (EEF), it is clear from visual inspection that there are

277 metabolomic profile differences. These results are useful to better understand
278 their antifungal activity, as demonstrated via the antimicrobial assays. By
279 analyzing the ESI(-) FT-ICR MS data, 340 compounds were identified in the
280 EEF and 146 compounds were identified in the EEC. Several isotopologues
281 ions with closer m/z values were observed in the MS data, such as the peaks of
282 m/z 290.07507 corresponding to the $[M - H]^-$ anion of epicatechin ($M =$
283 $^{12}C_{14}^{13}CH_{14}O_6$ and error = -0.13 ppm), of m/z 379.08264 corresponding to $[M +$
284 $^{37}Cl]^-$ of cellobiose-dihexose ($M = C_{12}H_{22}O_{11}$ and error = 0.20 ppm), and of m/z
285 696.36803 corresponding to $[M - H]^-$ of obebioside A ($^{12}C_{37}^{13}CH_{56}O_{13}$ and error
286 = 0.13 ppm).

287 Generally, the EEC and EEF fractions had noticeable differences. For example,
288 the mass spectrum of the hexanic fraction (HFC) of EEC showed a substantial
289 difference from the mass spectrum of the hexanic fraction (HFF) of EEF; there
290 was a noticeable distribution of compounds from m/z 450 to 550. These
291 differences are more perceptible when the assigned compounds are displayed
292 in graphical form rather than in a table with hundreds of entries.

293 In fact, the elemental composition reveals an important property of a molecule:
294 its heteroatom class (O_x). This property can be hierarchically arranged
295 according to heteroatom class (from O_1 and O_{20}), which is shown in Figures 3
296 and 4 for the bark and leaf extracts of *Eugenia calycina* and their fractions. The
297 relative percentages of the assigned compounds were calculated by adding the
298 number of compounds of the one compound class and dividing this by the total
299 number of compounds assigned. Each fraction has a different profile of oxygen
300 content (O_x class), which is directly related to the solvent used during the
301 extraction. Figure 3 shows that sample EEC was composed primarily of highly

302 oxygenated species (O_{11} , O_{12} , and O_{13} classes) due to high polarity of the
303 extraction solvent. These compounds generally refer to flavonoids, glycosides,
304 tanins, steroids, and sugar like compounds [21-22]. The HFC fraction, which
305 was obtained from a hexane liquid-liquid extraction of the EEC fraction, has a
306 higher diversity of classes (O_2 to O_{12}) corresponding to lipids, carboxylic acids,
307 and steroids compounds [23]. As a consequence of increasing the polarity of
308 the solvent used in the liquid-liquid extraction of the EEC fraction, it was
309 possible to note an increasing and shifting number of oxygen species (O_1 to
310 O_{20}) of the compounds detected. Note that for the DFC fraction, the most
311 abundant class detected was the O_5 class; however, compound classes
312 containing a high oxygen content was also observed (from O_{10} to O_{14}). On the
313 other hand, the EAFC fraction was basically composed of compounds with an
314 oxygen number ranging from O_{10} to O_{14} , with a maximum for the O_{12} class. A
315 similar profile was observed for the AFC fraction; however, the O_{13} class was
316 the most abundant class detected in this fraction.

317 **Figure 3**

318 **Figure 4**

319 Similar to the EEC extract, the fractions of the ethanolic extract of the *Eugenia*
320 *calycina* leaves (Figure 4) displayed a shift to a higher oxygen content class as
321 the function of polarity of the solvent used during the liquid-liquid extraction
322 increased. The EEF extract showed a profile with oxygen compound classes
323 ranging from O_2 to O_{18} . The most apolar fraction, the HFF, exhibited a profile
324 with classes ranging from O_2 to O_8 . The intermediate polar fractions, DFF and
325 EAFF, had profiles with oxygen classes ranging from O_3 to O_{10} and from O_6 to
326 O_{15} , respectively. The most polar fraction, the AFF, exhibited a wide range of

327 oxygen-containing compounds (O₆ to O₂₀ classes), as it was the most abundant
328 of the compounds with a high oxygen content.

329 The ultra-high accuracy mass (error < 1 ppm) provided from the ESI(-) FT-ICR
330 MS data for the bark and leaf extracts and their fractions enabled us to propose
331 a structural assignment using a database like chemspider
332 (www.chemspider.com), but we were unable to differentiate among the possible
333 constitutional isomers. This differentiation could be achieved, for example, using
334 liquid chromatography (LC)–MSⁿ experiments. Based on this statement, we
335 propose some chemical structures for known compounds that have been
336 isolated or detected from *Eugenia* plants, as displayed in Figure 5.

337 **Figure 5**

338

339 The profiles of the bark and leaf extracts and their fractions of *E. calycina*
340 revealed by ESI FT-ICR MS analysis show that the aqueous fraction of the bark
341 (AFC), which was the most active against *Cryptococcus sp.* ATCC D, is mainly
342 composed of polar compounds, such as polyphenolic compounds. On the other
343 hand, the hexanic fraction of the leaves (HFF), which is mainly composed of
344 steroids, terpenes, and fat acids, inhibits the *C. gatti* L48 and *C. neoformans* L3
345 strains.

346 The antimicrobial assays using the bark and leaf extracts of *E. calycina* and
347 their fractions indicated good antifungal activity against strains of *Cryptococcus*
348 of the aqueous fraction of the bark (AFC) with the proposed quercitrin
349 [C₂₁H₂₀O₁₁] already isolated in *Eugenia* [24] as responsible for the antifungal
350 activity [25], and of the hexane fraction of the leaves (HFF) propose the terpene
351 oleanolic acid [26] and their isomers betulinic and ursolic acid [C₃₀H₄₈O₃]

352 identified *Eugenia* [6;26] and antifungal activity [27] proven. Opening prospects
353 for the research of active substances that may be used for the treatment of
354 cryptococcosis, a disease that is common in immunosuppressed patients,
355 because concentrations of less than 250 µg/mL are considered relevant to the
356 study of antifungal substances for therapeutic purposes [28].

357

358

359 **4. Conclusion**

360 ESI(-)-FT-ICR MS has been shown to be a powerful analytical tool for the
361 chemical typification of polar compound species in plant extracts. In this study,
362 the ESI(-)-FT-ICR MS spectra detected 140 oxygen-containing compounds in
363 the bark and leaf extracts of *E. calycina* and their fractions, with their *m/z*
364 ranging from 150 to 1,000. When the polarity of the bark or leaf fractions
365 increased, the amount of oxygen-containing compounds in the fractions also
366 increased. From the exact mass obtained from the extracts and their fractions,
367 ESI(-) FT-ICR MS data was used to assign structural formula using the
368 chemspider database (www.chemspider.com), but this approach did not
369 differentiate the possible constitutional isomers. Quercetin, quercitrin,
370 epicatechin, steroids, triterpens, tannins, and fat acids were proposed based on
371 these molecular formulae.

372

373 **Acknowledgements**

374 We gratefully acknowledge the financial support of the Coordination of Improvement of
375 Higher Education Personnel and the Foundation for Research Support of the State of
376 Goiás.

377

378 **References**

- 379 [1] L.R. Landrum, M.L. Kawasaki, The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated
380 synoptic treatment and identification keys, *Brittonia* 49 (1997) 508-536.
- 381 [2] T. Matsumura, M. Kasai, T. Hayashi, M. Arisawa, Y. Momose, I. Arai, S.
382 Amagaya, Y. Komatsu, α -glucosidase Inhibitors From Paraguayan Natural Medicine,
383 Ñangapiry, The Leaves of *Eugenia Uniflora*, *Pharmaceutical Biology* 38 (2000) 302-
384 307.
- 385 [3] P. Weyerstahl, H. Marschall-Weyerstahl, C. Christiansen, B.O. Oguntimein,
386 A.O. Adeoye, Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil, *Planta Medica* 54 (1988)
387 546–549.
- 388 [4] I.A. Ogunwande, N.O. Olawore, O. Ekundayo, T.M. Walker, J.M. Schmidt, W.N.
389 Setzer, Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of
390 *Eugenia uniflora* L, *International Journal of Aromatherapy* 15 (2005) 147-152.
- 391 [5] A. C. L. Amorim, C. K. F. Lima, A. M. C. Hovell, A. L. P. Miranda, C. M.
392 Rezende, Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and
393 isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga), *Phytomedicine* 16
394 (2009) 923-928.
- 395 [6] I. Lunardi, J.L.B. Peixoto, C.C. Silva, I.T.A. Shuquel, E.A. Basso, G.J. Vidotti,
396 Triterpenic Acids from *Eugenia moraviana*, *Journal of the Brazilian Chemical Society*
397 12 (2001) 180-183.
- 398 [7] J.F.W. Vonbulow, R. Carmona, T.V. Parente, Treatment and Storage of
399 *Eugenia calycina* seeds, *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 29 (1994) 961-970.
- 400 [8] J. Beens, U.A.T. Brinkman, The role of gas chromatography in compositional
401 analyses in the petroleum industry, *Trends in Analytical Chemistry* 19 (2000) 260–275.
- 402 [9] G.C. Klein, S. Kim, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, A. Yen, Mass spectral
403 analysis of asphaltenes. II. Detailed compositional comparison of asphaltenes deposit
404 to its crude oil counterpart for two geographically different crude oils by ESI FT-ICR
405 MS, *Energy and Fuels* 20 (2006) 1973-1979.
- 406 [10] J.J. Savory, N.K. Kaiser, A.M. McKenna, F. Xian, G.T. Blakney, R.P. Rodgers,
407 C.L.
408 Hendrickson, A.G. Marshall, Parts-Per-Billion Fourier Transform Ion Cyclotron
409 Resonance Mass Measurement Accuracy with a “Walking”; Calibration Equation,
410 *Analytical Chemistry* 83 (2011) 1732-1736.
- 411 [11] G.P. Dalmaschio, M.M. Malacarne, V.M.D.L. Almeida, T.M.C. Pereira, A. O.
412 Gomes, E.V.R. Castro, S.J. Greco, B.G. Vaz, W. Romão, Characterization of polar
413 compounds in a true boiling point distillation system using electrospray ionization FT-
414 ICR mass spectrometry, *Fuel* 115 (2014) 190-202.
- 415 [12] S. Mole, P.G. Waterman, A critical analysis of techniques for measuring
416 tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins, *Oecologia*
417 72 (1987a) 137-147.
- 418 [13] S. Mole, P.G. Waterman, A critical analysis of techniques for measuring tannins
419 in ecological studies II. Techniques for biochemically defining tannins, *Oecologia* 72
420 (1987b) 148-156.
- 421 [14] A. Rolim, C.P.M. Maciel, T. M. Kaneko, V. O. Consiglieri, I.M.N. Salgado-
422 Santos, M.V.R. Velasco, Validation Assay for Total Flavonoids, as Rutin Equivalents,
423 from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Bentham
424 (Olacaceae) Commercial Extract, *Journal of AOAC International* 88 (2005) 1015-1019.
- 425 [15] NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory and Standards, Reference
426 Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved
427 Standard M27-A3, NCCLS, Wayne, PA, USA, 2008.
- 428 [16] NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory and Standards, Methods for
429 Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved
430 Standard M07-A8, NCCLS, Wayne, PA, USA, 2012.

- 431 [17] F.B. Holetz, G.L. Pessini, N.R. Sanches, D.A.G. Cortez, C.V. Nakamura,
432 B.P.D.Filho, Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the
433 treatment of infectious diseases, *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 97 (2002) 1027-
434 1031.
- 435 [18] F. Braga, M. Bouzada, R. Fabri, M.O Matos, M. O. Moreira, F.; Scio, E.; E.S. Coimbra,
436 E. S., Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in
437 Brazil, *Journal of Ethnopharmacology* 111 (2007) 396-402.
- 438 [19] F.N. Victoria, E.J. Lenardão, L. Savegnago, G. Perin, R.G. Jacob, D. Alves,
439 W.P. Silva, A.S. Motta, P.S. Nascente, Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.:
440 Antioxidant and antimicrobial properties, *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012)
441 2668-2674.
- 442 [20] R. Haddad, T. Regiani, C.F. Klitzke, G.B. Sanvido, Y.E. Corilo, D.V. Augusti,
443 V.M.D. Pasa, R.C.C. Pereira, W. Romão, B.G. Vaz, R. Augusti, M.N. Eberlin, Gasoline,
444 Kerosene, and Diesel Fingerprinting via Polar Markers, *Energy Fuels* 26 (2012) 3542-
445 3547.
- 446 [21] A.G.R. Nair, S. Krishnan, C. Ravikrishna, K.P. Madhusudanan, New and rare
447 flavonol glycosides from leaves of *Syzygium samarangense*, *Fitoterapia* 70 (1999) 148-
448 151.
- 449 [22] S.A.M Hussein, A.N.M Hashem, M.A Seliem, U. Lindequist, M.A.M Nawwar,
450 Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*, *Phytochemistry* 64 (2003) 883-889.
- 451 [23] R. Srivastava, A.K. Shaw, D.K. Kulshreshtha, Triterpenoids and chalcone from
452 *Syzygium samarangense*, *Phytochemistry* 38 (1995) 687-689.
- 453 [24] A.L. Oliveira, E. Destandau, L. Fougère, M. Lafosse, Isolation by pressurised
454 fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic
455 compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.), *Food Chemistry* 145
456 (2014) 522–529.
- 457 [25] J.A.M. Paula, M.R.R. Silva, M.P. Costa, D.G.A. Diniz, F.A.S. Sa, S.F. Alves,
458 E.A. Costa, R.C. Lino, J.R. Paula, Phytochemical Analysis and Antimicrobial,
459 Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Activities of Two Chemotypes of *Pimenta*
460 *pseudocaryophyllus* (Myrtaceae). Evidence-Based Complementary and Alternative
461 Medicine 2012 (2012) 15p.
- 462 [26] M. Rajasekaran, J.S. Bapna, S. Lakshmanan, A.G. Ramachandran Nair, A.J.
463 Veliath, M. Panchanadam, Antifertility Effect In Male Rats Of oleanolic acid, a triterpene
464 from *Eugenia jambolana* flowers, *Journal of Ethnopharmacology* 24 (1988) 115-121.
- 465 [27] L.J. Shai, L.J. McGaw, M.A. Aderogba, L.K. Mdee, J.N. Eloff, Four pentacyclic
466 triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f)
467 C.A. Sm. Leaves, *Journal of Ethnopharmacology* 119 (2008) 238-244.
- 468 [28] L. Scorzoni, T. Benaducci, A.M.F. Almeida, D.H.S. Silva, V.S. Bolzani, M.J.S.
469 M. Gianinni, The use of standard methodology for determination of antifungal activity of
470 natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp, *Brazilian*
471 *Journal of Microbiology* 38 (2007) 391-397.

472

Table Captions

473

474 **Table 1.** Yield of extraction methods expressed as a percentage (w / w) and
475 the contents of total polyphenol, flavonoids and tannins in *Eugenia calycina*
476 Cambess. extracts and their fractions of the bark and leaves expressed in
477 percentage (w / w) \pm standard Deviation.

478

479 **Table 2.** Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) of extracts and fractions of
480 *Eugenia calycina* (Myrtaceae).

Table 1.

Samples	Yield	Phenolic contente	Tannins contente	Flavonoid content
EEC	10,52%	27,85 ± 0,019	24,36 ± 0,008	3,67 ± 0,006
HFC	6,77%	1,12 ± 0,002	0,27 ± 0,001	0,85 ± 0,003
DFC	2,18%	8,44 ± 0,005	1,77 ± 0,002	3,70 ± 0,009
E AFC	14,85%	40,06 ± 0,005	14,95 ± 0,011	4,39 ± 0,006
AFC	62,34%	29,38 ± 0,004	24,17 ± 0,001	2,69 ± 0,002
EEF	27,78%	18,54 ± 0,019	11,78 ± 0,006	9,96 ± 0,006
HFF	8,81%	0,13 ± 0,001	0,03 ± 0,002	0,07 ± 0,002
DFF	3,61%	5,25 ± 0,001	3,14 ± 0,006	4,29 ± 0,001
E AFF	20,65%	35,83 ± 0,006	8,62 ± 0,004	11,35 ± 0,006
AFF	51,67%	19,42 ± 0,005	10,15 ± 0,006	7,51 ± 0,008

EEC: ethanol extract, bark; HFC: hexane fraction, bark; DFC: dichloromethane fraction, bark; E AFC: ethyl acetate fraction, bark; AFC: aqueous fraction, bark;

EEF: ethanol extract, leaves; HFF: hexane fraction, leaves; DFF: dichloromethane fraction, leaves; E AFF: ethyl acetate fraction, leaves; AFF: aqueous fraction, leaves

Table 2.

Microorganisms	EEC	HFC	DFC	EAFC	AFC	EEF	HFF	DFF	EAFF	AFF	Control		
											Vanc.	Gent.	Itrac.
Gram (+) Bactéria													
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	2000	2000	1000	500	250	2000	2000	500	500	2000	2	NC	NC
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	2000	2000	1000	1000	2000	2000	2000	2000	1000	2000	2	NC	NC
<i>Micrococcus roseus</i> 1740	2000	2000	1000	1000	1000	2000	2000	2000	2000	2000	0.5	NC	NC
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	2000	2000	2000	1000	1000	2000	2000	1000	2000	1000	0.25	NC	NC
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC	2000	2000	2000	2000	1000	2000	1000	2000	2000	1000	1	NC	NC
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	1000	1000	1000	500	2000	2000	1000	1000	500	2000	2	NC	NC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2000	2000	2000	1000	2000	2000	2000	1000	1000	2000	1	NC	NC
Gram (-) Bactéria													
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	2000	2000	2000	2000	1000	2000	2000	2000	2000	2000	NC	0.125	NC
<i>Enterobacter cloacae</i> HMA FTA502	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	1000	NC	4	NC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	2000	2000	2000	2000	1000	2000	2000	2000	2000	2000	NC	2	NC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	NC	2	NC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	2000	2000	2000	2000	500	2000	2000	2000	2000	1000	NC	4	NC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SPM1	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	NC	4	NC
<i>Salmonella</i> spp. 19430	2000	1000	2000	1000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	NC	2	NC
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756	2000	2000	2000	1000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	NC	4	NC
Fungi													
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	250	2000	2000	1000	1000	2000	250	2000	2000	2000	NC	NC	1
<i>Candida albicans</i> 63U	500	2000	2000	2000	1000	2000	2000	2000	2000	2000	NC	NC	1
<i>Candida parapsilosis</i> 86U	250	2000	2000	2000	125	2000	250	2000	2000	2000	NC	NC	1
<i>Cryptococcus</i> sp ATCC D	1000	2000	1000	2000	15.62	1000	62.5	2000	500	1000	NC	NC	2
<i>Cryptococcus gatti</i> L48	250	2000	1000	1000	500	2000	31.2	250	2000	2000	NC	NC	2
<i>Cryptococcus neoformans</i> L3	500	2000	2000	2000	1000	2000	31.2	2000	2000	2000	NC	NC	2

EEC: ethanol extract, bark; HFC: hexane fraction, bark; DFC: dichloromethane fraction, bark; EAFC: ethyl acetate fraction, bark; AFC: aqueous fraction, bark; EEF: ethanol extract, leaves; HFF: hexane fraction, leaves; DFF: dichloromethane fraction, leaves; EAFF: ethyl acetate fraction, leaves; AFF: aqueous fraction, leaves; Vanc., vancomycin (32 µg/mL). Gent., gentamicin (128 µg/mL). Itrac., itraconazole (16 µg/mL)

Figure Captions

Figure 1. ESI(-) FT-ICR mass spectra for the bark extract of *E. calycina* and their fractions.

Figure 2. ESI(-) FT-ICR mass spectra for the leaves extract of *E. calycina* and their fractions.

Figure 3. Class compounds profile from the bark extract of *E. calycina* and their fractions.

Figure 4. Class compounds profile from the leaves extract of *E. calycina* and their fractions.

Figure 5. Possible structures of some molecular formulas assigned from ESI(-) FT-ICR MS data using *chemspider* database.

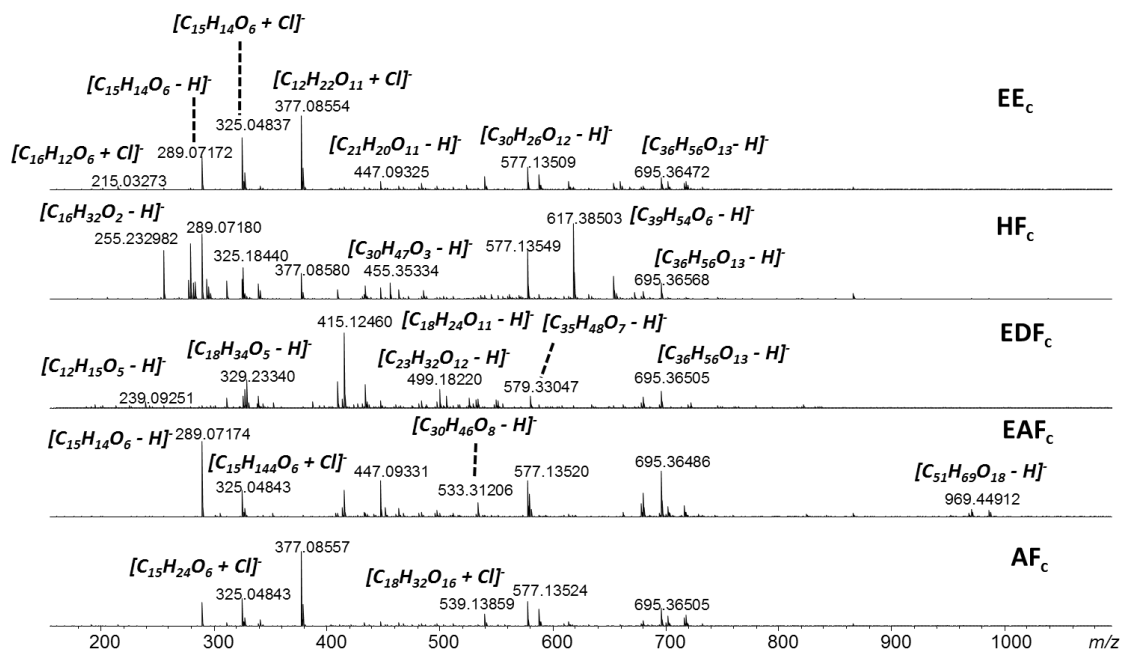


Figure 1.

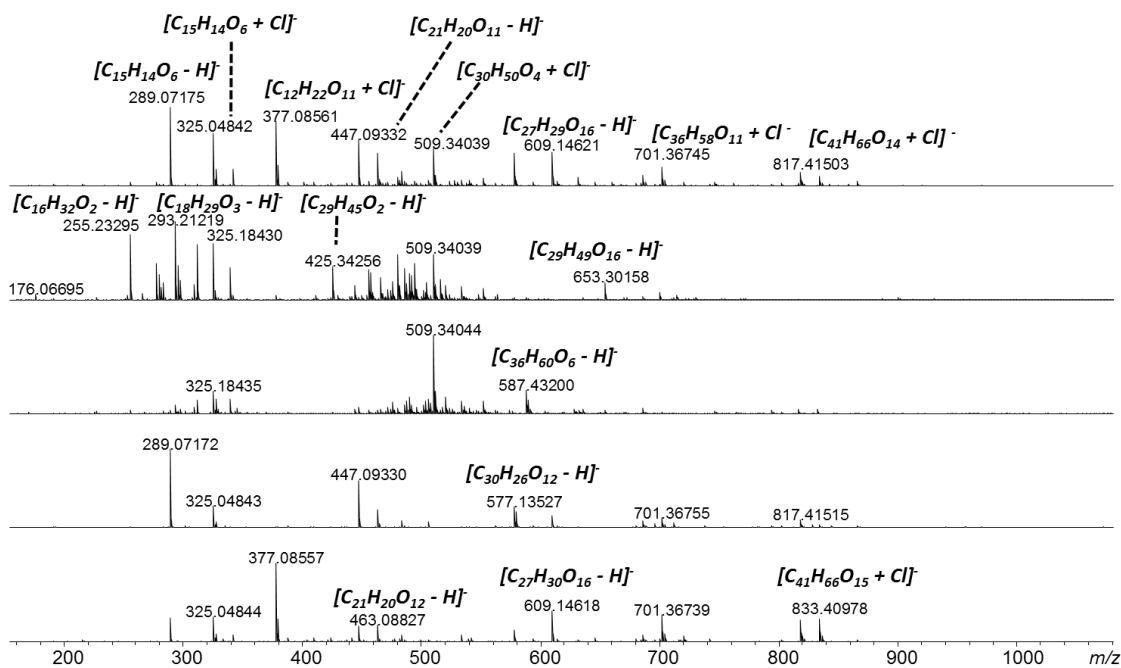


Figure 2.

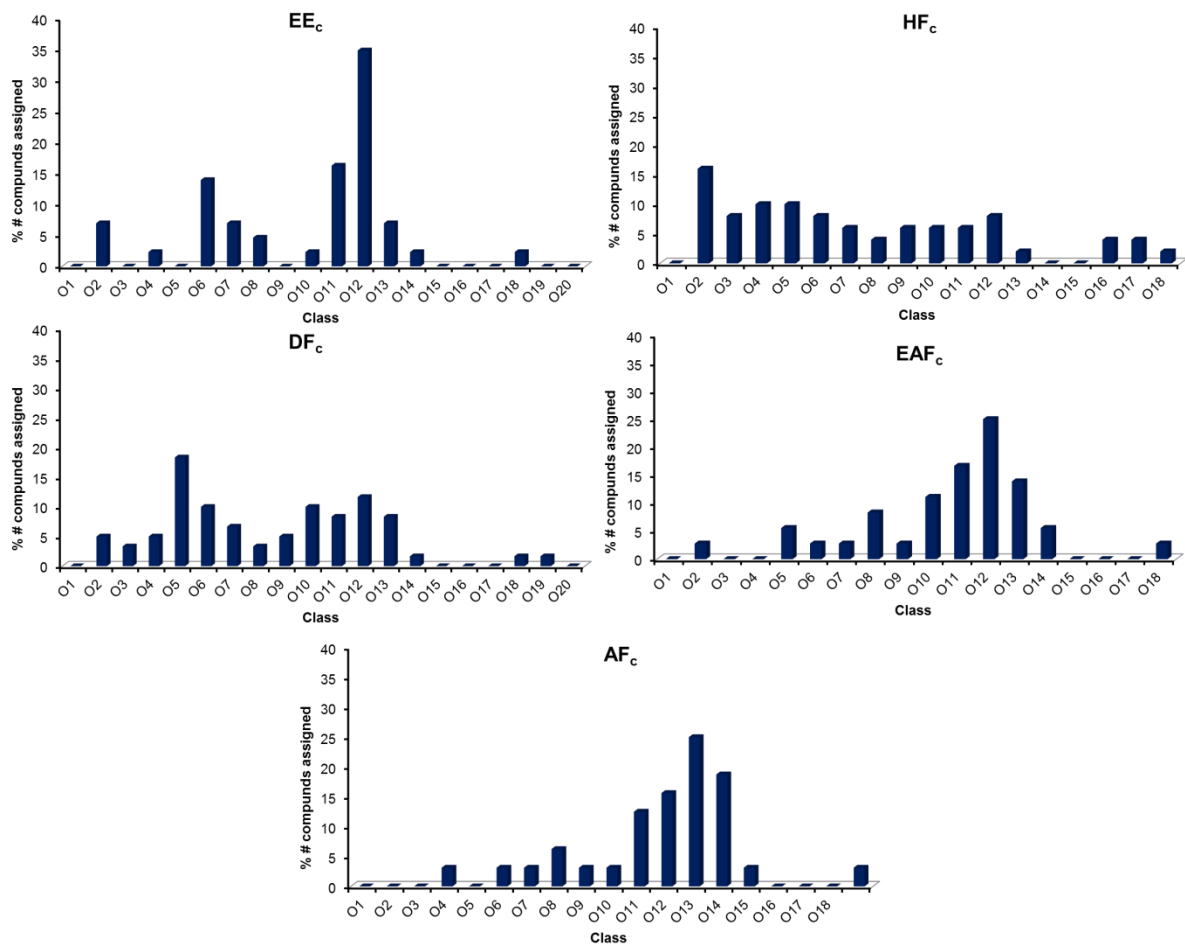


Figure 3

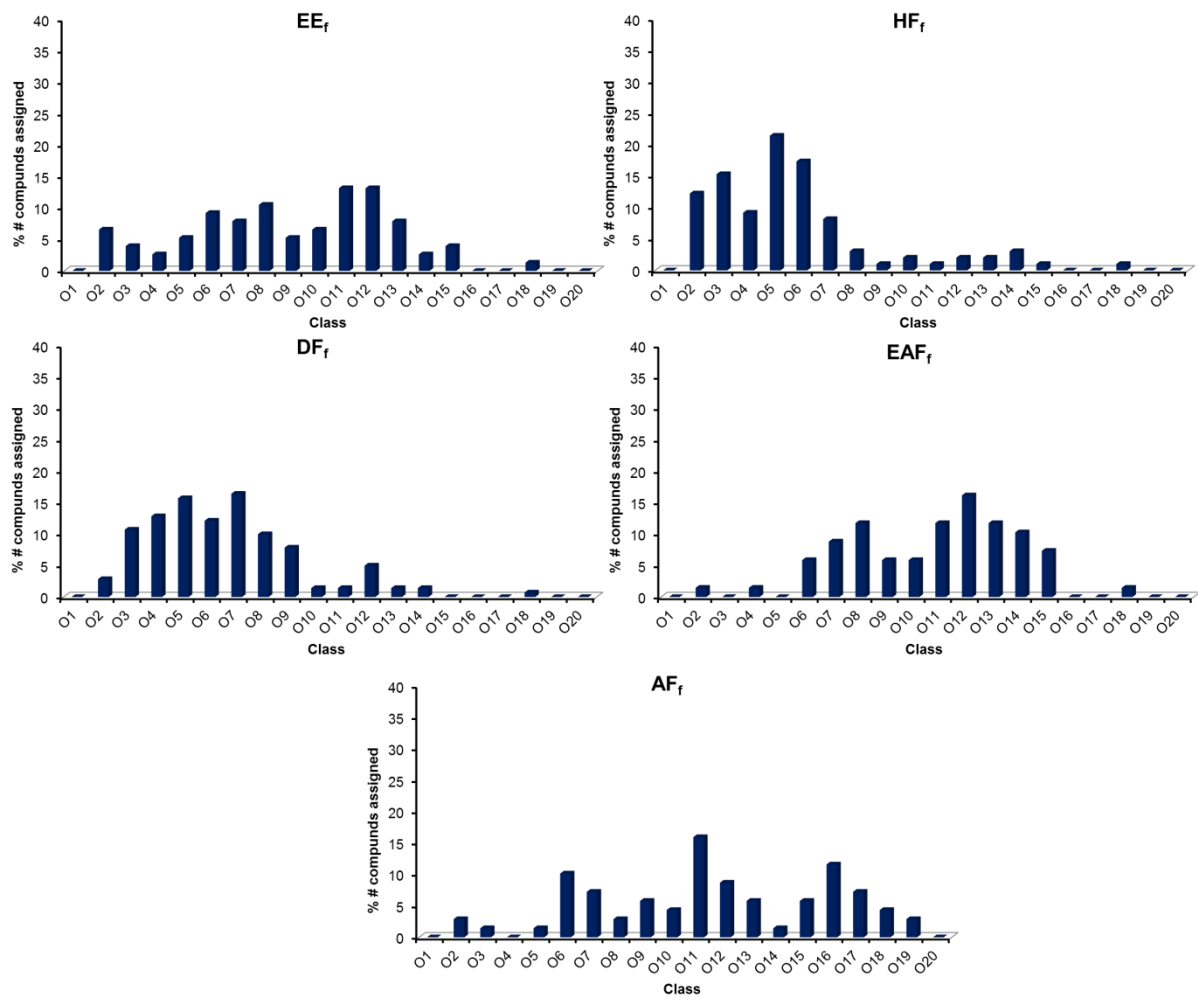


Figure 4.

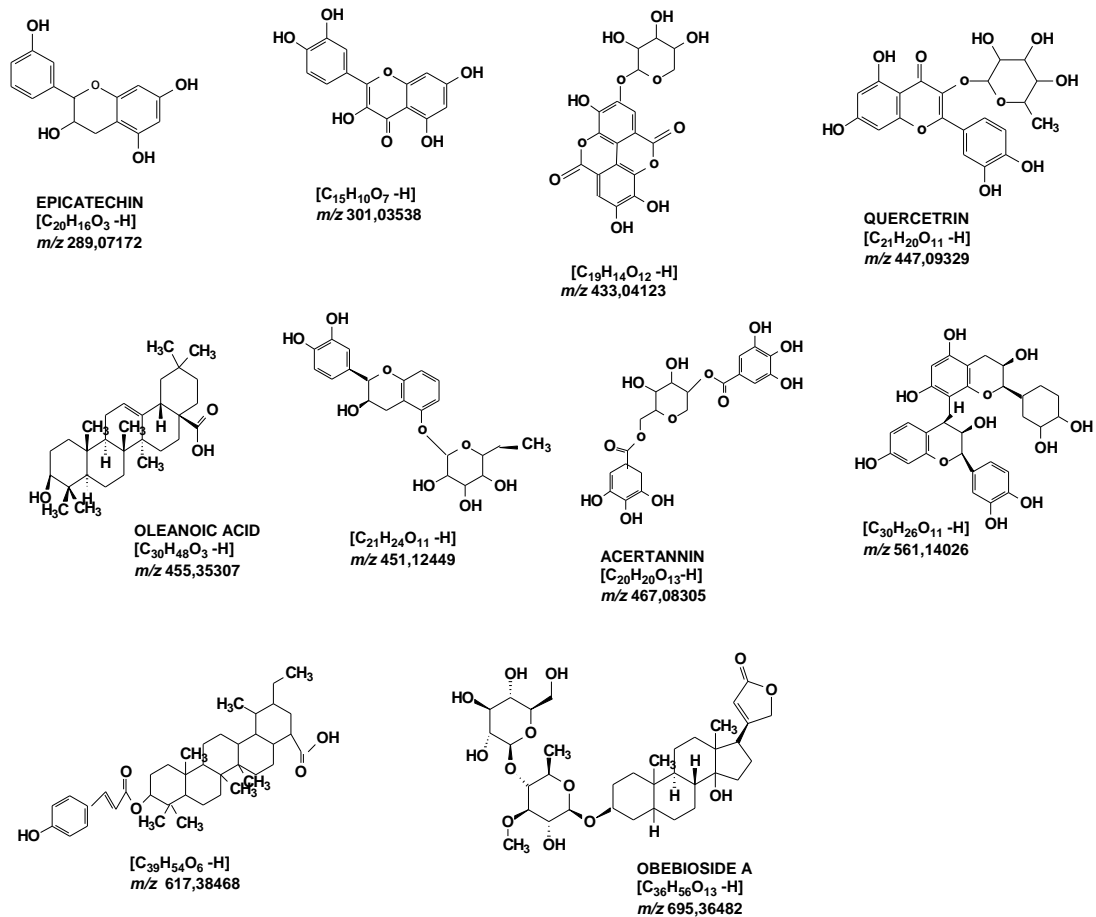


Figure 5.

Support Information

***Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry**

Fernanda P. S. Ferreira^a, Sandra R. Morais^{a,b}, Maria T. F. Bara^d, Edemilson C. Conceição^d, José R. Paula^{d*}, Thays C. Carvalho^e, Boniek G. Vaz^e, Helber B. Costa^f, Wanderson Romão^{f,g}, Maria H. Rezende^c

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 74001 970, Brazil

^b Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista, Campus Flamboyant, Goiânia, Goiás, 74845 090, Brazil

^c Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, Goiás, 74001 970, Brazil

^d Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, CP 131, Goiânia, Goiás, 74605 220, Brazil

^e Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, CP 131, Goiânia, Goiás, 74001 970, Brazil

^f Laboratório de Petroleômica e Forense, Departamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo, 29075-910, Vitória, ES, Brazil

^g Instituto Federal do Espírito Santo, Av. Ministro Salgado Filho, Soteco, Vila Velha- ES, CEP: 29106-010

* Corresponding author: tel +55 62 3209 6182; fax +55 62 3209 6037

E-mail: pjrpaula@gmail.com; jose_realino@ufg.br

Table 1S. Estimated molecular formulas for the measured m/z values from ESI(-) FT-ICR mass spectra of the leaves *E. calycina* extracts and their fractions.

Experimental m/z	Molecular formula	Relative Intensity (%)				
		EE _f	HF _f	DF _f	EAF _f	AF _f
165,04046	[C ₅ H ₁₀ O ₆ – H] ⁻					x
179,05611	[C ₆ H ₁₂ O ₆ – H] ⁻					x
191,01973	[C ₆ H ₈ O ₇ – H] ⁻				x	
191,05611	[C ₇ H ₁₂ O ₆ – H] ⁻	x				x
195,05103	[C ₆ H ₁₂ O ₇ – H] ⁻					x
203,05611	[C ₈ H ₁₂ O ₆ – H] ⁻				x	
209,11832	[C ₁₂ H ₁₈ O ₃ – H] ⁻			x		
213,14962	[C ₁₂ H ₂₂ O ₃ – H] ⁻			x		
215,03277	[C ₆ H ₁₂ O ₆ + Cl] ⁻	x				
221,08193	[C ₁₂ H ₁₃ O ₄ – H] ⁻					x
225,11320	[C ₁₂ H ₁₇ O ₄ – H] ⁻			x		
227,12888	[C ₁₂ H ₁₅ O ₄ -H] ⁻			x		
227,20202	[C ₁₄ H ₂₈ O ₂ -H] ⁻			x		
229,14453	[C ₁₂ H ₂₂ O ₄ - H] ⁻		x			
233,15470	[C ₁₅ H ₂₂ O ₂ - H] ⁻			x		
239,12888	[C ₁₃ H ₁₉ O ₄ - H] ⁻		x			
241,21730	[C ₁₅ H ₃₀ O ₂ - H] ⁻			x		
243,12380	[C ₁₂ H ₂₀ O ₅ - H] ⁻		x			
245,13945	[C ₁₂ H ₂₂ O ₅ - H] ⁻			x		
249,19902	[C ₁₅ H ₂₂ O ₃ - H] ⁻			x		
251,16527	[C ₁₅ H ₂₅ O ₃ - H] ⁻			x		
253,14453	[C ₁₄ H ₂₃ O ₄ - H] ⁻		x	x		
253,21730	[C ₁₆ H ₃₀ O ₂ - H] ⁻			x		

255,23295	$[\text{C}_6\text{H}_{32}\text{O}_2^- \text{H}]^-$		x		
263,12888	$[\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4^- \text{H}]^-$	x	x	x	
267,16018	$[\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_4^- \text{H}]^-$			x	
269,13945	$[\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_5^- \text{H}]^-$			x	
269,24860	$[\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2^- \text{H}]^-$			x	
271,06120	$[\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5^- \text{H}]^-$		x		
277,18092	$[\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_3^- \text{H}]^-$			x	
277,21730	$[\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2^- \text{H}]^-$			x	
279,23295	$[\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2^- \text{H}]^-$	x	x		
281,24860	$[\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2^- \text{H}]^-$	x	x	x	
283,26425	$[\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2^- \text{H}]^-$		x		
287,22278	$[\text{C}_{10}\text{H}_{32}\text{O}_4^- \text{H}]^-$	x	x	x	
289,07176	$[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6^- \text{H}]^-$			x	
293,21222	$[\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3^- \text{H}]^-$	x		x	x
295,10346	$[\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_9^- \text{H}]^-$	x	x	x	x
295,22787	$[\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_3^- \text{H}]^-$				
299,18640	$[\text{C}_{10}\text{H}_{28}\text{O}_5^- \text{H}]^-$		x	x	
301,03538	$[\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7^- \text{H}]^-$			x	
303,05103	$[\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_7^- \text{H}]^-$	x		x	x
305,06668	$[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7^- \text{H}]^-$			x	
307,19148	$[\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_4^- \text{H}]^-$				x
309,20713	$[\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_4^- \text{H}]^-$		x	x	
325,04842	$[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6 + \text{Cl}]^-$		x	x	x
327,04515	$[\text{C}_{29}\text{H}_8\text{O}_2^- \text{H}]^-$	x			x
327,21770	$[\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_5^- \text{H}]^-$				x
329,23335	$[\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_5^- \text{H}]^-$		x	x	

335,07724	$[\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_8 - \text{H}]^-$			x	
341,10894	$[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} - \text{H}]^-$				x x
343,21261	$[\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_6 - \text{H}]^-$	x	x		
345,18388	$[\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_4 + \text{Cl}]^-$			x	
351,21770	$[\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5 - \text{H}]^-$			x	
353,23335	$[\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5 - \text{H}]^-$			x	
355,24900	$[\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_5 - \text{H}]^-$			x	
369,22826	$[\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_6 - \text{H}]^-$			x	
375,20244	$[\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_8 - \text{H}]^-$			x	
377,08554	$[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} + \text{Cl}]^-$			x	x
379,08233	$[\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_7 - \text{H}]^-$	x			
379,10343	$[\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_9 - \text{H}]^-$		x		
387,14493	$[\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7 - \text{H}]^-$			x	
387,16606	$[\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_9 - \text{H}]^-$			x	x
395,24391	$[\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_6 - \text{H}]^-$	x		x	
401,10894	$[\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_{11} - \text{H}]^-$		x	x	x
401,12419	$[\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_8 - \text{H}]^-$				
401,13006	$[\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$			x	
403,13984	$[\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_8 - \text{H}]^-$	x			
405,13436	$[\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_6 - \text{H}]^-$			x	x
407,18640	$[\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_5 - \text{H}]^-$				
409,19991	$[\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_7 + \text{Cl}]^-$			x	x
409,29595	$[\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_5 - \text{H}]^-$				
411,19657	$[\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{O}_3 - \text{H}]^-$			x	x
411,31160	$[\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_5 - \text{H}]^-$	x			
419,13479	$[\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_9 - \text{H}]^-$				

421,15041	$[\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_9 - \text{H}]^-$			x	
423,17921	$[\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_8 + \text{Cl}]^-$			x	x
423,32685	$[\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_2 - \text{H}]^-$		x		
425,29086	$[\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_9 - \text{H}]^-$				
425,34250	$[\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_2 - \text{H}]^-$		x	x	
429,33742	$[\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_3 - \text{H}]^-$		x		
431,14063	$[\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{O}_{14} - \text{H}]^-$		x	x	
431,22866	$[\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_9 - \text{H}]^-$				
433,07763	$[\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{11} - \text{H}]^-$			x	x x
435,10854	$[\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_8 - \text{H}]^-$				x
435,21770	$[\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_5 - \text{H}]^-$	x			
439,07645	$[\text{C}_{33}\text{H}_{12}\text{O}_2 - \text{H}]^-$			x	
439,11871	$[\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{O}_6 - \text{H}]^-$	x			x
439,20713	$[\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_7 - \text{H}]^-$				
439,32177	$[\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_3 - \text{H}]^-$		x	x	
441,18978	$[\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_9 + \text{Cl}]^-$				x
441,33742	$[\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_3 - \text{H}]^-$		x	x	
443,18640	$[\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{O}_5 - \text{H}]^-$				x
443,35307	$[\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_3 - \text{H}]^-$		x	x	
447,09329	$[\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11} - \text{H}]^-$	x			x x
447,13554	$[\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{O}_{15} - \text{H}]^-$		x		
453,33742	$[\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3 - \text{H}]^-$		x		
455,35307	$[\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3 - \text{H}]^-$		x		
457,33233	$[\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_4 - \text{H}]^-$	x	x	x	
459,13554	$[\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_{15} - \text{H}]^-$				x
459,31160	$[\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_5 - \text{H}]^-$			x	

461,10894	$[\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}^- \text{H}]^-$			x	x	x
463,08820	$[\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}^- \text{H}]^-$			x	x	x
463,34290	$[\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_5^- \text{H}]^-$	x	x			
465,31417	$[\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_3 + \text{Cl}]^-$		x	x		
469,13515	$[\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_{12}^- \text{H}]^-$				x	x
469,33233	$[\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4^- \text{H}]^-$	x	x	x		
471,34798	$[\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4^- \text{H}]^-$		x	x		
473,36363	$[\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_4^- \text{H}]^-$	x	x			
475,13046	$[\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_{16}^- \text{H}]^-$					x
475,34290	$[\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_5^- \text{H}]^-$		x	x		
477,10385	$[\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{12}^- \text{H}]^-$				x	
477,14611	$[\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_{16}^- \text{H}]^-$					x
477,32216	$[\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_6^- \text{H}]^-$			x		
479,32980	$[\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_3 + \text{Cl}]^-$		x			
479,33199	$[\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{O}^- \text{H}]^-$			x		
481,13513	$[\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_{16}^- \text{H}]^-$					x
483,07005	$[\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11} + \text{Cl}]^-$	x				x
483,31160	$[\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5^- \text{H}]^-$	x		x		
485,06668	$[\text{C}_{30}\text{H}_{14}\text{O}_7^- \text{H}]^-$				x	x
485,28267	$[\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_3 + \text{Cl}]^-$		x			
485,32725	$[\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5^- \text{H}]^-$			x		
487,34290	$[\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5^- \text{H}]^-$		x	x		
489,35855	$[\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_5^- \text{H}]^-$	x	x	x		
491,32984	$[\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3 + \text{Cl}]^-$		x			
491,37420	$[\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_5^- \text{H}]^-$			x		
493,34546	$[\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3 + \text{Cl}]^-$		x			
493,34759	$[\text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{O}^- \text{H}]^-$			x		

495,32486	$[\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_4 + \text{Cl}]^-$			x	
497,36363	$[\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4 - \text{H}]^-$		x		
499,30651	$[\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_6 - \text{H}]^-$			x	
501,06159	$[\text{C}_{30}\text{H}_{14}\text{O}_8 - \text{H}]^-$				
501,32216	$[\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_6 - \text{H}]^-$	x		x	
501,35855	$[\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_5 - \text{H}]^-$		x		
503,33781	$[\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_6 - \text{H}]^-$			x	
505,09876	$[\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$	x			x x
505,35346	$[\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_6 - \text{H}]^-$	x	x	x	
507,36911	$[\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_6 - \text{H}]^-$			x	
509,34044	$[\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_4 + \text{Cl}]^-$		x	x	
511,34290	$[\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_5 - \text{H}]^-$		x		
515,16176	$[\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_{16} - \text{H}]^-$				x
515,30143	$[\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_7 - \text{H}]^-$			x	
515,37420	$[\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_5 - \text{H}]^-$		x		
515,41058	$[\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{O}_4 - \text{H}]^-$				
517,31708	$[\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_7 - \text{H}]^-$	x		x	
517,38985	$[\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_5 - \text{H}]^-$	x	x		
519,36911	$[\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_6 - \text{H}]^-$		x	x	
521,34813	$[\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_7 - \text{H}]^-$	x		x	x
521,38476	$[\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{O}_6 - \text{H}]^-$		x		
523,32177	$[\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{O}_3 - \text{H}]^-$			x	
527,30730	$[\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$			x	
529,30180	$[\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_{10} - \text{H}]^-$	x	X		
531,29634	$[\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_8 - \text{H}]^-$			x	
531,36911	$[\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_6 - \text{H}]^-$		x		

533,17232	$[\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_{17}^- \text{H}]^-$				x
533,31199	$[\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_8^- \text{H}]^-$	x			x
533,38478	$[\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_6^- \text{H}]^-$		x	x	
537,16136	$[\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_{13}^- \text{H}]^-$				x
537,33742	$[\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{O}_3^- \text{H}]^-$			x	
539,31469	$[\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_6 + \text{Cl}]^-$			x	
539,31668	$[\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{O}_4^- \text{H}]^-$				x
541,31120	$[\text{C}_{39}\text{H}_{42}\text{O}_2^- \text{H}]^-$			x	
543,23883	$[\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{O}_7^- \text{H}]^-$				x
543,40550	$[\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{O}_5^- \text{H}]^-$	x		x	
545,31199	$[\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_8^- \text{H}]^-$				x
545,34838	$[\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_7^- \text{H}]^-$	x	x	x	
547,36403	$[\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_7^- \text{H}]^-$			x	
547,40041	$[\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{O}_6^- \text{H}]^-$		x		
551,35307	$[\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_3^- \text{H}]^-$			x	
553,34759	$[\text{C}_{41}\text{H}_{46}\text{O}^- \text{H}]^-$		x	x	
557,31199	$[\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{O}_8^- \text{H}]^-$	x			x
557,42115	$[\text{C}_{55}\text{H}_{58}\text{O}_5^- \text{H}]^-$	x	x		
561,14024	$[\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{11}^- \text{H}]^-$				x
561,37968	$[\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{O}_7^- \text{H}]^-$	x	x	x	
563,39533	$[\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{O}_7^- \text{H}]^-$		x	x	
567,25996	$[\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_9^- \text{H}]^-$				x
567,29634	$[\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_8^- \text{H}]^-$				
569,31787	$[\text{C}_{26}\text{H}_{50}\text{O}_{13}^- \text{H}]^-$	x			
571,31239	$[\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_{11}^- \text{H}]^-$	x			
573,23414	$[\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{O}_{11}^- \text{H}]^-$	x			x

573,34329	$[\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_8^- \text{H}]^-$				x	
573,37968	$[\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_7^- \text{H}]^-$	x		x		
575,39533	$[\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{O}_7^- \text{H}]^-$				x	
577,13515	$[\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12}^- \text{H}]^-$		x		x	x
579,15080	$[\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{O}_{12}^- \text{H}]^-$	x			x	
579,39024	$[\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{O}_8^- \text{H}]^-$	x	x			
587,43171	$[\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_6^- \text{H}]^-$		x	x		
589,37459	$[\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_8^- \text{H}]^-$				x	
589,44736	$[\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_6^- \text{H}]^-$	x	x			
591,11441	$[\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_{13}^- \text{H}]^-$				x	
591,25996	$[\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{O}_9^- \text{H}]^-$				x	
593,15119	$[\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}^- \text{H}]^-$				x	x
595,13046	$[\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{16}^- \text{H}]^-$	x				x
597,11911	$[\text{C}_{36}\text{H}_{22}\text{O}_9^- \text{H}]^-$					
597,34917	$[\text{C}_{28}\text{H}_{54}\text{O}_{13}^- \text{H}]^-$	x	x			
599,34533	$[\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_7^- \text{H}]^-$				x	
601,41098	$[\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_7^- \text{H}]^-$				x	
603,42603	$[\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_7^- \text{H}]^-$				x	
605,16645	$[\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{O}_{12}^- \text{H}]^-$				x	
605,40589	$[\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_8^- \text{H}]^-$		x	x		
609,14611	$[\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}^- \text{H}]^-$				x	x
613,11402	$[\text{C}_{36}\text{H}_{22}\text{O}_{10}^- \text{H}]^-$	x			x	
615,10854	$[\text{C}_{39}\text{H}_{20}\text{O}_8^- \text{H}]^-$				x	
615,39024	$[\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_8^- \text{H}]^-$	x		x		
617,29675	$[\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{O}_{11}^- \text{H}]^-$				x	
617,40584	$[\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_8^- \text{H}]^-$	x		x		

619,33352	[C ₃₀ H ₅₂ O ₁₃ - H] ⁻		x		
619,42154	[C ₃₆ H ₆₀ O ₈ - H] ⁻				x
621,40081	[C ₃₅ H ₅₈ O ₉ - H] ⁻				x
629,18758	[C ₃₁ H ₃₄ O ₁₄ - H] ⁻				x
629,44228	[C ₃₈ H ₆₂ O ₇ - H] ⁻				x
631,18797	[C ₂₇ H ₃₆ O ₁₇ - H] ⁻				x x
631,38516	[C ₃₆ H ₅₆ O ₉ - H] ⁻	x		x	
631,49431	[C ₃₉ H ₆₈ O ₆ - H] ⁻		x		
633,40081	[C ₃₆ H ₅₈ O ₉ - H] ⁻	x		x	
635,32843	[C ₃₀ H ₅₂ O ₁₄ - H] ⁻		x		
645,12498	[C ₃₃ H ₂₆ O ₁₄ - H] ⁻	x			x x
645,43719	[C ₃₈ H ₆₂ O ₈ - H] ⁻	x		x	
647,11950	[C ₃₆ H ₂₄ O ₁₂ - H] ⁻				x
647,38007	[C ₃₆ H ₅₆ O ₁₀ - H] ⁻	x	x		
649,39572	[C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀ - H] ⁻				x
651,41137	[C ₃₆ H ₆₀ O ₁₀ - H] ⁻				x
653,30261	[C ₂₉ H ₅₀ O ₁₆ - H] ⁻	x	x	x	
657,21888	[C ₃₃ H ₃₈ O ₁₄ - H] ⁻	x			x
661,05300	[C ₂₄ H ₂₂ O ₂₂ - H] ⁻	x			
663,44188	[C ₄₅ H ₆₀ O ₄ - H] ⁻	x	X		
667,16684	[C ₃₃ H ₃₂ O ₁₅ - H] ⁻				x
669,18249	[C ₃₃ H ₃₄ O ₁₅ - H] ⁻	x			x
669,37968	[C ₄₂ H ₅₄ O ₇ - H] ⁻	x		x	
671,39533	[C ₄₂ H ₅₆ O ₇ - H] ⁻				x
677,22396	[C ₃₆ H ₃₈ O ₁₃ - H] ⁻				x
679,36990	[C ₃₆ H ₅₆ O ₁₂ - H] ⁻		X	x	x

683,22515	$[\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_{22}^- \text{H}]^-$	x			x
683,35894	$[\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{O}_8^- \text{H}]^-$			x	x
685,37459	$[\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{O}_8^- \text{H}]^-$			x	x
685,57765	$[\text{C}_{44}\text{H}_{78}\text{O}_5^- \text{H}]^-$		x		
687,36911	$[\text{C}_{45}\text{H}_{52}\text{O}_6^- \text{H}]^-$			x	x
695,36482	$[\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_{13}^- \text{H}]^-$	x			x
695,40120	$[\text{C}_{37}\text{H}_{60}\text{O}_{12}^- \text{H}]^-$	x		x	x
697,57765	$[\text{C}_{45}\text{H}_{78}\text{O}_5^- \text{H}]^-$		x		
699,35386	$[\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{O}_9^- \text{H}]^-$				x
699,59330	$[\text{C}_{45}\text{H}_{80}\text{O}_5^- \text{H}]^-$		x		
701,36745	$[\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_{11} + \text{Cl}]^-$				x
701,36951	$[\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{O}_9^- \text{H}]^-$	x			x
703,36403	$[\text{C}_{45}\text{H}_{52}\text{O}_7^- \text{H}]^-$			x	x
707,40120	$[\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{O}_{12}^- \text{H}]^-$	x		x	
707,56200	$[\text{C}_{46}\text{H}_{76}\text{O}_5^- \text{H}]^-$		x		
709,38097	$[\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_{13}^- \text{H}]^-$				x
709,41685	$[\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{O}_{12}^- \text{H}]^-$			x	
709,57765	$[\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{O}_5^- \text{H}]^-$	x	x		
711,39612	$[\text{C}_{37}\text{H}_{60}\text{O}_{13}^- \text{H}]^-$				x
711,59320	$[\text{C}_{46}\text{H}_{80}\text{O}_5^- \text{H}]^-$		x		
713,46341	$[\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_9^- \text{H}]^-$	x		x	
715,34877	$[\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{O}_{10}^- \text{H}]^-$	x			x
717,36442	$[\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{O}_{10}^- \text{H}]^-$				x
717,49471	$[\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_9^- \text{H}]^-$	x		x	
719,20218	$[\text{C}_{24}\text{H}_{45}\text{O}_{11}^- \text{H}]^-$				x
719,48923	$[\text{C}_{45}\text{H}_{68}\text{O}_7^- \text{H}]^-$	x		x	

721,19854	[C ₃₃ H ₃₈ O ₁₈ - H] ⁻				x
721,50488	[C ₄₅ H ₇₀ O ₇ - H] ⁻	x		x	
721,57765	[C ₄₇ H ₇₈ O ₅ - H] ⁻		x		
723,59330	[C ₄₇ H ₈₀ O ₅ - H] ⁻		x		
727,62460	[C ₄₇ H ₈₆ O ₅ - H] ⁻	x	x		
729,60386	[C ₄₆ H ₈₂ O ₆ - H] ⁻		x	x	
735,59330	[C ₄₈ H ₇₉ O ₅ - H] ⁻		x		
737,17232	[C ₃₆ H ₃₄ O ₁₇ - H] ⁻				x
737,49979	[C ₄₅ H ₇₀ O ₈ - H] ⁻	x	x	x	
739,42742	[C ₃₉ H ₆₄ O ₁₃ - H] ⁻				x
741,18837	[C ₃₂ H ₃₈ O ₂₀ - H] ⁻				x x
741,53109	[C ₄₅ H ₇₄ O ₈ - H] ⁻	x		x	
745,50488	[C ₄₇ H ₇₀ O ₇ - H] ⁻	x		x	
747,52053	[C ₄₇ H ₇₂ O ₇ - H] ⁻			x	
751,58821	[C ₄₈ H ₈₀ O ₆ - H] ⁻		x		
753,16724	[C ₃₆ H ₃₄ O ₁₈ - H] ⁻				x
753,60386	[C ₄₈ H ₈₂ O ₆ - H] ⁻	x	x		
755,42233	[C ₃₉ H ₆₄ O ₁₄ - H] ⁻				x
757,63516	[C ₄₈ H ₈₆ O ₆ - H] ⁻			x	
763,44267	[C ₄₅ H ₆₄ O ₁₀ - H] ⁻	x			
763,46380	[C ₄₂ H ₆₈ O ₁₂ - H] ⁻	x		x	
765,56748	[C ₄₆ H ₇₈ O ₇ - H] ⁻	x	x		
767,42233	[C ₄₀ H ₆₄ O ₁₄ - H] ⁻			x	x
769,59878	[C ₄₈ H ₈₂ O ₇ - H] ⁻		x		
771,61443	[C ₄₈ H ₈₄ O ₇ - H] ⁻		x		
777,42194	[C ₄₅ H ₆₂ O ₁₁ - H] ⁻	x			x

779,45872	[C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃ - H] ⁻	x		x		
781,56239	[C ₄₈ H ₇₈ O ₈ - H] ⁻			x		
781,93798	[C ₄₁ H ₆₆ O ₁₄ - H] ⁻					x
783,41724	[C ₄₀ H ₆₄ O ₁₅ - H] ⁻	x				x
785,35426	[C ₃₉ H ₅₈ O ₁₄ + Cl] ⁻				x	
793,41685	[C ₄₅ H ₆₂ O ₁₂ - H] ⁻					x
797,46928	[C ₄₂ H ₇₀ O ₁₄ - H] ⁻			x		
801,42194	[C ₄₇ H ₆₂ O ₁₁ - H] ⁻			x	x	x
803,41646	[C ₅₀ H ₆₀ O ₉ - H] ⁻	x				x
811,44855	[C ₄₂ H ₆₈ O ₁₅ - H] ⁻					x
815,07960	[C ₃₁ H ₂₈ O ₂₆ - H] ⁻	x				
817,41492	[C ₄₁ H ₆₆ O ₁₉ + Cl] ⁻	x				x
817,41685	[C ₄₇ H ₆₂ O ₁₂ - H] ⁻	x				x
819,41137	[C ₅₀ H ₆₀ O ₁₀ - H] ⁻					x
819,53227	[C ₃₉ H ₈₀ O ₁₇ - H] ⁻				x	
827,36482	[C ₄₇ H ₅₆ O ₁₃ - H] ⁻				x	
827,44346	[C ₄₂ H ₆₈ O ₁₆ - H] ⁻					x
833,40988	[C ₄₁ H ₆₆ O ₁₅ + Cl] ⁻	x				
833,41177	[C ₄₇ H ₆₂ O ₁₃ - H] ⁻	x				x
835,40629	[C ₅₀ H ₆₀ O ₁₁ - H] ⁻					x
843,43837	[C ₄₂ H ₆₈ O ₁₇ - H] ⁻	x				x
847,48844	[C ₃₉ H ₇₆ O ₁₉ - H] ⁻				x	
849,20362	[C ₄₅ H ₃₈ O ₁₇ - H] ⁻					x
857,45402	[C ₄₃ H ₇₀ O ₁₇ - H] ⁻	x				x
865,19854	[C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈ - H] ⁻	x				x
869,55731	[C ₅₄ H ₇₈ O ₆ - H] ⁻	x	x			

871,46967	$[C_{44}H_{72}O_{17}^- H]^-$		x	
885,66776	$[C_{58}H_{94}O_6^- H]^-$	x		
887,46459	$[C_{44}H_{72}O_{18}^- H]^-$		x	
899,46459	$[C_{45}H_{72}O_{18}^- H]^-$		x	x
901,17741	$[C_{51}H_{34}O_{16}^- H]^-$			x
905,63595	$[C_{52}H_{90}O_{12}^- H]^-$	x	x	
913,72906	$[C_{60}H_{98}O_6^- H]^-$			
915,45950	$[C_{45}H_{72}O_{19}^- H]^-$			x
917,47515	$[C_{45}H_{74}O_{10}^- H]^-$			x
927,49589	$[C_{47}H_{76}O_{18}^- H]^-$	x	x	
933,47007	$[C_{45}H_{74}O_2^- H]^-$			x
933,66725	$[C_{57}H_{94}O_{12}^- H]^-$		x	
939,47476	$[C_{51}H_{72}O_{16}^- H]^-$	X	x	
969,44894	$[C_{51}H_{70}O_{18}^- H]^-$		x	
973,50137	$[C_{48}H_{78}O_{20}^- H]^-$			x
975,45363	$[C_{57}H_{68}O_{14}^- H]^-$		x	
985,44385	$[C_{51}H_{70}O_{19}^- H]^-$		x	
991,44855	$[C_{57}H_{68}O_{15}^- H]^-$		x	x

Table 2S. Estimated molecular formulas for the measured m/z values from ESI(-) FT-ICR mass spectra of the bark *E. calycina* extracts and their fractions.

Experimental m/z	Molecular formula	Relative Intensity (%)				
		EEc	HFc	DFc	EAfc	AFc
161,04536	$[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{H}]^-$			x		
187,09759	$[\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4-\text{H}]^-$			x		
197,04552	$[\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{H}]^-$			x		
215,03273	$[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_6+\text{Cl}]^-$	x				x
217,10814	$[\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_5-\text{H}]^-$			x		
225,11326	$[\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_4-\text{H}]^-$			x		
227,12887	$[\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4-\text{H}]^-$			x		
233,04544	$[\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{H}]^-$			x		
239,09251	$[\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5-\text{H}]^-$			x	x	
243,12381	$[\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_5-\text{H}]^-$			x		
245,13945	$[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_5-\text{H}]^-$			x		
249,09793	$[\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_7-\text{H}]^-$			x		
251,05614	$[\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_6-\text{H}]^-$			x		
255,23290	$[\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2-\text{H}]^-$	x	x	x	x	
261,13438	$[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_6-\text{H}]^-$			x		
267,07215	$[\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_9-\text{H}]^-$			x		
269,24872	$[\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2-\text{H}]^-$		x			
271,15505	$[\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_5-\text{H}]^-$			x		
277,21740	$[\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2-\text{H}]^-$		x			
279,23292	$[\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2-\text{H}]^-$	x	x	x		
281,24869	$[\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2-\text{H}]^-$		x			
283,26436	$[\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2-\text{H}]^-$		x	x		
289,07172	$[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6-\text{H}]^-$	x	x	x	x	x

293,21227	$[\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3-\text{H}]^-$		x	x		
295,22799	$[\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_3-\text{H}]^-$		x			
305,06664	$[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7-\text{H}]^-$	x				x
311,22293	$[\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_4-\text{H}]^-$		x			
313,16465	$[\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_6-\text{H}]^-$		x			
315,07233	$[\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_9-\text{H}]^-$		x			
323,25932	$[\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_3-\text{H}]^-$		x			
325,04837	$[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6+\text{Cl}]^-$	x	x			x
327,04545	$[\text{C}_{24}\text{H}_8\text{O}_2-\text{H}]^-$	x				
327,21785	$[\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_5-\text{H}]^-$		x	x		
329,23356	$[\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_5-\text{H}]^-$		x	x	x	
331,20476	$[\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_3+\text{Cl}]^-$		x			
341,10891	$[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}-\text{H}]^-$	x	x			x
343,06704	$[\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_{10}-\text{H}]^-$	x			x	
343,06704	$[\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_{16}-\text{H}]^-$	x				
343,08256	$[\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7-\text{H}]^-$		x			
367,35839	$[\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2-\text{H}]^-$		x			
377,08554	$[\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_{11}+\text{Cl}]^-$	x	x			x
379,08264	$[\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_7-\text{H}]^-$	x	x			x
379,16101	$[\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_{10}-\text{H}]^-$			x	x	
387,16611	$[\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_9-\text{H}]^-$			x		
397,15045	$[\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_9-\text{H}]^-$			x		
407,18444	$[\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_5-\text{H}]^-$					x
409,23631	$[\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{O}_6+\text{Cl}]^-$		x			
413,14537	$[\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_{10}-\text{H}]^-$			x		x
415,12459	$[\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_{11}-\text{H}]^-$	x		x	x	x

423,09330	$[\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_{11} - \text{H}]^-$				x	
423,12972	$[\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_{10} - \text{H}]^-$			x		
427,16100	$[\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_{10} - \text{H}]^-$				x	
427,22829	$[\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_3 - \text{H}]^-$					x
433,04123	$[\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$	x			x	x
433,23635	$[\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{O}_6 + \text{Cl}]^-$		x	x		
441,08276	$[\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_{10} - \text{H}]^-$				x	
447,05694	$[\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$			x		
447,09325	$[\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11} - \text{H}]^-$	x	x		x	x
451,12449	$[\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{11} - \text{H}]^-$	x			x	x
453,10383	$[\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$	x			x	x
455,35334	$[\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3 - \text{H}]^-$		x			
461,07264	$[\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$				x	x
461,13038	$[\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$					x
463,08817	$[\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$	x	x		x	
467,08305	$[\text{C}_2\text{O}\text{H}_{20}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$	x			x	x
471,34835	$[\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4 - \text{H}]^-$		x			
475,21854	$[\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_{11} - \text{H}]^-$				x	x
481,09880	$[\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$				x	
481,13512	$[\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$	x				x
485,06698	$[\text{C}_{30}\text{H}_{14}\text{O}_7 - \text{H}]^-$	x				
485,28295	$[\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{O}_3 + \text{Cl}]^-$		x			
487,34330	$[\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5 - \text{H}]^-$		x	x		
495,11445	$[\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$				x	x
497,13005	$[\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$	x			x	x
497,16654	$[\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$				x	

499,18215	$[\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$			x	
501,32224	$[\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_6 - \text{H}]^-$			x	
503,16219	$[\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16} - \text{H}]^-$		x		
505,30191	$[\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{O}_{10} - \text{H}]^-$			x	
509,13020	$[\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$			x	
511,10927	$[\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_{14} - \text{H}]^-$	x		x	x
511,47366	$[\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_4 - \text{H}]^-$		x		
515,30152	$[\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_7 - \text{H}]^-$			x	x
515,41043	$[\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{O}_4 - \text{H}]^-$	x			
517,31712	$[\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_7 - \text{H}]^-$			x	
529,30192	$[\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_{10} - \text{H}]^-$			x	
531,29642	$[\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_8 - \text{H}]^-$			x	x
533,17227	$[\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_{17} - \text{H}]^-$	x			x
533,31208	$[\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_8 - \text{H}]^-$			x	x
535,47361	$[\text{C}_{34}\text{H}_{64}\text{O}_4 - \text{H}]^-$		x		
539,13839	$[\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_{16} + \text{Cl}]^-$	x			x
539,17720	$[\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$			x	x
541,13544	$[\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$	x			x
543,28118	$[\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_{11} - \text{H}]^-$			x	
545,29690	$[\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_{11} - \text{H}]^-$			x	
545,31213	$[\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_8 - \text{H}]^-$				x
545,31240	$[\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_8 - \text{H}]^-$		x		
549,30710	$[\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_9 - \text{H}]^-$				x
551,21395	$[\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$		x	x	x
557,17975	$[\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{O}_9 - \text{H}]^-$				x
559,27607	$[\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$			x	

561,14026	$[\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{11} - \text{H}]^-$	x	x		x
569,31255	$[\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{O}_8 - \text{H}]^-$		x		
577,13509	$[\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$	x	x	x	x
577,28685	$[\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$			x	
579,15061	$[\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$	x		x	
587,19004	$[\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{O}_{12} + \text{Cl}]^-$	x			
587,19076	$[\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{O}_{10} - \text{H}]^-$		x		
589,18706	$[\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_8 - \text{H}]^-$	x			x
593,18785	$[\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{14} - \text{H}]^-$			x	
595,28946	$[\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_9 - \text{H}]^-$		x		
601,39039	$[\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{O}_5 - \text{H}]^-$		x		
607,23980	$[\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$			x	
609,14602	$[\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16} - \text{H}]^-$	x	x		
613,11175	$[\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{O}_{12} + \text{Cl}]^-$	x			x
613,11189	$[\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_{23} - \text{H}]^-$			x	
613,11251	$[\text{C}_{36}\text{H}_{22}\text{O}_{10} - \text{H}]^-$		x		
615,10892	$[\text{C}_{39}\text{H}_{20}\text{O}_8 - \text{H}]^-$	x			
617,38468	$[\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{O}_6 - \text{H}]^-$	x	x	x	
631,18866	$[\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_{17} - \text{H}]^-$		x		x
633,38030	$[\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{O}_7 - \text{H}]^-$		x	x	
649,18075	$[\text{C}_{48}\text{H}_{26}\text{O}_3 - \text{H}]^-$			x	
653,30147	$[\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_{16} - \text{H}]^-$			x	
653,36139	$[\text{C}_{36}\text{H}_{55}\text{O}_6 + \text{Cl}]^-$	x	x		
657,45855	$[\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{O}_{10} - \text{H}]^-$			x	
659,05673	$[\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{O}_6 + \text{Cl}]^-$	x			
661,35947	$[\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}_{11} - \text{H}]^-$			x	x
669,16173	$[\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$	x			

671,46637	$[\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{O}_5 - \text{H}]^-$		x			
677,35415	$[\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$	x			x	x
679,36982	$[\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$	x	x	x	x	x
685,44567	$[\text{C}_{44}\text{H}_{62}\text{O}_6 - \text{H}]^-$		x			
693,34917	$[\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$				x	
695,36472	$[\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$	x	x			x
701,36714	$[\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{O}_{11} + \text{Cl}]^-$	x				x
701,36816	$[\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{O}_9 - \text{H}]^-$		x			
715,34649	$[\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{O}_{12} + \text{Cl}]^-$	x				x
717,36232	$[\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{O}_{12} + \text{Cl}]^-$	x				x
717,36330	$[\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{O}_{10} - \text{H}]^-$		x			
731,34200	$[\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{O}_{13} + \text{Cl}]^-$					x
779,37112	$[\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{18} - \text{H}]^-$				x	
797,31982	$[\text{C}_{45}\text{H}_{50}\text{O}_{13} - \text{H}]^-$					x
797,39658	$[\text{C}_{40}\text{H}_{62}\text{O}_{16} - \text{H}]^-$				x	
821,38155	$[\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{O}_{19} - \text{H}]^-$				x	
823,39105	$[\text{C}_{45}\text{H}_{60}\text{O}_{14} - \text{H}]^-$				x	
841,42305	$[\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{17} - \text{H}]^-$				x	
849,20471	$[\text{C}_{45}\text{H}_{38}\text{O}_{17} - \text{H}]^-$		x			
865,19867	$[\text{C}_{45}\text{H}_{38}\text{O}_{18} - \text{H}]^-$	x	x		x	x