

MARIANA BORDIN CAMPIDELI

Avaliação do perfil químico de folhas de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) por CLAE, RMN e IES-EM com vistas ao desenvolvimento de cosméticos e alimentos funcionais.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanderlan da Silva Bolzani
Coorientador: Dr. Paulo José Coelho Benevides

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

C196a Campideli, Mariana Bordin
Avaliação do perfil químico de folhas de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) por CLAE, RMN e IES-EM com vistas ao desenvolvimento de cosméticos e alimentos funcionais / Mariana Bordin Campideli. – Araraquara : [s.n.], 2017
126 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani
Coorientador: Paulo José Coelho Benevides

1. Eugenia (Planta). 2. Antioxidantes. 3. Flavonóides.
4. Ressonância magnética nuclear. 5. Espectrometria de massa.
I. Título.

MARIANA BORDIN CAMPIDELI

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 02 de junho de 2017.

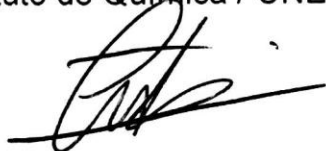
BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a Vanderlan da Silva Bolzani (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Dr^a Juliana Rodrigues
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof.Dr. Cristiano Soleo de Funari
Faculdade de Ciências Agrônômicas / UNESP / Botucatu - SP

DADOS CURRICULARES

Nome: Mariana Bordin Campideli

Formação acadêmica

2015 – Atual

Mestrado em Química

Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, Brasil.

Título: Avaliação do perfil químico de folhas de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) por CLAE, RMN e IES-EM com vistas ao desenvolvimento de cosméticos e alimentos funcionais.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanderlan da Silva Bolzani

Coorientador: Dr. Paulo José Coelho Benevides

Bolsista CAPES

2010 – 2014

Bacharelado em Química

Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil

Título: Difusão de água em hidrogéis

Orientador: Prof. Dr. Caio Marcio Paranhos da Silva

Participação de eventos científicos

1st UNESP NMR Symposium Recent Advances in NMR Spectroscopy: A Powerful Tool for Fundamental and Applied Research, 2014, Araraquara - SP.

Outros

I Workshop de Cosméticos, pela ATOM Química Jr. - UFSCar (17, 18, 19 e 20 de março de 2014).

Seminário Técnico de Cromatografia: HPLC - GC - Preparação de amostra – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP Araraquara (25 de Novembro de 2015).

1^o Workshop de Inovação e Empreendedorismo do Instituto de Química - Unesp (29 e 30 de março de 2016).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Roserval e Mirna pelo apoio financeiro e emocional, me dando força nos momentos mais difíceis e comemorando comigo cada vitória que venho conquistando. Obrigada por me ensinarem valores como caráter, respeito e honestidade, essenciais para lidar com as adversidades da vida e conseguir concretizar este trabalho. Obrigada por me ensinarem a dar e receber amor.

A minha irmã Marina por sempre estar presente nos momentos que eu mais precisei desabafar ou de receber um conselho. Também pelo carinho, preocupação e amor. Obrigada por celebrar minhas vitórias como se fossem as suas e por todo incentivo recebido nestes anos de ensino superior.

Ao meu namorado Victor pelo cuidado e presença nos momentos que eu mais precisei de apoio durante este mestrado. Pelo companheirismo, carinho, incentivo e amor. Obrigada pelo aconchego, abraços e palavras que me acalmavam quando achava que ia desabar, pela paciência e parceria nos estudos que me ajudaram na realização deste trabalho.

A minha vó, Waldyria, pelas orações, comidas gostosas, torcida e conversas prazerosas na sua casa. Obrigada por sempre apoiar meus estudos e me dar forças para continuar nesta jornada.

Aos meus sogros Angela e Eugenio e aos meus cunhados Rafaela e Matheus pelos conselhos e torcida. Obrigada pelas noites de risadas e conversas sérias, pelas histórias de vida compartilhadas e pela cumplicidade ao longo desses anos.

A professora Vanderlan pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa. Obrigada pela orientação, confiança, incentivo, por acreditar na execução deste trabalho e pelos conselhos que levarei para a vida.

Aos alunos do grupo de pesquisa, "Bolzani Team" pelo convívio diário, ajuda, conselhos e o aprendizado e convivência em grupo. Trabalhar com vocês foi uma experiência incrivelmente rica.

A Karina pela amizade, pela ajuda e preocupação nos momentos que mais precisei, dos conselhos, puxões de orelha, sugestões, conversas e principalmente pela paciência e respeito que sempre me tratou e por acreditar no meu trabalho.

A Keylla pela amizade, conversas, sugestões, caronas e ajuda com a elucidação estrutural das moléculas presentes neste trabalho. Obrigada por sempre estar por perto nos momentos que eu mais precisei, me dando conselhos e contando suas experiências no mundo acadêmico. Tenho certeza que isso contribuiu e muito para meu fortalecimento e para acalmar minhas neuroses.

Ao João Lucas, pela amizade, companheirismo, conselhos, respeito, risadas, churrascos e longas conversas. Obrigada por sempre estar por perto quando eu mais precisei, você foi um irmão que a vida me deu e não há nada que se compare a isso.

A Alana pela amizade, ajuda, e por me manter calma no meio das tempestades. Obrigada pelo apoio, incentivo, força e pelas músicas que animavam até os dias mais tensos de trabalho no laboratório.

Aos meus amigos, que me ajudaram tanto com conselhos como na execução de experimentos e tratamento dos dados experimentais desta dissertação. Obrigada pelas conversas, desabafos, risadas, churrascos, aniversários, festas juninas e incentivo que obtive nesta jornada, sem vocês o fardo seria mais pesado. Obrigada pela amizade.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química sempre dispostos em auxiliar e esclarecer dúvidas.

A Vilma pelo excelente trabalho, conversas, torcida e por comemorar conosco nossas vitórias.

A Dr^a. Juliana Rodrigues, Dr^a. Bianca Ferreira da Silva, Mestre João Luiz Bronzel Junior e ao Dr. Nivaldo Boralle, pelos conselhos, conversas, auxílios no laboratório e principalmente paciência. Obrigada por estarem sempre à disposição para o esclarecimento de dúvidas e pela dedicação em nos ajudar a buscar sempre os melhores resultados em nossas análises e assim obter êxito nos objetivos traçados em nossos projetos.

Esses mais de dois anos no grupo NuBBE foram de grande aprendizado e crescimento tanto no aspecto pessoal quanto profissional, consequência das experiências vividas.

À CAPES pelo apoio financeiro e bolsa concedida no mestrado.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar

Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança...”

(Mais Uma Vez – Renato Russo)



(Um Sábado Qualquer – Carlos Ruas)

RESUMO

O gênero *Eugenia* pertence à família Myrtaceae e compreende cerca de 400 espécies de ocorrência em todo o território nacional. Algumas espécies são muito conhecidas pelas atividades antifúngica, antiviral e bactericida. Outras são descritas pelas propriedades apresentadas na redução dos níveis de triglicerídeos e colesterol. As espécies de *Eugenia* apresentam uma composição química diversificada, como relatos na literatura da presença de terpenos, derivados flavonoidicos (quercetina, metoxiquercetina, miricetina) e outros fenólicos como chalconas, taninos e flavonas. Mesmo tratando-se de espécies com frutos comestíveis, a literatura é bastante escassa quanto à composição química das folhas de *E. handroana* e *E. pyriformis*, e todo trabalho relatado até o presente trata-se especialmente dos óleos essenciais. Desta forma, este projeto tem como objetivo o estudo bioquímico dos extratos das folhas de três espécies do gênero: *E. pyriformis* Cambess, *E. uniflora* L. e *E. handroana* D. Legrand, visando identificar substâncias presentes nas frações bioativas nos ensaios antioxidante e de inibição da glicação com vistas ao desenvolvimento de cosméticos e alimentos funcionais. Extratos hidroetanólicos e suas frações foram analisados por CLAE-DAD e avaliados por ensaios biológicos (ensaio antioxidante com radical DPPH^{*}, ação redutora sobre radicais peroxila e antiglicação), sendo a fração acetato de etila a mais ativa nas três espécies estudadas nos ensaios descritos. A fração acetato de etila de *E. pyriformis* e *E. handroana* foi submetida a cromatografia em coluna e as frações resultantes a ensaios biológicos. A fração C foi selecionada por apresentar resultados significativos nos ensaios antioxidantes e promissores no ensaio antiglicação. Esta fração foi submetida ao fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala preparativa, levando a identificação de seis bandas na fração C de *E. pyriformis* e quatro bandas na fração C de *E. handroana*. A identificação estrutural das substâncias presentes nestas bandas foi feita por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (IES-EM) por infusão direta, como também pela utilização de dados da literatura. Foram identificados os seguintes compostos: miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo, quercetina-3-O- β -D-glicosídeo, quercetina-3-O- β -D-galactosídeo, quercetina-3-O- β -D-xilosídeo, quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo, miricetina-3-O-(2"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo, miricetina-3-O-(4"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo, quercetina-3-O-(2"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo e quercetina, que foram submetidos aos ensaios biológicos propostos nesse projeto. A fração acetato de etila de *E. uniflora* foi explorada por meio da técnica de *desreplicação*, devido ao seu perfil cromatográfico bastante semelhante ao das outras espécies em estudo. Assim a identificação tentativa das substâncias foi realizada através das técnicas de IES-EM, CLAE-DAD e dados de EM publicados na literatura, sendo provavelmente as mesmas substâncias observadas nas outras espécies em estudo.

Palavras-chave: *Eugenia*; antioxidantes; antiglicação; flavonoides; CLAE; RMN; IES-EM; desreplicação.

ABSTRACT

The genus *Eugenia* belongs to the family Myrtaceae and comprises about 400 species of occurrence throughout the national territory. Some species are well known for antifungal, antiviral and bactericidal activities. Others are described by their properties in reducing triglyceride and cholesterol levels. The species of *Eugenia* have a diverse chemical composition, such as reports in the literature of the presence of terpenes, flavonoid derivatives (quercetin, methoxyquercetin, myricetin) and other phenolics such as chalcones, tannins and flavones. Even though it is species with edible fruits, the literature is rather scarce as to the chemical composition of the leaves of *E. handroana* and *E. pyriformis*, and all the literature reported to date is especially about the essential oils. In this way, this project aims at the bio-guided study with leaf extracts of three species of the genus: *E. pyriformis* Cambess, *E. uniflora* L. and *E. handroana* D. Legrand, aiming to identify substances present in the bioactive fractions, in the antioxidant and inhibition of glycation assays with a view to the development of cosmetics and functional foods. Hydroethanolic extracts and their respective fractions were analyzed by HPLC-DAD and accompanied by biological assays (antioxidant assay with DPPH[•] radical, reducing action on peroxy radicals and antiglycation), with ethyl acetate fraction being the most active in the three species studied in the described assays. The ethyl acetate fraction of *E. pyriformis* and *E. handroana* was fractionated by column chromatography and the resulting fractions were submitted to biological assays. The fraction C was selected because for presented significant results in the antioxidant and promising results in the antiglycation assay. This fraction was then submitted to fractionation by preparative high performance liquid chromatography (HPLC), leading to the identification of six bands in the C fraction of *E. pyriformis* and four bands in the C fraction of *E. handroana*. The structural identification of the substances present in these bands were made through nuclear magnetic resonance (NMR) and electrospray *ionisation* mass spectrometry (ESI-MS) by direct infusion, as well as the use of data from the literature. The following compounds were identified: myricetin-3-O- α -L-rhamnoside, quercetin-3-O- β -D-glucoside, quercetin-3-O- β -D-galactoside, quercetin-3-O- β -D-xyloside, quercetin-3-O- α -L-rhamnoside, myricetin-3-O-(2"-O-galloyl)- α -L-rhamnoside, myricetin-3-O-(4"-O-galloyl)- α -L-rhamnoside, quercetin-3-O-(2"-O-galloyl)- α -L-rhamnoside and quercetin, which were submitted to the biological tests proposed in this project. The ethyl acetate fraction of *E. uniflora* was explored through the technique of *dereplication* because it presented a very similar chromatographic profile with that of the other species under study, so the tentative identification of the substances was performed through the ESI-MS, HPLC-DAD and MS data published in the literature, being probably the same substances observed in the other species under study.

Keywords: *Eugenia*; antioxidants; antiglycation; flavonoids; HPLC; NMR; ESI-MS; dereplication.

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 Família, gênero e espécies, objeto de estudo desta pesquisa | 11 |
| 1.2 Compostos fenólicos..... | 14 |
| 1.3 Antioxidantes | 17 |
| 1.4 Glicação ou Reação de Maillard..... | 18 |
| 1.5 Alimentos funcionais..... | 20 |
| 1.6 Cosméticos | 22 |
| 2 OBJETIVOS | 25 |
| 2.1 Objetivo Geral | 25 |
| 2.2 Objetivos específicos | 25 |
| 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 26 |
| 3.1 Material Vegetal..... | 26 |
| 3.2 Obtenção dos extratos brutos de espécies de <i>Eugenia</i> | 26 |
| 3.3 Fracionamento dos extratos brutos de espécies de <i>Eugenia</i> | 26 |
| 3.4 Análise cromatográfica dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas de espécies de <i>Eugenia</i> | 27 |
| 3.4.1 Fracionamento das frações acetato de etila de <i>E. pyriformis</i> e <i>E. handroana</i> por cromatografia em coluna C ₁₈ (CC). | 27 |
| 3.4.2 Análise dos extratos brutos de folhas e frações de espécies de <i>Eugenia</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector com arranjo de diodos (CLAE-DAD) | 28 |
| 3.4.3 Refracionamento da fração C de <i>Eugenia pyriformis</i> e <i>Eugenia handroana</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector com arranjo de diodos (CLAE – DAD) em escala preparativa..... | 29 |
| 3.5 Metodologias dos ensaios biológicos..... | 29 |
| 3.5.1 Ensaio de avaliação do potencial de redução do radical DPPH [•] das espécies em estudo (teste para avaliação preliminar do potencial antioxidante) | 30 |
| 3.5.2 Ação redutora sobre radicais peroxila | 31 |
| 3.5.3 Atividade de inibição da glicação | 32 |
| 3.6 Análise dos extratos brutos e frações acetato por RMN de ¹ H..... | 33 |
| 3.7 Análises das substâncias isoladas de <i>Eugenia pyriformis</i> e <i>Eugenia handroana</i> por RMN de ¹ H | 33 |
| 3.8 Identificação dos constituintes químicos das frações C de <i>Eugenia pyriformis</i> e <i>Eugenia handroana</i> e fração acetato de etila de <i>Eugenia uniflora</i> por Espectrometria de Massas com ionização por <i>electrospray</i> (IES-EM) | 33 |

| | |
|---|------------|
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 4.1 Obtenção dos extratos brutos e frações de espécies de <i>Eugenia</i> | 35 |
| 4.2 Avaliação da capacidade antioxidante e antiglicação | 37 |
| 4.2.1 Ensaio da capacidade redutora do radical DPPH [•] em extratos e frações de espécies de <i>Eugenia</i> | 37 |
| 4.2.2 Ação redutora sobre radicais peroxila em extratos e frações de espécies de <i>Eugenia</i> | 40 |
| 4.2.3 Ensaio de atividade antiglicação em extratos e frações de espécies de <i>Eugenia</i> | 41 |
| 4.3 Perfil químico dos extratos brutos e frações acetato de etila de espécies de <i>Eugenia</i> por RMN de ¹H | 43 |
| 4.4 Perfil cromatográfico dos extratos brutos e das frações das folhas de espécies de <i>Eugenia</i> | 45 |
| 4.5 Perfil cromatográfico do fracionamento da fração acetato de etila de <i>E. pyriformis</i> e <i>E. handroana</i> | 48 |
| 4.6 Otimização das condições de análise da fração C de <i>E. pyriformis</i> e <i>E. handroana</i> | 50 |
| 4.7 Identificação dos compostos presentes nas frações C de <i>E. pyriformis</i> e <i>E. handroana</i> por RMN e IES-EM | 52 |
| 4.7.1 Identificação da substância I..... | 53 |
| 4.7.2 Identificação das substâncias II e III..... | 60 |
| 4.7.3 Identificação da substância IV..... | 68 |
| 4.7.4 Identificação da substância V..... | 74 |
| 4.7.5 Identificação das substâncias VI e VII..... | 81 |
| 4.7.6 Identificação da substância VIII..... | 88 |
| 4.7.7 Identificação da substância IX..... | 92 |
| 4.8 Ensaio biológicos das substâncias isoladas | 96 |
| 4.8.1 Ensaio da capacidade redutora do radical DPPH [•] | 96 |
| 4.8.2 Ação redutora sobre os radicais peroxila | 97 |
| 4.8.3 Ensaio de atividade antiglicação | 98 |
| 4.9 Estudo da fração acetato de etila de <i>Eugenia uniflora</i> por desreplicação utilizando IES-EM e CLAE-DAD | 99 |
| 5 CONCLUSÃO | 108 |
| REFERÊNCIAS | 110 |
| ANEXO | 118 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família, gênero e espécies, objeto de estudo desta pesquisa

A família Myrtaceae compreende cerca de 140 gêneros e 4620 espécies de árvores e arbustos, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da Austrália, Ásia e América. É considerada uma das maiores famílias de plantas no Brasil e pode ser encontrada em diferentes biomas brasileiros como: Mata Atlântica, Floresta Amazônica, Caatinga e Cerrado. Esta família apresenta grande potencial econômico no setor alimentício, na ornamentação, no uso medicinal popular como anti-inflamatória, antioxidante e por reduzir o colesterol no sangue (MORAIS; CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014; LAGO et al., 2011). Além disso, na perfumaria os óleos essenciais vêm sendo utilizados como agentes antimicrobianos e antifúngicos em sabões e cremes, incluindo os dentais (MORAIS; CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014; LAGO et al., 2011). A família Myrtaceae é caracterizada pela biossíntese de terpenoides, taninos, flavonoides e esteroides como os principais constituintes químicos, sendo rara a presença de alcaloides (HAN et al., 2011; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

O gênero *Eugenia* compreende cerca de 400 espécies existentes em todo território nacional (OLIVEIRA; DIAS; CÂMARA, 2005). As folhas deste gênero exibem atividades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, analgésicas, antipiréticas, espasmolíticas, sendo usadas na medicina popular como chás, decocção e infusão dos frutos, cascas e folhas, no tratamento de infecções ocasionadas por vírus, fungos ou bactérias, doenças cardíacas, redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos e distúrbios gastrointestinais (RAMIREZ et al., 2012; QUEIROZ et al., 2015).

Os perfis químicos das espécies de *Eugenia* demonstraram uma composição química diversificada com a presença de flavonoides (quercetina, miricetina, canferol), taninos, óleos essenciais, chalconas e terpenos, sendo α -pineno, β -pineno, β -cariofileno, espatulenol e limoneno os componentes majoritários (OLIVEIRA et al., 2006; QUEIROZ et al., 2015).

A maioria das espécies do gênero estão localizadas na Mata Atlântica, da região sudeste do Brasil (*Eugenia* L., 2017), como mostra a Figura 1.

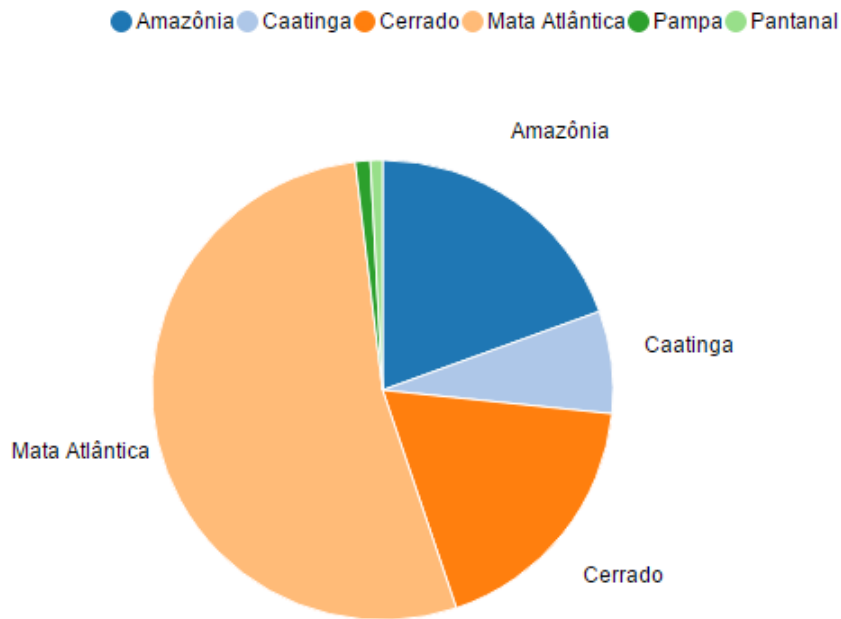


Figura 1 - Domínio fitogeográfico do gênero *Eugenia*.
Fonte: *Eugenia L.* (2017).

A espécie *Eugenia pyriformis* Cambess, conhecida popularmente como uvaia, (Figura 2) está distribuída em vários tipos de habitats, desde preservados até áreas abertas e ocupadas por pastagem. É uma espécie nativa da bacia dos rios Paraná e Uruguai. Sua presença é comum nas formações abertas das florestas semidecíduais de altitude, bem como no sub-bosque das matas abertas de pinheiros e nas matas do oeste do Estado de Santa Catarina, onde apresenta ampla e significativa distribuição. Seus frutos são comestíveis, bastante apreciados pelo homem e por animais. É recomendada para recomposição de áreas degradadas e para paisagismo (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006). Estudos relacionados à constituição química do óleo essencial das folhas de *E. pyriformis* revelam que α -cadinol, δ -cadineno, T-cadinol, biciclogermacreno e β -cariofileno estão entre as substâncias majoritárias (APEL et al., 2004). A presença de flavonoides nas folhas desta espécie inibe a enzima xantina-oxidase, sendo utilizada no tratamento de gota, doença causada pelo acúmulo de ácido úrico nas articulações (THEODULOZ et al., 1988). As folhas de *E. pyriformis* possuem também atividade fumigante, antimicrobiana e antifúngica e seu extrato etanólico 70% mostrou a presença de alcaloides, flavonoides, taninos e saponinas (ASSIS et al., 2011; CHAVASCO et al., 2014; SOUZA et al., 2014).

A espécie *Eugenia uniflora* L. (Figura 2) é um arbusto tropical e subtropical amplamente distribuída nos países da América, sendo popularmente chamada de

pitangueira ou cerejeira-brasileira. Esta espécie é extremamente utilizada na medicina popular, sendo a infusão de suas folhas empregadas como antirreumática e anti-hipertensiva, e seu extrato alcoólico utilizado em bronquites, tosses, febres, ansiedade, hipertensão arterial e verminoses. Como a *E. pyriformis*, suas folhas inibem a enzima xantina-oxidase, sendo utilizada no tratamento de gota. Estudos comprovam que as folhas desta espécie possuem propriedades anti-inflamatórias, antimicrobiana e antifúngica devido a presença de metabólitos secundários: terpenos, flavonoides (flavonóis como quercetina, miricetina, miricetina-3-O-ramnosídeo, quercetina-3-O-ramnosídeo, miricetina-3-O-(4"-O-galoil)- α -L-ramnosídeo, miricetina 3-O- β -D-glucosídeo, miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -L-ramnosídeo, canferol-3-O-ramnosídeo e flavan-3-óis como a galocatequina), taninos (eugeniflorinas D1 e D2, oenoteína B), leucoantocianidinas, triterpenos como o ácido betulínico, entre outros (QUEIROZ et al., 2015; RATTMANN et al., 2012; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987; SAMY et al., 2014; LEE et al., 1997; FORTES et al., 2015).

A pitangueira está na lista de plantas medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), divulgadas pelo Ministério da Saúde. A lista consiste em plantas medicinais que possuem potencial para gerar produtos de interesse, na qual pode ser consultada no site do SUS (PLANTAS ..., 2014). Já na cartilha de plantas medicinais e fitoterápicos do Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, divulgada em agosto de 2016, as folhas de *E. uniflora* são indicadas no tratamento da diarreia, através da infusão de suas folhas (CONSELHO ..., 2016).

A espécie *Eugenia handroana* D. Legrand (Figura 2) é uma árvore de ocorrência rara, podendo chegar a 15 metros de altura. Essa espécie cresce em formações vegetais arbóreas (cerrado, matas de galeria e floresta pluvial subtropical), onde é conhecida popularmente como guamirim ou fruto-de-macaco. Seus frutos são majoritariamente consumidos por animais (LOPES, 2016). Atualmente não existem relatos na literatura sobre a composição química de suas folhas, frutos e cascas do caule, somente a descrição morfológica da espécie.

Estudos realizados por Santos (2013), mostraram que o extrato metanólico de folhas desta espécie apresentou potencial formicida frente as formigas cortadeiras *Atta senex* em teste *in vitro* de ingestão.



Figura 2 - Fotos das espécies *E. pyriformis*, *E. uniflora* e *E. handroana* respectivamente. Fonte: (1) Cardoso (2012); (2) Bagatini (2015); (3) Verdi (2010).

1.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são derivados do metabolismo secundário das plantas, sendo fundamentais para o crescimento e reprodução por atuarem nos mecanismos de defesa contra agentes patogênicos, parasitas e predadores, além de proteger contra radiação ultravioleta. A produção de compostos fenólicos, tais como taninos, antocianinas e flavonoides está relacionada com a intensidade de radiação que a planta é submetida. Estes compostos absorvem e/ou dissipam a radiação ultravioleta, dificultando a danificação dos tecidos mais internos (BEZERRA et al., 2013; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Além da importância biológica para as plantas, compostos fenólicos apresentam diversas atividades biológicas benéficas ao homem como: anti-inflamatória, antibacteriana, antialérgica, cardioprotetora, vasodilatadora e antioxidante (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Estes compostos são categorizados em diversas classes, tais como, fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (SOUSA et al., 2007).

Os flavonoides são constituídos de um esqueleto geral formado por uma estrutura química fundamental do tipo $C_6C_3C_6$ onde os dois anéis benzênicos (A e B) estão ligados a um anel pirano (C) (Figura 3). De acordo com a biossíntese desta classe, o anel A é formado pela via do acetato e o anel B pela via do chiquimato (BEHLING et al., 2004; DEWICK, 2002).

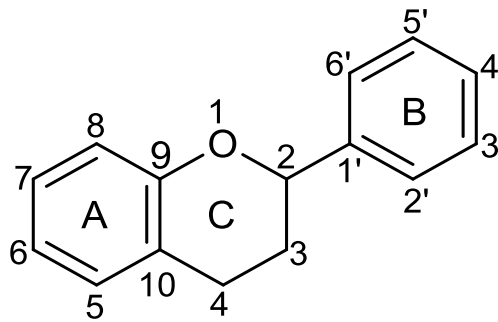


Figura 3 - Estrutura básica dos flavonoides.
 Fonte: Balasundram; Sundram; Samman (2006).

Os flavonoides podem ocorrer como agliconas ou derivados glicosídeos e são subdivididos em subclasses, entre elas: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, isoflavonas, antocianidinas, chalconas e auronas (ANGELO; JORGE, 2007). Estes compostos possuem atividade antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana, antienvhecimento, antialérgica, anticancerígena, antiviral, antiulcerogênica, vasodilatadora, entre outras (BEHLING et al., 2004; GATTUSO et al., 2007).

Os flavonoides absorvem na região do ultravioleta-visível devido ao cromóforo benzeno, cujas transições são do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, através da ressonância entre as ligações duplas dos anéis (PAVIA et al., 2010). Os espectros de flavonóis exibem duas bandas de maior absorção na região de 240-400 nm. Essas duas bandas são referidas comumente como banda I (normalmente de 330-360 nm) que está associada a absorção da conjugação entre o anel B e a carbonila do anel C (sistema cinamoil) e banda II (normalmente em 250-280 nm) que está associada a absorção da conjugação entre o anel A e a carbonila do anel C (sistema benzoil) (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; MARKHAN, K. R., 1982). As bandas de absorção características para flavonoides são apresentadas na Tabela 1, e a Figura 4 mostra o espectro de absorção do flavonol miricetina-3-O-ramnosídeo, substância da classe dos flavonoides.

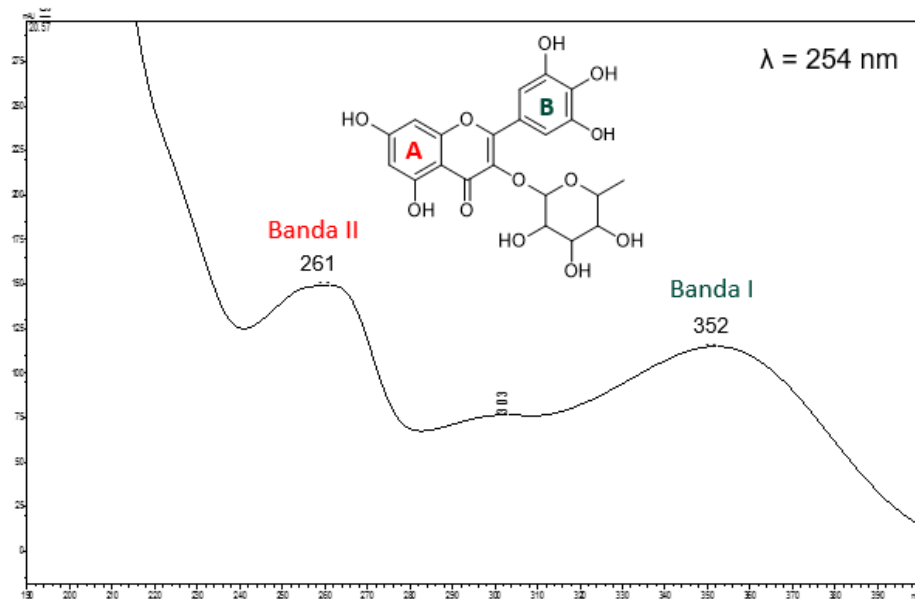


Figura 4 - Representação das bandas de absorção do anel A e B da molécula miricetrina. Fonte: Autora (2017).

Tabela 1 - Bandas de absorção no UV características para flavonoides.

| Banda II (nm) | Banda I (nm) | Tipo de flavonóide |
|---------------|--------------|-------------------------------|
| 250-280 | 310-350 | Flavona |
| 250-280 | 330-360 | Flavonóis (3-OH substituído) |
| 250-280 | 350-385 | Flavonóis (3-OH livre) |
| 245-275 | 310-330 | Isoflavonas |
| 275-295 | 300-330 | Flavanonas e dihidroflavonóis |
| 230-270 | 340-390 | Chalconas |
| 230-270 | 380-430 | Auronas |
| 270-280 | 465-560 | Antocianidinas e antocianinas |

Fonte: Markhan, K. R. (1982).

1.3 Antioxidantes

Os antioxidantes são definidos como um grupo de substâncias que, em concentrações baixas comparadas ao substrato oxidável, retardam ou previnem as reações de oxidação deste substrato. Um bom antioxidante é aquele que apresenta substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical livre e a habilidade de estabilizar o radical formado em sua estrutura, através da deslocalização do elétron desemparelhado. Exemplos de tais características estruturais na natureza são os flavonoides, cuja estabilização ocorre através da ressonância e por ligação hidrogênio, tornando o radical formado pela abstração do hidrogênio estável, além disso, os flavonoides possuem a capacidade de quelar metais de transição envolvidos no processo oxidativo. Estes radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, pois são neutralizados por reação com outro radical, originando produtos estáveis (COTINGUIBA et al., 2013; SOUSA et al., 2007; SUCUPIRA et al., 2012; BARREIROS; DAVID, 2006).

Os antioxidantes são responsáveis pela defesa do organismo contra a ação deletéria dos radicais livres, espécies bastante reativas devido à sua instabilidade ocasionada pelo elétron desemparelhado, pois são capazes de estabilizá-los ou desativá-los antes que iniciem o ataque aos alvos biológicos nas células, ajudando na prevenção de doenças crônicas como o câncer, doenças cardíacas, derrames, catarata, doença de Alzheimer, envelhecimento da pele, entre outros (SOUSA et al., 2007; SUCUPIRA et al., 2012; COTINGUIBA et al., 2013; OS ANTIOXIDANTES, 2009). A formação dos radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas e pela exposição a fatores exógenos como medicamentos, dieta, cigarro, poluição, entre outros (COTINGUIBA et al., 2013; SOUSA et al., 2007). Os antioxidantes são classificados de acordo com sua atividade (enzimática e não enzimática) ou de acordo com o mecanismo de ação (primário e secundário). Antioxidantes com atividade enzimática são substâncias que possuem alta capacidade de bloquear o início da oxidação, como a catalase (Cat) e a glutathione peroxidase (GPx). Já os que apresentam atividade não enzimática interagem com os radicais sendo consumidos durante a reação, como os carotenoides, flavonoides, tripeptídeo glutathione (GSH). Os antioxidantes primários atuam interrompendo a cadeia da reação, por meio da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, transformando-os em produtos estáveis, enquanto que os antioxidantes secundários atuam desacelerando as etapas que dão

início a autooxidação, que ocorrem por meio de mecanismos como complexação de metais, decomposição de hidroperóxidos para formar um não radical, sequestro de oxigênio, entre outros (COTINGUIBA et al., 2013; DEL RÉ; JORGE, 2012).

Moléculas de baixo peso molecular podem agir como antioxidantes através da neutralização dos radicais livres e/ou participando indiretamente de sistemas enzimáticos com esta função. Alguns exemplos são: vitamina C, glutathiona, ácido úrico, vitamina E, selênio e carotenoides (COTINGUIBA et al., 2013).

Os compostos fenólicos agem como antioxidantes combatendo os radicais livres por meio da doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila da sua estrutura aromática estável, devido à ressonância do anel aromático presente nestas substâncias; quelando metais de transição; cessando a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; alterando o potencial redox do meio e reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais livres (SOUSA et al., 2007; SUCUPIRA et al., 2012).

1.4 Glicação ou Reação de Maillard

A glicação avançada é um processo não enzimático que se inicia com uma reação de adição nucleofílica de açúcares redutores, como a glicose, com os grupos amínicos livres de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, dando origem a bases de Schiff (iminas), as quais sofrem rearranjos, originando os produtos de Amadori (cetosaminas), que por sua vez podem originar os produtos finais da glicação avançada, conhecidos como “Advanced Glycated End-Products” (AGEs) original da língua inglesa, como mostra a Figura 5 (ROCHA et al., 2006; BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).

As AGEs podem ocorrer também por via do “estresse carbonílico”. Nestes casos a oxidação de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos, como o metilglioxal e glioxal, que interagem com grupos amínicos, sulfidrilas e guanidinas de proteínas e aminoácidos formando as AGEs, que são estáveis e irreversíveis. Estes precursores de AGEs são mais reativos que a glicose e são os principais intermediários da formação dos produtos de glicação avançada que são danosos ao tecidos e organismos (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008; PENG et al., 2011).

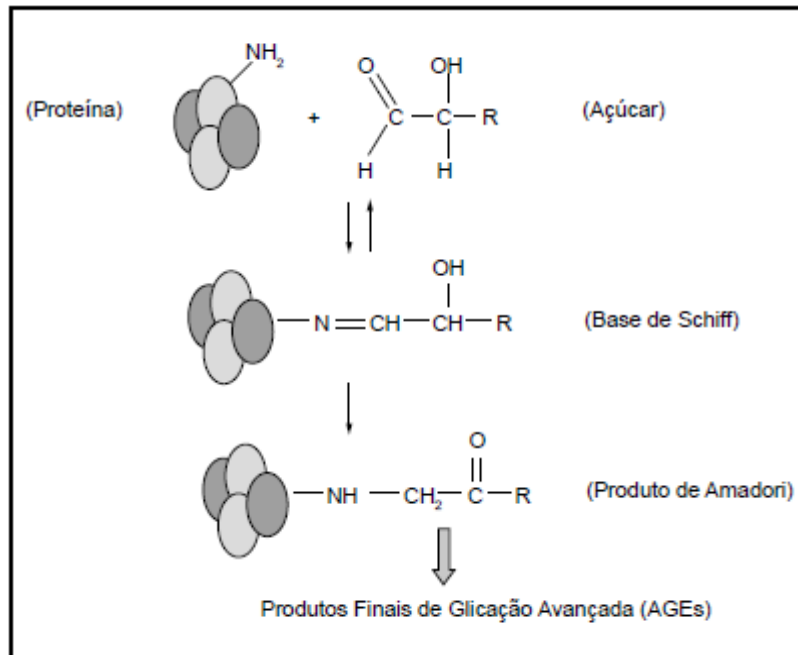


Figura 5 - Representação do processo de glicação avançada.
 Fonte: Bem, A. F. de; Kunde, J. (2006).

Os AGEs podem danificar as células por três mecanismos básicos: alteração de estruturas intracelulares, como a formação de ligações cruzadas (*cross-links*) alterando suas propriedades funcionais; interação com proteínas da matriz extracelular modificando a sinalização entre as moléculas da matriz e da célula e a alteração de proteínas ou lipídeos sanguíneos, que podem ligar-se a receptores específicos, acarretando a produção de citocinas inflamatórias. Recentemente, o acúmulo destes *in vivo*, estão associados a várias complicações, principalmente ao diabetes, a catarata e outros problemas de saúde como aterosclerose, Mal de Alzheimer e envelhecimento precoce (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008; PENG et al., 2011).

Os inibidores de AGEs podem ser divididos em dois grupos: compostos sintéticos e produtos naturais. De modo geral estes inibidores atuam bloqueando a ligação do açúcar às proteínas através da captura ou eliminação de alguns intermediários incluindo os dicarbonílicos, radicais livres e espécies nitrogenadas produzidas, rompendo as ligações cruzadas formadas pelas AGEs, atenuando o estresse oxidativo e a glicoxidação (PENG et al., 2011).

Os flavonoides inibem a formação de AGEs através da quelação com íons metálicos formando complexos, inibindo parcialmente a formação de produtos pós-Amadori e captando diretamente os radicais livres. Desta forma considera-se que o

mecanismo inibitório da glicação é devido a atividade antioxidante promissora dos mesmos, já que estes são capazes de eliminar os radicais livres formados durante a glicação, influenciando assim na formação das AGEs. Desta forma, inibidores de AGEs a partir de produtos naturais com toxicidade baixa são fortes candidatos para o desenvolvimento de nutracêuticos e fármacos para o tratamento de doenças associadas a AGE (JUNG et al., 2015; PENG et al., 2011).

1.5 Alimentos funcionais

A preocupação com a saúde e qualidade de vida se tornou um tema relevante para saúde humana e, portanto, um estímulo para as pesquisas na área de alimentos, tornando-se uma alternativa interessante para a pesquisa científica e também para manutenção de vida longa e saudável (VIZZOTTO; KROLOW; TEIXEIRA, 2010; MORAES; COLLA, 2006). De acordo com Vicentinni et al. (2016), o mercado brasileiro de alimentos funcionais cresce 10% ao ano, três vezes mais do que o mercado de alimentos convencionais.

Os alimentos funcionais marcam uma nova concepção de alimento, lançada no Japão, na década de 80 por um programa do governo que objetivava o desenvolvimento de alimentos saudáveis para a população que envelhecia e apresentava expectativa de vida elevada (ANJO, 2004).

Alimentos funcionais são alimentos que possuem compostos ativos capazes de regular funções corporais, auxiliando na prevenção e tratamento contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose, obesidade, entre outros. Esses não devem ser utilizados como medicamentos, mas sim associados a uma dieta sendo consumidos diariamente, ajudando no fortalecimento do organismo. Estes alimentos podem ser encontrados para o consumo humano de duas formas: naturais e artificiais, variando de produtos de biotecnologia, suplementos dietéticos, derivados de plantas, entre outros (MORAES; COLLA, 2006; VIDAL et al., 2012; ANJO, 2004).

Algumas substâncias químicas que propiciam funcionalidade aos alimentos são: carotenoides, flavonoides, ácidos graxos como ômega-3, probióticos, fibras, terpenoides, ácidos clorogênicos, taninos, entre outros (VIDAL et al., 2012).

Os benefícios dos alimentos são devido a vários efeitos metabólicos e fisiológicos que auxiliam no desempenho do organismo dos indivíduos que os ingere. Como exemplo podemos citar a atividade antioxidante e proteção de órgãos como

fígado, cérebro e rins que flavonoides, vitaminas antioxidantes (A, C, E), catequinas e carotenoides desempenham no organismo, através do consumo de alimentos como: tomate, pimentão, soja, cenoura, entre outros. Temos também como exemplo alimentos que contribuem para o aumento da imunidade do organismo, como o alho, peixes (ômega-3) e minerais como selênio e zinco (VIDAL et al., 2012).

Os flavonóis, como quercetina e miricetina, encontrados em cebolas, maçãs, chás e brócolis, neutralizam radicais livres que podem danificar as células, como também reforçam a defesa antioxidante do organismo (FUNCTIONAL foods, 2011). Exemplos de alimentos funcionais são apresentados na Figura 6.

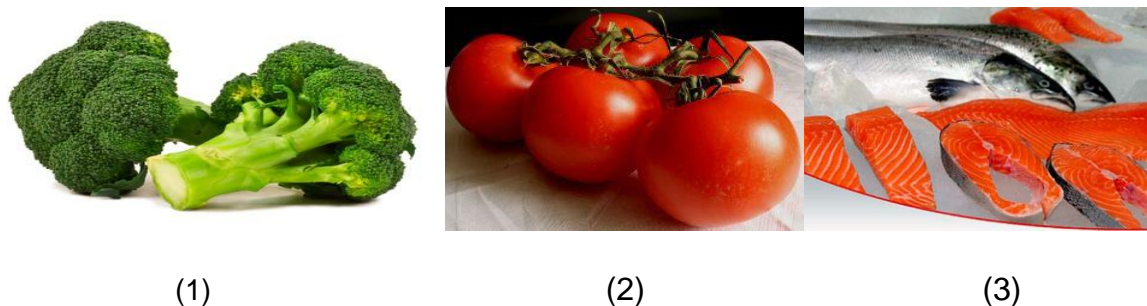


Figura 6 - Exemplos de alimentos funcionais.
Fonte: (1) Martinez (2017); (2) Zoller (2017); (3) Patrícia (2012).

Com a crescente procura da população por uma melhor qualidade de vida e conseqüentemente uma alimentação saudável, as empresas acreditam que investir neste mercado é promissor e muito lucrativo financeiramente. Assim, empresas como UNILEVER, NESTLÉ, SADIA, DANONE, entre outras, lançaram no mercado produtos nesta linha de alimentos funcionais.

A UNILEVER tem no mercado alimentício as linhas Becel e ADES que combatem o colesterol ruim e as doenças do coração. Já a NESTLÉ possui as linhas Molico e linha zero que contribui com a saúde do sistema digestivo, como também é o caso da SADIA com a linha de Soja Vita e Qualy fibras margarina que ajuda a renovar a flora intestinal e regular a digestão. A DANONE por sua vez, possui no mercado as linhas de iogurte Activia, Actimel e iogurte Danacol que ajudam a reforçar as defesas do organismo e diminuir o colesterol de forma natural (GIANEZINI et al., 2012).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina normas e procedimentos para regulamentar os alimentos funcionais no Brasil através da

Resolução n.18/1999, que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedade funcional e de saúde e pela Resolução n.19/1999, que determina os procedimentos para registro dos alimentos com base nas propriedades citadas. Isto foi necessário para proteger a saúde do consumidor e regulamentar a competição entre as empresas (GIANEZINI et al., 2012; VIDAL et al., 2012; AGÊNCIA..., 2013).

1.6 Cosméticos

Segundo o Guia de orientação para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos elaborado pela ANVISA, os cosméticos, produtos de higiene e perfumes “são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas, mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado” (AGÊNCIA..., 2003).

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), a indústria de cosméticos brasileira ocupa a quarta posição no mercado mundial, representando 7,1% do consumo mundial, perdendo somente para o Japão, China e Estados Unidos que é o maior mercado consumidor de cosméticos do mundo (ASSOCIAÇÃO..., 2016).

Existem no Brasil cerca de 2613 empresas regularizadas na ANVISA atuando no mercado, situando-se 1598 na região sudeste, contribuindo para o crescimento do mercado de cosméticos no Brasil. Este crescimento também pode estar relacionado a fatores como: o aumento da expectativa de vida e cuidados com o bem-estar e saúde, lançamentos constantes de produtos atendendo as necessidades de mercado, participação crescente da mulher no mercado de trabalho, entre outros (ASSOCIAÇÃO..., 2016).

Com o crescimento do mercado de cosméticos veio a necessidade da garantia de que os produtos comercializados tragam segurança e eficácia nas condições de uso orientadas. Para que isso seja concretizado são utilizados atualmente ensaios biológicos *in vitro* desses cosméticos que garantam a segurança e eficácia do produto como: avaliação do potencial de citotoxicidade, avaliação da atividade mutagênica e o uso de pele artificial para ensaios. O uso de extratos vegetais em produtos

cosméticos obteve um crescimento nos últimos anos, porém há poucos estudos na literatura em relação à atividade mutagênica ou fototóxica de extratos vegetais, assim ocorre a necessidade da realização dos ensaios citados acima para que os produtos com base em extratos vegetais sejam utilizados com segurança (CHIARI et al., 2012).

Cosméticos com ingredientes naturais em sua composição tem despertado interesse por parte de empresas e consumidores nacionais e internacionais. Para a fabricação de cosméticos naturais os ingredientes mais procurados são: óleo de sementes de maracujá, óleo de castanha do pará, manteiga de cupuaçu, mel e derivados (COSMÉTICOS..., 2008). Também pode-se citar como exemplos os produtos que contenham em seus constituintes flavonoides, que apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e tanante. Produtos cosméticos que possuem 1% de flavonoides em peso apresentam atividade microbicida, são hidrossolúveis e não acarretam irritação cutânea, sendo de grande potencial para a área cosmética (PACKER; LUZ, 2007).

Os extratos de plantas que contém flavonoides podem também ser utilizados como fotoprotetores, pois são capazes de absorver a radiação ultravioleta, podendo ser utilizados nas formulações de filtros solares prevenindo o envelhecimento cutâneo (SOUZA et al., 2005).

A diversidade biológica ou a biodiversidade é reconhecida como responsável pelo desenvolvimento e bem-estar da humanidade, já que gerou benefícios econômicos como fonte de matéria prima para diversos setores da indústria. O Brasil é o país com maior diversidade biológica do mundo, tendo mais de 22% do total de espécies vegetais do planeta (FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006).

Empresas estão apostando na biodiversidade como forma de valorização dos negócios, principalmente no Brasil que possui 60% do seu território com vegetação, o que traz como consequência diversas riquezas naturais. Cerca de 86,7% dos gestores brasileiros percebem a importância da sustentabilidade que ocorreu devido ao aumento da conscientização sobre o tema. Deste modo, empresas nacionais que atuam em diversos setores como extratos naturais, cosméticos, perfumaria e higiene pessoal tem procurado integrar as dimensões econômicas, social e ambiental da sustentabilidade em seu contexto de negócio para o aproveitamento do potencial da biodiversidade (SABARÁ, 2017; FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006).

Nos últimos dois anos, 52,5% das empresas investiram em produtos que utilizam recursos da biodiversidade e neste mesmo período, 48% das campanhas

investiram em ações ou projetos voluntários de conservação ambiental junto às comunidades locais para extração da matéria-prima por meio de planos de manejo sustentáveis a fim de garantir uma renda a estas comunidades (SABARÁ, 2017; FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006).

Uma das linhas de produto mais famosas no Brasil, sinônimo de sustentabilidade e biodiversidade é a linha Natura Ekos, da empresa Natura, que utiliza insumos vegetais a partir da biodiversidade brasileira em parceria com comunidades fornecedoras, além das embalagens dos produtos serem reutilizáveis e recicláveis (NATURA, 2017).

Segundo Natura (2017) outras inovações sustentáveis foram adotadas, tais como: a não realização de testes em animais; a substituição de matérias-primas animal e mineral por vegetal; a utilização de álcool orgânico certificado; o Programa Carbono Neutro, com a redução e compensação das emissões calculadas com base na cadeia produtiva desde a extração da matéria prima até o descarte final pelo consumidor e a adoção de uma tabela ambiental publicada nos produtos trazendo as informações sobre o impacto ambiental de cada item.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

i) Documentação de substâncias fenólicas, com potencial de inovação para os setores de cosméticos e alimentos.

2.2 Objetivos específicos

i) Avaliar o perfil químico de extratos, frações de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) e ressonância magnética nuclear (RMN).

ii) Avaliar o potencial antioxidante e antiglicação de extratos e frações de espécies de *Eugenia*, como também das substâncias identificadas;

iii) Isolar os compostos com atividades biológicas promissoras presentes nas frações de *Eugenia pyriformis* e *Eugenia handroana* por cromatografia líquida de alta eficiência em escala preparativa e identificação estrutural por RMN e espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (IES-EM) por infusão direta;

iv) Identificar os metabólitos secundários da fração mais promissora de *E. uniflora* por EM-IES por infusão direta utilizando a abordagem de *desreplicação*.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Material Vegetal

As folhas das espécies *Eugenia pyriformis* Cambess e *Eugenia handroana* D. Legrand foram coletadas na Reserva Flora da RPPN Monte Sinai, localizada em Monte Sinai-PR no mês de setembro de 2015. As folhas de *Eugenia uniflora* L. foram coletadas na cidade de São Carlos-SP no mês de junho de 2016.

3.2 Obtenção dos extratos brutos de espécies de *Eugenia*

As folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 40 °C durante três dias e em seguida trituradas em moinho de facas. O material seco e triturado foi submetido à extração por maceração durante 3 dias, (retirando o extrato bruto obtido a cada 24 horas) utilizando como solvente etanol grau P.A 70%, sendo o extrato obtido filtrado e concentrado em rotaevaporador com temperatura do banho de 35°C, seguido de liofilização, como é ilustrado na Figura 7.

3.3 Fracionamento dos extratos brutos de espécies de *Eugenia*

O extrato bruto foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila e hexano, visando o fracionamento das substâncias de acordo com suas polaridades. O extrato bruto foi solubilizado em água/etanol grau P.A (60:40) e adicionou-se hexano grau P.A (200 mL) por três vezes, extraíndo assim a fração hexânica. A fração acetato foi obtida adicionando-se ao extrato bruto solubilizado o solvente acetato de etila grau P.A (200 mL) por três vezes, como mostra a Figura 7. As frações foram secas no rotaevaporador e a fração hidroetanólica, obtida após a extração com os solventes, foi liofilizada.

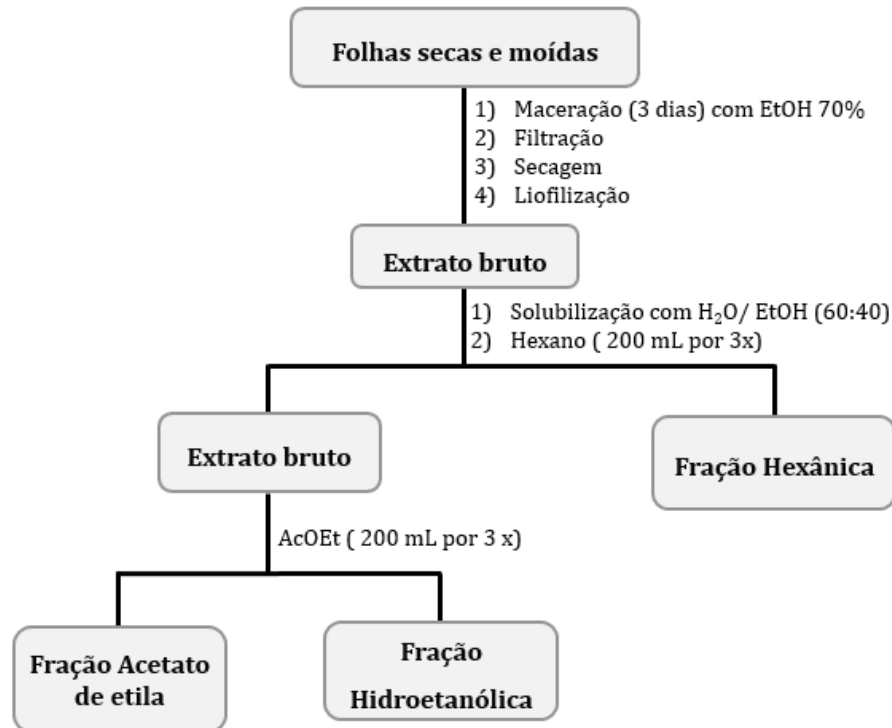


Figura 7 - Fluxograma da obtenção do extrato bruto das três espécies em estudo e suas respectivas frações.

Fonte: Autora (2017).

3.4 Análise cromatográfica dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas de espécies de *Eugenia*

3.4.1 Fracionamento das frações acetato de etila de *E. pyriformis* e *E. handroana* por cromatografia em coluna C₁₈ (CC).

As frações acetato de etila de *E. pyriformis* (2,0 g) e de *E. handroana* (1,5 g) foram ressuspensas em um volume de MeOH:H₂O (25:75 v/v) de aproximadamente 2 mL. Estas soluções foram misturadas a uma quantidade mínima de sílica C₁₈ em um béquer, levando à formação da “farofa”, seguido por fracionamento em coluna. Para a fase estacionária foi utilizada 30 g de sílica C₁₈ que foi ativada com metanol 100% grau P.A., em seguida condicionada com a fase inicial de eluição MeOH:H₂O (25:75 v/v). Após o condicionamento, a amostra foi aplicada na coluna e sucessivas eluições foram realizadas com as seguintes porcentagens de fase móvel (3x volume morto = 150 mL): MeOH:H₂O (25:75 v/v), MeOH:H₂O (40:60 v/v), MeOH:H₂O (55:45 v/v), MeOH:H₂O (70:30 v/v), MeOH:H₂O (85:15 v/v) e MeOH:H₂O (1:0 v/v). As dimensões da coluna foram 11 cm (altura da sílica) por 3 cm de diâmetro, sendo o

volume morto calculado de 49,5 mL. As amostras coletadas da coluna foram rotaevaporadas e liofilizadas.

3.4.2 Análise dos extratos brutos de folhas e frações de espécies de *Eugenia* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector com arranjo de diodos (CLAE-DAD)

As amostras foram solubilizadas em H₂O:MeOH (05:95 v/v) e submetidas a uma etapa de *clean up* utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de sílica de fase reversa (Chromabond C18ec 500 mg). Os cartuchos foram previamente condicionados com 5 mL de MeOH para ativação da fase estacionária e equilibrados com 5 mL de H₂O:MeOH (05:95 v/v) para a posterior injeção das amostras. As amostras adquiridas na extração em fase sólida foram secas, solubilizadas em H₂O:MeOH (05:95 v/v) e filtradas em filtro de 0,22 µm para a injeção no CLAE-DAD. O MeOH utilizado foi grau HPLC da marca J. T. Baker e água ultrapura purificada em sistema Milli Q (Millipore®).

Para as análises de CLAE-DAD foi utilizado o cromatógrafo Shimadzu equipado com bombas LC-20AT, detector UV-DAD SPD-M20A, auto injetor SIL-20A, controlador CBM-20A, e os cromatogramas foram registrados e processados utilizando *software* LC-Solution.

Para as análises foi utilizada uma coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadesilsilano (C₁₈) (250 x 4,6 mm, d.i. 5 µm), com volume de injeção de 25 µL e eluição em modo gradiente exploratório utilizando como fases móveis H₂O (A) e MeOH (B), iniciando com 5 % B a 100 % B em 40 min. A vazão utilizada foi de 1,0 mL.min⁻¹ e comprimento de onda (λ) de monitoramento igual a 254 nm.

O perfil cromatográfico das frações C de *E. pyriformis* e *E. handroana* foram otimizadas a fim de se obter uma melhor resolução e assim identificar os compostos presentes nas mesmas. Para as análises da fração C de *E. pyriformis* foi utilizada uma coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadesilsilano (C₁₈) (250 x 4,6 mm, d.i. 5 µm), com volume de injeção de 15 µL, vazão 1,0 mL.min⁻¹ e eluição em gradiente utilizando como fases móveis H₂O (A) e MeOH (B) iniciando com 40% B a 80% B em 30 min, 100% B em 35 min, permanecendo em 100% B por 10 min e retornando a condição inicial e λ= 254 nm. Já para a análise da fração C de *E. handroana*, foi utilizada uma coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadesilsilano (C₁₈) (250 x 4,6 mm, d.i. 5 µm),

com volume de injeção de 15 μL , vazão 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e eluição em modo isocrático 40% B por 40 min. Limpeza da coluna: 100% B por 10 min e $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Para a análise da banda 2CEh foi utilizada uma coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadesilsilano (C_{18}) (250 x 4,6 mm, d.i. 5 μm), com volume de injeção de 15 μL e eluição em modo isocrático com 45% B, utilizando como fases móveis H_2O (A) e MeOH (B). A vazão utilizada foi de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e comprimento de onda (λ) de monitoramento igual a 254 nm.

3.4.3 Refracionamento da fração C de *Eugenia pyriformis* e *Eugenia handroana* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector com arranjo de diodos (CLAE – DAD) em escala preparativa.

A fração C de *Eugenia pyriformis* (250 mg), assim como a fração C de *Eugenia handroana* (120 mg) foram solubilizadas em MeOH: H_2O (40:60 v/v), filtradas em filtro de 0,22 μm e analisadas por CLAE-DAD em escala preparativa. Para a análise em escala preparativa foi utilizada uma coluna preparativa Luna Phenomenex C_{18} (100 Å) (150 x 21,20 mm, d.i. 5 μm), volume de injeção de 1,0 mL, vazão de 10,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A fração C de *Eugenia pyriformis* foi eluída em modo gradiente utilizando como fases móveis H_2O (A) e MeOH (B), iniciando-se com 40% B a 80% B em 30 min, 100% B em 35 min, permanecendo em 100% B por 10 min, a fim de realizar a limpeza da coluna, retornando à condição inicial. Já a fração C de *Eugenia handroana* foi eluída em modo isocrático com 40% B em 40 min, a limpeza da coluna foi feita com 100% B por 10 min. O comprimento de onda utilizado para o monitoramento foi de 254 nm. O MeOH utilizado foi grau HPLC da marca J. T. Baker e água ultrapura purificada em sistema Milli Q (Millipore®). Foram coletadas 4 frações para *E. handroana* e 6 frações para *E. pyriformis*, que foram posteriormente analisadas por CLAE-DAD, IES-EM e RMN.

3.5 Metodologias dos ensaios biológicos

Os testes preliminares para a determinação da atividade antioxidante dos extratos de folhas foram realizados sob a supervisão das pós-doutorandas Dra. Karina Fraige e Dra. Maria Luiza Zeraik (Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais - Instituto de Química/ Unesp Araraquara).

3.5.1 Ensaio de avaliação do potencial de redução do radical DPPH• das espécies em estudo (teste para avaliação preliminar do potencial antioxidante)

O potencial antioxidante dos extratos e frações foram avaliados de acordo com a redução do radical DPPH• por meio do monitoramento espectrofotométrico em 515 nm, utilizando ácido gálico como padrão. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada segundo o método de Brand-Williams e colaboradores (1995) com algumas modificações. O método consiste no radical livre difenil-picril-hidrazila abstrair um radical hidrogênio de um composto químico com potencial antioxidante puro ou em misturas, como extratos brutos e frações.

Nas placas de 96 poços foram adicionados 35 µL de amostra solubilizada em etanol grau HPLC e 215 µL da solução alcoólica de DPPH• ($8,6 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$). A placa foi incubada no escuro à temperatura ambiente por 30 min, e em seguida foi realizada a medida da absorbância em 515 nm na Leitora de Microplacas Multidetecção Synergy HT (BioTek). Foram realizadas medidas em triplicata das soluções de diferentes concentrações de cada extrato e frações, entre 1 e 60 µg.mL⁻¹. O mesmo procedimento foi realizado com as soluções etanólicas do padrão ácido gálico, na faixa de concentração de 0,4 a 8,0 µg.mL⁻¹. O resultado positivo é fundamentado na variação da coloração, de roxa para amarela (Figura 8), sendo o grau de redução de DPPH• medido através da diminuição da absorbância da mistura reacional em comparação com leitura do branco (DPPH• em solução etanólica).

A capacidade sequestradora do radical DPPH• foi calculada com a seguinte equação:

$$\% \text{ de DPPH}^\bullet \text{ sequestrado} = \left(\frac{A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{branco}}} \right) \times 100$$

Em que A_{branco} refere-se a absorbância do controle e A_{amostra} é a absorbância na presença do extrato ou fração.

A concentração efetiva média (EC₅₀) que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH•, foi calculada através do gráfico %DPPH• reduzido *versus* concentração da amostra.

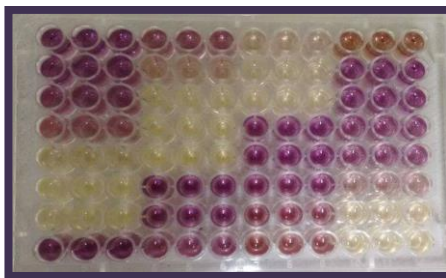


Figura 8 - Teste de potencial antioxidante das amostras em diferentes concentrações.
Fonte: Autora (2017).

3.5.2 Ação redutora sobre radicais peroxila

A ação redutora dos extratos e frações sobre radicais peroxila foi avaliada segundo o método de Pino et al. (2003). Este teste se baseia no decaimento da fluorescência da piranina quando submetida à oxidação por radicais peroxila (produzidos a partir da reação do AAPH com o oxigênio atmosférico), originando um produto não fluorescente.

A partir das soluções estoque dos extratos e frações foram preparadas diferentes diluições nas concentrações de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em etanol. Um volume de $150 \mu\text{L}$ da solução do composto fluorescente piranina ($5 \mu\text{M}$) foi incubado, em placa preta de leitura de fluorescência, com $125 \mu\text{L}$ da solução de AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)] ($40 \mu\text{M}$) em PBS (Tampão Fosfato Salino) a 37°C , na ausência ou presença de $25 \mu\text{L}$ das soluções dos extratos. O decaimento da fluorescência da piranina foi monitorado utilizando os comprimentos de onda de excitação em 485 nm e de emissão em 528 nm , em uma Leitora de Microplacas Multidetecção Synergy HT (BioTek). A capacidade antioxidante foi avaliada em função do tempo de decaimento da fluorescência da piranina provocado pela presença dos extratos. Cada concentração foi avaliada em triplicata, e a leitura e cálculo da área sob as curvas foram feitos com o *software* de análises de dados Gen5. O mesmo procedimento foi realizado com as soluções etanólicas do padrão ácido gálico, na faixa de concentração de $0,5$ a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram avaliados dois controles, o controle branco contendo piranina, etanol e PBS, e o controle positivo contendo piranina, etanol e AAPH.

A porcentagem do radical peroxila sequestrado foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Radical peroxila sequestrado} = \left(\frac{\text{Área}_{\text{amostra}} - \text{Área}_{\text{controle positivo}}}{\text{Área}_{\text{controle branco}} - \text{Área}_{\text{controle positivo}}} \right) \times 1000$$

A concentração efetiva média (EC₅₀) foi obtida pelo gráfico de %radical peroxila sequestrado *versus* concentração.

3.5.3 Atividade de inibição da glicação

A atividade antiglicante foi avaliada segundo o método utilizado por Ramkisson et al. (2013) com algumas modificações. Estas modificações foram realizadas pela mestranda do NuBBE, Larissa Freitas. O teste se baseia na capacidade de inibição que substâncias químicas tem na reação de glicação da proteína albumina (BSA) com o metilglioxal (MGO), uma espécie reativa de carbonila com potente ação de glicação. Esta inibição é medida por fluorescência.

Foram feitas soluções finais de 3 mL com as concentrações: 1mg.ml⁻¹ de BSA, 10 mmol.L⁻¹ de aminoguanidina (AG), 5 mmol.L⁻¹ de MGO e 150 µg.mL⁻¹ dos inibidores a serem testados (extratos hidroetanólicos 70% e suas respectivas frações). A proteína e o inibidor aminoguanidina (AG) foram solubilizados em tampão fosfato e os extratos/frações em 1:1 DMSO/tampão. Foram preparados o branco contendo apenas tampão e BSA, o controle negativo contendo tampão, BSA e MGO e o controle positivo contendo tampão, BSA, AG e MGO.

As soluções foram incubadas a 37°C por 72h. A leitura foi realizada em triplicata em placa preta para leitura de fluorescência, usando o *software* de análises de dados Gen5.

Ao final do experimento, a porcentagem de inibição de cada amostra foi calculada usando a seguinte equação:

$$\frac{\text{Média do controle negativo} - \text{Amostra}}{\text{Média do controle negativo}} \times 100$$

3.6 Análise dos extratos brutos e frações acetato por RMN de ^1H

Os experimentos de RMN de ^1H dos extratos brutos foram realizados em um espectrômetro Bruker Fourier 300 operando a 300 MHz. Para estas análises utilizou-se cerca de 10,0 mg dos extratos brutos e frações acetato de etila, que foram solubilizados em solvente deuterado DMSO (Aldrich).

3.7 Análises das substâncias isoladas de *Eugenia pyriformis* e *Eugenia handroana* por RMN de ^1H

Os experimentos de RMN de ^1H das substâncias isoladas foram realizados em um espectrômetro Bruker Fourier 600 operando a 600 MHz. Para estas análises utilizou-se cerca de 1,0 a 3,0 mg destes compostos que foram solubilizados em solvente deuterado CD_3OD (Deutero).

3.8 Identificação dos constituintes químicos das frações C de *Eugenia pyriformis* e *Eugenia handroana* e fração acetato de etila de *Eugenia uniflora* por Espectrometria de Massas com ionização por *electrospray* (IES-EM)

As análises de IES-EM para as frações 1 a 4 C de *Eugenia handroana* e fração acetato de *Eugenia uniflora* foram realizadas no laboratório NDCOM (Núcleo de Desenvolvimento de Métodos de Análises de Combustíveis) do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química (Unesp - Araraquara), sob coordenação da Prof^a. Dr^a. Maria Valnice Boldrin Zanon. As análises foram feitas por infusão direta em um espectrômetro de massas 3200 Q Trap (quadrupolo – *IonTrap linear*), AB Sciex (Darmstadt, DE), equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (*Turbo Ion Spray*), operando no modo negativo. Os parâmetros utilizados para a fonte de ionização no modo negativo foram: voltagem do *Turbo Ion Spray*: -4500 V, *curtain*gas: 20 psi, temperatura da fonte de ionização: 650°C, DP (potencial de dessolvatação) -35.0 V, EP (potencial de entrada) -10.0 V e CEP (potencial de entrada da cela) -20.0 V. O modo de varredura de íons no modo *Trap linear* foi realizado na faixa de 200 a 900 Da (*fullscan*) e a energia de colisão foi na faixa de 30 a 37V, dependendo da amostra analisada. As amostras foram diluídas para uma concentração de 2 ppm

em MeOH: H₂O (1:1 v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico, e injetadas a uma vazão de 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

As análises em IES-EM para as frações 1 a 6 C de *Eugenia pyriformis* foram realizadas no laboratório NuBBE do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química (Unesp- Araraquara). As análises foram feitas por infusão direta em um espectrômetro de massas BrukerAmazon IES-IT-EM, com fonte de ionização por *electrospray* e analisador *iontrap*. Os parâmetros utilizados para a análise no modo negativo foram: Voltagem do capilar: 4500V, gás nebulizador: 7,0 psi, Dry gas: 4,0 L/min, Dry Temp.: 230°C e Modo de Varredura dos íons: Enhanced Resolution foi realizado na faixa de 50 a 1500 m/z. A intensidade de fragmentação utilizada variou de 75% a 235%, dependendo da amostra e análise realizada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos extratos brutos e frações de espécies de *Eugenia*

As folhas das três espécies de *Eugenia* foram submetidas à extração por maceração com etanol 70%, e estes extratos foram particionados com hexano e acetato de etila. As Tabelas 2 e 3 apresentam as massas obtidas, respectivamente, para os extratos e frações de *E. pyriformis*, *E. handroana* e *E. uniflora*.

Tabela 2 - Massas das folhas secas e do extrato de *E. pyriformis*, *E. handroana* e *E. uniflora*.

| Material Vegetal (Folhas) | Massa Vegetal (g) | Extrato (g) |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------|
| <i>Eugenia pyriformis</i> | 75,16 | 10,63 |
| <i>Eugenia handroana</i> | 43,30 | 7,60 |
| <i>Eugenia uniflora</i> | 38,40 | 7,11 |

Fonte: Autora (2017).

Tabela 3 - Massas obtidas após o fracionamento por partição líquido-líquido para cada espécie.

| Espécie Vegetal | Extrato (g) | Fração hidroetanólica (g) | Fração hexânica (g) | Fração acetato de etila (g) |
|---------------------------|--------------------|----------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| <i>Eugenia pyriformis</i> | 7,53 | 4,07 | 0,27 | 2,99 |
| <i>Eugenia handroana</i> | 6,55 | 3,97 | 0,69 | 1,87 |
| <i>Eugenia uniflora</i> | 5,60 | 2,59 | 1,02 | 1,94 |

Fonte: Autora (2017).

As frações acetato de etila de *E. pyriformis* e *E. handroana* foram aplicadas em uma coluna de vidro preenchida com sílica C₁₈, e eluídas com proporções crescentes de metanol em água, para separação de seus componentes. A Tabela 4 apresenta as massas obtidas após a separação da fração acetato de etila de cada espécie.

Tabela 4 - Massas obtidas por cromatografia em coluna C₁₈.

| <i>E. pyriformis</i> (Frações) | Massa (mg) | <i>E. handroana</i> (Frações) | Massa (mg) |
|-----------------------------------|------------|----------------------------------|------------|
| 25% (A) | 300,2 | 25% (A) | 80,5 |
| 40% (B) | 582,7 | 40% (B) | 122,3 |
| 55% (C) | 322,3 | 55% (C) | 172,5 |
| 70% (D) | 167,7 | 70% (D) | 62,1 |
| 85% (E) | 272,1 | 85% (E) | 83,5 |
| 100% (F) | 200,0 | 100% (F) | 312,7 |

Fonte: Autora (2017).

As frações C foram submetidas à CLAE-DAD em coluna preparativa, por apresentarem resultados promissores nos ensaios biológicos propostos no projeto, sendo as massas das bandas coletadas nestas frações representadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Massas das frações coletadas da fração C no CLAE-DAD em escala preparativa.

| <i>E. pyriformis</i> (Bandas) | Massa (mg) | Código | <i>E. handroana</i> (Bandas) | Massa (mg) | Código |
|----------------------------------|------------|--------|---------------------------------|------------|--------|
| 1 | 14 | 1CEp | 1 | 7,7 | 1CEh |
| 2 | 4 | 2CEp | 2 | 5,2 | 2CEh |
| 3 | 28,6 | 3CEp | 3 | 3,2 | 3CEh |
| 4 | 12 | 4CEp | 4 | 42,4 | 4CEh |
| 5 | 12,1 | 5CEp | - | - | - |
| 6 | 4,9 | 6CEp | - | - | - |

Fonte: Autora (2017).

Os extratos, frações e compostos isolados obtidos foram submetidos aos ensaios biológicos de atividade antioxidante e antiglicação, como descrito na seção 3.5.

4.2 Avaliação da capacidade antioxidante e antiglicação

4.2.1 Ensaio da capacidade redutora do radical DPPH• em extratos e frações de espécies de *Eugenia*

O ensaio da capacidade redutora do radical DPPH• é um teste considerado rápido, prático e com boa estabilidade (SUCUPIRA et al., 2012), sendo utilizado para análises preliminares de avaliação de atividade antioxidante. A Figura 9 ilustra o mecanismo da reação de oxirredução que ocorre neste ensaio, no qual o elétron desemparelhado do nitrogênio se emparelha com elétron do radical hidrogênio de um antioxidante. No exemplo o ácido gálico, usado como padrão nestes ensaios iniciais, é utilizado para demonstrar como ocorre a redução do DPPH•.

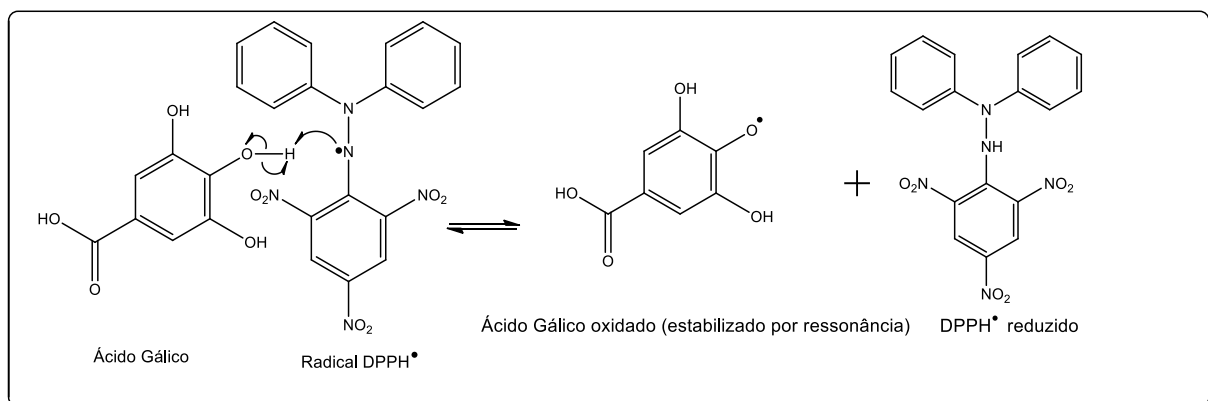


Figura 9 - Esquema ilustrativo do mecanismo de reação entre o radical DPPH• e uma espécie antioxidante (ácido gálico).

Fonte: Autora (2017).

Os extratos brutos e as frações das três espécies de *Eugenia* foram analisados pelo ensaio do DPPH• em diferentes concentrações, variando de 1 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6 para os extratos hidroetanólicos e suas respectivas frações.

Tabela 6 - Ensaio da capacidade redutora do radical DPPH* em extratos e frações de espécies de *Eugenia* com relação ao padrão utilizado, ácido gálico.

| Amostra | EC₅₀ (µg/mL) |
|------------------------------|--------------------------------|
| Extrato <i>E. pyriformis</i> | 15,46 ± 0,58 |
| Fração acetato de etila | 8,36 ± 0,36 |
| Fração hidroetanólica | 18,85 ± 0,37 |
| Fração hexânica | > 60 |
| Extrato <i>E. handroana</i> | 23,89 ± 0,14 |
| Fração acetato de etila | 13,00 ± 0,18 |
| Fração hidroetanólica | 25,14 ± 0,66 |
| Fração hexânica | > 60 |
| Extrato <i>E. uniflora</i> | 14,71 ± 0,19 |
| Fração acetato de etila | 7,13 ± 0,18 |
| Fração hidroetanólica | 24,48 ± 0,63 |
| Fração hexânica | > 60 |
| Ácido gálico | 2,01 ± 0,01 |

Fonte: Autora (2017).

O teste de DPPH* foi utilizado para uma avaliação preliminar da atividade antioxidante dos extratos e frações. De acordo com os resultados obtidos na Tabela 6, as frações acetato de etila foram as que apresentaram os menores valores de EC₅₀, indicando um elevado potencial antioxidante devido às substâncias presentes nestas frações. Para um estudo bioguiado, as frações acetato de etila de *E. pyriformis* e *E. handroana* foram submetidas a um fracionamento em coluna aberta, e a Tabela 7 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 7 - Ensaio da capacidade redutora do radical DPPH* nas frações de *E. pyriformis* (*Ep*) e *E. handroana* (*Eh*) da fração acetato de etila com relação ao padrão utilizado, ácido gálico.

| Amostra | EC₅₀ (µg/mL) |
|----------------|--------------------------------|
| A <i>Ep</i> | 22,75 ± 3,36 |
| B <i>Ep</i> | 4,13 ± 0,10 |
| C <i>Ep</i> | 5,63 ± 0,25 |
| D <i>Ep</i> | 11,33 ± 1,07 |
| E <i>Ep</i> | 20,79 ± 2,24 |
| F <i>Ep</i> | 18,63 ± 2,70 |
| A <i>Eh</i> | 4,13 ± 0,53 |
| B <i>Eh</i> | 4,24 ± 0,05 |
| C <i>Eh</i> | 4,81 ± 0,35 |
| D <i>Eh</i> | 14,75 ± 0,37 |
| E <i>Eh</i> | 19,36 ± 0,80 |
| F <i>Eh</i> | 55,10 ± 0,80 |
| Ácido gálico | 2,01 ± 0,01 |

Fonte: Autora (2017).

Pode-se observar que as frações B e C de *E. pyriformis*, como também as frações A, B e C de *E. handroana* apresentaram resultados promissores, ou seja, os menores valores de EC₅₀ no teste, indicando um elevado potencial antioxidante devido às substâncias presentes nestas frações.

4.2.2 Ação redutora sobre radicais peroxila em extratos e frações de espécies de *Eugenia*

Os extratos brutos e as frações também foram avaliados quanto à atividade antioxidante frente à capacidade redutora dos radicais peroxila em diferentes concentrações (de 1 a 60 µg/mL). Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Ação redutora sobre radicais peroxila.

| Amostra | EC₅₀ (µg/mL) |
|------------------------------|--------------------------------|
| Extrato <i>E. pyriformis</i> | 8,43 ± 0,10 |
| Fração acetato de etila | 4,94 ± 0,37 |
| Fração hidroetanólica | 6,03 ± 0,24 |
| Extrato <i>E. handroana</i> | 8,44 ± 0,91 |
| Fração acetato de etila | 3,66 ± 0,10 |
| Fração hidroetanólica | 4,95 ± 0,29 |
| Extrato <i>E. uniflora</i> | 9,27 ± 0,28 |
| Fração acetato de etila | 3,97 ± 0,15 |
| Fração hidroetanólica | 11,82 ± 0,26 |
| Ácido gálico | 0,91 ± 0,07 |

Fonte: Autora (2017).

De acordo com a Tabela 8, as frações acetato de etila apresentaram os menores valores de EC₅₀, corroborando com os resultados obtidos no teste DPPH*. Tais resultados analisados juntamente com os dados de RMN e EM indicam que a fração acetato de etila das três espécies em estudo são as com maior concentração em compostos fenólicos, o que corroboram a alta capacidade antioxidante.

Na Tabela 9 estão representados os resultados do ensaio realizado com as frações obtidas na cromatografia em coluna, nas concentrações variando de 1 a 60 µg/mL.

Tabela 9 - Ação redutora sobre radicais peroxila nas frações de *E. pyriformis* (*Ep*) e *E. handroana* (*Eh*) da fração acetato de etila, em função do padrão ácido gálico.

| Amostra | EC ₅₀ (µg/mL) |
|--------------|--------------------------|
| A <i>Ep</i> | 5,26 ± 0,75 |
| B <i>Ep</i> | 1,71 ± 0,09 |
| C <i>Ep</i> | 2,65 ± 0,09 |
| D <i>Ep</i> | 3,80 ± 0,08 |
| E <i>Ep</i> | 8,15 ± 0,78 |
| F <i>Ep</i> | 11,94 ± 4,23 |
| A <i>Eh</i> | 1,02 ± 0,13 |
| B <i>Eh</i> | 1,71 ± 0,12 |
| C <i>Eh</i> | 2,19 ± 0,19 |
| D <i>Eh</i> | 6,26 ± 0,25 |
| E <i>Eh</i> | 10,01 ± 1,99 |
| F <i>Eh</i> | > 60 |
| Ácido gálico | 0,91 ± 0,07 |

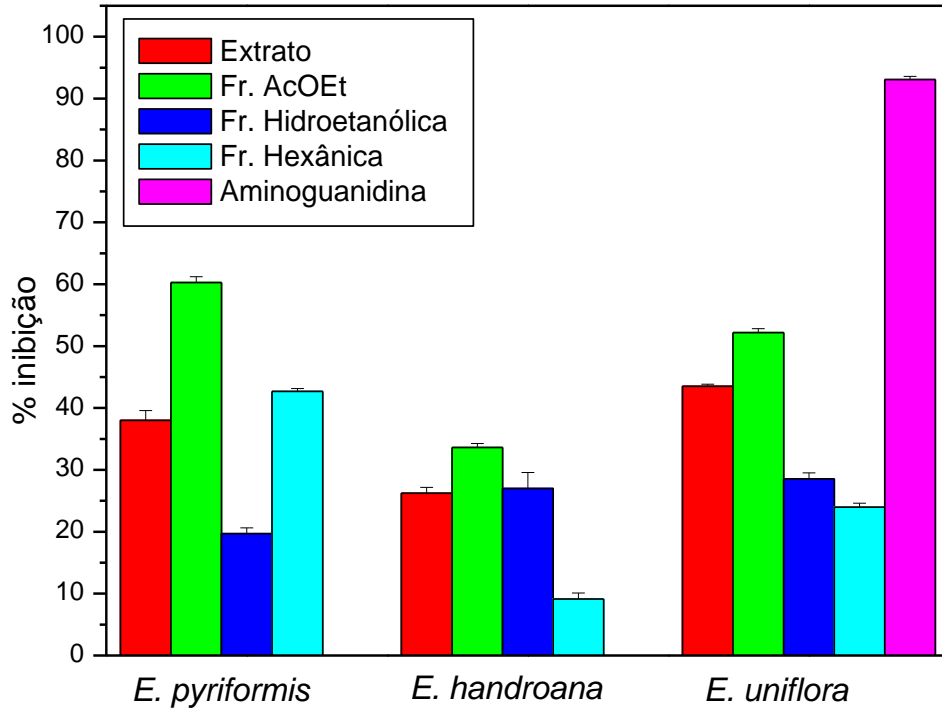
Fonte: Autora (2017).

De acordo com os resultados da Tabela 9, as frações B e C de *E. pyriformis* foram as que apresentaram os menores valores de EC₅₀, como também as frações A, B e C de *E. handroana* corroborando com os resultados obtidos no teste DPPH*, indicando que estas frações apresentam promissor potencial antioxidante.

4.2.3 Ensaio de atividade antiglicação em extratos e frações de espécies de *Eugenia*

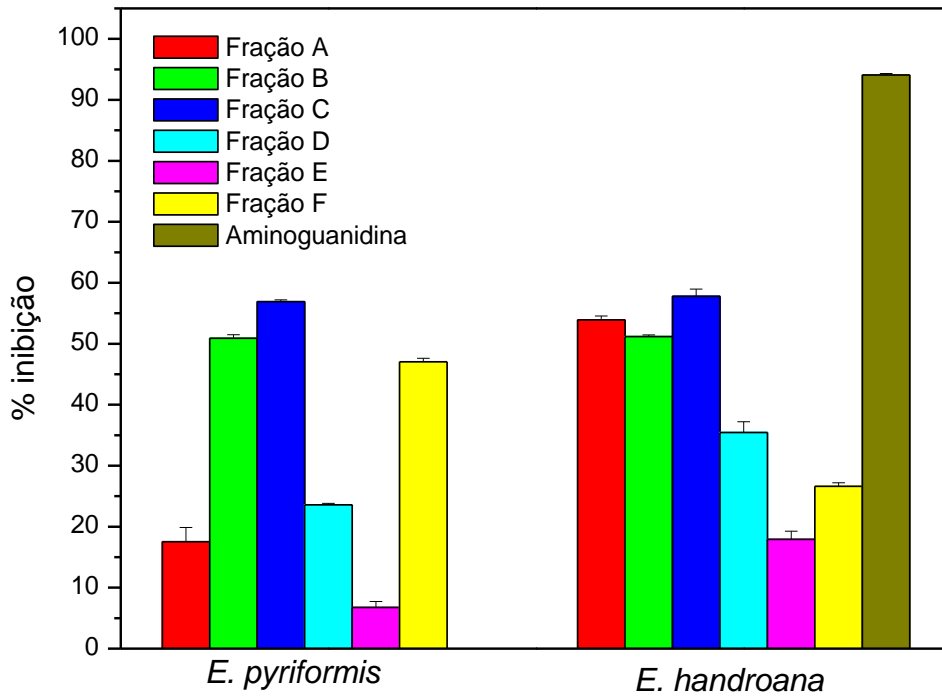
Os extratos brutos e as frações foram avaliados quanto à atividade antiglicante, e os valores obtidos foram expressos em porcentagem (%) de inibição da glicação. Os resultados do teste são apresentados no Gráfico 1 para os extratos brutos e frações, e no Gráfico 2 para as frações obtidas após fracionamento em coluna C₁₈ das frações acetato de etila de *E. pyriformis* e *E. handroana*.

Gráfico 1 - Teste de anti-glicação para os extratos de folhas de espécies de *Eugenia* e suas frações.



Fonte: Autora (2017).

Gráfico 2 - Ensaio antiglicante para as frações de *E. pyriformis* e *E. handroana* da fração acetato de etila.



Fonte: Autora (2017).

Os resultados mostram que as frações acetato de etila das espécies *E. pyriformis* e *E. uniflora* e as frações C de *E. pyriformis* e *E. handroana* apresentaram os valores mais promissores na porcentagem de inibição da reação de glicação entre a proteína albumina e o metilglioxal, indicando um potencial inibitório devido às substâncias presentes nestas frações. Os resultados abaixo de 40% indicam baixa atividade dos extratos e frações. As frações B *Ep*, A *Eh* e B *Eh* também apresentaram valores interessantes na porcentagem de inibição, mas para o estudo bioguiado foi selecionada a fração com maior porcentagem de inibição.

Desta forma, com os resultados dos ensaios biológicos, as frações mais promissoras foram selecionadas para estudo do perfil cromatográfico e identificação dos compostos presentes. A caracterização química das frações ativas foi realizada com a fração C das espécies *E. pyriformis* e *E. handroana*, por apresentarem os melhores resultados antioxidante e antiglicação nos três ensaios realizados e também pelos seus dados escassos na literatura sobre a composição de metabólitos secundários presentes nestas espécies em estudo.

4.3 Perfil químico dos extratos brutos e frações acetato de etila de espécies de *Eugenia* por RMN de ^1H

Esta técnica é bastante utilizada nos estudos fitoquímicos como um *fingerprint* preliminar para verificação e identificação de classes de produtos naturais. Na Figura 10 estão representados os espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos e frações acetato de etila, as mais ativas nos ensaios biológicos. O sinal intenso observado em $\delta_{\text{H}} 2,5$ é atribuído ao solvente DMSO-*d*6 utilizado para análise.

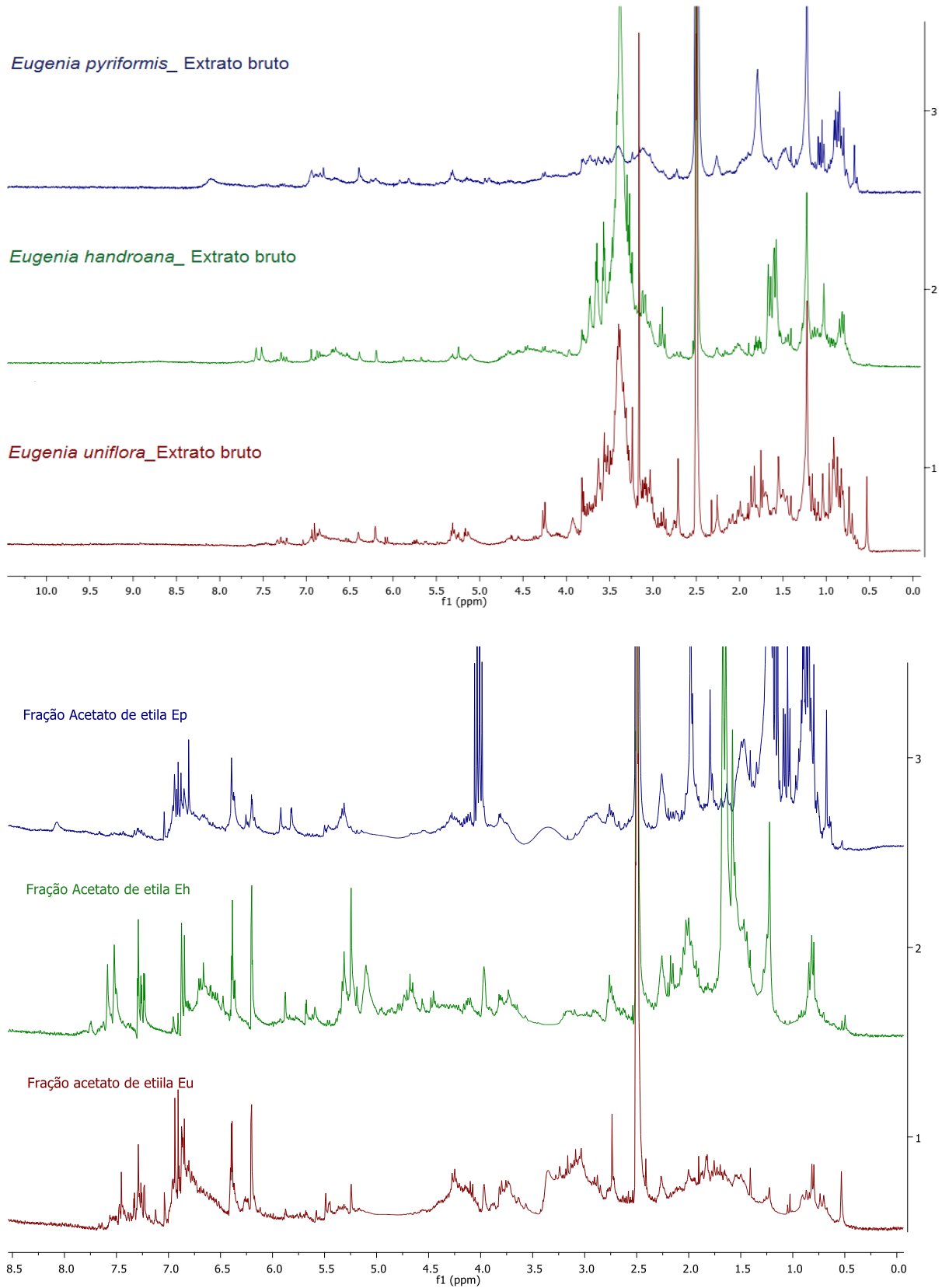


Figura 10 - Espectros de RMN de ¹H, com pressaturação da água, dos extratos e frações mais ativas (acetato de etila) de espécies de *Eugenia*. (DMSO-d₆, 300 MHz). Fonte: Autora (2017).

Analisando os espectros, observa-se uma semelhança entre os perfis das três espécies de *Eugenia*. Observa-se nos espectros de RMN a presença de sinais característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos (δ_H 0,7 - 3,0), sinais característicos de hidrogênios pertencentes às unidades glicosídicas (δ_H 2,0 - 5,0), hidrogênios carbinólicos (δ_H 3,0 - 4,0), hidrogênios olefínicos (δ_H 4,5 - 6,5), e uma região de aromáticos (δ_H 6,5 - 8,0). Estes resultados indicam que os extratos brutos e frações estudadas apresentam evidências de substâncias aromáticas. Nas regiões correspondentes aos hidrogênios aromáticos e às unidades glicosídicas observa-se uma grande quantidade de sinais, indício de substâncias aromáticas glicosiladas.

4.4 Perfil cromatográfico dos extratos brutos e das frações das folhas de espécies de *Eugenia*

Os perfis cromatográficos são bastante utilizados no estudo de plantas, permitindo comparar e sugerir classes de compostos presentes em extratos e frações quando se utiliza detectores de arranjo de diodos ou espectrometria de massas. A fim de se obter os perfis dos extratos e frações foi realizado um gradiente exploratório, permitindo a visualização dos metabólitos presentes em uma ampla faixa de polaridade. A Figura 11 apresenta os cromatogramas dos extratos brutos para cada uma das espécies estudadas, que apresentaram bandas com diferentes intensidades sendo que os compostos detectados, em geral, são de média a baixa polaridade.

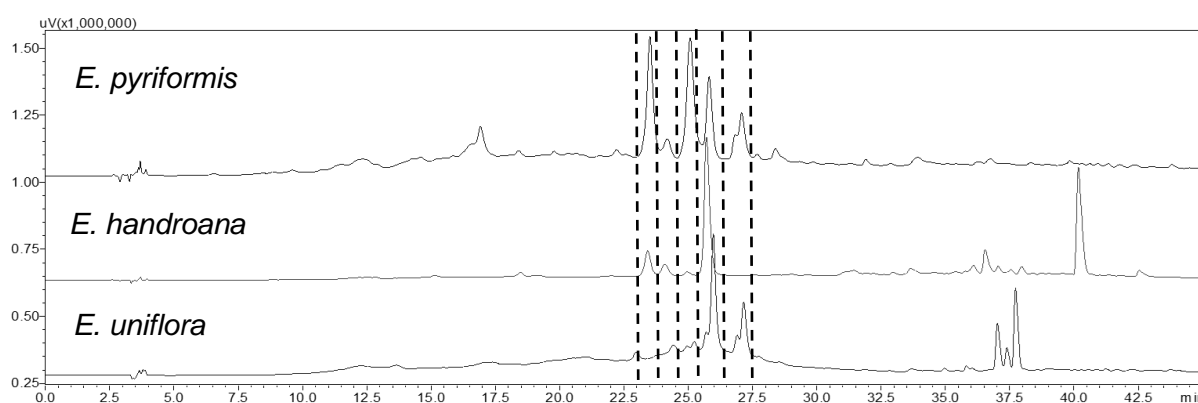


Figura 11 – Cromatograma dos extratos brutos de folhas das espécies de *Eugenia*. Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadesil silano (C_{18}) (250 x 4,6 mm, d.i. 5 μ m), volume de injeção foi de 25,0 μ L e eluição em modo gradiente exploratório utilizando como fases móveis H_2O (A) e MeOH (B), iniciando com 5 % B a 100 % B em 40 min. A vazão utilizada foi de 1,0 $mL \cdot min^{-1}$ e $\lambda = 254$ nm.

Fonte: Autora (2017).

Pode-se observar a variação metabólica presente nas espécies de *Eugenia*, contudo algumas bandas se assemelham pelo tempo de retenção, podendo ser atribuídos aos mesmos metabólitos secundários, o que será verificado pela análise por técnicas espectrométricas e espectroscópicas usuais.

Analisando o espectro de absorção no ultravioleta-visível das bandas das espécies estudadas em tempos de retenção semelhantes (Figura 12), podemos observar que estes compostos possuem bandas características de flavonoides, sendo a banda II entre 250-295 nm e a banda I entre 300-560 nm (Tabela 1). Isto corrobora com os resultados promissores nos ensaios antioxidantes, já que na literatura está bastante difundido que os flavonoides apresentam propriedades antioxidante e antiglicante potenciais, devido a sua propriedade em sequestrar diretamente os radicais livres (agentes doadores de hidrogênio e elétrons ao radical), formando intermediários radicalares que são estáveis devido ao efeito de ressonância do anel aromático presente na estrutura destes flavonoides (BARREIROS; DAVID, 2006; JUNG et al., 2015).

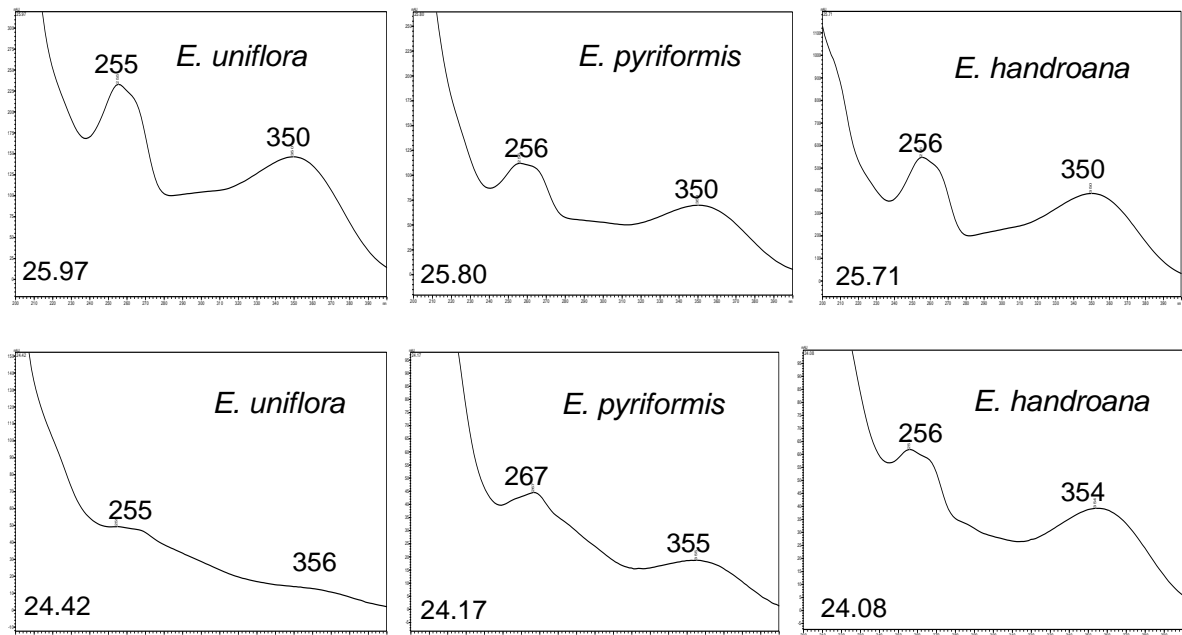


Figura 12 - Espectros de absorção no ultravioleta- visível das espécies com tempo de retenção semelhantes. Fonte: Autora (2017).

Os cromatogramas referentes às frações acetato de etila e hidroetanólica de *E. pyriformis*, *E. handroana* e *E. uniflora*, apresentados nas Figuras 13, 14 e 15, respectivamente, mostraram algumas diferenças quantitativas e qualitativas entre essas frações, indicando que a separação pelo procedimento de fracionamento líquido-líquido foi efetiva, e que os taninos, geralmente interferentes em algumas

análises, permaneceram nas frações hidroetanólicas. Como as frações acetato de etila foram as mais promissoras nos testes realizados, a eliminação deste interferente nestas frações se tornou um ponto positivo para o andamento da pesquisa.

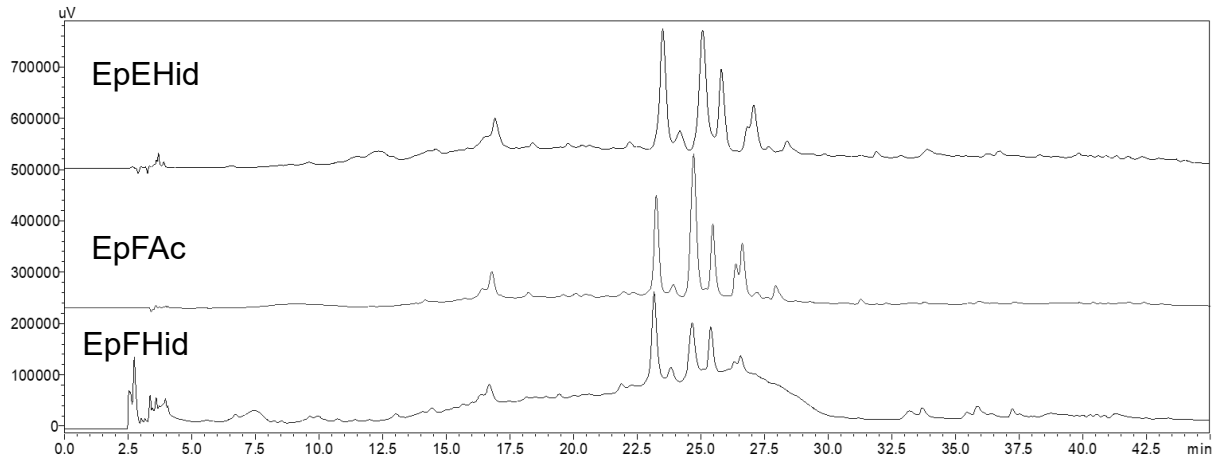


Figura 13 -Cromatograma do extrato e frações de folhas de *E. pyriformis*. Condições de análise descritas na Figura 11. Ep = *Eugenia pyriformis*; FAc = fração acetato de etila; FHid = fração hidroetanólica; EHid = extrato hidroetanólico. Fonte: Autora (2017).

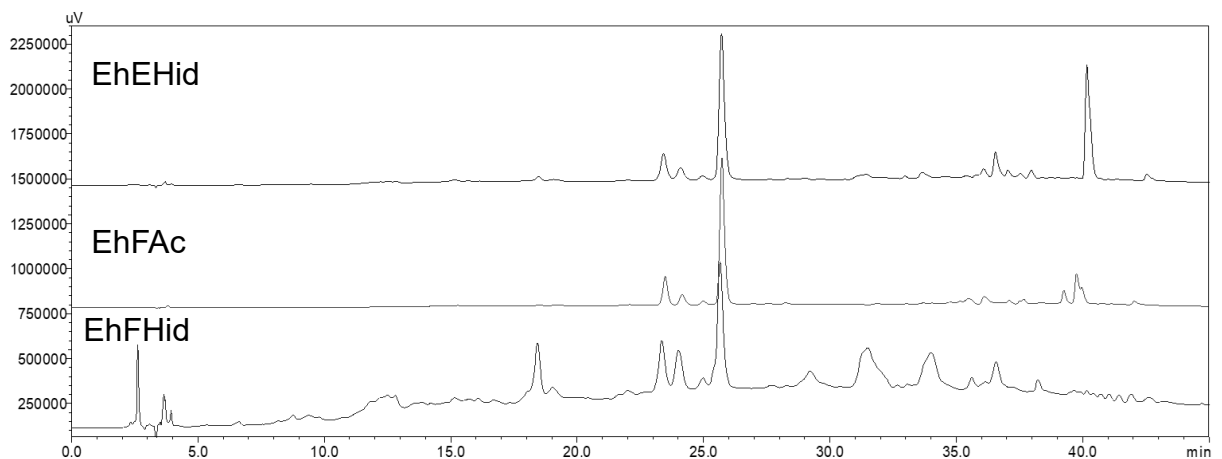


Figura 14 - Cromatograma do extrato e frações de folhas de *E. handroana*. Condições de análise descritas na Figura 11. Eh = *Eugenia handroana*. Fonte: Autora (2017).

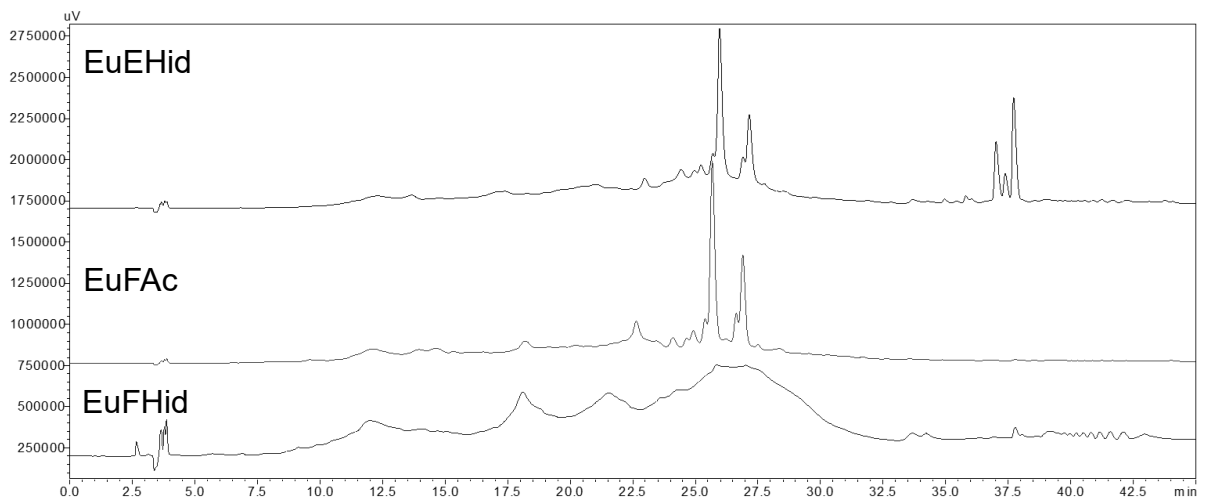


Figura 15 - Cromatograma do extrato e frações de folhas de *E. uniflora*. Condições de análise descritas na Figura 11. Eu = *Eugenia uniflora*. Fonte: Autora (2017).

A fração acetato de etila foi a mais promissora nos ensaios biológicos realizados para as três espécies, e visando um estudo guiado por estes ensaios, estas amostras foram fracionadas através de cromatografia em coluna C₁₈ (CC) a fim de determinar quais os compostos presentes nesta fração seriam responsáveis pelas atividades biológicas.

A fração da espécie *E. pyriformis* foi submetida a CC por ser a mais ativa no ensaio antiglicação além de apresentar resultados interessantes nos ensaios antioxidantes. Já a fração de *E. handroana* foi selecionada por não existir dados na literatura sobre sua composição química, apenas foram encontrados estudos relatando aspectos da morfologia da espécie. Visto que *E. uniflora* é uma espécie bastante estudada com relatos da composição química de seus frutos e folhas na literatura, além de apresentar o perfil cromatográfico muito similar às outras duas, optou-se por identificar os compostos presentes pela abordagem de *desreplicação*, evitando assim, o isolamento de substâncias já conhecidas e presentes nas outras frações. Assim, *E. pyriformis* e *E. handroana* foram selecionadas para dar continuidade à pesquisa com a finalidade de isolamento e identificação estrutural das substâncias químicas, através do monitoramento bioguiado.

4.5 Perfil cromatográfico do fracionamento da fração acetato de etila de *E. pyriformis* e *E. handroana*

As Figuras 16 e 17 mostram os cromatogramas obtidos após o fracionamento da fração acetato de etila de *E. pyriformis* e *E. handroana*, respectivamente. As frações foram nomeadas de A a F, de acordo com a polaridade da mistura de eluição, sendo A eluída na proporção 25:75 MeOH:H₂O (v/v) e F em 1:0 MeOH:H₂O (v/v), e analisadas utilizando-se as mesmas condições experimentais (CLAE-DAD) descritas anteriormente para os extratos (Figura 11).

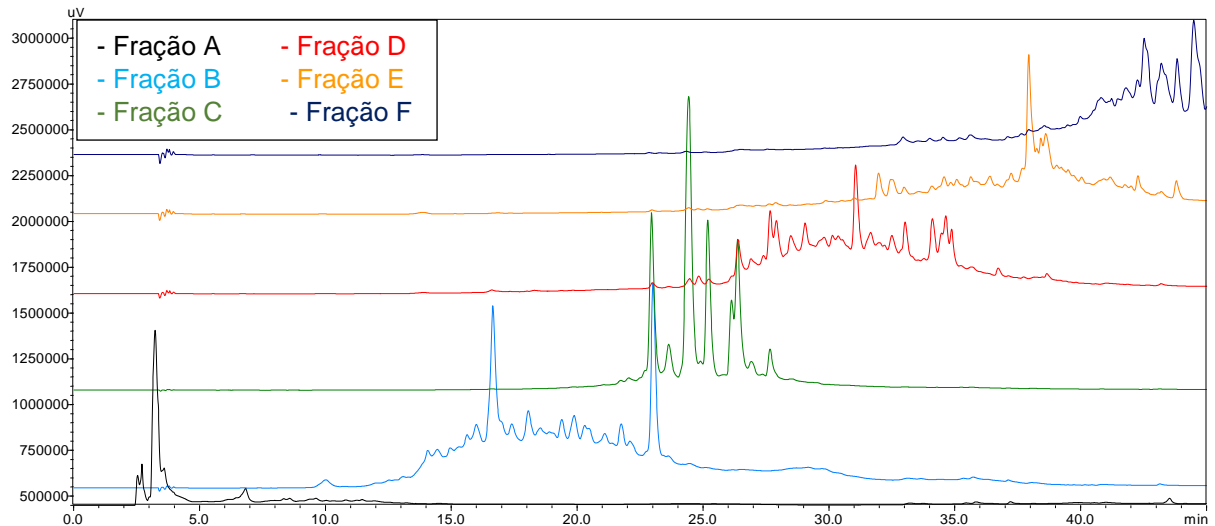


Figura 16 - Cromatogramas das frações da fração acetato de etila de *E. pyriformis*. $\lambda=254$ nm. Fonte: Autora (2017).

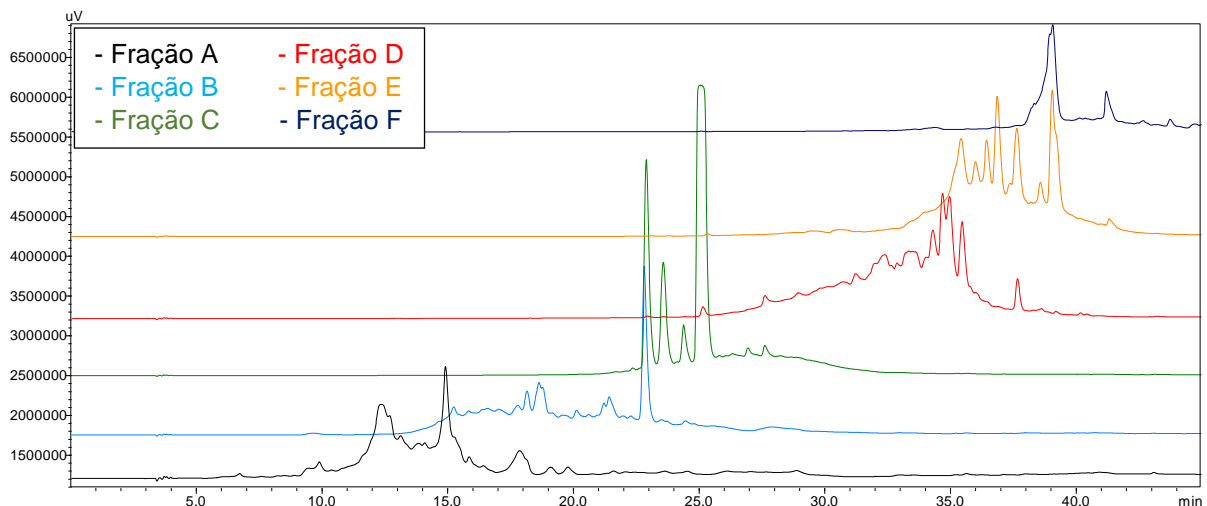


Figura 17 - Cromatogramas das frações da fração acetato de etila de *E. handroana*. $\lambda=254$ nm. Fonte: Autora (2017).

Observa-se nos cromatogramas o perfil dos extratos de acordo com o aumento da porcentagem de metanol e a variedade de metabólitos em cada fração, com bandas de diferentes intensidades e em diferentes tempos de retenção, evidenciando um fracionamento efetivo dos compostos presentes na fração acetato de etila. Estas frações foram submetidas a ensaios biológicos, sendo a fração C a mais promissora no ensaio antiglicação, como apresentado anteriormente, além de apresentar resultados significativos nos ensaios antioxidantes para ambas espécies. A separação cromatográfica para esta fração foi otimizada e suas bandas coletadas por CLAE-DAD em escala preparativa.

4.6 Otimização das condições de análise da fração C de *E. pyriformis* e *E. handroana*

Diversas análises foram realizadas para otimização do perfil cromatográfico da fração C a fim de se obter uma melhor resolução e identificação das classes de metabólitos secundários presentes. Os cromatogramas obtidos e os sistemas de solventes e gradiente de eluição que permitiram uma melhor separação dos componentes da fração C de *E. pyriformis* e *E. handroana*, estão descritos respectivamente nas Figuras 18 e 19.

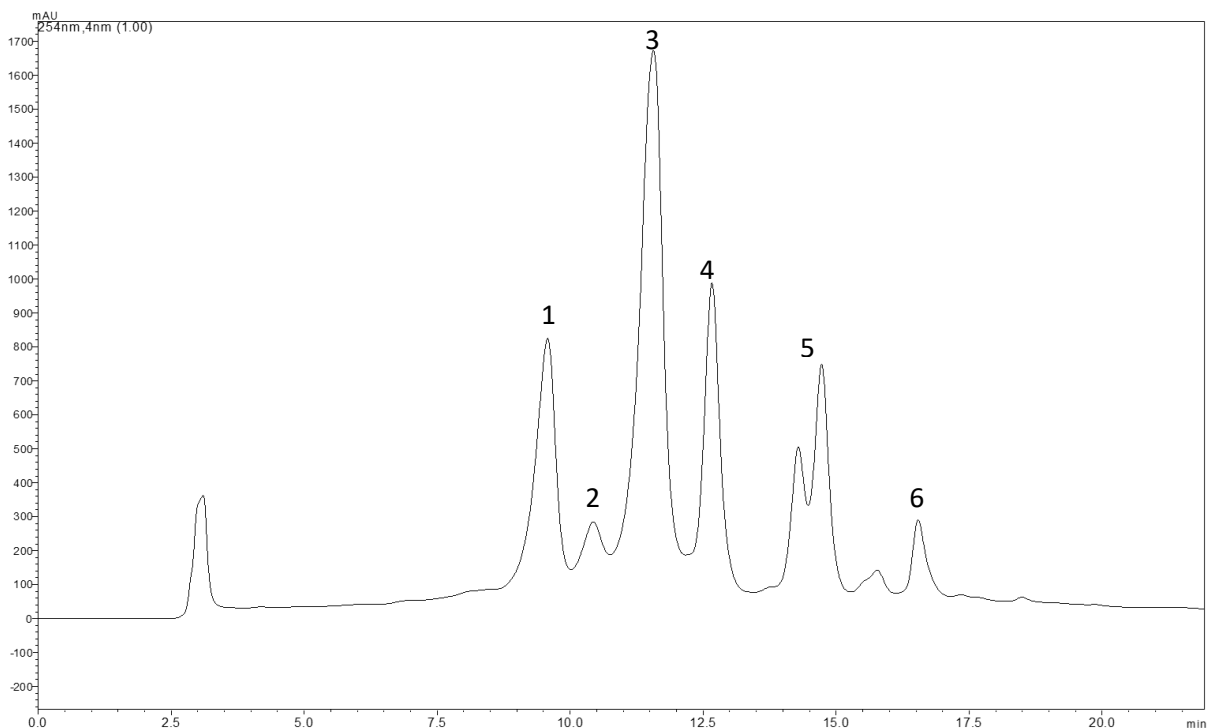


Figura 18 - Cromatograma da fração C da fração acetato de etila de *E. pyriformis*. Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex C₁₈ (250 x 4,6 mm, d.i. 5 µm), volume de injeção de 15,0 µL, vazão 1,0 mL.min⁻¹ e eluição em gradiente utilizando como fases móveis H₂O (A) e MeOH (B) iniciando com 40% B a 80% B em 30 min, 100% B em 35 min, permanecendo em 100% B por 10 min e retornando a condição inicial. λ= 254 nm. Fonte: Autora (2017).

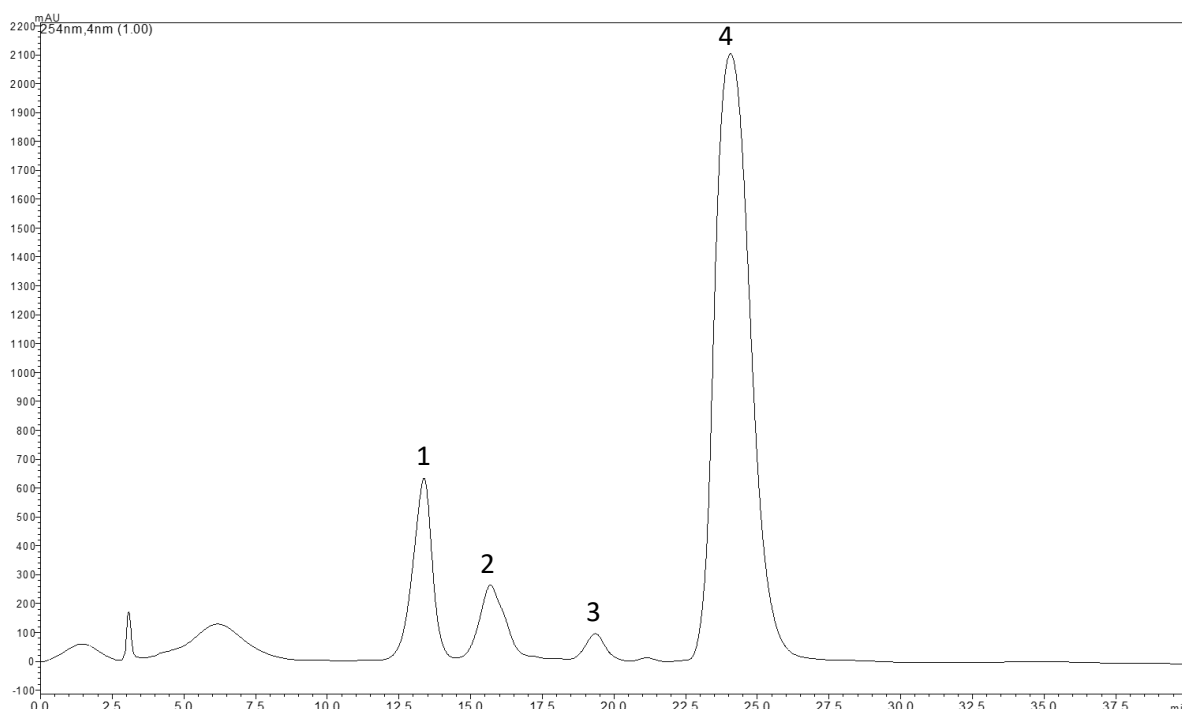


Figura 19 - Cromatograma da fração C da fração acetato de etila de *E. handroana*. Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex C₁₈ (250 x 4,6 mm, d.i. 5 µm), volume de injeção de 15,0 µL, vazão 1,0 mL.min⁻¹ e eluição em modo isocrático 40% B por 40 min. Limpeza da coluna: 100% B por 10 min. $\lambda = 254$ nm. Fonte: Autora (2017).

Em comparação com o gradiente exploratório inicialmente utilizado, pode-se observar que a otimização melhorou a resolução das bandas presentes, auxiliando as análises por CLAE-DAD em escala preparativa, a fim de isolar as substâncias presentes nessas frações. As condições de análise em escala preparativa estão descritas na Seção 3.4.3.

As bandas foram coletadas e analisadas por CLAE-DAD em escala preparativa sendo submetidas a análises por RMN e IES-EM por infusão direta com a finalidade de identificação estrutural dos compostos presentes nestas frações C, além de serem realizados os ensaios biológicos propostos neste projeto. As bandas estão devidamente identificadas nas Figuras 18 e 19, como também na Tabela 5, onde consta o código utilizado para elas.

4.7 Identificação dos compostos presentes nas frações C de *E. pyriformis* e *E. handroana* por RMN e IES-EM

A Figura 20 apresenta as estruturas das substâncias isoladas e identificadas das bandas presentes nas frações C das espécies de *E. pyriformis* e *E. handroana* que serão discutidas nas seções seguintes. Os compostos isolados foram nomeados de I a IX.

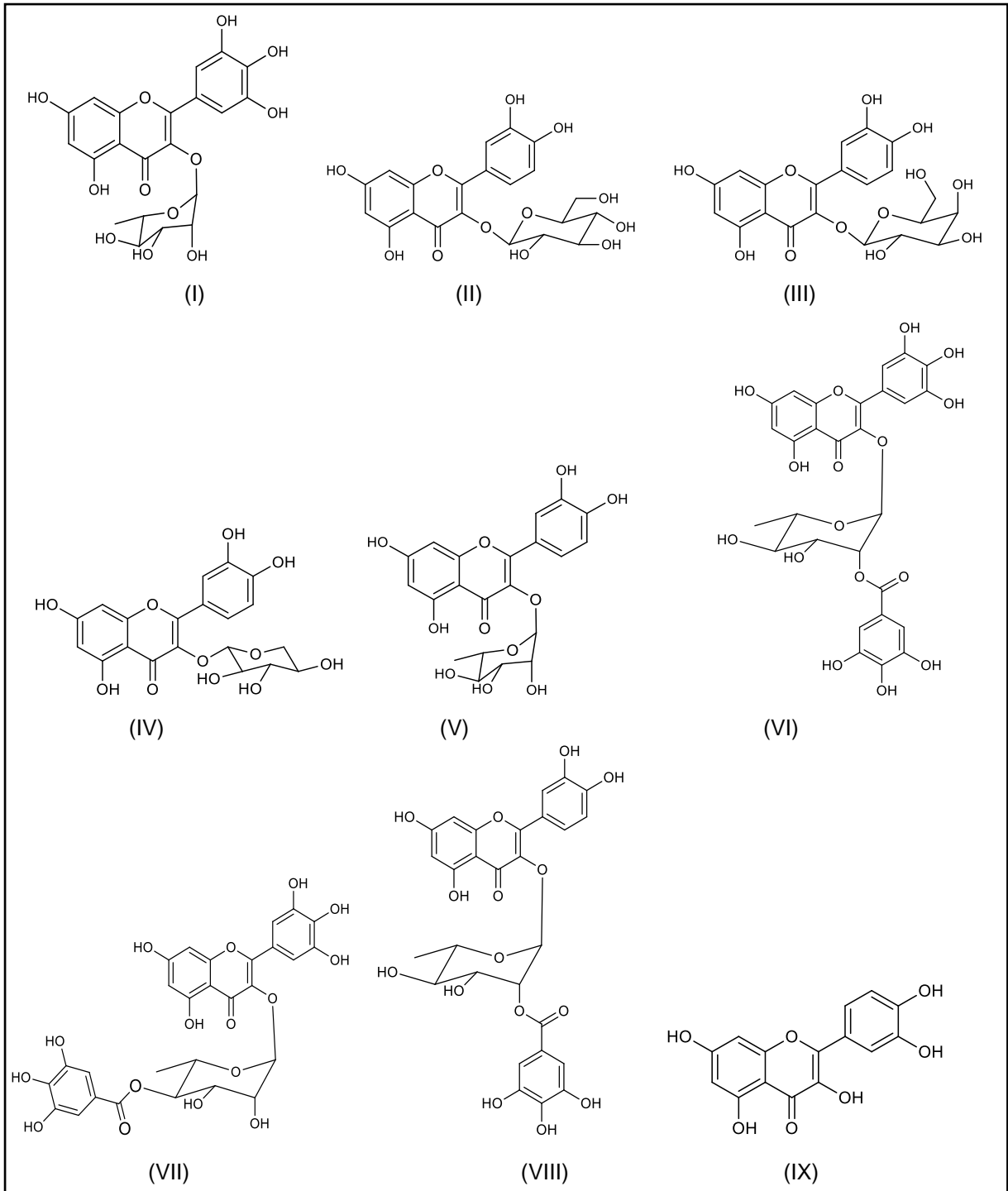


Figura 20 - Substâncias isoladas e identificadas das frações C. Fonte: Autora (2017).

4.7.1 Identificação da substância I

O estudo das frações C de *E. pyriformis* e *E. handroana*, obtidas da fração acetato de etila, demonstrou serem frações ricas em flavonoides, através de seus espectros de UV obtidos por CLAE-DAD. Este foi o primeiro relato desta classe de compostos na espécie de *E. handroana* sendo já relatados em outras do gênero, como a *E. uniflora* e *E. pyriformis* também presente neste estudo.

A substância I foi isolada das bandas 1CEp e 1CEh como um óleo amarelo, e sua identificação foi realizada através de experimentos de RMN de ^1H , COSY, HSQC, HMBC, espectrometria de massas e por meio de comparação com os dados da literatura (ISIDORO et al., 2012). O espectro de RMN de ^1H é apresentado na Figura 21. Os espectros apresentados referem-se à banda 1CEh.

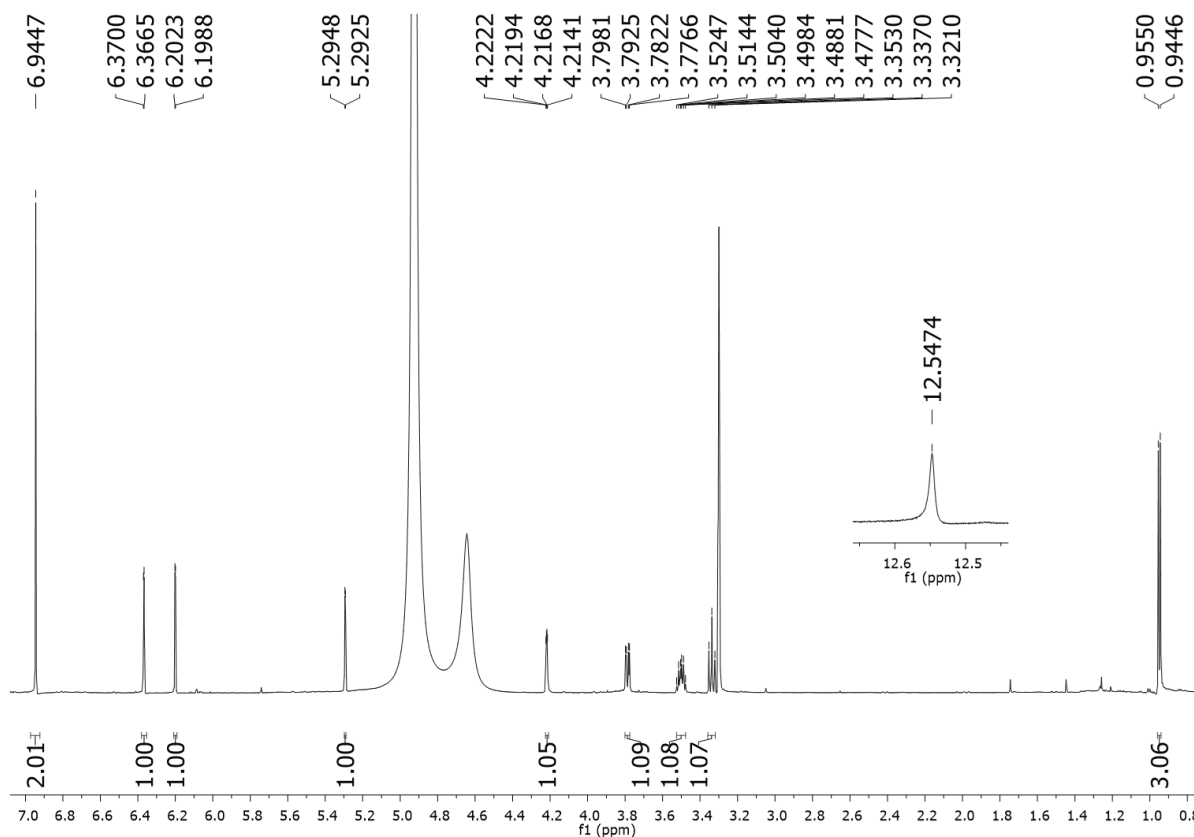


Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H da substância I (600 MHz, CD_3OD). Fonte: Autora (2017).

A análise do espectro de RMN de ^1H mostrou sinais característicos da aglicona miricetina. Observou-se sinais referentes a um sistema de substituição 3', 4', 5' no anel B com sinal em δ_{H} 6,94 (s, 2H) que foi atribuído aos hidrogênios na posição H-2' e H-6' que são magneticamente equivalentes, ou seja, estão no mesmo ambiente

químico e assim possuem equivalência no deslocamento químico. Também foram observados dois dubletos referentes a dois hidrogênios do anel A, δ_H 6,20 (*d*, 1H, $J=$ 2,0 Hz) e δ_H 6,37 (*d*, 1H, $J=$ 2,0 Hz), correspondentes aos hidrogênios na posição H-6 e H-8 respectivamente, típicos de acoplamento *meta* entre estes hidrogênios em um sistema AX.

No espectro de RMN de 1H foi verificado o sinal de deslocamento químico característico de metila de ramnose δ_H 0,95 (*d*, 3H, $J=$ 6,20 Hz), indicativo de uma unidade glicosídica como substituinte no esqueleto flavonoidico, que foi confirmado através do multiplete em δ_H 4,22 (*m*, H-2''), do duplo dubleto em δ_H 3,79 (*dd*, $J=$ 9,5 e 3,3 Hz, H-3''), do tripleto em δ_H 3,34 (*t*, $J=$ 9,5 Hz, H-4'') e do multiplete em δ_H 3,50 (*m*, H-5''). O sinal em δ_H 5,29 (*d*, 1H, $J=$ 1,5 Hz) refere-se ao hidrogênio anomérico e este valor de constante de acoplamento é característico de α -L-ramnosídeo, como pode ser verificado na Tabela 10. Também foi observado um sinal em δ_H 12,55 (*s*) indicando a presença de uma hidroxila quelatogênica em C-5 (SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009).

Tabela 10 - Grupo, configuração e constante de acoplamento dos glicosídeos (HARBORNE, 1994).

| Grupo | Glicosídeo | Configuração | $J_{H-1''/H-2''}$ (Hz) |
|--------------------|------------------------------|--------------|------------------------|
| Piranosídeo | D-glicose, galactose, xilose | - β - | 7 - 8 |
| | D-glicose, galactose, xilose | - α - | 3 - 4 |
| | L-ramnose | - β - | 1 |
| | L-ramnose | - α - | 2 |
| | L-arabinose | - β - | 2,5 |
| | L-arabinose | - α - | 8 |
| Furanosídeo | D-glicose, galactose, xilose | - β - | 0 - 2 |
| | D-glicose, galactose, xilose | - α - | 4 - 4,5 |
| | L-arabinose | - β - | 4 |
| | L-arabinose | - α - | 1 |

As Figuras 22, 23 e 24 apresentam o mapa de contornos COSY, e os mapas de correlações HSQC e HMBC, respectivamente, para a substância I.

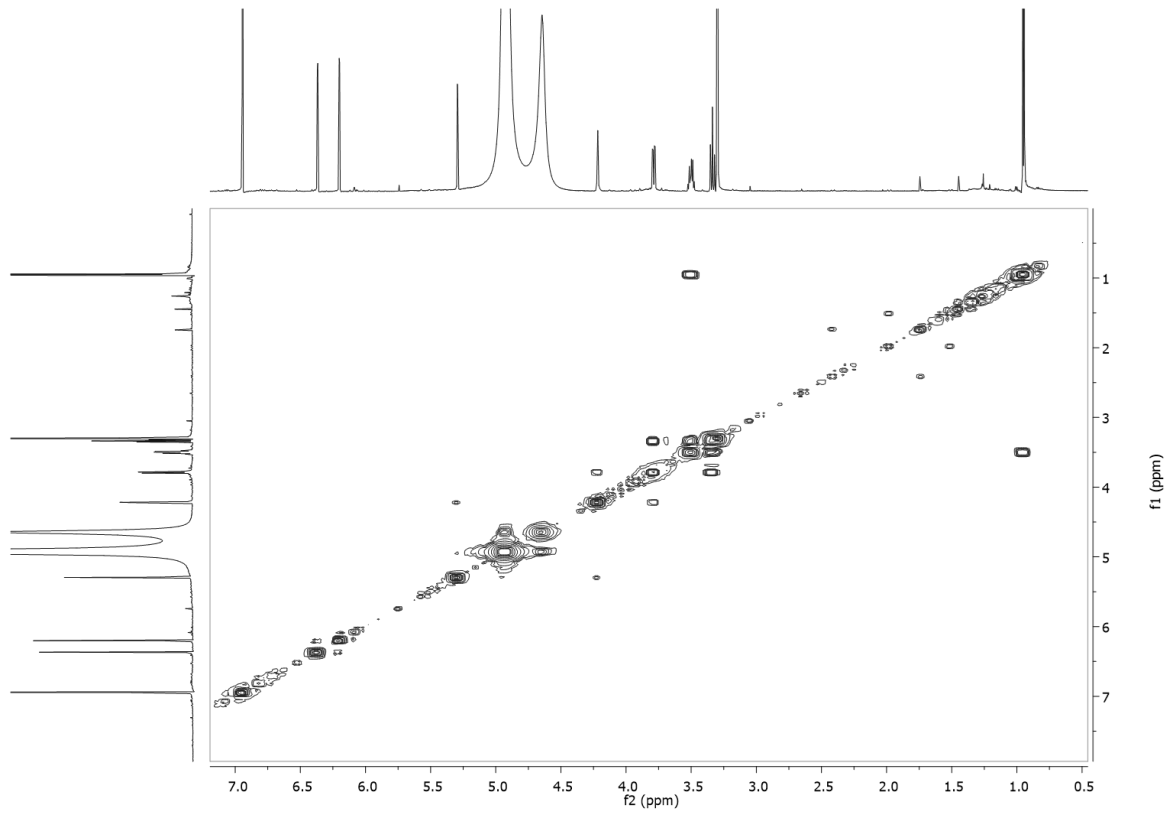


Figura 22 - Mapa de contornos COSY da substância I (600 MHz, CD₃OD).
Fonte: Autora (2017).

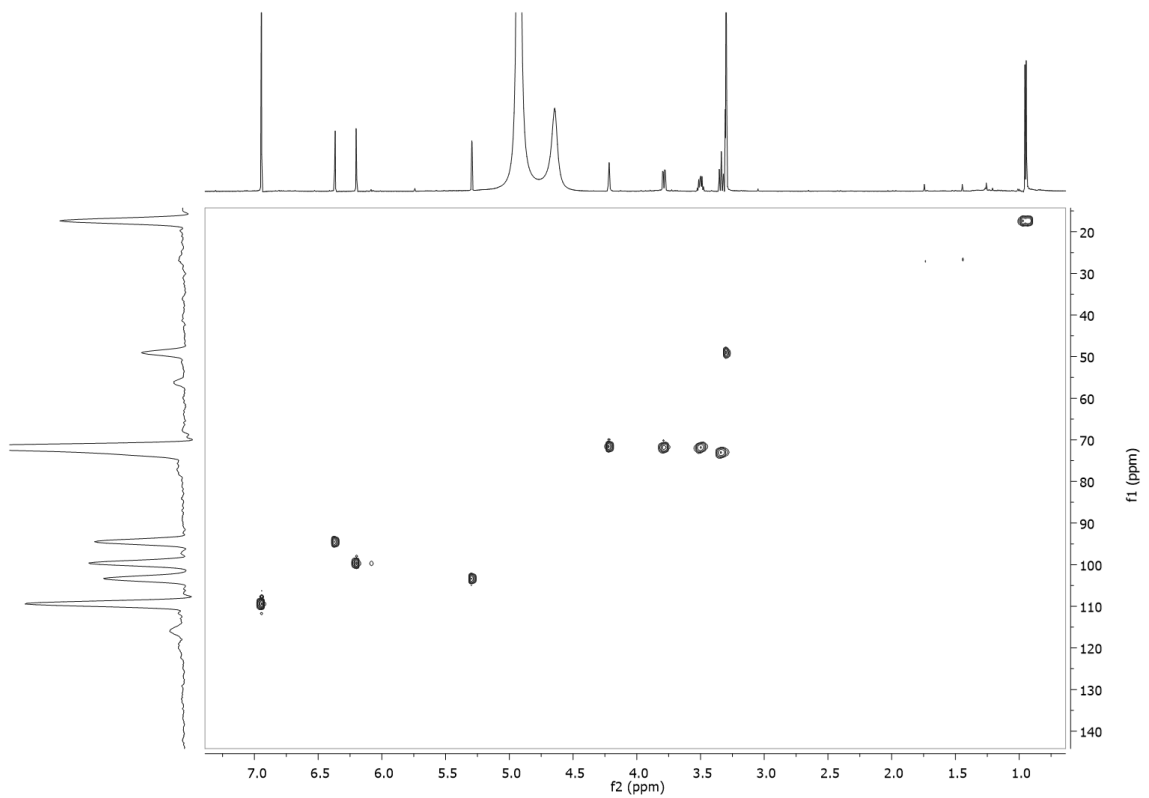


Figura 23 - Mapa de correlações HSQC da substância I (600 MHz, CD₃OD).
Fonte: Autora (2017).

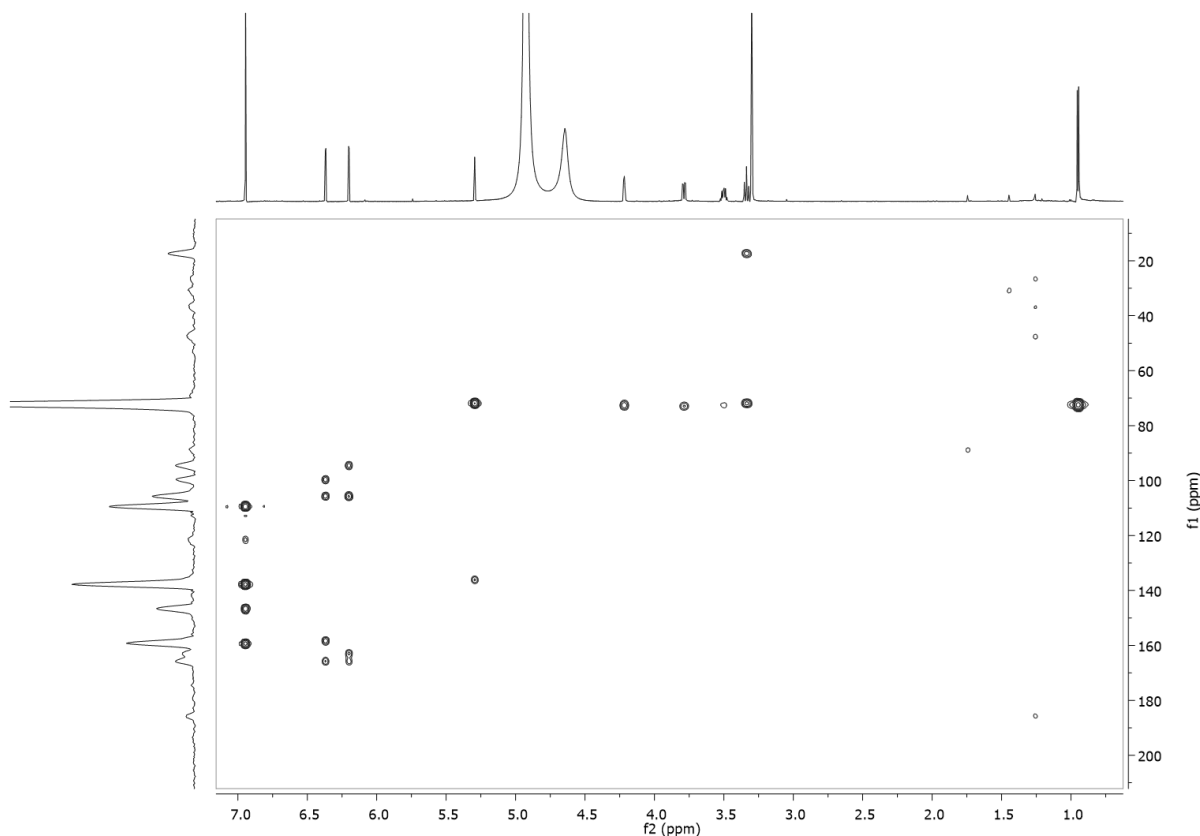


Figura 24 - Mapa de correlações HMBC da substância I (600 MHz, CD₃OD).
Fonte: Autora (2017).

No mapa de contornos COSY (Figura 22) as correlações para o anel A são confirmadas através do hidrogênio em δ_H 6,20 se correlacionando com o hidrogênio em δ_H 6,37. No COSY também foi possível observar as interações dos átomos de hidrogênio presentes no anel da ramnose, onde o hidrogênio anomérico H-1'' se correlaciona diretamente com o hidrogênio δ_H 4,22 (*m*, H-2'') e este se correlaciona com o hidrogênio δ_H 3,79 (*dd*, $J=9,5$ e $3,3$ Hz, H-3''). O hidrogênio H-3'' se correlaciona com o tripleto δ_H 3,34 (*t*, $J=9,5$ Hz, H-4'') e o H-4'' se correlaciona com o multipletto em δ_H 3,50 (*m*, H-5''), e este com os hidrogênios da metila da ramnose, δ_H 0,95 (*d*, $J=6,20$ Hz).

Através do mapa de correlações HSQC (Figura 23) foi possível observar a correlação dos sinais de hidrogênio em δ_H 6,94 com o carbono em δ_C 109,4 (C-2' e C-6') correspondente ao anel B. Já para o anel A o mapa mostrou correlações entre os hidrogênios δ_H 6,20 e δ_H 6,37 com os carbonos δ_C 99,6 (C-6) e δ_C 94,5 (C-8) respectivamente. Para a unidade ramnosídica foi possível observar que os hidrogênios H-1'' e H-6'' estão diretamente ligados aos carbonos δ_C 103,3 (C-1'') e δ_C

17,4 (C-6''), respectivamente. Os demais hidrogênios glicosídicos estão ligados a carbonos na faixa de δ_c 71,6-73,0.

No mapa de correlações HMBC (Figura 24), o sinal do hidrogênio H-6 se correlaciona com os dos carbonos em δ_c 94,5 (C-8), δ_c 165,8 (C-7), δ_c 162,9 (C-5), δ_c 105,6 (C-10) e δ_c 179,5 (C-4). Já o sinal do hidrogênio H-8 se correlaciona com os dos carbonos em δ_c 99,6 (C-6), δ_c 165,8 (C-7), δ_c 158,3 (C-9), δ_c 105,6 (C-10) e δ_c 179,5 (C-4), permitindo assim a atribuição de carbonos do anel A. Para o anel B o mesmo raciocínio foi aplicado, sendo a correlação do sinal em δ_H 6,94 com os dos carbonos em δ_c 109,4 (C-2' e C-6'), δ_c 146,6 (C-3' e C-5'), δ_c 137,8 (C-4'), δ_c 121,5 (C-1') e δ_c 159,3 (C-2), com isso foi possível atribuir os valores de carbono tanto para o anel A como para o anel B.

Determinou-se a posição do glicosídeo na aglicona através do mapa de correlações HMBC, por meio da correlação do hidrogênio anomérico com o carbono δ_c 136,1 que foi atribuído ao C-3 do anel C do flavonol, confirmando assim a posição de substituição da unidade de ramnose.

Com base nos dados descritos acima, a substância **I** foi identificada como o flavonol miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo, relatada pela primeira vez nas espécies de *E. pyriformis* e *E. handroana*, representada na Figura 25.

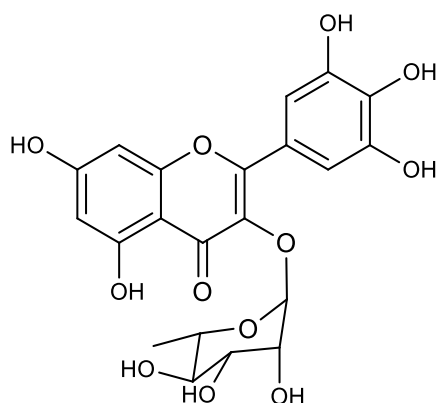


Figura 25 - Estrutura química da miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo

Fonte: Autora (2017).

Os dados de RMN de 1H para a substância **I** e para miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo, de acordo com a literatura, estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 - Comparação dos dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 600 MHz) obtidos para a substância I com os dados descritos na literatura para o composto miricetina-3-O- α -L-raminosídeo (ISIDORO et al., 2012: CD_3OD , 400 MHz para RMN de ^1H e 50 MHz para RMN de ^{13}C).

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|---------|-------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------|
| | Substância I | ISIDORO et al., 2012 | Substância I | ISIDORO et al., 2012 |
| 2 | - | - | 159,3 | 159,6 |
| 3 | - | - | 136,1 | 136,5 |
| 4 | - | - | 179,5 | 179,4 |
| 5 | - | - | 162,9 | 163,4 |
| 6 | 6,20 (<i>d</i> , 2,0) | 6,20 (<i>d</i> , 2,0) | 99,6 | 100,0 |
| 7 | - | - | 165,8 | 166,3 |
| 8 | 6,37 (<i>d</i> , 2,0) | 6,42 (<i>d</i> , 2,0) | 94,5 | 94,9 |
| 9 | - | - | 158,3 | 158,7 |
| 10 | - | - | 105,6 | 106,0 |
| 1' | - | - | 121,5 | 122,1 |
| 2' | 6,94 (<i>s</i>) | 6,95 (<i>s</i>) | 109,4 | 109,7 |
| 3' | - | - | 146,6 | 147,0 |
| 4' | - | - | 137,8 | 138,1 |
| 5' | - | - | 146,6 | 147,0 |
| 6' | 6,94 (<i>s</i>) | 6,95 (<i>s</i>) | 109,4 | 108,5 |
| RAMNOSE | | | | |
| 1'' | 5,29 (<i>d</i> , 1,5) | 5,31 (<i>d</i> , 2,0) | 103,3 | 103,8 |
| 2'' | 4,22 (<i>m</i>) | 4,21 (<i>dd</i> , 3,2 e 1,8) | 71,6 | 71,8 |
| 3'' | 3,79 (<i>dd</i> , 9,5 e 3,3) | 3,78 (<i>dd</i> , 9,2 e 3,2) | 71,8 | 72,2 |
| 4'' | 3,34 (<i>t</i> , 9,5) | 3,33 (<i>t</i> , 9,2) | 73,0 | 72,3 |
| 5'' | 3,50 (<i>m</i>) | 3,51 (<i>m</i>) | 71,9 | 72,0 |
| 6'' | 0,95 (<i>d</i> , 6,20) | 0,94 (<i>d</i> , 5,6) | 17,4 | 17,8 |
| 5-OH | 12,55 (<i>s</i>) | - | - | - |

Fonte: Autora (2017).

Nos espectros de massas obtidos para os flavonoides O-glicosilados podem ser diagnosticadas as clivagens que sofrem as ligações O-glicosídicas. Podem ocorrer dois tipos: homolítica e heterolítica. A clivagem homolítica origina um íon radicalar $[\text{Y}_0\text{-H}]^{\cdot-}$, que se refere ao radical aglicona desprotonado. Já a clivagem heterolítica

origina a aglicona desprotonada $[Y_0^-]$. (HVATTUM; EKERBERG, 2003, CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

Os espectros de massas de primeira e de segunda ordem para a substância I são apresentados nas Figuras 26 e 27, respectivamente.

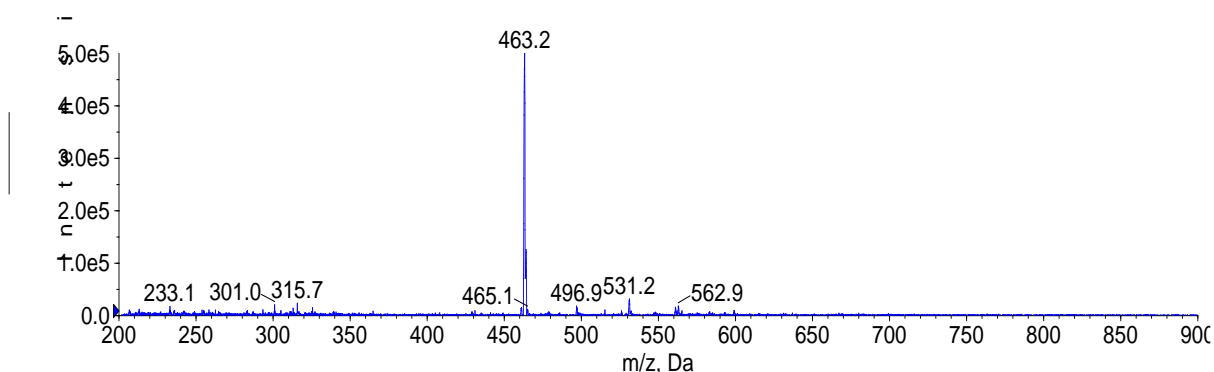


Figura 26 - Espectro de massas de primeira ordem por infusão direta no modo negativo *full-scan* da substância I. Faixa de íons 200 a 900 m/z (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

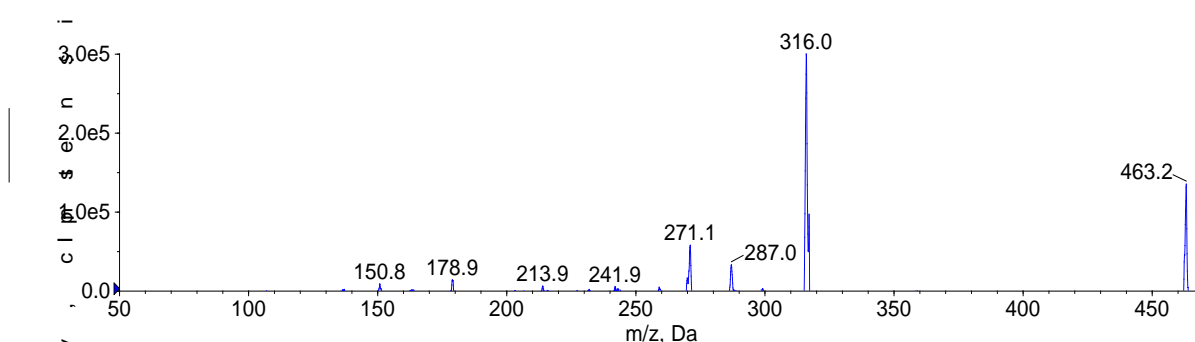


Figura 27 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 463 em modo negativo com energia de colisão 30 eV e faixa de íons 50 a 470 m/z (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

No espectro de massas de primeira ordem (Figura 26) podemos observar o sinal mais intenso de m/z 463. Este íon confirmou a massa molecular da miricetrina, com o auxílio da base de dados Massbank Project e Fabre et al. (2001). No espectro de massas de segunda ordem (Figura 27), o fragmento ($[M-H-147]^-$), referente ao sinal de m/z 316, comprova a perda de uma ramnose (147 Da) formando a aglicona miricetina sucedida por meio de uma clivagem do tipo homolítica. Os fragmentos em m/z 151 ($[M-H-147-165]^-$) e m/z 287 ($[M-H-147-29]^-$) são referentes à quebra do anel pirano sendo respectivamente uma reação de Retro Diels-Alder e uma reação de perda de CO. A formação do fragmento em m/z 271 ($[M-H-147-45]^-$) ocorre devido à perda de CO₂ e de um hidrogênio. Para o fragmento em m/z 179 ocorre uma retrociclicação deste flavonoide indicada pela perda de 137 Da (FABRE et al., 2001;

TIBERTI et al.,2007). Nas Figuras 75 a 81 das páginas 105-107, estão indicados os mecanismos de fragmentação geral de compostos da classe dos flavonoides.

Desta forma, com os resultados de RMN e os fragmentos formados por espectrometria de massas, pode-se confirmar a identidade da substância I como sendo miricetina-3-O- α -L-raminosídeo.

4.7.2 Identificação das substâncias II e III

As substâncias II (minoritária) e III (majoritária) foram identificadas em mistura nas bandas 2CEp e 2CEh como um óleo amarelo escuro, e sua identificação foi realizada através de experimentos de RMN de ^1H , HSQC, HMBC, espectrometria de massas, CLAE-DAD e comparação com a literatura (WUST et al., 2016; GHANADIAN et al., 2012).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 28) foram constatados dois sinais de hidrogênios anoméricos δ_{H} 5,14 (*d*, *J*= 7,8 Hz, H_{III-1''}) e δ_{H} 5,23 (*d*, *J*= 7,8 Hz, H_{II-1''}) com integração de 1:0,50 respectivamente. Os dois sinais apresentam constante de acoplamento de 7,8 Hz, valor característico para os piranosídeos glucose, galactose e xilose (Tabela 10). Os espectros apresentados referem-se à banda 2CEh.

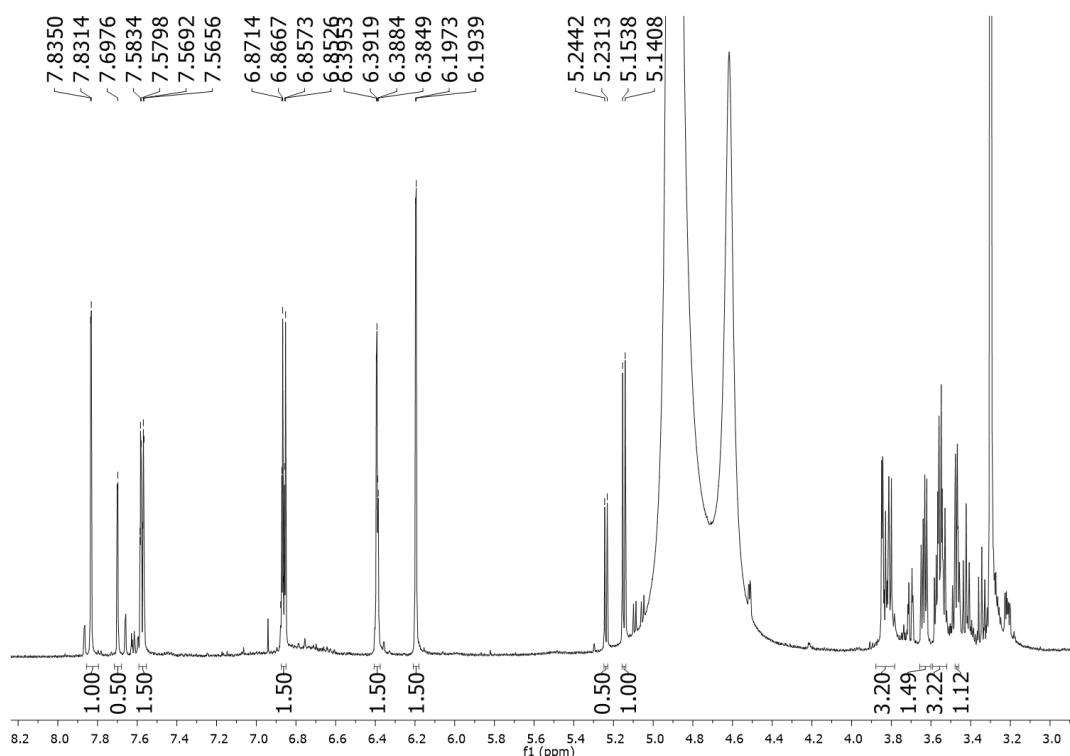


Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H da substância II e III (600 MHz, CD_3OD).
Fonte: Autora (2017).

De acordo com o valor de integração dos hidrogênios glicosídicos, 9,0 H, que corresponde a 6 hidrogênios da substância majoritária (III) (1H), e 6 hidrogênios da substância minoritária (II) (0,50H), pode-se concluir que os compostos apresentam unidades glicosídicas e galactosídicas como substituintes na estrutura da aglicona. A semelhança estrutural das duas substâncias pode ser comprovada também por CLAE-DAD, no qual observa-se apenas uma banda apesar da tentativa de otimização das condições cromatográficas para que os compostos fossem separados. Estes dados indicam um mecanismo muito similar de interação de ambos os compostos com a coluna, dificultando a separação dos mesmos, como pode ser observado no cromatograma da Figura 29, e também por espectrometria de massas, onde o m/z 463 é o mesmo para ambas substâncias, que apresentaram massa molecular idênticas de 464 Da.

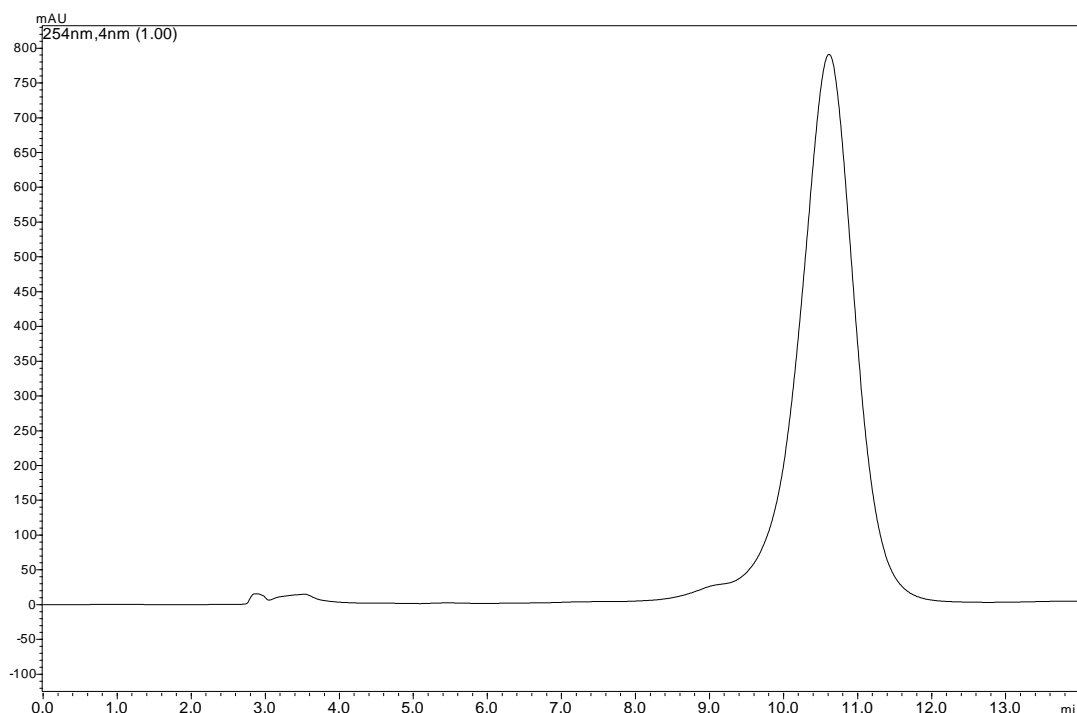


Figura 29 - Cromatograma da banda 2CEh.

Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadesil silano (C_{18}) (250 x 4,6 mm, 5 μ m d.i.), com volume de injeção de 15 μ L e eluição em modo isocrático 45% B utilizando como fases móveis H_2O (A) e MeOH (B). A vazão utilizada foi de 1,0 mL.min⁻¹ e $\lambda = 254$ nm. Fonte: Autora (2017).

A análise do espectro de RMN de 1H mostrou sinais de hidrogênios característicos da aglicona de quercetina para as duas substâncias. Para o anel A, foram observados dois sinais δ_H 6,39 (d , $J = 2,0$ Hz, H_{II-8}/H_{III-8}) e δ_H 6,19 (d , $J = 2,0$ Hz, H_{II-6}/H_{III-6}), típicos de um acoplamento *meta* neste anel em um sistema AX. Como os

dois sinais estão integrados para 1,50 H, estes se referem ao anel A dos dois compostos apresentados. Foram constatados ainda para o anel B sinais em δ_H 7,83 (*d*, $J = 2,2$ Hz, H-2') referente ao composto majoritário, δ_H 7,70 (*d*, $J = 2,1$ Hz, H-2') referente ao composto minoritário e a sobreposição dos sinais das substâncias em δ_H 6,86 (*d*, $J = 8,5$, H_{II}-5'/H_{III}-5') e δ_H 7,57 (*dd*, $J = 8,4$ e $2,0$ Hz, H_{II}-6'/H_{III}-6') onde o sinal de integração corresponde a 1,50 H em ambos os sinais. De acordo com as constantes de acoplamento, podemos observar que os H-6' acoplam em *meta* com os H-2' e em *orto* com os H-5'. Assim, com base nos dados analisados, os sinais no espectro de RMN de ^1H são de duas substâncias flavonoidicas derivadas de quercetina em que uma é substituída com uma unidade glicosídica e a outra com uma unidade galactosídica.

Através dos mapas de correlações HSQC (Figura 30) e HMBC (Figura 31) foi possível atribuir todos os carbonos das agliconas para os dois compostos.

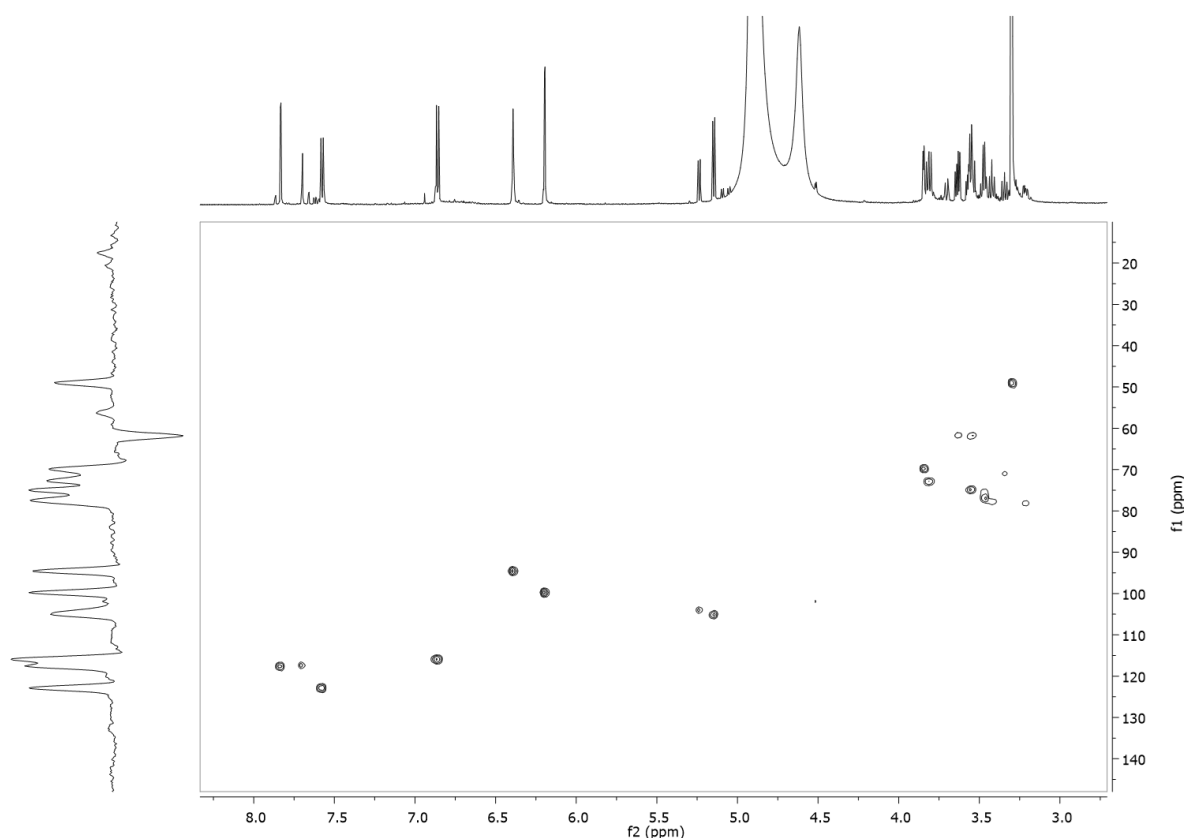


Figura 30 - Mapa de correlações HSQC da substância II e III (600 MHz, CD_3OD).
Fonte: Autora (2017).

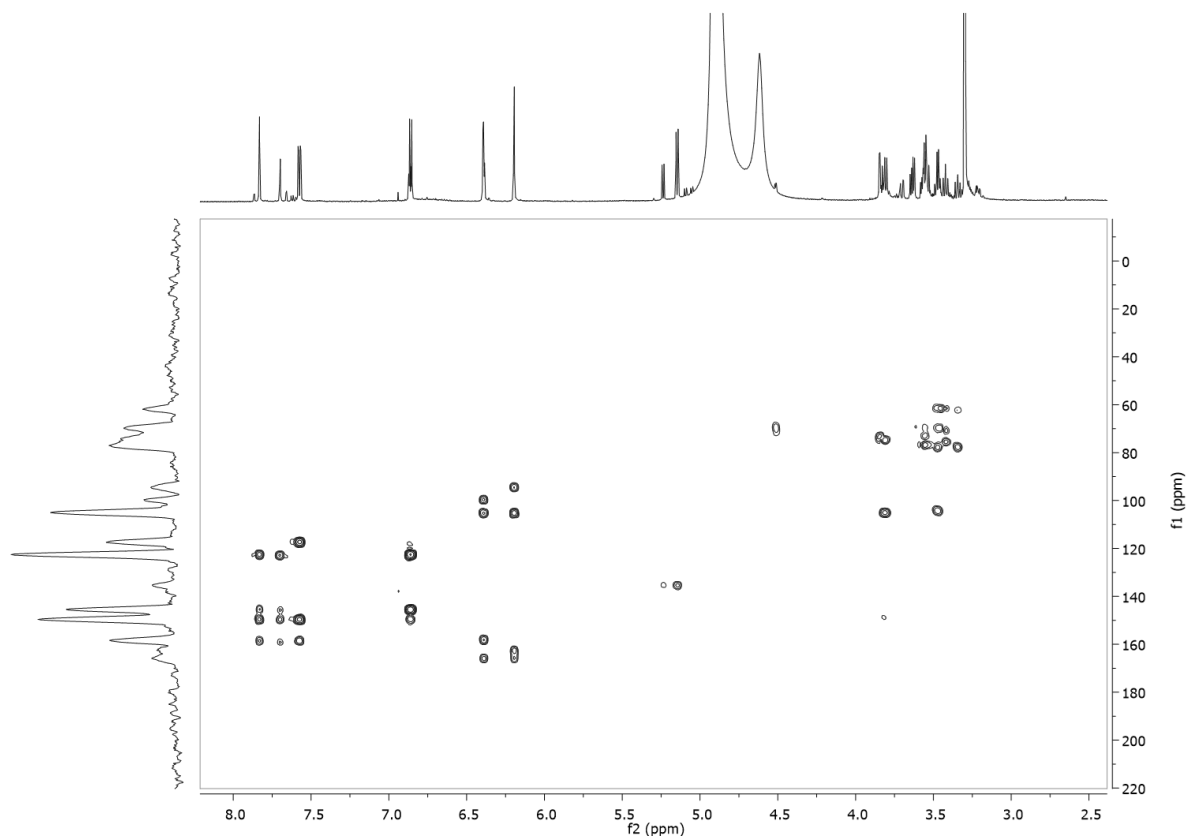


Figura 31 - Mapa de correlações HMBC da substância II e III (600 MHz, CD₃OD).
Fonte: Autora (2017).

Os dois resíduos de açúcar foram confirmados na posição C-3 através das correlações entre os hidrogênios anoméricos $\delta_{\text{H}} 5,14$ (H_{III-1''}) e $\delta_{\text{H}} 5,23$ (H_{II-1''}) com os carbonos $\delta_{\text{C}} 135,4$ (C_{III-3}) e $\delta_{\text{C}} 135,3$ (C_{II-3}), respectivamente através do mapa de correlações HMBC. Os hidrogênios das unidades de açúcar restantes foram observados na faixa de $\delta_{\text{H}} 3,40$ - $3,85$ enquanto que os demais carbonos foram observados na faixa de $\delta_{\text{C}} 61,6$ - $78,1$.

Desta forma as duas substâncias foram identificadas como quercetina-3-O- β -D-glicosídeo (II) e quercetina-3-O- β -D-galactosídeo (III), ambas relatadas pela primeira vez nas espécies de *E. pyriformis* e *E. handroana*. As estruturas dessas substâncias estão representadas na Figura 32 e Figura 33.

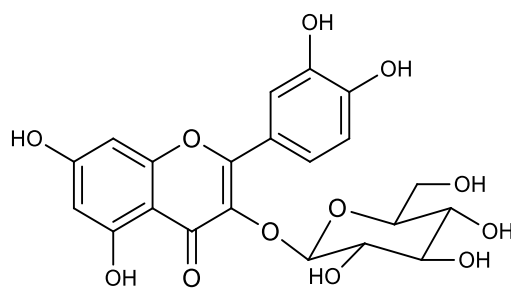


Figura 32 - Estrutura química da quercetina-3-O- β -D-glicosídeo (II)
Fonte: Autora (2017).

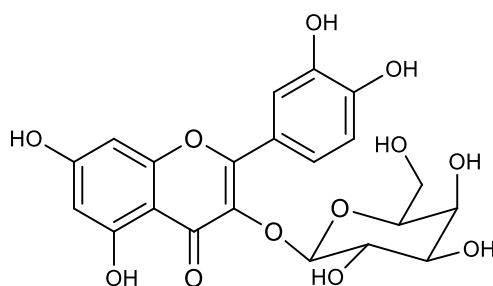


Figura 33 - Estrutura química da quercetina-3-O- β -D-galactosídeo (III)
Fonte: Autora (2017).

Os dados de RMN de ^1H para a substância II e para quercetina-3-O- β -D-glicosídeo, de acordo com a literatura, estão representados na Tabela 12, e os dados para a substância III e quercetina-3-O- β -D-galactosídeo estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 12 - Comparação dos dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 600 MHz) obtidos da substância II com os dados descritos na literatura do composto quercetina-3- O - β - D -glicosídeo (WUST et al., 2016: CD_3OD , 300 MHz para RMN de ^1H e 75 MHz para RMN de ^{13}C).

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------|
| | Substância II | WUST et al., 2016 | Substância II | WUST et al., 2016 |
| 2 | - | - | 159,1 | 158,9 |
| 3 | - | - | 135,3 | 135,6 |
| 4 | - | - | 179,4 | 179,4 |
| 5 | - | - | 162,5 | 163,0 |
| 6 | 6,19 (<i>d</i> , 2,0) | 6,19 (<i>s</i>) | 99,7 | 99,9 |
| 7 | - | - | 165,8 | 166,2 |
| 8 | 6,39 (<i>d</i> , 2,0) | 6,38 (<i>s</i>) | 94,5 | 94,7 |
| 9 | - | - | 158,1 | 158,4 |
| 10 | - | - | 105,2 | 105,6 |
| 1' | - | - | 122,8 | 123,2 |
| 2' | 7,70 (<i>d</i> , 2,1) | 7,70 (<i>d</i> , 2,1) | 117,3 | 117,5 |
| 3' | - | - | 145,7 | 145,9 |
| 4' | - | - | 149,6 | 149,8 |
| 5' | 6,86 (<i>d</i> , 8,5) | 6,85 (<i>d</i> , 8,7) | 115,9 | 115,9 |
| 6' | 7,57 (<i>dd</i> , 8,4 e 2,0) | 7,56 (<i>m</i>) | 122,8 | 123,0 |
| GLICOSE | | | | |
| 1'' | 5,23 (<i>d</i> , 7,8) | 5,24 (<i>d</i> , 7,5) | 104,0 | 104,3 |
| 2'' | 3,40-3,85 (<i>m</i>) | 3,45 (<i>m</i>) | 61,6-78,1 (<i>m</i>) | 75,7 |
| 3'' | 3,40-3,85 (<i>m</i>) | 3,42 (<i>t</i> , 9,0) | 61,6-78,1 (<i>m</i>) | 78,4 |
| 4'' | 3,40-3,85 (<i>m</i>) | 3,34 (<i>t</i> , 9,3) | 61,6-78,1 (<i>m</i>) | 71,2 |
| 5'' | 3,40-3,85 (<i>m</i>) | 3,23 (<i>m</i>) | 61,6-78,1 (<i>m</i>) | 78,1 |
| 6_A'' | 3,40-3,85 (<i>m</i>) | 3,57 (<i>dd</i> , 12,0 e 5,1) | 61,6-78,1 (<i>m</i>) | 62,5 |
| 6_B'' | 3,40-3,85 (<i>m</i>) | 3,71 (<i>dd</i> 11,7 e 2,1) | 61,6-78,1 (<i>m</i>) | 62,5 |

Fonte: Autora (2017).

Tabela 13 - Comparação dos dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 600 MHz) obtidos da substância III com os dados descritos na literatura do composto quercetina-3-O- β -D-galactosídeo (GHANADIAN et al., 2012: CD_3OD , 500 MHz para RMN de ^1H e 150 MHz para RMN de ^{13}C).

| H/C | δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|-------------------|--|-------------------------------|---------------------------|------------------------|
| | Substância III | GHANADIAN et al., 2012 | Substância III | GHANADIAN et al., 2012 |
| 2 | - | - | 158,5 | 158,4 |
| 3 | - | - | 135,4 | 135,6 |
| 4 | - | - | 179,4 | 179,5 |
| 5 | - | - | 162,5 | 163,0 |
| 6 | 6,19 (<i>d</i> , 2,0) | 6,16 (<i>d</i> , 2,5) | 99,7 | 100,5 |
| 7 | - | - | 165,8 | 169,0 |
| 8 | 6,39 (<i>d</i> , 2,0) | 6,35 (<i>d</i> , 2,0) | 94,5 | 95,2 |
| 9 | - | - | 158,1 | 158,4 |
| 10 | - | - | 105,2 | 105,5 |
| 1' | - | - | 122,5 | 122,8 |
| 2' | 7,83 (<i>d</i> , 2,2) | 7,82 (<i>d</i> , 2,0) | 117,6 | 117,3 |
| 3' | - | - | 145,5 | 145,9 |
| 4' | - | - | 149,6 | 150,8 |
| 5' | 6,86 (<i>d</i> , 8,5) | 6,85 (<i>d</i> , 8,5) | 115,9 | 116,0 |
| 6' | 7,57 (<i>dd</i> , 8,4 e 2,0) | 7,57 (<i>dd</i> , 8,5 e 2,0) | 122,8 | 123,1 |
| GALACTOSE | | | | |
| 1'' | 5,14 (<i>d</i> , 7,8) | 5,12 (<i>d</i> , 7,5) | 105,2 | 105,2 |
| 2'' | 3,40-3,85 (<i>m</i>) | 3,81 (<i>dd</i> , 9,5 e 7,5) | 61,6-78,1 (<i>m</i>) | 73,4 |
| 3'' | 3,40-3,85 (<i>m</i>) | 3,53 (<i>m</i>) | 61,6-78,1 (<i>m</i>) | 75,0 |
| 4'' | 3,40-3,85 (<i>m</i>) | 3,84 (<i>dl</i> , 3,0) | 61,6-78,1 (<i>m</i>) | 69,8 |
| 5'' | 3,40-3,85 (<i>m</i>) | 3,46 (<i>dd</i> , 6,5 e 6,0) | 61,6-78,1 (<i>m</i>) | 77,2 |
| 6 _A '' | 3,40-3,85 (<i>m</i>) | 3,56 (<i>m</i>) | 61,6-78,1 (<i>m</i>) | 61,9 |
| 6 _B '' | 3,40-3,85 (<i>m</i>) | 3,63 (<i>dd</i> 11,5 e 6,0) | 61,6-78,1 (<i>m</i>) | 61,9 |

Fonte: Autora (2017).

As Figuras 34 e 35 apresentam os espectros de massas de primeira e segunda ordem, respectivamente, para a banda contendo as substâncias II e III.

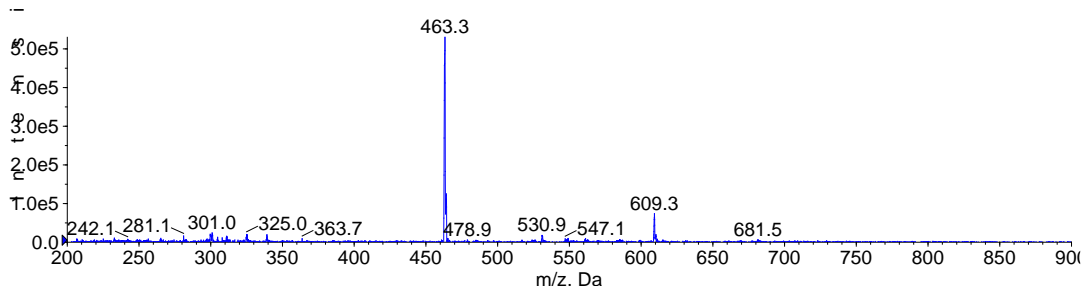


Figura 34 - Espectro de massas de primeira ordem em infusão direta no modo negativo *full-scan* da fração contendo as substâncias II e III. Faixa de íons 200 a 900 m/z (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

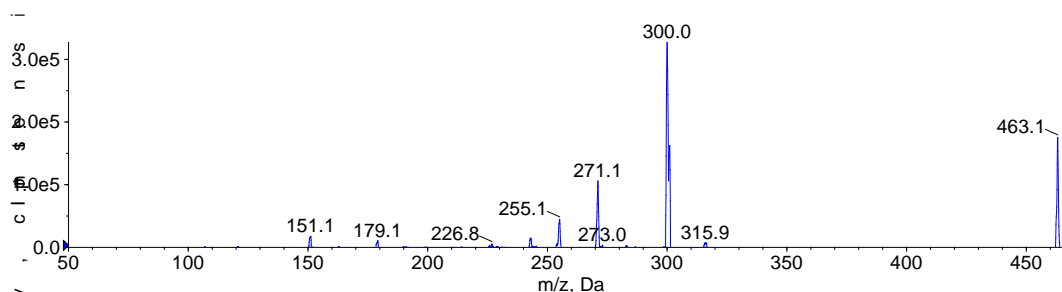


Figura 35 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 463 em modo negativo com energia de colisão 30 eV e faixa de íons 50 a 470 m/z (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

No espectro de massas (Figura 34) de primeira ordem podemos observar o sinal mais intenso m/z 463. Pelo espectro de massas de segunda ordem (Figura 35), foi possível confirmar a massa molecular de quercetina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo e quercetina-3-*O*- β -*D*-galactosídeo, sendo de 464 Da (g/mol) (por auxílio da base de dados Massbank Project). O fragmento ($[M-H-163]^-$) referente ao sinal m/z 300 comprova a perda de uma hexose (163 Da) por meio de clivagem homolítica, formando a aglicona quercetina. Os fragmentos em m/z 151 ($[M-H-163-149]^-$), e m/z 271 ($[M-H-163-29]^-$) são referentes à quebra do anel pirano (Figura 19). A formação do fragmento em m/z 255 ($[M-H-163-45]^-$) ocorre devido à perda de CO_2 e um hidrogênio e o fragmento m/z 179 ocorre uma retrociclização deste flavonoide indicada pela perda de 121 Da (FABRE et al., 2001; TIBERTI et al., 2007). Nas Figuras 75 a 81 das páginas 105-107, estão indicados os mecanismos de fragmentação geral de compostos da classe dos flavonoides.

4.7.3 Identificação da substância IV

A substância **IV** foi isolada da banda 3CEh como um óleo amarelo escuro, e sua identificação foi realizada através de experimentos de RMN de ^1H , COSY, HSQC, HMBC, espectrometria de massas e comparação com a literatura (MOREIRA, 2009).

A análise do espectro de RMN de ^1H mostrou sinais característicos da aglicona quercetina. Observou-se sinais referentes a um sistema de substituição 3', 4' no anel B com sinais em δ_{H} 7,74 (*d*, $J = 2,2$ Hz, H-2'), δ_{H} 6,87 (*d*, $J = 8,4$ Hz, H-5') e δ_{H} 7,57 (*dd*, $J = 8,5$ e $2,2$ Hz, H-6') integrados para um hidrogênio. Os valores das constantes revelam um acoplamento em *orto* entre H-6' e H-5' e um acoplamento em *meta* entre H-6' e H-2'. Também foram observados um dubleto e um singleto referentes a dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,20 (*d*, $J = 1,8$ Hz) e δ_{H} 6,40 (*s*) correspondentes aos hidrogênios na posição H-6 e H-8 respectivamente, sendo estes sinais característicos de um sistema de acoplamento AX. Estas conclusões podem ser observadas na Figura 36.

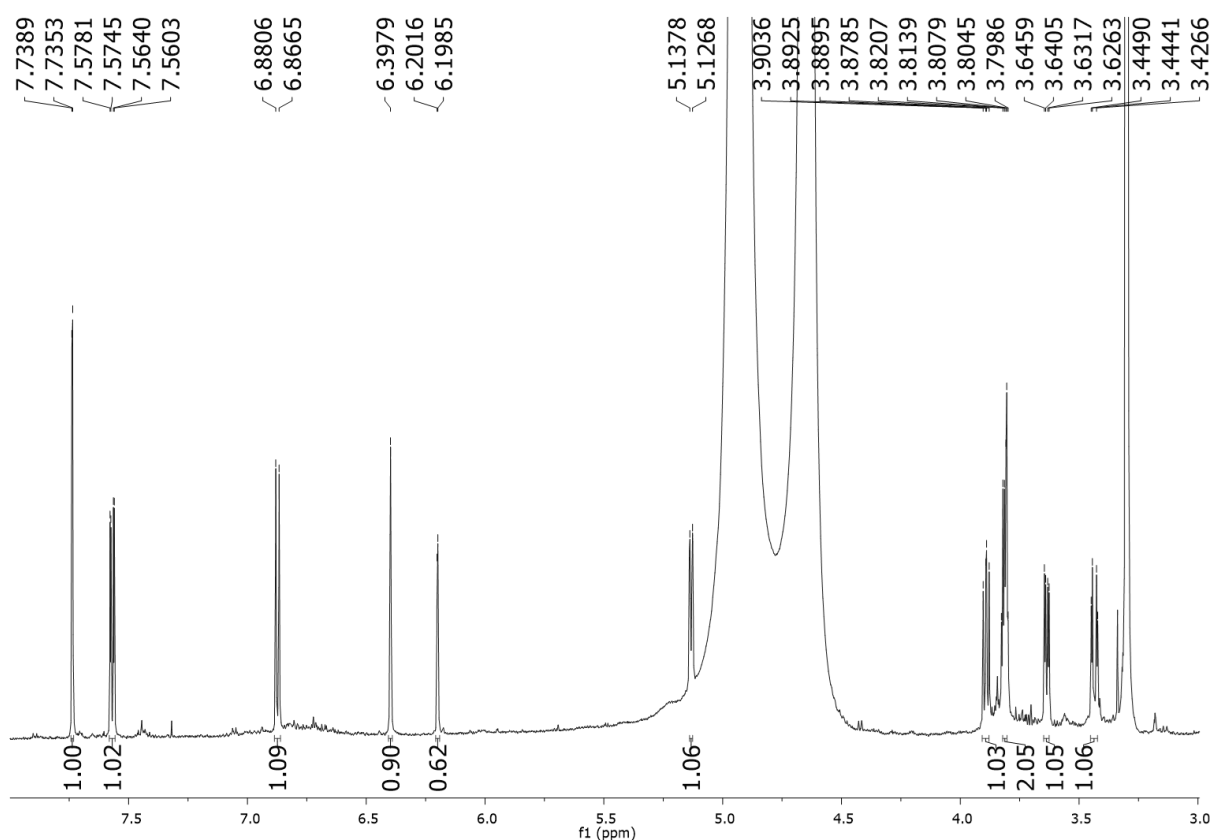


Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H da substância **IV** (600 MHz, CD_3OD).
Fonte: Autora (2017).

No espectro de RMN de ^1H foi verificado a presença de um sinal em δ_{H} 5,13 (d , $J= 6,9$ Hz, H-1'') sendo este sinal atribuído ao hidrogênio anomérico, sendo que sua constante de acoplamento é característica de β -D-xilopiranosídeo, como pode ser verificado na Tabela 10. Assim, a xilose, é a unidade glicosídica ligada a aglicona de quercetina, que apresenta os seguintes sinais: δ_{H} 3,89 (dd , $J= 6,6$ e 8,8 Hz, H-2''), δ_{H} 3,64 (dd , $J= 3,3$ e 8,5 Hz, H-3''), δ_{H} 3,80-3,83 (m , H-4'' e H-5A'') e δ_{H} 3,44 (dd , $J= 2,8$ e 13,6 Hz, H-5B'') que foram reafirmados com o mapa de contornos COSY. Os hidrogênios H-5'' apresentam valores distintos por estarem em ambientes químicos diferentes, sendo assim, hidrogênios diastereotópicos.

O mapa de contornos COSY, e os mapas de correlações HSQC e HBMC para a substância **IV** são apresentados, respectivamente, nas Figuras 37, 38, 39 e 40.

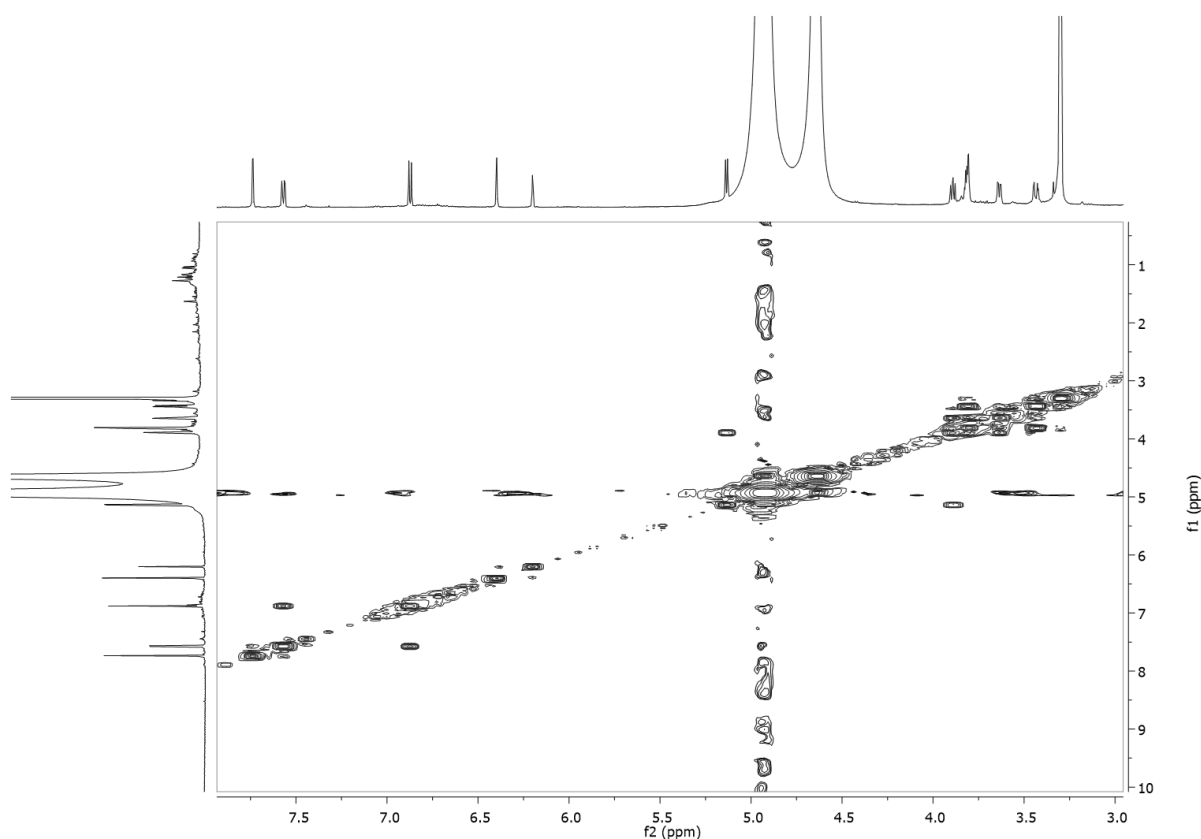


Figura 37 - Mapa de contornos COSY da substância **IV** (600 MHz, CD_3OD).
Fonte: Autora (2017).

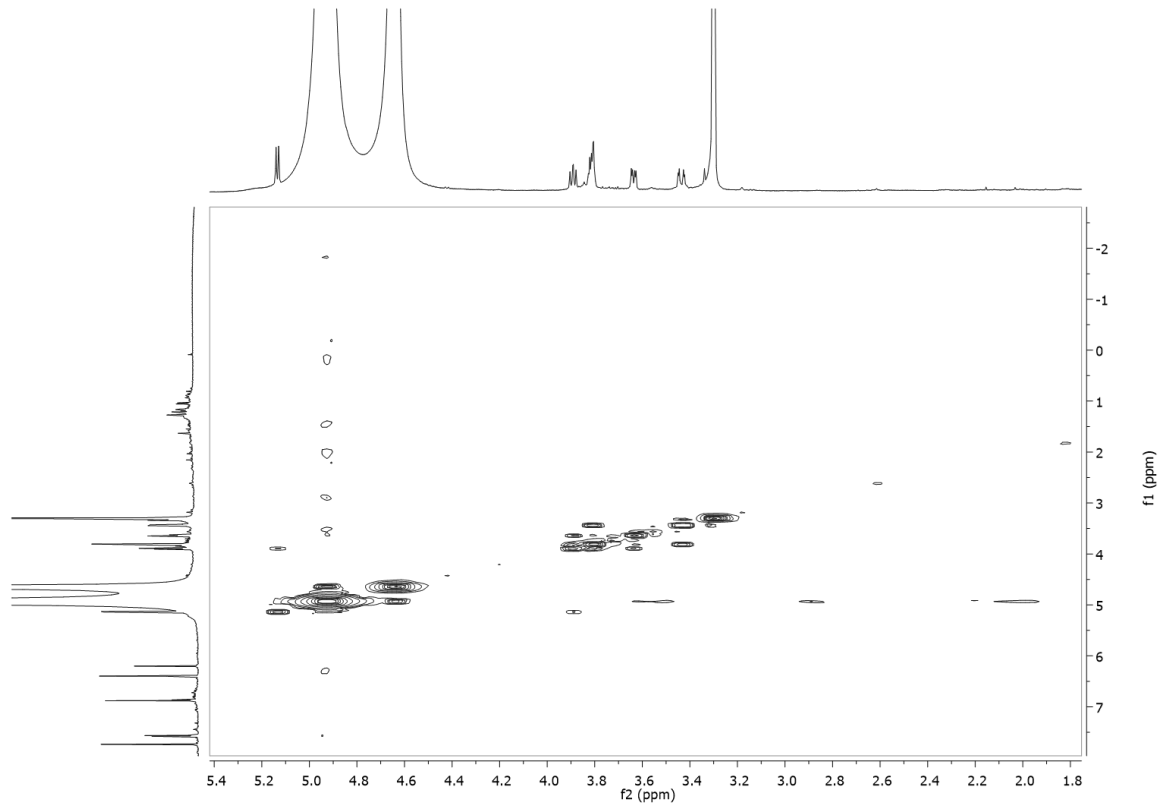


Figura 38 - Expansão do mapa de contornos COSY da substância **IV** (600 MHz, CD₃OD).
Fonte: Autora (2017).

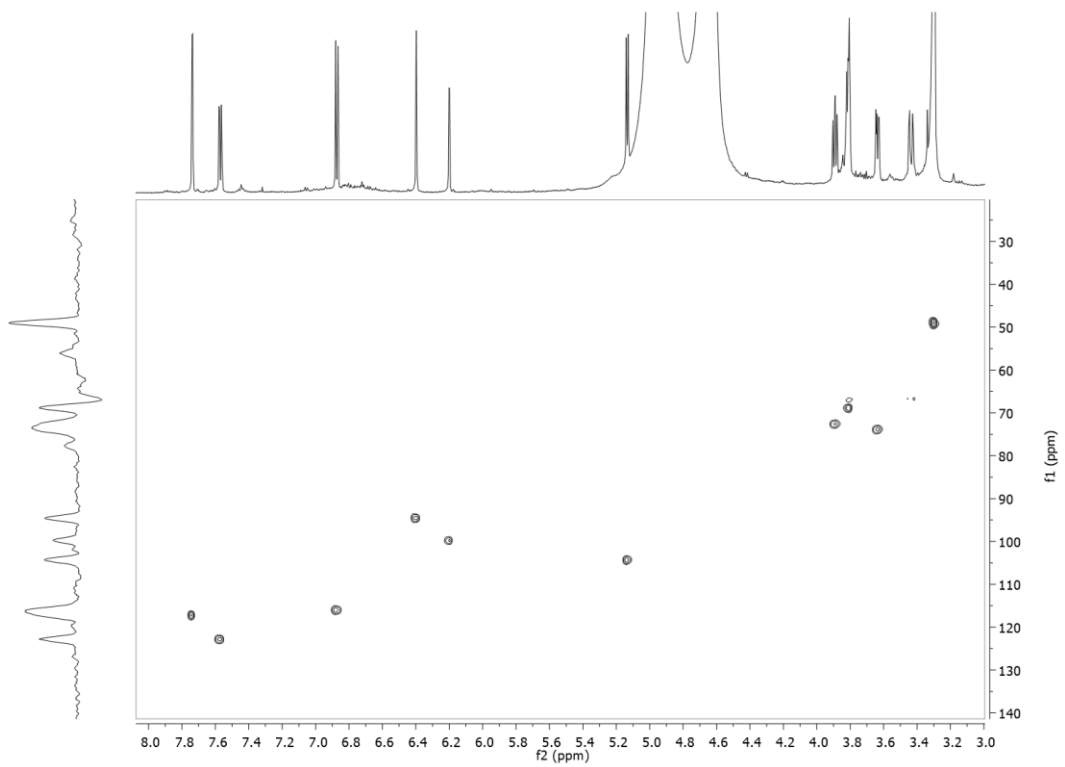


Figura 39 - Mapa de correlações HSQC da substância **IV** (600 MHz, CD₃OD).
Fonte: Autora (2017).

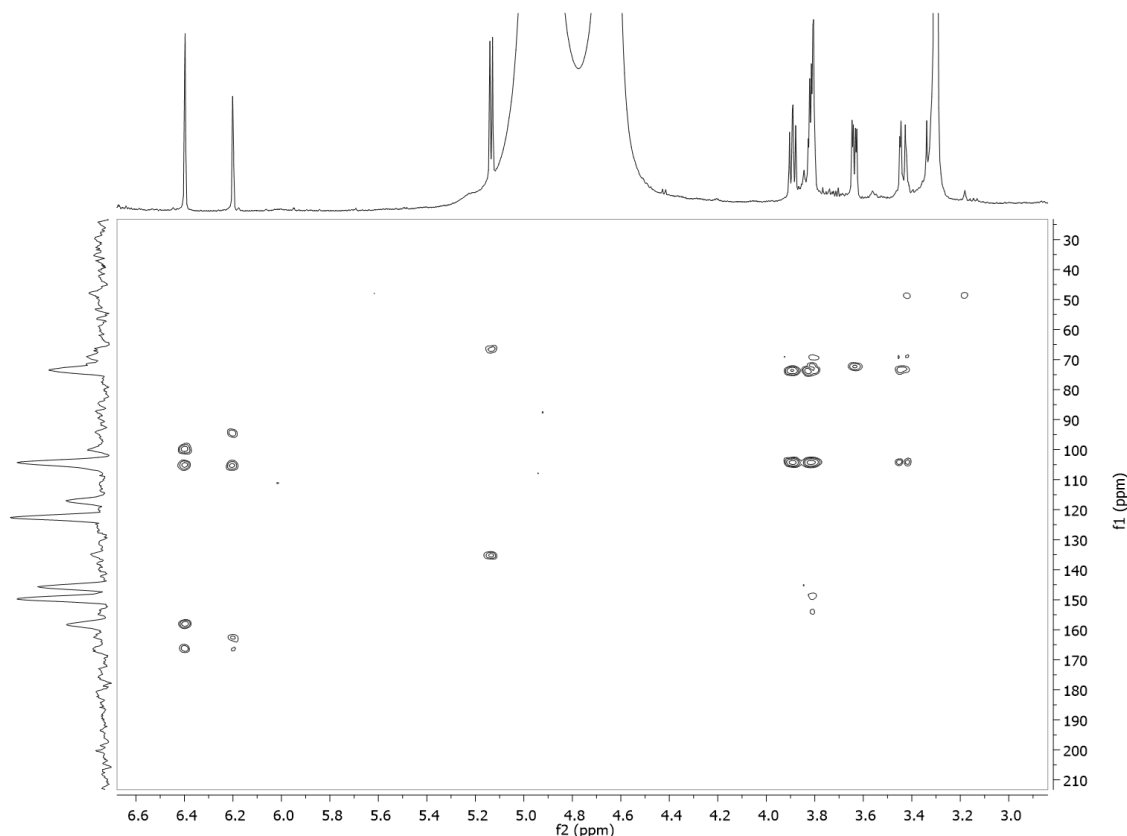


Figura 40 - Mapa de correlações HMBC da substância **IV** (600 MHz, CD₃OD).
Fonte: Autora (2017).

No mapa de contornos COSY (Figura 37) as correlações para o anel A são confirmadas através do hidrogênio em δ_{H} 6,20, se correlacionando com o hidrogênio em δ_{H} 6,40. Na expansão do COSY (Figura 38) também foi possível observar as interações dos átomos de hidrogênio presentes no anel da xilose, onde o hidrogênio anomérico H-1'' se correlaciona diretamente com o hidrogênio δ_{H} 3,89 (*dd*, $J = 6,6$ e $8,8$ Hz, H-2'') e este se correlaciona com o hidrogênio δ_{H} 3,64 (*dd*, $J = 3,3$ e $8,5$ Hz, H-3''). O hidrogênio H-3'' se correlaciona com o multipletto δ_{H} 3,80-3,83 (*m*, H-4'') e o H-4'' se correlaciona com o duplo dubleto em δ_{H} 3,44 (*dd*, $J = 2,8$ e $13,6$ Hz, H-5_B''), e este com os hidrogênios do multipletto δ_{H} 3,80-3,83 (*m*, H-4'' e H-5_A'').

Através do mapa de correlações HSQC (Figura 39) foi possível observar a correlação dos sinais dos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' com os respectivos carbonos: δ_{C} 117,1 (C-2'), δ_{C} 116,0 (C-5') e δ_{C} 122,7 (C-6'), correspondentes ao anel B. Já para o anel A o mapa mostrou correlações entre os hidrogênios H-6 e H-8 com os carbonos δ_{C} 99,8 (C-6) e δ_{C} 94,5 (C-8) respectivamente. Para a unidade xilosídica foi possível observar o hidrogênio anomérico H-1'' se correlacionando com o δ_{C} 104,2 (C-1''), o

H-2" com δ_c 72,6 (C-2"), H-3" com δ_c 73,8 (C-3"), H-4" com δ_c 68,8 e H_A/H_B – 5" com δ_c 66,7 (C-5").

No mapa de correlações HMBC (Figura 40), o sinal do hidrogênio H-6 se correlaciona com os dos carbonos C-8, C-7, C-5 e C-10. Já o sinal do hidrogênio H-8 se correlaciona com os dos carbonos em C-6, C-7, C-9 e C-10, permitindo assim a atribuição de carbonos do anel A. Para o anel B o mesmo raciocínio foi aplicado, sendo a correlação do H-2' com os carbonos C-2, C-3', C-4' e C-6', o hidrogênio H-5' com os carbonos C-1', C-3', C-4' e o hidrogênio H-6' se correlaciona com os carbonos C-2', C-4' e C-2. Desta forma foi possível atribuir os valores de carbono tanto para o anel A como para o anel B.

Determinou-se a posição do glicosídeo na aglicona através do mapa de correlações HMBC através da correlação do hidrogênio anomérico com o carbono δ_c 135,2 que foi atribuído ao C-3 do anel C do flavonol, confirmando assim a posição de substituição da unidade de xilose.

Segundo os dados descritos acima, a substância **IV** foi identificada como quercetina-3-O- β -D-xilopiranosídeo, pela primeira vez relatada para a espécie *E. handroana*, sendo representada na Figura 41. A Tabela 14 apresenta os dados de RMN de ¹H para a substância **IV** e para quercetina-3-O- β -D-xilopiranosídeo, de acordo com a literatura.

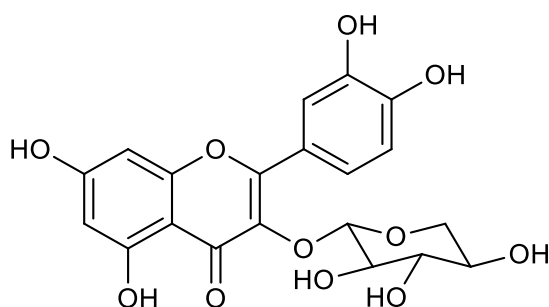


Figura 41 - Estrutura química da quercetina-3-O- β -D-xilopiranosídeo
Fonte: Autora (2017).

Tabela 14 - Comparação dos dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 600 MHz) obtidos da substância IV com os dados descritos na literatura do composto quercetina-3- O - β - D -xilopiranosídeo (MOREIRA, 2009: CD_3OD , 300 MHz para RMN de ^1H e 75 MHz RMN de ^{13}C).

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|---------------|--|--|---------------------------|---------------|
| | Substância IV | MOREIRA, 2009 | Substância IV | MOREIRA, 2009 |
| 2 | - | - | 158,2 | 158,5 |
| 3 | - | - | 135,2 | 135,5 |
| 4 | - | - | - | 179,3 |
| 5 | - | - | 162,5 | 162,9 |
| 6 | 6,20 (<i>d</i> , 1,8) | 6,16 (<i>d</i> , 2,1) | 94,5 | 99,84 |
| 7 | - | - | 165,5 | 165,9 |
| 8 | 6,40 (<i>s</i>) | 6,35 (<i>d</i> , 2,1) | 94,5 | 94,7 |
| 9 | - | - | 158,0 | 158,3 |
| 10 | - | - | 105,3 | 105,5 |
| 1' | - | - | 122,4 | 122,8 |
| 2' | 7,74 (<i>d</i> , 2,1) | 7,74 (<i>d</i> , 2,1) | 117,1 | 117,4 |
| 3' | - | - | 145,8 | 145,8 |
| 4' | - | - | 149,7 | 149,8 |
| 5' | 6,87 (<i>d</i> , 8,4) | 6,85 (<i>d</i> , 8,4) | 116,0 | 116,1 |
| 6' | 7,57 (<i>dd</i> , 8,5 e 2,2) | 7,55 (<i>dd</i> , 8,4 e 2,1) | 122,7 | 122,9 |
| XILOSE | | | | |
| 1'' | 5,13 (<i>d</i> , 6,6) | 5,13 (<i>d</i> , 6,6) | 104,2 | 104,6 |
| 2'' | 3,89 (<i>dd</i> , 8,8 e 6,6) | 3,89 (<i>dd</i> , 6,6 e 6,6) | 72,6 | 72,8 |
| 3'' | 3,64 (<i>dd</i> , 8,5 e 3,3) | 3,64 (<i>dd</i> , 8,4 e 3,3) | 73,8 | 74,1 |
| 4'' | 3,80-3,83 (<i>m</i>) | 3,88-3,24 (<i>m</i>) | 68,8 | 69,1 |
| 5'' | 5 _A : 3,80-3,83 (<i>m</i>) 5 _B : 3,44 (<i>dd</i> , 13,6 e 2,8) | eq. 3,44 (<i>dd</i> , 13,2 e 3,0) ax. 3,88-3,24 (<i>m</i>) | 66,7 | 67,0 |

Fonte: Autora (2017).

As Figuras 42 e 43 apresentam os espectros de massas de primeira e segunda ordem respectivamente, para a substância IV.

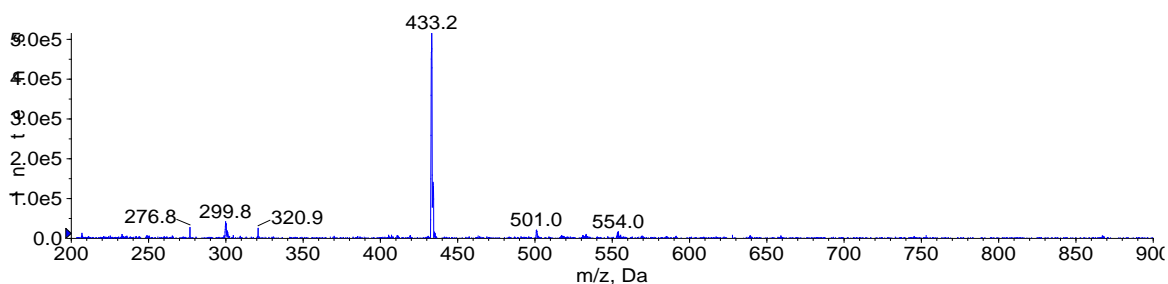


Figura 42 - Espectro de massas de primeira ordem em infusão direta no modo negativo *full-scan* da substância **IV**. Faixa de íons 200 a 900 m/z (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

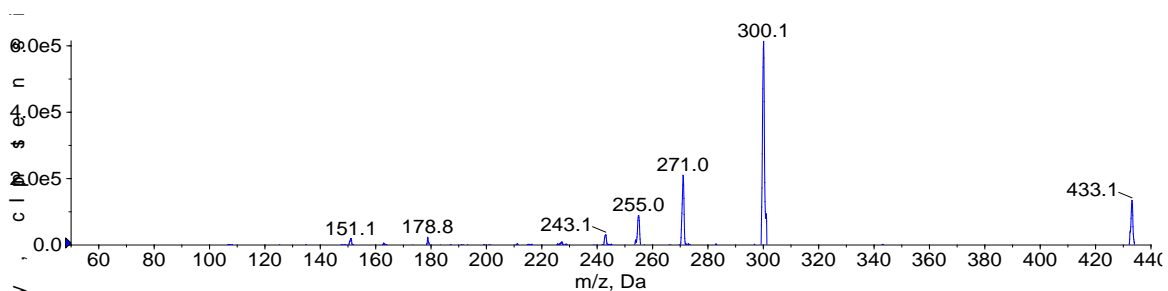


Figura 43 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 433 em modo negativo com energia de colisão 30 eV e faixa de íons 50 a 440 m/z (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

No espectro de massas de primeira ordem (Figura 42) pode-se observar o sinal mais intenso em m/z 433. Analisando o espectro de massas de segunda ordem (Figura 43) obtido para o íon precursor m/z 433 ($[M-H]^-$), e com o auxílio da base de dados Massbank Project e Pereira et al. (2015), foi possível confirmar a massa molecular da quercetina-3-O- β -D-xilopiranosídeo. O fragmento ($[M-H-133]^-$) referente ao sinal m/z 300 comprova a perda de uma pentose (133 Da) e a formação da aglicona quercetina por meio de uma clivagem homolítica. Os fragmentos m/z 151 ($[M-H-133-149]^-$) e m/z 271 ($[M-H-133-29]^-$) são referentes à quebra do anel pirano. A formação do fragmento m/z 255 ($[M-H-133-45]^-$) ocorre devido à perda de CO_2 e um hidrogênio, e o fragmento m/z 179, indicando a retrociclicação deste flavonoide pela perda de 121 Da (FABRE et al., 2001). Nas Figuras 75 a 81 das páginas 105-107, estão indicados os mecanismos de fragmentação geral de compostos da classe dos flavonoides.

4.7.4 Identificação da substância **V**

A substância **V** foi isolada das bandas 4CEp e 4CEh como um sólido amarelo, e sua identificação foi realizada através de experimentos de RMN de 1H , COSY,

HSQC, HMBC, espectrometria de massas e comparação com a literatura (VECHIA et al., 2016). Os espectros apresentados referem-se à banda 4CEh.

A análise do espectro de RMN de ^1H desta substância (Figura 44) mostrou sinais característicos da aglicona quercetina. Observou-se sinais referentes a um sistema de substituição 3', 4' no anel B com sinais em δ_{H} 7,33 (d , $J= 2,0$ Hz, H-2'), δ_{H} 6,92 (d , $J= 8,3$ Hz, H-5') e δ_{H} 7,29 (dd , $J= 2,1$ e 8,3 Hz, H-6') integrados para um hidrogênio. Os valores das constantes nos revelam um acoplamento em *orto* entre H-6' e H-5' e um acoplamento em *meta* entre H-6' e H-2'. Também foram observados dois dubletos referentes a dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,20 (d , $J= 1,8$ Hz) e δ_{H} 6,38 (d , $J= 1,7$ Hz) correspondentes aos hidrogênios na posição H-6 e H-8 respectivamente, sendo estes sinais característicos de um sistema de acoplamento AX.

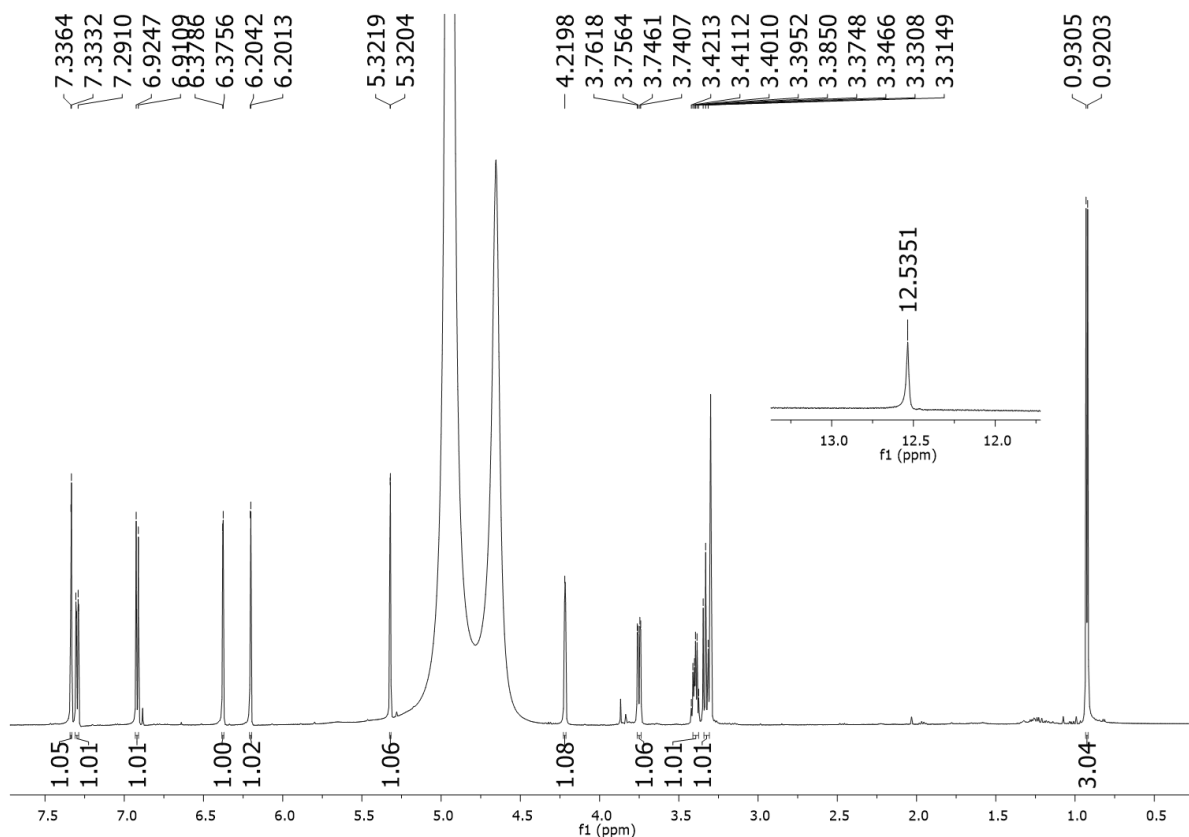


Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H da substância **V** (600 MHz, CD_3OD). Fonte: Autora (2017).

No espectro de RMN de ^1H foi verificado o sinal de deslocamento químico característico de metila de ramnose δ_{H} 0,93 (d , 3H, $J= 6,14$ Hz, H-6''), indicativo de uma unidade glicosídica como substituinte no esqueleto flavonoidico. Este foi confirmado pelos sinais de RMN: multipletto em δ_{H} 4,22 (m , H-2''), duplo dubleto em

δ_{H} 3,75 (*dd*, $J= 9,5$ e $3,3$ Hz, H-3''), triplete em δ_{H} 3,33 (*t*, $J= 9,5$ Hz, H-4'') e multiplete em δ_{H} 3,40 (*m*, H-5''). O sinal em δ_{H} 5,32 (*s*, H-1'') refere-se ao hidrogênio anomérico. Também foi observado um sinal em δ_{H} 12,53 (*s*) indicativo da presença de um grupo hidroxílico quelado em C-5 (SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009).

No mapa de contornos COSY (Figura 45) as correlações para o anel A são confirmadas pelo hidrogênio H-6 que se correlaciona com o hidrogênio H-8. Na expansão do COSY (Figura 46) também foi possível observar as interações dos átomos de hidrogênio presentes no anel da ramnose, onde o hidrogênio anomérico H-1'' se correlaciona diretamente com o hidrogênio δ_{H} 4,22 (*m*, H-2'') e este se correlaciona com o hidrogênio δ_{H} 3,75 (*dd*, $J= 3,3$ e $9,5$ Hz, H-3''). O hidrogênio H-3'' se correlaciona com o triplete δ_{H} 3,33 (*t*, $J= 9,9$ Hz, H-4'') e o H-4'' se correlaciona com o multiplete em δ_{H} 3,40 (*m*, H-5'') e este com os hidrogênios da metila da ramnose, δ_{H} 0,93 (*d*, $J= 6,20$ Hz, H-6'').

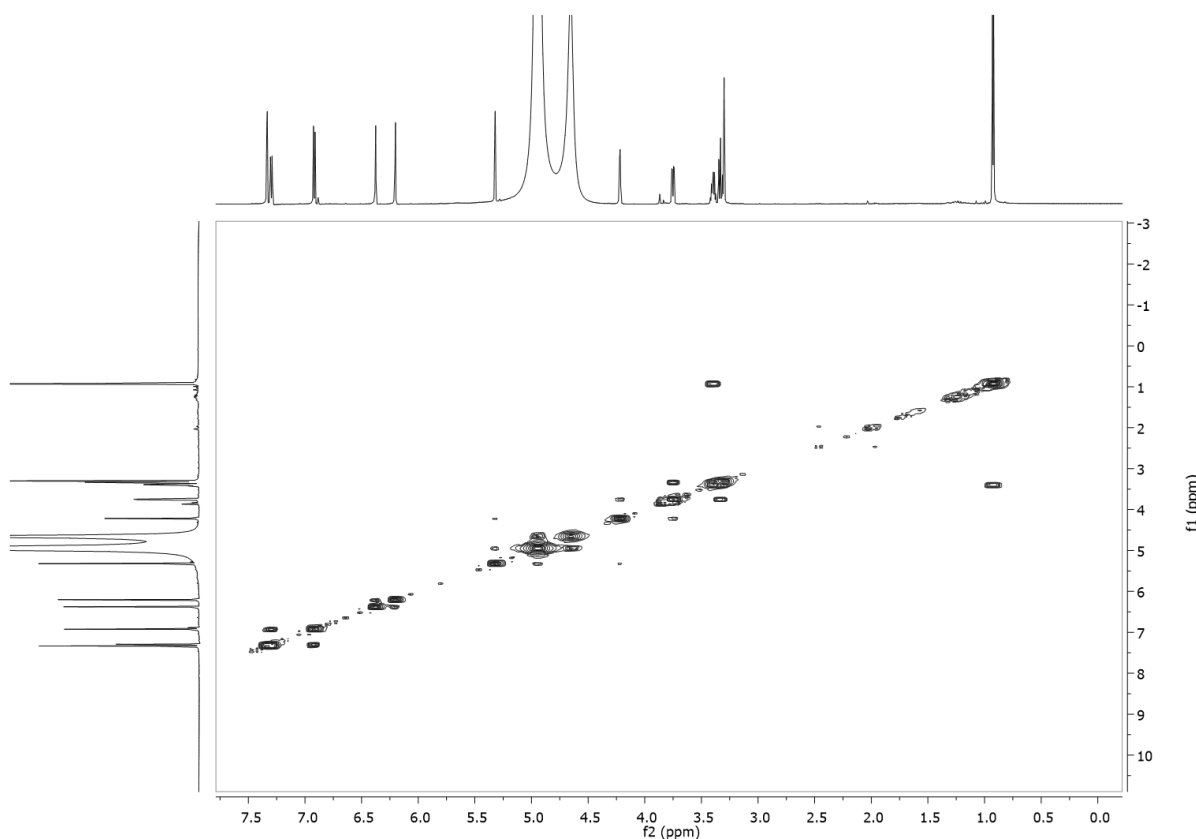


Figura 45 - Mapa de contornos COSY da substância **V** (600 MHz, CD₃OD).
Fonte: Autora (2017).

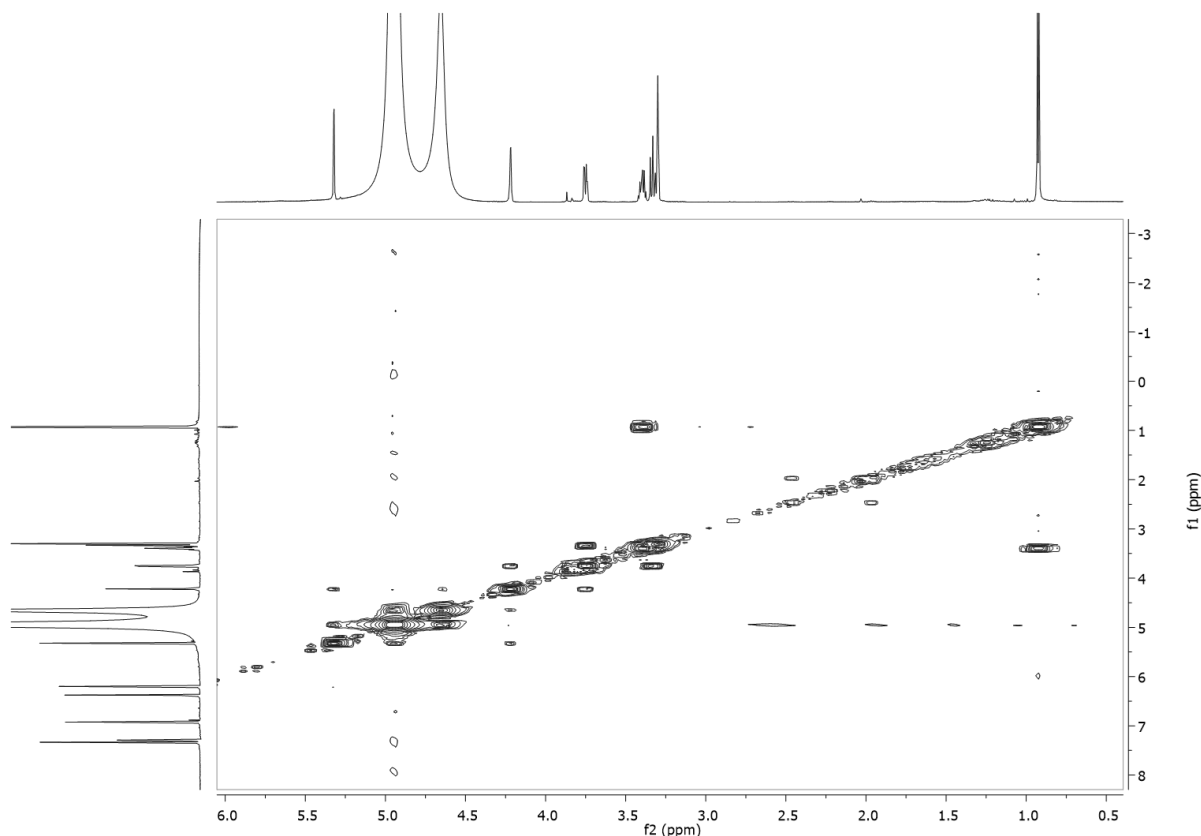


Figura 46 - Expansão do mapa de contornos COSY da substância **V** (600 MHz, CD₃OD).
Fonte: Autora (2017).

Através do mapa de correlações HSQC (Figura 47) foi possível observar a correlação dos sinais dos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' com os respectivos carbonos: δ_c 116,8 (C-2'), δ_c 116,3 (C-5') e δ_c 122,8 (C-6'), correspondentes ao anel B. Já para o anel A o mapa mostrou correlações entre os hidrogênios H-6 e H-8 com os carbonos δ_c 99,7 (C-6) e δ_c 94,6 (C-8) respectivamente. Para a unidade ramnosídica foi possível observar que os hidrogênios H-1'' e H-6'' estão diretamente ligados aos carbonos δ_c 103,2 (C-1'') e δ_c 17,3 (C-6''), respectivamente. Os demais hidrogênios glicosídicos estão ligados a carbonos na faixa de δ_c 71,6-72,9.

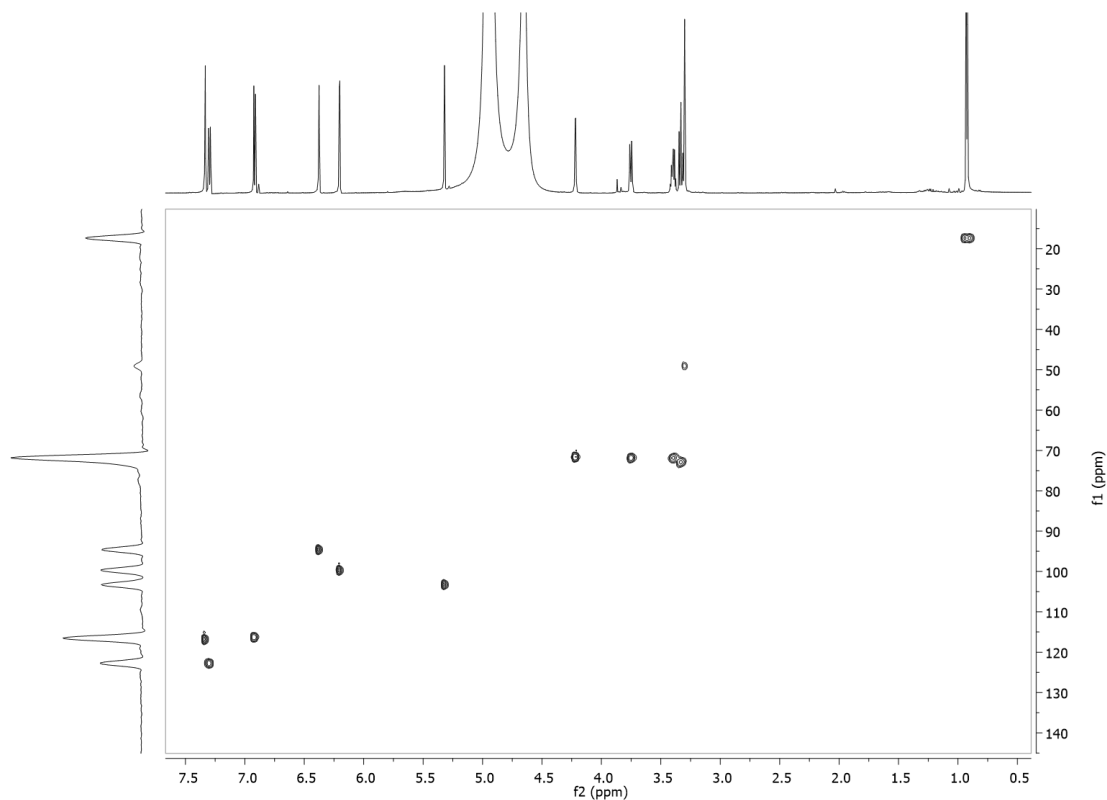


Figura 47 - Mapa de correlações HSQC da substância **V** (600 MHz, CD₃OD).
Fonte: Autora (2017).

No mapa de correlações HMBC (Figura 48), o sinal do hidrogênio H-6 se correlaciona com os dos carbonos C-8, C-7, C-5 e C-10. Já o sinal do hidrogênio H-8 se correlaciona com os dos carbonos em C-6, C-7, C-9, C-10 e C-4, permitindo assim a atribuição de carbonos do anel A. Para o anel B o mesmo raciocínio foi aplicado, sendo a correlação do H-2' com os carbonos C-2, C-3', C-4' e C-1', do hidrogênio H-5' com os carbonos C-1', C-3', C-4' e o hidrogênio H-6' se correlaciona com os carbonos C-5', C-4' e C-2. Desta forma foi possível atribuir os valores de carbono tanto para o anel A como para o anel B.

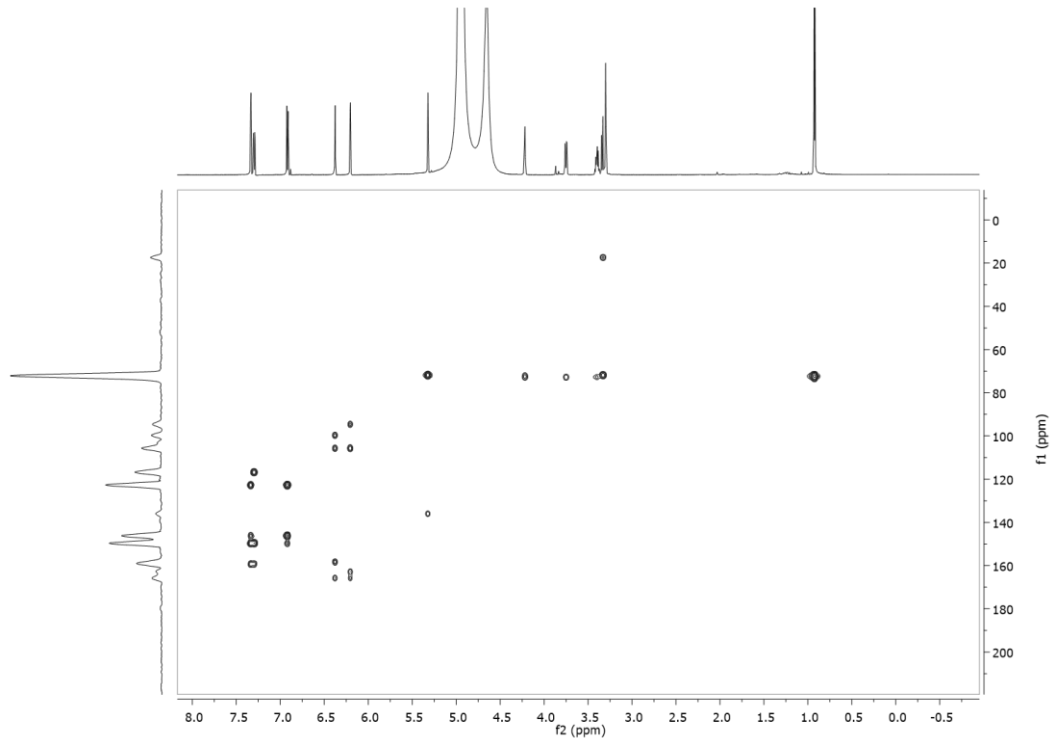


Figura 48 - Mapa de correlações HMBC da substância **V** (600 MHz, CD₃OD).
Fonte: Autora (2017).

Determinou-se a posição do glicosídeo na aglicona pelo mapa de correlações HMBC através da correlação do hidrogênio anomérico com o carbono δ_c 135,9 que foi atribuído ao C-3 do anel C do flavonol, confirmando assim a posição de substituição da unidade de ramnose.

Com base nos dados descritos acima, a substância **V** foi identificada como o flavonol quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (Figura 49), relatada pela primeira vez nas espécies de *E. pyriformis* e *E. handroana*. A Tabela 15 apresenta os dados RMN de ¹H para a substância **V** e para quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo, de acordo com a literatura.

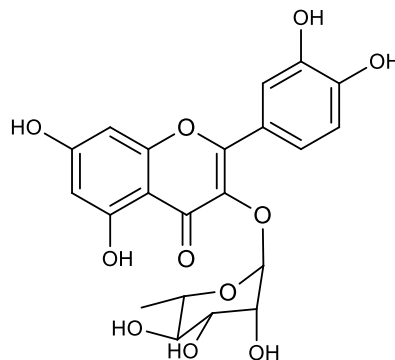


Figura 49 - Estrutura química da quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo
Fonte: Autora (2017).

Tabela 15 - Comparação dos dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 600 MHz) obtidos da substância **V** com os dados descritos na literatura do composto quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (VECHIA et al., 2016: CD_3OD , 400 MHz para RMN de ^1H e 100 MHz para RMN de ^{13}C).

| H/C | δ_{H} (ppm), <i>J</i> (Hz) | | δ_{C} (ppm) | |
|----------------|--|-------------------------------|---------------------------|---------------------|
| | Substância V | VECHIA et al., 2016 | Substância V | VECHIA et al., 2016 |
| 2 | - | - | 159,3 | 159,4 |
| 3 | - | - | 135,9 | 136,4 |
| 4 | - | - | 179,4 | 179,8 |
| 5 | - | - | 162,8 | 163,4 |
| 6 | 6,20 (<i>d</i> , 1,8) | 6,20 (<i>d</i> , 2,1) | 99,7 | 100,0 |
| 7 | - | - | 165,8 | 166,0 |
| 8 | 6,38 (<i>d</i> , 1,7) | 6,37 (<i>d</i> , 2,1) | 94,6 | 94,9 |
| 9 | - | - | 158,3 | 158,7 |
| 10 | - | - | 105,7 | 106,0 |
| 1' | - | - | 122,7 | 123,1 |
| 2' | 7,33 (<i>d</i> , 2,0) | 7,34 (<i>d</i> , 2,1) | 116,8 | 117,1 |
| 3' | - | - | 146,1 | 146,5 |
| 4' | - | - | 149,7 | 150,0 |
| 5' | 6,92 (<i>d</i> , 8,3) | 6,91 (<i>d</i> , 8,3) | 116,3 | 116,5 |
| 6' | 7,29 (<i>dd</i> , 8,3 e 2,1) | 7,31 (<i>dd</i> , 8,3 e 2,1) | 122,8 | 123,0 |
| RAMNOSE | | | | |
| 1'' | 5,32 (<i>s</i>) | 5,35 (<i>d</i> , 1,5) | 103,2 | 103,7 |
| 2'' | 4,22 (<i>m</i>) | 4,23 (<i>dd</i> , 3,2 e 1,5) | 71,6 | 72,0 |
| 3'' | 3,75 (<i>dd</i> , 9,5 e 3,3) | 4,76 (<i>dd</i> , 9,4 e 3,4) | 71,8 | 72,2 |
| 4'' | 3,33 (<i>t</i> , 9,9) | 3,35 (<i>dd</i> , 9,4 e 3,4) | 72,9 | 72,2 |
| 5'' | 3,40 (<i>m</i>) | 3,43 (<i>dq</i> , 9,4 e 6,1) | 71,9 | 73,4 |
| 6'' | 0,93 (<i>d</i> , 6,14) | 0,94 (<i>d</i> , 6,1) | 17,3 | 17,8 |
| 5-OH | 12,54 (<i>s</i>) | - | - | - |

Fonte: Autora (2017).

No espectro de massas de primeira ordem (Figura 50) pode-se observar o sinal mais intenso m/z 447 $[\text{M-H}]^-$. Analisando o espectro de massas de segunda ordem (Figura 51) obtido para o íon precursor e com o auxílio da base de dados Massbank Project e Fabre et al. (2001), foi possível confirmar a massa molecular da quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo. O fragmento ($[\text{M-H}-147]^-$) referente ao fragmento m/z 300

comprova a perda de uma ramnose (147 Da) formando a aglicona de quercetina. Os fragmentos m/z 151 ($[M-H-147-149]^-$) e m/z 271 ($[M-H-147-29]^-$) são referentes à quebra do anel pirano. A formação do fragmento de m/z 255 ($[M-H-147-45]^-$) ocorre devido à perda de CO_2 e um hidrogênio e para o fragmento m/z 179 ocorre uma retrociclicação deste flavonoide indicada pela perda de 121 Da (FABRE et al., 2001; TIBERTI et al., 2007).

Nas Figuras 75 a 81 das páginas 105-107, estão indicados os mecanismos de fragmentação geral de compostos da classe dos flavonoides.

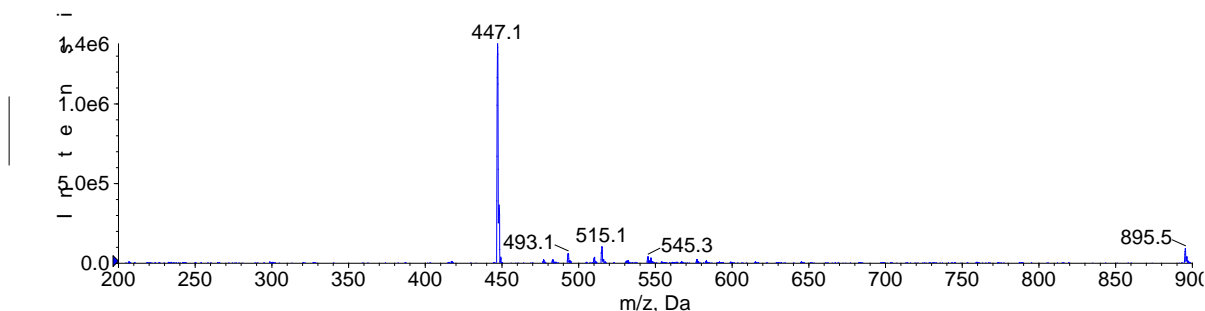


Figura 50 - Espectro de massas de primeira ordem em infusão direta no modo negativo *full-scan* da substância **V**. Faixa de íons 200 a 900 m/z (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

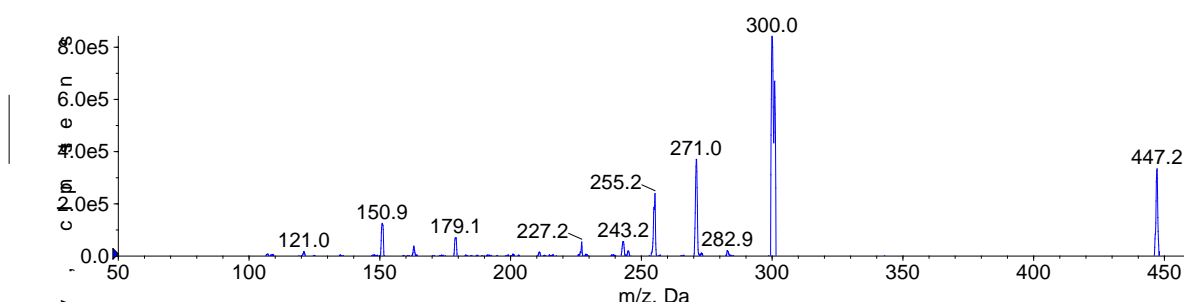


Figura 51 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 447 em modo negativo com energia de colisão 35 eV e faixa de íons 50 a 460 m/z (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

4.7.5 Identificação das substâncias **VI** e **VII**

As substâncias **VI** (majoritária) e **VII** (minoritária) foram identificadas em mistura na banda 3 *CEp* como um óleo amarelo, e sua identificação foi realizada através de experimentos de RMN de 1H , COSY, espectrometria de massas e comparação com a literatura (OKONKWO et al., 2016).

No espectro de RMN de 1H (Figura 52) foram constatados dois sinais de hidrogênios anoméricos δ_H 5,48 (*s*, $H_{VI-1''}$) e δ_H 5,27 (*d*, $J = 1,8$ Hz, $H_{VII-1''}$) com integração de 1:0,8 respectivamente. Neste espectro também é constatado sinais característico da aglicona de miricetina para os dois compostos.

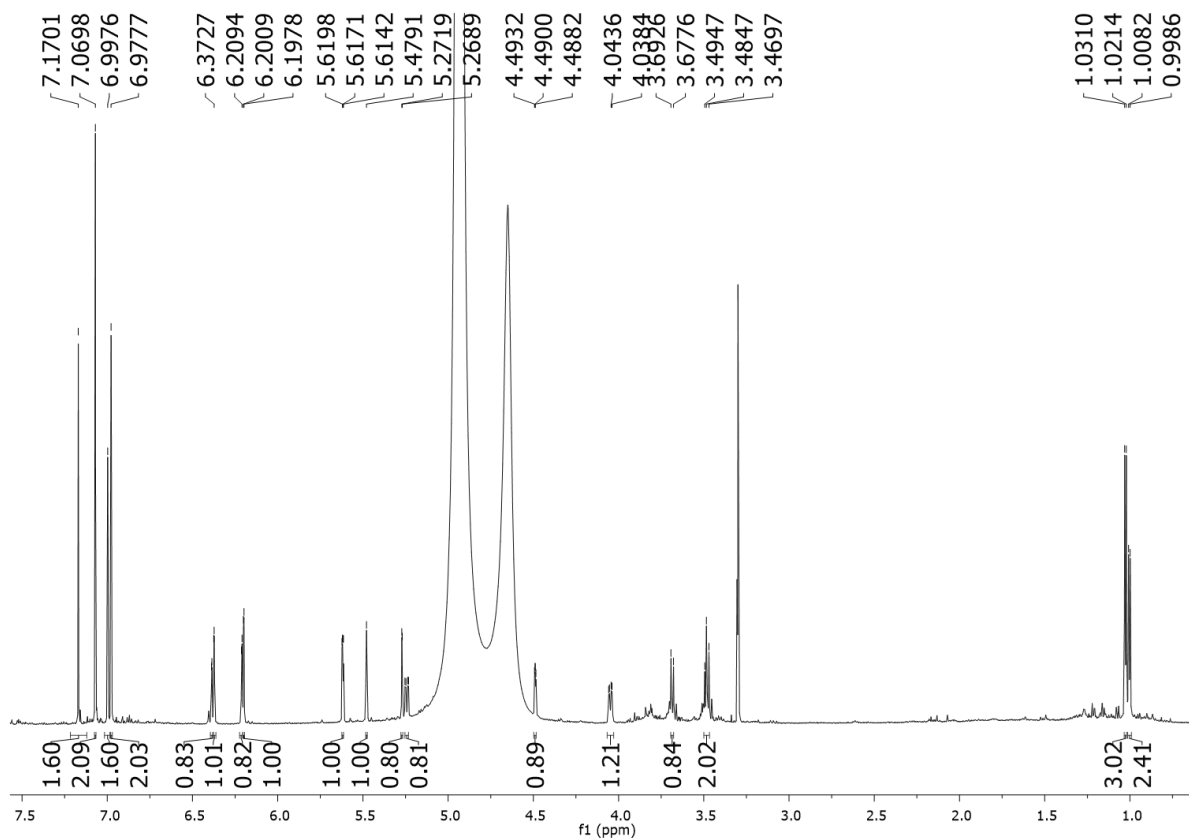


Figura 52 - Espectro de RMN de ^1H da substância **VI** e **VII** (600 MHz, CD_3OD).
Fonte: Autora (2017).

No composto majoritário, para o anel A, foram observados dois dubletos δ_{H} 6,20 (d , $J= 1,9$ Hz) e δ_{H} 6,37 (d , $J= 1,5$ Hz) correspondentes aos hidrogênios na posição H-6 e H-8 respectivamente, típicos de acoplamento *meta* entre estes hidrogênios em um sistema AX. Já para o composto minoritário ocorreram sinais em δ_{H} 6,21 (d , $J= 1,9$ Hz) e δ_{H} 6,39 (d , $J= 1,5$ Hz) correspondentes aos hidrogênios na posição H-6 e H-8. Para o anel B tanto do composto majoritário quanto do minoritário, observou-se sinais referentes a um sistema de substituição 3', 4', 5' no anel B com sinal em δ_{H} 7,07 (s, 2H) para o composto **VI** (majoritário) e δ_{H} 7,17 (s, 2H) para o composto **VII** (minoritário) que foram atribuídos aos hidrogênios na posição H-2' e H-6' magneticamente equivalentes, ou seja, estão no mesmo ambiente químico e assim possuem equivalência no deslocamento químico.

No espectro de RMN de ^1H foi verificado o sinal de deslocamento químico característico de metila de ramnose δ_{H} 1,03 (d , 3H, $J= 5,7$ Hz) para o composto **VI** e δ_{H} 1,00 (d , 3H, $J= 5,6$ Hz) para o composto **VII**, indicativo de uma ramnose como substituinte no esqueleto flavonoidico. Também foram observados sinais referentes a

um ácido gálico presente em ambos os compostos, sendo para o composto majoritário δ_{H} 6,98 (s, 2H) e para o minoritário δ_{H} 7,00 (s, 2H).

No mapa de contornos COSY (Figura 53) pode-se observar para o composto minoritário a correlação dos hidrogênios do grupo metílico de ramnose H-6'' com o H-5'', assim como a correlação deste hidrogênio com o H-4'', com valor de deslocamento de 5,27 ppm. Este deslocamento é justificado devido à desblindagem da carbonila do ácido gálico, sugerindo assim, que o composto minoritário apresenta a unidade galoil no C-4''. Já para o composto majoritário os acoplamentos foram confirmados pela análise dos espectros e comparação com os dados obtidos na literatura. Assim, o composto majoritário trata-se de uma miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -L-ramnosídeo e o composto minoritário sugere-se ser o composto miricetina-3-O-(4''-O-galoil)- α -L-ramnosídeo, ambos inéditos para a espécie de *E. pyriformis*. As estruturas dos dois flavonoides são apresentadas na Figura 54, e os dados de RMN de ^1H para as substâncias na Tabela 16.

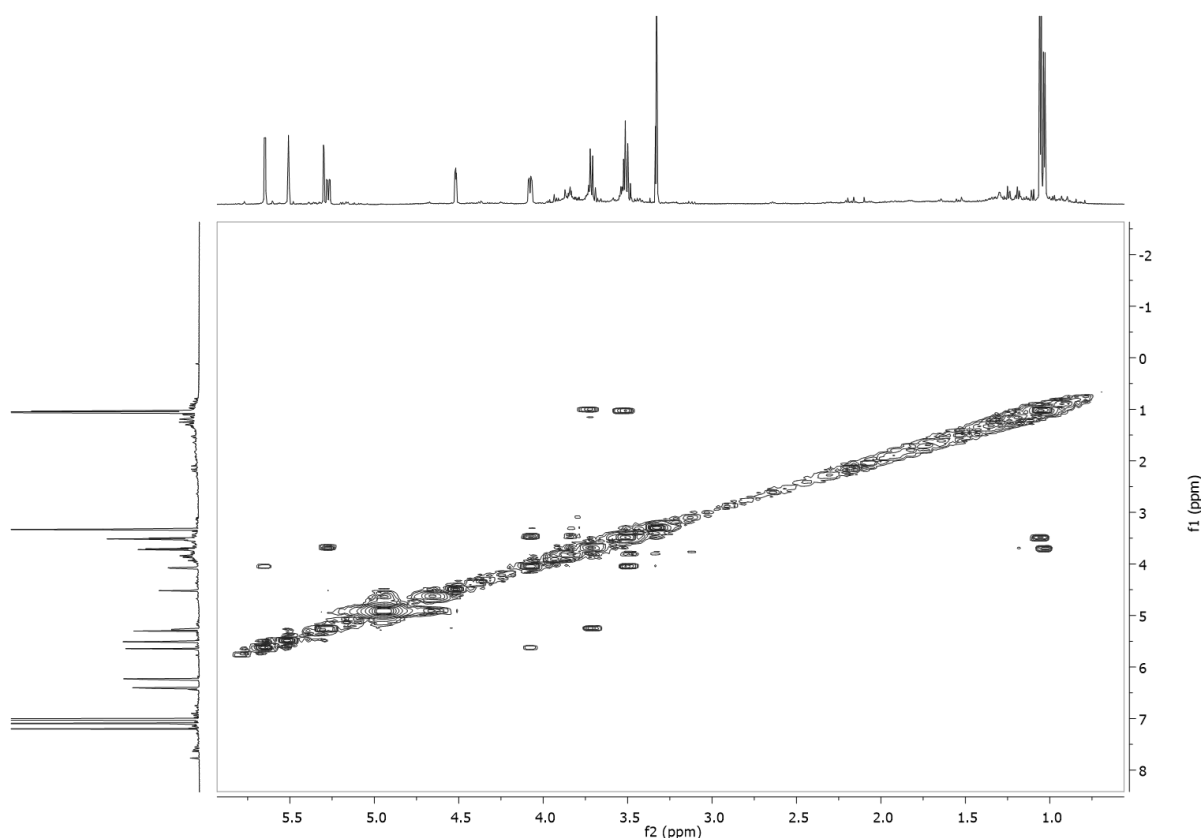


Figura 53 - Expansão do mapa de contornos COSY da substância **V** (600 MHz, CD_3OD).
Fonte: Autora (2017).

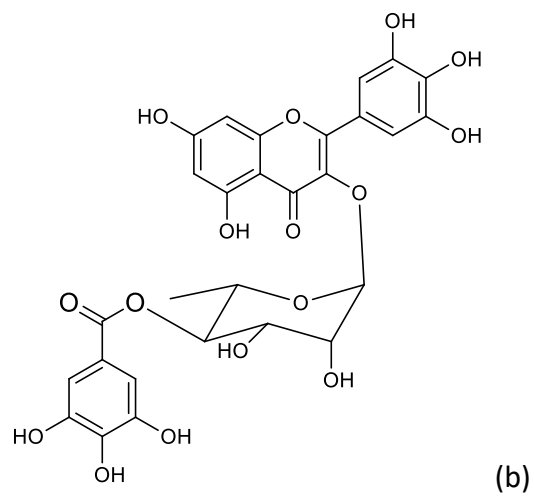
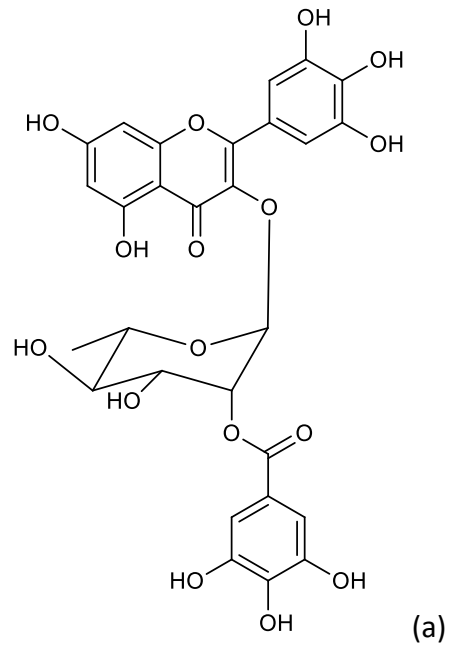


Figura 54 - Estrutura química dos flavonoides (a) miricetina-3-O-(2''-O-galoiil)- α -L-ramnosídeo e (b) miricetina-3-O-(4''-O-galoiil)- α -L-ramnosídeo. Fonte: Autora (2017).

Tabela 16 - Comparação dos dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 600 MHz) obtidos da substância **VI** e **VII** com os dados descritos na literatura do composto miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -L-ramnosídeo e do composto miricetina-3-O-(4''-O-galoil)- α -L-ramnosídeo, respectivamente. (OKONKWO et al., 2016: CD_3OD , 600 MHz para RMN de ^1H ; SAMY et al., 2014: CD_3OD , 400 MHz para RMN de ^1H).

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | | δ_{H} (ppm), J (Hz) | |
|--------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | Substância VI (Majoritária) | Substância VII (Minoritária) | OKONKWO et al., 2016 | SAMY et al., 2014 |
| 2 | - | - | - | - |
| 3 | - | - | - | - |
| 4 | - | - | - | - |
| 5 | - | - | - | - |
| 6 | 6,20 (d, 1,9) | 6,21 (d, 1,9) | 6,22 (d, 2,1) | 6,20 (d, 2,0) |
| 7 | - | - | - | - |
| 8 | 6,37 (d, 1,5) | 6,39 (d, 1,5) | 6,39 (d, 2,1) | 6,36 (d, 2,0) |
| 9 | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - |
| 1' | - | - | - | - |
| 2' | 7,07 (s) | 7,17 (s) | 7,09 (s) | 7,17 (s) |
| 3' | - | - | - | - |
| 4' | - | - | - | - |
| 5' | - | - | - | - |
| 6' | 7,07 (s) | 7,17 (s) | 7,09 (s) | 7,17 (s) |
| RAMNOSE | | | | |
| 1'' | 5,48 (s) | 5,27 (d, 1,8) | 5,53 (sl) | 5,29 (sl) |
| 2'' | 5,62 (dd, 1,7 e 3,4) | - | 5,65 (sl) | - |
| 3'' | 4,05 (dd, 3,1 e 9,0) | - | 4,06 (dd, 3,4 e 9,1) | - |
| 4'' | 3,48 (m) | 5,24 (dd, 3,2 e 9,0) | 3,50 (m) | - |
| 5'' | 3,48 (m) | 3,68 (m) | 3,50 (m) | - |
| 6'' | 1,03 (d, 5,7) | 1,00 (d, 5,6) | 1,06 (d, 5,8) | 1,00 (d, 6,2) |
| ÁCIDO GÁLICO | | | | |
| 2''' | 6,98 (s) | 7,00 (s) | 7,00 (s) | 6,99 (s) |
| 6''' | 6,98 (s) | 7,00 (s) | 7,00 (s) | 6,99 (s) |

Fonte: Autora (2017).

No espectro de massas de primeira ordem (Figura 55) pode-se observar o sinal mais intenso m/z 615. Analisando o espectro de massas de segunda ordem (Figura 56) obtido para o íon precursor de m/z 615 $[M-H]^-$, e com o auxílio de Saldanha et al. (2013), foi possível identificar os compostos citados acima. Observou-se no espectro de massas de segunda ordem os íons produtos m/z 463 $[M-152-H]^-$, e m/z 317 $[M-152-146-H]^-$, que correspondem respectivamente a perda de uma unidade galoil (152 Da) e uma unidade de ramnose (146 Da) através de uma clivagem heterolítica.

O fragmento m/z 151 $[M-H-298-166]^-$ e m/z 289 $[M-H-298-28]^-$ se referem as quebras do anel pirânico, já o fragmento de m/z 179 $[M-H-298-138]^-$ formou-se por retrociclicação do composto com a perda de 138 Da e o íon produto m/z 272 $[M-H-298-45]^-$ através da perda de CO_2 e um hidrogênio, ambas fragmentações representadas no espectro de massas de terceira ordem na Figura 57 (FABRE et al., 2001; TIBERTI et al., 2007). Nas Figuras 75 a 81 das páginas 105-107, estão indicados os mecanismos de fragmentação geral de compostos da classe dos flavonoides.

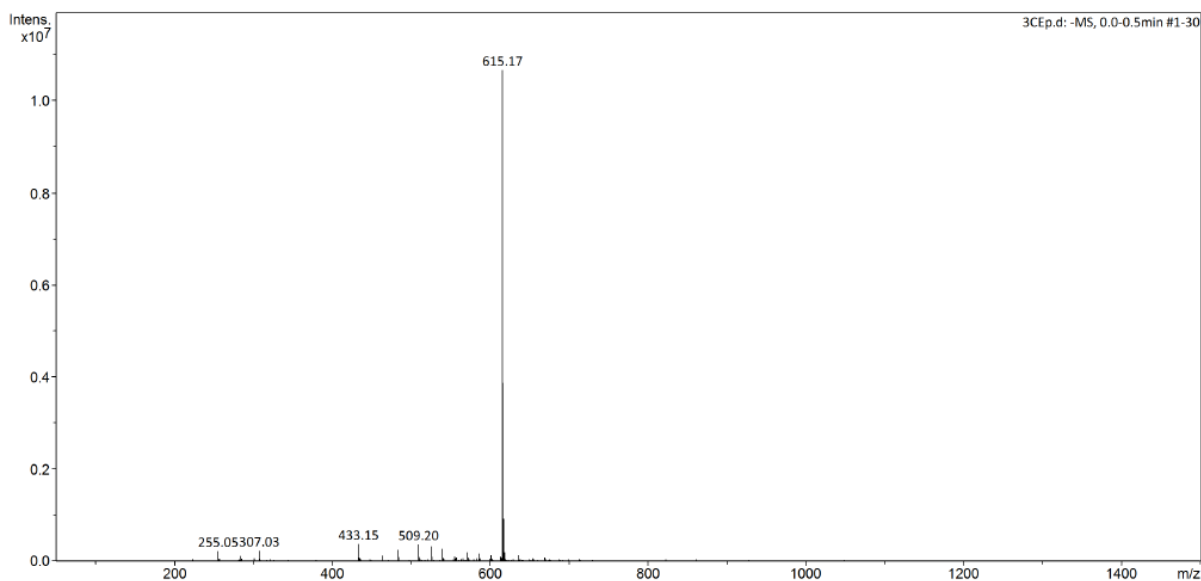


Figura 55 - Espectro de massas de primeira ordem em infusão direta no modo negativo *full-scan* da substância VI e VII. Faixa de íons 50 a 1500 m/z (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

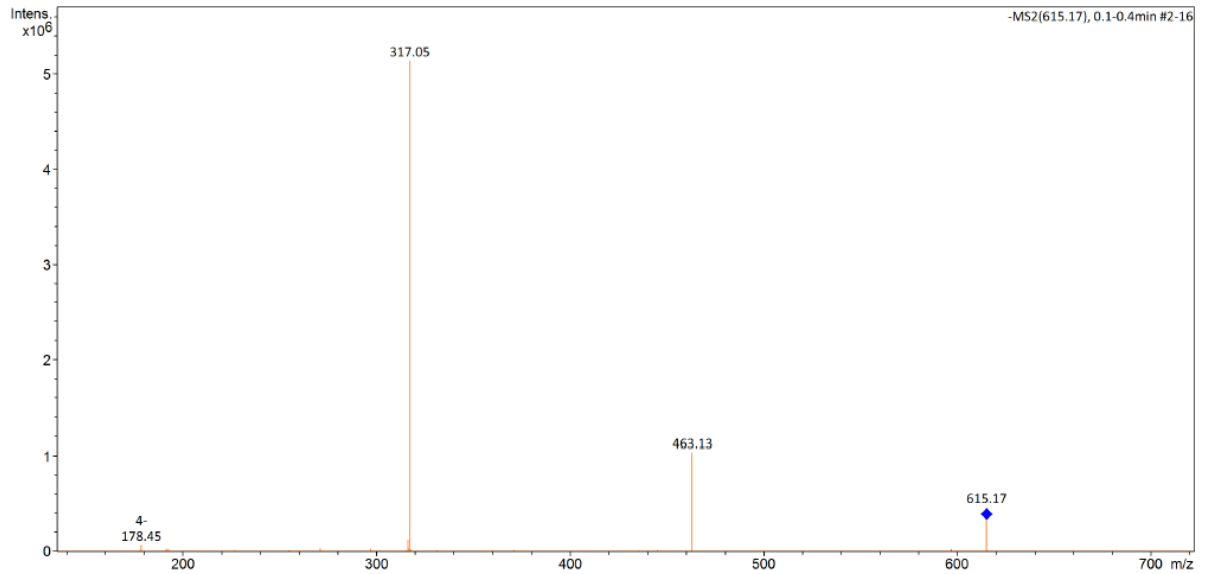


Figura 56 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 615 em modo negativo com faixa de íons 50 a 1500 m/z e intensidade de fragmentação 90% (Seção 3.8).
Fonte: Autora (2017).

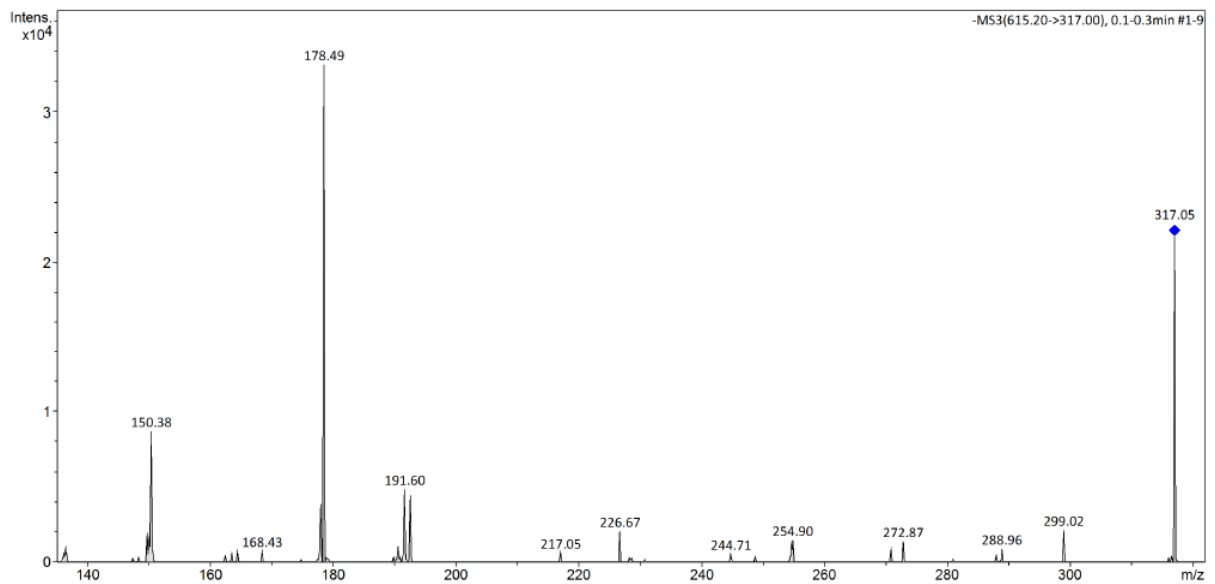


Figura 57 - Espectro de massas de terceira ordem do íon precursor de m/z 317 em modo negativo com faixa de íons 50 a 1500 m/z e intensidade de fragmentação 150 % (Seção 3.8).
Fonte: Autora (2017).

4.7.6 Identificação da substância VIII

A substância **VIII** foi identificada em mistura na fração 5 *CEp* como um óleo amarelo, e sua identificação foi realizada através de experimentos de RMN de ^1H , espectrometria de massas e comparação com a literatura (OKONKWO et al., 2016).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 58) observa-se a presença de sinais na região dos hidrogênios aromáticos e na região de glicosídeos, sendo referentes a um flavonoide glicosilado. Nota-se a presença de sinais característicos da aglicona quercetina com sinais referentes a um sistema de substituição 3', 4' no anel B com sinais em δ_{H} 7,37 (*d*, $J = 2,1$ Hz, H-2'), δ_{H} 6,95 (*m*, H-5') e δ_{H} 7,34 (*dd*, $J = 2,0$ e 8,3 Hz, H-6') integrados para um hidrogênio. Também foram observados dois dubletos referentes a dois hidrogênios do anel A, δ_{H} 6,21 (*d*, $J = 2,0$ Hz) e δ_{H} 6,39 (*d*, $J = 2,0$ Hz) correspondentes aos hidrogênios na posição H-6 e H-8 respectivamente, sendo estes sinais característicos de um sistema de acoplamento *meta* entre estes hidrogênios.

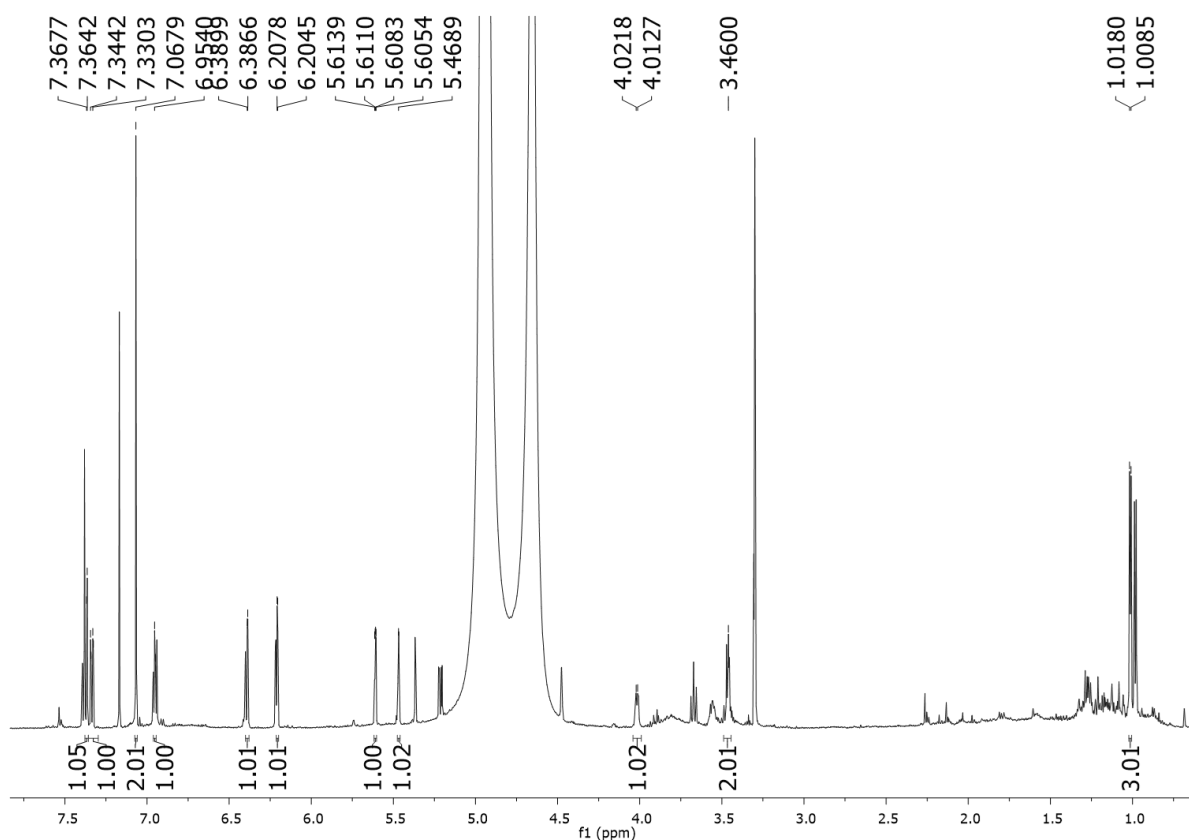


Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H da substância **VIII** (600 MHz, CD_3OD).
Fonte: Autora (2017).

No espectro de RMN de ^1H foi verificado o sinal de deslocamento químico característico de metila de ramnose $\delta_{\text{H}} 1,01$ (*d*, 3H, $J = 5,6$ Hz) para o composto **VIII**, majoritário na mistura, indicativo de uma ramnose como substituinte no esqueleto flavonoidico que foi confirmado através do duplo dubleto em $\delta_{\text{H}} 5,61$ (*dd*, $J = 1,9$ e $3,4$ Hz, H-2''), um multiplete em $\delta_{\text{H}} 4,01$ (*m*, H-3'') e $\delta_{\text{H}} 3,46$ (*m*, H-4''/ H-5''). O sinal em $\delta_{\text{H}} 5,47$ (*s*, H-1'') refere-se ao hidrogênio anomérico. Também foi observado sinal referente ao ácido gálico em $\delta_{\text{H}} 7,07$ (*s*, 2H).

Estes acoplamentos foram confirmados em comparação dos dados na literatura, os quais seguem na Tabela 17. Assim, a substância majoritária trata-se de um derivado de quercetina com ramnose e ácido gálico como substituintes, sendo identificado como quercetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -L-ramnosídeo (Figura 59), relatado pela primeira vez para a espécie *E. pyriformis*. A Tabela 17 apresenta os dados RMN de ^1H para a substância, juntamente com os dados da literatura.

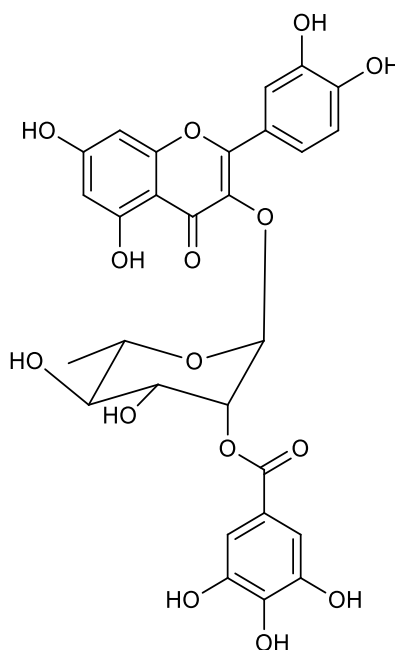


Figura 59 - Estrutura da Quercetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -L-ramnosídeo
Fonte: Autora (2017).

Tabela 17 - Comparação dos dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 600 MHz) obtidos da substância **VIII** com os dados descritos na literatura do composto quercetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -L-ramnosídeo. (OKONKWO et al., 2016: CD_3OD , 600 MHz para RMN de ^1H).

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) Substância VIII (Majoritária) | δ_{H} (ppm), J (Hz) OKONKWO et al., 2016 |
|--------------|---|---|
| 2 | - | - |
| 3 | - | - |
| 4 | - | - |
| 5 | - | - |
| 6 | 6,21 (<i>d</i> , 2,0) | 6,19 (<i>d</i> , 2,1) |
| 7 | - | - |
| 8 | 6,39 (<i>d</i> , 2,0) | 6,36 (<i>d</i> , 2,1) |
| 9 | - | - |
| 10 | - | - |
| 1' | - | - |
| 2' | 7,37 (<i>d</i> , 2,1) | 7,37 (<i>d</i> , 2,1) |
| 3' | - | - |
| 4' | - | - |
| 5' | 6,95 (<i>m</i>) | 6,94 (<i>d</i> , 8,3) |
| 6' | 7,34 (<i>dd</i> , 2,0 e 8,3) | 7,35 (<i>dd</i> , 2,1 e 8,3) |
| RAMNOSE | | |
| 1'' | 5,47 (<i>s</i>) | 5,51 (<i>s</i>) |
| 2'' | 5,61 (<i>dd</i> , 1,9 e 3,4) | 5,63 (<i>s</i>) |
| 3'' | 4,01 (<i>m</i>) | 4,01 (<i>m</i>) |
| 4'' | 3,46 (<i>m</i>) | 3,47 (<i>m</i>) |
| 5'' | 3,46 (<i>m</i>) | 3,47 (<i>m</i>) |
| 6'' | 1,01 (<i>d</i> , 5,6) | 1,03 (<i>d</i> , 5,7) |
| ÁCIDO GÁLICO | | |
| 2''' | 7,07 (<i>s</i>) | 7,07 (<i>s</i>) |
| 6''' | 7,07 (<i>s</i>) | 7,07 (<i>s</i>) |

Fonte: Autora (2017).

No espectro de massas de primeira ordem (Figura 60) pode-se observar o sinal mais intenso m/z 599. Analisando o espectro de massas de segunda ordem (Figura 61) obtido para o íon precursor m/z 599 $[\text{M}-\text{H}]^-$, e com o auxílio de Abu-Reidah et al.

(2015), pode-se observar a formação majoritária do íon produto m/z 301 ($[M-H-298]^-$). Este íon é formado devido à clivagem heterolítica da ligação O-glicosídica, ocasionando a perda de 298 Da levando assim à aglicona quercetina. Com o fragmento m/z 447 ($[M-H-152]^-$), foi possível identificar uma unidade galoil ligada a ramnose por uma perda de 152 Da e uma unidade galoil-ramnose pela perda de 298 Da.

A formação dos fragmentos m/z 151 ($[M-H-298-150]^-$) e m/z 272 ($[M-H-298-29]^-$) ocorrem devido à quebra do anel pirano, já o fragmento m/z 256 ($[M-H-298-45]^-$) se deve à perda de CO_2 e um hidrogênio. O íon produto m/z 179 ($[M-H-298-122]^-$) é formado por retrociclização do composto com a perda de 122 Da que podem ser observados no espectro de massas de terceira ordem na Figura 62 (FABRE et al., 2001). Nas Figuras 75 a 81 das páginas 105-107, estão indicados os mecanismos de fragmentação geral de compostos da classe dos flavonoides.

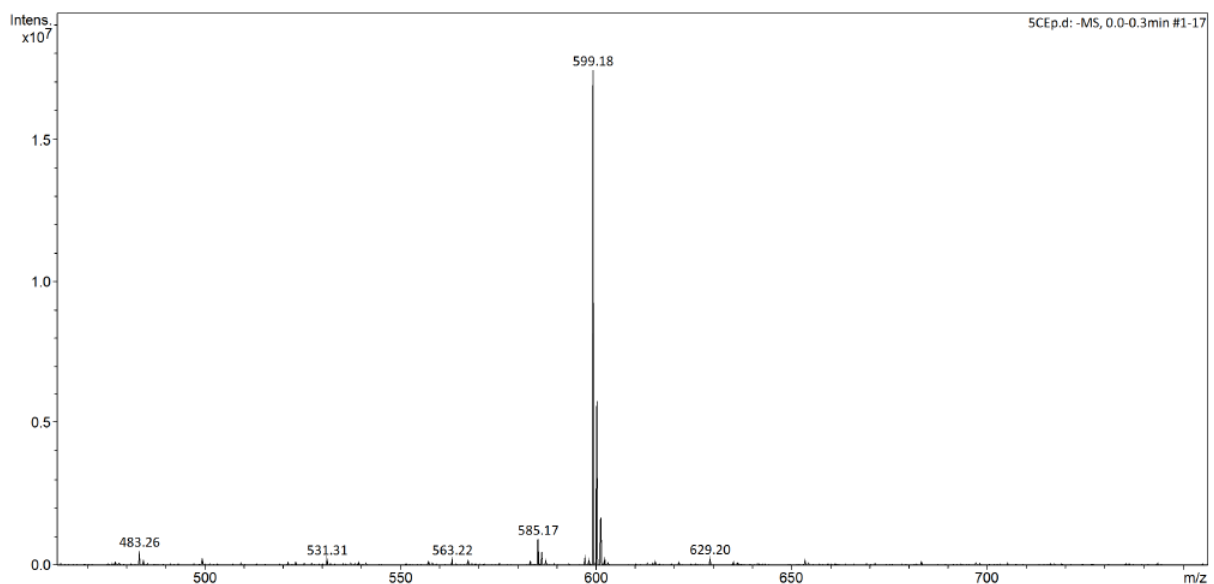


Figura 60 - Espectro de massas de primeira ordem em infusão direta no modo negativo *full-scan* da substância **VIII**. Faixa de íons 50 a 1500 m/z (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

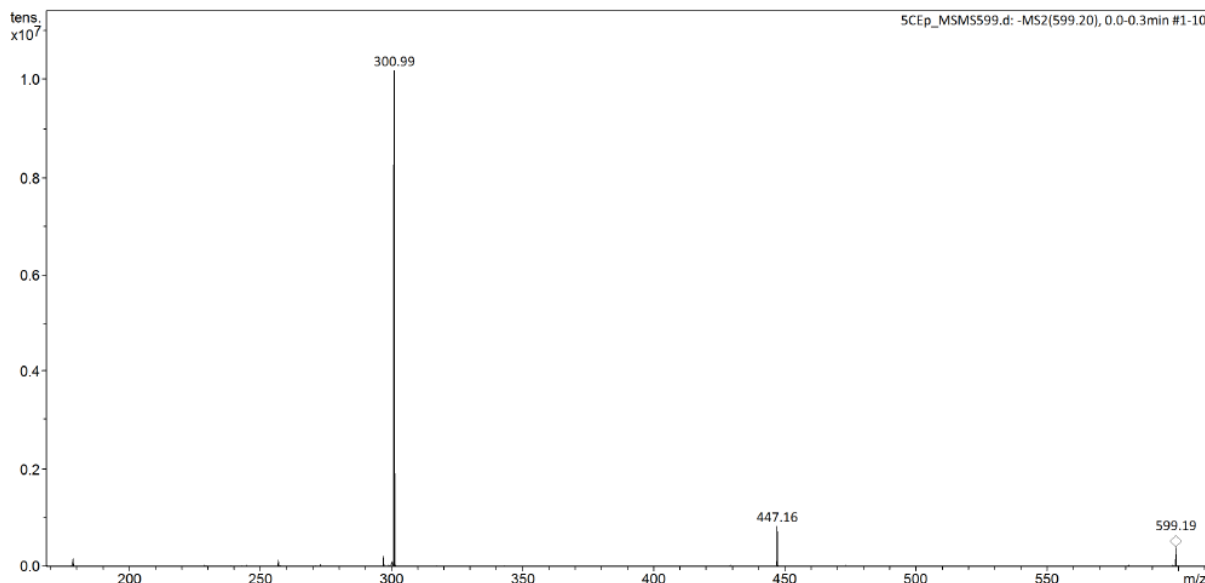


Figura 61 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 599 em modo negativo com faixa de íons 50 a 1500 m/z e intensidade de fragmentação 75% (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

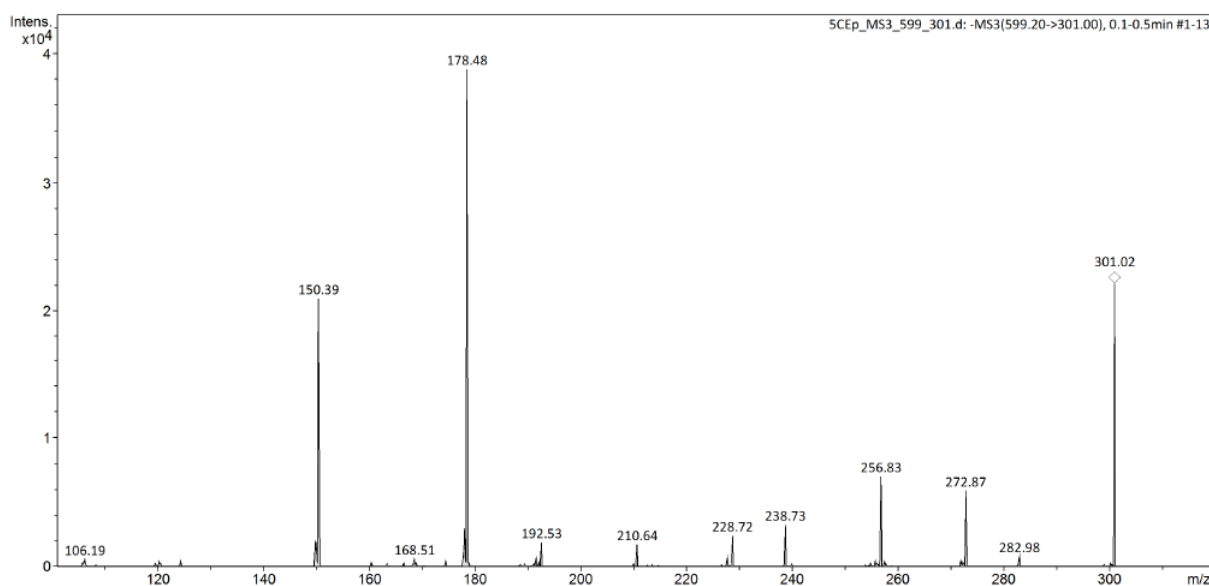


Figura 62 - Espectro de massas de terceira ordem do íon precursor de m/z 301 em modo negativo com faixa de íons 50 a 1500 m/z e intensidade de fragmentação 150 % (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

4.7.7 Identificação da substância **IX**

A substância **IX** foi identificada na fração 6 *CEp* como um sólido amarelo claro, e sua identificação foi realizada através de experimentos de RMN de ^1H , espectrometria de massas e comparação com a literatura (MOUFFOK et al., 2012).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 63) observa-se sinais característicos de quercetina com sinais referentes a um sistema de substituição 3', 4' no anel B com

sinais em δ_H 7,73 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'), δ_H 6,88 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-5') e δ_H 7,63 (*dd*, $J = 2,0$ e $8,5$ Hz, H-6') integrados para um hidrogênio. Também foram observados dois dubletos referentes a dois hidrogênios do anel A, δ_H 6,18 (*d*, $J = 2,0$ Hz) e δ_H 6,39 (*d*, $J = 2,0$ Hz) correspondentes aos hidrogênios na posição H-6 e H-8 respectivamente. Os valores das constantes revelam um acoplamento em *orto* entre H-6' e H-5' e um acoplamento em *meta* entre H-6' e H-2'. Assim, a substância **IX** foi identificada como uma molécula de quercetina (Figura 64) já relatada nos frutos de *E. pyriformis* por Haminiuk et al., (2012). Nas folhas este é o primeiro relato para a espécie. A Tabela 18 apresenta os dados RMN de 1H para a substância **IX**, juntamente com os dados da literatura.

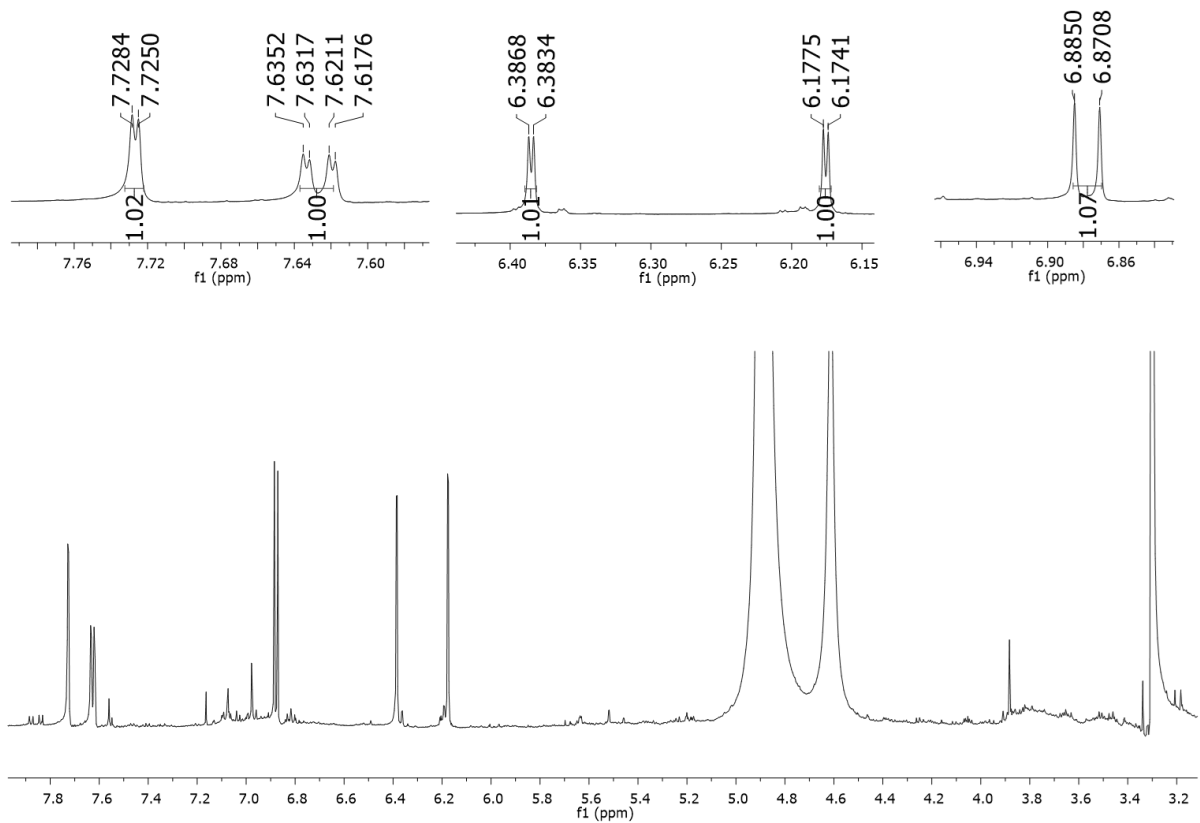


Figura 63 - Espectro de RMN de 1H da substância **IX** (600 MHz, CD_3OD). Fonte: Autora (2017).

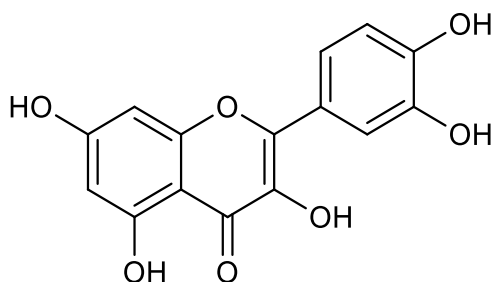


Figura 64 - Estrutura química da quercetina.

Fonte: Autora (2017).

Tabela 18 - Comparação dos dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 600 MHz) obtidos da substância IX com os dados descritos na literatura do composto quercetina. (MOUFFOK et al., 2012: CD_3OD , 500 MHz para RMN de ^1H).

| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | δ_{H} (ppm), J (Hz) |
|-----|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Substância IX | MOUFFOK et al., 2012 |
| 2 | - | - |
| 3 | - | - |
| 4 | - | - |
| 5 | - | - |
| 6 | 6,18 (d, 2,0) | 6,18 (d, 2,0) |
| 7 | - | - |
| 8 | 6,39 (d, 2,0) | 6,39 (d, 2,0) |
| 9 | - | - |
| 10 | - | - |
| 1' | - | - |
| 2' | 7,73 (d, 2,0) | 7,74 (d, 2,1) |
| 3' | - | - |
| 4' | - | - |
| 5' | 6,88 (d, 8,5) | 6,88 (d, 8,3) |
| 6' | 7,63 (dd, 2,0 e 8,5) | 7,62 (dd, 2,1 e 8,3) |

Fonte: Autora (2017).

No espectro de massas de primeira ordem (Figura 65) pode-se observar o sinal mais intenso m/z 301. Analisando o espectro de massas de segunda ordem (Figura 66) obtido para o íon precursor m/z 301 $[\text{M}-\text{H}]^-$, e com o auxílio de Fabre et al. (2001); Demarque et al. (2016) e do banco de dados Massbank Project, pode-se observar a massa molecular da quercetina. Os fragmentos em m/z 151 ($[\text{M}-\text{H}-150]^-$) e m/z 273

([M-H-28]⁻) são referentes a quebra do anel pirano. O fragmento m/z 107 foi originado a partir da perda de CO₂ do íon produto m/z 151 e o fragmento m/z 179 se formou por retrociclicação da quercetina, com a perda de 122 Da. Nas Figuras 75 a 81 das páginas 105-107, estão indicados os mecanismos de fragmentação geral de compostos da classe dos flavonoides.

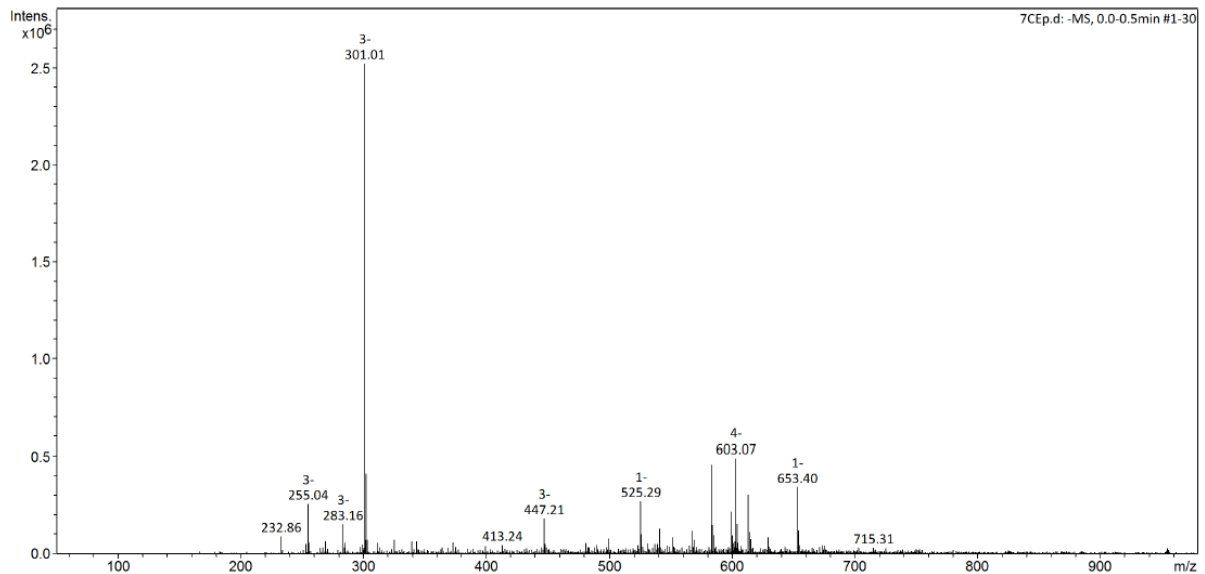


Figura 65 - Espectro de massas de primeira ordem em infusão direta no modo negativo *fullscan* da substância **IX**. Faixa de íons 50 a 1500 m/z (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

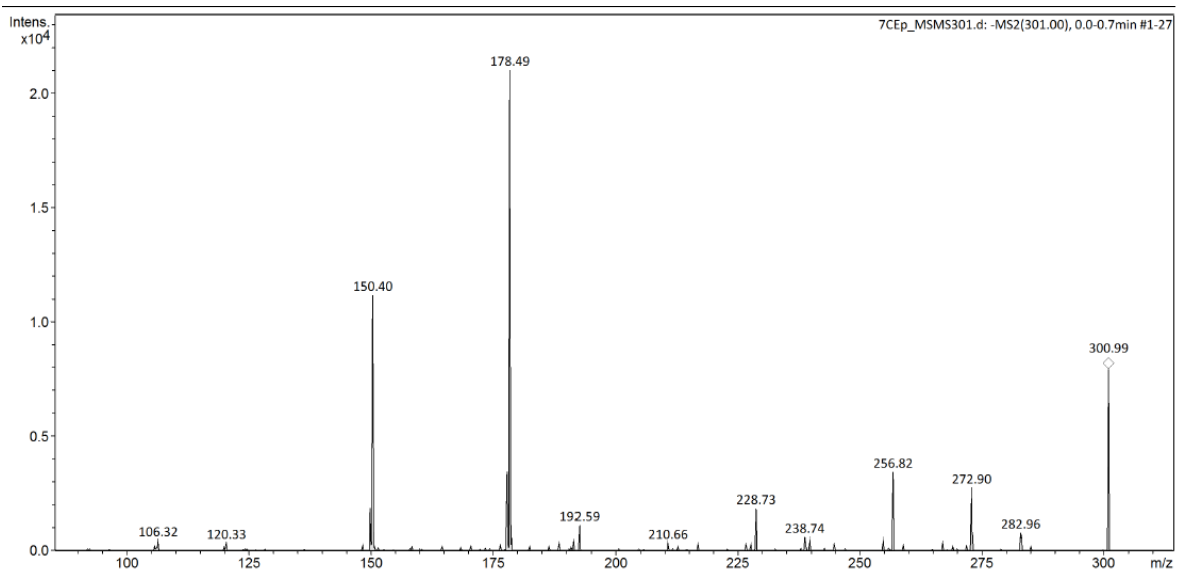


Figura 66 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 301 em modo negativo com faixa de íons 50 a 1500 m/z e intensidade de fragmentação 170% (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

4.8 Ensaios biológicos das substâncias isoladas

4.8.1 Ensaio da capacidade redutora do radical DPPH*

As substâncias isoladas e identificadas foram submetidas aos ensaios usados para avaliação das frações em diferentes concentrações, variando-se de 1 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 19.

Tabela 19 - Ensaio da capacidade redutora do radical DPPH* nos compostos identificados.

| Amostra | EC₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|--|---|
| Miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo (I) | 6,87 \pm 0,54 |
| Quercetina-3-O- β -D-glicosídeo e Quercetina-3-O- β -D-galactosídeo (mistura II e III) | 7,17 \pm 0,27 |
| Quercetina-3-O- β -D-xilosídeo (IV) | 36,63 \pm 1,12 |
| Quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (V) | 5,51 \pm 0,25 |
| Miricetina-3-O-(2"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo e Miricetina-3-O-(4"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo (mistura VI e VII) | 4,79 \pm 0,30 |
| Quercetina-3-O-(2"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo (mistura VIII) | 4,33 \pm 0,29 |
| Quercetina (IX) | 16,91 \pm 1,90 |
| Ácido gálico | 2,01 \pm 0,01 |

Fonte: Autora (2017).

De acordo com os resultados obtidos, a substância majoritária em mistura quercetina-3-O-(2"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo foi a que apresentou o menor valor de EC₅₀, indicando um potencial antioxidante bastante promissor. Outros compostos também apresentaram resultados interessantes nos testes realizados, corroborando com os dados da literatura que indicam os flavonoides como substâncias com elevado potencial antioxidante. Já a substância quercetina-3-O- β -D-xilosídeo, encontrada na fração 3CEh, apresentou valores elevados de EC₅₀, indicando baixa potencialidade em inibir o radical DPPH*.

4.8.2 Ação redutora sobre os radicais peroxila

As substâncias identificadas também foram analisadas quanto à atividade antioxidante frente a ação redutora dos radicais peroxila em diferentes concentrações, variando de 1 a 7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 20.

Tabela 20 - Ação redutora sobre os radicais peroxila nas substâncias identificadas.

| Amostra | EC₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|--|---|
| Miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo (I) | 1,05 \pm 0,10 |
| Quercetina-3-O- β -D-glicosídeo e Quercetina-3-O- β -D-galactosídeo (mistura II e III) | 2,62 \pm 0,21 |
| Quercetina-3-O- β -D-xilosídeo (IV) | 3,96 \pm 0,35 |
| Quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (V) | 1,05 \pm 0,05 |
| Miricetina-3-O-(2"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo e Miricetina-3-O-(4"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo (mistura VI e VII) | 2,21 \pm 0,04 |
| Quercetina-3-O-(2"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo (mistura VIII) | 1,72 \pm 0,16 |
| Quercetina (IX) | 3,02 \pm 0,22 |
| Ácido gálico | 0,91 \pm 0,07 |

Fonte: Autora (2017).

De acordo com a Tabela 20, os compostos que apresentaram menores valores de EC₅₀ foram: miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo e quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo, indicando elevado potencial antioxidante de ambos os compostos. Pode-se observar também que todos os compostos em comparação com o padrão ácido gálico, apresentaram valores promissores de EC₅₀. Este resultado é indicativo da excelente atividade dos compostos em análise, já que quanto maior o tempo de decaimento da fluorescência da piranina mais os compostos atuam como antioxidante.

4.8.3 Ensaio de atividade antiglicação

As substâncias identificadas foram avaliadas também em relação a atividade antiglicante e os resultados do teste são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Teste de antiglicação nas substâncias identificadas.

| Amostra | Inibição (%) |
|--|---------------------|
| Miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo (I) | 53,63 \pm 1,37 |
| Quercetina-3-O- β -D-glicosídeo e Quercetina-3-O- β -D-galactosídeo (mistura II e III) | 51,18 \pm 0,55 |
| Quercetina-3-O- β -D-xilosídeo (IV) | 31,44 \pm 0,55 |
| Quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (V) | 67,14 \pm 0,55 |
| Miricetina-3-O-(2"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo e Miricetina-3-O-(4"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo (mistura VI e VII) | 68,25 \pm 0,72 |
| Quercetina-3-O-(2"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo (mistura VIII) | 52,92 \pm 0,72 |
| Quercetina (IX) | 43,76 \pm 1,45 |
| Aminoguanidina (AG) | 91,31 \pm 0,27 |

Fonte: Autora (2017).

Os resultados mostraram que as substâncias quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo e a mistura contendo os compostos miricetina-3-O-(2"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo e miricetina-3-O-(4"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo apresentaram os maiores valores de porcentagem na inibição da reação de glicação. Os outros compostos também apresentaram resultados promissores frente ao ensaio, com exceção da quercetina-3-O- β -D-xilosídeo, cujos resultados estão abaixo de 40%, indicando baixa atividade. Assim, a maioria dos compostos identificados apresenta potencial na inibição da glicação, apresentando indícios de que podem ser utilizados pelas indústrias de cosméticos e farmacêuticas no desenvolvimento de um medicamento natural para complicações do diabetes e aceleração do envelhecimento cutâneo, como exemplos.

4.9 Estudo da fração acetato de etila de *Eugenia uniflora* por desreplificação utilizando IES-EM e CLAE-DAD

A desreplificação trata-se de uma análise qualitativa em misturas complexas, sendo uma etapa muito importante no processo de triagem de um extrato ou fração complexa com a finalidade de se evitar o isolamento e a determinação estrutural de substâncias já conhecidas por meio dos métodos convencionais, o que acarretaria no aumento de custos e tempo despendido na pesquisa. Esta prática faz uso de técnicas de instrumentação analítica associadas a buscas em bancos de dados, como *Dictionary of Natural Products* (FUNARI et al., 2013; SILVA et al., 2012).

A fração acetato de etila de *E. uniflora* foi estudada por desreplificação devido à sua similaridade de perfil cromatográfico com as outras duas espécies, nas quais os compostos foram devidamente isolados e identificados. Vale ressaltar que as espécies *E. pyriformis* e *E. handroana* foram estudadas com mais afinco devido ao fato de ambas não apresentarem muitos trabalhos publicados na literatura sobre os constituintes químicos de suas folhas, sendo os compostos identificados inéditos para ambas espécies, ao contrário da *E. uniflora*, da qual se encontra dados na literatura sobre seus compostos isolados tanto de folhas como de frutos.

O perfil cromatográfico das três espécies em estudos pode ser observado na Figura 67.

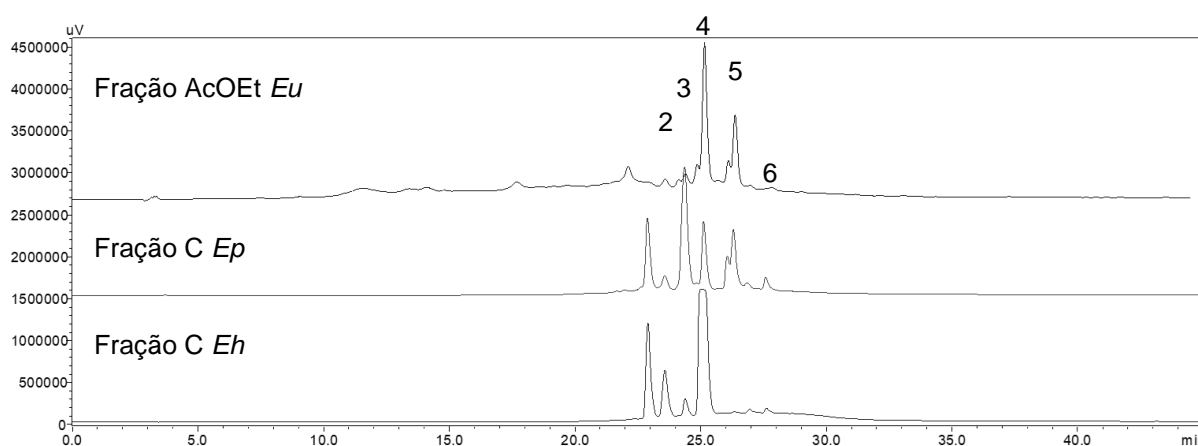


Figura 67 - Perfil cromatográfico das frações das três espécies em estudo. Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadesil silano (C_{18}) (250 x 4,6 mm, d.i. 5 μ m), volume de injeção foi de 25,0 μ L e eluição em modo gradiente exploratório utilizando como fases móveis H_2O (A) e MeOH (B), iniciando com 5 % B a 100 % B em 40 min. A vazão utilizada foi de 1,0 mL.min⁻¹ e $\lambda = 254$ nm. Fonte: Autora (2017).

Observando os perfis das três espécies em estudo pode-se perceber a similaridade dita anteriormente, sendo que os cromatogramas apresentam bandas com diferentes intensidades e compostos de média a baixa polaridade. Também é possível observar bandas com os mesmos tempos de retenção, podendo ser atribuídas aos mesmos metabolitos secundários, o que é proposto através das análises de IES-EM por infusão direta e pelo espectro de absorção em ultravioleta-visível (UV-vis).

No espectro de ultravioleta- visível pode-se constatar que as bandas a serem analisadas pertencem à classe de substâncias denominadas flavonoides. O espectro de absorção para uma destas bandas é apresentado na Figura 68.

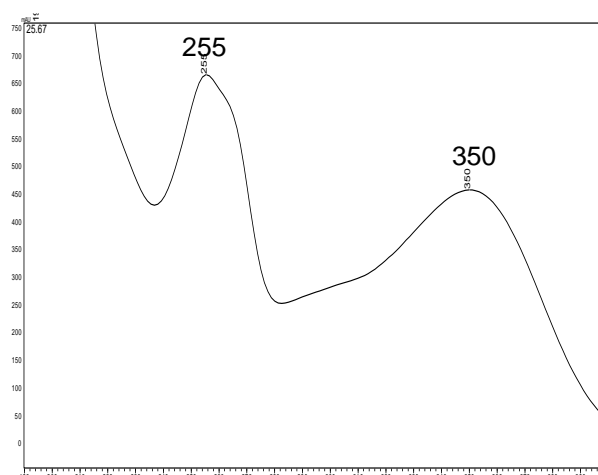


Figura 68 - Espectro de ultravioleta- visível para a banda em $t_r = 25,67$ min, da fração acetato de etila de *E. uniflora*. Fonte: Autora (2017).

Conforme apresentado, esta banda, assim como as demais encontradas em *E. uniflora*, apresenta duas bandas na faixa de absorção característica dos flavonoides, sendo que de acordo com a Tabela 1 de Markhan (1982), são do tipo flavonols 3-OH substituído, com exceção da quercetina que é um flavonol 3-OH livre.

O experimento de espectrometria de massas por infusão direta permitiu detectar os mesmos íons precursores que foram encontrados nas bandas cromatográficas das outras espécies em estudo, sendo estas também encontradas na espécie *E. uniflora*. Com o auxílio de dados da literatura e dos compostos identificados anteriormente para *E. pyriformis* e *E. handroana*, foi possível identificar tentativamente os íons precursores selecionados no espectro de massas de *E. uniflora*, que estão apresentados na Tabela 22. Os íons m/z 599 e m/z 615 também foram detectados,

porém devido a baixa intensidade dos mesmos, não foi possível obter um espectro de massas de segunda ordem.

Tabela 22 - Compostos identificados no extrato hidroetanólico de folhas de *E. uniflora*.

| Substâncias | Banda | UV-vis ($\lambda_{\text{máx}}$) | [M-H] ⁻ (<i>m/z</i>) | Fragmentos MS/MS (<i>m/z</i>) |
|--|-------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Quercetina-O-pentosídeo | 3 | 255; 354 | 433 | 35eV: 433 → 300; 297; 271; 255 |
| Quercetina-O-ramnosídeo | 4 | 255; 350 | 447 | 37eV: 447 → 301; 271; 255; 179; 151 |
| Quercetina-O-hexosídeo | 2 | 256; 347 | 463 | 35eV: 463 → 316; 300; 301; 271; 255 |
| Quercetina | 6 | - | 301 | 35eV: 301 → 283; 255; 201 |
| Quercetina-galoil-ramnosídeo | 5 | 265; 348 | 599 | - |
| Miricetina-3-O-(4"-O-galoil)- α -L-ramnosídeo e Miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -L-ramnosídeo | 3 | 255; 354 | 615 | - |

Fonte: Autora (2017).

A Figura 69 apresenta o espectro de segunda ordem do íon precursor *m/z* 433 para a fração acetato de etila de *E. uniflora*.

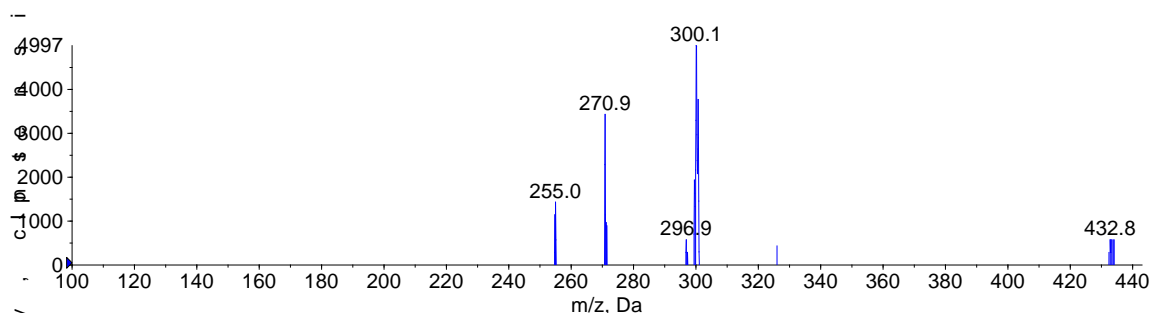


Figura 69 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de *m/z* 433 em modo negativo com energia de colisão 35 eV (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

Pode-se observar os mesmos fragmentos encontrados para a substância quercetina-3-O- β -D-xilosídeo, isolada da fração 3C de *E. handroana*, cujas fragmentações estão descritas na Seção 4.7.3, além da similaridade no espectro de absorção e tempo de retenção, podendo ser o mesmo composto. Até o momento não foi encontrado na literatura relatos desta substância na espécie, porém há relatos da mesma no gênero. Assim, a substância quercetina-3-O- β -D-xilosídeo foi anteriormente relatada por Batalhão (2014), no extrato etanólico de folhas da espécie *Eugenia myrcianthes*.

Analisando o espectro de massas de segunda ordem (Figura 70) obtido para o íon precursor m/z 447 [M-H]⁻ pode-se identificar tentativamente o flavonoide quercetina-O-ramnosídeo, por seu padrão de fragmentação e tempo de retenção similares a substância isolada quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo, podendo ser esta substância, que foi encontrada nas frações 4CEh e 4CEp, e apresentada na Seção 4.7.4. Desta forma, o flavonoide quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo pode estar presente na espécie *E. uniflora*, tendo sido relatado por Schmeda-Hirschmann et al. (1987), em extrato hidroalcoólico de folhas desta espécie.

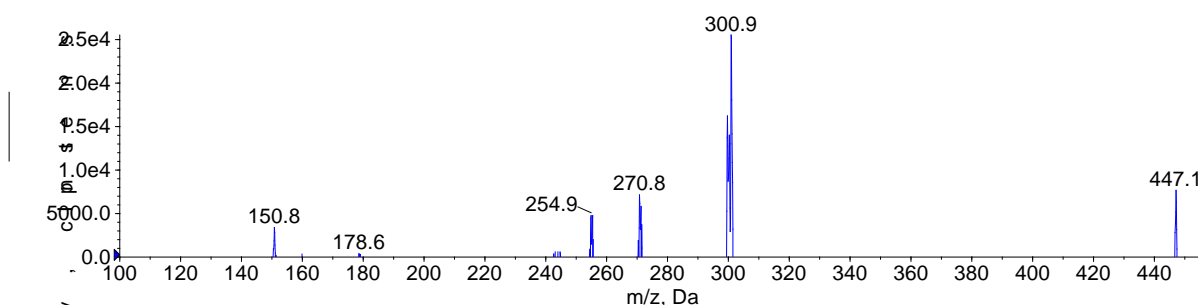


Figura 70 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 447 em modo negativo com energia de colisão 37 eV (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

A Figura 71 apresenta o espectro de segunda ordem do íon precursor m/z 463 para a fração acetato de etila de *E. uniflora*.

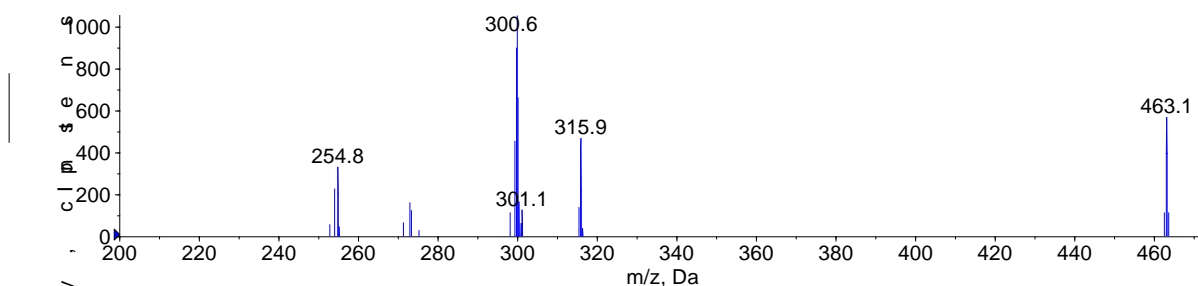


Figura 71 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 463 em modo negativo com energia de colisão 35 eV (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

Pode-se constatar os mesmos fragmentos encontrados para as substâncias quercetina-3-O- β -D-glicosídeo e/ou quercetina-3-O- β -D-galactosídeo, isolada das frações 2C de *E. pyriformis* e *E. handroana*, onde suas fragmentações estão descritas na Seção 4.7.2, além do mesmo tempo de retenção no gradiente exploratório realizado, sendo assim, a substância quercetina-O-hexosídeo pode ser uma dessas substâncias. Desta forma estas substâncias podem estar presentes na espécie *E. uniflora*. Os padrões de fragmentação desses compostos condizem com Rattmann et al. (2012), onde em seu estudo ele identifica este flavonoide como sendo uma quercetina com uma unidade hexosídica (glicose ou galactose), do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. uniflora*. Estudos feitos por Denardin et al. (2015), revelaram que o composto quercetina-3-O- β -D-glicosídeo foi encontrado em extrato 95% etanol de frutos de *E. uniflora*.

Analisando o espectro de massas de segunda ordem (Figura 72) obtido para o íon precursor m/z 301, identificou-se tentativamente o flavonoide quercetina, através de seu padrão de fragmentação e tempo de retenção similar a este composto da fração 6 de *E. pyriformis* (6CEp), apresentado na Seção 4.7.7. Assim, este flavonoide está presente tanto em *E. uniflora* como em *E. pyriformis*, tendo sido relatado por Schmeda-Hirschmann et al. (1987), em extrato hidroalcoólico de folhas de *E. uniflora*.

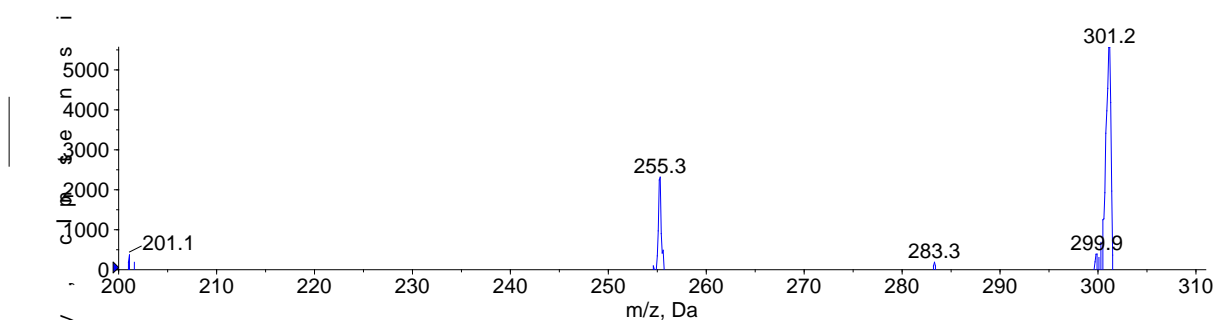


Figura 72 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 301 em modo negativo com energia de colisão 35 eV (Seção 3.8). Fonte: Autora (2017).

O íon precursor m/z 615 está presente na fração 3CEp da espécie *E. pyriformis*. Segundo Samy et al. (2014), que estudou os compostos presentes no extrato metanólico das folhas de *E. uniflora*, isolou da mesma a substância miricetina-3-O-(4"-O-galoil)- α -L-ramnosídeo encontrada como composto minoritário desta fração. Já o composto miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -L-ramnosídeo foi isolado do extrato acetato de etila das folhas de *E. uniflora*, segundo estudo de Fortes et al. (2015), composto este identificado como majoritário na fração 3CEp. Assim, os dados são indicativos de que a substância de m/z 615 encontrada na fração acetato de etila de *E. uniflora*

seja uma mistura de compostos, já que apresentam também similaridades no tempo de retenção no gradiente exploratório (Figura 67) e nos dados de absorção no ultravioleta (Figura 73 e 74).

A substância de m/z 599 está presente na fração 5CEp de *E. pyrifomis*, que foi comparada com Rattmann et al. (2012), cujo estudo identifica esta substância como sendo uma quercetina com uma unidade ramnosil-galato, encontrada no extrato hidroalcoólico das folhas de *E. uniflora*. Na fração 5CEp, o composto identificado foi quercetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -L-ramnosídeo. Como a fração 5CEp está no mesmo tempo de retenção (Figura 67) e possui ultravioleta visível similar a substância de m/z 599 encontrada em *E. uniflora* (Figura 73 e 74), pode se concluir que o m/z 599 encontrado da fração acetato de etila de *E. uniflora* pode ser tentativamente identificado como a mesma substância, já que nos estudos de Rattmann et al. (2012) identificaram este composto em folhas de *E. uniflora*.

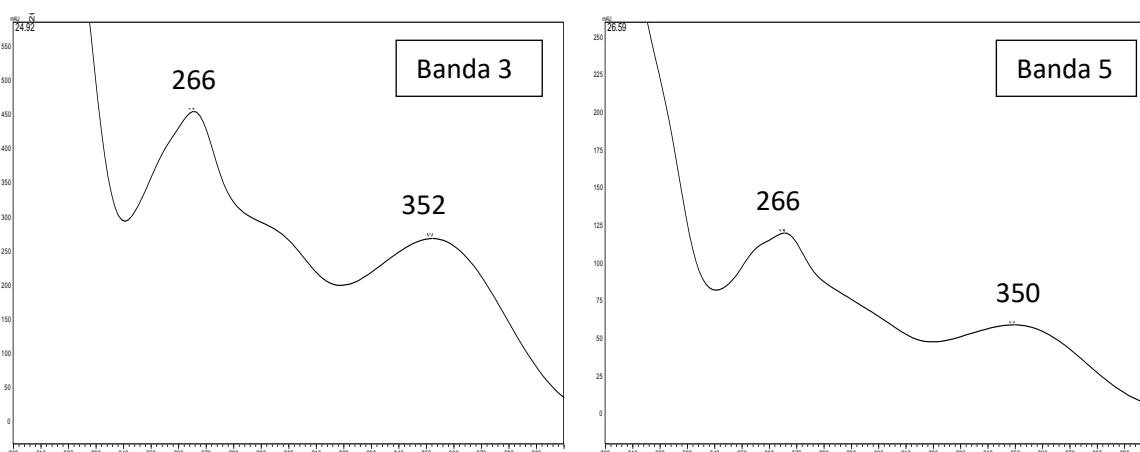


Figura 73 - Espectros de absorção em ultravioleta-visível das bandas 3 e 5 de *E. pyrifomis* respectivamente. Fonte: Autora (2017).

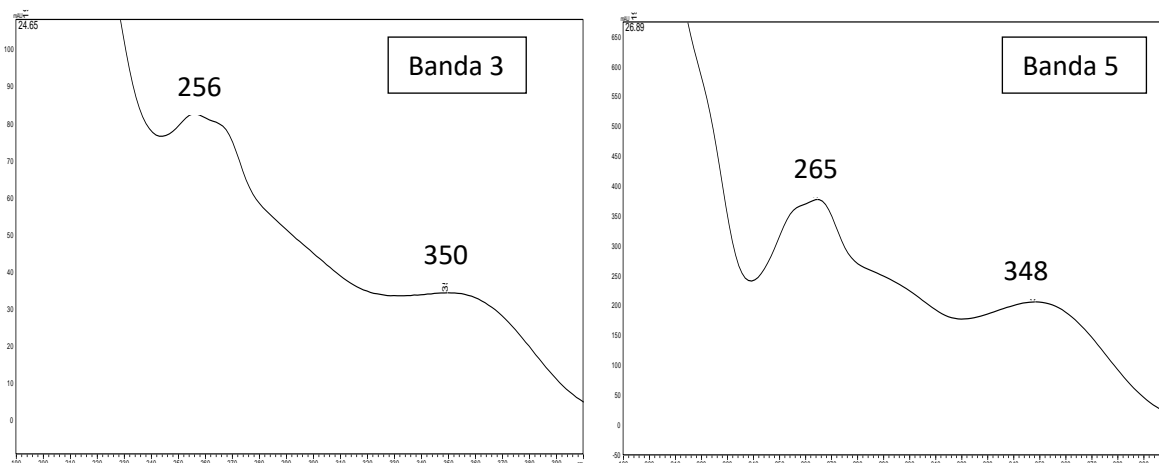


Figura 74 - Espectros de absorção em ultravioleta-visível das bandas 3 e 5 da fração acetato *E. uniflora* respectivamente. Fonte: Autora (2017).

Visto que todas as substâncias identificadas nas espécies estudadas pertencem à classe dos flavonoides, as propostas de fragmentação geral para estes compostos são apresentadas nas Figuras 75 a 81.

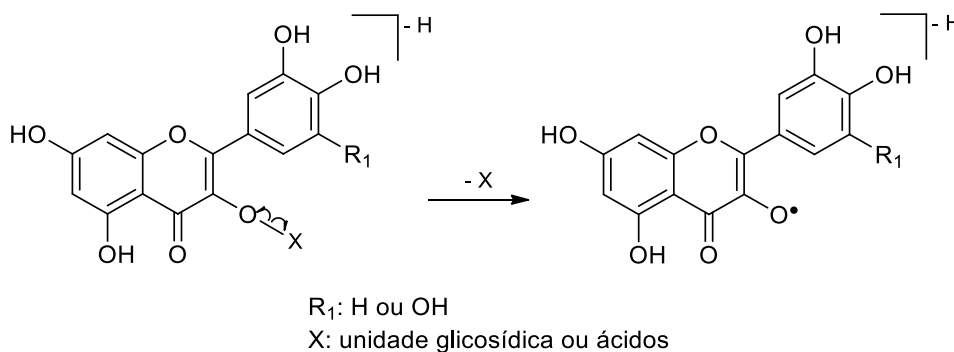


Figura 75 - Proposta de fragmentação homolítica. Fonte: Autora (2017).

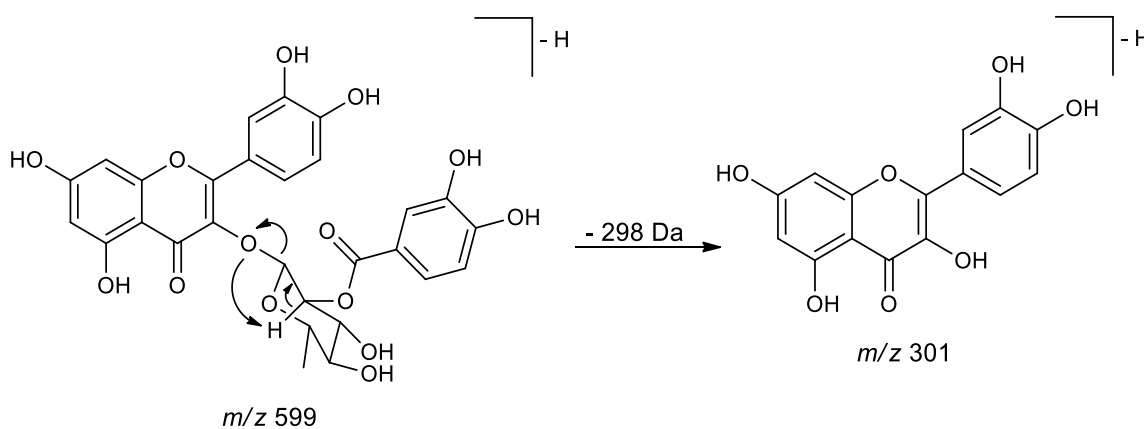


Figura 76 - Proposta de fragmentação de rearranjo de hidrogênio. Fonte: Autora (2017).

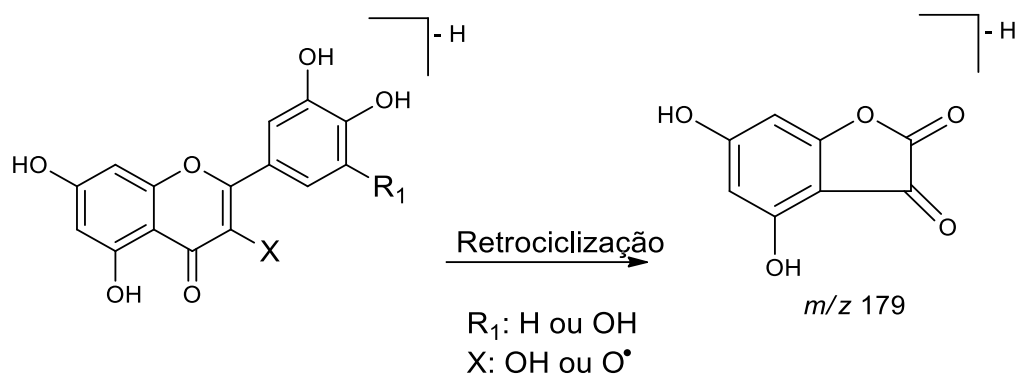


Figura 77 - Proposta de fragmentação por retrociclização.
Fonte: Frabe et al. (2001).

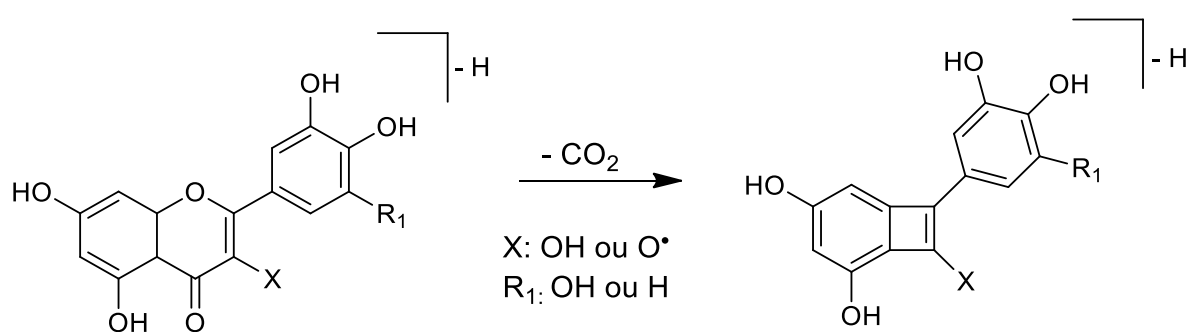


Figura 78 - Proposta de fragmentação de perda de CO₂.
Fonte: Frabe et al. (2001).

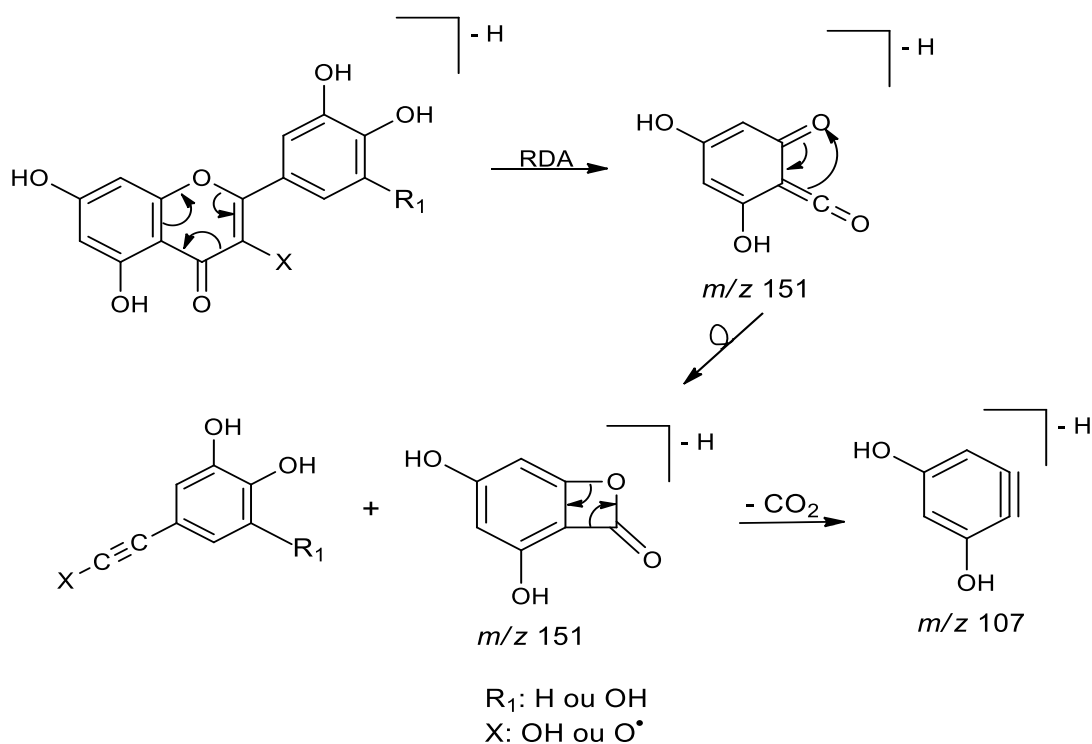


Figura 79 - Proposta de fragmentação do anel pirânico (C) e formação do íon m/z 107.
Fonte: Autora (2017).
RDA: Retro Diels-Alder

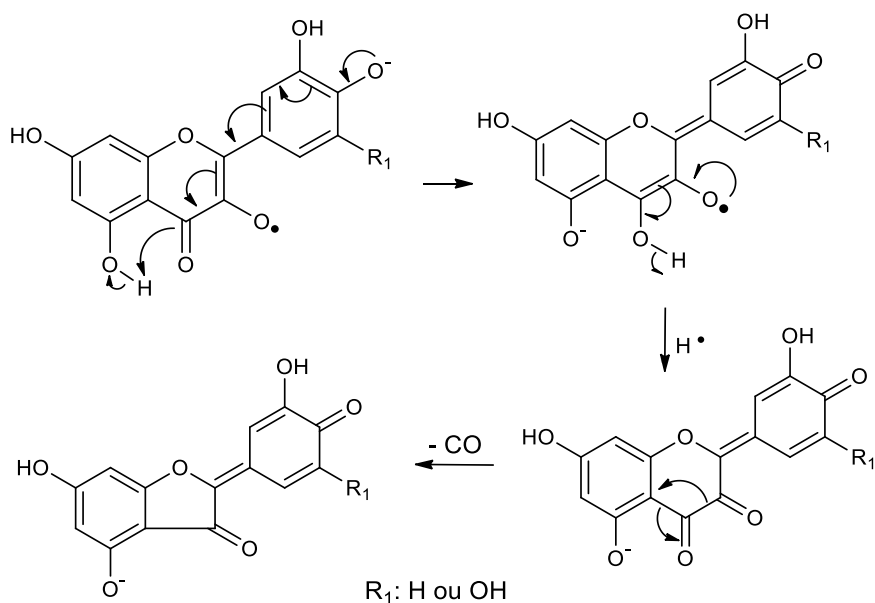


Figura 80 - Proposta de fragmentação do anel pirânico (C) com liberação de CO para clivagem homolítica.

Fonte: Autora (2017).

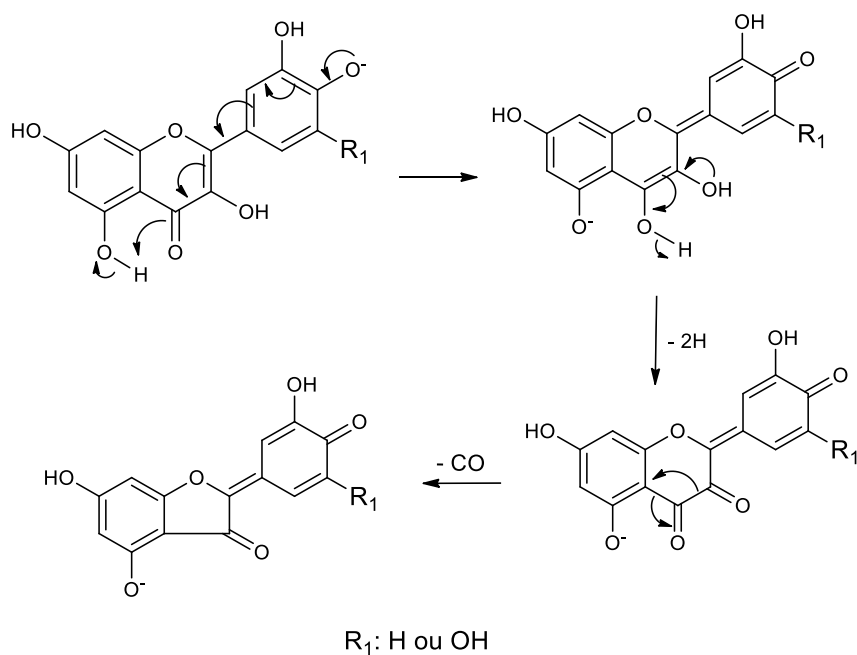


Figura 81 - Proposta de fragmentação do anel pirânico (C) com liberação de CO para clivagem heterolítica.

Fonte: Autora (2017).

Estes mecanismos propostos e encontrados na literatura, nos leva a compreensão de como ocorrem as fragmentações dos íons precursores a fim de originar os íons produtos, auxiliando na discussão dos dados resultantes deste projeto.

5 CONCLUSÃO

Concluiu-se através da avaliação dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD dos extratos brutos e das frações obtidas a partir das folhas de *E. pyriformis*, *E. handroana* e *E. uniflora*, a presença de substâncias da classe dos flavonoides pelos dados espectrais discutidos nos resultados do presente trabalho e pela presença de duas bandas de absorção nos espectros no UV, uma na região de 250-280 nm (banda II) e outra em 330-385 nm (banda I) que são características tradicionalmente utilizadas para a identificação de derivados flavonoídicos, no caso deste projeto, os flavonóis.

Através dos ensaios para avaliar a atividade antioxidante dos extratos e frações pela capacidade redutora do radical DPPH^{*} e dos radicais peroxila foi possível concluir que a fração acetato de etila apresentou-se promissora nas três espécies estudadas. As frações acetato de etila das espécies *E. pyriformis* e *E. handroana* foram fracionadas por cromatografia em coluna obtendo-se 6 frações, sendo que as frações B e C de *E. pyriformis* e A, B e C de *E. handroana* apresentaram resultados significativos nos ensaios antioxidantes. Concluiu-se também que todas as substâncias isoladas apresentaram valores notáveis como antioxidantes. Os resultados obtidos fornecem dados sobre o perfil dos extratos e frações em estudo que permitem indagar que espécies de Myrtaceae são, de fato, ricas em constituintes fenólicos de interesse para os setores de cosméticos e alimentos funcionais, sendo, portanto, um táxon interessante para pesquisa em produtos naturais. Vale ressaltar que mesmo sendo constatadas atividades antioxidante potentes, os mesmos precisam de avaliação de eficácia e segurança para posteriores usos comerciais. Esta ressalva é devido a grande disseminação popular de usos de plantas da família Myrtaceae, muito em função dos frutos muito apreciados de algumas das espécies.

Por meio do ensaio de atividade antiglicação, concluiu-se que a fração acetato de etila das três espécies em estudo, assim como a fração C de *E. pyriformis* e *E. handroana* foram as mais ativas para inibir a formação de produtos avançados da glicação. Já analisando a atividade antiglicação das substâncias isoladas, foi possível concluir que a substância V como a mistura VI e VII foram as que apresentaram maior porcentagem de inibição da glicação. Produtos naturais antiglicação avançada são bastantes procurados atualmente pelos setores industriais de cosméticos funcionais e farmacêuticos, devido a busca por novos produtos que inibam o processo celular de glicação (formação de AGEs), considerados importantes mediadores patogênicos das

complicações do diabetes e da aceleração do envelhecimento cutâneo, especialmente para os portadores de doenças crônicas.

As técnicas de CLAE-DAD, CLAE-DAD em escala preparativa, RMN e IES-EM foram cruciais para a identificação das substâncias na fração C oriunda da fração acetato de etila de *E. pyriformis* e *E. handroana*. Desta forma, foi possível identificar os compostos: miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo, quercetina-3-O- β -D-glicosídeo, quercetina-3-O- β -D-galactosídeo, quercetina-3-O- β -D-xilosídeo, quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo, miricetina-3-O-(2"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo, miricetina-3-O-(4"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo, quercetina-3-O-(2"-O-galloil)- α -L-ramnosídeo e quercetina.

A fração acetato de etila de *E. uniflora* foi analisada por IES-EM e pelo processo de *desreplicação*, sendo possível identificar tentativamente os compostos: quercetina-O-pentosídeo, quercetina-O-ramnosídeo, quercetina-O-hexosídeo, quercetina, miricetina-3-O-(4"-O-galoil)- α -L-ramnosídeo, miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -L-ramnosídeo e quercetina-galoil-ramnosídeo por meio de tempo de retenção, espectro de absorção no ultravioleta-visível e espectro de massas dos compostos já isolados, além de dados publicados na literatura. A identificação em mistura pela técnica de *desreplicação* é muito útil na área de produtos naturais, já que o processo de isolamento de todos os constituintes ativos, em geral conduz a muitos derivados química e biologicamente conhecidos, resultando em economia de tempo e solventes.

Este estudo é de suma importância para o conhecimento dos metabólitos secundários presentes nas espécies de *Eugenia*, que apresentaram em suas frações atividades biológicas promissoras e que podem ser utilizados pelos setores de cosméticos e alimentos. O estudo também possui sua devida importância ao fornecer dados inéditos à literatura, já que *Eugenia pyriformis* não apresenta muitos estudos sobre a composição química de suas folhas, assim como *Eugenia handroana*, sobre a qual os estudos relatados na literatura se limitam à sua morfologia.

REFERÊNCIAS

- ABU-REIDAH, I. M. et al. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive componentes from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p. 179-191, 2015.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília, DF, 2003. 43 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes**. Brasília, DF, 2013. 41 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395734/Guia+para+Comprova%C3%A7%C3%A3o+da+Seguran%C3%A7a+de+Alimentos+e+Ingredientes/f3429948-03db-4c02-ae9c-ee60a593ad9c>>. Acesso em: 10 mar. 2017.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.
- OS ANTIOXIDANTES. **Food Ingredients Brasil**, n. 6, p. 16-30, 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2016.
- APEL, M. A. et al. Chemical composition of the essential oils of *Eugenia beaurepaireana* and *Eugenia pyriformis*: section *Dichotomae*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 3, p. 191-192, May/June 2004.
- ASSIS, C. P. O. de. et al. Toxicity of essential oils from plants towards *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) and *Suidasia pontifica* Oudemans (Acari: Astigmata). **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n. 4, p. 311-315, April 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. **Panorama do setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos**. Ago. 2016. Disponível em: <<https://www.abihpec.org.br/novo/wp-content/uploads/PANOMARA-DO-SETOR-2016.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2017.
- BAGATINI, J. A. *Eugenia uniflora* L. **Flora digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**, 2015. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=14370>. Acesso em: 23 jul. 2016.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (ages) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BATALHÃO, J. R. **Estudo fitoquímico de *Eugenia myrcianthes***: busca de substâncias bioativas. 2014. 143 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

BEHLING, E. B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentação e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BEM, A. F. de; KUNDE, J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes *mellitus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 185-191, jun. 2006.

BEZERRA, A. S. et al. Parâmetros climáticos e variação de compostos fenólicos em cevada. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1546-1552, set. 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CARDOSO, J. *Eugenia pyriformis* Cambess. **Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**, 2012. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=9262>. Acesso em: 23 jul. 2016.

CHAVASCO, J. M. et al. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais cerrado. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 13-20, jan./fev. 2014.

CHIARI, B. G. et al. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 323-330, 2012.

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Plantas medicinais e fitoterápicos**. São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://portal.crfs.org.br/publicacoes-2/cartilhas-por-area.html?download=202:cartilha-plantas-medicinais-e-fitoterapicos>>. Acesso em: 6 jun. 2017.

COSMÉTICOS à base de produtos naturais. [S.l.]: SEBRAE, 2008. (Série mercado). Disponível em: <http://www.funccex.org.br/material/redemercosul_bibliografia/biblioteca/ESTUDOS_BRASIL/BRA_167.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2017.

COTINGUIBA, G. C. et al. Methods of the antioxidant defense: a literature review. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231-237, 2013.

CUYCKENS, J.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-15, 2004.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

DEMARKE, D. P. et al. Fragmentation reactions using *electrospray* ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 367-524, Mar. 2016.

DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387-398, Sept. 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 2nd ed. West Sussex: Wiley & Sons, 2002. 486 p.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. Myrtales mediciniais. In: _____. **Plantas mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Ed. Unesp, 2002. Cap. 19, p. 321-330.

EUGENIA L. In: FLORA do Brasil 2020 em construção. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10338>>. Acesso em: 28 mar. 2017.

FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M.; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégicas concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção**, v. 13, n. 3, p. 489-501, set./dez. 2006.

FORTES, G. A. C. et al. Antioxidant activities of hydrolysable tannins and flavonoid glycosides isolated from *Eugenia uniflora* L. **Records of Natural Products**, v. 9, n. 2, p. 251-156, 2015.

FRABE, N. et al. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography *electrospray* ion trap mass spectrometry. **Journal American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, p. 707-715, 2001.

FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

FUNCTIONAL foods. **Food Insight**, July 2011. Disponível em: <<http://www.foodinsight.org/Content/3842/Final%20Functional%20Foods%20Background.pdf>>. Acesso em: 4 mar. 2017.

GATTUSO, G. et al. Flavonoid composition of *Citrus* juices. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1641-1673, 2007.

GHANADIAN, S. M. et al. Flavonol glycosides from *Euphorbia microsciadia* Bioss. with their immunomodulatory activities. **Iranian Journal oh Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 3, p. 925-930, 2012.

GIANEZINI, M. et al. Diferenciação de produto e inovação na indústria agroalimentar: a inserção de alimentos funcionais no Brasil. **Revista de Administração, Contabilidade e Economia**, v. 11, n. 1, p. 9-26, jun. 2012.

HAN, Q.-H. et al. Chemical constituents from the leaves and twigs of *Syzygium tetragonum* Wall. **Biochemical Systematics and Ecology** v. 41, p. 3-5, 2011.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids**: advances in research since 1986. London: Chapman & Hall, 1994. 676 p.

HVATTUM, E.; EKERBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative *electrospray* ionization tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, p. 43-49, 2003.

ISIDORO, M. M. et al. Fitoquímica e quimiosistemática de *Euxylophora paraensis* (Rutaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2119-2124, 2012.

JUNG, H. A. et al. Inhibition of advanced glycation endproducts formation by Korean thistle, *Cirsium maackii*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-5, Jan. 2015.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328-2375, 2013.

LAGO, J. H. 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.

LEE, M. et al. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1343-1349, 1997.

LOPES, G. L. ***Eugenia handroana* D. Legrand fruto- de- macaco**. [2012]. Disponível em: <<http://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/12331-2/>>. Acesso em: 23 jul. 2016.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. In: _____. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer, 1970. Chap. 5, p. 41-61.

MARKHAM, K. R. Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. In: _____. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. Chap 3, p. 36-51.

- MARTINEZ, M. Brócolis. **InfoEscola**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/plantas/brocolis/>>. Acesso em: 6 mar. 2017.
- MASSBANK PROJECT. [**Peak search**]. Disponível em: <<http://www.massbank.jp/PeakSearch.html>>. Acesso em: 12 ago. 2016.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.
- MORAIS, L. M. F; CONCEIÇÃO, G. M.; NASCIMENTO, J. M. Família Myrtaceae: análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. **Agrarian Academy**, v. 1, n. 1, p. 317-319, 2014.
- MOREIRA, B. O. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* engl. (Anacardiaceae)**. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.
- MOUFFOK, S. et al. Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. **Records of Natural Products**, v. 6, n. 3, p. 292-295, 2012.
- NATURA. **Sustentabilidade**. Disponível em: <<http://www.natura.com.br/a-natura/inovacao/sustentabilidade>>. Acesso em: 20 mar. 2017.
- OKONKWO, C. J. et al. Two new acylated flavonol glycosides from *Mimosa pigra* L. leaves sub-family Mimosoideae. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 71-75, 2016.
- OLIVEIRA, A. M. de. et al. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 618-624, dez. 2006. Supl.
- OLIVEIRA, R. N. de; DIAS, I. J. M.; CÂMARA, C. A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 39-43, jan./mar. 2005.
- PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S da. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102-107, jan./mar. 2007.
- PATRÍCIA, K. Por que a carne do Salmão é vermelha? **Diário de Biologia**. Disponível em: <<http://diariodebiologia.com/2012/06/por-que-a-carne-de-salmaa-e-cor-de-rosa/>>. Acesso em: 6 mar. 2017.
- PAVIA, D. L. et al. Espectroscopia no ultravioleta. In: _____. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. Cap. 7, p. 365-395.

PENG, X. et al. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. **Food & Function**, v. 2, p. 289-301, 2011.

PEREIRA, V. V. et al. *Electrospray* ionization mass spectrometry fingerprint of the *Byrsonima* species. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2539-2548, 2015.

PINO, E.; CAMPOS, A. M.; LISSI, E. 8-hydroxy-1,3,6-pyrene trisulfonic acid (pyranine) bleaching by 2,2'-azobis (2- amidinopropene) derived peroxy radicals. **Journal of Chemical Kinetics**, v. 35, p. 525-531, 2003.

PLANTAS de interesse ao SUS. **Portal da Saúde**, maio 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/ceaf-sctie/fitoterapicos-cgafb/l1-fitoterapicos/12552-plantas-de-interesse-ao-sus>>. Acesso em: 8 jun. 2017.

QUEIROZ, J. M. G. et al. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. **Revista Fitos**, v. 9, n. 2, p. 89-95, abr./jun. 2015.

RAMIREZ, M. R. et al. Evaluation of the polyphenolic content, anti-inflammatory and antioxidant activities of total extract from *eugenia pyriformes* cambess (uvaia) fruits. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, p. 405-412, 2012.

RAMKISSOON, J. S. et al. Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 7, p. 561-569, 2013.

RATTMANN, Y. D. et al. Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against murine sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012. doi:10.1155/2012/623940.

ROCHA, F. D. et al. Diabetes mellitus and oxidative stress: natural products as target of new therapeutics types. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 2, p. 49-54, 2006.

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

SABARÁ, U. O futuro das empresas depende da valorização da biodiversidade. **Brazil Beauty News**, jan. 2017. Disponível em: <<http://www.brazilbeautynews.com/o-futuro-das-empresas-depende-da-valorizacao-da,1679>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. using FIA-ESI-IT-MS and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, v. 18, p. 8402-8416, 2013.

SAMY, M. N. et al. Bioactive compounds from the leaves of *Eugenia uniflora*. **Journal of Natural Products**, v. 7, p. 37-47, 2014.

- SANTOS, J. C. dos. **Toxicidade de extratos vegetais e suas frações para *Atta sexdens* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Formicidae) e seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* (Moller) Singer (Agaricales: Agaricaceae)**. 2013. 220 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, p. 183-186, 1987.
- SILVA, F. M. A. da et al. Desreplicação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por ESI-IT-MS. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 944-947, 2012.
- SILVA, T. M. S. da; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* AGRA & NEE E *S. paludosum* MORIC. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1119-1128, 2009.
- SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- SOUZA, A. M. de. et al. In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae: antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862-867, Sept. 2014.
- SOUZA, T. M. et al. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 36-38, jan./mar. 2005.
- SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.
- THEODULOZ, C. et al. Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan Myrtaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, p. 179-183, 1988.
- TIBERTI, L. A. et al. On-Line LC/UV/MS analysis of flavonols in the three apple varieties most widely cultivated in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 100-105, 2007.
- VECHIA, C. A. D. et al. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 288-296, 2016.
- VERDI, M. *Eugenia handroana* D. Legrand. **Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**, 2010. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=4477>. Acesso em: 23 jul. 2016.

VICENTINI, A.; LIBERATORE, L.; MASTROCOLA, D. Functional foods: trends and development of the global market. **Italian Journal of Food Science**, v. 28, n. 2, p. 338-351, 2016.

VIDAL, A. M. et al. A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. **Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde**, Aracaju, v. 1, n. 15, p. 43-52, out. 2012.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; TEIXEIRA, F. C. Alimentos funcionais: conceitos básicos. **Embrapa Clima Temperado, Documento**, 312, dez. 2010.

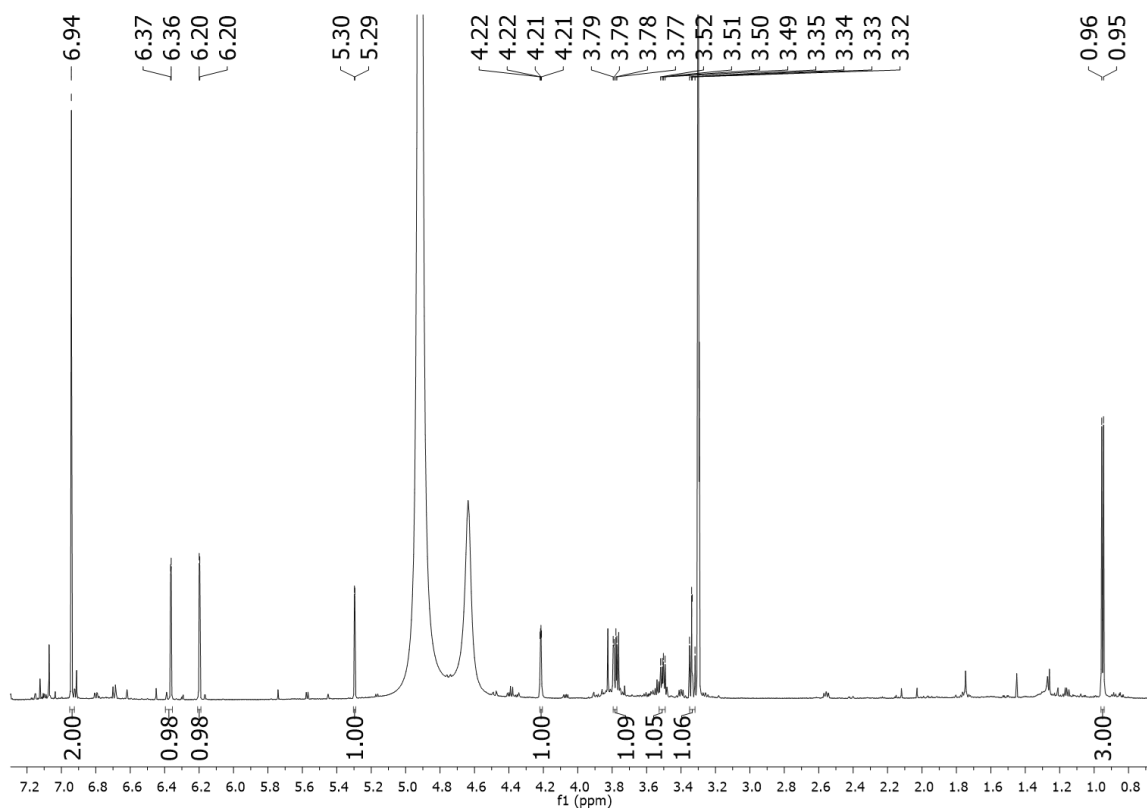
WUST, K. M. et al. Investigação fitoquímica, atividade antioxidante, antifúngica e antibacteriana da parte aérea da macrófita *Paspalum Repens* P. J. Bergius. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1392-1403, set. 2016.

ZOLLER, C. Importância do tomate. **InfoEscola**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/alimentos/importancia-do-tomate/>>. Acesso em: 6 mar. 2017.

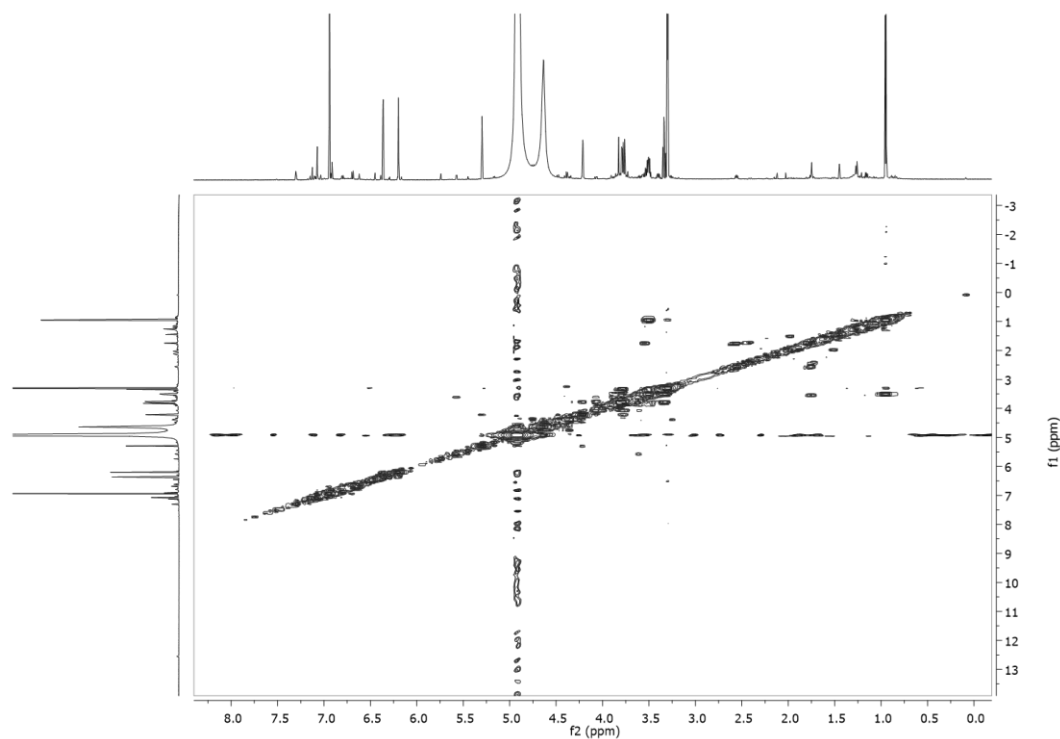
ANEXO

O anexo é composto pelos dados complementares das análises por RMN unidimensionais, bidimensionais e IES-EM por infusão direta das substâncias encontradas nas frações 1C, 2C e 4C de *Eugenia pyriformis* Cambess. Todos os anexos foram produzidos pela autora.

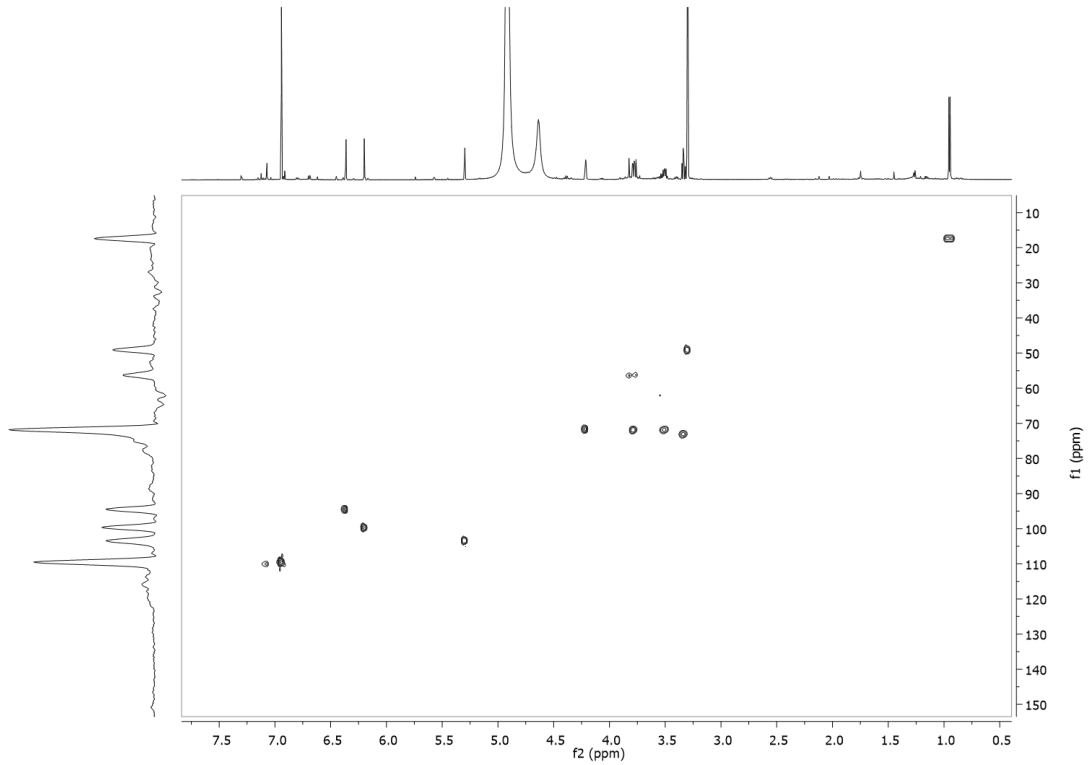
Anexo 1 - Espectro de RMN de ^1H da substância miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo na fração 1 CE_p (600 MHz, CD₃OD).



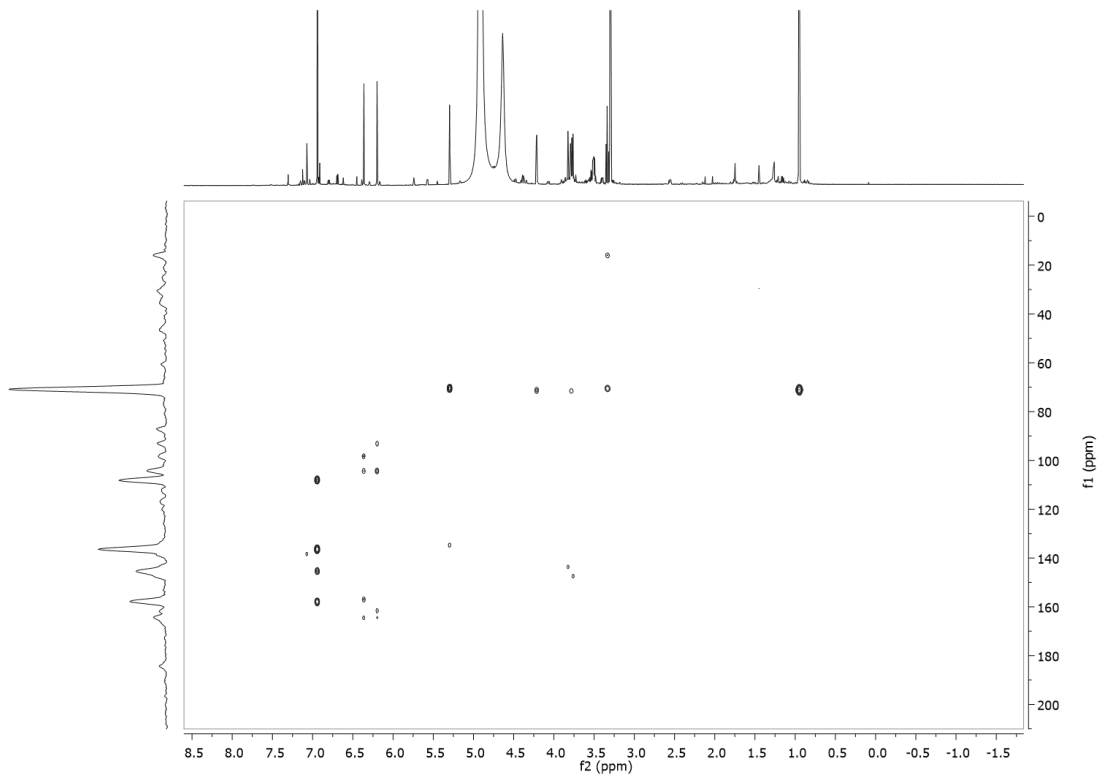
Anexo 2 - Mapa de contornos COSY da substância miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo na fração 1 CE_p (600 MHz, CD₃OD).



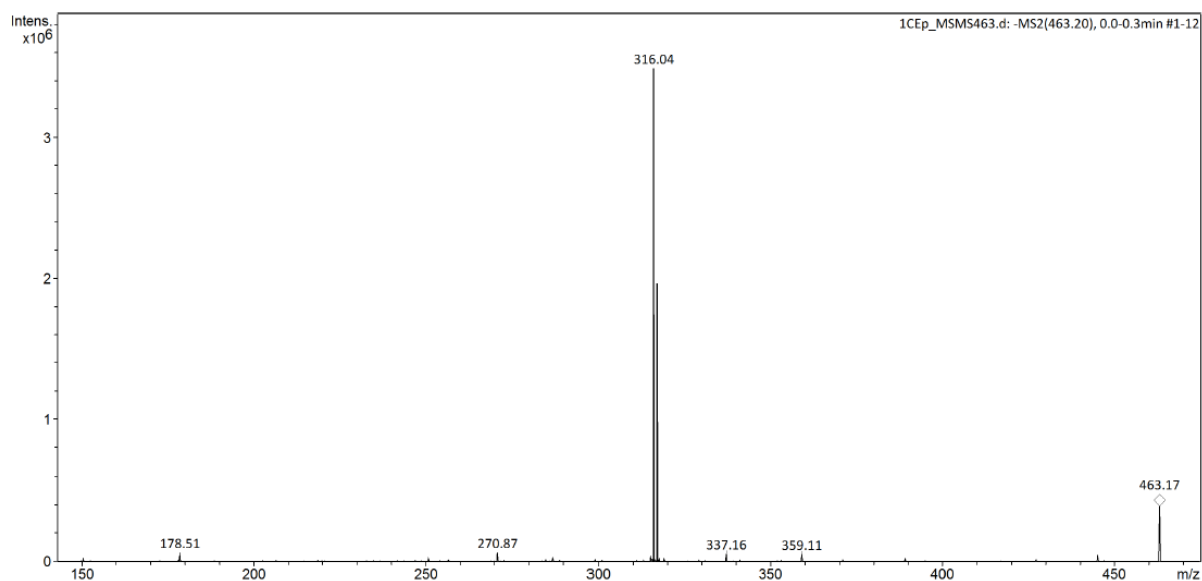
Anexo 3 - Mapa de correlações HSQC da substância miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo na fração 1 CE_p (600 MHz, CD₃OD).



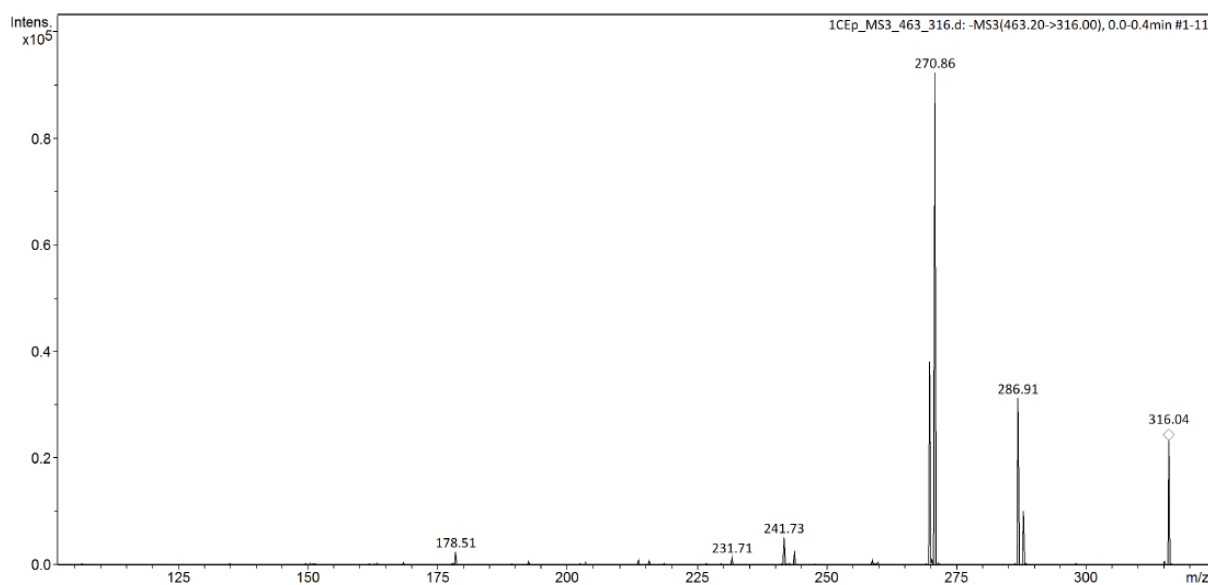
Anexo 4 - Mapa de correlações HMBC da substância miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo na fração 1 CE_p (600 MHz, CD₃OD).



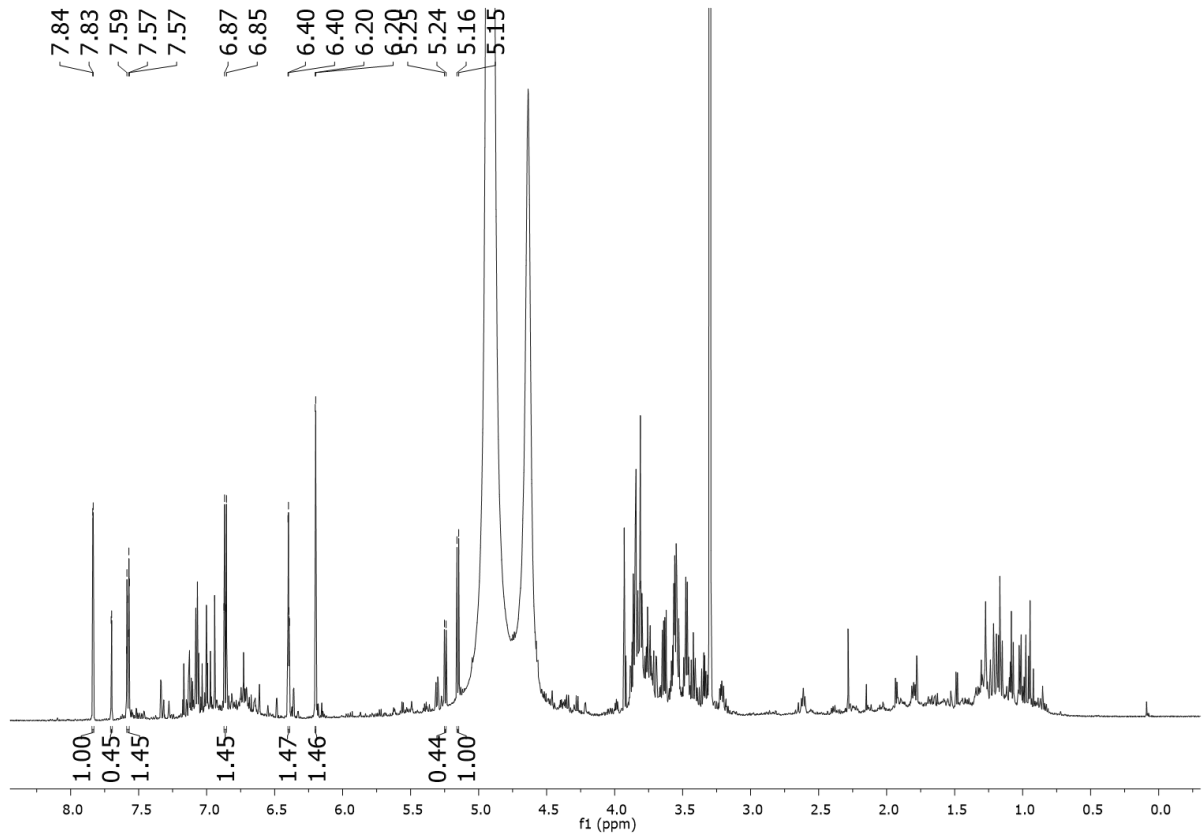
Anexo 5 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 463 em modo negativo com faixa de íons 50 a 1500 m/z e intensidade de fragmentação 100%. (Miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo)



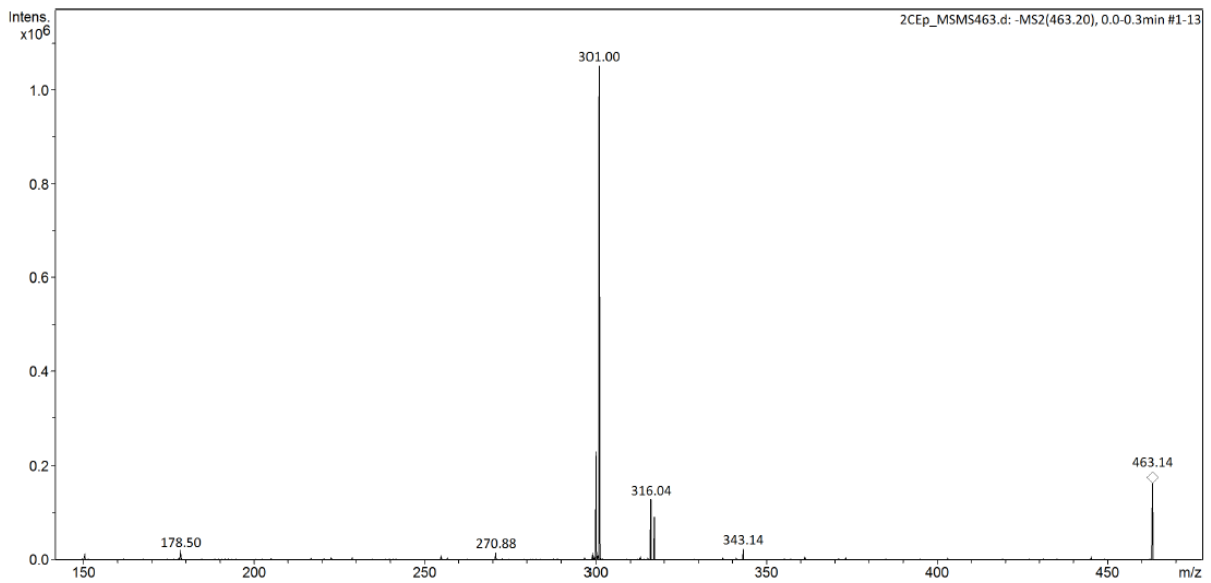
Anexo 6 - Espectro de massas de terceira ordem do íon precursor de m/z 316 em modo negativo com faixa de íons 50 a 1500 m/z e intensidade de fragmentação 150%. (Miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo)



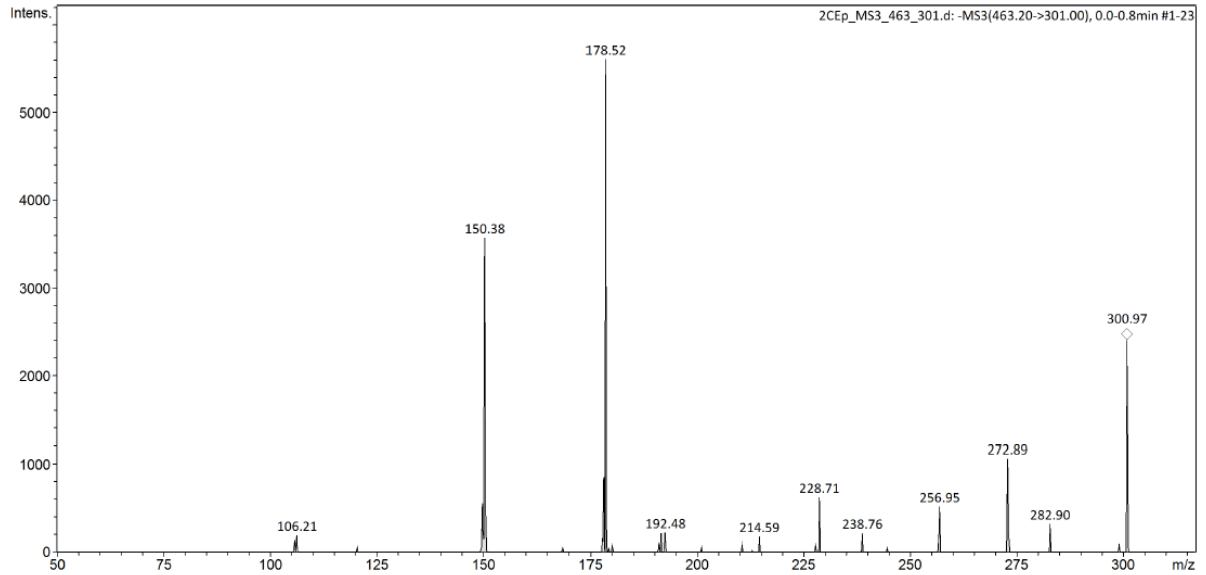
Anexo 7 - Espectro de RMN de ^1H das substâncias quercetina-3- O - β -D-glicosídeo e quercetina-3- O - β -D-galactosídeo na fração 2 CEp (600 MHz, CD_3OD).



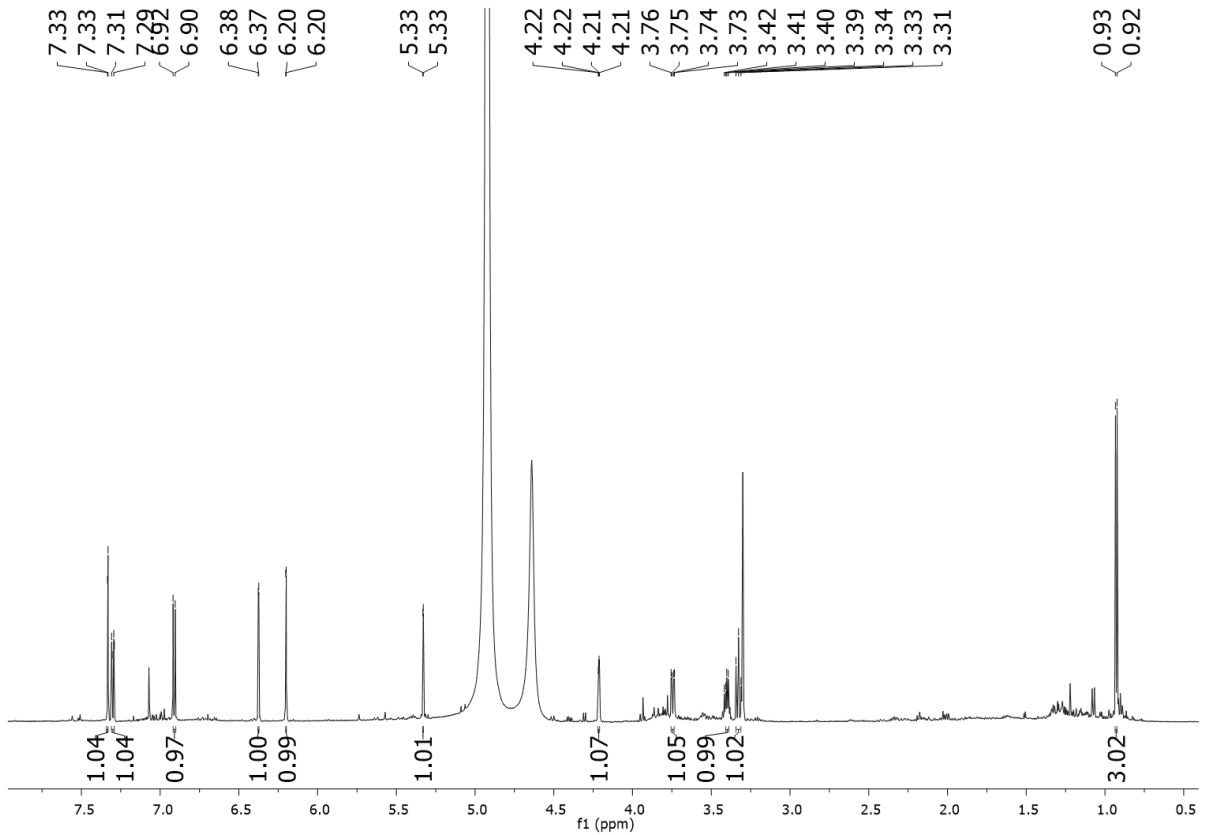
Anexo 8 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 463 em modo negativo com faixa de íons 50 a 1500 m/z e intensidade de fragmentação 85%. (Quercetina-3- O - β -D-glicosídeo e quercetina-3- O - β -D-galactosídeo)



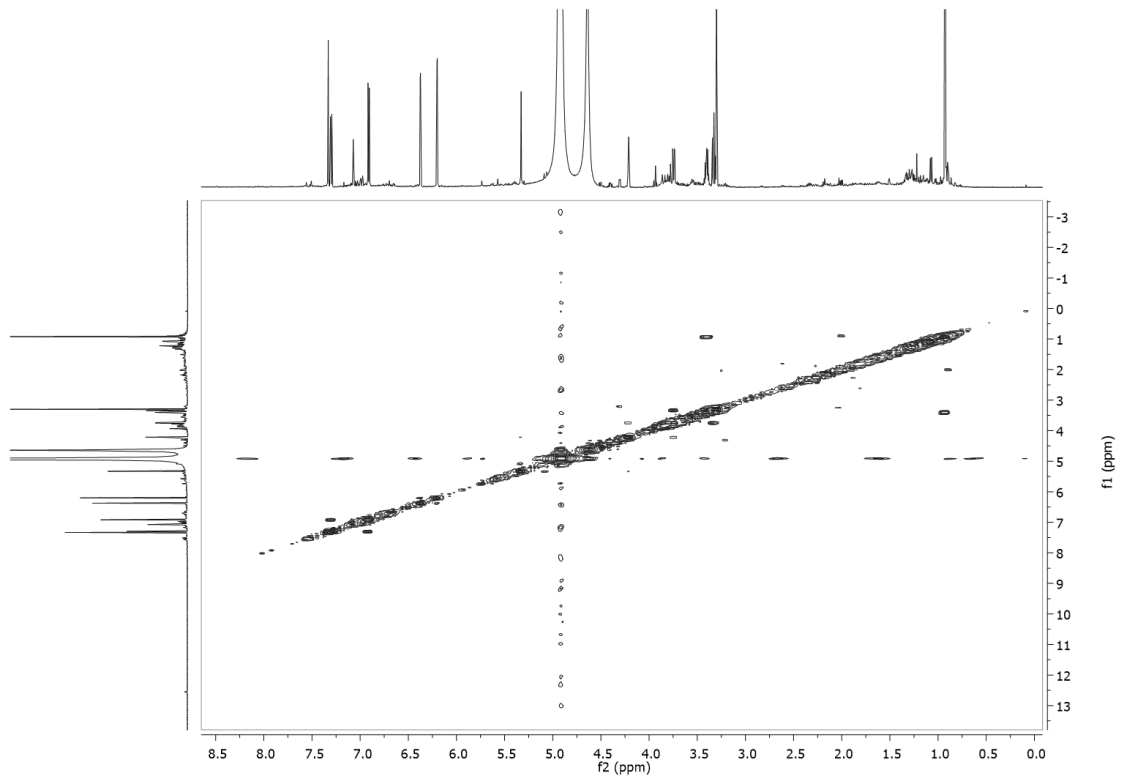
Anexo 9 - Espectro de massas de terceira ordem do íon precursor de m/z 301 em modo negativo com faixa de íons 50 a 1500 m/z e intensidade de fragmentação 160 %. (Quercetina-3-O- β -D-glicosídeo e quercetina-3-O- β -D-galactosídeo)



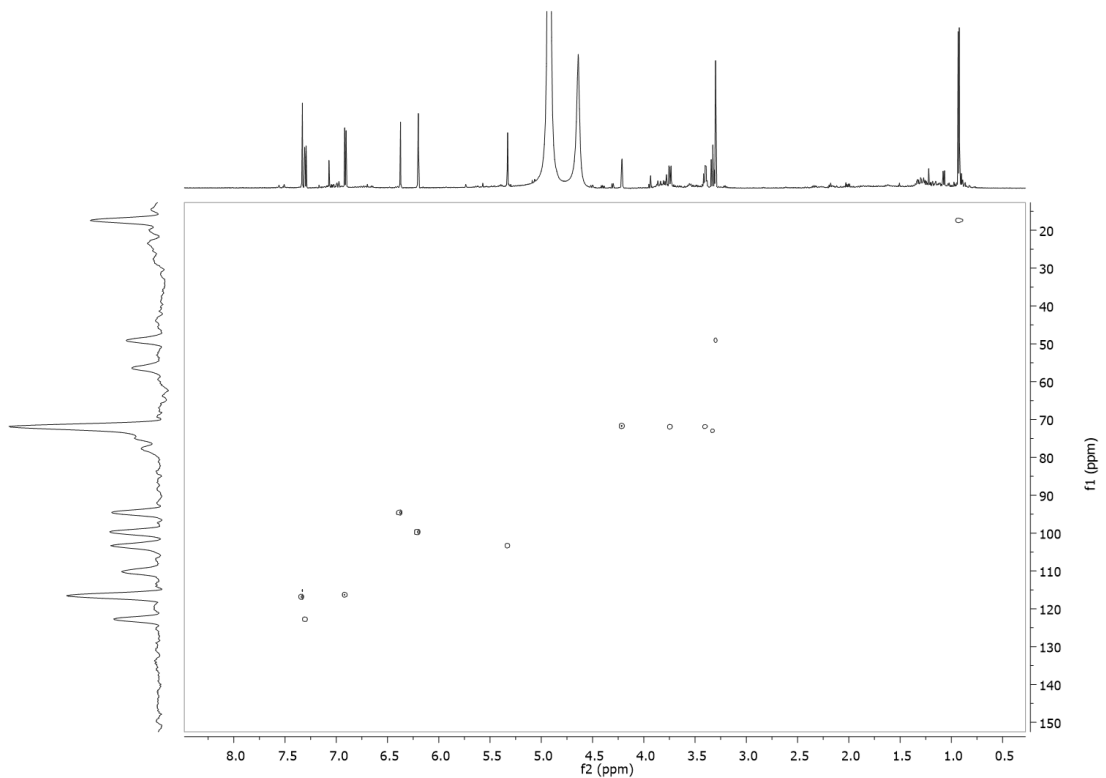
Anexo 10 - Espectro de RMN de ^1H da substância quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo na fração 4 CEp (600 MHz, CD_3OD).



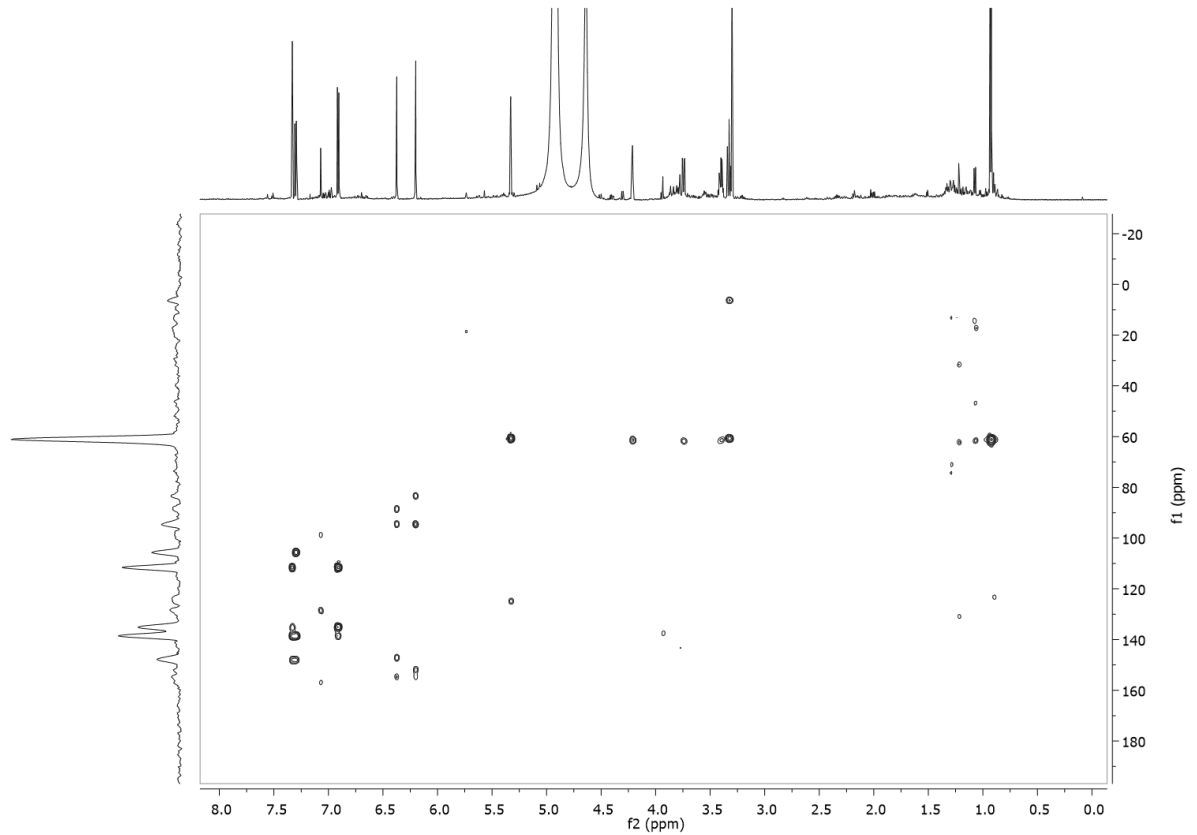
Anexo 11 - Mapa de contornos COSY da substância quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo na fração 4 CEp (600 MHz, CD₃OD).



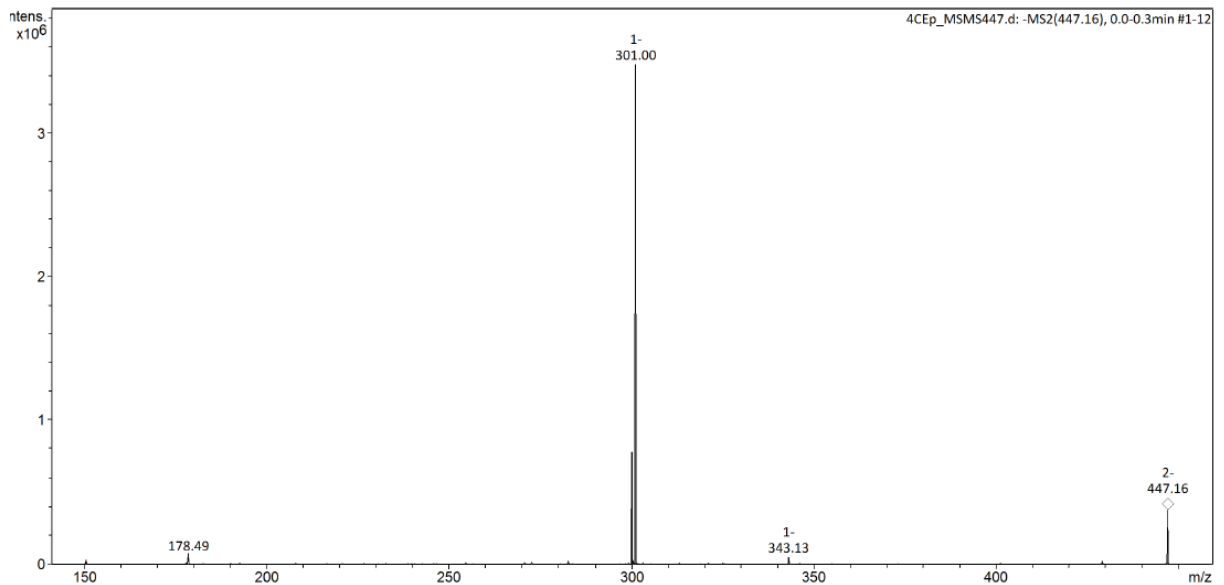
Anexo 12 - Mapa de correlações HSQC da substância quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo na fração 4 CEp (600 MHz, CD₃OD).



Anexo 13 - Mapa de correlações HMBC da substância quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo na fração 4 CEp (600 MHz, CD₃OD).



Anexo 14 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 447 em modo negativo com faixa de íons 50 a 1500 m/z e intensidade de fragmentação 75%. (Quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo)



Anexo 15 - Espectro de massas de terceira ordem do íon precursor de m/z 301 em modo negativo com faixa de íons 50 a 1500 m/z e intensidade de fragmentação 235 %. (Quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo)

