

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**ESTUDO FITOQUÍMICO SOBRE TRÊS ESPÉCIES NATIVAS
DA FAMÍLIA MYRTACEAE DA MATA ATLÂNTICA (RJ)**

VÍCTOR DE CARVALHO MARTINS

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO SOBRE TRÊS ESPÉCIES NATIVAS
DA FAMÍLIA MYRTACEAE DA MATA ATLÂNTICA (RJ)**

VÍCTOR DE CARVALHO MARTINS

Sob a Orientação do
Professor Dr. Mario Geraldo de Carvalho

e Co-orientação do
Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Química**, no Programa de Pós-
Graduação em Química, Área de
Concentração em Química.

Seropédica, RJ
Janeiro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M379e Martins, Víctor de Carvalho, 1991-
Estudo fitoquímico sobre três espécies nativas da
família Myrtaceae da Mata Atlântica (RJ) / Víctor de
Carvalho Martins. - Seropédica, 2022.
209 f.

Orientador: Mário Geraldo de Carvalho.
Coorientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Química, 2022.

1. Myrciaria tenella. 2. Eugenia copacabanensis.
3. Myrcia eriopus. I. Carvalho, Mário Geraldo de,
1952-, orient. II. Godoy, Ronoel Luiz de Oliveira,
1951-, coorient. III Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Química. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

VICTOR DE CARVALHO MARTINS

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química.

TESE APROVADA EM 28/01/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Membros da banca:

Mario Geraldo de Carvalho. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Monalisa Santana Coelho de Jesus Dr^a. EMBRAPA

Julio Cesar Escalona Arranz Dr. UO-Cuba

Roberto Carlos Campos Martins. Dr. UFRJ

Marco Andre Alves de Souza. PPGQ-UFRRJ



Emitido em 2022

TERMO Nº 66/2022 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 31/01/2022 11:07)

MARCO ANDRE ALVES DE SOUZA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DBQ (11.39.00.24)

Matrícula: 2582213

(Assinado digitalmente em 31/01/2022 12:13)

MARIO GERALDO DE CARVALHO

PROFESSOR TITULAR-LIVRE MAG SUPERIOR

DQO (11.39.00.23)

Matrícula: 6386421

(Assinado digitalmente em 31/01/2022 14:37)

ROBERTO CARLOS CAMPOS MARTINS

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 428.903.492-68

(Assinado digitalmente em 31/01/2022 10:53)

MONALISA SANTANA COELHO DE JESUS

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 072.786.517-00

(Assinado digitalmente em 31/01/2022 22:44)

JULIO CÉSAR ESCALONA ARRANZ

ASSINANTE EXTERNO

Passaporte: E354220

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número:
66, ano: **2022**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **31/01/2022** e o código de verificação: **853b658c25**

*À Deus, Nádia, Luiz e Vinicius,
por terem sido minha base forte durante longos anos.*

*“Em tudo dai graças, porque esta é a vontade de Deus
em Cristo Jesus para convosco.” I Ts 5.18*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. Mario Geraldo de Carvalho, por ter me dado a oportunidade de cursar o doutorado e ter aberto as portas do seu laboratório para a realização desta tese. Obrigado por toda a paciência, o conhecimento e os auxílios diversos ao qual me foi concedido durante os 4 anos.

Ao meu co-orientador professor Dr. Ronoel Luiz de O. Godoy, por nunca ter desistido de mim e por sempre ter me apoiado, até nos momentos em que estive desacreditado do meu potencial como profissional. Obrigado por todo o incentivo durante estes 9 anos de caminhada na Cromatografia Líquida, desde o estágio da graduação.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e à Embrapa Agroindústria de Alimentos, pela realização do meu curso de Doutorado em Química através da educação pública, federal e de qualidade.

As minhas alunas de IC, Liliana Princisval e Yasmim Ferreira, por todo o companheirismo, por terem sido meu braço esquerdo e direito durante o doutorado, com direito à muitas risadas, muito aprendizado e muitos congressos científicos.

Aos incríveis e competentes colegas do Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Alimentos, Dra. Manuela Santiago, Dr. Sidney Pacheco, Dra. Renata Borguini, Dra. Monalisa Coelho, Me. Luzimar Nascimento e Be. João Victor Mello, por tudo o que vocês contribuíram durante essa (quase) década de convívio, de incentivo, de muitos momentos maravilhosos. Obrigado por nunca desistirem de mim!

Ao professor Dr. Marcelo da C. Souza, pela contribuição e orientação quanto as informações taxonômicas das espécies estudadas.

À técnica do Laboratório de Cromatografia Gasosa da Embrapa Alimentos, Dra. Paola Ervatti, por toda a colaboração no estudo de óleo essencial.

Aos professores do IQ-UFRJ por todo o incentivo, em especial, aos professores Dr. Raimundo Braz-Filho, Dr. Luciano Suzart e Dra. Rosane Nora.

Aos colegas do IQ-UFRJ, por todo o apoio mútuo no dia-a-dia, melhorando o nosso ambiente de trabalho, em especial Débora Ramos, Mariana Rodrigues, Érica Barbosa, Gabriela Rocha, Érica Cabral e Lisieux Julião. Todas vocês me ajudaram a não desistir!

Às minhas amigas e pós-graduandas Elaine Braga e Karen Elbert, por compartilhar de todos os momentos de luta desde a graduação, passando pelo mestrado até o doutorado, que incluíram muita conversa, paciência e realizações. Que venham muito sucesso para nós!

E um agradecimento especial a psicóloga Aline Maia, pelo apoio profissional durante estes últimos anos pandêmicos, tendo me ajudado a lutar contra os momentos de ansiedade e a concluir o meu doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

MARTINS, Víctor de Carvalho. **Estudo fitoquímico sobre três espécies nativas da família Myrtaceae da Mata Atlântica (RJ)**. 2022. 209 p. Tese (Doutorado em Química, Química). Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

A Mata Atlântica é um dos *hotspots* mundiais, principalmente no estado do Rio de Janeiro e nas restingas pelo avanço da urbanização. Nestas regiões, destaca-se a família Myrtaceae, pela grande importância econômica, diferentes atividades biológicas e elevada taxa de endemismo. O objetivo desta tese foi identificar os metabólitos de espécies nativas e quimicamente pouco conhecidas da família Myrtaceae, da Mata Atlântica (RJ). Para tal finalidade, foram empregadas técnicas cromatográficas instrumentais como CG-DIC, CG-EM, CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM. O primeiro estudo consistiu na caracterização do óleo essencial de folhas de *Myrciaria tenella*, coletadas na Restinga da Marambaia (RJ). Foram identificadas 36 substâncias por CG-DIC e CG-EM, sendo majoritário os terpenos não-oxigenados como β - e α -pineno (21,46% e 19,43%, respectivamente), *E*-cariofileno (10,89%) e aromadendreno (9,17%). Foi sugerida a estrutura química do fenilpropanoide 2',4',6'-trimetóxi-fenil-butano para o quinto constituinte majoritário (8,45%), através de análises complementares por RMN ^1H e ^{13}C . Além disso, um óleo rico em β - e α -pineno e de alto rendimento foi obtido com apenas 2 h de extração. O segundo estudo consistiu na desreplicação de extratos metanólicos e partições subsequentes de folhas de *Eugenia copacabanensis* e *M. tenella*. Através de análise por CG-EM, CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM, foram identificadas 104 substâncias, sendo para cada espécie 78 e 64 substâncias, em sua maioria inéditas dentro de cada táxon. Para a espécie *E. copacabanensis*, destacam-se o ácido 3-*O*-cafeoilquínico – ácido clorogênico, o galato de metila, a quercitrina, os derivados de procianidina tipo B e os isômeros de strictinina e tellimagrandina I. No extrato e partições de *M. tenella*, o ácido elágico e seus derivados, como o ácido 3,3'-*O*-dimetil elágico, e os flavonóis quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)-galactosídeo, quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)-glicosídeo, hiperosídeo e isoquercitrina foram observadas majoritariamente. Diferentes classes foram isoladas ou obtidas em mistura, como o sesquiterpeno 2-metóxi-clovan-9-ol na partição hexânica de folhas de *E. copacabanensis* e com estrutura elucidada por experimentos uni- e bidimensionais de RMN ^1H e ^{13}C . O terceiro estudo teve como objetivo caracterizar um produto liofilizado de frutos de *Myrcia eriopus*. Através da análise por CLAE-DAD e IES-QTdV-EM, 5 antocianinas monoglicosiladas e outras 2 substâncias fenólicas (ácido gálico e miricetina) foram identificadas, com destaque para a delphinidina 3-*O*-glicosídeo e a petunidina 3-*O*-glicosídeo. O pó liofilizado apresentou alto teor de antocianinas e potencial antioxidante quando comparados a outros frutos brasileiros. Todos os resultados impactam positivamente na preservação das espécies nativas brasileiras, através da caracterização química e dos ensaios biológicos feitos em parceria, sendo previamente publicados em revistas científicas de alto impacto.

Palavras-chave: *Myrciaria tenella*, *Eugenia copacabanensis*, *Myrcia eriopus*.

ABSTRACT

MARTINS, Víctor de Carvalho. **Phytochemical study of three native species of Myrtaceae family from Atlantic Forest (RJ)**. 2022. 209 p. Thesis (Doctor Science in Chemistry, Chemistry). Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

The Atlantic Forest is one of the world hotspots, mainly in the state of Rio de Janeiro and in restingas due to the advance of urbanization. In these regions, the Myrtaceae family stands out, due to its great economic importance, different biological activities and high rate of endemism. The objective of this thesis was to identify the metabolites of native and chemically unknown species of the Myrtaceae family, from the Atlantic Forest (RJ). For this purpose, instrumental chromatographic techniques were employed such as GC-FID, GC-MS, HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS. The first study consisted of the characterization of the essential oil of *Myrciaria tenella* leaves, collected in Restinga da Marambaia (RJ). Thirty-six substances were identified by GC-FID and GC-MS, with the major composition of non-oxygenated terpenes such as β - and α -pinene (21.46% and 19.43%, respectively), *E*-caryophyllene (10.89%) and aromadendrene (9.17%). The chemical structure of the phenylpropanoid 2',4',6'-trimethoxyphenyl-butane was suggested as the fifth major constituent (8.45%), through the additional analyzes by ^1H and ^{13}C NMR. Furthermore, a high yield β -pinene/ α -pinene-rich essential oil was obtained with only 2 h of extraction. The second study consisted of the dereplication of methanol extracts and subsequent partitions from *Eugenia copacabanensis* and *M. tenella* leaves. By GC-MS, HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS analysis, 104 substances were identified, being 78 and 64 substances for each species and mostly reported for the first time for each taxon. For the species *E. copacabanensis*, 3-*O*-caffeoylquinic acid – chlorogenic acid, methyl gallate, quercitrin, type B procyanidin derivatives and isomers of strictinin and tellimagrandin I were the main substances. In the extract and partitions of *M. tenella*, ellagic acid and its derivatives, such as 3,3'-*O*-dimethyl ellagic acid, and the flavonols quercetin 3-*O*-(6''-*O*-galoyl)-galactoside, quercetin 3-*O*-(6''-*O*-galoyl)-glycoside, hyperoside and isoquercitrin were mostly observed. Different classes were isolated or obtained in fractions, such as the sesquiterpene 2-methoxyclovan-9-ol in the hexane partition of *E. copacabanensis* leaves, with structure elucidation by one- and two-dimensional ^1H and ^{13}C NMR experiments. The third study aimed to characterize a lyophilized product from *Myrcia eriopus* fruits. By HPLC-DAD and ESI-QToF-MS analysis, 5 monoglycosylated anthocyanins and 2 other phenolic substances (gallic acid and myricetin) were identified, with delphinidin 3-*O*-glycoside and petunidin 3-*O*-glycoside as the major substances. The lyophilized powder had a high content of anthocyanins and antioxidant potential when compared to other Brazilian fruits. All results have a positive impact on the preservation of these Brazilian native species, through the chemical characterization and the biological tests in collaborations research, with these results previously published in high-impact scientific journals.

Key-words: *Myrciaria tenella*, *Eugenia copacabanensis*, *Myrcia eriopus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais critérios usados para classificação e exemplos de técnicas cromatográficas (ETTRE, 1993; LANÇAS, 2009a).	9
Tabela 2. Classificação taxonômica da família Myrtaceae (ITIS, 2014).	10
Tabela 3. Teores em porcentagem normalizada (%) das substâncias presentes no óleo essencial de folhas de <i>Myrciaria tenella</i> , obtido por 5 h de hidrodestilação.	23
Tabela 4. Deslocamentos químicos, em ppm, para ¹³ C obtidos experimentalmente dos constituintes majoritários do OEMT.	32
Tabela 5. Rendimentos de extração (% m/m) de OE de <i>Myrciaria tenella</i> de acordo com o tempo de destilação.	34
Tabela 6. Efeitos do tempo de destilação nos teores (% m/m) das principais substâncias do OEMT.	37
Tabela 7. Gradiente de eluição para o método por CLAE-DAD para substâncias fenólicas (SANTIAGO et al., 2018).	49
Tabela 8. Gradiente de eluição para o método por CLAE-DAD para carotenoides (PACHECO et al., 2014).	51
Tabela 9. Curvas analíticas utilizadas para quantificação de substâncias fenólicas.	52
Tabela 10. Proposta de identificação de substâncias nas frações hexânicas de folhas de Myrtaceae spp. através de desrepliação por CG-EM.	62
Tabela 11. Teores de carotenoides, em µg.g ⁻¹ , encontrados em folhas de Myrtaceae spp.	67
Tabela 12. Proposta de identificação por CLAE-DAD de substâncias fenólicas em partições de folhas de Myrtaceae spp.	69
Tabela 13. Teores de substâncias fenólicas, em µg.g ⁻¹ , em folhas de Myrtaceae spp.	74
Tabela 14. Proposta de identificação de substâncias, através de desrepliação por CLAE-DAD-EM, nos extratos/frações de folhas de <i>E. copacabanensis</i>	78
Tabela 15. Deslocamentos químicos, em ppm, para ¹ H e ¹³ C obtidos experimentalmente na fração EFEC-Ac 11-18.	96
Tabela 16. Proposta de identificação de flavonoides na fração SEP-ECB 12-19.	102
Tabela 17. Proposta de identificação de substâncias, através de desrepliação por CLAE-DAD-EM, nos extratos/frações de folhas de <i>M. tenella</i>	105
Tabela 18. Deslocamentos químicos, em ppm, para ¹ H e ¹³ C obtidos experimentalmente para o 2-metóxi-clovan-9-ol e a comparação com os dados da literatura, incluindo o sesquiterpeno clovandiol.	125
Tabela 19. Deslocamentos químicos, em ppm, para ¹ H e ¹³ C obtidos para o palmitato de metila e comparação com os dados da literatura (CHEMICALBOOK, [s.d.], [s.d.]).	134

Tabela 20. Deslocamentos químicos, em ppm, para ^1H e ^{13}C obtidos experimentalmente para a conglomerona e comparação com os dados da literatura (D'AMICO et al., 2011).	139
Tabela 21. Resultados para os ensaios indiretos de capturas de radicais sintéticos para os extratos brutos e partições de folhas de <i>Myrtaceae spp.</i>	148
Tabela 22. Mortalidade em % (média \pm desvio padrão) de larvas não-alimentadas de <i>R. microplus</i> tratadas com diferentes concentrações da fração rica em 2-metóxi-clovan-9-ol... 151	151
Tabela 23. Parâmetros obtidos no teste de imersão de larvas adultas (média \pm desvio padrão), tratados com diferentes concentrações da fração rica em 2-metóxi-clovan-9-ol.	152
Tabela 24. Concentração letal (CL_{50}), em mg.mL^{-1} , da fração rica em 2-metóxi-clovan-9-ol, obtido de folhas de <i>E. copacabanensis</i> , contra larvas não-alimentadas e fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	152
Tabela 25. Gradiente de eluição para o método por CLAE-DAD para antocianinas (GOUVÊA et al., 2015).	159
Tabela 26. Antocianinas identificadas nos frutos de <i>M. eriopus</i>	163

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do globo terrestre, com destaque para as regiões tropicais e seus biomas e formação de corais (REDE AMAZÔNIA SUSTENTÁVEL, 2021).....	2
Figura 2. Os 25 <i>hotspots</i> do planeta Terra, incluindo o Cerrado Brasileiro e a Mata Atlântica Brasileira (MYERS et al., 2000).	3
Figura 3. Diferentes objetivos de estudo científico para as substâncias oriundas do metabolismo secundário (SBPC, [s.d.]).	5
Figura 4. Esquema resumido das principais vias metabólicas observadas no metabolismo vegetal (BASER & BUCHBAUER, 2020).	6
Figura 5. Exemplos de terpenos, flavonoides e alcaloides de ocorrência natural em plantas. ...	7
Figura 6. Ilustração sobre o processo clássico de cromatografia em coluna.	8
Figura 7. Distribuição geográfica da família Myrtaceae no estado do Rio de Janeiro (SOUZA, 2014).....	10
Figura 8. Registros fotográficos da espécie <i>Myrciaria tenella</i> : (A) árvore adulta; (B) detalhe do tronco; (C) galhos com folhas, superfície adaxial; e (D) frutos maduros (FLORA DIGITAL/UFSC, 2020).	15
Figura 9. Registro fotográfico in loco dos troncos, galhos e folhas de <i>M. tenella</i> localizadas na Restinga da Marambaia (RJ). Fonte: Sidney Pacheco (Embrapa).....	17
Figura 10. Esquema representativo da avaliação do efeito de destilação sobre a composição química do óleo essencial de folhas de <i>M. tenella</i>	18
Figura 11. Terpenos majoritários encontrado no óleo essencial de folhas de <i>M. tenella</i>	22
Figura 12. Espectros de massas das substâncias: α -pineno (M1), β -pineno (M3), <i>E</i> -cariofileno (M15) e aromadendreno (M17).	24
Figura 13. Proposta de mecanismo de fragmentação para o α -pineno (M1).	25
Figura 14. Proposta de mecanismo de fragmentação para o β -pineno (M3).	25
Figura 15. Proposta de mecanismo de fragmentação para o <i>E</i> -cariofileno (M15).	26
Figura 16. Proposta de mecanismo de fragmentação para o aromadendreno (M17).	26
Figura 17. Estrutura química da 2',4',6'-trimetóxiifenil-butano (M32).	27
Figura 18. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do OEMT, com expansão em 3,0-8,0 ppm e correlação, em preto, com os sinais do 2',4',6'-trimetóxiifenil-butano (M32) e, em azul, com os demais componentes majoritários.	28
Figura 19. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do OEMT, com expansão em 60,0-220,0 ppm e correlação, em preto, com os sinais do 2',4',6'-trimetóxiifenil-butano (M32) e, em azul, com os demais componentes majoritários.	29

Figura 20. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do OEMT, com expansão em 34,0-60,0 ppm e correlação, em preto, com os sinais do 2',4',6'-trimetóxifenil-butano (M32) e, em azul, com os demais componentes majoritários.	30
Figura 21. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do OEMT, com expansão em 15,0-34,0 ppm e correlação, em preto, com os sinais do 2',4',6'-trimetóxifenil-butano (M32) e, em azul, com os demais componentes majoritários.	31
Figura 22. Espectro de massas da substância 2',4',6'-trimetóxifenil-butano (M32).	33
Figura 23. Mecanismo de fragmentação proposto para o 2',4',6'-trimetóxifenil-butano (M32).	33
Figura 24. Cromatogramas por CG-DIC das frações coletadas por hidrodestilação das folhas de <i>M. tenella</i> , com expansão de 0-20 min e picos identificados do α -pineno (M1) e β -pineno (M3).	35
Figura 25. Cromatogramas por CG-DIC das frações coletadas por hidrodestilação das folhas de <i>M. tenella</i> , com expansão de 20-40 min e picos identificados do <i>E</i> -cariofileno (M15), aromadendreno (M17) e 2',4',6'-trimetóxifenil-butano (M32).	36
Figura 26. Gráfico de barra de erros com a variação das concentrações das substâncias majoritárias em relação ao tempo de destilação.	37
Figura 27. Gráfico de barra de erros com a variação das concentrações das classes de substâncias voláteis em relação ao tempo de destilação.	38
Figura 28. Ilustrações fotográficas da espécie <i>E. copacabanensis</i> : (A) árvore adulta ; (B) galhos com folhas e flores; e (C) galho com frutos em período de maturação (AMIGOS JB, 2015; COLECIONANDO FRUTAS, 2021; E-JARDIM.COM, 2021).	44
Figura 29. Material vegetal de Myrtaceae spp. após o pré-tratamento para obtenção dos extratos brutos.	47
Figura 30. Esquema ilustrativo sobre o preparo do extrato bruto e suas partições a partir de folhas de <i>E. copacabanensis</i> (EFEC).	48
Figura 31. Esquema ilustrativo sobre o preparo do extrato bruto e suas partições a partir de folhas de <i>M. tenella</i> (EFMT).	48
Figura 32. Esquema ilustrativo sobre as etapas de purificação e isolamento do sesquiterpenos 2-metóxi-clovan-9-ol (103).	53
Figura 33. Esquema ilustrativo dos processos de purificação em Sephadex realizados com a partição em acetato de etila do extrato de folhas de <i>E. copacabanensis</i> (EFEC-Ac).	54
Figura 34. Esquema ilustrativo sobre o isolamento da conglomerona (104) a partir da partição EFMT-D do extrato de folhas de <i>M. tenella</i>	55
Figura 35. Esquema ilustrativo dos processos de purificação em Sephadex realizados com a partição em acetato de etila do extrato de folhas de <i>M. tenella</i> (EFMT-Ac).	56

Figura 36. Estruturas químicas das substâncias propostas através de desreplicação por CG-EM em folhas de Myrtaceae <i>spp.</i>	60
Figura 37. Continuação das estruturas químicas das substâncias propostas através de desreplicação por CG-EM em folhas de Myrtaceae <i>spp.</i>	61
Figura 38. Comparação dos extratos/frações com coloração característica de carotenoides obtidos por diferentes metodologias a partir das folhas de <i>E. copacabanensis.</i>	65
Figura 39. Estruturas químicas dos carotenoides identificados através da metodologia CLAE-DAD em folhas de Myrtaceae <i>spp.</i>	65
Figura 40. Cromatograma por CLAE-DAD da fração EFMT-H 6-7, obtido a partir da partição hexânica de folhas de <i>M. tenella</i> , com os carotenoides identificados: α -caroteno (51) – t _R 15,9 min; β -caroteno (52) – t _R 16,9 min; 13- <i>cis</i> - β -caroteno (53) – t _R 15,5 min; e 9- <i>cis</i> - β -caroteno (54) – t _R 17,6 min.	66
Figura 41. Cromatograma por CLAE-DAD do extrato em acetona das folhas de <i>Eugenia copacabanensis</i> (vermelho) e <i>Myrciaria tenella</i> (preto) após hidrólise básica: luteína (50) – t _R 9,2 min; 13- <i>cis</i> - β -caroteno (53) – t _R 15,6 min; α -caroteno (51) – t _R 16,1 min; β -caroteno (52) – t _R 17,1 min; 9- <i>cis</i> - β -caroteno (54) – t _R 17,8 min.	66
Figura 42. Principais espectros UV/Vis encontrados nos extratos de Myrtaceae <i>spp.</i>	68
Figura 43. Estruturas químicas das substâncias fenólicas identificadas por CLAE-DAD em folhas de Myrtaceae <i>spp.</i> , com diferenciação por letras maiúsculas nos anéis dos flavonoides.	70
Figura 44. Cromatogramas por CLAE-DAD das partições EFEC-D, EFEC-Ac e EFEC-Bu, com as substâncias identificadas: ácido gálico (55), ácido protocatecuico (56), ácido <i>p</i> -hidróxibenzoico (57), galato de metila (58), ácido siríngico (59), ácido elágico (60) ácido clorogênico (61), (-)-epicatequina (64), hiperosídeo (65) e quercitrina (67).	71
Figura 45. Cromatogramas por CLAE-DAD das partições EFMT-D, EFMT-Ac e EFMT-Bu, com as substâncias identificadas: ácido gálico (55), ácido protocatecuico (56), ácido <i>p</i> -hidróxibenzoico (57), galato de metila (58), ácido siríngico (59), ácido elágico (60), ácido <i>p</i> -hidróxibenzoico (62), hiperosídeo (65) e isoquercitrina (66).	73
Figura 46. Cromatograma por CLAE-DAD das frações livres (em preto, 370 nm) e hidrolisadas (em vermelho, 270 nm) de folhas de <i>E. copacabanensis</i> e <i>M. tenella</i> , com as substâncias identificadas: ácido elágico (60), ácido clorogênico (61), ácido <i>p</i> -cumárico (62), (+)-catequina (63), (-)-epicatequina (64), hiperosídeo (65), isoquercitrina (66), quercitrina, (67) e quercetina (68).	75
Figura 47. Comparação entre espectros de UV das substâncias fenólicas encontradas em folhas de Myrtaceae <i>spp.</i> (em vermelho) e dos padrões analíticos (em azul): ácido elágico (60), ácido clorogênico (61), ácido <i>p</i> -cumárico (62), (+)-catequina (63), (-)-epicatequina (64), hiperosídeo (65), isoquercitrina (66), quercitrina (67) e quercetina (68).	76
Figura 48. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para o ácido clorogênico (61) e o derivado metílico do ácido clorogênico (69).	81

Figura 49. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para os isômeros de strictinina (78 e 80).....	82
Figura 50. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para o digaloil-hexose (78) e o isômero de tellimagrandina I (81).	83
Figura 51. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para os isômeros de procianidina tipo B (70) e de hexosil procianidina tipo B (74).....	84
Figura 52. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para a quercitrina (67) e o padrão analítico de quercitrina.	85
Figura 53. Estrutura química com numeração da cadeia carbônica do galato de metila (58) e quercetina (68).....	86
Figura 54. Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM, com os espectros de UV/Vis e de massas da quercetina (68).....	88
Figura 55. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18, com correlação, em preto, para os sinais da quercetina (68) e, em vermelho, para o galato de metila (58).	89
Figura 56. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18, com expansão na região de 6,0-8,0 ppm e correlação, em preto, para os sinais da quercetina (68) e, em vermelho, para o galato de metila (58).	90
Figura 57. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18.....	91
Figura 58. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18, com expansão na região de 5,0-180,0 ppm e correlação, em preto, para os sinais da quercetina (68) e, em vermelho, para o galato de metila (58).	92
Figura 59. Expansão do mapa de contorno COSY (500/500 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18, com correlação, em preto, para os sinais da quercetina (68) e, em vermelho, para o galato de metila (58).	93
Figura 60. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/125 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18, com correlação, em preto, para os sinais da quercetina (68) e, em vermelho, para o galato de metila (58).	94
Figura 61. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18, com correlação, em preto, para os sinais da quercetina (68) e, em vermelho, para o galato de metila (58), com suas respectivas estruturas químicas.	95
Figura 62. Cromatograma por CLAE-DAD de uma fração rica em ácido gálico (55).	97
Figura 63. Cromatograma por CLAE-DAD-EM da fração SEP-ECA 46-67, com a composição majoritária dos isômeros 3-galoil procianidina tipo B (71), 3-3'-digaloil procianidina tipo B (75) e (-)-epicatequina galato (76). Outros componentes identificados foram ácido gálico (55), galato de metila (58) e (-)-epicatequina (64).	97
Figura 64. Cromatograma por CLAE-DAD da fração SEP-ECB 12-19.....	98

Figura 65. Espectros de massas de alta resolução por EM e EM-EM da fração SEP-ECB 12-19 e o grupo de flavonoides presentes.....	99
Figura 66. Mecanismo de fragmentação por EM-EM proposto para a quercitrina (67).	100
Figura 67. Cromatograma por CLAE-DAD e espectro de massas por EM-EM da fração SEP-ECB 20-29, com isômeros da strictinina (78 e 80) e digaloil-hexose (79).....	100
Figura 68. Mecanismo de fragmentação por EM-EM proposto para os isômeros de strictinina (78 e 80).....	101
Figura 69. Cromatograma por CLAE-DAD-EM da fração SEP-ECC 23-75.	103
Figura 70. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para o ácido elágico (60) e o ácido 3,3'- <i>O</i> -dimetil-elágico (96).	107
Figura 71. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para os derivados do ácido elágico 382 (93), 396 (94) e 410 (95).	108
Figura 72. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para os flavonóis hiperosídeo (65) e isoquercitrina (66).....	109
Figura 73. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para os flavonóis quercetina 3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -galoil)-galactosídeo (98) e quercetina 3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -galoil)-glicosídeo (99).	110
Figura 74. Cromatograma por CLAE-DAD-EM da fração EFMT-Ac 7-12, com destaque para a presença de quercetina (68).	111
Figura 75. Cromatograma por CLAE-DAD e espectros UV/Vis dos ácidos fenólicos: ácido <i>p</i> -hidróxibenzoico (57), ácido vanílico (101), ácido sirínico (59), ácido <i>p</i> -cumárico (62) e ácido ferúlico (102).	113
Figura 76. Cromatograma por CLAE-DAD da fração SEP-MTA 6-8 e da substância isolada ácido 3,3'- <i>O</i> -dimetil elágico (96), com seus espectros de UV/Vis e de massas por diferentes técnicas.	114
Figura 77. Cromatograma por CLAE-DAD da fração SEP-MTB-47-71, com as substâncias quercetinas 3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -galoil)-galactosídeo (98) e 3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -galoil)-glicosídeo (99) hiperosídeo (65) e isoquercitrina (66), incluindo os espectros de UV/Vis e por EM-EM.	115
Figura 78. Cromatograma por CLAE-DAD-EM da fração SEP-MTC 41-55.....	116
Figura 79. Cromatograma por CLAE-DAD-EM da fração SEP-MTC 56-67.....	116
Figura 80. Estrutura química referente ao esqueleto clovano.	117
Figura 81. Estrutura química do sesquiterpeno 2-metóxi-clovan-9-ol (103).	117
Figura 82. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do 2-metóxi-clovan-9-ol (103).....	118
Figura 83. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃), entre 0,0-2,5 ppm, do 2-metóxi-clovan-9-ol (103).....	119
Figura 84. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do 2-metóxi-clovan-9-ol (103).	120

Figura 85. Expansão do mapa de contorno COSY (500/500 MHz, CDCl ₃) do 2-metóxi-clovan-9-ol (103).	121
Figura 86. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/125 MHz, CDCl ₃), entre 0,0-4,5 ppm, do 2-metóxi-clovan-9-ol (103).	122
Figura 87. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, CDCl ₃), entre 0,7-1,2 ppm, do 2-metóxi-clovan-9-ol (103).	123
Figura 88. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, CDCl ₃), entre 3,0-3,6 ppm, do 2-metóxi-clovan-9-ol (103).	124
Figura 89. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto derivado 9-acetil-2-metóxi-clovano (103a).	126
Figura 90. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do produto derivado 9-acetil-2-metóxi-clovano (103a).	127
Figura 91. Espectro de infravermelho da fração rica em 2-metóxi-clovan-9-ol (103).	128
Figura 92. CCD em sílica gel das frações de 2-metóxi-clovan-9-ol, com eluição diclorometano:acetato de etila (1:1, v/v).	129
Figura 93. Cromatograma por CG-EM da fração rica em 2-metóxi-clovan-9-ol (103).	130
Figura 94. Espectro de massas por CG-EM do sesquiterpeno 2-metóxi-clovan-9-ol (103)... ..	130
Figura 95. Proposta de mecanismo de fragmentação do 2-metóxi-clovan-9-ol (103) e formação do íon base <i>m/z</i> 99.	131
Figura 96. Proposta de mecanismo de fragmentação do 2-metóxi-clovan-9-ol (103) e formação dos demais íons produtos.	132
Figura 97. Estrutura química do éster metílico do ácido hexadecanóico ou palmítico (16:0) – hexadecanoato ou palmitato de metila (10).	133
Figura 98. Espectro de massas por CG-EM do palmitato de metila (10).	133
Figura 99. Mecanismos de fragmentação para o palmitato de metila (10).	134
Figura 100. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da fração EFEC-H' 1-10, com composição majoritária do palmitato de metila (10).	135
Figura 101. Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) da fração EFEC-H' 1-10, com composição majoritária do palmitato de metila (10).	136
Figura 102. Espectros de massas obtido por CG-EM dos terpenos espatulenol (30), α - e β -amirina (44 e 45).	137
Figura 103. Proposta de mecanismo de fragmentação para os isômeros α - e β -amirina (44 e 45) e a formação dos principais íons produtos.	138
Figura 104. Estrutura química da conglomerona (104).	139
Figura 105. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da fração rica em conglomerona (104).	140

Figura 106. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da fração rica em conglomerona (104).	141
Figura 107. Expansão do mapa de contorno COSY (500/500 MHz, CDCl ₃) da fração rica em conglomerona (104).....	142
Figura 108. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/125 MHz, CDCl ₃), na região entre 0,5-3,5 ppm, da fração rica em conglomerona (104).....	143
Figura 109. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/125 MHz, CDCl ₃), na região entre 3,5-6,5 ppm, da fração rica em conglomerona (104).....	144
Figura 110. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, CDCl ₃), na região entre 0,5-3,5 ppm, da fração rica em conglomerona (104).....	145
Figura 111. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, CDCl ₃), na região entre 1,0-6,5 ppm, da fração rica em conglomerona (104).....	146
Figura 112. Espectro de massas, obtido por CG-EM, da conglomerona (104).....	147
Figura 113. Proposta de mecanismo de fragmentação para a conglomerona (104) e a formação dos principais íons produtos.	147
Figura 114. Gráficos de viabilidade celular para os quatro ensaios diferentes com as partições em acetato de etila e butanol de folhas de <i>M. tenella</i> (EFMT-Ac e EFMT-Bu) e <i>E. copacabanensis</i> (EFEC-Ac e EFEC-Bu) nas concentrações de 0,14 mg.mL ⁻¹ (A) e 4,00 mg.mL ⁻¹ (B). Os resultados (1) e (2) correspondem aos ensaios de toxicidade com as cepas BY4741 e <i>Δgsh1</i> e os resultados (3) e (4) aos ensaios de atividade antioxidante com as respectivas cepas. Diferentes letras indicam resultados estatisticamente diferentes para cada tratamento (p < 0.05).	150
Figura 115. Exsicata da espécie <i>M. eriopus</i> (HERBÁRIO VIRTUAL - UFJF, [s.d.]).	157
Figura 116. Esquema do preparo do pó liofilizado dos frutos de <i>M. eriopus</i> (PLME).	158
Figura 117. Válvula Rheodyne e o esquema de coleta automatizada.	159
Figura 118. Esquema ilustrativo da investigação das antocianinas através dos espectros obtidos por CLAE-DAD e IES-QTdV-EM a partir do pó liofilizado de frutos de <i>M. eriopus</i> : delfinidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (1, t _R = 5,3 min); cianidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (2, t _R = 7,1 min); petunidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (3, t _R = 8,9 min); peonidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (4, t _R = 11,3 min); e malvidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (5, t _R = 13,4 min).	161
Figura 119. Estruturas químicas das antocianinas identificadas em frutos de <i>M. eriopus</i>	162
Figura 120. Mecanismo de fragmentação proposto para a delfinidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (1), similar para as demais antocianinas glicosiladas.....	163
Figura 121. Comparação entre os cromatogramas por CLAE-DAD do PLME (em preto) e das uvas roxas (em azul): delfinidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (1), cianidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (2), petunidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (3), peonidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (4), e malvidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (5).....	164
Figura 122. Estruturas químicas das outras substâncias fenólicas identificadas no PLME. ..	164

Figura 123. Cromatograma de substâncias fenólicas obtidas por CLAE-DAD, com a identificação do ácido gálico (6), delphinidina 3-*O*-glicosídeo (1), cianidina 3-*O*-glicosídeo (2), petunidina 3-*O*-glicosídeo (3), e miricetina (7). 165

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo do índice de retenção linear (IRL) para análises por CG-DIC (van Den Dool & Kratz, 1963).	19
Equação 2. Fator de resposta relativo da substância X (FRRXP), baseado no padrão original adotado por Cachet et al. (2016), octanoato de metila (P).	20
Equação 3. Cálculo de um novo fator de resposta relativo da substância X baseado em qualquer padrão utilizado na análise (FRRXP'). É necessário primeiro calcular o FFR do novo padrão adotado em relação ao padrão original de octanoato de metila (FRRP'P).	20
Equação 4. Cálculo da porcentagem normalizada da substância X (%nX).	20
Equação 5. Cálculo de teor de carotenoides totais, a partir da Lei de Lambert-Beer, em que 2592 é o coeficiente de absorvidade molar do β -caroteno em éter de petróleo.	51
Equação 6. Cálculo de teor de cada substância fenólica através da padronização externa.	52
Equação 7. Cálculo do Índice de Eficiência Reprodutiva (<i>Reproductive Efficiency Index</i> ou REI).	58
Equação 8. Cálculo da porcentagem de controle ou eficácia de cada tratamento para o controle dos carrapatos <i>R. microplus</i>	58

LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de Onda de Máxima Absorção
$\delta_{\text{H,C}}$	Deslocamento Químico em ppm nos Espectros de RMN
$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Unidade de Concentração em microgramas por grama
ΔgshI	Cepa mutante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
$\Sigma\text{Ac},n$	Somatório de Todas as Áreas Corrigidas pelos FRR de Cada Substância e Normalizadas em Relação a Área Corrigida Padrão de Octanoato de Etila
$\%_{\text{eclosão}}$	Porcentagem de Eclosão Larval
$[\text{M}]^+$	Íon Molecular obtido por EM
$[\text{M}]^+$	Cátion obtido por EM
$[\text{M} + \text{H}]^+$	Molécula Protonada obtido por EM
$[\text{M} - \text{H}]^-$	Molécula Desprotonada obtido por EM
$[\text{M} + \text{Na}]^+$	Aduto de Sódio obtido por EM
$[\text{M} + \text{Cl}]^-$	Aduto de Cloro obtido por EM
ABTS ⁺	Radical 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
$A_{p'}$	Área do Padrão de Octanoato de Etila
AIT	<i>Adult Immersion Test</i> ou Teste de Imersão de Fêmeas Adultas
ATP	Adenosina Trifosfato
A_x	Área da Substância X
B.O.D.	Câmara com “ <i>biological oxygen demand</i> ”
BY4741	Cepa controle de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
C_5	Unidade com 5 Átomos de Carbono (Isopreno)
C_{10}	Unidade com 10 Átomos de Carbono (Monoterpeno)
C_{15}	Unidade com 15 Átomos de Carbono (Sesquiterpeno)
C_{20}	Unidade com 20 Átomos de Carbono (Diterpeno)
C_{30}	Unidade com 30 Átomos de Carbono (Triterpeno)
C_{40}	Unidade com 40 Átomos de Carbono (Caroteno)
C_6C_1	Unidade com 1 Anel de 6 Membros e Cadeia Lateral com 1 Átomo de Carbono (Ácido Benzoico)
C_6C_3	Unidade com 1 Anel de 6 Membros e Cadeia Lateral com 3 Átomos de Carbono (Ácido Cinâmico)
$C_6C_3C_6$	Unidade com 2 Anéis Fundidos de 6 e 3 Membros (com heteroátomo de O) e 1 Anel Fenila (Flavonoide)
C_6-C_{26}	Série Homóloga de Alcanos com 6 a 26 Átomos de Carbono
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CE ₅₀	Concentração Equivalente para Redução a 50%
CG-DIC	Cromatografia Gasosa acoplada com Detecção por Ionização em Chama
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massas
CL ₅₀	Concentração Letal a 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector por Arranjo de Diodos
CLAE-DAD-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector por Arranjo de Diodos e Espectrometria de Massas
CLAE-EM-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Espectrometria de Massas Sequencial

CLAE-EM-RMN	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear
COX	Enzimas do tipo ciclo-oxigenase
d	Multiplicidade do Sinal em RMN como dubleto
dd	Multiplicidade do Sinal em RMN como duplo dubleto
Da	Unidade de Massa Atômica - Dalton
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EC-H	Fração Hidrolisada de Folhas de <i>Eugenia copacabanensis</i>
EC-L	Fração Livre de Folhas de <i>E. copacabanensis</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EFEC	Extrato Metanólico de Folhas de <i>E. copacabanensis</i>
EFEC-Ac	Partição em Acetato de Etila do EFEC
EFEC-Bu	Partição em Butanol do EFEC
EFEC-D	Partição em Diclorometano do EFEC
EFEC-H	Partição em Hexano do EFEC
EFEC-H'	Nova Partição em Hexano do EFEC
EFMT	Extrato Metanólico de Folhas de <i>Myrciaria tenella</i>
EFMT-Ac	Partição em Acetato de Etila do EFMT
EFMT-Bu	Partição em Butanol do EFMT
EFMT-D	Partição em Diclorometano do EFMT
EFMT-H	Partição em Hexano do EFMT
EM	Espectrometria de Massas
EM-EM	Espectrometria de Massas Sequencial
$FRR_{X/p}$	Fator de Resposta Relativo da Substância X em Relação ao Octanoato de Metila
$FRR_{X/p'}$	Fator de Resposta Relativo da Substância X em Relação ao Octanoato de Etila
$FRR_{p'}/p$	Fator de Resposta Relativo do Padrão de Octanoato de Etila em Relação ao Padrão Original de Octanoato de Metila
g/100 g	Unidade de Concentração em gramas por 100 gramas
g/mol	Unidade de Massa Molar em gramas por 1 mol
Hz	Hertz
IC	Intervalo de Confiança
IES(-)-Q	Espectrômetro de Massas com Ionização por Eletrospray em Modo Negativo e Analisador do tipo Quadrupolo (<i>ESI-Q</i>)
IES-QTdV-EM	Espectrômetro de Massas com Ionização por Eletrospray e Analisadores do tipo Quadrupolo e Tempo de Voo (<i>ESI-QToF-MS</i>)
IL-1 β	Citocina Pró-inflamatória Interleucina 1 β
IL-6	Citocina Pró-inflamatória Interleucina 6
IL-10	Citocina Pró-inflamatória Interleucina 10
IRL_X	Índice de Retenção Linear da Substância X
J	Constante de Acoplamento em RMN
LPT	<i>Larval Packed Test</i> ou Teste do Pacote de Larvas
m	Multiplicidade do Sinal em RMN como multiplete
m/z	Relação massa/carga obtido por EM
$m_{fêmea}$	Massa das Fêmeas antes da Oviposição
m_{ovos}	Massa dos Ovos obtidos na Oviposição
MHz	MegaHertz
MM_X	Massa Molecular da Substância X

MM_p	Massa Molecular do Padrão Original de Octanoato de Metila
mg/mL	Unidade de Concentração em miligramas por miliLitro
mmol Trolox/g	Unidade de Concentração em milimols equivalente de Trolox por grama
MT-H	Fração Hidrolisada de Folhas de <i>M. tenella</i>
MT-L	Fração Livre de Folhas de <i>M. tenella</i>
n	Número de Carbonos do Alcano com Tempo de Retenção Anterior à Substância X
$n_{C,H,O,N,S}$	Número de Átomos de C, H, O, N, S e de Anéis Aromáticos Presentes na Estrutura Química da substância X.
NO	Óxido Nítrico
OE	Óleo Essencial
OEMT	Óleo Essencial de Folhas de <i>M. tenella</i>
PGE ₂	Mediador Pró-inflamatório Prostaglandina E2
PLME	Pó Liofilizado dos Frutos de <i>Myrcia eriopus</i>
ppm	Unidade de Concentração em partes por milhão
REI	Índice de Eficiência Reprodutiva ou <i>Reproductive Efficiency Index</i>
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear do Isótopo Hidrogênio ¹ H
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear do Isótopo Carbono ¹³ C
s	Multiplicidade do Sinal em RMN como singlete
sept	Multiplicidade do Sinal em RMN como septeto
sl	Multiplicidade do Sinal em RMN como singlete largo
<i>spp.</i>	Espécies de uma Família ou Gênero
SEP-ECA	Experimento A em Sephadex da Partição em Acetato de Etila de EFEC
SEP-ECB	Experimento B em Sephadex da Partição em Acetato de Etila de EFEC
SEP-ECC	Experimento C em Sephadex da Partição em Acetato de Etila de EFEC
SEP-MTA	Experimento A em Sephadex da Partição em Acetato de Etila de EFMT
SEP-MTB	Experimento B em Sephadex da Partição em Acetato de Etila de EFMT
SEP-MTC	Experimento C em Sephadex da Partição em Acetato de Etila de EFMT
SISGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TNF- α	Grupo de Citocinas Pró-Inflamatórias TNF- α (Fatores de Necrose Tumoral Alfa)
t_{R_n}	Tempo de Retenção do Alcano da Série Homóloga com Tempo de Retenção Anterior à Substância X
$t_{R_{n+1}}$	Tempo de Retenção do Alcano da Série Homóloga com Tempo de Retenção Posterior à Substância X
t_{R_X}	Tempo de Retenção da Substância X
UVA	Região do Espectro Eletromagnético da Luz entre 320-400 nm
UVB	Região do Espectro Eletromagnético da Luz entre 280-320 nm
UVC	Região do Espectro Eletromagnético da Luz entre 200-280 nm
UV/Vis	Região do Espectro Eletromagnético da Luz entre o Ultravioleta (200-400 nm) e o Visível (400-600 nm)
YPD	Meio de Cultura - <i>Yeast Extract – Peptone - Dextrose</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1	
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	2	
2.1.	A Biodiversidade Brasileira	2	
2.2.	A Química de Produtos Naturais.....	4	
2.3.	A Biossíntese de Produtos Naturais	5	
2.4.	A Importância da Cromatografia na Química de Produtos Naturais.....	7	
2.5.	O Conhecimento Fitoquímico da Família Myrtaceae	9	
CAPÍTULO I - ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Myrciaria tenella</i> (DC.) O.BERG.....			
RESUMO			13
ABSTRACT			14
1	INTRODUÇÃO.....	15	
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	17	
2.1.	Materiais e Equipamentos	17	
2.2.	Coleta do Material Vegetal.....	17	
2.3.	Identificação das Substâncias do Óleo Essencial de Folhas de <i>M. tenella</i> (OEMT)..	17	
2.3.1.	Extração do OEMT por hidrodestilação.....	17	
2.3.2.	Avaliação do tempo de destilação sobre a composição química do OEMT	18	
2.3.3.	Análise por CG-DIC e CG-EM do OEMT.....	18	
2.3.4.	Identificação das Substâncias Presentes no OEMT	19	
2.3.5.	Quantificação das Substâncias Presentes no OEMT	19	
2.3.6.	Processamento dos dados	20	
2.4.	Avaliação da Atividade Biológica do Óleo Essencial de Folhas de <i>M. tenella</i>	21	
2.4.1.	Estudo anti-inflamatório e antinociceptivo <i>in vivo</i> do OEMT	21	
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22	
3.1.	Avaliação Química do Óleo Essencial de Folhas de <i>M. tenella</i> (OEMT).....	22	
3.2.	Avaliação do Tempo de Destilação sobre a Qualidade do OEMT.....	34	
3.3.	Avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do OEMT	39	
4	CONCLUSÃO.....	40	
CAPÍTULO II - DESREPLICAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS EM FOLHAS DE <i>Eugenia copacabanensis</i> e <i>Myrciaria tenella</i>			41
RESUMO			42

ABSTRACT	43
1 INTRODUÇÃO.....	44
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1. Materiais e Equipamentos	46
2.2. Coleta do Material Vegetal.....	46
2.3. Desrepliação das Frações do Extrato Metanólico de Folhas de <i>Myrtaceae spp.</i>	46
2.3.1. Construção de banco de dados para os gêneros <i>Eugenia</i> e <i>Myrciaria</i>	46
2.3.2. Preparo e partição dos extratos brutos de folhas de <i>Myrtaceae spp.</i>	47
2.3.3. Fracionamento em coluna de sílica gel das partições EFEC-H e EFMT-H.....	48
2.3.4. Análises por CG-EM das frações de EFEC-H e EFMT-H.....	49
2.3.5. Análise por CLAE-DAD e por CLAE-DAD-EM das frações mais polares de EFEC e EFMT	49
2.4. Quantificação de Substâncias Bioativas em Folhas de <i>Myrtaceae spp.</i>	50
2.4.1. Análise de carotenoides por CLAE-DAD	50
2.4.2. Análise de ácidos fenólicos e flavonoides por CLAE-DAD.....	51
2.5. Isolamento e Purificação de Substâncias do Extrato Metanólico de Folhas de <i>Eugenia copacabanensis</i>	52
2.5.1. Fracionamento em coluna de sílica gel de EFEC-H 38-46	52
2.5.2. Fracionamento em coluna de sílica gel de EFEC-Ac.....	53
2.5.3. Fracionamento em coluna de Sephadex das frações de EFEC-Ac.....	53
2.6. Isolamento e Purificação de Substâncias do Extrato Metanólico de Folhas de <i>Myrciaria tenella</i>	54
2.6.1. Fracionamento em coluna de sílica gel de EFMT-D.....	54
2.6.2. Fracionamento em coluna de Sephadex de EFMT-D 18-24	54
2.6.3. Fracionamento em coluna de sílica gel de EFMT-Ac.....	55
2.6.4. Fracionamento em coluna de Sephadex das frações de EFMT-Ac.....	55
2.7. Processamento de Dados	56
2.8. Avaliação de Atividades Biológicas de Extratos de Folhas de <i>Myrtaceae spp.</i>	56
2.8.1. Ensaio espectrofotométrico de captura de radicais sintéticos DPPH e ABTS ⁺	56
2.8.2. Avaliação de potencial antioxidante <i>in vivo</i> através de modelo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
2.8.3. Avaliação da atividade acaricida da fração EFEC-H 38-46 contra carrapatos bovinos da espécie <i>Rhipicephalus microplus</i>	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59

3.1.	Identificação de Constituintes das Frações Não-Polares de Extratos de Folhas de <i>Myrtaceae spp.</i>	59
3.1.1.	Desrepliação por CG-EM das frações EFEC-H e EFMT-H.....	59
3.1.2.	Determinação Quantitativa de Carotenoides em Folhas de <i>E. copacabanensis</i> e <i>M. tenella</i>	64
3.2.	Identificação dos Constituintes das Frações Polares do Extrato de Folhas de <i>Myrtaceae spp.</i>	68
3.2.1.	Desrepliação por CLAE-DAD das frações polares do extrato de folhas de <i>Myrtaceae spp.</i>	68
3.2.2.	Determinação Quantitativa de Flavonoides e Ácidos Fenólicos em Folhas de <i>E. copacabanensis</i> e <i>M. tenella</i>	74
3.2.3.	Desrepliação por CLAE-DAD-EM dos extratos e frações de folhas de <i>Eugenia copacabanensis</i>	76
3.2.4.	Análise das frações da partição EFEC-Ac	86
3.2.5.	Desrepliação por CLAE-DAD-EM das frações de folhas de <i>Myrciaria tenella</i>	103
3.2.6.	Análise das frações em Sephadex da partição EFMT-Ac	111
3.3.	Isolamento de Outros Metabólitos Secundários em Folhas de <i>Myrtaceae spp.</i>	117
3.3.1.	Elucidação estrutural da substância 103 (EFEC-H, folhas de <i>E. copacabanensis</i>) .	117
3.3.2.	Identificação de outras substâncias lipofílicas a partir da fração EFEC-H'	133
3.3.3.	Elucidação estrutural da substância 104 (EFMT-D, folhas de <i>M. tenella</i>)	139
3.4.	Avaliação das Atividades Biológicas de Folhas de <i>Myrtaceae spp.</i>	148
3.4.1.	Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> das partições de EFEC e EFMT	148
3.4.2.	Avaliação da atividade acaricida da fração EFEC-H 38-46.....	150
4	CONCLUSÃO.....	153
CAPÍTULO III - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ANTOCIANINAS EM FRUTOS DE <i>Myrcia eriopos</i>		154
RESUMO		155
ABSTRACT		156
1	INTRODUÇÃO.....	157
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	158
2.1.	Materiais e Equipamentos	158
2.2.	Coleta do Material Vegetal.....	158
2.3.	Processamento dos Frutos de <i>M. eriopos</i>	158

2.4.	Análise Quantitativa por CLAE-DAD das Antocianinas do Pó Liofilizado dos Frutos de <i>M. eriopus</i> (PLME).....	159
2.5.	Análise por IES-QTdV-EM das Antocianinas de PLME.....	159
2.6.	Análise por CLAE-DAD de Outras Substâncias Fenólicas de PLME.....	160
2.7.	Ensaio espectrofotométrico de captura de radicais sintéticos DPPH e ABTS ⁺	160
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	161
3.1.	Identificação das Antocianinas Presentes no PLME por CLAE-DAD e IES-QTdV-EM	161
3.2.	Outros Resultados para a Caracterização do PLME	164
4	CONCLUSÕES.....	166
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	167
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	168
5	ANEXO I.....	178
6	ANEXO II	180

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em pleno século XXI, a grande preocupação mundial tem sido os efeitos catastróficos da ação antrópica e o uso irracional dos recursos naturais por todo o território do planeta. As discussões entre as lideranças têm enfatizado a adoção de medidas sustentáveis para a produção de insumos, bens materiais e fontes de energia. Dentro deste contexto, países com elevada extensão territorial e biodiversidade preservada recebem destaque, como o Brasil.

Além disso, a importância dos produtos naturais para o desenvolvimento da humanidade é um fato indiscutível, sendo a base para a culinária e medicina popular e alcançando as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. O estudo da composição química de plantas nativas ainda se faz extremamente necessária, fornecendo novas substâncias com estruturas químicas diferenciadas e propriedades biológicas distintas

Os estudos fitoquímicos podem contribuir para o conhecimento de espécies que porventura ainda não foram investigadas pelos cientistas. Quando estas encontram-se em regiões com elevada perda de biodiversidade, estes estudos podem também favorecer a preservação destas espécies e indicar um uso racional para os extratos e substâncias isoladas.

Dentro deste panorama, em território brasileiro, podemos destacar o bioma da Mata Atlântica, presente nas regiões Sul e Sudeste e que abrigam as maiores regiões metropolitanas do país, e a família Myrtaceae e a sua grande representatividade dentro da flora brasileira.

Esta tese teve como objetivo identificar os metabólitos secundários de espécies ainda pouco conhecidas da família Myrtaceae, localizadas na região de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro (RJ), e, em parceria com outros grupos de pesquisa, avaliar o potencial biológico dos extratos, frações e/ou substâncias. A tese foi dividida em 3 capítulos, em que:

- O capítulo I descreve o estudo de caracterização química do óleo essencial de folhas de *Myrciaria tenella*, coletadas na Restinga da Marambaia (RJ), incluindo a avaliação do tempo de destilação sobre a qualidade do óleo essencial. Em parceria, foram incluídos o estudo de atividade anti-inflamatória e nociceptivo do óleo essencial;
- O capítulo II relaciona a identificação por desreplicação por CG-EM e CLAE-DAD-EM e o isolamento de metabólitos secundários de extratos metanólicos e suas partições de folhas de *Eugenia copacabanensis* e *M. tenella*, também coletadas na Restinga da Marambaia (RJ). Este capítulo também descreve brevemente os trabalhos em parceria sobre a avaliação do potencial antioxidante das partições com modelo de *Saccharomyces cerevisiae* e sobre a atividade acaricida de um sesquiterpeno isolado do extrato de folhas de *E. copacabanensis* e inédito para a família Myrtaceae;
- Por último, o capítulo III detalha a caracterização por CLAE-DAD/IES-QTdV-EM de antocianinas presentes nas cascas dos frutos de *Myrcia eriopus*, uma espécie botânica inédita quanto à sua composição química. Uma avaliação do seu potencial nos ensaios espectrofotométricos de captura de radicais orgânicos também foi incluída.

Todo este estudo fitoquímico foi realizado através da infraestrutura da Embrapa Agroindústria de Alimentos, nos Laboratórios de Cromatografia Líquida, de Óleos Essenciais e de Cromatografia Gasosa, sob supervisão do pesquisador Dr. Ronoel Luiz de O. Godoy; e também do Instituto de Química da UFRRJ, no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) e na Central Analítica, sob supervisão do professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho.

A coleta e a identificação dos materiais vegetais foram realizadas junto ao professor Dr. Marcelo da C. Souza, do Herbário do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFRRJ (ICBS-UFRRJ), com as exsiccatas de cada espécie depositadas. Além disso, todas as espécies foram previamente registradas na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGen), conforme solicitado pela Lei nº 13.123 de 17 de novembro de 2015 (BRASIL, 2015), sob cadastro de número AEADE65.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A Biodiversidade Brasileira

Desde o início da humanidade, a relação do ser humano com a natureza foi fundamental para a sobrevivência da espécie. A biodiversidade do nosso planeta possibilitou ao homem a exploração dos recursos naturais ao longo dos séculos e serviu de base para os avanços científicos e tecnológicos, que resultaram na conquista do mundo globalizado ao qual vivemos hoje em dia.

Embora sejam responsáveis apenas por 40% do território do planeta, as regiões tropicais são atualmente os grandes responsáveis pela biodiversidade mundial, constituindo um conjunto de ecossistemas de espécies vivas, sejam animais, plantas e/ou microrganismos. Os ecossistemas tropicais (Figura 1) possuem cerca de 75% das espécies de seres vivos, com elevada taxa de endemismo, e são considerados fundamentais para o clima global como repositórios naturais de carbono (BARLOW et al., 2018).

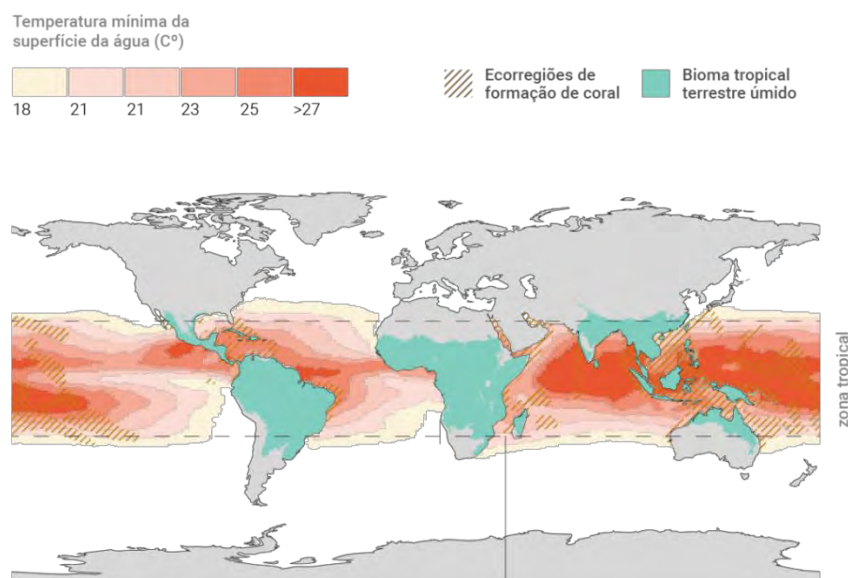


Figura 1. Ilustração do globo terrestre, com destaque para as regiões tropicais e seus biomas e formação de corais (REDE AMAZÔNIA SUSTENTÁVEL, 2021).

Entre todas as nações, o Brasil recebe um grande destaque por ser considerado um país privilegiado pelas suas riquezas naturais e com a maior biodiversidade do mundo (PINTO et al., 2002; BERLINCK et al., 2017; PILON et al., 2017). Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente do governo brasileiro (2021), o território brasileiro apresenta cerca de 8,5 milhões de km² de extensão territorial e 3,5 milhões de km² de costa marinha, ocupando quase metade da América do Sul. Devido à sua elevada faixa territorial, o país apresenta uma grande diversidade climática como o trópico úmido na região Norte; o clima semi-árido na região Nordeste; e ainda áreas temperadas na região Sul. Estes fatores resultam na existência de seis biomas diferentes em um único país (Floresta Amazônica, Pantanal, Cerrado, Caatinga, Pampas e Mata Atlântica), além de três ecossistemas marinhos. Dados mais específicos indicam que o Brasil possui cerca de 12% das espécies de plantas e mamíferos e 24% das espécies de peixes da biodiversidade global (BARLOW et al., 2018).

Em geral, as regiões tropicais, incluindo o território brasileiro, tem enfrentado rápidas mudanças ambientais, socioeconômicas e demográficas. Atividades antrópicas como desmatamento e pesca predatória tem resultado em processos intensos de destruição nos últimos 150 anos, similar ao ocorrido com os países temperados nos séculos anteriores

(BARLOW et al., 2018; REDE AMAZÔNIA SUSTENTÁVEL, 2021). No final do século XX, alguns pesquisadores, como o ecologista britânico Norman Myers, introduziram o conceito de *hotspots*, áreas que apresentam alta concentração de espécies endêmicas e elevada perda de seu habitat, como um alarme para a população global. Entre os biomas brasileiros, destacam-se o Cerrado e a Mata Atlântica entre os *hotspots* mundiais (Figura 2), com grande parte destes localizados nas regiões tropicais (MYERS et al., 2000; MARCHESE, 2015).



Figura 2. Os biomas considerados *hotspots* do planeta Terra, incluindo o Cerrado Brasileiro e a Mata Atlântica Brasileira (MARCHESE, 2015).

Ainda de acordo com Lucas & Bünger (2015), a situação da Mata Atlântica ainda é mais drástica, sendo considerada uma das cinco áreas prioritárias pela Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (*United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization* – UNESCO). Elevados índices de urbanização e altos níveis de exploração de recursos naturais continuam ameaçando severamente a Mata Atlântica. As restingas são áreas tipicamente encontradas neste bioma e consistem em depósitos arenosos localizados paralelos à linha costeira em que a cobertura vegetal encontra-se em praias, dunas e depressões (CONAMA, 2002). No estado do Rio de Janeiro, a biodiversidade das restingas também corre risco de extinção devido à expansão imobiliária.

O célebre pesquisador Raimundo Braz-Filho (1994) já alertava ainda na década de 90 para o perigo da exploração irracional do meio ambiente e consequentemente de espécies vivas, principalmente vegetais:

“O extermínio de espécies vegetais prejudica o equilíbrio ambiental e elimina um poderoso laboratório vivo de produtos químicos, muitos deles úteis para a manutenção do sistema ecológico e para curar doenças e salvar vidas.” (BRAZ-FILHO, 1994)

Portanto, é possível correlacionar os impactos negativos da deterioração da biodiversidade com prejuízos sociais e econômicos, a partir da perda de espécies e da diversidade de substâncias químicas naturais, potencialmente para a bioeconomia pelo emprego dos próprios produtos naturais ou de derivados sintéticos (VALLI et al., 2018).

Nas últimas décadas, o Brasil tem evoluído quanto aos aspectos de proteção à biodiversidade nacional (SOARES et al., 2021). Com a Constituição Federal de 1988 (BRASIL, 1988) garantindo esta defesa, novas legislações entraram em vigor, buscando

proteger o patrimônio genético e o conhecimento tradicional. O Marco Legal da Biodiversidade foi registrado através da Lei de nº 13.123, de 20 de maio de 2015 (BRASIL, 2015), considerado avanços para a área, como a maior participação da sociedade civil no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) e a obrigação de repartição dos benefícios para a conservação e uso sustentável da biodiversidade. Além disso, o Decreto de nº 8.772, de 11 de maio de 2016 (BRASIL, 2016), criou o Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), um sistema eletrônico responsável pela gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado.

Todos estes avanços são importantes para o reconhecimento e a valorização da nossa biodiversidade. Entretanto, nos últimos anos, o crescimento do desmatamento tem sido devastador. É necessário ressaltar o papel fundamental dos pesquisadores científicos, possibilitando a preservação e o conhecimento dos ecossistemas brasileiros.

2.2. A Química de Produtos Naturais

Os pesquisadores contribuem significativamente para a conservação da biodiversidade através do conhecimento científico. Entre as áreas da ciência, a Química de Produtos Naturais consiste na investigação química de organismos vivos, ou seja, o estudo das substâncias provenientes do metabolismo secundário (BRAZ-FILHO, 1994; BERLINCK et al., 2017). É considerado a sub-área mais antiga da Química Orgânica e o campo mais antigo e tradicional da Química Brasileira, congregando o maior número de pesquisadores científicos (PINTO et al., 2002; VALLI et al., 2018).

De acordo com PINTO e colaboradores (2002), a importância dos organismos vivos brasileiros se mistura a história do nosso país, iniciando-se desde a utilização das plantas brasileiras como remédios indígenas e posteriormente pelos médicos portugueses que chegaram ainda no século XVI para as colônias brasileiras. Em um passado mais recente, destacam-se pesquisadores como o farmacêutico alemão Theodoro Peckolt, considerado pai da fitoquímica brasileira, no século XIX; e os químicos Dr. Otto Richard Gottlieb (nacionalidade tcheca), Dr. Walter Baptist Mors (brasileiro) e Dr. Benjamin Gilbert (inglês), principais responsáveis por introduzir a fitoquímica moderna entre os anos de 1950 e 1970 e responsáveis por uma nova geração de pesquisadores no país (PINTO et al., 2002; VALLI et al., 2018). Atualmente, a importância da área é demonstrada através da existência da divisão de Produtos Naturais, na Sociedade Brasileira de Química (SBQ), desde o ano de 1994; e ainda por eventos científicos específicos, como o *Brazilian Conference on Natural Products* (BCNP), um dos mais relevantes no Brasil e na América Latina (PINTO et al., 2002; BERLINCK et al., 2017).

A importância desta área de estudo está relacionada com a caracterização de substâncias biossintetizadas no metabolismo secundário de determinada espécie, que, em alguns casos, é utilizada pela medicina popular e pode apresentar determinadas atividades biológicas. Estas substâncias, conhecidas como produtos naturais ou ainda substâncias bio-orgânicas, geralmente estão associadas com a classificação taxonômica das espécies investigadas, como família e gênero, e possibilitam o conhecimento de extensa diversidade estrutural e a síntese de novos produtos com potencial biológico. Todos estes aspectos contribuem para o caráter interdisciplinar da área de Química de Produtos Naturais (BRAZ-FILHO, 1994). Logo, os estudos em Química de Produtos Naturais podem apresentar inúmeros objetivos científicos, como demonstrados na Figura 3.

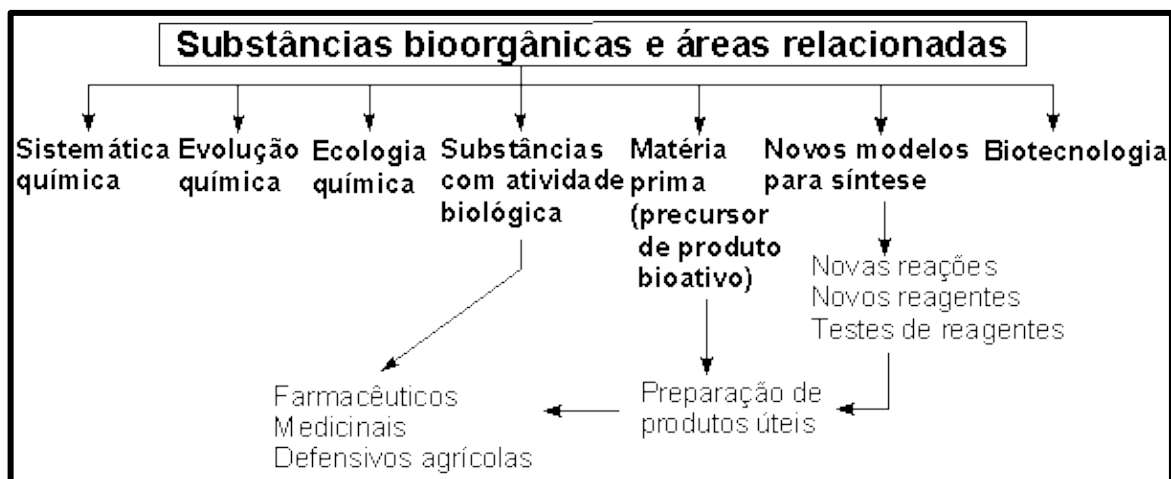


Figura 3. Diferentes objetivos de estudo científico para as substâncias oriundas do metabolismo secundário (SBPC, [s.d.]).

Para a investigação fitoquímica, etapas iniciais de elucidação estrutural e avaliação de atividade biológica de substâncias são desenvolvidas a partir de extratos brutos, frações purificadas ou substâncias isoladas. Como apenas pequenas quantidades são obtidas, estudos de síntese orgânica são normalmente empregadas para as substâncias mais promissoras, resultando substâncias ou derivados sintéticos em maior quantidade e, portanto, melhor caracterização química e biológica. Por tais razões mencionadas, muitas substâncias oriundas do metabolismo secundário e produtos derivados estão presentes na grande maioria dos medicamentos (BRAZ-FILHO, 1994; BERLINCK et al., 2017).

O grande desenvolvimento da área foi alcançado a partir da década de 1960, com o advento de ferramentas de análise espectroscópica (BERLINCK et al., 2017). Nas últimas décadas, a utilização de técnicas analíticas hífenadas ou *off-line* e de ferramentas de biologia molecular possibilitou investigar qualquer sistema biológico (animal, vegetal, terrestre ou marinho, ou microbiano), através do conhecimento do metabolismo secundário (PINTO et al., 2002; BERLINCK et al., 2017). O atual desafio consiste na utilização de metodologias mais rápidas, precisas e eficientes para a descoberta de novos produtos naturais (GAUDÊNCIO & PEREIRA, 2015).

2.3. A Biossíntese de Produtos Naturais

O funcionamento dos organismos vivos está relacionado essencialmente a uma rede integrada de reações químicas reguladas e mediadas por enzimas para a produção de energia através das moléculas de adenosina trifosfato (ATP) e para a construção de células e tecidos. O conjunto destas reações é denominado metabolismo primário, por ser fundamental para a vida, sendo os carboidratos, os lipídeos, as proteínas e os ácidos nucleicos os quatro grupos principais de metabólitos primários. Além destes, outras substâncias também são produzidas através do metabolismo secundário (BASER & BUCHBAUER, 2020; DEWICK, 2009).

Estas substâncias podem ter ocorrência em organismos específicos e, em alguns casos, expressar a individualidade ao táxon. Nas espécies vegetais, os metabólitos secundários apresentam papel vital para o bem estar da espécie, atuando na proteção contra patógenos e predadores, na defesa antioxidante, na adaptação a condições climáticas, na atração de agentes polinizadores por substâncias voláteis e coloração de flores e frutos, entre outros (DEWICK, 2009; VALLI et al., 2018). Suas atuações específicas conferem a estas substâncias atividades biológicas diferenciadas em estudos científicos.

Nos organismos vegetais, os produtos naturais são biosintetizados a partir de reações catalisadas por enzimas com “blocos de construção”, substratos provenientes do metabolismo primário. Diferentes reações químicas estão presentes nas quatro rotas metabólicas principais (via do mevalonato, via do metileritritolfosfato, via do chiquimato e via do acetato), como reações de substituição nucleofílica, adição eletrofílica, condensação aldólica, condensação de Claisen, rearranjos de Wagner-Meerwein, entre outros (DEWICK, 2009). A Figura 4 resume as principais vias metabólicas observadas nos organismos vegetais a partir dos substratos fosfoenolpiruvato e acetil-coenzima A, produtos da glicólise.

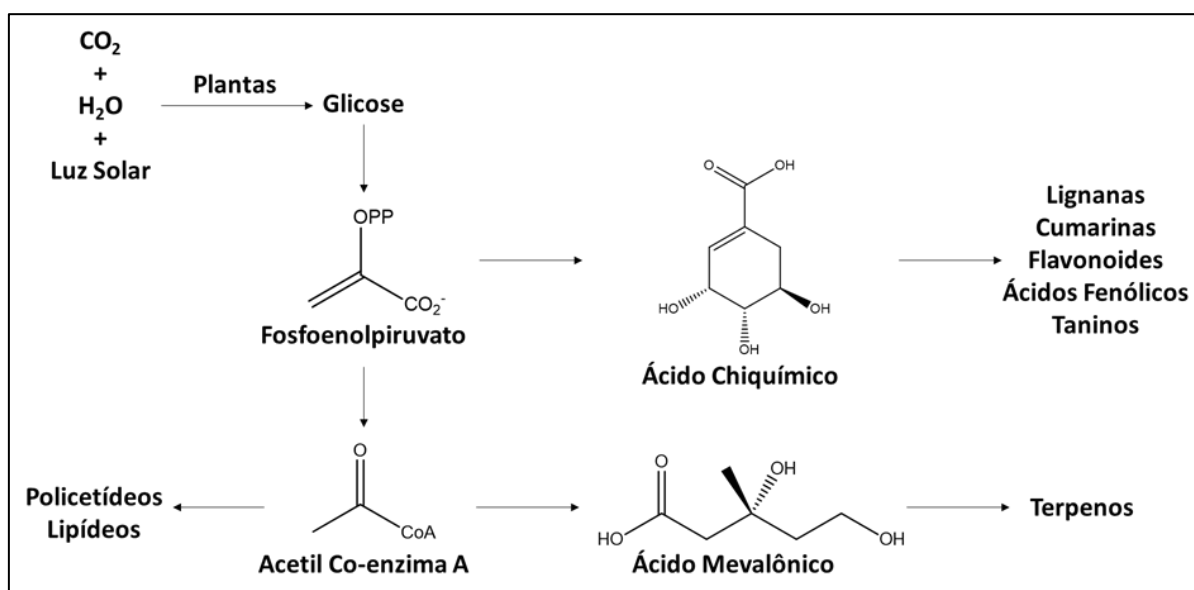


Figura 4. Esquema resumido das principais vias metabólicas observadas no metabolismo vegetal, adaptado de Baser & Buchbauer (2020).

As principais classes de metabólitos secundários são os terpenos, os flavonoides e os alcaloides. Os terpenos são considerados a maior e mais antiga classe de biomoléculas, com maior diversidade estrutural e funcional. Estes são biosintetizados a partir das unidades isoprênicas (2-metil butadieno), normalmente denominadas C₅, e cujo as reações de condensação entre as unidades possibilita a formação de monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀), carotenos e xantofilas (C₄₀) e outros derivados como saponinas e esteroides. Em geral, nos óleos essenciais, predominam-se os monoterpenos e sesquiterpenos (EISENREICH et al., 2001; DEWICK, 2009; BASER & BUCHBAUER, 2020).

Os flavonoides constituem uma classe importante dentro das substâncias fenólicas oriundas do metabolismo secundário, como os ácidos fenólicos (benzoicos – C₆-C₁ e cinâmicos C₆-C₃), os policetídeos aromáticos e os taninos. Os flavonoides correspondem a um grupo abundante de substâncias, porém estruturalmente definidos, apresentando um núcleo básico 2-fenilcromano (C₆-C₃-C₆) com grupos hidroxilas, metoxilas, glicosídicos e/ou substituintes prenilados ligados em várias posições. Alterações no anel C da estrutura básica conferem a formação de diferentes subclasses de flavonoides, como as chalconas, flavonóis, flavonas, flavan-3-óis, flavanonas, isoflavonas, entre outros (ANOUAR et al., 2012; BILER et al., 2017). Nas plantas, os flavonoides atuam como defesa antioxidante, proteção contra os raios UV da luz solar e na sinalização entre espécies (BASER & BUCHBAUER, 2020).

Por último, os alcaloides apresentam ocorrência restrita em determinadas espécies botânicas. Estes são substâncias cíclicas contendo átomos de nitrogênio como heteroátomo nos anéis e, por tal definição, apresentam ampla variedade estrutural, como anéis

piperidínicos, piridínicos, pirrolidínicos, quinolínicos, entre outros. A principal atividade biológica dos alcaloides está relacionada aos efeitos no sistema nervoso central do homem, como as substâncias alucinogênicas (DEWICK, 2009). A Figura 5 apresenta algumas substâncias conhecidas das principais classes de metabólitos secundários.

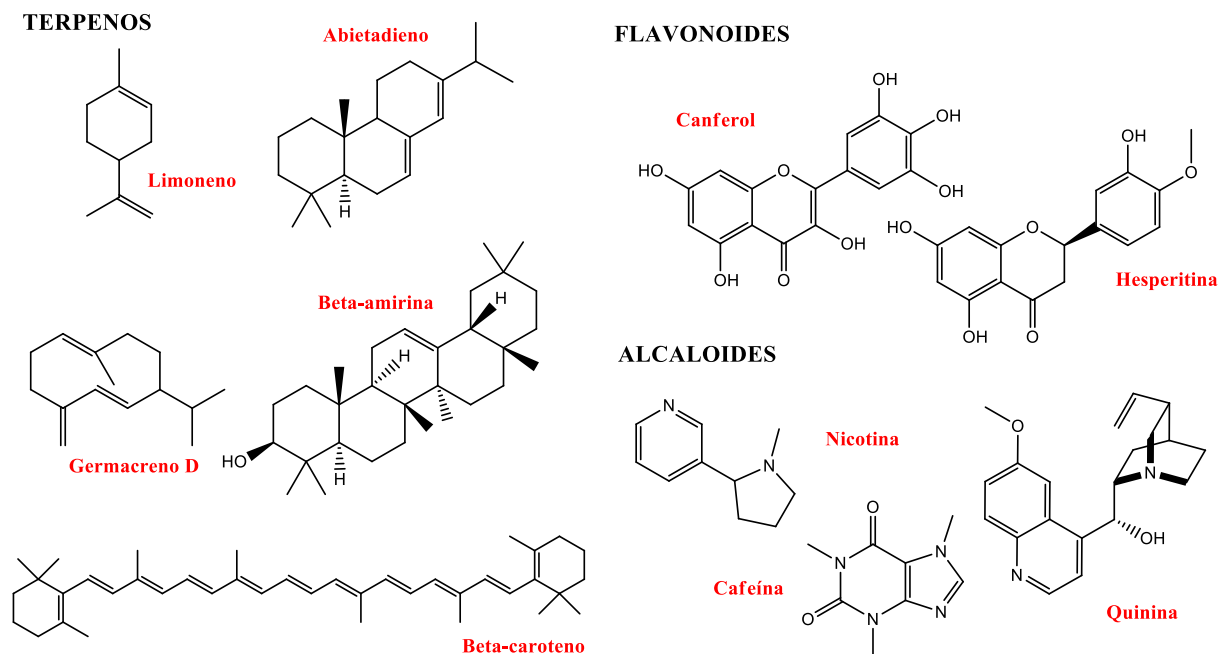


Figura 5. Exemplos de terpenos, flavonoides e alcaloides de ocorrência natural em plantas.

Como já mencionado anteriormente, a descoberta de metabólitos secundários nas espécies vegetais é possível através da atuação dos químicos de produtos naturais e o emprego de métodos de extração da matriz vegetal, separação das substâncias em mistura e da elucidação estrutural por métodos físicos de análise. Dentre diferentes técnicas adotadas, é importante ressaltar que uma das principais ferramentas empregada pelos químicos de produtos naturais é a cromatografia.

2.4. A Importância da Cromatografia na Química de Produtos Naturais

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* – (IUPAC, 1997), a cromatografia é definida como “um método físico de separação em que os componentes que serão separados estão distribuídos entre duas fases, uma que é estacionária (fase estacionária) enquanto a outra se move em direção definida (fase móvel)”. A interação entre as substâncias inicialmente presentes em uma mistura e as duas fases distintas e imiscíveis contribuirá para a ocorrência dos fenômenos de retenção e eluição, responsáveis pela migração diferencial e a consequente separação das substâncias. A Figura 6 ilustra a cromatografia em coluna, método mais clássico em que ocorre a adição da mistura na fase superior da coluna e retirada das frações após eluição com fase móvel através da fase estacionária.

Na história da humanidade, relatos de experimentos similares à cromatografia foram observados em períodos anteriores ao século XX, como a descrição de um método para verificação da autenticidade de *verdigris*, um sal utilizado como fungicida e pigmento verde, ainda na Roma Antiga, no ano 77 depois de Cristo – d.C. (PACHECO et al., 2015). Porém, a história da Química Moderna atribui a invenção da cromatografia ao botânico russo Mikhael S. Tswett (1872-1919), cujo trabalho inicial envolveu uma investigação fitoquímica (LANÇAS, 2009a; LANÇAS, 2009b; PACHECO et al., 2015).

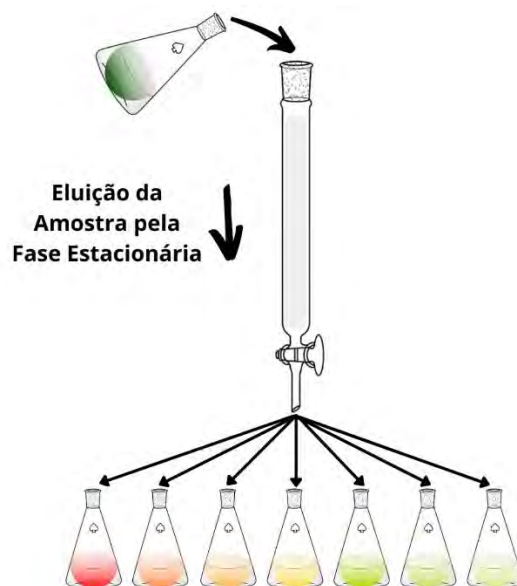


Figura 6. Ilustração sobre o processo clássico de cromatografia em coluna.

Em 1903, Tswett publicou inicialmente um relatório sobre seus extensivos experimentos sobre um novo fenômeno de adsorção e a potencial aplicação na separação de pigmentos de folhas de plantas através de diferentes substâncias sólidas depositadas em uma coluna de vidro, similar ao exemplificado na Figura 6. Até então, o cientista ainda nomeava o processo como filtração. Somente em 1906 com a publicação de dois artigos científicos, o termo cromatografia foi adotado e descrito pelo botânico russo. A origem do nome normalmente é relacionada as palavras gregas *chroma* (cor) e *graphein* (escrever), significando “a escrita da cor”, porém acredita-se também que pode ter sido uma auto-homenagem, devido ao nome Tswett escrito em russo significar “cor” e, portanto, seria “a escrita de Tswett” (PACHECO et al., 2015).

Desde o século XX até os dias atuais, as técnicas cromatográficas se expandiram de maneira destacada. A Tabela 1 relaciona as principais classificações utilizadas na literatura científica e alguns exemplos de técnicas cromatográficas relevantes dentro de cada critério.

Entre as técnicas empregadas, é possível destacar as técnicas clássicas, como a cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e preparativa (CCDP) e cromatografia em coluna aberta ou à pressão atmosférica. Estas são empregadas exaustivamente nos estudos de fitoquímica básica. Porém, nas últimas décadas, as técnicas instrumentais também ganharam destaque, apresentando importância devido a elevada resolução cromatográfica, sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade. A cromatografia gasosa, a cromatografia líquida preparativa, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e, mais recentemente, a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) são atualmente importantes ferramentas para a separação de substâncias em misturas e, através do uso de sistemas hifenados com técnicas espectroscópicas, como a espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV/Vis) e a espectrometria de massas, são possibilitadas a identificação e a quantificação dos analitos (LANÇAS, 2009a; LANÇAS, 2009b; PACHECO et al., 2015).

Tabela 1. Principais critérios usados para classificação e exemplos de técnicas cromatográficas (ETTRE, 1993; LANÇAS, 2009a).

Crítérios	Tipos	Exemplos
Forma Física do Sistema	Em Coluna	Colunas de vidro ou metal
	Planar	Camada delgada com sílica
Estado Físico da Fase Móvel	Líquido	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
	Gasoso	Cromatografia Gasosa
	Fluido no Estado Supercrítico	Cromatografia com Fluido Supercrítico
	Adsorção	Camada delgada com sílica
Mecanismo de Separação	Partição	Cromatografia em filtro de papel com adição de solvente
	Troca Iônica	Resinas poliméricas iônicas neutralizadas com contra-íons
	Exclusão Molecular	Utilização de gel polimérico Sephadex
	(Bio)Afinidade	Interação específica entre analito e ligante presente na FE
Polaridade das Fases	Fase Normal	FE polar e FM apolar
	Fase Reversa	FE apolar e FM polar
Finalidade	Analítica	Quantificação de flavonoides em alimentos
	Preparativa	Isolamento de metabólitos secundários de matriz vegetal

Os avanços tecnológicos permitiram que a cromatografia seja responsável por grande parte dos métodos de separação e de caracterização nos laboratórios de pesquisa e nas indústrias farmacêuticas, petroquímicas, cosméticos, entre outros. É importante ressaltar que as técnicas clássicas continuam tendo seu destaque na atuação dos químicos de produtos naturais.

2.5. O Conhecimento Fitoquímico da Família Myrtaceae

Com um amplo número de estudos fitoquímicos, em que a cromatografia é empregada para fins preparativos e analíticos, pode-se destacar a família Myrtaceae, entre os organismos vegetais da biodiversidade brasileira. As mirtáceas são uma das dez maiores famílias de angiospermas (*angio* – urna; *sperma* – semente) no Brasil, com taxa de endemismo somente inferior a família Bromeliaceae, com, respectivamente 76,2% e 85,3% (FORZZA et al., 2010; LUCAS & BÜNGER, 2015). Esta família, cujos dados taxonômicos estão descritos na Tabela 2, é reconhecida por sua grande importância cultural e econômica, sendo utilizada para fins medicinais, como distúrbios gastrointestinais, quadros hemorrágicos e doenças infecciosas, e para fins alimentícios, através dos seus frutos geralmente consumidos *in natura* ou processados (CRUZ & KAPLAN, 2004; STEFANELLO et al., 2011).

É importante destacar que o bioma Mata Atlântica e, em especial, o estado do Rio de Janeiro apresentam uma das maiores riquezas botânicas. Somente o estado possui atualmente 7.354 espécies de angiospermas, sendo 1.076 espécies endêmicas e, por tais razões, o Rio de Janeiro é considerado um importante centro de endemismo (COELHO et al., 2017). Muitas destas espécies endêmicas pertencem as mirtáceas, que estão presentes no território fluminense (Figura 7) e representam uma das dez famílias predominantes na Mata Atlântica e de maior riqueza nas áreas de restingas (LANDRUM & KAWASAKI, 1997; SOUZA et al., 2007; FORZZA et al., 2010).

Tabela 2. Classificação taxonômica da família Myrtaceae (ITIS, 2014).

Classificação	Dados taxonômicos
Reino	Plantae
Sub-reino	Viridiplantae
Infrareino	Embryophyta
Divisão	Tracheophyta
Subdivisão	Spermatophytina
Classe	Magnoliopsida
Super-ordem	Rosanae
Ordem	Myrtales
Família	Myrtaceae

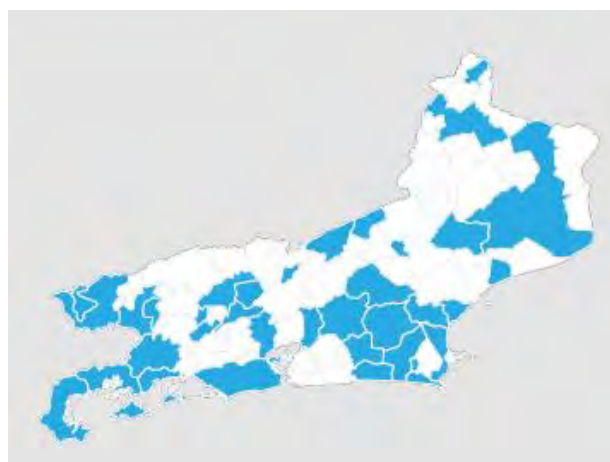


Figura 7. Distribuição geográfica da família Myrtaceae no estado do Rio de Janeiro (SOUZA, 2014)

Quanto à sua constituição química, a família Myrtaceae já é conhecida por ser rica em óleos essenciais e que, em sua maioria, apresentam atividade antimicrobiana (BORGES et al., 2014). Ainda de acordo com a base de dados do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE_{DB}), da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), existem trabalhos que destacam a presença de derivados aromáticos, taninos e terpenos para as mirtáceas e atividades antileishmania, antitripanossômica, antifúngica, antioxidante, inseticidas, entre outros (PILON et al., 2017).

Entre os gêneros mais importantes, destacam-se *Eugenia*, *Myrcia* e *Myrciaria*, que estão presentes em todas as regiões do território brasileiro (LANDRUM & KAWASAKI, 1997). Segundo Lucas & Bünger (2015), o gênero *Eugenia* possui cerca de 385 espécies no Brasil, sendo 241 presentes na Mata Atlântica. Este gênero é caracterizado por estrutura arbustiva ou arbórea de 3 a 12 metros de altura, sendo um dos mais ricos em número de espécies do planeta e amplamente utilizado na medicina popular para diferentes patologias como distúrbios gastrointestinais, inflamações e infecções (FORZZA et al., 2010; STEFANELLO et al., 2011; QUEIROZ et al., 2015). Nos óleos essenciais obtidos do gênero *Eugenia*, já foram encontradas mais de 300 substâncias voláteis, predominando principalmente os sesquiterpenos cíclicos. Estes óleos essenciais são utilizados na medicina popular para tratamento de disenterias, problemas estomacais, inflamações e infecções. Além dos sesquiterpenos em óleos essenciais, outras classes de metabólitos secundários já foram identificados em espécies de *Eugenia*, como os flavonoides, triterpenos e taninos (STEFANELLO et al., 2011; DE SOUZA et al., 2018).

O gênero *Myrcia*, corresponde a 320 espécies presentes na Mata Atlântica, também é muito empregada na medicina popular através de infusões, sendo relacionados os extratos de

folhas a atividades hipoglicêmica, anti-hemorrágica e antioxidante (CASCAES et al., 2015; LUCAS & BÜNGER, 2015). Os óleos essenciais das folhas de espécies do gênero *Myrcia* também são bastante conhecidos, apresentando em sua composição química monoterpenos e sesquiterpenos e como atividades biológicas ação anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante e antimicrobiana. Quanto aos componentes não-voláteis, é observada a presença de ácidos orgânicos, taninos, triterpenos, flavonoides glicosilados e derivados de acetofenona, que são relacionados aos tratamentos tradicionais de diabetes (CASCAES et al., 2015).

Por último, o gênero *Myrciaria* apresenta cerca 15 espécies na Mata Atlântica. Embora os óleos essenciais das folhas de algumas espécies sejam conhecidos, com a composição majoritária de sesquiterpenos cíclicos, o principal destaque ocorre para o potencial tecnológico dos frutos e ainda sua larga distribuição na América Latina e Central (BORGES et al., 2014; LUCAS & BÜNGER, 2015). Um exemplo do potencial deste gênero é a espécie *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg, responsável pelos frutos de jabuticaba, amplamente explorado pela indústria alimentícia nos últimos anos (WU et al., 2013). As espécies do gênero *Myrciaria* apresentam frutos comestíveis ricos em substâncias fenólicas como ácido elágico, taninos, flavonoides e antocianinas, cujo consumo está relacionado a atividades anti-carcinogênico, antioxidante, antiviral, anti-inflamatório e efeitos positivos no tratamento de diabetes tipo 2 e doença de Alzheimer (BORGES et al., 2014).

CAPÍTULO I

**ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
FOLHAS DE *Myrciaria tenella* (DC.) O.BERG**

RESUMO

A espécie *Myrciaria tenella* (DC.) O.Berg (Myrtaceae) é uma planta nativa com ampla distribuição no território brasileiro, incluindo a região de Mata Atlântica do Rio de Janeiro (RJ). Estudos sobre o óleo essencial de folhas de *M. tenella* (OEMT) já foram publicados na literatura científica, porém apresentando diferenças entre locais de coleta, metodologias de extração e composição química. Além disso, o seu óleo essencial já demonstrou potencial anti-inflamatório em resultados preliminares. O objetivo deste estudo foi caracterizar quimicamente o óleo essencial de folhas de *M. tenella*, determinando o efeito do tempo de destilação na composição química do óleo, e avaliar a sua atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Para a execução, foram coletadas, no período da manhã, folhas de 5 indivíduos de uma população de *M. tenella* localizados na Restinga da Marambaia (RJ). A extração do óleo essencial foi realizada em duas etapas: a primeira consistiu na hidrodestilação até a exaustão (5 h), enquanto a segunda etapa refere-se a repetição da extração, com retiradas de alíquotas a cada 1 h (F1, F2, F3, F4 e F5). A caracterização química foi realizada através de análises por CG-DIC e CG-EM. Cada substância foi identificada por comparação dos índices de retenção linear (IRL's) e espectros de massas com bibliotecas disponíveis (NIST e Adams); e a quantificação foi feita por normalização de áreas através do uso de padrão interno e predição dos fatores de resposta relativos (FRR's). Para avaliação biológica, o OEMT foi encaminhado para o Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Nocicepção (ICBS/UFRRJ). Ensaio *in vivo* e *in vitro* com camundongos machos suíços e cultura de macrófagos de camundongos foram empregados tais como teste de contorção abdominal induzida por ácido acético, teste de formalina, teste de Von Frey, medição de mediadores inflamatórios, entre outros. Quanto aos resultados, 36 substâncias foram identificadas no OEMT, com a composição majoritária de terpenos hidrocarbônicos. β -pineno (21,46%), α -pineno (19,43%), *E*-cariofileno (10,89%) e aromadendreno (9,17%) foram os principais constituintes encontrados no OEMT. Foi sugerida a estrutura química do fenilpropanoide 2',4',6'-trimetóxi-fenil-butano para o quinto constituinte majoritário (8,45%), através de análises complementares por RMN ^1H e ^{13}C . O efeito do tempo de destilação sobre a composição química do OEMT foi confirmado através das diferenças significativas entre os teores dos componentes majoritários nas frações coletadas. Além disso, foi observado que, para esta espécie, é possível obter um óleo essencial rico em β -pineno/ α -pineno e com alto rendimento com apenas 2 h de extração. Os tempos de destilação superiores a 3 h resultaram em óleos essenciais com maior teor de sesquiterpenos. Em relação ao potencial biológico do OEMT, os principais resultados consistiram na ação contra hipernocicepção, inibição *in vivo* e *in vitro* da produção de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, de NO e da prostaglandina PGE $_2$, aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10, ausência de citotoxicidade e inibição das enzimas COX. Todo o presente estudo colabora para futuras aplicações do OEMT e a preservação da espécie *M. tenella*.

Palavras-chave: *Myrciaria tenella*, óleo essencial, atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

Myrciaria tenella (DC.) O.Berg (Myrtaceae) is a native plant with wide distribution in Brazil and also in the Atlantic Forest located in Rio de Janeiro (RJ). Some studies about the essential oil of *M. tenella* leaves (OEMT) have been published in the scientific literature, but with different collection areas, methodologies of extraction and chemical composition. In addition, its essential oil has already shown anti-inflammatory potential in preliminary results. The aim of this study was to chemically characterize the essential oil of *M. tenella* leaves, determining the effect of distillation time on the chemical composition, and to evaluate its anti-inflammatory and antinociceptive activity. Leaves of 5 individuals of *M. tenella* population from Restinga da Marambaia (RJ) were collected in the morning period. The extraction of essential oil was performed in two stages: the first consisted of hydrodistillation until exhaustion (5 h), while the second stage refers to the repetition of this extraction, with obtention of aliquots every 1 h (F1, F2, F3, F4 and F5). The chemical characterization was carried out through the GC-DIC and GC-EM analyses. The identification of each substance was performed by comparison of the linear retention indices (IRL's) and the mass spectra with the available libraries (NIST and Adams); and the quantification was performed by normalization of areas through the use of internal standard and prediction of relative response factors (FRR's). For biological evaluation, the OEMT was evaluated in the Laboratório da Farmacologia da Inflamação e Nocicepção (ICBS/UFRRJ). *In vivo* and *in vitro* assays with Swiss male mice and mouse macrophage cultures were used, such as acetic acid-induced abdominal writhing test, formalin test, Von Frey test, measurement of inflammatory mediators, among others. 36 substances were identified in the OEMT, with the majority composition of hydrocarbon terpenes. β -pinene (21.46%), α -pinene (19.43%), *E*-caryophyllene (10.89%) and aromadendrene (9.17%) were the main constituents found in the OEMT. The chemical structure of the phenylpropanoid 2',4',6'-trimethoxyphenyl-butane was suggested for the fifth major constituent (8.45%), by additional ^1H and ^{13}C NMR analyzes. The effect of the distillation time on the chemical composition of the OEMT was confirmed through the significant differences between the contents of the major components in the fractions. Furthermore, it was observed that, for this species, it is possible to obtain a high yield β -pinene/ α -pinene-rich essential oil with only 2 h of extraction. The distillation times superior to 3 h resulted in essential oils with higher sesquiterpenes content. Regarding the biological potential of the OEMT, the main results consisted of the action against hypernociception, *in vivo* and *in vitro* inhibition of the production of cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6, of NO and of the prostaglandin PGE $_2$, increased production of anti-inflammatory cytokine IL-10, no cytotoxicity and inhibition of COX enzymes. This present study contributes to future applications of the OEMT and the preservation of the *M. tenella* species.

Keywords: *Myrciaria tenella*, essential oil, anti-inflammatory activity.

1 INTRODUÇÃO

As plantas apresentam, através do seu metabolismo, uma composição química diversificada de inúmeras substâncias, que apresentam relevantes propriedades terapêuticas ao homem. Muitas espécies botânicas desconhecidas e que sofrem risco de extinção podem ser preservadas e/ou valorizadas economicamente através da utilização de suas substâncias. Uma possibilidade é pela obtenção dos óleos essenciais (OE).

Segunda a norma ISO 9235: 2013, o termo “óleos essenciais” refere-se a um produto odorífero, geralmente com composição química complexa, obtido a partir de uma matéria-prima vegetal definida botanicamente, através de processos como a destilação à vapor, destilação à seco ou ainda um processo mecânico adequado sem aquecimento (COUNCIL OF EUROPE, 2016 *apud*). Este produto consiste numa mistura de substâncias líquidas e lipofílicas de baixa massa molar (< 300 Da). Entre as principais classes de metabólitos secundários presentes nos OE, observam-se os monoterpenos, os sesquiterpenos e os fenilpropanoides (BASER & BUCHBAUER, 2020; DEWICK, 2009).

Embora seja observado um crescente interesse da sociedade pelos óleos essenciais, como, por exemplo, pela prática da aromaterapia, todo o potencial econômico em relação as plantas aromáticas e aos óleos essenciais continua a ser pouco explorado no Brasil (CAVALCANTI et al., 2015). Além disso, estes produtos apresentam diferentes propriedades biológicas como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana, entre outros (BASER & BUCHBAUER, 2020).

Algumas famílias botânicas são reconhecidas por apresentarem espécies com tricomas glandulares produtoras de óleo essencial em folhas, flores e frutos, como a família Myrtaceae, revelados por um grande número de artigos científicos sobre a caracterização e atividade farmacológica destes óleos essenciais (STEFANELLO et al., 2011).

Entre espécies ainda pouco conhecidas quimicamente, podemos citar a espécie *Myrciaria tenella* (DC.) O.Berg (Figura 8), de nome popular “cambuí” ou “murta-do-campo” (LORENZI & BACHER, 2015). Esta espécie apresenta pequenas folhas lanceoladas e frutos do tipo baga, globosos e coloração vermelha ao roxo escuro, com diâmetro médio de 9 mm, sendo explorado para consumo *in natura* ou em geleias (MARCHIORI, 1987; SILVA et al., 2012). Suas folhas são utilizadas na medicina popular devido a diferentes ações como adstringente, antimicrobiana, antidiabética e anti-inflamatória (RIBEIRO et al., 2019).



Figura 8. Registros fotográficos da espécie *Myrciaria tenella*: (A) árvore adulta; (B) detalhe do tronco; (C) galhos com folhas, superfície adaxial; e (D) frutos maduros (FLORA DIGITAL/UFSC, 2020).

A espécie *M. tenella* é considerada nativa do Brasil, porém apresenta extensa distribuição no território brasileiro. Esta espécie pode ser encontrada desde a região Norte ao Sul do país através dos biomas Amazônia, cerrado, caatinga e Mata Atlântica (FORZZA et al., 2010). Isto ocorre devido à sua capacidade de dispersão e à alta adaptabilidade a ambientes com diferentes condições hídricas. No estado do Rio de Janeiro, por exemplo, a espécie pode ser encontrada em algumas restingas, como a Restinga da Marambaia, localizada nos municípios do Rio de Janeiro, Itaguaí e Mangaratiba. Estes ecossistemas são áreas de extensa faixa arenosa nas costas litorâneas com condições climáticas diferenciadas, como alta salinidade, elevadas temperaturas, alta correnteza de ar e escassez hídrica (SOUZA et al., 2007; SOUZA & MORIM, 2008; MONTEIRO et al., 2016).

Embora a espécie apresente ampla distribuição territorial, poucos estudos científicos já foram desenvolvidos, sendo, em sua maioria, a obtenção do óleo essencial de suas folhas. Apenas o estudo de Apel et al. (2010) indicou que o seu óleo essencial possui potencial anti-inflamatório através de dois ensaios *in vivo*. Os demais trabalhos focaram na extração do óleo essencial de *M. tenella* de diferentes regiões do Brasil e através de diferentes metodologias de extração (ANDRADE et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2008; MONTEIRO et al., 2016). Nenhum destes estudos apresentaram coletas em regiões com condições climáticas diferenciadas, como nas restingas.

Além disso, com o uso de hidrodestilação com diferentes tempos de extração, os OE obtidos de folhas desta planta do estados do Pará e São Paulo demonstraram a presença majoritária de sesquiterpenos, enquanto o OE obtido de plantas do Rio de Janeiro apresentou uma mistura de terpenos hidrocarbônicos (ANDRADE et al., 2006; APEL et al., 2010; MONTEIRO et al., 2016). Apenas Schneider et al. (2008) obtiveram um OE rico em monoterpenos a partir da destilação à vapor de folhas coletadas no estado do Rio Grande do Sul. A composição química do OE pode ser alterada devido a diferentes fatores como condições edafoclimáticas, período de colheita e pré-tratamento. Por outro lado, alguns estudos científicos tem demonstrado que o tempo de destilação influencia diretamente na composição química e no rendimento de extração do OE (VALTCHO et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2015; HENNIA et al., 2016; TOKER et al., 2017). Estas considerações são importantes para futuros cultivos comerciais de espécies botânicas.

O capítulo I desta tese teve como objetivo identificar os metabólitos secundários do OE de folhas de *M. tenella*, coletadas na Restinga da Marambaia (Rio de Janeiro – RJ), bem como avaliar o efeito do tempo de destilação sobre o rendimento de extração e a composição química do OE desta planta. Em complementação aos nossos resultados, foram avaliadas através de um trabalho em parceria as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo* e *in vitro*, incluindo possíveis mecanismos de ação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais e Equipamentos

Para a extração por hidrodestilação, foram empregados balão de fundo redondo de 12 L, aparelho do tipo Clevenger, condensador e manta de aquecimento. Foram utilizadas inicialmente água destilada e sulfato de sódio anidro – Na₂SO₄ grau P.A. (Vetec, Brasil). Todas as amostras foram pesadas em balança analítica Shimadzu (Japão) modelo Marte AY220. Os extratos obtidos foram acondicionados em frascos do tipo âmbar de 10 mL.

Para as análises instrumentais, foram utilizados diclorometano grau MS, série homóloga de *n*-alcano (C₆-C₂₆) e padrão de octanoato de etila, grau de pureza de 98% (Sigma-Aldrich, EUA); clorofórmio deuterado (CDCl₃) e tetrametilsilano (Tedia, EUA). As especificações dos equipamentos de instrumentação analítica serão mencionadas nos subtópicos de caracterização química das amostras.

2.2. Coleta do Material Vegetal

Folhas de *Myrciaria tenella* (Figura 9) foram coletadas no mês de agosto de 2018 na Restinga da Marambaia, em área localizada no município do Rio de Janeiro – RJ (23°02'11.7" S, 43°37'14.6" W), entre o horário de 9h e 10h da manhã. Procedeu-se uma coleta de folhas maduras da mesma altura (parte apical dos galhos) de cinco espécimes de *M. tenella*. Uma excisata (RBR 12552) foi depositada no Herbário do ICBS-UFRRJ.

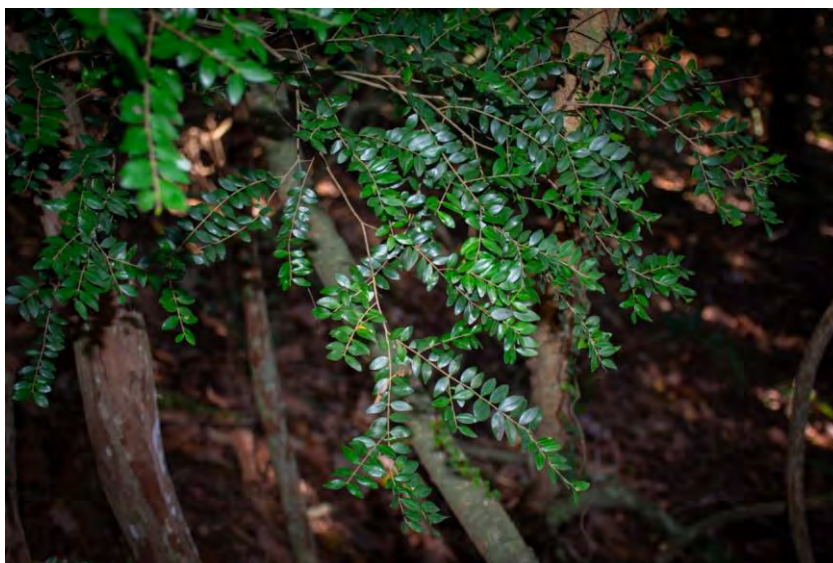


Figura 9. Registro fotográfico in loco dos troncos, galhos e folhas de *M. tenella* localizadas na Restinga da Marambaia (RJ). Fonte: Sidney Pacheco (Embrapa).

2.3. Identificação das Substâncias do Óleo Essencial de Folhas de *M. tenella* (OEMT)

2.3.1. Extração do OEMT por hidrodestilação

O óleo essencial das folhas de *M. tenella* (OEMT) foi extraído a partir das folhas desta espécie, no dia seguinte a coleta do material vegetal conforme procedimento ilustrado na Figura 10. Procedeu-se a hidrodestilação por imersão em água usando um aparelho do tipo Clevenger, contendo 320 g de folhas secas e cerca de 8 L de água destilada. A extração foi realizada até a exaustão, contando o tempo a partir da primeira gota de óleo obtida e encerrada

após 5 h, quando não havia mais obtenção do óleo essencial. Portanto, determinou-se um tempo limite de destilação de 5 h. O OEMT foi seco com sulfato de sódio anidro e armazenado no escuro sob temperatura de 4°C até o momento da análise. O rendimento de extração do óleo essencial foi determinado através da porcentagem de massa de OEMT obtido em relação a massa de material vegetal utilizado (g/100 g folhas - % m/m).

2.3.2. Avaliação do tempo de destilação sobre a composição química do OEMT

Uma nova extração do OEMT foi realizada, repetindo as mesmas prévias condições, conforme a Figura 10. Após o aquecimento, cinco tempos de destilação (1, 2, 3, 4 e 5 h) foram determinados, com uma fração sendo coletada separadamente em cada tempo. Cada fração foi seca com sulfato de sódio anidro e armazenada no escuro a 4°C para posterior análise. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

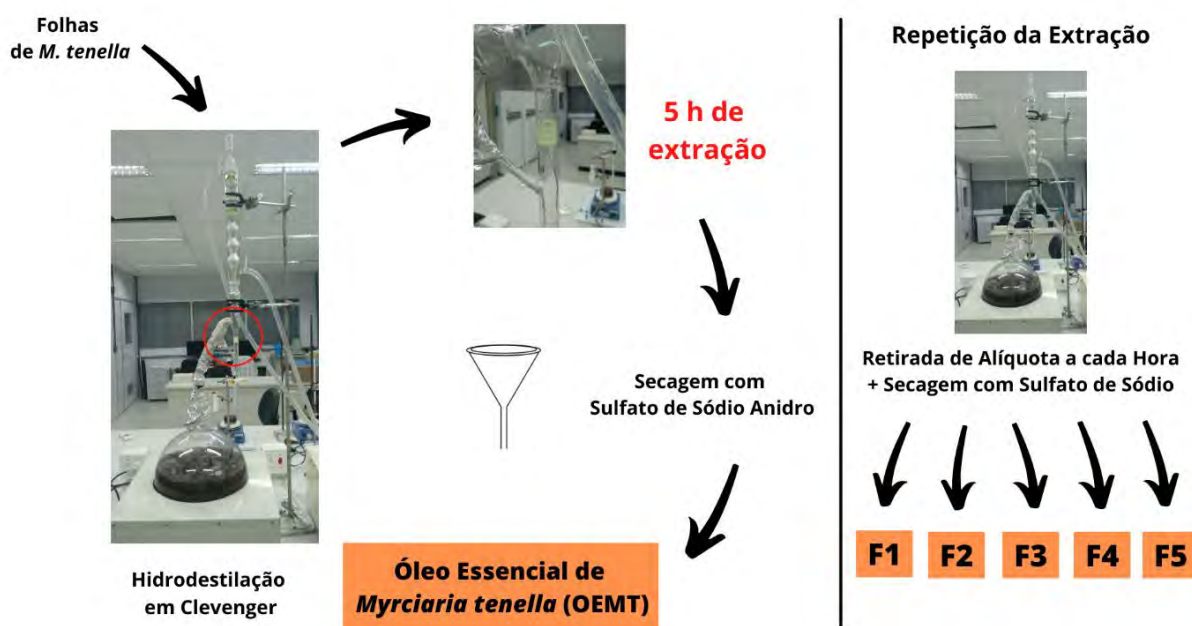


Figura 10. Esquema representativo da avaliação do efeito de destilação sobre a composição química do óleo essencial de folhas de *M. tenella*.

2.3.3. Análise por CG-DIC e CG-EM do OEMT

Cerca de 1 µL de amostra foi diluída em 1 mL de diclorometano e injetada no modo split de 1:20 em um cromatógrafo à gás Agilent® (EUA) 7890B com detector de ionização por chama, empregando uma coluna Agilent® (EUA) HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; fase estacionária de 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano). Volume de injeção e temperatura do injetor foram de 1 µL e 250°C, respectivamente. Hélio, grau de pureza 99,999% (White Martins, Brasil), foi empregado como gás de arraste no fluxo de 1 mL/min. A temperatura do forno foi programada para 60-240°C, com rampa de temperatura de 3°C/min.

Em seguida, a mesma amostra foi injetada em um cromatógrafo à gás Agilent® (EUA) 5975C equipado com um espectrômetro de massas e coluna Agilent® (EUA) HP-5MS sob as mesmas condições cromatográficas. O detector foi operado com ionização por impacto de elétrons a 70 eV e temperatura da fonte de íons de 230°C.

Para a identificação dos componentes do OEMT e das frações, uma mistura de *n*-alcanos lineares (C₆-C₂₆) foi analisada posteriormente por CG-DIC sob as mesmas condições experimentais.

2.3.4. Identificação das Substâncias Presentes no OEMT

As substâncias presentes no OEMT foram identificadas a partir do cálculo individual do índice de retenção linear (IRL), de acordo com a Equação 1 determinada por van Den Dool & Kratz (1963), para a programação linear de temperatura e baseada nos dados com a série de *n*-alcanos, e através da comparação dos espectros de massas obtidos nas bibliotecas disponíveis (Adams 4ª edição e NIST versão 11). Para o Capítulo I, cada substância foi identificada pelo código em negrito **M + número cardinal correspondente** (M referente a inicial da espécie botânica).

$$IRL_X = \left(\frac{t_{R_X} - t_{R_n}}{t_{R_{n+1}} - t_{R_n}} + n \right) * 100$$

Equação 1. Cálculo do índice de retenção linear (IRL) para análises por CG-DIC (van Den Dool & Kratz, 1963).

Símbolos:

- IRL_X : índice de retenção linear da substância X;
- t_{R_X} : tempo de retenção da substância X;
- t_{R_n} : tempos de retenção do alcano da série homóloga com tempo de retenção anterior à substância X;
- $t_{R_{n+1}}$: tempos de retenção do alcano da série homóloga com tempo de retenção posterior à substância X;
- n : número de carbonos do alcano com tempo de retenção anterior à substância X.

Para complementar a identificação das principais substâncias presentes no OEMT, experimentos unidimensionais de RMN ¹H e ¹³C foram realizados em um espectrômetro de RMN Bruker® AVANCE II (EUA), operando na faixa de 500 e 125 MHz respectivamente para análises de ¹H e ¹³C e utilizando CDCl₃ como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

2.3.5. Quantificação das Substâncias Presentes no OEMT

A quantificação das substâncias presentes no OEMT e nas demais frações recolhidas foi realizada em triplicata por análises em CG-DIC. Para isto, optou-se pela normalização das áreas através da adição de um padrão interno. O padrão octanoato de etila foi escolhido por não apresentar co-eluição com os demais componentes do OEMT. Procedeu-se a diluição de 10 µL de amostra em 1 mL de diclorometano e em seguida adicionou-se à mistura 10 µL de solução de octanoato de etila a 1% (v/v). Para cada substância, foi estimado o fator de resposta relativo (FRR) de acordo com Cachet et al. (2016), baseado no padrão de octanoato de etila (Equação 2 e Equação 3). Os teores de cada substância identificada foram determinados por normalização interna (Equação 4).

$$FRR_{X/P} = \frac{10^3(MM_X/MM_P)}{(-61,3 + 88,8n_C + 18,7n_H - 41,3n_O + 6,4n_N + 64n_S + 127n_{benz})}$$

Equação 2. Fator de resposta relativo da substância X ($FRR_{X/P}$), baseado no padrão original adotado por Cachet et al. (2016), octanoato de metila (P).

Símbolos:

- MM_X : massa molecular da substância X;
- MM_P : massa molecular do padrão original de octanoato de metila;
- n : número de átomos de C, H, O, N, S e de anéis aromáticos presentes na estrutura química da substância X.

$$FRR_{X/P'} = FRR_{X/P} / FRR_{P'/P}$$

Equação 3. Cálculo de um novo fator de resposta relativo da substância X baseado em qualquer padrão utilizado na análise ($FRR_{X/P'}$). É necessário primeiro calcular o FFR do novo padrão adotado em relação ao padrão original de octanoato de metila ($FRR_{P'/P}$).

$$\%_{nX} = \left(\frac{A_X \cdot FRR_{X/P'}}{A_{P'} \cdot FRR_{P'/P}} \right) \cdot 100$$

Equação 4. Cálculo da porcentagem normalizada da substância X ($\%_{nX}$).

Símbolos:

- A_X : área da substância X;
- $A_{P'}$: área do padrão de octanoato de etila;
- $FRR_{X/P'}$: fator de resposta relativo da substância X em relação ao octanoato de etila;
- $FRR_{P'/P}$: fator de resposta relativo do padrão de octanoato de etila em relação ao padrão original de octanoato de metila;
- $\sum A_{c,n}$: somatório de todas as áreas corrigidas pelos FRR de cada substância e normalizadas em relação a área corrigida padrão de octanoato de etila.

Todas as substâncias foram classificadas de acordo com a rota biossintética e sua estrutura química como monoterpenos hidrocarbônicos ou oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbônicos ou oxigenados ou outras classes. A porcentagem de cada grupo foi determinada pela soma simples das porcentagens das substâncias.

2.3.6. Processamento dos dados

Os cromatogramas e os espectros de massas obtidos foram processados através do software Agilent ChemStation (EUA). O software MestReNova versão 9.0 (MestReLab Research, EUA) foi utilizado para interpretação dos espectros obtidos nos experimentos de RMN. Todas as estruturas químicas foram desenhadas através do software ChemDraw Ultra versão 12.0 (Cambridge Soft, PerkinElmer, Reino Unido).

Os cálculos dos IRL's, FRR's e dos teores de cada substância foram realizados através de planilhas do Excel (Microsoft, EUA), sendo estes últimos expressos como média \pm desvio

padrão. Para o estudo do efeito do tempo de destilação, foram selecionadas como critério as concentrações das substâncias majoritárias e das classes metabólicas presentes e empregadas a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, através do software Statistica versão 7.0 (StatSoft®, EUA), com nível de significância de $p < 0,05$.

2.4. Avaliação da Atividade Biológica do Óleo Essencial de Folhas de *M. tenella*

Os experimentos referentes ao ensaio biológico foram realizados em uma atividade de colaboração com outros pesquisadores da UFRRJ.

2.4.1. Estudo anti-inflamatório e antinociceptivo *in vivo* do OEMT

A avaliação do estudo anti-inflamatório e antinociceptivo com o óleo essencial de folhas de *M. tenella* foi realizado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Nocicepção (ICBS-UFRRJ) pela equipe do professor Dr. Bruno Guimarães Marinho (Departamento de Ciências Fisiológicas – ICBS-UFRRJ). A metodologia empregada foi descrita integralmente no artigo publicado em parceria entre os laboratórios de pesquisa (GONÇALVES *et al.*, 2021). Os experimentos *in vivo* e *in vitro* foram conduzidos, respectivamente, com camundongos suíços machos e cultura de macrófagos de camundongos. Foram avaliados diferentes ensaios como o teste de contorção abdominal induzida por ácido acético; o teste de comportamento induzido pela ação de formalina; o teste de campo aberto para comprometimento motor; o teste de edema de pata; o teste de Von-frey para hiperalgesia mecânica; e a quantificação de mediadores inflamatórios. Os testes *in vitro* consistiram na avaliação citotóxica, na determinação de óxido nítrico (NO) e citocinas, e no ensaio de inibição de cicloxigenases (COX).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação Química do Óleo Essencial de Folhas de *M. tenella* (OEMT)

No presente estudo, foi realizada a extração do óleo essencial de folhas de *M. tenella* de uma população nativa da Restinga da Marambaia (RJ), pertencente ao bioma Mata Atlântica. Este trabalho de caracterização química foi publicado juntamente ao estudo biológico no ano de 2021 na revista Journal of Essential Oil Research (GONÇALVES *et al.*, 2021).

A primeira etapa deste estudo consistiu na extração do OEMT até a exaustão do material vegetal empregado. O tempo máximo de condensação do OEMT foi de 5 h, resultando em um total de rendimento de extração de 0,72% (m/m). Posteriormente, o produto obtido da hidrodestilação foi analisado em triplicata por CG-DIC e CG-EM. Os resultados do procedimento de identificação e quantificação das substâncias presentes no OEMT indicaram que a sua composição química consistiu basicamente na presença dos metabólitos da classe dos terpenos, sendo majoritariamente hidrocarbônicos (ou não-oxigenados). Todas as substâncias identificadas estão relatadas na Tabela 3.

Quanto à composição química, trinta e seis substâncias diferentes foram identificadas no OEMT, consistindo basicamente em relação aos dados quantitativos como monoterpenos hidrocarbônicos (teor total de 43,39%) e sesquiterpenos hidrocarbônicos (30,29%). β -pineno (M3, 21,46%), α -pineno (M1, 19,43%), *E*-cariofileno (M15, 10,89%) e aromadendreno (M17, 9,17%) foram os constituintes majoritários do OEMT, sendo suas fórmulas estruturais e moleculares e as massas moleculares (MM) disponíveis na Figura 11.

Como pode ser observado, os terpenos β -pineno e α -pineno são isômeros de posição (diferem apenas na posição da ligação dupla), apresentando a mesma massa molecular. Uma observação similar ocorre para os sesquiterpenos *E*-cariofileno e aromadendreno, que são isômeros estruturais (diferentes fórmulas estruturais). A identificação destes isômeros pelos espectros de massas é dificultada pela observação do mesmo íon molecular, sendo necessária a observação dos íons produtos obtidos a partir da dissipação da elevada energia empregada na fonte de ionização por elétrons para formação do íon molecular e fragmentos, técnica utilizada no equipamento de CG-EM. Portanto, a proposição de mecanismos de fragmentação pode contribuir para corroborar na identificação destas substâncias. Os espectros de massas dos constituintes majoritários, bem como os mecanismos de fragmentação para os principais íons produtos, estão dispostos abaixo nas Figuras 13 a 16. As propostas de fragmentação foram indicadas principalmente a partir de reações de rearranjo, quebras heterolíticas e reações de migração 1,3-hidrogênio.

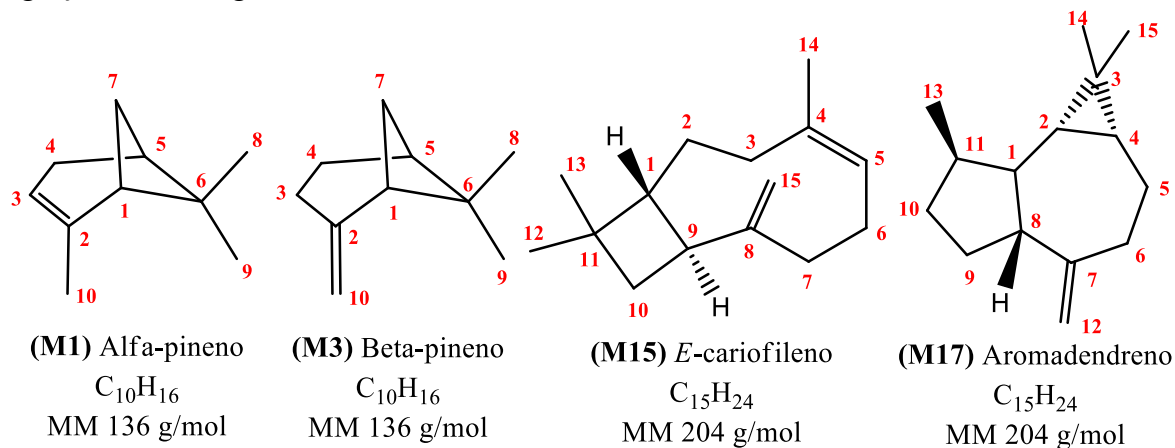


Figura 11. Terpenos majoritários encontrado no óleo essencial de folhas de *M. tenella*.

Tabela 3. Teores em porcentagem normalizada (%) das substâncias presentes no óleo essencial de folhas de *Myrciaria tenella*, obtido por 5 h de hidrodestilação.

N	IRL _{exp}	IRL _{lit}	Substâncias	Teor (% Média ± Desvio Padrão)
M1	932	932	α -pineno	19,43 ± 0,05
M2	946	946	Canfeno	0,43 ± 0,01
M3	976	974	β -pineno	21,46 ± 0,08
M4	1023	1022	<i>o</i> -cimeno	0,27 ± 0,01
M5	1026	1024	Limoneno	1,64 ± 0,04
M6	1029	1026	1,8-cineol	3,59 ± 0,05
M7	1098	1086	Terpinoleno	0,15 ± 0,00
M8	1100	1099	Linalool	0,22 ± 0,01
M9	1112	1114	Fenchol (Endo)	0,30 ± 0,00
M10	1163	1165	Borneol	0,40 ± 0,01
M11	1175	1174	Terpinen-4-ol	0,27 ± 0,01
M12	1189	1186	α -terpineol	2,90 ± 0,09
M13	1368	1374	Isoledeno	0,17 ± 0,00
M14	1404	1409	α -gurjuneno	0,51 ± 0,00
M15	1414	1417	<i>E</i> -cariofileno	10,89 ± 0,06
M16	1422	1431	β -gurjuneno	0,19 ± 0,06
M17	1433	1439	Aromadendreno	9,17 ± 0,04
M18	1448	1452	α -humuleno	1,28 ± 0,01
M19	1455	1458	Allo-aromadendreno	2,14 ± 0,02
M20	1466	1475	γ -gurjuneno	0,60 ± 0,01
M21	1480	1489	β -selineno	0,62 ± 0,00
M22	1489	1496	Viridifloreno	2,71 ± 0,02
M23	1500	1505	α -bulneseno	0,11 ± 0,01
M24	1508	1513	γ -cadineno	0,15 ± 0,02
M25	1518	1522	δ -cadineno	0,53 ± 0,00
M26	1535	1545	Selina-3,7(11)-dieno	0,95 ± 0,01
M27	1550	1559	Germacreno B	0,28 ± 0,00
M28	1572	1577	Espatulenol	3,91 ± 0,04
M29	1577	1582	Óxido de cariofileno	4,46 ± 0,04
M30	1585	1592	Viridiflorol	0,34 ± 0,00
M31	1588	1595	Cubeban-11-ol	0,16 ± 0,00
M32	1628	-	2',4',6'-trimetóxifenil-butano	8,45 ± 0,09
M33	1646	1652	α -eudesmol	0,27 ± 0,01
M34	1689	1700	Eudesm-7(11)-en-4-ol	0,14 ± 0,00
M35	1724	-	Derivado de trimetóxifenil	0,71 ± 0,01
M36	1762	1777	Isobaeckeol metil éter	0,20 ± 0,02
Monoterpenos Hidrocarbônicos				43,39
Monoterpenos Oxigenados				7,68
Sesquiterpenos Hidrocarbônicos				30,29
Sesquiterpenos Oxigenados				9,28
Outros Componentes				9,36
Total Identificado				100,0

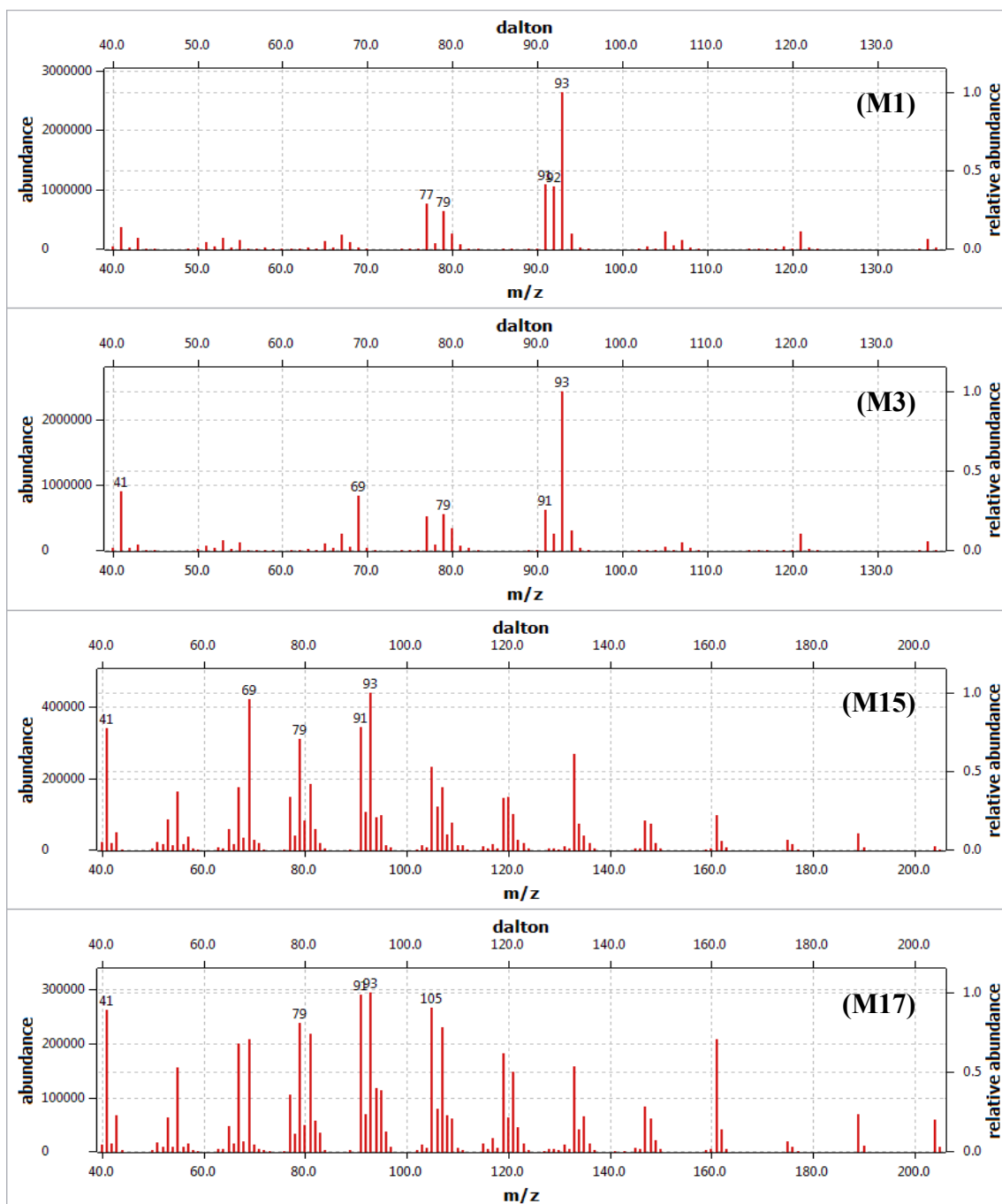


Figura 12. Espectros de massas das substâncias: α -pineno (M1), β -pineno (M3), *E*-cariofileno (M15) e aromadendreno (M17).

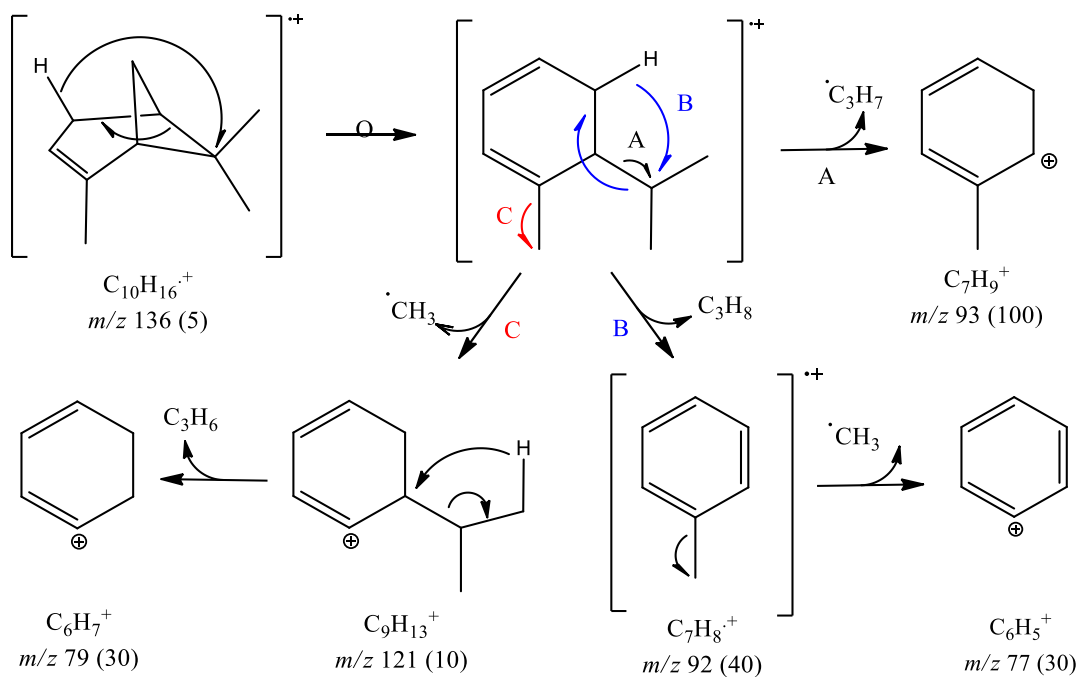


Figura 13. Proposta de mecanismo de fragmentação para o α -pineno (M1).

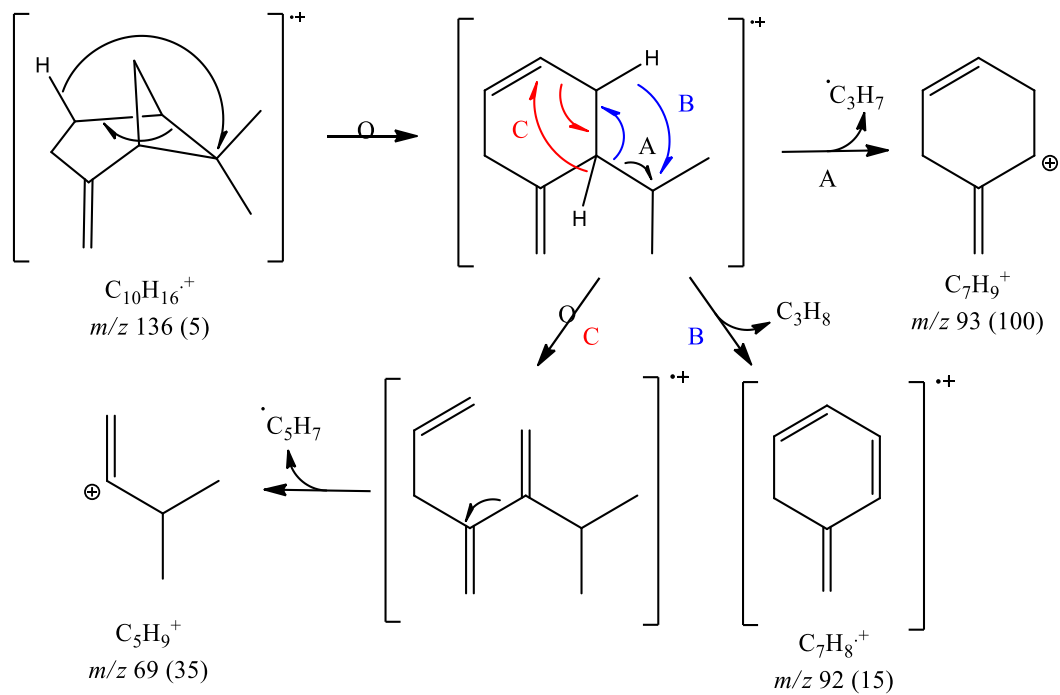


Figura 14. Proposta de mecanismo de fragmentação para o β -pineno (M3).

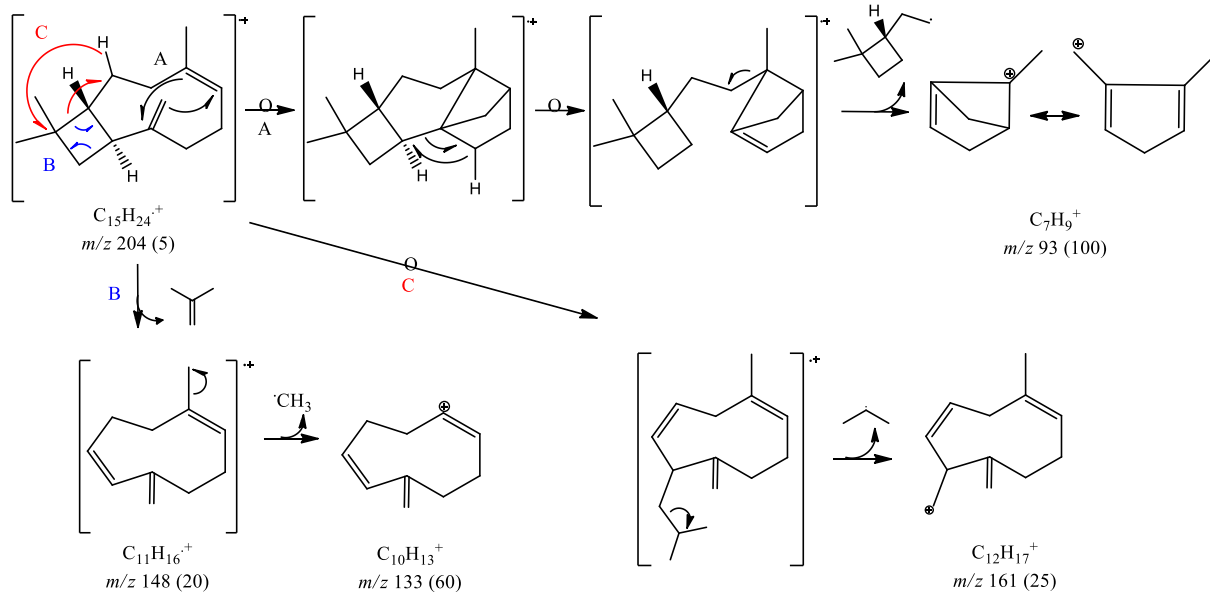


Figura 15. Proposta de mecanismo de fragmentação para o *E*-cariofileno (M15).

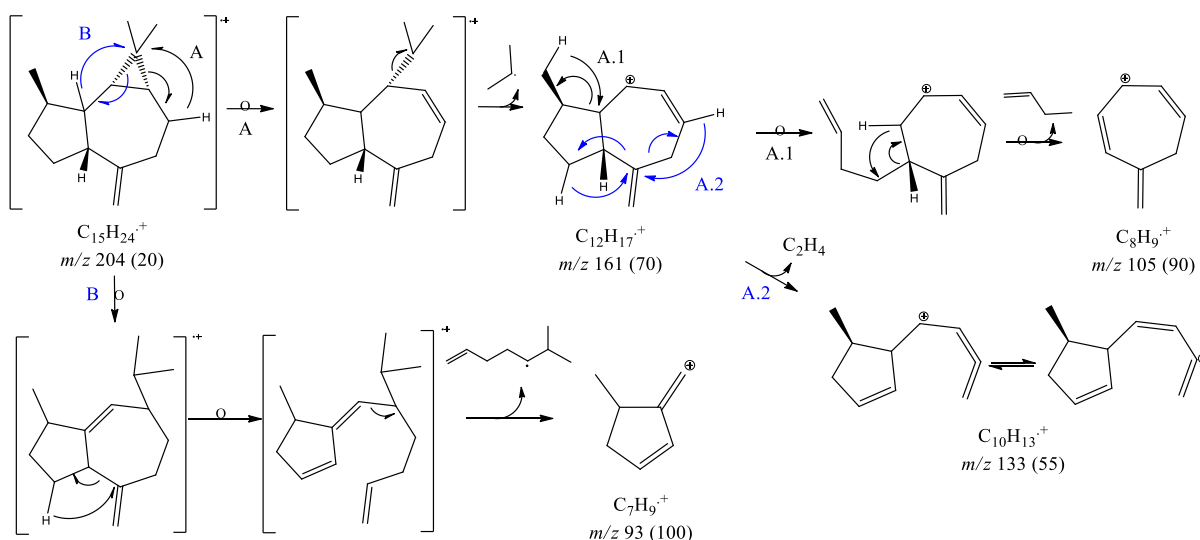


Figura 16. Proposta de mecanismo de fragmentação para o aromadendreno (M17).

É importante ressaltar que, em análises de rotina, a comparação dos dados de IRL_{exp} e IRL_{lit} bem como a utilização de softwares para cálculos dos níveis de similaridade garantem um maior nível de confiabilidade para a identificação dos constituintes de um óleo essencial. Além disso, a atuação do profissional na interpretação destes dados torna-se imprescindível. No presente trabalho, todos estes parâmetros foram considerados na identificação dos constituintes do OEMT.

Outra análise que pode ser empregada para óleos essenciais são as análises de RMN 1H e ^{13}C . Para a análise química do OEMT, estes experimentos possibilitaram propor a identificação da substância M32 (IRL 1628, teor de 8,45%, a quinta substância majoritária) como a 2',4',6'-trimetóxilfenil-butano (Figura 17), diferente da estrutura química 3',4',5'-trimetóxilfenil-propanona sugerido pela biblioteca NIST. As Figura 18 a 21 correspondem aos espectros de RMN 1H e ^{13}C do OEMT. Estes espectros apresentaram sinais para esta estrutura química, como os sinais em 3,80 ppm (s, 6H), 3,83 ppm (s, 3H) e 55,5 ppm (δ_{CH_3}) equivalentes a presença de grupos metoxílicos ligados ao anel aromático. Entretanto, um sinal

com valor de 90,4 ppm (δ_{CH}) é compatível a carbono metínico protegido por dois grupos metoxílicos, em contraste com o valor esperado inicialmente de 105 ppm (δ_{CH}). O mesmo pode ser observado através da presença de um sinal em 6,15 ppm (s, 2H), em detrimento do sinal esperado em 6,46 ppm. Outra informação importante é a ausência de sinais referente ao carbono quaternário de carbonila de cetona ($\delta_{Cq} > 200$ ppm). Os sinais de carbono quaternário do anel aromático (δ_C 159,1 e 161,7 ppm, respectivamente para 2 e 1 $C_{q(=C-O)}$) também são indicativos desta estrutura, assim como o fato do padrão de substituição do anel aromático (1,3,5 ou 2,4,6) ser relatado comumente na biossíntese de policetídeos aromáticos (DEWICK, 2009).

O espectro de massas obtido (Figura 22) apresentou os íons m/z 224 (M^+ , 20), 181 (100) e 121 (30) e, juntamente ao mecanismo de fragmentação proposto (Figura 23), corroborou na identidade da substância **M32**.

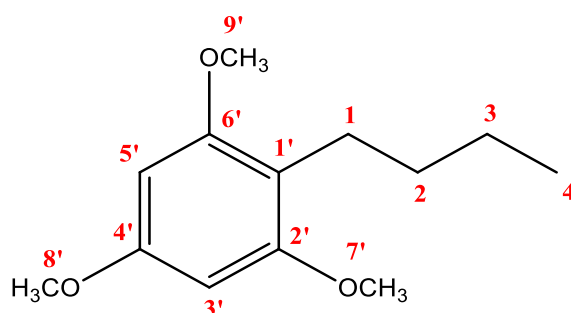


Figura 17. Estrutura química da 2',4',6'-trimetóxiifenil-butano (**M32**).

As análises por RMN 1H e de ^{13}C também contribuíram para a confirmação da presença das demais substâncias majoritárias no OEMT. Os sinais do tipo singlete com deslocamento químico em 0,74 e 1,26 ppm referem-se aos grupos metilas (H-8 e H-9) do componente majoritário β -pineno. Os hidrogênios vinilídnicos (H-10) também foram observados em 4,58 e 4,65 ppm. De maneira similar, foram identificados os sinais referentes aos hidrogênios metílicos e olefínicos para o α -pineno (δ_{CH_3} 0,86, 1,29 e 1,68 ppm para H-9, H-8 e H-10; δ_{CH} 5,21 ppm para H-3) e o *E*-cariofileno (δ_{CH_3} 0,99, 1,06 e 1,64 ppm para H-13, H-12 e H-14; δ_{CH_2} 5,33 ppm para H-15). Para o espectro de ^{13}C , foram observados todos os sinais referentes, respectivamente, aos 10 e 15 núcleos de carbonos diferentes para os monoterpenos e sesquiterpenos majoritários. A comparação com a literatura corrobora para a identificação destas substâncias, como pode ser observado na Tabela 4.

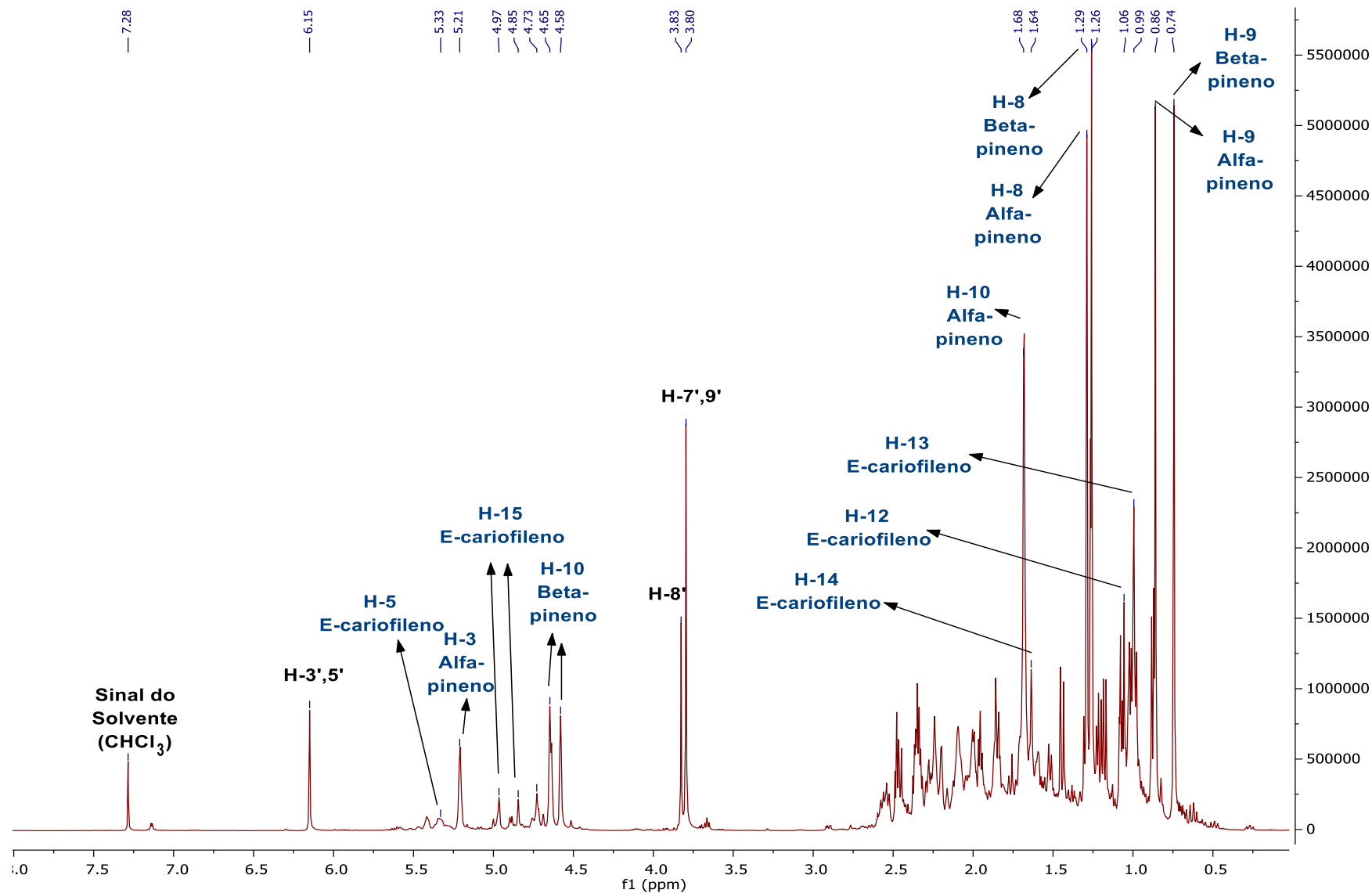


Figura 18. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do OEMT, com expansão em 3,0-8,0 ppm e correlação, em preto, com os sinais do 2',4',6'-trimetóxiifenil-butano (**M32**) e, em azul, com os demais componentes majoritários.

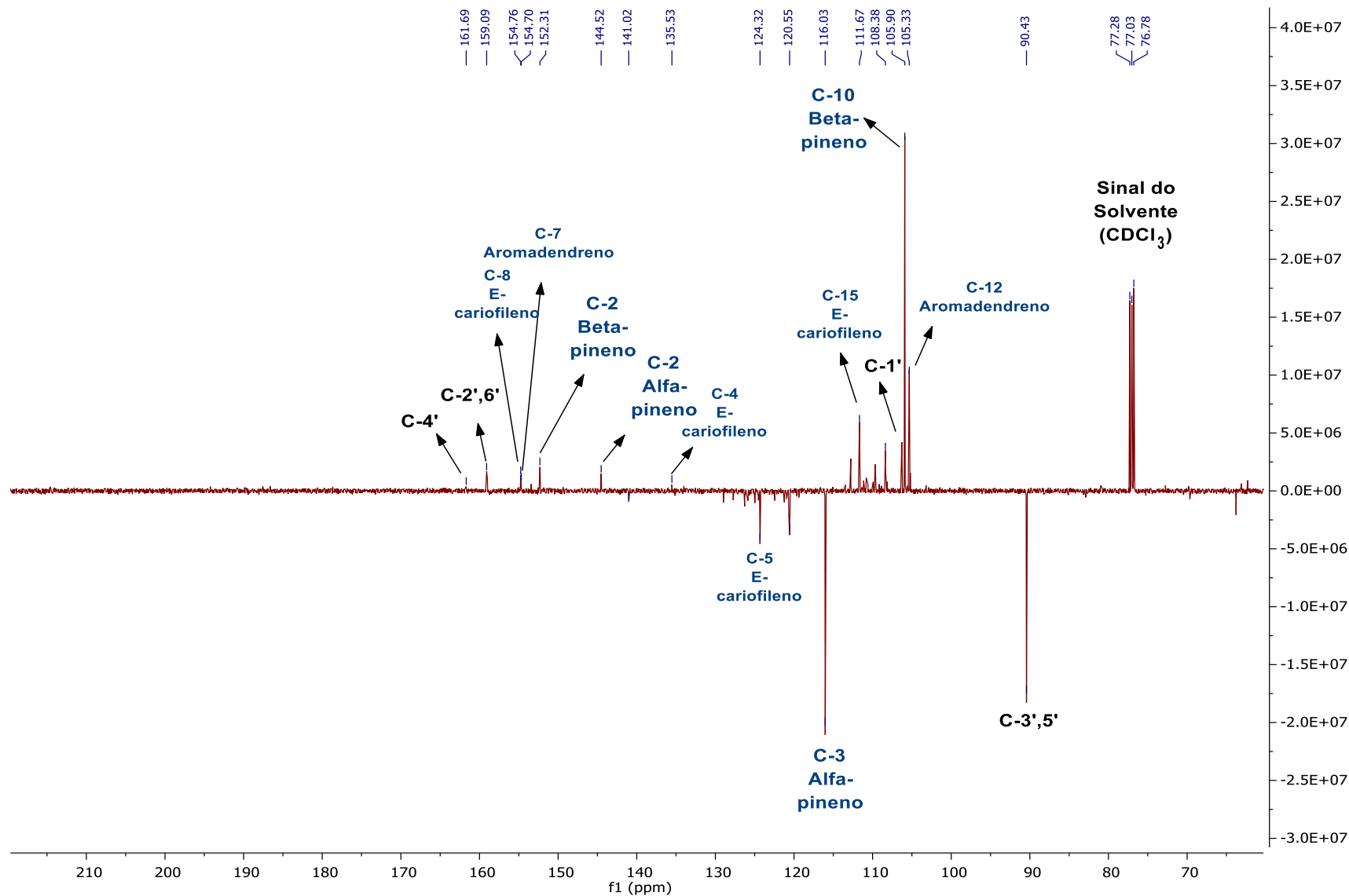


Figura 19. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do OEMT, com expansão em 60,0-220,0 ppm e correlação, em preto, com os sinais do 2',4',6'-trimetóxiifenil-butano (M32) e, em azul, com os demais componentes majoritários.

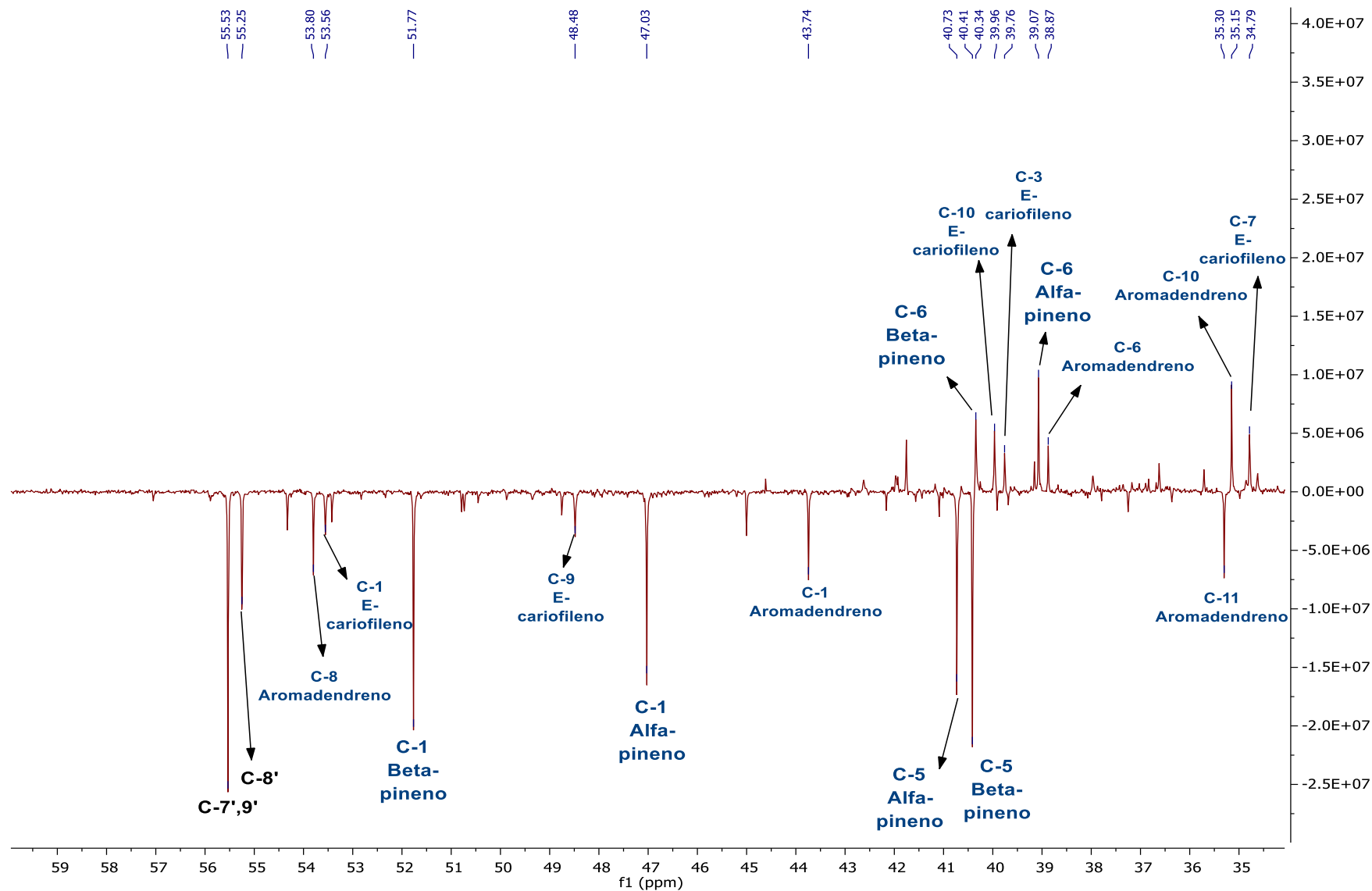


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do OEMT, com expansão em 34,0-60,0 ppm e correlação, em preto, com os sinais do 2',4',6'-trimetóxiifenil-butano (M32) e, em azul, com os demais componentes majoritários.

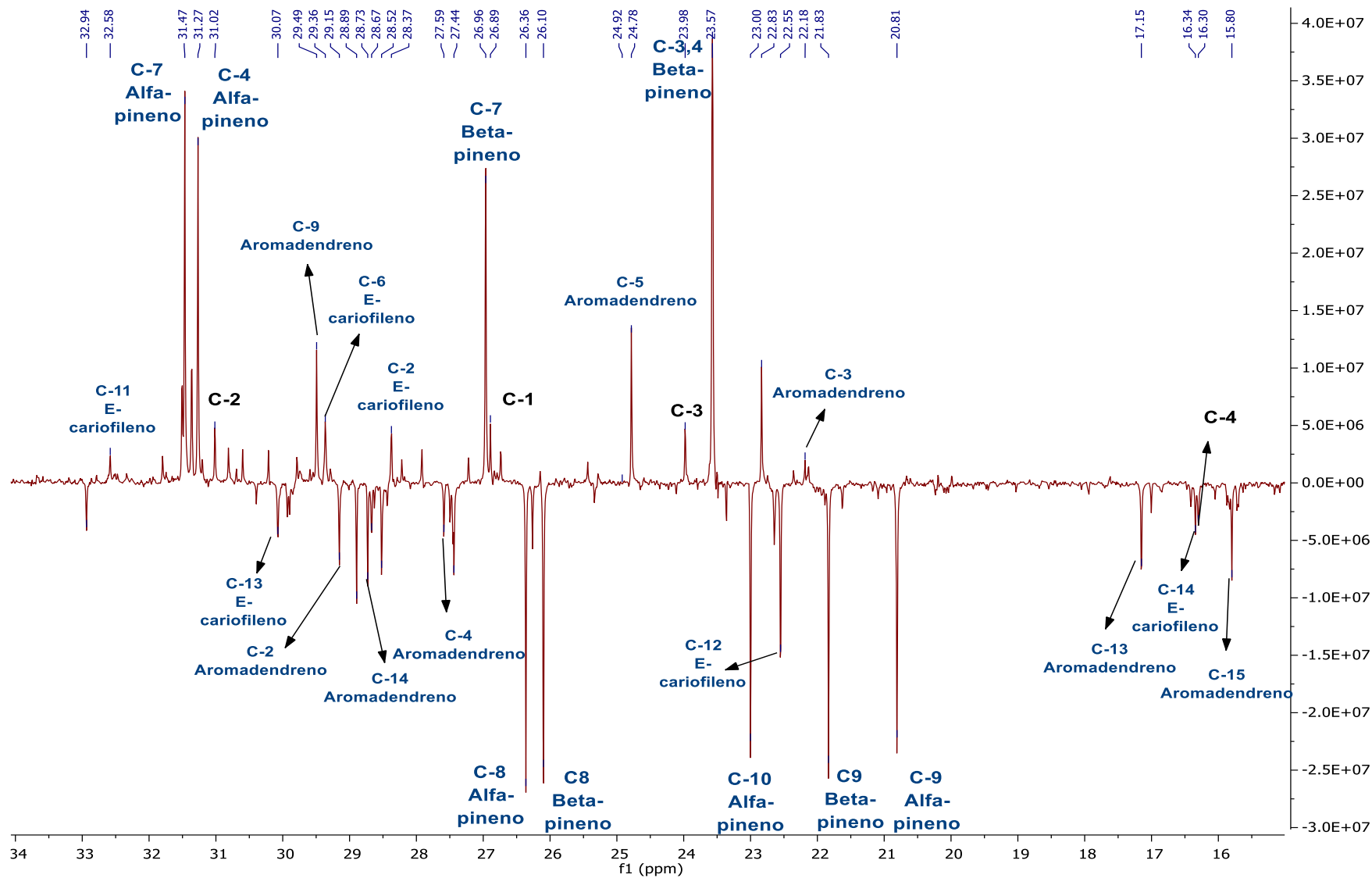


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do OEMT, com expansão em 15,0-34,0 ppm e correlação, em preto, com os sinais do 2',4',6'-trimetóxiifenil-butano (**M32**) e, em azul, com os demais componentes majoritários.

Tabela 4. Deslocamentos químicos, em ppm, para ¹³C obtidos experimentalmente dos constituintes majoritários do OEMT.

<i>α</i>-pineno			<i>β</i>-pineno			<i>E</i>-cariofileno			Aromadendreno			2',4',6'-trimétóxiifenil-butano			
n	$\delta_{C \text{ exp}}$	$\delta_{C \text{ lit}}^1$	C	$\delta_{C \text{ exp}}$	$\delta_{C \text{ lit}}^2$	C	$\delta_{C \text{ exp}}$	$\delta_{C \text{ lit}}^3$	C	$\delta_{C \text{ exp}}$	$\delta_{C \text{ lit}}^4$	C	n	$\delta_{C \text{ exp}}$	C
1	47,03	46,99	CH	51,77	52,1	CH	53,56	53,7	CH	43,74	44,01	CH	1	26,89	CH ₃
2	144,52	144,54	C _q	152,31	152,1	C _q	28,37	28,4	CH ₂	29,15	29,32	CH	2	31,02	CH ₂
3	116,03	116,01	CH	23,57	23,69	CH ₂	39,76	40,0	CH ₂	22,18	19,94	C _q	3	23,98	CH ₂
4	31,27	31,25	CH ₂	23,57	23,69	CH ₂	135,53	135,5	C _q	27,59	27,71	CH	4	16,30	CH ₂
5	40,73	40,69	CH	40,41	40,7	CH	124,32	124,4	CH	24,92	24,92	CH ₂	1'	106,38	C _q
6	39,07	37,97	C _q	40,35	40,5	C _q	29,36	29,4	CH ₂	38,87	39,17	CH ₂	2',6'	159,09	C _q
7	31,46	31,45	CH ₂	26,96	27,12	CH ₂	34,79	34,8	CH ₂	154,70	154,00	C _q	3',5'	90,43	CH
8	26,36	26,35	CH ₃	26,10	26,18	CH ₃	154,76	154,7	C _q	53,80	53,80	CH	4'	161,69	C _q
9	20,81	20,80	CH ₃	21,83	21,86	CH ₃	48,48	48,5	CH	29,49	29,53	CH ₂	7',9'	55,53	CH ₃
10	23,00	23,01	CH ₃	105,90	106,4	CH ₂	39,96	40,4	CH ₂	35,15	35,44	CH ₂	8'	55,25	CH ₃
11	-	-	-	-	-	-	32,58	33,0	C _q	35,30	35,23	CH	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	22,55	22,6	CH ₃	105,33	105,66	CH ₂	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	30,07	30,1	CH ₃	17,15	17,15	CH ₃	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	16,34	16,3	CH ₃	28,73	28,74	CH ₃	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	111,67	111,6	CH ₂	15,80	15,75	CH ₃	-	-	-

¹LEE, 2002; ²SPECTRA BASE (WILEY), 2021; ³SILVA et al., 2010; ⁴FAURE et al., 1987.

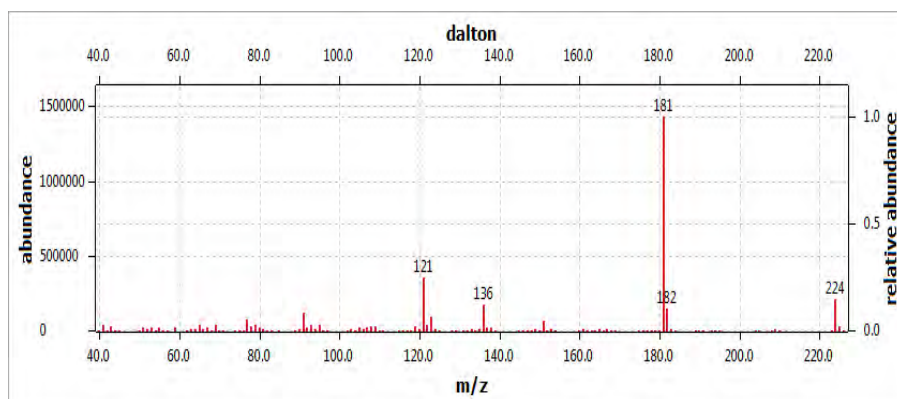


Figura 22. Espectro de massas da substância 2',4',6'-trimetóxiifenil-butano (M32).

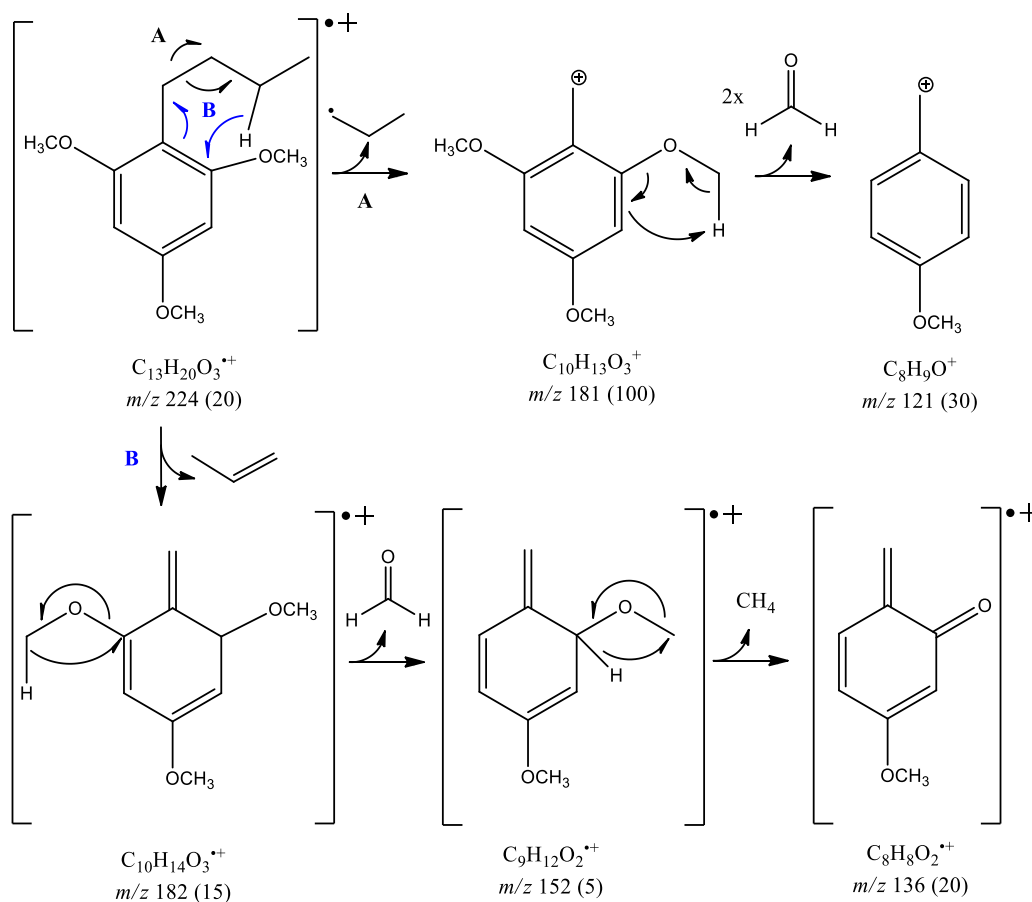


Figura 23. Mecanismo de fragmentação proposto para o 2',4',6'-trimetóxiifenil-butano (M32).

Em relação à literatura científica, como mencionado na Introdução do Capítulo I, outros pesquisadores já investigaram o óleo essencial de folhas de *Myrciaria tenella*. Como esta espécie não é endêmica da Mata Atlântica, estes estudos apresentaram resultados de material coletado em outras áreas do mesmo bioma, como nos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, e em outras regiões do país, como no Rio Grande do Sul e no Pará. Entretanto, os resultados indicaram a composição majoritária de terpenos não-oxigenados, principalmente α - e β -pineno e *E*-cariofileno, diferindo nos teores observados (ANDRADE *et al.*, 2006; SCHNEIDER *et al.*, 2008; APEL *et al.*, 2010; MONTEIRO *et al.*, 2016). Destaca-se, por exemplo, o trabalho de Monteiro *et al.* (2016) com o OEMT de folhas da espécie localizada em outra região da Mata Atlântica do Rio de Janeiro. Os autores também relataram um alto

teor de monoterpenos hidrocarbônicos (47,9%), porém com menor rendimento (0,39%) e um teor de cerca de 50% inferior de sesquiterpenos hidrocarbônicos (15,6%) em relação ao presente estudo.

É importante ressaltar que o presente trabalho investigou pela primeira vez o óleo essencial obtido de espécimes desta planta localizada em região de restinga. Quando comparados as suas composições químicas, a identidade dos componentes majoritários (α - e β -pineno e *E*-cariofileno) não diferiu de acordo com a área ou bioma de coleta, podendo ser utilizados como marcadores químicos para o óleo essencial desta espécie. Porém, outras variações na composição química dos OE desta espécie foram observadas, como os teores e o perfil das demais substâncias encontradas. Estas considerações podem estar correlacionadas a diferentes fatores, como os aspectos edafoclimáticos e também as diferenças metodológicas de extração. De acordo com esta possibilidade, foi realizado um experimento sobre diferentes tempos de destilação, uma das variáveis observadas nestes estudos científicos.

3.2. Avaliação do Tempo de Destilação sobre a Qualidade do OEMT

Em relação aos trabalhos anteriores com óleo essencial de folhas de *M. tenella*, outras diferenças observadas consistiram na metodologia empregada, variando o tipo e o tempo de destilação do material vegetal. Schneider e colaboradores (2008) utilizaram a hidrodestilação por arraste a vapor enquanto os demais autores empregaram a hidrodestilação por coação (imersão em água) como método de extração. Os tempos de destilação nestes trabalhos variaram entre 3 horas (ANDRADE, *et al.*, 2006) e 4 horas (APEL *et al.*, 2010; MONTEIRO *et al.*, 2016). Entre outros fatores, esta variável pode afetar diretamente o rendimento de extração e a composição química do óleo essencial (CAVALCANTI *et al.*, 2015, TOKER *et al.*, 2017). Por esta razão, foi investigado o efeito do tempo de destilação sobre a qualidade do OEMT.

Como esperado, o rendimento de extração do OEMT aumenta de acordo com o tempo de destilação, alcançando cerca de 56% após a primeira hora de extração (Tabela 5). Isto pode ser explicado pelo alto teor de monoterpenos hidrocarbônicos. Além disso, foi observado que o tempo de destilação de 3 horas extraiu mais de 90% do rendimento total do óleo essencial, representando um tempo mínimo de extração e suficiente para obter altos rendimentos de OEMT. Este resultado consiste em um importante parâmetro tecnológico para futuras aplicações pela indústria e uma conseqüente valorização da espécie botânica. Todas estas frações coletadas foram analisadas por CG-DIC e CG-EM, sendo os cromatogramas disponíveis nas Figura 24 e Figura 25.

Tabela 5. Rendimentos de extração (% m/m) de OE de *Myrciaria tenella* de acordo com o tempo de destilação.

Tempo (h)	Rendimento de Extração (% m/m)	Proporção de OE extraído (%)	Proporção Acumulada (%)
1	0,17	56,4	56,4
2	0,08	26,2	82,6
3	0,02	7,6	90,2
4	0,01	4,7	95,0
5	0,01	5,0	100,0

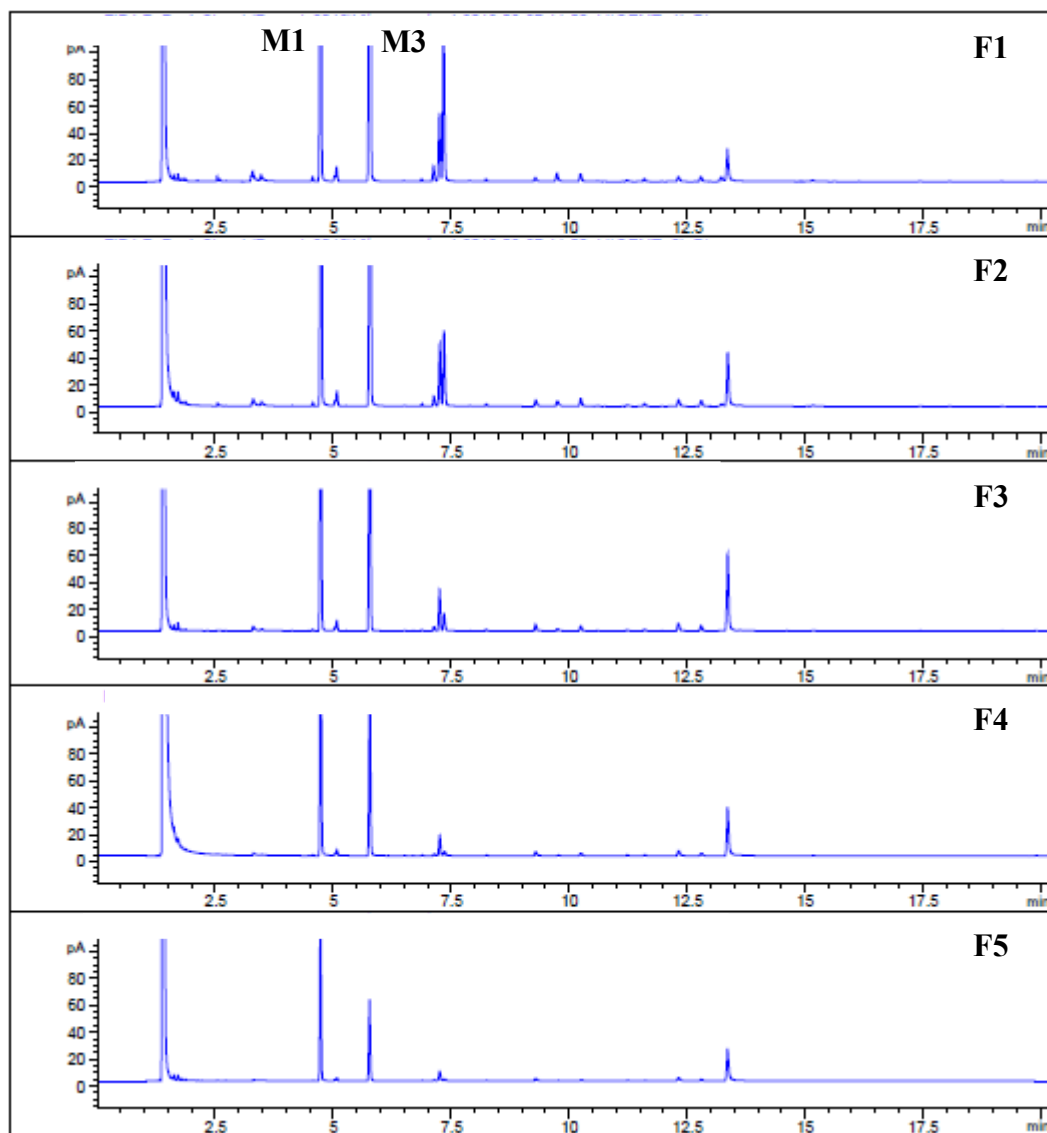


Figura 24. Cromatogramas por CG-DIC das frações coletadas por hidrodestilação das folhas de *M. tenella*, com expansão de 0-20 min e picos identificados do α -pineno (M1) e β -pineno (M3).

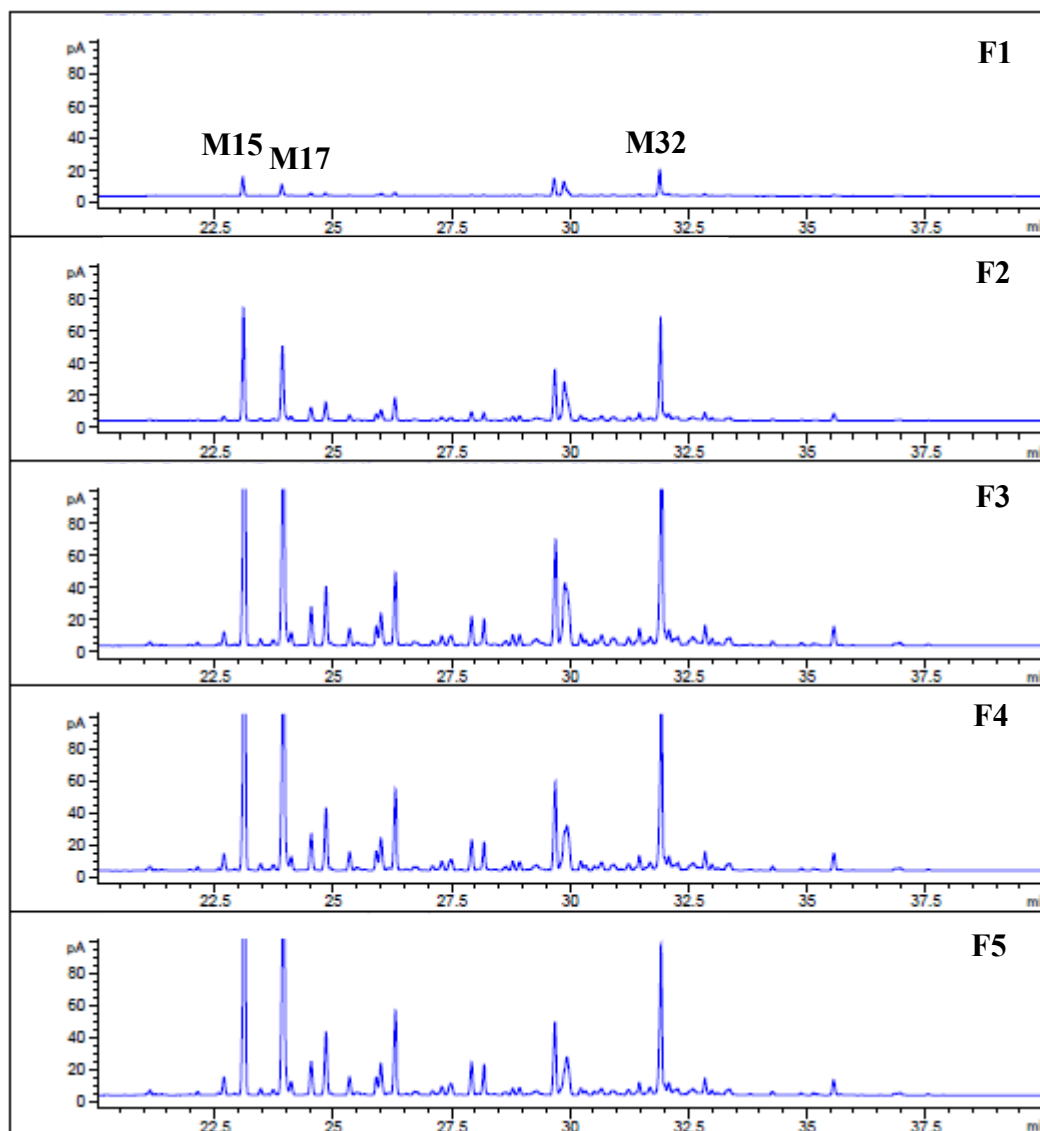


Figura 25. Cromatogramas por CG-DIC das frações coletadas por hidrodestilação das folhas de *M. tenella*, com expansão de 20-40 min e picos identificados do *E*-cariofileno (M15), aromadendreno (M17) e 2',4',6'-trimetóxiifenil-butano (M32).

Para indicar os possíveis efeitos do tempo de destilação sobre o perfil químico do OEMT, foram considerados os teores das cinco substâncias majoritárias (α -pineno, β -pineno, *E*-cariofileno, aromadendreno e 2',4',6'-trimetóxiifenil-butano) e das diferentes subclasses de substâncias voláteis presentes, conforme Tabela 6.

Tabela 6. Efeitos do tempo de destilação nos teores (% m/m) das principais substâncias do OEMT.

Substâncias	OE	F1	F2	F3	F4	F5
α -pineno	19,43 ± 0,05	31,32 ± 0,46 ^a	28,24 ± 0,53 ^b	15,31 ± 0,96 ^c	9,32 ± 0,13 ^d	4,84 ± 0,24 ^e
β -pineno	21,46 ± 0,08	40,49 ± 0,06 ^a	26,80 ± 0,48 ^b	11,20 ± 0,61 ^c	5,88 ± 0,12 ^d	2,82 ± 0,11 ^e
<i>E</i> -cariofileno	10,89 ± 0,06	1,06 ± 0,05 ^a	5,77 ± 0,18 ^b	13,42 ± 0,17 ^c	17,47 ± 0,10 ^d	20,03 ± 0,18 ^e
Aromadendreno	9,17 ± 0,04	0,71 ± 0,03 ^a	4,24 ± 0,22 ^b	10,71 ± 0,16 ^c	15,02 ± 0,05 ^d	18,47 ± 0,14 ^e
2',4',6'-trimetóxilfenil-butano	8,45 ± 0,09	2,01 ± 0,03 ^a	7,88 ± 0,30 ^b	13,86 ± 0,55 ^c	14,54 ± 0,29 ^c	14,57 ± 0,25 ^c
Monoterpenos Hidrocarbônicos	43,39	77,13^a	58,79^b	28,54^c	16,45^d	8,25^e
Monoterpenos Oxigenados	7,68	14,22^a	8,64^b	5,30^c	4,30^d	2,88^e
Sesquiterpenos Hidrocarbônicos	30,29	2,26^a	14,59^b	36,45^c	49,19^d	59,06^e
Sesquiterpenos Oxigenados	9,28	2,93^a	8,51^b	13,88^c	13,79^c	13,32^c
Outros Componentes	9,36	3,47^a	9,47^b	15,83^c	16,27^c	16,14^c

*Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

As Figura 26 e Figura 27 apresentam graficamente as concentrações das substâncias e classes como média e desvio padrão, em que é possível visualizar as diferenças durante o processo extrativo.

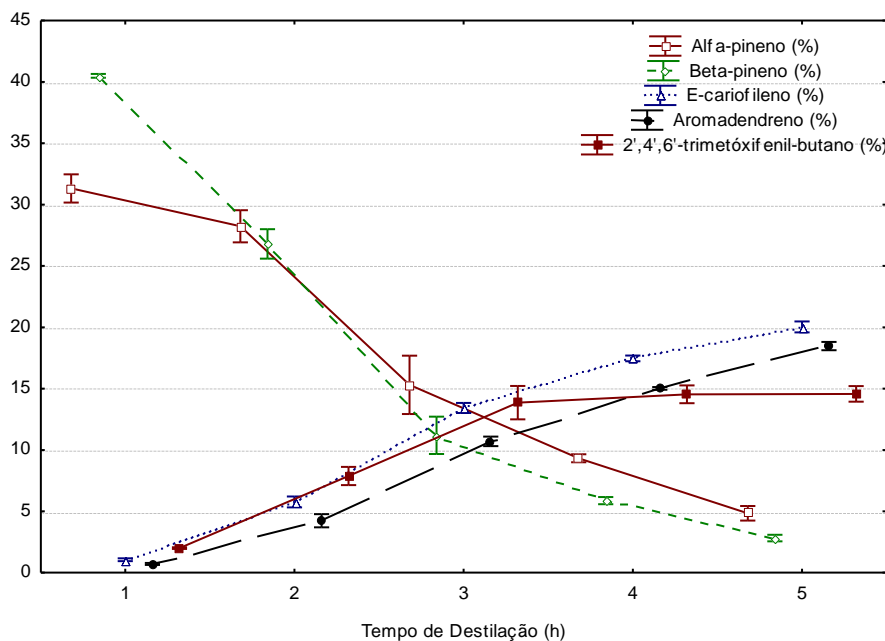


Figura 26. Gráfico de barra de erros com a variação das concentrações das substâncias majoritárias em relação ao tempo de destilação.

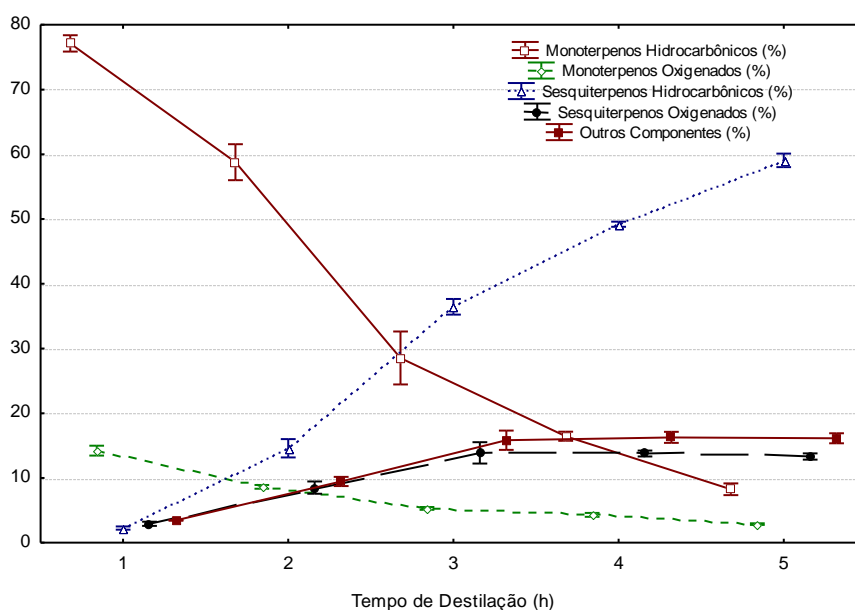


Figura 27. Gráfico de barra de erros com a variação das concentrações das classes de substâncias voláteis em relação ao tempo de destilação.

De acordo com os resultados apresentados nas Figura 26 e Figura 27 e na Tabela 6, o alto teor de monoterpenos hidrocarbônicos e de α - e β -pineno diminui com diferença significativa pelo aumento do tempo de destilação. As maiores porcentagens destas substâncias foram observadas após o menor tempo de destilação (F1 – 1 h), com redução à metade dos valores iniciais após 3 h de extração (F3). É importante ressaltar que α - e β -pineno são monoterpenos amplamente encontrados em óleos essenciais, apresentando importantes atividades biológicas, como ações anticoagulantes, antitumoral, antimicrobiano, antimalárico, antioxidante, anti-inflamatória, entre outros (SALEHI *et al.*, 2019). Logo, altos níveis destes monoterpenos podem contribuir para efeitos positivos do OEMT em ensaios biológicos *in vitro* e/ou *in vivo*. Além disso, estes resultados demonstram que, através do controle do tempo de destilação, é possível obter um OEMT rico em α -pineno/ β -pineno, através do emprego de um menor tempo de destilação.

Em contrapartida, as porcentagens de *E*-cariofileno, aromadendreno e a subclasse de sesquiterpenos hidrocarbônicos (Figura 26 e Figura 27 e Tabela 6) aumentaram estatisticamente durante o processo extrativo, com maiores valores após 3 h de tempo de destilação (F3, F4 e F5). Resultados similares encontrados por Andrade *et al.* (2006) e Apel *et al.* (2010) foram obtidos por hidrodestilação com tempo superior a 3 h e teores elevados de sesquiterpenos hidrocarbônicos, especialmente *E*-cariofileno. Os demais resultados em relação aos teores de sesquiterpenos oxigenados e outros componentes como o 2',4',6'-trimetóxifenil-butano também aumentaram após 3 h de extração (F3, F4 e F5), porém sem diferença significativa até o fim da destilação.

Os resultados são coerentes com o esperado, pois a extração do óleo essencial depende da capacidade de difusão das moléculas voláteis do local original de síntese e/ou armazenamento, através do tecido da planta, até atingir a atmosfera. Por este motivo, quanto maior for o impedimento (como o tamanho da molécula), menor será a difusão e maior será o tempo necessário para a extração (REVERCHON *et al.*, 1995; CAVALCANTI *et al.*, 2015)

Estudos envolvendo a variável tempo de destilação para extração de OE's são importantes e mais comuns nos últimos anos, como os trabalhos de Cavalcanti *et al.* (2015) com folhas de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*) e aroeira-salvo (*S. molle*); de Hennis *et al.* (2016), com folhas e frutos de murta comum (*Myrtus communis*); e de Toker *et*

al. (2017) com orégano selvagem (*Origanum minutiflorum*). Quanto ao OE de folhas de *Myrciaria tenella*, estes resultados são relevantes pois constituem um fator crucial para a produção do OE, podendo minimizar custos de processo e valorizar a espécie nativa da biodiversidade brasileira.

3.3. Avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do OEMT

O óleo essencial de folhas de *M. tenella*, obtido após 5 h de hidrodestilação, apresentou resultados relevantes no trabalho de avaliação biológico, realizado em parceria com o professor Dr. Bruno Guimarães (ICBS-UFRRJ). Estas análises foram executadas e interpretadas pela própria equipe do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Nocicepção (ICBS-UFRRJ). Todos os resultados obtidos foram previamente publicados (GONÇALVES et al., 2021), sendo os principais resultados destacados abaixo:

- Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético: redução em 45% do número de contrações em camundongos suíços a 100 mg.kg⁻¹ de OEMT, em comparação ao grupo controle. O ensaio com controle positivo morfina reduziu em 40%, demonstrando uma atividade antinociceptiva;
- Teste de formalina para resposta contra fase primária (não-inflamatória) e fase secundária (inflamatória): o OEMT apresentou resultado positivo apenas na fase inflamatória da dor, com reduções do tempo do ato de lambe a pata em até 51% (100 mg.kg⁻¹). O controle positivo morfina reduziu este tempo em 43% e 42% nas duas fases enquanto ácido acetilsalicílico apresentou diminuição de 39% na fase secundária;
- Teste de campo aberto para comportamento locomotor: o OEMT não interferiu na atividade motora dos camundongos;
- Teste de edema de pata induzido por carragenina: o OEMT nas concentrações de 50 e 100 mg.kg⁻¹ reduziu as áreas de edema em 56% e 89%. O controle positivo dexametasona reduzir a área em 70%;
- Teste de Von Frey para mediadores inflamatórios: o OEMT na dose de 100 mg.kg⁻¹ aumentou o limiar mecânico, com redução significativa das concentrações de mediadores pró-inflamatórios como IL-6, IL-1 β , TNF- α e PGE₂, e aumento do mediador anti-inflamatório IL-10;
- Determinação indireta *in vitro* de citocinas e óxido nítrico: o efeito inibitório do OEMT foi observado em macrófagos monócitos de camundongos, com redução da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e de óxido nítrico (NO);
- Avaliação citotóxica *in vitro*: o OEMT não causou a morte das linhagens celulares estudadas, confirmando a inibição da produção das citocinas e NO e a segurança em relação a macrófagos e fibroblastos, células importantes para os processos de inflamação e reparo tecidual;
- Ensaio *in vitro* de inibição das enzimas COX: a atividade das enzimas COX-1 e COX-2 foram inibidas por OEMT, confirmando o efeito na redução das prostaglandinas PGE₂ nas patas, o aumento do limiar mecânico no modelo de Von Frey e a redução do edema induzido pela carragenina.

Estes resultados demonstraram a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do OEMT, sendo induzida a resposta nociceptiva por estímulos químicos e mecânicos e evidências significativas do controle dos processos inflamatórios.

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *M. tenella* foi pela primeira vez obtido e caracterizado, a partir de espécimes de uma área de restinga, apresentando composição majoritária de substâncias voláteis não-oxigenadas como monoterpenos (como α - e β -pineno) e sesquiterpenos (principalmente *E*-cariofileno e aromadendreno). Além disso, o uso de Ressonância Magnética Nuclear como técnica auxiliar neste estudo contribuiu para a identificação da estrutura de um derivado trimetóxfenílico, provavelmente oriundo da biossíntese de policetídeos aromáticos. Os sinais referentes aos núcleos de hidrogênio e carbono pertencentes à grupos metoxilas e à padrões específicos de substituição do anel aromático, aliado a ausência de grupo carbonílico, contribuiu para a proposta do 2',4',6'-trimetóxfenilbutano, diferindo da proposta por comparação com a biblioteca.

O estudo quanto a metodologia de extração confirmou a variação na composição química do óleo essencial, diferindo, de acordo com o tempo de destilação e por análise estatística, principalmente as concentrações dos constituintes majoritários: α - e β -pineno, *E*-cariofileno, aromadendreno e das classes de monoterpenos e sesquiterpenos hidrocarbônicos. O emprego de 2 h de extração é suficiente para obtenção de OEMT de alto rendimento e rico em α - e β -pineno enquanto maior tempo de destilação possibilitam a obtenção de um óleo com maior teor de sesquiterpenos.

A colaboração com outros grupos de pesquisa foi uma decisão acertada para uma maior valorização do OEMT. Os resultados obtidos na avaliação anti-inflamatória e antinociceptiva foram promissoras, com excelentes respostas mecânicas (redução de contração e preservação do comportamento locomotor) e químicas (inibição *in vivo* e *in vitro* da produção de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, de NO e da prostaglandina PGE₂ e aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10), ausência de citotoxicidade e inibição das enzimas COX.

Todos estes resultados corroboram na possibilidade de uso futuro do óleo essencial das folhas de *M. tenella*, sendo importante para a valorização, uma exploração econômica inicial e a consequente preservação de uma espécie nativa da nossa biodiversidade brasileira e ainda pouco conhecida pela nossa sociedade.

CAPÍTULO II

**DESREPLICAÇÃO DE PRODUTOS
NATURAIS EM FOLHAS DE
Eugenia copacabanensis e *Myrciaria tenella***

RESUMO

As espécies *Eugenia copacabanensis* e *Myrciaria tenella* (Myrtaceae) são plantas brasileiras nativas, que são encontradas em áreas da Mata Atlântica como na Restinga da Marambaia (RJ). Entretanto, poucas informações sobre as suas composições químicas e os seus potenciais biológicos estão disponíveis na literatura científica. O objetivo deste estudo foi empregar a desreplicação por CG-EM, CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM para a identificação de substâncias em extratos e partições de folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella*, incluindo também o isolamento de metabólitos e a avaliação do seu potencial biológico. Para o experimental, foram preparados extratos metanólicos por maceração estática de folhas de cada espécie e, após, realizadas etapas de partição em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. A partição hexânica foi fracionada em coluna de sílica gel, com as frações submetidas a uma análise não-direcionada por CG-EM e análise de carotenoides por CLAE-DAD. As demais partições foram avaliadas em sistemas CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM em análises direcionadas para substâncias fenólicas. Em seguida, alguns metabólitos foram isolados em colunas de sílica gel e/ou Sephadex, com a proposta de estruturas químicas pelas técnicas analíticas de RMN de ^1H e ^{13}C e IES-QTdV-EM. O potencial antioxidante das partições foi determinado pelo modelo de *Saccharomyces cerevisiae* em um trabalho em parceria com o Laboratório de Estresse Oxidativo em Microrganismos (IQ/UFRRJ). A atividade acaricida contra carrapatos *Rhipicephalus microplus* da fração rica no sesquiterpeno 2-metóxi-clovan-9-ol, obtido das folhas de *E. copacabanensis* foi determinado no Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP/UFJF). Todo o estudo fitoquímico conduziu a identificação de 104 metabólitos diferentes. Para a espécie *E. copacabanensis*, foram identificados um total de 78 substâncias, com 67 relatados pela primeira vez para a espécie, incluindo sesquiterpenos, carotenoides, ácidos fenólicos, derivados catequínicos, taninos hidrolisáveis e flavonóis derivados de quercetina e kaempferol. Entre as substâncias relatadas principalmente para a partição em acetato de etila, podemos destacar o ácido 3-*O*-cafeoilquínico – ácido clorogênico, o galato de metila, a quercetina 3-*O*-rhamnosídeo – quercitrina, a procianidina tipo B e seus derivados, os isômeros de strictinina e tellimagrandina I. O sesquiterpeno 2-metóxi-clovan-9-ol foi isolado a partir da partição hexânica das folhas de *E. copacabanensis*, com elucidação estrutural confirmada através do seu derivado acetilado. Em relação as partições do extrato de folhas de *M. tenella*, 64 substâncias foram identificadas, com 53 metabólitos sendo relatadas pela primeira vez para a espécie, como sesquiterpenos, carotenoides e ácidos fenólicos. O ácido elágico e seus derivados, como o ácido 3,3'-*O*-dimetil elágico, e os flavonóis quercetina 3-*O*-galoil-galactosídeo, quercetina 3-*O*-galoil-glicosídeo, hiperosídeo e isoquercitrina foram observadas majoritariamente para a espécie *M. tenella*. Além disso, foi isolado também o derivado aromático conglomerona. Quanto ao potencial biológico, os resultados *in vivo* demonstraram que as partições em acetato de etila e butanol das duas espécies possuem expressiva proteção antioxidante nas linhagens de *S. cerevisiae* BY4741 e Δgsh1 , com alto impacto nas células deficientes de glutatona. Além disso, o sesquiterpeno 2-metóxi-clovan-9-ol apresentou importante atividade acaricida no ciclo reprodutivo dos carrapatos *R. microplus*. Este estudo fitoquímico contribuiu positivamente para o conhecimento da composição química e potencial biológico de duas espécies pouco conhecidas da família Myrtaceae.

Palavras-chave: *Myrciaria tenella*, *Eugenia copacabanensis*, desreplicação.

ABSTRACT

The species *Eugenia copacabanensis* and *Myrciaria tenella* (Myrtaceae) are native Brazilian plants, which are found in areas of the Atlantic Forest such as Restinga da Marambaia (RJ). However, little information about their chemical composition and biological potential is available in the scientific literature. The aim of this study was to use the dereplication by GC-MS, HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS to identify substances in the extracts and partitions of *E. copacabanensis* and *M. tenella* leaves, also including the isolation of different metabolites and the evaluation of their biological potential. For this experimental, methanol extracts were prepared by static maceration from leaves of each species, and, after, the partition steps were performed in hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol. The hexane partition was fractionated on a silica gel column, with the fractions submitted to untargeted analysis by GC-MS and carotenoid analysis by HPLC-DAD. The other partitions were evaluated by HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS in targeted analyzes for phenolic substances. Then, some metabolites were isolated on silica gel and/or Sephadex columns, with structural elucidation by the analytical techniques, ^1H and ^{13}C NMR and ESI-QToF-MS. The antioxidant potential of the partitions was determined by the *Saccharomyces cerevisiae* model in partnership with the Laboratório de Estresse Oxidativo em Microrganismos (IQ/UFRRJ). The acaricidal activity against *Rhipicephalus microplus* ticks of the fraction rich in sesquiterpenes 2-methoxy-clovan-9-ol, from *E. copacabanensis* leaves, was determined at the Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP/UFJF). All phytochemical study led to the identification of 104 different metabolites. For the *E. copacabanensis* leaves, a total of 78 substances were identified, with 67 reported for the first time for this species, including sesquiterpenes, carotenoids, phenolic acids, catechin derivatives, hydrolyzable tannins and flavonols quercetin and kaempferol derivatives. Among the substances reported mainly for the partition in ethyl acetate, the main metabolites were 3-*O*-caffeoylquinic acid – chlorogenic acid, methyl gallate, quercetin 3-*O*-rhamnoside – quercitrin, procyanidin type B and its derivatives, the isomers of strictinin and tellimagrandin I. The sesquiterpene 2-methoxy-clovan-9-ol was isolated from the hexane partition of *E. copacabanensis* leaves, with the structural elucidation confirmed through its acetyl derivative. Regarding the partitions of *M. tenella* leaves extract, 64 substances were identified, with 53 metabolites being reported for the first time for this species, such as sesquiterpenes, carotenoids and phenolic acids. Ellagic acid and its derivatives, such as 3,3'-*O*-dimethyl ellagic acid, and flavonols quercetin 3-*O*-galoyl-galactoside, quercetin 3-*O*-galoyl-glycoside, hyperoside and isoquercitrin were mostly observed for the species *M. tenella*. Furthermore, the aromatic derivative conglomerone was also isolated. As for the biological potential, *in vivo* results revealed that the partitions in ethyl acetate and butanol of the two species showed expressive antioxidant protection in BY4741 and *Agsh1* strains of *S. cerevisiae*, with greater impact on glutathione-deficient cells. Furthermore, the sesquiterpene 2-methoxy-clovan-9-ol showed important acaricide activity against the reproductive cycle of *R. microplus* ticks. This phytochemical study positively contributed to the knowledge of the chemical composition and biological potential of two unknown species of the Myrtaceae family.

Keywords: *Myrciaria tenella*, *Eugenia copacabanensis*, dereplication.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta grande destaque mundial devido a sua biodiversidade, em que muitas espécies botânicas se encontram sob risco de extinção por ações antrópicas e sem o devido conhecimento fitoquímico. Neste contexto, como já mencionado anteriormente, a família Myrtaceae e sua elevada representatividade dentro da flora brasileira recebem grande atenção das pesquisas em Química de Produtos Naturais.

Além da espécie *Myrciaria tenella*, outra espécie ainda pouco conhecida é a *Eugenia copacabanensis*, que, embora com limitadas informações científicas, faz parte de um dos gêneros mais representativos, com cerca de 350 espécies em território brasileiro (DE SOUZA et al., 2018; FORZZA et al., 2010). Quanto à espécie, esta é popularmente conhecida como “bapuana” ou “princesinha-de-Copacabana”, devido a sua descoberta no final do século XIX nas areias da praia do famoso bairro carioca (ARRUDA & VICTÓRIO, 2011; PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO (RJ), 2020). Atualmente, a planta, que é considerada símbolo do bairro de Copacabana, é encontrada apenas em áreas de restingas do estado do Rio de Janeiro, como a Restinga da Marambaia (Rio de Janeiro – RJ), sendo considerada endêmica do bioma Mata Atlântica (SOUZA & MORIM, 2008; FORZZA et al., 2010).

A espécie constitui-se como um arbusto de 4-6 metros de altura, com folhas lanceoladas e brilhantes e frutos globosos de coloração amarelo-alaranjado quando maduros e muito apreciados pelo sabor adocicado (SOUZA & MORIM, 2008; LORENZI, 2015). Por esta razão, mesmo com ocorrência restrita, a planta é empregada ocasionalmente para ornamentação por colecionadores e consumo dos frutos *in natura* ou na forma de sucos (JUNIOR et al., 2014; LORENZI, 2015). A Figura 28 apresenta registros fotográficos da espécie *E. copacabanensis*.

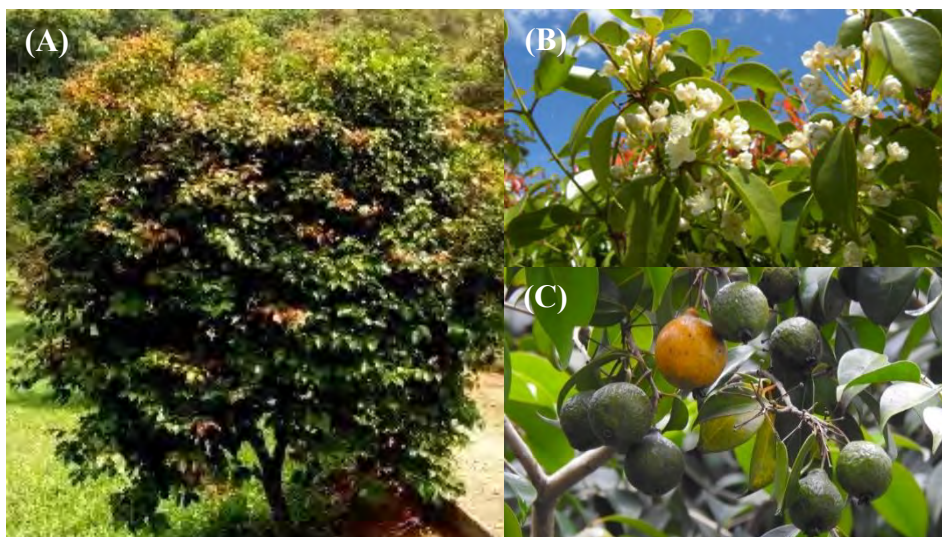


Figura 28. Ilustrações fotográficas da espécie *E. copacabanensis*: (A) árvore adulta ; (B) galhos com folhas e flores; e (C) galho com frutos em período de maturação (AMIGOS JB, 2015; COLECIONANDO FRUTAS, 2021; E-JARDIM.COM, 2021).

Quanto ao conhecimento fitoquímico, poucos estudos científicos já foram relatados. A obtenção do óleo essencial das folhas de *E. copacabanensis* foi investigada por Nakamura et al. (2010), com a extração de um óleo com composição majoritária de sesquiterpenos oxigenados, e posteriormente com folhas da Restinga da Marambaia por Arruda & Victório (2011), em que foram observadas as estruturas secretoras nas folhas e um óleo rico em α - e β -pineno. O grupo de pesquisa do LQPN-UFRJ foi o primeiro grupo a estudar a composição química das folhas desta planta. Foram identificadas 20 substâncias, como os sesquiterpenos

clovandiol, globulol e viridiflorol, os triterpenos α - e β -amirina, ácido ursólico, ácido 30-hidróxi-ursólico, betulina, friedelina, friedelina-3-4-lactona e taraxerol, os esteroides β -sitosterol e β -sitosterol glicosídeo, os flavonoides kaempferol 3-O- β -D-rhamnosídeo, quercetina 3-O- α -L-arabinosídeo e quercetina, e os cumaratos de octacosanila, heptacosanila, hexacosanila e tetracosanila (JUNIOR et al., 2014).

Este estudo foi desenvolvido a partir da perspectiva da fitoquímica clássica, com o fracionamento e isolamento de metabólitos por cromatografia em coluna aberta a partir do extrato bruto de partes da planta. As etapas posteriores consistem na elucidação estrutural por métodos físicos de análise orgânica, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a espectroscopia na região do infravermelho e na região do ultravioleta (BRAZ-FILHO, 1994). Uma tendência observada nos últimos anos é o emprego da estratégia de desrepliação nos estudos da área de Química de Produtos Naturais.

O conceito “desrepliação” foi mencionado pela primeira vez em 1978, por HANKA e colaboradores, no capítulo “*Detection and Assay of Antitumor Antibiotics*”, no livro “*Recent Results in Cancer Research*” (Editora Springer). Este termo está relacionado com a identificação de substâncias já conhecidas nos estágios iniciais da investigação fitoquímica e a maior ênfase na descoberta de novas moléculas, ainda não elucidadas estruturalmente e principalmente com atividade biológica. Entre os pontos positivos estão a economia de amostra e de solventes, a diminuição das etapas de purificação e o menor tempo gasto com isolamento de substâncias conhecidas em detrimento as desconhecidas (GAUDÊNCIO & PEREIRA, 2015; BERLINCK et al., 2017; HUBERT et al., 2017).

Estes estudos de desrepliação em Química de Produtos Naturais começaram a ganhar destaques a partir do final da década de 90, através principalmente do desenvolvimento tecnologias de sistemas hifenados ou *off-line* de maior sensibilidade e seletividade, como a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) ou acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-EM-EM) e Ressonância Magnética Nuclear (CLAE-EM-RMN), entre outros. Outros aspectos também foram importantes como, por exemplo, os processos de triagem biológica, as informações taxonômicas e os avanços em novas bases de dados espectrais e em métodos computacionais e estatísticos (GAUDÊNCIO & PEREIRA, 2015).

Entre as possíveis estratégias metodológicas, destacam-se a análise não-direcionada de frações de um extrato bruto e a comparação com bases de dados, a análise direcionada de substâncias ou classes de metabólitos em extratos e/ou frações do extrato bruto e a análise metabolômica direta de uma coleção de extratos e reconhecimento de padrões através de testes estatísticos (HUBERT et al., 2017).

O capítulo II desta tese teve como objetivo geral empregar a desrepliação pelas técnicas de CG-EM, CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM para a identificação dos metabólitos secundários de extratos e partições de folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella*, coletadas na Restinga da Marambaia (Rio de Janeiro – RJ). Adicionalmente, foram fracionados por cromatografia clássica e obtidas substâncias isoladas ou em mistura. Os trabalhos em parceria contribuíram para o estudo da atividade antioxidante das partições em modelo de *Saccharomyces cerevisiae* e para a avaliação da atividade acaricida de um sesquiterpeno isolado das folhas de *E. copacabanensis*, inédito para a família Myrtaceae.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais e Equipamentos

Para o preparo dos extratos e frações, foram empregados solventes metanol, n-hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (Neon[®], Brasil); sílica gel, com tamanho dos poros e de partículas, respectivamente, de 60 Å e 70-230 mesh (Merck[®], Alemanha), Sephadex[®] LH-20 (Sigma-Aldrich, EUA) e placas de alumínio para cromatografia em camada delgada TLC 60 F254 Merck[®] (Supelco, Alemanha); iodo ressublimado, vanilina (Proquimios, Brasil) e difenilborato de aminoetanol (Aldrich, EUA); etanol e ácido sulfúrico grau P.A. (Tedia[®], Brasil). Os principais equipamentos utilizados foram balança analítica Shimadzu (Japão) modelo ATY224, evaporador rotativo Fisatom (Brasil) modelo 801, banho de ultrassom, capacidade 3 L, Q 3.0/40 Eco-Sonics (Brasil) e câmara de irradiação ultravioleta com comprimento de onda 254 e 365 nm. Entre as vidrarias empregadas, destacam-se funis de separação de 500 mL e 1,0 L, colunas de vidro de diferentes alturas e diâmetros e frascos de vidro incolor e do tipo âmbar de 10 mL.

Os solventes utilizados nas análises instrumentais foram clorofórmio deuterado (CDCl₃), benzeno deuterado (C₆D₆) e tetrametilsilano (Tedia, EUA); acetonitrila, metanol e acetato de etila, todos grau HPLC, e ácido fosfórico e ácido fórmico grau P.A. (Tedia, EUA). A água purificada foi obtida através de sistema Milli-Q[®] Gradient 10A Millipore[®] e Elix[®]/RiOs™ 5 systems (EUA). As especificações dos equipamentos de instrumentação analítica serão mencionadas nos subtópicos de caracterização química das amostras.

2.2. Coleta do Material Vegetal

Assim como no Capítulo I, as folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella* também foram coletadas na Restinga da Marambaia (23°02'11.7" S, 43°37'14.6" W), em área localizada no município do Rio de Janeiro (RJ), entre o horário de 9 e 10 h da manhã, no mês de março de 2018. Para as espécies, foram depositadas, respectivamente, exsiccatas RBR11564 e RBR12552 no Herbário do ICBS-UFRRJ.

2.3. Desrepliação das Frações do Extrato Metanólico de Folhas de Myrtaceae spp.

2.3.1. Construção de banco de dados para os gêneros *Eugenia* e *Myrciaria*

A desrepliação das substâncias presentes nas folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella* foi realizada principalmente através dos dados por espectrometria de massas. Como estratégia de identificação, foi construída inicialmente uma biblioteca local com as substâncias já identificadas em cada gênero. Foi realizado um levantamento bibliográfico nas bases de dados Periódicos Capes e Science Direct durante o primeiro semestre de 2019, resultando num alcance de 218 e 75 artigos, respectivamente para os gêneros *Eugenia* e *Myrciaria*, desde o ano de 1968. No banco de dados criado em Excel (Microsoft, EUA), foram incluídas 274 e 160 substâncias para os gêneros *Eugenia* e *Myrciaria*, sendo calculados os valores teóricos de massa/carga dos íons possivelmente detectados ([M + H]⁺, [M - H]⁻, [M + Na]⁺ e [M + Cl]⁻).

Os dados espectrométricos das substâncias detectadas foram comparados à biblioteca construída e aos bancos de dados gratuitos online PubChem, *Global Natural Product Social - GNPS*, a base de dados do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia – NuBBE *database* e o *MassBank of North America - MoNA*. Para os constituintes das frações hexânicas, empregaram-se, também, as bases de dados do software NIST versão 11 e da

biblioteca Adams 4ª edição, similar ao Capítulo I, devido à polaridade e proximidade estrutural das substâncias detectadas.

2.3.2. Preparo e partição dos extratos brutos de folhas de *Myrtaceae spp.*

Inicialmente, as folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella* foram secas à temperatura ambiente e em local protegido da luz solar por 7 dias. Após a secagem, as folhas foram moídas em moinho de facas tipo *willey* usando peneira de 2 mm, localizado no Departamento de Nutrição Animal e Pastagens do Instituto de Zootecnia (IZ-UFRRJ). A Figura 29 consiste no registro fotográfico das folhas secas e trituradas das duas espécies.



Figura 29. Material vegetal de *Myrtaceae spp.* após o pré-tratamento para obtenção dos extratos brutos.

Em seguida, no Laboratório LQPN (IQ-UFRRJ), as extrações foram executadas paralelamente com solvente metanol pelo método clássico de maceração estática e exaustiva à temperatura ambiente. O processo extrativo foi executado de modo que semanalmente fosse realizada a filtração do solvente extrator e a concentração do extrato em evaporador rotativo sob pressão reduzida. O solvente recuperado foi reutilizado para nova etapa de extração com o material anterior da mesma espécie botânica. Para a determinação da exaustão e consequente finalização deste processo, procedeu-se periodicamente a avaliação qualitativa do extrato recolhido através da coloração obtida e de cromatografia em camada delgada (CCD) e revelação em câmara de ultravioleta (254 nm) e com reagente químico iodo (I_2). Por fim, os extratos concentrados foram secos à temperatura ambiente.

O Extrato bruto de Folhas de *E. copacabanensis* foi codificado pela sigla **EFEC**, em que foram empregadas cerca de 1,4 kg de folhas secas, divididos em 2 recipientes e adicionados 1,7 L de metanol, resultando, após cerca de 10 semanas, em uma massa de extrato bruto de 752,2 g (rendimento de 54%). Este extrato não foi obtido totalmente seco. Em seguida, foi realizada a solubilização de cerca de 50 g de EFEC em 300 mL de uma solução contendo metanol/água (8:2, v/v) e repetidas etapas de partição líquido/líquido com cerca de 200 mL de diferentes solventes em grau crescente de polaridade, conforme a Figura 30. Todo o processo de fracionamento foi repetido quatro vezes, totalizando o uso de 200 g de EFEC. Após a concentração em rotaevaporador rotativo e secagem à temperatura ambiente, esta etapa resultou nas frações em **Hexano (EFEC-H)** com massa de 10,8 g (5,4%); em **Diclorometano (EFEC-D)**, 19,0 g (9,5%); em **Acetato de etila (EFEC-Ac)**, 96,1 g (48,1%); e em **Butanol (EFEC-Bu)**, 39,0 g (19,5).

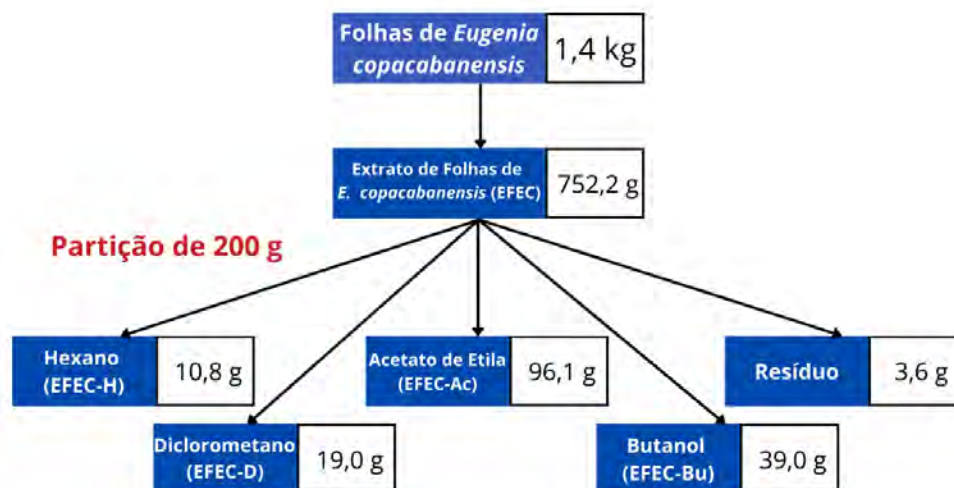


Figura 30. Esquema ilustrativo sobre o preparo do extrato bruto e suas partições a partir de folhas de *E. copacabanensis* (EFEC).

O Extrato bruto de Folhas de *M. tenella*, codificado pela sigla EFMT, foi preparado de maneira similar, com cerca de 700 g de folhas secas, um volume de metanol de 1,4 L e um extrato bruto seco de 81,37 g (rendimento de 11,6%), após 8 semanas de extração. A partição líquido/líquido foi realizada com a solubilização de cerca de 70 g de EFMT em 700 mL de uma solução contendo metanol/água (8:2, v/v), resultando nas frações em Hexano (EFMT-H) com massa de 15,1 g (21,6%); em Diclorometano (EFMT-D), 18,7 g (26,7%); em Acetato de etila (EFMT-Ac), 13,2 g (18,8%); e em Butanol (EFMT-Bu), 12,2 g (17,4%), conforme a Figura 31.

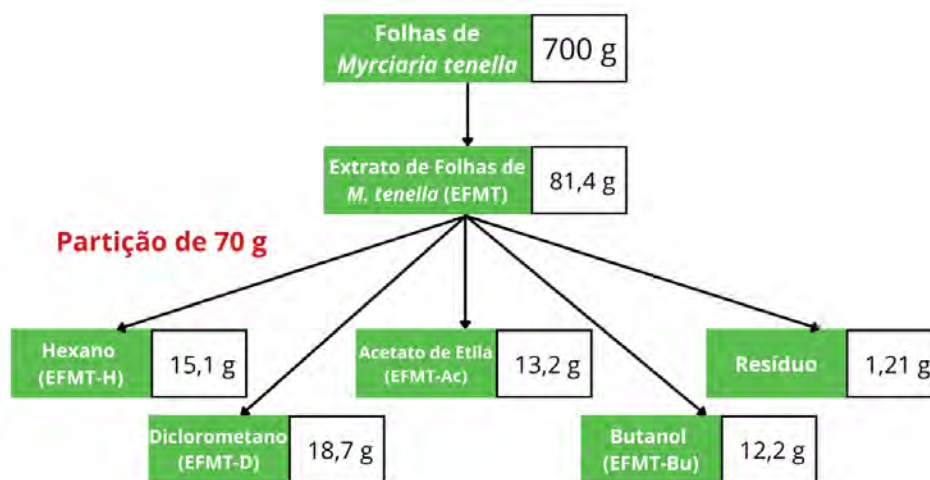


Figura 31. Esquema ilustrativo sobre o preparo do extrato bruto e suas partições a partir de folhas de *M. tenella* (EFMT).

Todas as frações obtidas para as duas espécies foram separadas para etapas de fracionamento em colunas cromatográficas e caracterização química e avaliações biológicas.

2.3.3. Fracionamento em coluna de sílica gel das partições EFEC-H e EFMT-H

Previamente às análises por CG-EM, procedeu-se a purificação de 10 g de cada fração hexânica em cromatografia em coluna aberta de sílica gel (60 Å, 70-230 mesh, 200 g, 80 cm altura x 5 cm de diâmetro), a partir do preparo inicial de pastilha com 15 g de sílica gel. Foram empregadas como fases móveis misturas binárias de 100 mL de solventes com

gradiente crescente de polaridade (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol), variando em 10% a proporção de cada constituinte. Foram coletadas cerca de 100 mL para cada fração em frascos do tipo Erlenmeyer e concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Após esta etapa, todas as frações foram analisadas por CCD de sílica gel, empregando fase móvel conforme eluição em coluna e revelação com radiação ultravioleta (254 nm) e vanilina sulfúrica seguido de aquecimento. No total, foram recolhidas para **EFEC-H** 86 frações, resultando em 21 frações agrupadas. O processo de fracionamento da partição **EFMT-H** resultou em 69 frações, com um total de 28 frações agrupadas.

2.3.4. Análises por CG-EM das frações de EFEC-H e EFMT-H

Na Central Analítica (IQ-UFRRJ), cerca de 2 mg de cada fração obtida foi solubilizada em 1 mL de diclorometano e injetada em modo split (1:20) em um cromatógrafo à gás Shimadzu[®] (Japão) modelo QP2010 Plus equipado com detector de espectrometria de massas e coluna capilar Agilent[®] (EUA) modelo HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; fase estacionária 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano). As condições cromatográficas incluíram gás hélio (99,9%) como gás de arraste e com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹; e programação de temperatura do forno de 60-290°C com rampa de 5°C.min⁻¹. Para o detector, foi empregada na fonte de ionização por impacto de elétrons energia de 70 eV e temperatura de 250°C. As substâncias detectadas foram identificadas através de comparação dos espectros de massas com bibliotecas disponíveis (Adams 4ª edição e NIST versão 11), respeitando um grau mínimo de similaridade de 85%. Cada substância identificada no capítulo II foi relacionada a um código em negrito (**número cardinal correspondente**).

2.3.5. Análise por CLAE-DAD e por CLAE-DAD-EM das frações mais polares de EFEC e EFMT

Todas as frações mais polares, exceto **EFEC-H** e **EFMT-H**, foram analisadas na Embrapa Agroindústria de Alimentos em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters[®] Alliance e2695 acoplado com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), empregando duas colunas cromatográficas BDS Hypersil C₁₈ Thermo Scientific (50 mm x 4,6 mm; 100 mm x 4,6 mm; ambos com 2,4 µm) e fase móvel em gradiente de eluição de solução aquosa de ácido fosfórico a 0,15% (v/v) (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B), de acordo com metodologia de Santiago et al. (2018) com adaptações (Tabela 7). Os demais parâmetros foram temperatura da coluna de 40°C, volume de injeção de 5 µL, fluxo de 1,2 mL.min⁻¹ e tempo de corrida de 30 min. A faixa de detecção foi ajustada para 200 a 600 nm.

Tabela 7. Gradiente de eluição para o método por CLAE-DAD para substâncias fenólicas (SANTIAGO et al., 2018).

Tempo (min)	Fase A (% v/v)	Fase B (% v/v)
0,00	95,0	5,0
6,00	95,0	5,0
8,00	88,0	12,0
12,00	88,0	12,0
18,00	80,0	20,0
22,00	70,0	30,0
23,00	40,0	60,0
25,00	40,0	60,0
26,00	95,0	5,0
30,00	95,0	5,0

Para a identificação dos analitos, procedeu-se a prévia injeção no mesmo sistema CLAE-DAD de 53 padrões analíticos de substâncias fenólicas (derivados de ácidos benzoicos e de ácidos cinâmicos, flavan-3-ols, flavonóis, flavanonas e flavonas) disponíveis no Laboratório de Cromatografia Líquida, da Embrapa Agroindústria de Alimentos, ou ainda cedidos pela professora Dra. Rosane N. Castro (IQ/UFRRJ). Após esta etapa, foi possível proceder a identificação dos ácidos fenólicos e flavonoides presentes nas frações de *E. copacabanensis* e *M. tenella* através de comparação dos tempos de retenção e espectro na região do UV/Visível.

Outra análise com as mesmas frações foi realizada em um sistema LCMS-2020 Shimadzu, disponível no IQ-UFRRJ, contendo um cromatógrafo a líquido ultra rápido (*Ultra Fast Liquid Chromatography – UFLC*) acoplado a um detector de arranjo de diodos e a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo. As mesmas condições cromatográficas anteriores foram empregadas, com as adaptações sendo a coluna Kromasil® 100-5-C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) e as fases móveis solução aquosa de ácido fórmico a 1% (v/v) e solução de acetonitrila contendo ácido fórmico a 1% (v/v). Os dados obtidos, como os espectros de UV/Visível e de massas e a ordem de eluição, possibilitaram a confirmação das substâncias já identificadas e a sugestão da presença de outras substâncias fenólicas.

2.4. Quantificação de Substâncias Bioativas em Folhas de *Myrtaceae spp.*

2.4.1. Análise de carotenoides por CLAE-DAD

Devido a função metabólica, a presença de carotenoides nas folhas das espécies de *E. copacabanensis* e *M. tenella* era algo previamente esperado, sendo confirmado a partir da visualização de coloração amarelo ao vermelho nas primeiras frações obtidas em colunas de sílica gel das partições hexânicas (EFEC-H e EFMT-H). Por tal motivo, foi realizado o método de extração e de caracterização de carotenoides diretamente das folhas das duas espécies, ao qual o Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos possui certificação pelo INMETRO para análise de carotenoides, de acordo com a ISO/IEC 17025:2005.

A extração foi realizada em triplicata através do método de Rodriguez-Amaya (2001), que consistiu na maceração do material vegetal com celite e acetona e a filtração à vácuo em frasco do tipo Kitassato. O processo foi repetido com o material sólido até que o solvente extrator não apresentasse coloração característico de carotenoides. Procedeu-se a partição da fração orgânica com éter de petróleo e lavagem com água Milli-Q e a transferência para balão volumétrico. Após a etapa de extração, foi realizada uma etapa de hidrólise de 5 mL do extrato etéreo com 5 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio a 10% (m/v) por 16 h na ausência de luz. Todo o volume do frasco foi particionado com água Milli-Q e em seguida foi medido o volume de fração saponificada.

Todas as amostras, incluindo as frações das partições hexânicas, foram analisadas através do método de Pacheco *et al.* (2014), em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters® W600, coluna C₃₀ YMC Carotenoid S-3 (250 mm x 4.6 mm x 3 µm), gradiente de eluição de metanol (fase móvel A) e éter metil *terc*-butílico (fase móvel B), conforme a Tabela 8, e detector de arranjo de fotodiodos Waters® modelo 996, com varredura de 300 a 500 nm. Os demais parâmetros cromatográficos foram temperatura da coluna de 33°C, volume de injeção de 15 µL, fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ e tempo de corrida de 28 min.

As concentrações totais de carotenoides nas folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella* foram mensuradas através de leituras em espectrofotômetro Shimadzu® (Japão) UV-1800 em 450 nm e do cálculo com a Equação 5

Erro! Fonte de referência não encontrada..

Tabela 8. Gradiente de eluição para o método por CLAE-DAD para carotenoides (PACHECO *et al.*, 2014).

Tempo (min)	Fase A (% v/v)	Fase B (% v/v)
0,00	80,0	20,0
0,50	75,0	25,0
15,00	15,0	85,0
15,05	10,0	90,0
16,50	10,0	90,0
16,55	80,0	20,0
28,00	80,0	20,0

$$\text{Concentração } (\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/g}) = \frac{\text{Abs}_{450\text{ nm}} * v \text{ (mL)} * 10^4}{2592 * b \text{ (cm)} * m \text{ (g)}}$$

Equação 5. Cálculo de teor de carotenoides totais, a partir da Lei de Lambert-Beer, em que 2592 é o coeficiente de absorvidade molar do β -caroteno em éter de petróleo.

Os perfis de carotenoides foram identificados a partir da comparação com os dados (tempo de retenção e espectro de absorção na região do UV/Visível) de padrões analíticos isolados a partir de matrizes vegetais no próprio laboratório pelo método de Pacheco *et al.* (2013). Cada carotenoide foi quantificado individualmente por normalização de áreas, com resultado expresso em média \pm desvio padrão e unidade de concentração μg equivalente β -caroteno. g^{-1} .

2.4.2. Análise de ácidos fenólicos e flavonoides por CLAE-DAD

Para a análise de substâncias fenólicas, empregou-se a metodologia descrita por Nascimento *et al.* (2017), que consistiu inicialmente na extração das substâncias fenólicas por agitação mecânica por 1 h com 4 mL de solução aquosa de metanol a 50% (v/v, pH 2,0) e posterior centrifugação. A etapa de extração foi novamente executada, a partir do resíduo e com 4 mL de solução aquosa de acetona a 70% (v/v). Os dois extratos foram reunidos para posterior análise cromatográfica, identificados como a fração livre (EC-L e MT-L).

Ainda com o resíduo, procedeu-se uma etapa de hidrólise para extração das demais substâncias fenólicas. Inicialmente foi adicionado 5 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio a 2 M contendo ácido ascórbico a 1% (m/v) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10 mM, seguido de aquecimento a 60°C por 1 h. Após a hidrólise básica, foi adicionado 1,5 mL de solução aquosa de ácido clorídrico a 6 M, com posterior centrifugação. O sobrenadante da etapa de hidrólise foi particionado com 6,5 mL de acetato de etila, sendo o processo repetido mais uma vez. A fração de substâncias fenólicas hidrolisadas (EC-H e MT-H) foi seca sob ar comprimido e solubilizada em metanol.

As extrações foram realizadas em triplicata, com as frações livres e hidrolisadas analisadas no sistema cromatográfico CLAE-DAD anteriormente mencionado (2.3.5). Após a identificação realizada por comparação dos t_R e espectros UV/Visível, os flavonoides e ácidos fenólicos presentes em folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella* foram quantificados por padronização externa, através de curvas analíticas construídas com soluções dos padrões comerciais disponíveis e pontos equidistantes, conforme Tabela 9 e Equação 6.

Tabela 9. Curvas analíticas utilizadas para quantificação de substâncias fenólicas.

Substância	λ (nm)	Equação da Reta
Ácido Gálico	270	$y = 1,38.10^7x - 1,68.10^5$
Ácido Clorogênico	325	$y = 6,67.10^7x - 3,55.10^5$
Ácido <i>p</i> -cumárico	310	$y = 2,82.10^7x$
Ácido Elágico	370	$y = 6,99.10^6x - 4,23.10^4$
(+)-catequina	270	$y = 2,67.10^6x - 1,92.10^4$
(-)-epicatequina	270	$y = 2,62.10^6x - 1,46.10^4$
Quercetina	370	$y = 1,78.10^7x - 1,02.10^5$

$$\text{Concentração } \left(\mu\text{g padrão analítico/g} \right) = \frac{x \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) * v \text{ (mL)} * 10^3}{m \text{ (g)}}$$

Equação 6. Cálculo de teor de cada substância fenólica através da padronização externa.

Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e unidade de concentração μg equivalente ao padrão analítico. g^{-1} .

2.5. Isolamento e Purificação de Substâncias do Extrato Metanólico de Folhas de *Eugenia copacabanensis*

2.5.1. Fracionamento em coluna de sílica gel de EFEC-H 38-46

O fracionamento da partição hexânica de folhas de *E. copacabanensis* (EFEC-H) conduziu a obtenção de uma fração EFEC-H 38-46 (1,1 g). Esta fração foi analisada qualitativamente por CCD com fase móvel diclorometano e acetato de etila (8:2, v/v) e revelador químico vanilina sulfúrica, indicando a presença majoritária de uma substância. Cerca de 400 mg desta fração foi submetida novamente à cromatografia em coluna de sílica gel (60 Å, 70-230 mesh, 40 cm altura x 3,5 cm de diâmetro), nas mesmas condições do experimento por CCD, sendo recolhidas frações de 5 mL. Após análise por CCD, o fracionamento resultou na obtenção da substância **103** (72,5 mg).

Para a elucidação estrutural desta substância, procedeu-se inicialmente a análise por CG-EM nas condições experimentais descritas anteriormente no subtópico 2.3.4. Foram empregados também os experimentos uni- e bidimensionais de RMN ^1H e ^{13}C espectrômetro de RMN Bruker[®] (EUA) AVANCE II (500/125 MHz) com clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente e tetrametilsilano como referência; e análise por infravermelho em um espectrômetro do tipo VERTEX-70 FT-IR (*Fourier transform infrared spectroscopy*) Bruker[®] (EUA). A identificação da substância **103** foi sugerida através da comparação dos dados espectroscópicos com a literatura científica como o sesquiterpeno 2-metoxi-clovan-9-ol. Para confirmação da estrutura, foi preparado um produto derivado (**103a**) por reação de acetilação em meio com piridina e anidrido acético, de acordo com método descrito por Junior e colaboradores (2014).

Após a identificação, outras etapas de purificação foram realizadas para a obtenção de maior quantidade do sesquiterpeno, visando os estudos biológicos. Nova purificação em coluna de sílica gel em procedimento similar ao anterior foi realizada com 34 mg de EFEC-H 38-46, resultando em 9,2 mg da substância **103**. Em seguida, procedeu-se uma nova partição do extrato bruto EFEC (150 g) e a obtenção de nova partição em hexano (EFEC-H', 5,3 g). Uma nova purificação em coluna aberta de sílica gel resultou na obtenção de uma fração rica em hexadecanoato de metila (ou palmitato de metila, **10**), com massa de 327,6 mg; uma mistura de espatulenol (**30**), α - e β -amirina (**44** e **45**), com 152,0 mg; e outra fração rica em 2-

metóxi-clovan-9-ol (**103**), com 102,6 mg. Todas as etapas de purificação e isolamento do sesquiterpeno por fitoquímica clássica estão descritos na Figura 32.

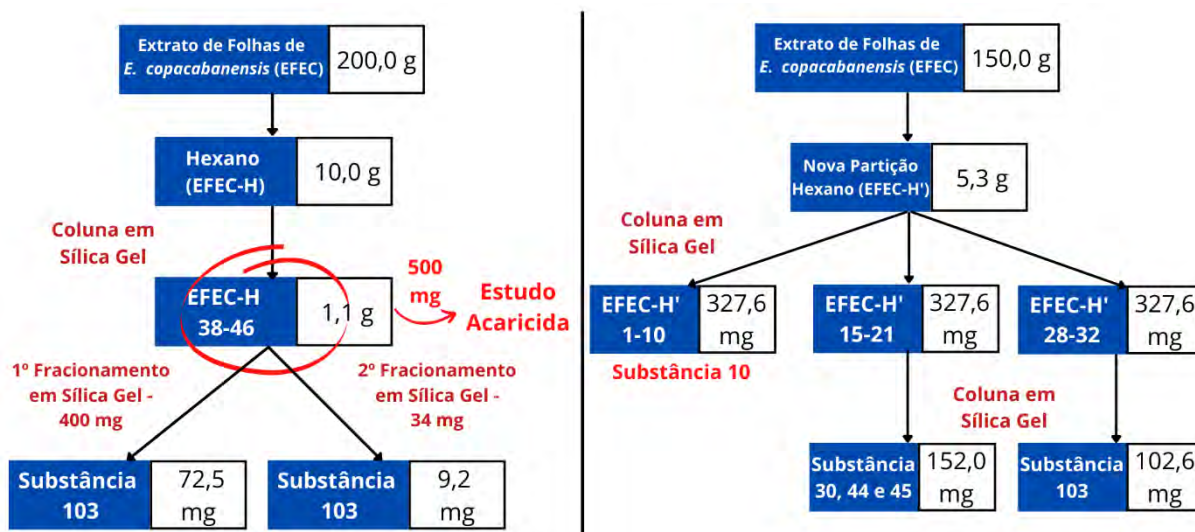


Figura 32. Esquema ilustrativo sobre as etapas de purificação e isolamento do sesquiterpeno 2-metóxi-clovan-9-ol (**103**).

Todas estas frações foram analisadas por CG-EM, espectroscopia na região do infravermelho (IV) e/ou experimentos uni- e bidimensionais de RMN ^1H e ^{13}C . As frações ricas neste sesquiterpeno foram encaminhadas para estudos biológicos.

2.5.2. Fracionamento em coluna de sílica gel de EFEC-Ac

Foi realizado ainda o fracionamento de 6,2 g da partição em acetato de etila de folhas de *E. copacabanensis* (EFEC-Ac), preparado na forma de pastilha com 12 g de sílica, em cromatografia em coluna aberta de sílica gel (60 Å, 70-230 mesh, 200 g, 54 cm x 5 cm). Para a fase móvel, foram empregadas misturas binárias de 500 mL de solventes em gradiente crescente de polaridade (diclorometano, acetato de etila e metanol), variando entre 10% e 20% (v/v) a composição de cada constituinte. 67 frações de 100 mL foram coletadas e reunidas em 11 frações, após avaliação qualitativa por CCD com radiação ultravioleta (254 nm) e NP (2-aminoetila difenilborato) como reveladores e padrão de (+)-catequina, quercetina e/ou rutina. A fração EFEC-Ac 11-18 (28,1 mg) demonstrou a presença majoritária de quercetina (**68**), em mistura com galato de metila (**58**) e kaempferol (**91**). As frações EFEC-Ac 25-28, 29-31 e 32-40 também reagiram positivamente na reação com o revelador NP (coloração alaranjada), sendo direcionadas para etapas posteriores de purificação.

2.5.3. Fracionamento em coluna de Sephadex das frações de EFEC-Ac

As frações selecionadas foram purificadas em coluna de Sephadex[®] LH-20 (30 cm x 2 cm), empregando eluição isocrática com metanol. Para cada experimento de purificação, procedeu-se a coleta de frações de 5 mL, em que, após avaliação por CCD similar ao item anterior, estas foram agrupadas. As frações foram codificadas pelo tipo de fase estacionária utilizada (SEPhadex – SEP), a espécie botânica (*E. copacabanensis* – EC) e a ordem de experimentos (primeiro – A, segundo – B, entre outros). A Figura 33 demonstra todas as etapas de purificação utilizadas para a partição EFEC-Ac.

As frações contendo misturas de substâncias fenólicas foram analisadas por CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM, de acordo com o método já mencionado (no subtópico 2.3.5). O

primeiro experimento (SEP-ECA) conduziu ao isolamento do ácido gálico (**55**) na fração SEP-ECA 3-4, com massa de 2,0 mg. Outras duas misturas de substâncias fenólicas foram obtidas neste experimento, sendo respectivamente as frações SEP-ECA 27-33 (48,0 mg, substâncias **70, 74, 81, 89** e **90**) e SEP-ECA 46-67 (110,9 mg, substâncias **71, 75** e **76**). As identidades destas substâncias em misturas foram propostas através de desrepliação por CLAE-DAD-EM.

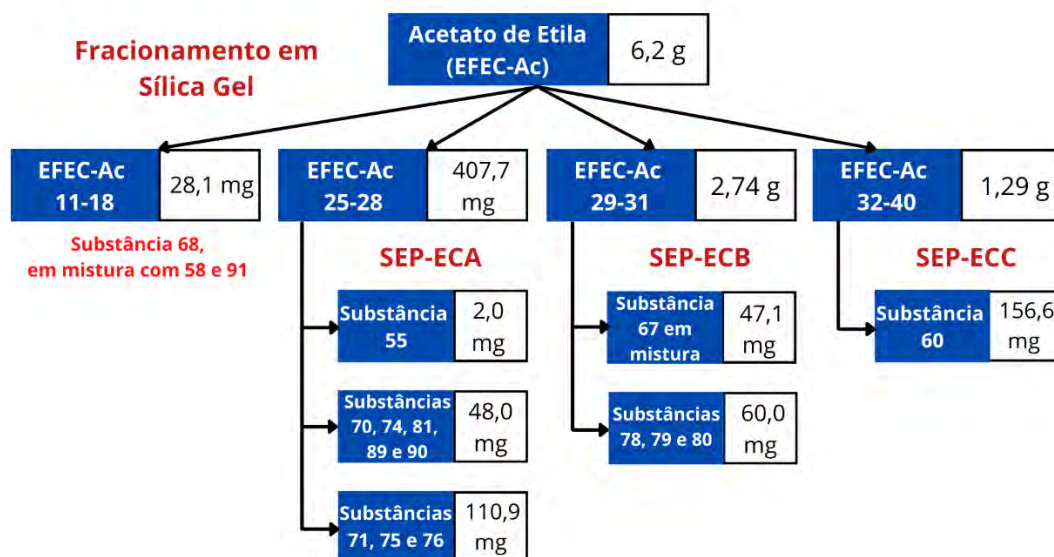


Figura 33. Esquema ilustrativo dos processos de purificação em Sephadex realizados com a partição em acetato de etila do extrato de folhas de *E. copacabanensis* (EFEC-Ac).

A fração SEP-ECB 12-19, rica em quercitrina (**67**, 47,1 mg), foi obtida através do experimento **SEP-ECB**. As demais substâncias detectadas nesta fração, assim como da segunda fração de interesse deste experimento (SEP-ECB 20-29, mistura de substâncias **78, 79** e **80**), também foram sugeridas através de desrepliação por CLAE-DAD-EM. Para o último experimento **SEP-ECC**, foi obtida uma fração rica em ácido elágico (**60**, 156,6 mg) com código SEP-ECC 23-75. Todas estas frações também foram analisadas, quando possível, por injeção direta no sistema IES-QTdV-EM.

2.6. Isolamento e Purificação de Substâncias do Extrato Metanólico de Folhas de *Myrciaria tenella*

2.6.1. Fracionamento em coluna de sílica gel de EFMT-D

Cerca de 10 g da fração em diclorometano das folhas de *M. tenella* (EFMT-D) foram submetidos à cromatografia em coluna aberta de sílica gel (60 Å, 70-230 mesh, 230 g, 80 cm altura x 5 cm de diâmetro). O procedimento foi similar ao anterior para o fracionamento do EFMT-H (2.3.4), com mistura binária de solventes orgânicos para fase móvel e avaliação qualitativa por CCD e revelação em câmara ultravioleta e reação com vanilina sulfúrica. Foram coletadas 142 frações de volume de 100 mL e reunidas em 29 frações agrupadas.

2.6.2. Fracionamento em coluna de Sephadex de EFMT-D 18-24

As frações EFMT-D 18-19 e 20-24 foram analisadas inicialmente por CG-EM nas condições descritas anteriormente no subtópico 2.5.3. Procedeu-se o isolamento da substância

majoritária presente nestas frações através da purificação de 97,6 mg em coluna Sephadex LH-20 Sephadex[®] LH-20 (30 cm x 2 cm), empregando como fase móvel uma mistura binária de metanol e diclorometano (8:2, v/v). Foram coletadas 20 frações de 5 mL, sendo reunidas em 4 frações após revelação em CCD com vanilina sulfúrica. A substância **104** (23,6 mg, Figura 34) foi isolada e identificada como o 2-metil-1-(2',4',6'-trimetóxi-fenil)-propan-1-ona ou conglomerona, através de elucidação estrutural por experimentos uni- e bidimensional de RMN ¹H e ¹³C (500/125 MHz), utilizando CDCl₃ como solvente e tetrametilsilano como referência interna, e CG-EM.

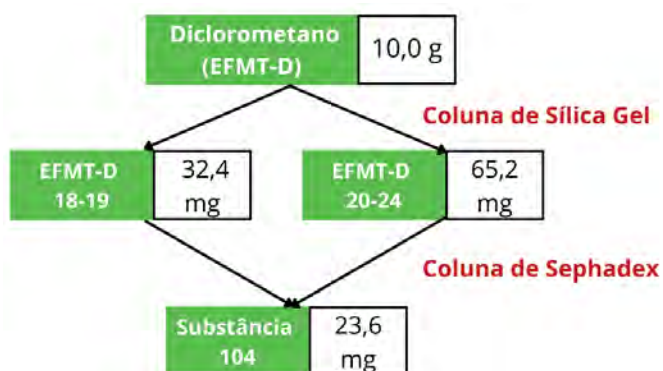


Figura 34. Esquema ilustrativo sobre o isolamento da conglomerona (**104**) a partir da partição EFMT-D do extrato de folhas de *M. tenella*.

2.6.3. Fracionamento em coluna de sílica gel de EFMT-Ac

Cerca de 8,4 g da partição em acetato de etila das folhas de *M. tenella* (EFMT-Ac) foram fracionadas em cromatografia em coluna aberta de sílica gel, de modo similar ao fracionamento de EFMT-Ac (no subtópico 2.5.22.6.3). Foram coletadas 80 frações com volume de 100 mL, aos quais, após a concentração em evaporador rotativo, foram analisadas por CCD, utilizando radiação ultravioleta (254 nm) e NP (difetilborato de aminoetanol) como reveladores e padrão de (+)-catequina, quercetina e/ou rutina. Das 13 frações reunidas, as frações EFMT-Ac 7-12, 13-18, 34-35 e 36-38 reagiram positivamente ao NP (coloração alaranjada). A fração EFMT-Ac 7-12 foi analisada por CLAE-DAD-EM, demonstrando a presença majoritária de quercetina (**68**). As três últimas frações foram direcionadas a novas etapas de purificação.

2.6.4. Fracionamento em coluna de Sephadex das frações de EFMT-Ac

As frações selecionadas foram purificadas em coluna de Sephadex[®] LH-20 (30 cm x 2 cm), empregando eluição isocrática com metanol, conforme Figura 35. As frações foram codificadas pelo tipo de fase estacionária utilizada (SEPhadex – SEP), a espécie botânica (*M. tenella* – MT) e a ordem de experimentos (primeiro – A, segundo – B, entre outros).

As frações foram analisadas em experimentos de CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM, nas condições cromatográficas previamente mencionadas (no subtópico 2.3.5), e, quando possível, por injeção direta no sistema IES-QTdV-EM. O experimento SEP-MTA, a partir da fração EFMT-Ac 13-18, conduziu a obtenção de uma fração SEP-MTA 4-5, contendo uma mistura de ácidos *p*-hidróxi-benzoico (**57**), siríngico (**59**), *p*-cumárico (**62**), vanílico (**101**) e ferúlico (**102**), enquanto a fração SEP-MTA 6-8 apresentou majoritariamente o ácido 3,3'-*O*-dimetil-elágico (**96**). Os demais experimentos SEP-MTB e SEP-MTC conduziram a diferentes frações ricas nos flavonoides hiperosídeo (**65**), isoquercitrina (**66**), quercetina 3-*O*-galoil-galactosídeo (**98**) e quercetina 3-*O*-galoil-glicosídeo (**99**).

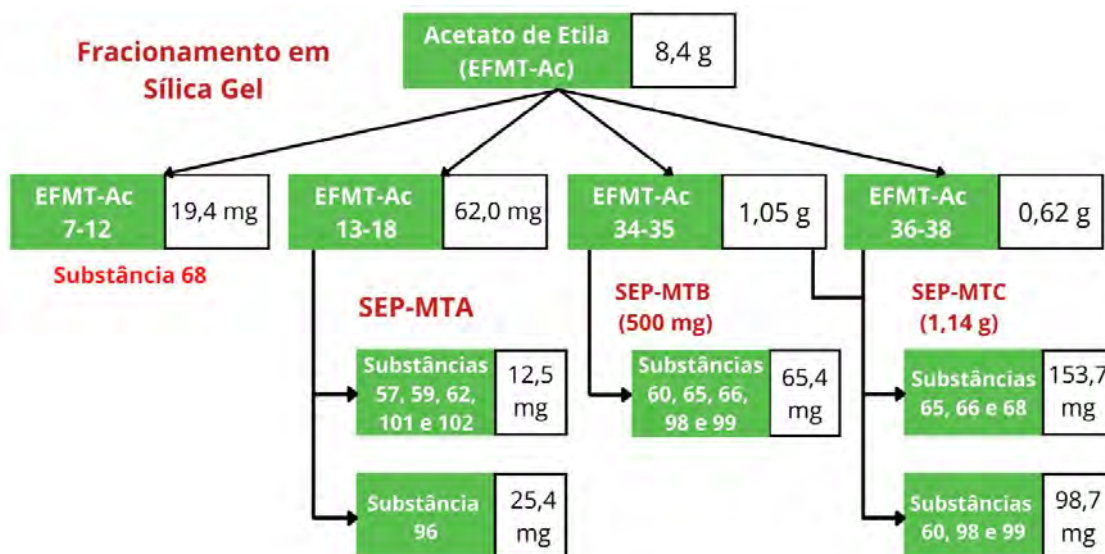


Figura 35. Esquema ilustrativo dos processos de purificação em Sephadex realizados com a partição em acetato de etila do extrato de folhas de *M. tenella* (EFMT-Ac).

2.7. Processamento de Dados

Os cromatogramas por CG-EM e os espectros de massas de baixa resolução foram processados no programa GCMS Postrun Analysis (Shimadzu, Japão). Os cromatogramas obtidos nos demais sistemas cromatográficos foram processados a partir dos softwares Empower (Waters, EUA) e LabSolutions LC-MS (Shimadzu, Japão). As interpretações dos espectros de massas de alta resolução foram feitas com o software MassLynx (Waters, EUA).

O software MestReNova versão 9.0 (MestReLab Research, EUA) foi utilizado para interpretação dos espectros obtidos nos experimentos de RMN uni- e bidimensional. Os espectros de infravermelho foram processados através do software ACD/Labs versão 12.0 (Canadá). Todas as estruturas químicas foram desenhadas através do software ChemDraw Ultra versão 12.0 (Cambridge Soft, PerkinElmer, Reino Unido).

2.8. Avaliação de Atividades Biológicas de Extratos de Folhas de Myrtaceae spp.

2.8.1. Ensaio espectrofotométrico de captura de radicais sintéticos DPPH e ABTS^{•+}

Os extratos e suas frações de folhas das duas espécies foram avaliados em relação ao seu potencial antioxidante. Para ensaios *in vitro*, os estudos foram realizados por métodos de captura de radicais sintéticos pelo próprio autor no Laboratório de Cromatografia Líquida, da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Para o ensaio de captura do radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), foi empregado a metodologia de Rufino *et al.* (2007) com adaptações. 0,1 mL de solução metanólica do extrato bruto ou cada fração a 10 mg.mL⁻¹ foi adicionado a 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH a 60 µM. A mistura foi mantida em frascos do tipo âmbar por 30 min em temperatura ambiente, sendo medidas as absorvâncias a 517 nm no início e no fim do tempo reacional para avaliação da porcentagem remanescente de DPPH. Procedeu-se o ensaio com diferentes concentrações de extrato bruto e frações a partir de diluições da solução estoque. O teste foi realizado em triplicata e os resultados foram reportados em concentração equivalente para redução a 50% de DPPH (CE₅₀ - mg.mL⁻¹). Foram analisados como controle positivo os padrões de quercetina e do ácido ascórbico.

O segundo experimento consistiu no ensaio de redução do radical ABTS^{•+}, também conhecido como *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* – TEAC. A solução do radical foi

preparada através da reação de oxidação de 5 mL de uma solução aquosa de 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) a 7 mM com 88 µL de uma solução aquosa de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) a 140 mM, nas condições de ausência de luz, temperatura ambiente e tempo reacional de 16 h. A solução obtida foi diluída em etanol até medição em comprimento de onda de 734 nm de absorvância de $0,7 \pm 0,5$. Os experimentos foram conduzidos com a mistura de 2,0 mL de solução diluída de ABTS⁺ e 20 µL de amostra em frasco tipo âmbar por 6 min à temperatura ambiente. Procedeu-se os ensaios em triplicata com as mesmas soluções estoque, diluições e controle positivo quercetina e ácido ascórbico usados no ensaio com DPPH. Os valores de absorvância obtidas foram utilizados para comparação com solução do padrão antioxidante Trolox através de curva analítica previamente construída. Os resultados foram reportados como mmol Trolox.g⁻¹ amostra.

2.8.2. Avaliação de potencial antioxidante *in vivo* através de modelo de *Saccharomyces cerevisiae*

Uma investigação aprofundada do potencial antioxidante dos extratos e frações de folhas de *M. tenella* foi realizado no Laboratório de Estresse Oxidativo em Microrganismos – LEOM (IQ-UFRRJ), pela equipe do professor Dr. Cristiano Jorge Riger (Departamento de Bioquímica – UFRRJ). Foram conduzidos experimentos a partir do modelo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, com a cepa controle BY4741 e a cepa mutante *Δgsh1*, obtidas da empresa Euroscarf (Frankfurt, Alemanha) e mantidas em meio sólido YPD (1% extrato de levedura, 2% glicose, 2% peptona e 2% ágar, m/v). A cepa mutante apresenta deficiência no tripeptídeo glutatona, uma substância presente em meio celular e com alto poder redutor.

A metodologia empregada foi descrita no artigo publicado em parceria entre os laboratórios de pesquisa (MARTINS *et al.*, 2021). Para os estudos, as células foram transferidas para meio líquido YPD e mantidas até a fase exponencial respiratória (2,0 mg massa seca.mL⁻¹) para os experimentos. As amostras foram solubilizadas em dimetil sulfóxido (DMSO), em concentração de 20% (m/v), com níveis abaixo de 3% DMSO em contato com as células. Procederam-se experimentos de citotoxicidade pelo ensaio qualitativo da resaruzina; viabilidade celular a partir de concentrações não-citotóxicas; e atividade antioxidante através do pré-tratamento com as amostras e exposição ao peróxido de hidrogênio por 2 h. Os resultados de no mínimo três replicatas foram analisados estatisticamente pelo teste de variância ANOVA e teste de Tukey (p < 0,05).

2.8.3. Avaliação da atividade acaricida da fração EFEC-H 38-46 contra carrapatos bovinos da espécie *Rhipicephalus microplus*

Este estudo biológico foi desenvolvido pela zootecnista Paula B. C. Marchesini, até então aluna do curso de Doutorado em Ciências Veterinárias (IV-UFRRJ), e o professor Dr. Caio Márcio de O. Monteiro, atualmente no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Foram utilizados carrapatos bovinos da espécie *Rhipicephalus microplus* cedidos pelo Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, também localizada em Juiz de Fora (MG), provenientes de bovinos naturalmente infestados. As fêmeas ingurgitadas foram lavadas com água destilada e secas em toalhas de papel. Em seguida, parte das fêmeas foi separada para o teste de imersão e outra parte mantidas para oviposição em câmara climatizada do tipo B.O.D. (*biological oxygen demand*) Eletrolab EI 202 nas condições de temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa > $80 \pm 10\%$ por 15 dias. Quanto a amostra, a

fração EFEC-H 38-46 foi diluída em diferentes concentrações a partir de uma solução hidroetanólica a 50% (v/v) contendo dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% (v/v).

A avaliação acaricida foi determinada a partir de dois ensaios biológicos diferentes. O primeiro consistiu no teste de pacote de larvas, proposto por Stone & Haydock (1962) e adaptado por Monteiro e colaboradores (2012). Aproximadamente, 100 larvas não ingurgitadas de *R. microplus*, de idade de 15 a 21 dias, foram colocadas no centro de uma folha de papel de filtro (6 cm x 6 cm, Whatman nº1), em seguida o papel filtro foi dobrado ao meio e fechado nas laterais com cliques. Após essa etapa, cada um dos lados dos papéis foi umedecido com 90 µL das soluções diluídas (3,125, 6,25, 12,5, 25,0 e 50,0 mg.mL⁻¹), totalizando 180 µL por pacote, sendo realizado 10 repetições por tratamento. Um grupo controle (solução de etanol 50% v/v + DMSO 1% v/v) também foi testado. Os grupos experimentais foram mantidos em câmara climatizada B.O.D. nas condições previamente mencionadas por 24 horas. Após o período, o número de larvas vivas e mortas foram contadas a partir do uso de uma bomba de vácuo para obter a porcentagem de mortalidade (%).

O segundo ensaio consistiu no teste de imersão de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, proposto por Drummond e colaboradores (1973). As fêmeas ingurgitadas foram divididas em grupos, contendo 10 indivíduos com peso estatisticamente similar ($p > 0,05$). Em seguida, estas foram imersas por 5 min nas soluções testadas (12,5, 25,0, 50,0, 100,0 e 150,0 mg.mL⁻¹), incluindo no controle positivo. Após a imersão, cada fêmea foi pesada individualmente e transferida para placa de Petri (6 cm x 6 cm) para oviposição. Todos os grupos foram mantidas em câmaras B.O.D. sob as condições mencionadas para avaliar a reprodução biológica. Após a completa oviposição e morte das fêmeas, procedeu-se a medição da massa de cada ovo e o acondicionamento em seringas plásticas com extremidade distal cortada, vedada com algodão hidrófilo (MONTEIRO et al., 2012; RESENDE et al., 2012). Os ovos foram mantidos em câmaras B.O.D. por mais 21 dias.

Os seguintes parâmetros biológicos foram verificados: massa das fêmeas antes da oviposição, massa dos ovos e porcentagem de eclosão larval. A eficácia dos tratamentos foi demonstrada através da porcentagem de controle e calculado a partir das Equação 7 e Equação 8 em acordo com Drummond e colaboradores (1973):

$$\text{Índice de Eficiência Reprodutiva} = \left(\frac{m_{\text{ovos}}}{m_{\text{fêmea}}} \right) * \%_{\text{eclosão}} * 20000$$

Equação 7. Cálculo do Índice de Eficiência Reprodutiva (*Reproductive Efficiency Index - REI*).

Símbolos:

- m_{ovos} : massa dos ovos obtidos na oviposição;
- $m_{\text{fêmea}}$: massa das fêmeas antes da oviposição;
- $\%_{\text{eclosão}}$: porcentagem de eclosão larval.

$$\%_{\text{controle}} = \left(\frac{REI_{\text{controle}} - REI_{\text{tratamento}}}{REI_{\text{controle}}} \right) * 100$$

Equação 8. Cálculo da porcentagem de controle ou eficácia de cada tratamento para o controle dos carrapatos *R. microplus*.

Os dados foram analisados através do software Biostat 5.0. Os valores médios de cada parâmetro entre diferentes tratamentos foram avaliados pela análise de Variância (ANOVA, seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$)). Análise do tipo probit foi realizada para calcular a concentração letal a 50% (CL₅₀), usando o software R-Studio versão 1.2 (EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação de Constituintes das Frações Não-Polares de Extratos de Folhas de Myrtaceae spp.

3.1.1. Desreplicação por CG-EM das frações EFEC-H e EFMT-H

No presente estudo, foi proposta a desreplicação por técnicas cromatográficas instrumentais de frações de folhas de duas espécies de Myrtaceae (*E. copacabanensis* e *M. tenella*). Inicialmente, optou-se pelo fracionamento das duas frações não-polares em coluna de sílica gel, possibilitando a identificação de um maior número de substâncias através da análise não-direcionada por CG-EM. Esta técnica foi o primeiro sistema hifenado aplicado para desreplicação e recomendado para extratos ou frações lipofílicos de plantas (GAUDÊNCIO & PEREIRA, 2015; CARNEVALE NETO et al., 2016).

Após a análise por CG-EM e a comparação dos espectros de massas com as bibliotecas disponíveis, foi possível propor a identificação de um total de 49 substâncias nas frações hexânicas de folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella*. Todas estas substâncias estão disponibilizadas nas Figuras 36 Figura 37 e na Tabela 10, incluindo os parâmetros observados e os códigos correspondente para cada substância.

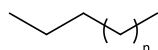
Diferentes classes de substâncias de baixa polaridade foram observadas, como os ésteres de ácidos graxo, tocoferóis, sesquiterpenos, triterpenos e esteroides. Vinte substâncias foram detectadas em ambos os extratos: sete hidrocarbonetos e derivados (*n*-undecano, **1**; *n*-dodecano, **2**; *n*-tridecano, **3**; *n*-tetradecano, **4**; 1,3-bis-isopropilbenzeno, **7**; 1,4-bis-isopropilbenzeno, **8**; e 2,4-bis-*terc*-butil-fenol, **9**), cinco ésteres de ácido graxo (palmitato de metila, **10**; linolenato de metila, **11**; linoeato de metila, **12**; estearato de metila, **13**; e 18-metil-nonadecanoato de metila, **14**), quatro sesquiterpenos não-oxigenados (α -copaeno, **16**; *E*-cariofileno, **21**; α -humuleno, **24**; e allo-aromadendreno, **25**), dois tocoferóis (α -tocoferol, **40**; e γ -tocoferol, **42**), um triterpeno (β -amirina, **45**) e um esteroide (β -sitosterol, **48**).

Especificamente para a fração hexânica de folhas de *E. copacabanensis*, foram propostas a identificação de um total de 34 substâncias, sendo 25 substâncias relatadas pela primeira vez nesta espécie, como ésteres de ácidos graxos, tocoferóis e diterpeno α -kaureno (**38**). Entre as substâncias já previamente relatadas para a espécie, 5 sesquiterpenos (γ -muuroleno, **17**; α -calacoreno, **20**; *E*-cariofileno, **21**; allo-aromadendreno, **25**; e espatulenol, **30**) foram identificados no estudo de óleo essencial de folhas de *E. copacabanensis* por Nakamura et al. (2010). Além disso, Junior et al. (2014), em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, já tinham isolado a partir da fração hexânica de folhas de *E. copacabanensis* e identificados o sesquiterpeno oxigenado clovandiol (**32**), o esteroide β -sitosterol (**48**) e uma mistura dos triterpenos α - e β -amirina (**44** e **45**). Estes mesmos terpenos foram identificados através de desreplicação por CG-EM, indicando a viabilidade do uso da técnica para análises não-direcionadas de espécies desconhecidas.

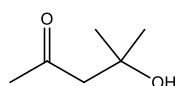
Trinta e cinco compostos também foram identificados na fração hexânica de folhas de *M. tenella*. Vinte e quatro deles foram relatados pela primeira vez nesta espécie, incluindo ésteres metílicos de ácidos graxos (palmitato de metila, **10**; linolenato de metila, **11**; linoeato de metila, **12**; estearato de metila, **13**; e 18-metil-nonadecanoato de metila, **14**), α - e γ -tocoferóis (**40** e **42**) e terpenos, como fitol (**39**), esqualeno (**43**), β -amirina (**45**), lupeol (**46**), betulina (**47**) e β -sitosterol (**48**). Considerando trabalhos anteriores sobre estudo de óleo essencial das folhas de *M. tenella*, concluiu-se que alguns sesquiterpenos relatados na Tabela 10 já foram descritos para esta espécie (ANDRADE et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2008; APEL et al., 2010; MONTEIRO et al., 2016). Quando comparados aos resultados do OEMT do Capítulo I, oito sesquiterpenos foram também identificados na fração hexânica de folhas

de *M. tenella*, tais como os constituintes majoritários *E*-cariofileno (**21**, com 10,9% no OEMT) e aromadendreno (**23**, 9,2%), além de óxido de cariofileno (**35**, 4,5%), viridifloreno (**28**, 2,7%), allo-aromadendreno (**25**, 2,1%), α -humuleno (**24**, 1,3%), β -selineno (**27**, 0,6%) e α -gurjuneno (**22**, 0,5%).

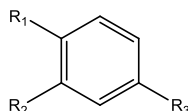
HIDROCARBONETOS E DERIVADOS



n = 7 (1) *n*-Undecano
 n = 8 (2) *n*-Dodecane
 n = 9 (3) *n*-Tridecane
 n = 10 (4) *n*-Tetradecano
 n = 11 (5) *n*-Pentadecano

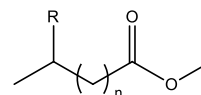


(6) 4-idróxi-4-metil-2-pentanona



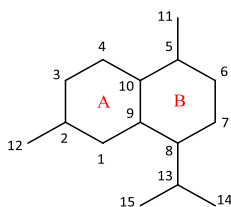
R₁ = H; R₂ = R₃ = Isopropil (7) 1,3-bis-isopropil-benzeno
 R₁ = R₃ = Isopropil; R₂ = H (8) 1,4-bis-isopropil-benzeno
 R₁ = OH; R₂ = R₃ = *terc*-butil (9) 2,4-bis-*terc*-butil-fenol

ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS

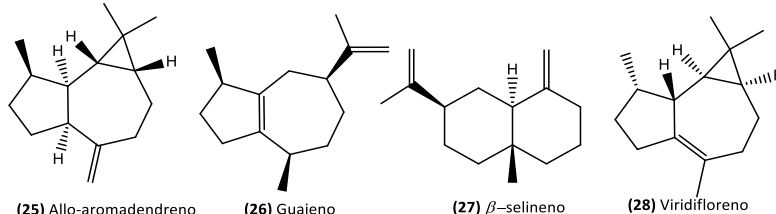
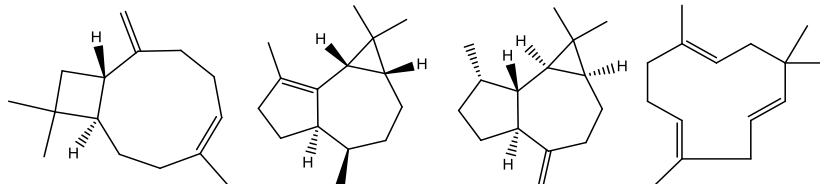


R = H; n = 13 (10) Palmitato (16:0) de metila
 R = H; n = 15 (11) Estearato (18:0) de metila
 R = H; n = 15 (9Z, 12Z) (12) Linoleato (18:2) de metila
 R = H; n = 15 (9Z, 12Z, 15Z) (13) Linolenato (18:3) de metila
 R = CH₃; n = 17 (14) 18-metil-nonadecanoato (20:0) de metila
 R = H; n = 21 (15) Lignocerato (22:0) de metila

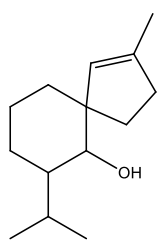
SESQUITERPENOS NÃO-OXIGENADOS



C₂-C₃ ligação dupla, C₁-C₅ ligação simples (16) α -copaeno
 C₁-C₂, C₅-C₆ ligações duplas (17) α -muuroloeno
 C₁-C₂, C₅-C₁₁ ligações duplas (18) γ -muuroloeno
 C₁-C₂, C₅-C₁₀ ligações duplas (19) δ -cadineno
 Anel aromático A, C₅-C₆ ligação dupla (20) α -calacoreno



SESQUITERPENOS OXIGENADOS



(29) Gleenol

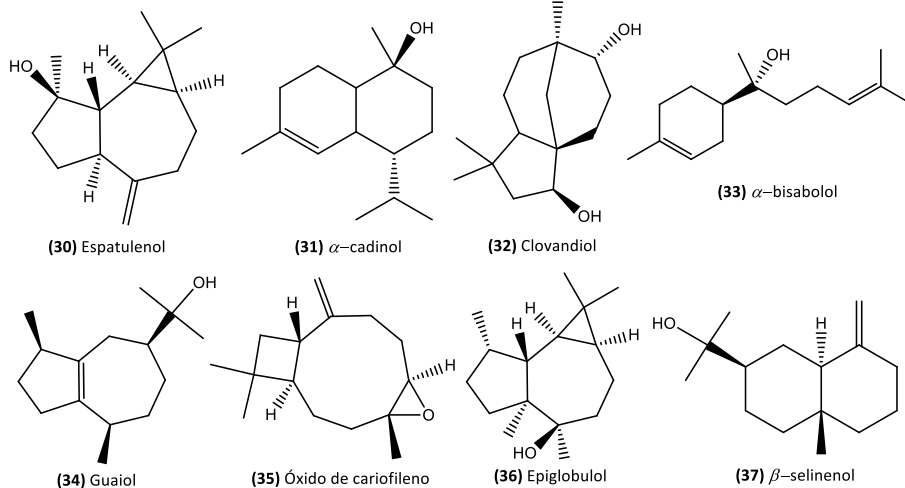


Figura 36. Estruturas químicas das substâncias propostas através de desrepliação por CG-EM em folhas de *Myrtaceae spp.*

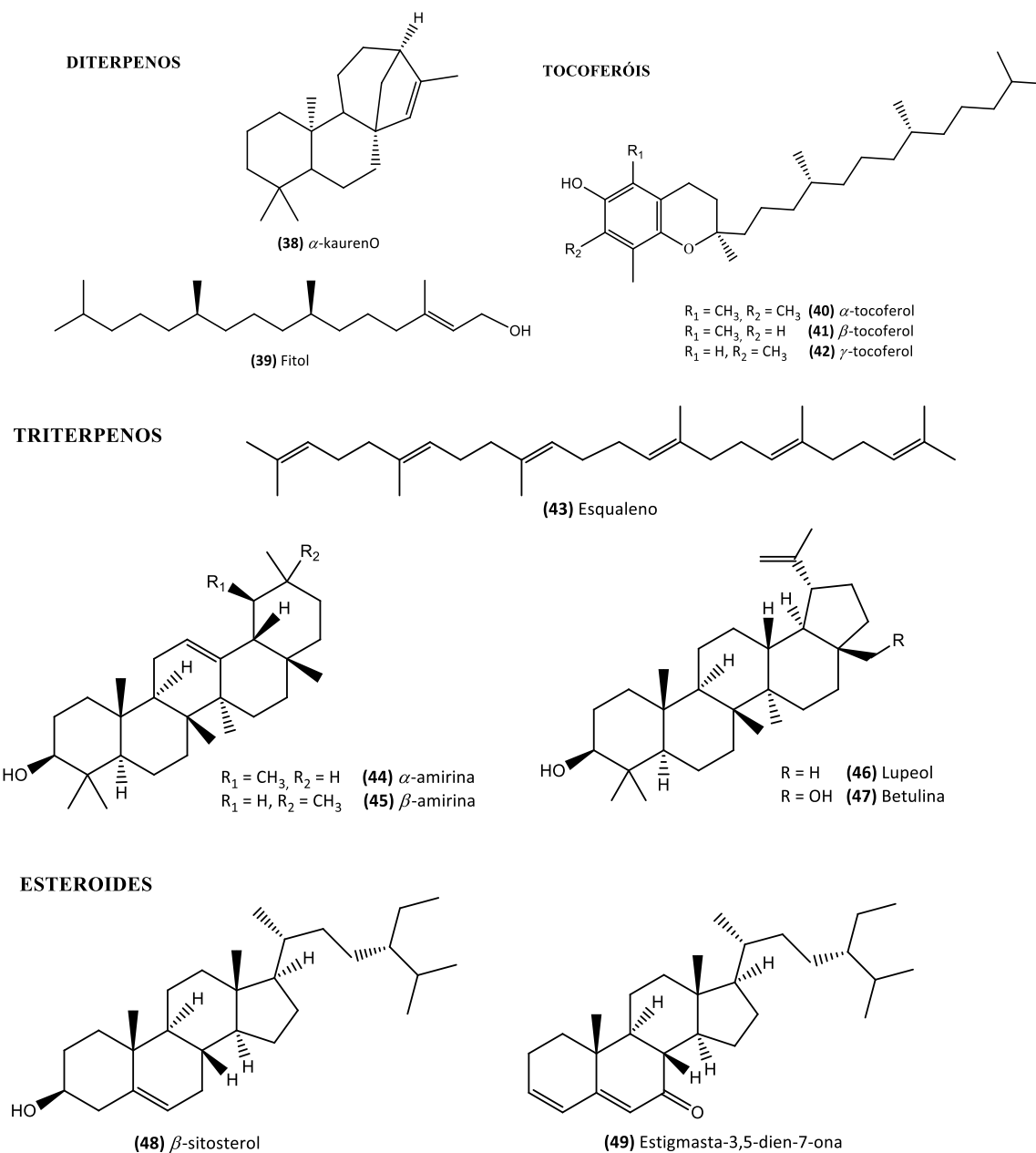


Figura 37. Continuação das estruturas químicas das substâncias propostas através de desrepliação por CG-EM em folhas de *Myrtaceae spp.*

Tabela 10. Proposta de identificação de substâncias nas frações hexânicas de folhas de *Myrtaceae spp.* através de desreplicação por CG-EM.

N	Substâncias	MM (g/mol)	Similaridade (%)	Íon Molecular	Principais Íons Fragmentos	EFEC- H	EFMT- H
<i>Hidrocarbonetos e Derivados</i>							
1	<i>n</i> -undecano	156	95	156	43, 57, 71, 85	X	X
2	<i>n</i> -dodecano	170	95	170	43, 57, 71, 85	X	X
3	<i>n</i> -tridecano	184	95	184	43, 57, 71, 85	X	X
4	<i>n</i> -tetradecano	198	94	198	43, 57, 71, 85	X	X
5	<i>n</i> -pentadecano	212	89	212	43, 57, 71, 85		X
6	4-hidróxi-4-metil-2-pentanona	116	85	116	43, 58, 59, 101	X	
7	1,3-bis-isopropil-benzeno	162	89	162	91, 105, 119, 147	X	X
8	1,4-bis-isopropil-benzeno	162	89	162	91, 105, 119, 147	X	X
9	2,4-bis- <i>terc</i> -butil-fenol	206	85	206	57, 191	X	X
<i>Ésteres de Ácidos Graxos</i>							
10	Palmitato de metila	270	97	270	74, 87	X	X
11	Linolenato de metila	292	89	292	41, 55, 67, 79	X	X
12	Linoleato de metila	294	94	294	55, 67, 81, 95	X	X
13	Estearato de metila	298	95	298	74, 87	X	X
14	18-metilnonadecanoato de metila	326	87	326	41, 87	X	X
15	Lignocerato de metila	354	85	354	41, 87	X	
<i>Sesquiterpenos Não-Oxigenados</i>							
16	α -copaeno	204	95	204	105, 119, 161	X	X
17	α -muuroloeno	204	95	204	105, 161	X	
18	γ -muuroloeno	204	92	204	93, 105, 119, 161	X	
19	δ -cadineno	204	85	204	105, 119, 159, 161	X	
20	α -calacoreno	200	88	200	142, 157	X	
21	<i>E</i> -cariofileno	204	95	204	69, 93, 133	X	X
22	α -gurjuneno	204	92	204	147, 161, 189		X
23	Aromadendreno	204	94	204	91, 93, 105, 107, 161		X
24	α -humuleno	204	92	204	80, 93	X	X
25	Allo-aromadendreno	204	95	204	91, 105, 161	X	X

26	Guaieno	204	90	204	81, 91, 93, 105, 119		X
27	β -selineno	204	90	204	105, 133, 147, 161, 189		X
28	Viridifloreno	204	93	204	79, 93		X
Sesquiterpenos Oxigenados							
29	Gleenol	222	90	222	81, 108, 121	X	
30	Espatuleno	220	93	220	43, 119, 159, 205	X	
31	δ -cadinol	222	85	222	43, 119, 161, 204	X	
32	Clovandiol	238	87	238	93, 95, 164, 220	X	
33	α -bisabolol	222	93	222	69, 109, 119, 204		X
34	Guaiol	222	85	222	43, 59, 81, 93, 107, 161		X
35	Óxido de Cariofileno	220	94	220	43, 69, 79, 91, 93, 107		X
36	Epiglobulol	222	92	222	69, 82, 109, 161, 189, 204		X
37	β -selinenol	222	94	222	59, 149, 189, 204		X
Diterpenos							
38	α -kaureno	272	89	272	69, 105, 257	X	
39	Fitol	296	97	296	71, 278		X
Tocoferóis							
40	α -tocoferol	430	97	430	165	X	X
41	β -tocoferol	416	85	416	191, 151	X	
42	γ -tocoferol	416	85	416	191, 151	X	X
Triterpenos							
43	Esqualeno	410	96	410	41, 69, 81		X
44	α -amirina	426	88	426	203, 218, 219	X	
45	β -amirina	426	88	426	203, 218, 219	X	X
46	Lupeol	426	86	426	189, 207, 218		X
47	Betulina	442	91	442	95, 119, 135, 189, 207, 440		X
Esteroides							
48	β -sitosterol	414	80	414	213, 159, 145, 107, 95, 81	X	X
49	Estigmasta-3,5-dien-8-ona	410	-*	410	269, 187, 174, 159	X	

X indica a presença na fração; *Identificado com base no trabalho de HASSAN et al. (2018).

Quanto às classes químicas observadas, a identificação destas substâncias em frações apolares de *Myrtaceae spp.* era algo esperado, devido à baixa polaridade do solvente empregado e os importantes papéis fisiológicos destas classes nos organismos vegetais. Por exemplo, os ácidos graxos são considerados uma importante fonte de carbono para o metabolismo das plantas e foram identificados como ésteres metílicos, provavelmente por reação com o solvente de extração metanol, formando os derivados metílicos como artefatos do processo extrativo (MALTESE et al., 2009).

Além disso, os tocoferóis e os terpenos desempenham um papel na defesa das plantas contra estresses bióticos e abióticos. Os tocoferóis são comumente conhecidos como vitamina E, atuando nos mecanismos antioxidantes das células vegetais (FRITSCHE et al., 2017). Os terpenos são responsáveis pela reprodução das plantas como importantes moléculas sinalizadoras que atraem insetos polinizadores (SINGH & SHARMA, 2015). Em destaque, os sesquiterpenos cíclicos e triterpenos como *E*-cariofileno, α - e β -amirina são comumente relatados como constituintes importantes da família *Myrtaceae*, especialmente no gênero *Eugenia* (JUNIOR et al., 2014; DE SOUZA et al., 2018).

3.1.2. Determinação Quantitativa de Carotenoides em Folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella*

Outra importante subclasse dos terpenos são os tetraterpenos, conhecidos como carotenoides. Assim como os demais terpenos, estas substâncias apresentam elevado caráter lipofílico (baixa polaridade) devido à extensa cadeia carbônica. Além disso, os carotenoides são reconhecidos como uma classe de pigmentos naturais, apresentando coloração do amarelo ao vermelho (comprimento de onda máximo de absorção na região entre 450-470 nm) e sendo amplamente distribuídos em organismos fotossintetizantes quanto não-fotossintetizantes. Na fotossíntese, estas substâncias são importantes por atuarem como pigmentos acessórios na absorção da energia luminosa, além de exercerem papel como antioxidantes nos organismos (UENOJO et al., 2007; YOUNG & LOWE, 2018; SUN et al., 2018).

Por tal razão, a presença destas substâncias nas partições hexânicas de folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella* foi observada durante a etapa de fracionamento em coluna aberta de sílica gel. As primeiras frações eluídas da coluna, ainda com hexano como fase móvel, apresentaram coloração nas tonalidades amarela, laranja e vermelha, sendo um indicativo da presença dos carotenoides. Logo, foi empregado o método quantitativo por CLAE-DAD para determinação do perfil e teor dos carotenoides nas folhas das duas espécies de *Myrtaceae*. O Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos é acreditado pelo INMETRO segundo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 para análise de carotenoides, o que garante uma maior confiabilidade nas informações obtidas quanto a esses metabólitos secundários. O procedimento de preparo da amostra foi diferente do empregado no LQPN/UFRRJ e consistiu em duas etapas: uma extração por maceração dinâmica com o sólido abrasivo celite e uma etapa de hidrólise básica. A reação de hidrólise com solução metanólica de hidróxido de potássio é importante para a obtenção dos carotenoides na forma livre, visto que nas células vegetais estes se apresentam, por exemplo, na forma de complexos com proteínas (UENOJO et al., 2007). A Figura 38 exemplifica a observação dos extratos ricos em carotenoides de folhas de *E. copacabanensis*, através dos diferentes métodos empregados.

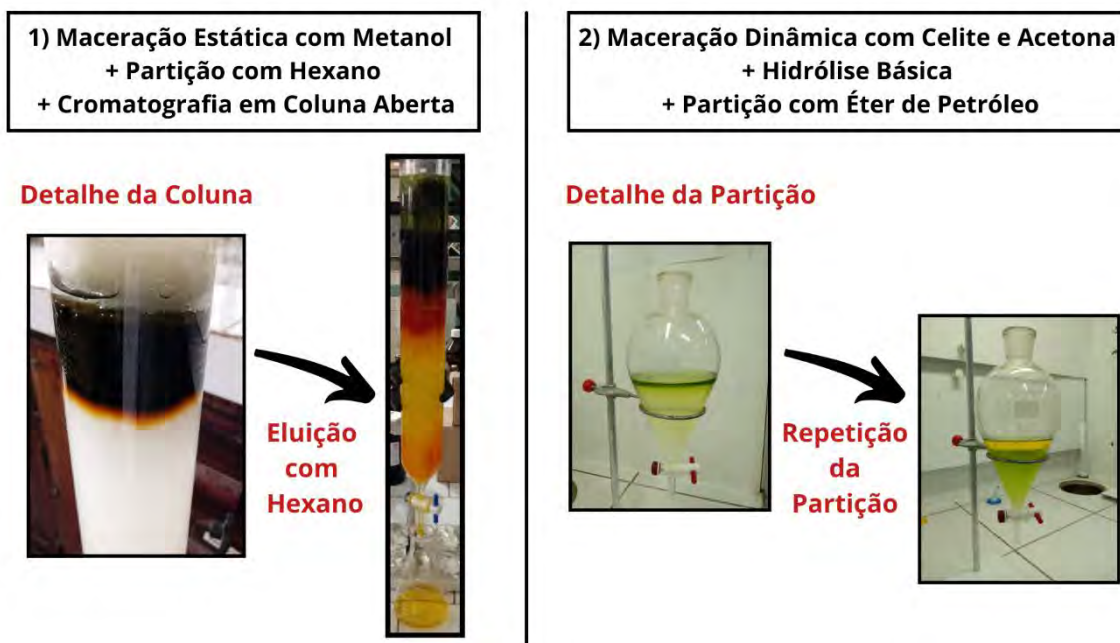


Figura 38. Comparação dos extratos/frações com coloração característica de carotenoides obtidos por diferentes metodologias a partir das folhas de *E. copacabanensis*.

Em relação aos resultados da análise por CLAE-DAD, foram identificados cinco diferentes carotenoides nas folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella*: luteína (**50**; t_R 9,1 min; $\lambda_{m\acute{a}x}$ 444,3/473,3 nm), α -caroteno (**51**; t_R 16,1 min; $\lambda_{m\acute{a}x}$ 445,3/473,3 nm) e β -caroteno (**52**; t_R 17,1 min; $\lambda_{m\acute{a}x}$ 451,5/478,2 nm) foram os carotenoides majoritários, enquanto também foram observados duas substâncias isômeros do β -caroteno, 13-*cis*- β -caroteno (**53**; t_R 15,6 min; $\lambda_{m\acute{a}x}$ 337,6/444,3/473,3 nm) e 9-*cis*- β -caroteno (**54**; t_R 17,8 min; $\lambda_{m\acute{a}x}$ 338,8/446,7/473,3 nm). As estruturas químicas destes metabólitos estão dispostas na Figura 39.

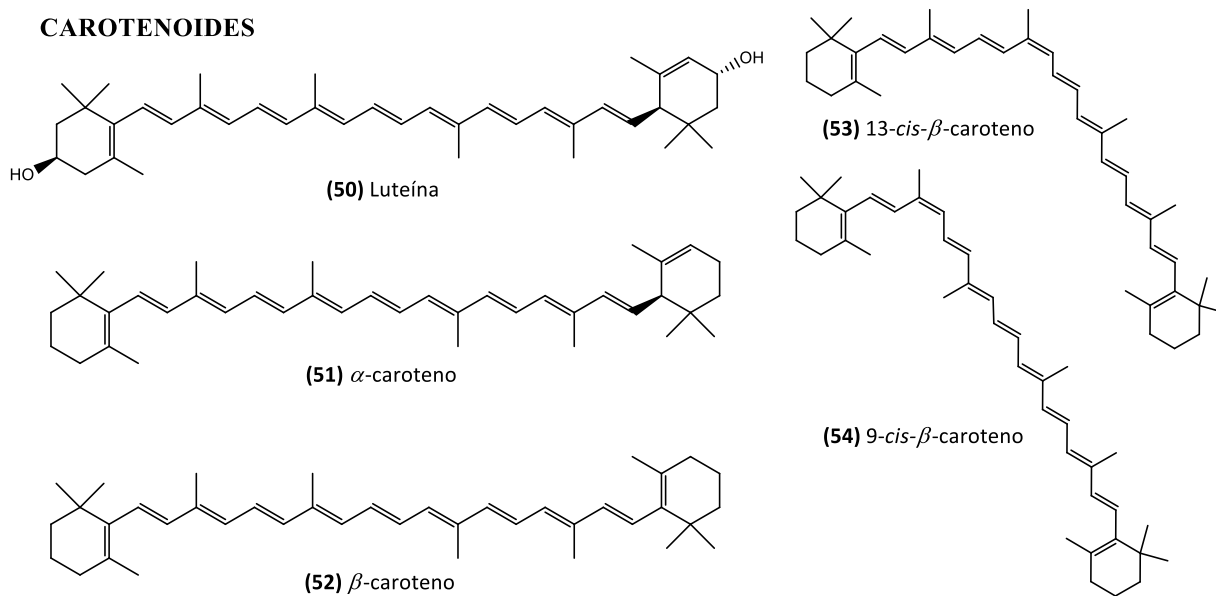


Figura 39. Estruturas químicas dos carotenoides identificados através da metodologia CLAE-DAD em folhas de Myrtaceae spp.

A Figura 40 representa o cromatograma por CLAE-DAD obtido a partir de uma fração da partição hexânica das folhas de *M. tenella*. Já a Figura 41 compara os cromatogramas obtidos através da metodologia analítica empregada na Embrapa Agroindústria de Alimentos.

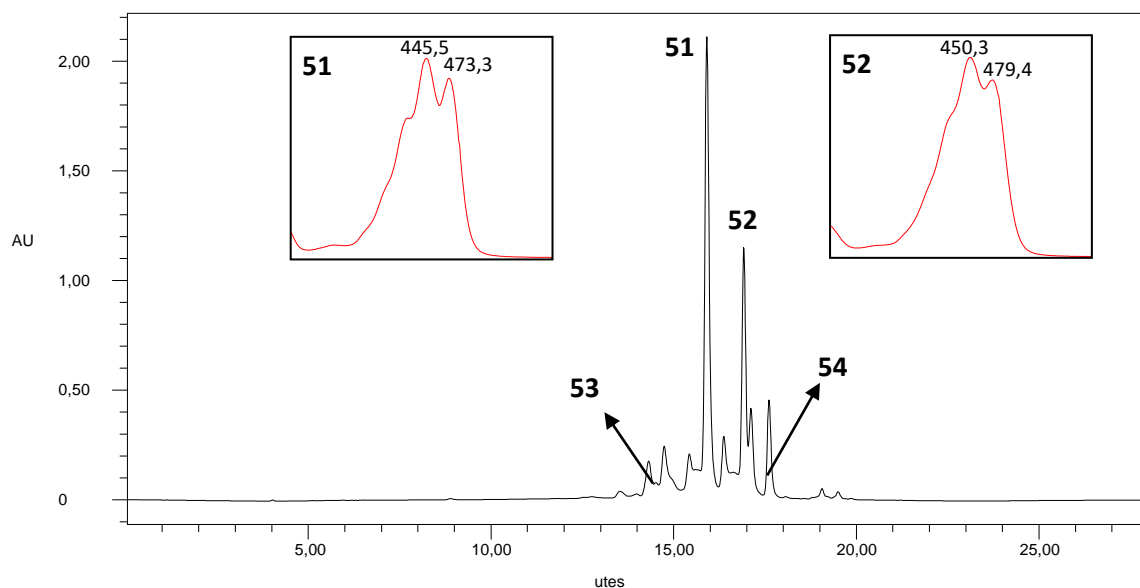


Figura 40. Cromatograma por CLAE-DAD da fração EFMT-H 6-7, obtido a partir da partição hexânica de folhas de *M. tenella*, com os carotenoides identificados: α -caroteno (**51**) – t_R 15,9 min; β -caroteno (**52**) – t_R 16,9 min; 13-*cis*- β -caroteno (**53**) – t_R 15,5 min; e 9-*cis*- β -caroteno (**54**) – t_R 17,6 min.

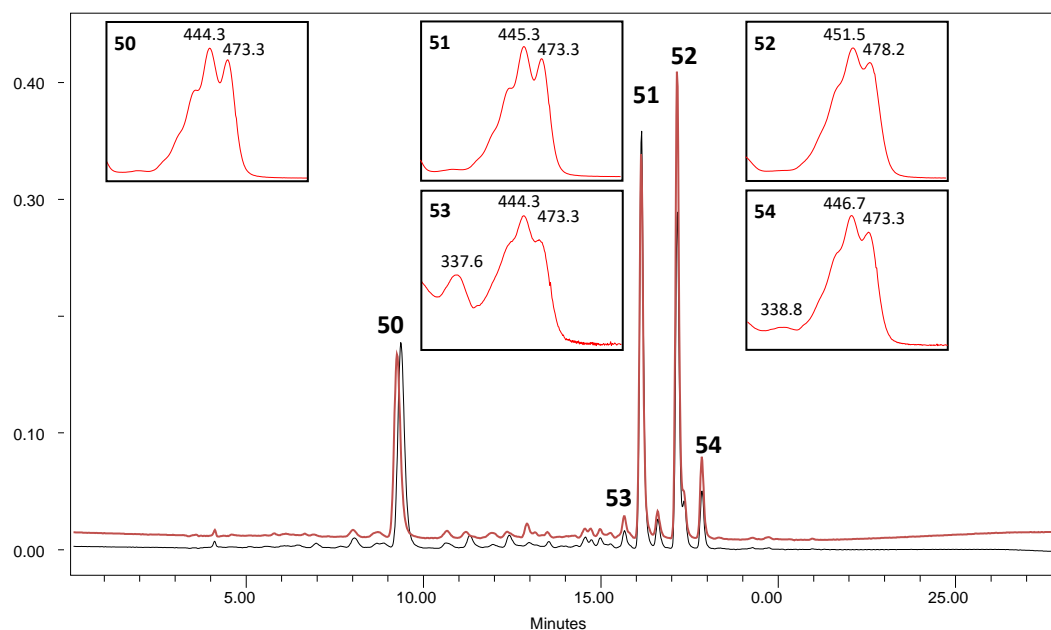


Figura 41. Cromatograma por CLAE-DAD do extrato em acetona das folhas de *Eugenia copacabanensis* (vermelho) e *Myrciaria tenella* (preto) após hidrólise básica: luteína (**50**) – t_R 9,2 min; 13-*cis*- β -caroteno (**53**) – t_R 15,6 min; α -caroteno (**51**) – t_R 16,1 min; β -caroteno (**52**) – t_R 17,1 min; 9-*cis*- β -caroteno (**54**) – t_R 17,8 min.

Inicialmente, foi possível observar que através da purificação em coluna de sílica gel foram obtidas frações ricas nos carotenoides α - e β -caroteno (**51** e **52**). Estas frações apresentaram ainda nos cromatogramas por CLAE-DAD picos co-eluídos aos constituintes majoritários. Embora os carotenoides ocorram naturalmente na forma *todo-trans*, termodinamicamente mais estáveis, um escaneamento desta região do cromatograma demonstrou a presença de substâncias com espectros de UV/Visível similar ao α - e β -caroteno, porém com diferente isomeria, tais quais os isômeros já citados acima 13-*cis*- β -caroteno (**53**) e 9-*cis*- β -caroteno (**54**). Esta observação baseia-se na análise dos espectros, pois apresentaram uma nova banda de absorção na região do ultravioleta (330-340 nm). Segundo Rodriguez-Amaya (2001), esta absorção é um indicativo característico da presença de ligação insaturada com isomeria *cis* na cadeia central dos carotenoides. Além disso, os isômeros “mono-*cis*” (com apenas uma ligação com isomeria *cis*) apresentam deslocamento hipsocrômico de 2-6 nm e efeito hipocrômico para as duas bandas de absorção na região do Visível. Outra informação importante é que, quanto maior a intensidade da terceira banda de absorção, maior a tendência desta ligação se localizar na região central da cadeia. Estas diferenças podem ser observadas na comparação dos espectros de UV/Visível dos dois isômeros de β -caroteno com o próprio β -caroteno e entre si (Figura 41).

A presença dos isômeros do tipo *cis* pode ser explicada por ocorrência natural devido a própria biossíntese dos organismos vegetais, em que apresentam substâncias com grande diversidade estrutural. Outra possível justificada foi o emprego de sílica gel como adsorvente na etapa de purificação do extrato. Como a presente pesquisa de doutorado envolvia uma busca não-direcionada a subclasses específicas de metabólitos secundários, optou-se pelo emprego da técnica clássica com coluna com fase estacionária sílica gel. Levando em consideração a alta susceptibilidade de degradação dos carotenoides pela extensa cadeia insaturada (maior deslocalização eletrônica), a adsorção em uma fase estacionária composta por um óxido de caráter ácido favorece a isomerização dos carotenoides *todo-trans* para a forma *cis* durante o processo de purificação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Logo, devido a observação da co-eluição dos isômeros junto aos constituintes majoritários, foi executado também o novo método de extração, conforme relatado anteriormente, e, mediante a obtenção de uma melhor resolução cromatográfica, fez-se a quantificação dos teores de cada carotenoides por normalização de áreas. As concentrações estão detalhadas na Tabela 11.

Tabela 11. Teores de carotenoides, em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, encontrados em folhas de Myrtaceae spp.

		<i>Eugenia copacabanensis</i>	<i>Myrciaria tenella</i>
Carotenoides			
50	Luteína	6,40 \pm 1,98	13,26 \pm 3,15
51	α -caroteno	6,52 \pm 0,62	17,15 \pm 0,8
52	β -caroteno	8,29 \pm 0,84	12,97 \pm 0,62
53	13- <i>cis</i> - β -caroteno	0,47 \pm 0,05	0,82 \pm 0,04
54	9- <i>cis</i> - β -caroteno	1,33 \pm 0,14	2,16 \pm 0,12

Quanto aos teores, foi observado uma composição majoritária dos carotenos β - e α -caroteno e da xantofila luteína para as folhas das duas espécies estudadas. Os β - e α -caroteno são carotenoides comuns em tecidos vegetais, sendo as primeiras substâncias formadas na biossíntese através de reações de ciclização nas duas extremidades da cadeia carbônica linear do licopeno e formação dos anéis do tipo ionona. Por consequência, a luteína consiste em uma das xantofilas mais comuns em tecidos vegetais, obtidas metabolicamente após reações de oxidação, sobretudo do α -caroteno. Além disso, este carotenoide está associado a clorofila, sendo observados normalmente teores elevados nas folhas (PACHECO, 2009, 2014).

3.2. Identificação dos Constituintes das Frações Polares do Extrato de Folhas de Myrtaceae spp.

3.2.1. Desreplicação por CLAE-DAD das frações polares do extrato de folhas de Myrtaceae spp.

Para as frações mais polares, isto é, as partições em diclorometano, em acetato de etila e em butanol, foi aplicada inicialmente a estratégia de desreplicação através de análise por CLAE-DAD. Como a família Myrtaceae é reconhecida pela presença de substâncias fenólicas, foi empregada uma investigação direcionada para derivados de ácidos fenólicos (ácidos benzoicos e cinâmicos) e flavonoides (flavan-3-óis, flavonóis, flavanonas e flavonas). Procedeu-se a comparação com a biblioteca local do Laboratório de Cromatografia Líquida, atualizada pelo presente autor e disponível no Anexo I.

Além do tempo de retenção no método cromatográfico, os espectros de absorção na região do ultravioleta e visível para cada substância, incluindo as bandas de absorção presentes e suas respectivas intensidades, foram fundamentais para a proposta de identificação. Foram observados o padrão de três comportamentos espectrais (Figura 42): (a) analitos com bandas de absorção na região UVC, com valores entre 255-275 nm; (b) analitos com bandas de absorção na região UVB, com valores entre 308-330 nm; e (c) analitos com duas bandas de absorção, a primeira (banda I) entre 250-270 nm e a segunda (banda II) entre 345-370 nm, já na região UVA. O primeiro padrão sugere a presença de cromóforos aromáticos com substituintes carbonílicos, o mesmo fato observado nos espectros dos padrões de derivados de ácidos benzóicos. Para o segundo padrão observado, é verificado um deslocamento batocrômico pelo efeito de extensão de conjugação em cromóforos aromáticos carbonilados, como os derivados de ácido cinâmico (SISA et al., 2010; PAVIA et al., 2016).

O último padrão de espectro UV/Visível é compatível aos flavonóis, uma subclasse dos flavonoides que apresenta estrutura química do tipo 2-arilcromano (2-aril-benzopirano), com grupos hidroxila e carbonila, respectivamente, em C-3 e C-4 e a ligação dupla entre C-2 e C-3. Nestes metabólitos, é observada uma diminuição do *gap* de energia entre os orbitais moleculares HOMO e LUMO e uma elevada deslocalização dos elétrons destes orbitais de fronteira ao longo de toda porção flavonoidica, o que explica o surgimento da banda II (BILER et al., 2017). Além disso, os grupos substituintes contribuem para variações no comprimento de onda referente a banda II, como os deslocamentos batocrômicos de acordo com o padrão de hidroxilação do anel B, ou os grupamentos ligados ao C-3, em especial a glicosilação, que provoca deslocamento hipsocrômico e é geralmente observada nos flavonoides de ocorrência natural (SISA et al., 2010; ANOUAR et al., 2012; BILER et al., 2017).

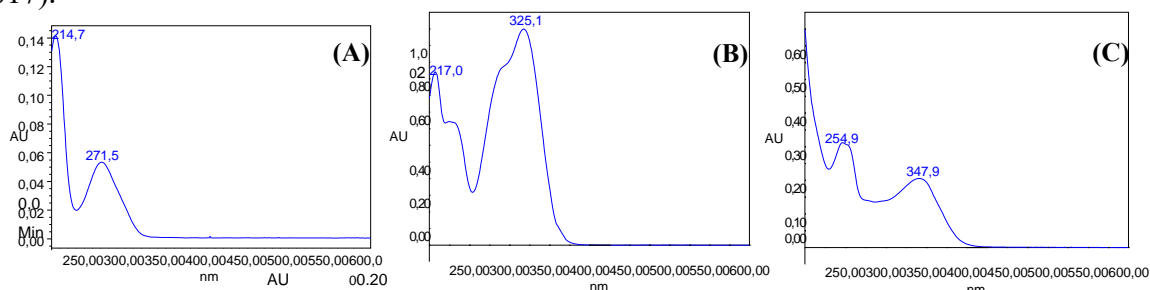


Figura 42. Principais espectros UV/Vis encontrados nos extratos de Myrtaceae spp.

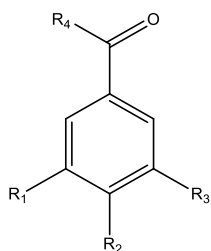
Portanto, a partir destes dados, a identificação de um total de quatorze substâncias fenólicas foi proposta nas partições de folhas de Myrtaceae spp., sendo dispostos na Tabela 12. Todas as estruturas químicas das substâncias fenólicas estão descritas na Figura 43.

Tabela 12. Proposta de identificação por CLAE-DAD de substâncias fenólicas em partições de folhas de *Myrtaceae spp.*

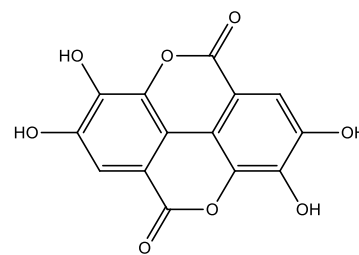
N	Substância	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	EFEC-D	EFEC-Ac	EFEC-Bu	EFMT-D	EFMT-Ac	EFMT-Bu
<i>Derivados do Ácido Benzoico</i>									
55	Ácido gálico	2,1	215,8/270,3	X	X	X	X	X	X
56	Ácido protocatecuico	3,7	259,6/294,1	X			X		
57	Ácido <i>p</i> -hidróxibenzoico	6,3	254,9	X			X		
58	Galato de metila	7,3	215,8/271,5	X	X	X	X	X	
59	Ácido siríngico	10,4	217,0/273,8		X		X	X	
60	Ácido elágico	16,6	252,5/364,4	X	X	X	X	X	X
<i>Derivados do Ácido Cinâmico</i>									
61	Ácido 3-O-cafeoilquínico – Ácido clorogênico	9,6	217,0/325,1	X	X	X			
62	Ácido <i>p</i> -cumárico	12,2	226,5/309,6				X		
<i>Flavonoides</i>									
63	(+)-catequina*	8,7	278,6						
64	(-)-epicatequina	11,1	278,6	X	X	X			
65	Quercetina 3- <i>O</i> -galactosídeo – Hiperosídeo	17,2	254,9/353,9	X	X		X	X	
66	Quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo – Isoquercitrina	17,5	254,9/352,7				X	X	X
67	Quercetina 3- <i>O</i> -rhamnosídeo – Quercitrina	19,6	254,9/347,9	X	X		X	X	
68	Quercetina*	22,8	254,9/364,4						

X indica a presença na partição do extrato bruto; *Substância identificada apenas pelo método quantitativo por CLAE-DAD (subtópico 3.2.2).

DERIVADOS DE ÁCIDO BENZOICO

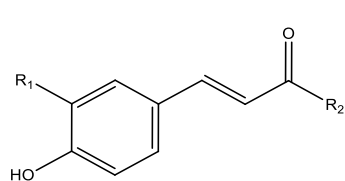


- $R_1=R_2=R_3=R_4=OH$ (55) Ácido gálico
 $R_1=R_2=R_4=OH, R_3=H$ (56) Ácido protocatecuico
 $R_2=R_4=OH, R_1=R_3=H$ (57) Ácido *p*-hidróxibenzoico
 $R_1=R_2=R_3=OH, R_4=OCH_3$ (58) Galato de metila
 $R_1=R_3=OCH_3, R_2=R_4=OH$ (59) Ácido siringico

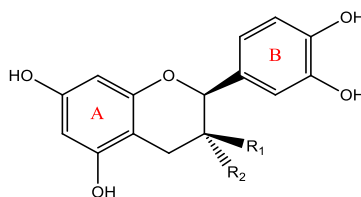


(60) Ácido elágico

DERIVADOS DE ÁCIDO CINÂMICO FLAVAN-3-ÓIS

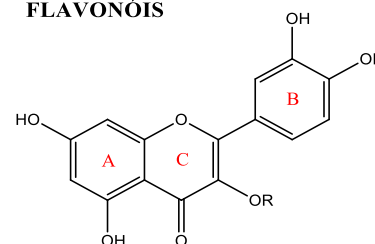


- $R_1=OH, R_2=O$ -quinoil (61) Ácido clorogênico
 $R_1=H, R_2=OH$ (62) Ácido *p*-cumárico



- $R_1=H, R_2=OH$ (63) (+)-catequina
 $R_1=OH, R_2=H$ (64) (-)-epicatequina

FLAVONÓIS



- $R=Galactosil$ (65) Quercetina 3-*O*-galactosídeo
 $R=Glicosil$ (66) Quercetina 3-*O*-glicosídeo
 $R=Rhamnosil$ (67) Quercetina 3-*O*-rhamnosídeo
 $R=H$ (68) Quercetina

Figura 43. Estruturas químicas das substâncias fenólicas identificadas por CLAE-DAD em folhas de *Myrtaceae spp*, com diferenciação por letras maiúsculas nos anéis dos flavonoides.

Quanto as substâncias para cada espécie investigada, resultados similares foram observados. Cerca de dez substâncias foram observadas especificamente nas partições de *E. copacabanensis* pela metodologia proposta, conforme a Figura 44: seis derivados de ácidos benzoicos (ácido gálico, 55; ácido protocatecuico, 56; ácido *p*-hidróxibenzoico, 57; galato de metila, 58; ácido siringico, 59; e ácido elágico, 60), um derivado de ácido cinâmico (ácido 3-*O*-cafeoilquínico – ácido clorogênico, 61), um flavan-3-ol ((-)-epicatequina, 64), e dois flavonóis glicosilados (quercetina 3-*O*- β -D-galactosídeo – hiperosídeo, 65; e quercetina 3-*O*- α -L-rhamnosídeo – quercitrina, 67).

Todas estas substâncias foram relatadas pela primeira vez para a espécie *E. copacabanensis*. Em relação ao trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, Junior et al. (2014) isolaram outras substâncias fenólicas diretamente dos extratos de folhas e galhos desta espécie, como os flavonóis kaempferol-3-*O*- β -D-rhamnosídeo, quercetina-3-*O*- α -L-arabinosídeo e quercetina, e cumaratos de alquila. A presença de derivados glicosilados de flavonóis é um aspecto característico do gênero *Eugenia*, sendo observado também em outras espécies como *E. brasiliensis*, *E. dysenterica* e *E. umbelliflora* (VITEK et al., 2017; DE SOUZA et al., 2018).

Ainda de acordo com os cromatogramas disponibilizados na Figura 44, foi possível também indicar os picos majoritários de cada partição de *E. copacabanensis* através da análise por CLAE-DAD. Para EFEC-D e EFEC-Bu, os constituintes majoritários foram, respectivamente, o galato de metila (58; t_R 7,9 min; $\lambda_{máx}$ 215,8/271,5 nm) e o ácido clorogênico (61; t_R 9,9 min; $\lambda_{máx}$ 217,0/325,1 nm). Estas duas substâncias foram observadas em todas as partições analisadas, bem como os ácidos gálico e elágico e o flavan-3-ol (-)-epicatequina. A partição em acetato de etila das folhas de *E. copacabanensis* (EFEC-Ac) apresentou sinais intensos para o ácido elágico (60; t_R 16,6 min; $\lambda_{máx}$ 252,5/364,4 nm) e quercitrina (67; t_R 19,6 min; $\lambda_{máx}$ 254,9/347,9 nm).

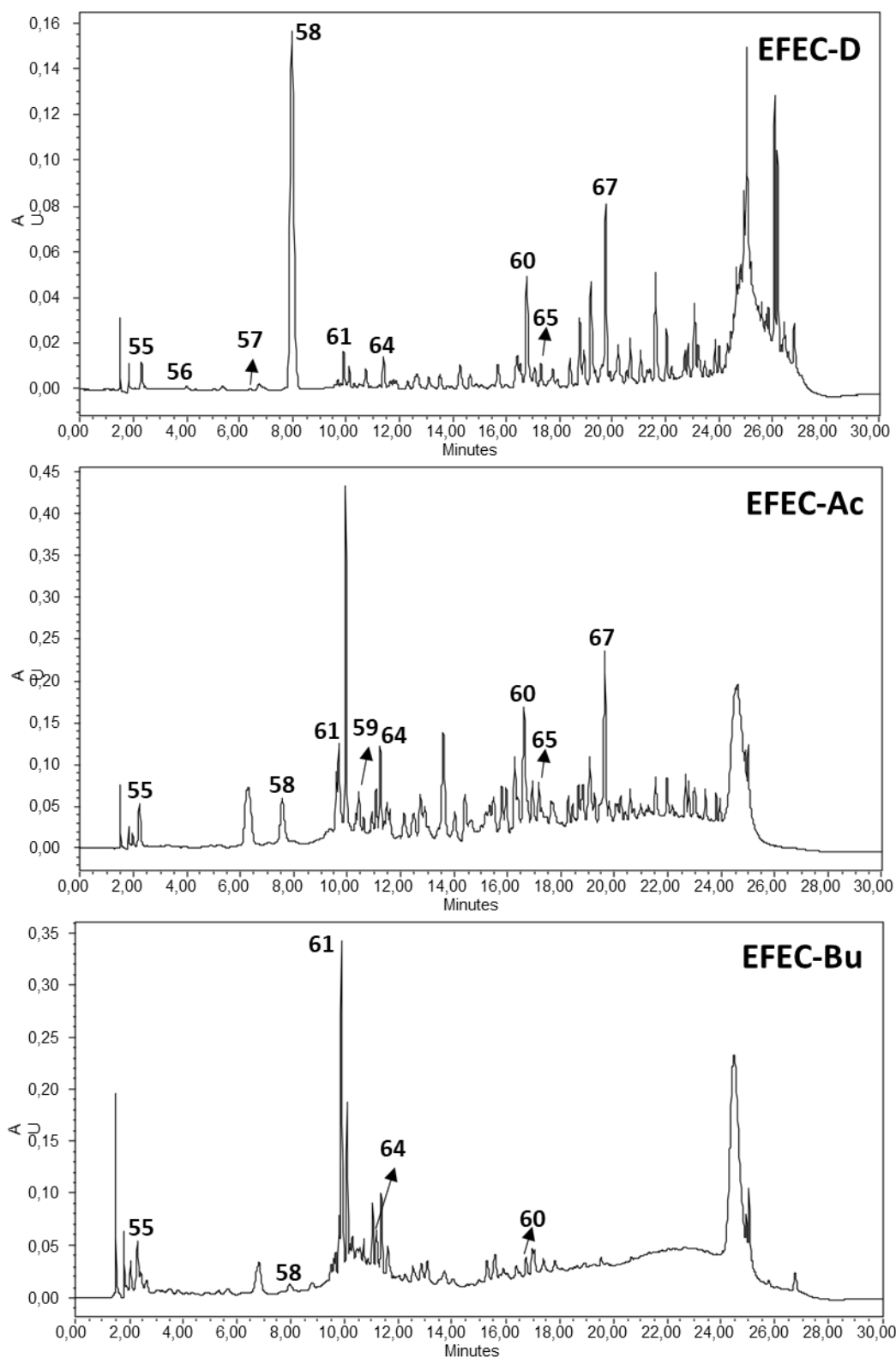


Figura 44. Cromatogramas por CLAE-DAD das partições EFEC-D, EFEC-Ac e EFEC-Bu, com as substâncias identificadas: ácido gálico (55), ácido protocatecuico (56), ácido *p*-hidróxibenzoico (57), galato de metila (58), ácido siríntrico (59), ácido elágico (60) ácido clorogênico (61), (-)-epicatequina (64), hiperosídeo (65) e quercitrina (67).

Entretanto, todos os cromatogramas apresentaram um número razoável de picos em que, através da metodologia empregada, não foi possível fazer propostas de estruturas químicas. Com exceção do pico com t_R 10,0 min ($\lambda_{m\acute{a}x}$ 214,7/256,1 nm) no cromatograma da partição EFEC-Ac, estes picos em sua maioria possuíram intensidade baixa a média. Quanto aos dados espectroscópicos, foi observado que, em sua maioria, estes apresentaram espectros UV/Visível próximos ao padrão (c) observado inicialmente, com bandas de absorção em 255 e 347 nm, indicando possíveis derivados glicosilados de quercetina. Além disso, outros espectros apresentaram banda de absorção em 278 nm, similar aos espectros apresentados pelos padrões analíticos de flavan-3-óis (+)-catequina e (-)-epicatequina. Esta absorção em comprimento de onda inferior aos flavonóis é facilmente explicada pela ausência do grupo oxo na posição C-4 e também da ligação dupla entre C-2 e C-3, que resulta num deslocamento hipsocrômico pelo maior *gap* de energia necessário para as transições eletrônicas nos orbitais de fronteira. Além disso, a quiralidade dos carbonos C-2 e C-3 possibilita a formação de 4 isômeros ópticos, porém com espectros UV/Vis similares, como constatados na análise dos padrões analíticos (SISA et al., 2010; BILER et al., 2017). Estas observações sugerem que as folhas de *E. copacabanensis* apresentam uma série de flavonoides com diversidade estrutural em sua composição química, como as catequinas nas formas livres ou esterificadas e outros flavonóis glicosilados, que são reconhecidos por inúmeras atividades biológicas (GADKARI; BALARAMAN, 2015; ISEMURA, 2019; SANTIAGO et al., 2020). Além disso, o emprego de outras técnicas analíticas hifenadas e/ou a purificação das partições em sistemas cromatográficos pode ainda contribuir na proposta de identificação destas substâncias.

Quanto ao estudo das partições de *M. tenella*, foram propostas a identificação de 10 substâncias fenólicas: seis derivados de ácidos benzoicos (ácido gálico, **55**; ácido protocatecuico, **56**; ácido *p*-hidróxibenzoico, **57**; galato de metila, **58**; ácido siríngico, **59**; e ácido elágico, **60**), um derivado de ácido cinâmico (ácido *p*-cumárico, **62**), e três flavonóis glicosilados (quercetina 3-*O*- β -D-galactosídeo – hiperosídeo, **65**; quercetina 3-*O*- α -L-glicosídeo – isoquercitrina, **66**; e quercetina 3-*O*- α -L-rhamnosídeo – quercitrina, **67**). Os cromatogramas das análises por CLAE-DAD das partições EFMT-D, EFMT-Ac e EFMT-Bu estão disponíveis na Figura 45.

Tal qual para a espécie *E. copacabanensis*, todas as substâncias foram relatadas pela primeira vez para na espécie *M. tenella*. Em geral, estas substâncias fenólicas já foram relatadas para extratos de folhas de outras espécies do gênero *Myrciaria*, como os flavonóis glicosilados derivados de quercetina, miricetina e kaempferol presentes na *M. cauliflora* e derivados do ácido elágico para *M. dubia* (BORGES et al., 2014). De maneira similar, Ribeiro et al. (2019) recentemente identificaram a presença de rutina em um extrato etanólico de folhas de *M. tenella*.

Em uma avaliação em relação aos picos majoritários, é válido ressaltar que na partição EFMT-Ac os seus variados constituintes majoritários observados foram o ácido gálico (**55**; t_R 2,1 min; $\lambda_{m\acute{a}x}$ 215,8/270,3 nm), o ácido elágico (**60**; t_R 16,6 min; $\lambda_{m\acute{a}x}$ 252,5/364,4 nm), a quercetina 3-*O*-galactosídeo (**65**; t_R 17,2 min; $\lambda_{m\acute{a}x}$ 254,9/353,9 nm) e a quercetina 3-*O*-glicosídeo (**66**; t_R 9,9 min; $\lambda_{m\acute{a}x}$ 254,9/352,7 nm). Nesta mesma partição, outros picos não foram identificados através da desreplicação por CLAE-DAD. Em geral, os espectros UV/Visível destes picos foram similares aos dos derivados de quercetina (bandas de absorção em 255 e 347 nm) e principalmente do ácido elágico (bandas de absorção em 250 e 364 nm). De maneira similar ao estudo das partições de folhas de *E. copacabanensis*, a identificação direta por comparação dos dados cromatográficos e espectroscópicos tornou-se limitada pela ausência de padrões analíticos comerciais destes derivados fenólicos, sendo necessárias outras etapas de purificação e/ou uso de outras estratégias de desreplicação como análises por CLAE-EM.

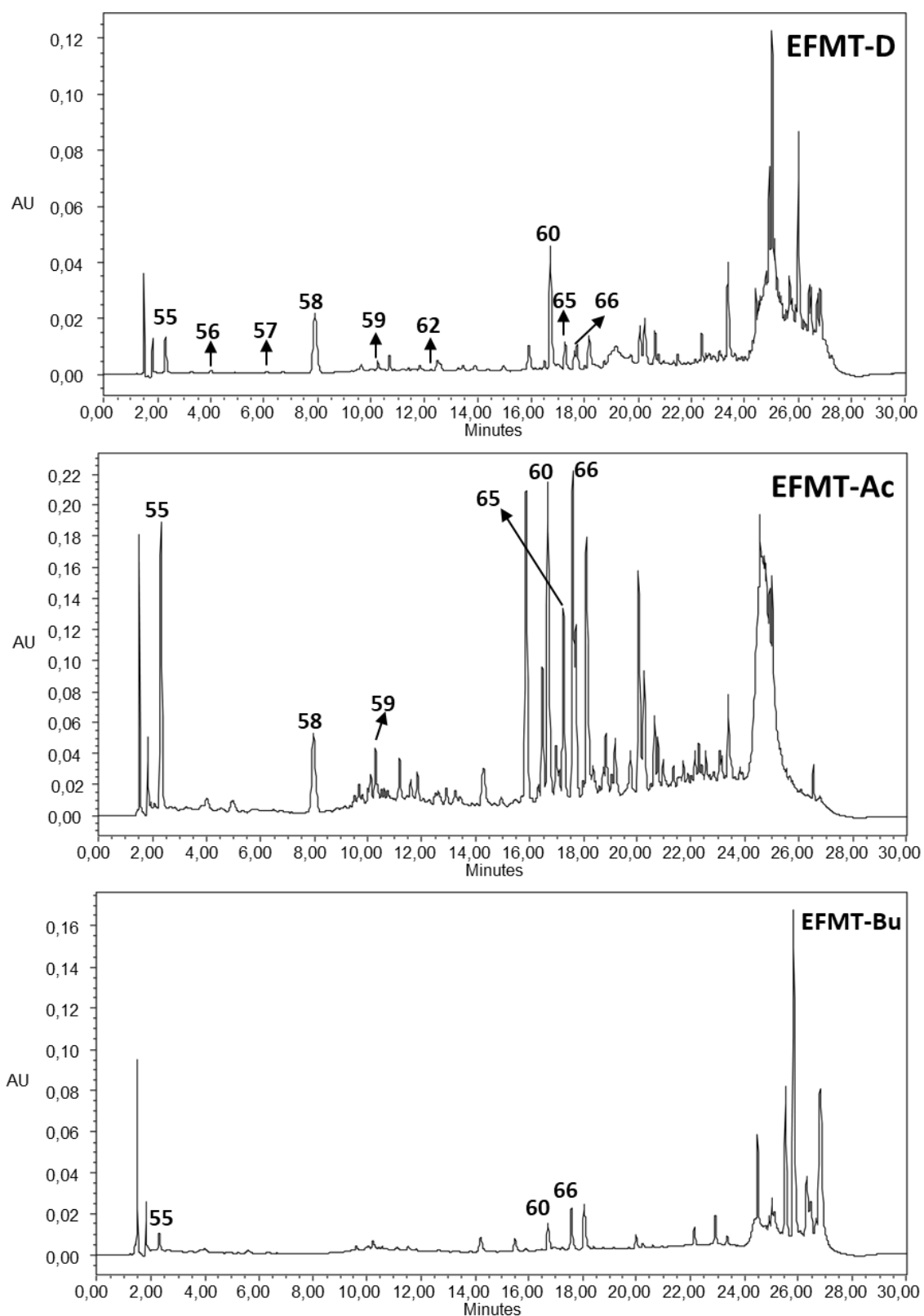


Figura 45. Cromatogramas por CLAE-DAD das partições EFMT-D, EFMT-Ac e EFMT-Bu, com as substâncias identificadas: ácido gálico (55), ácido protocatecuico (56), ácido *p*-hidróxibenzoico (57), galato de metila (58), ácido siríngico (59), ácido elágico (60), ácido *p*-hidróxibenzoico (62), hiperosídeo (65) e isoquercitrina (66).

- ✓ Logo, foi dada continuidade no presente trabalho por duas linhas de investigação:
- ✓ a primeira consistiu na quantificação por padronização externa das substâncias fenólicas das folhas de *Myrtaceae spp.* a partir de metodologia por CLAE-DAD;
- ✓ e a segunda consistiu na análise de todos os extratos e partições por desreplicação em um equipamento CLAE-DAD-EM disponível no IQ/UFRRJ. Foram analisados também as frações obtidas após a purificação em coluna de sílica gel e posterior coluna de Sephadex das partições em acetato de etila (EFEC-Ac e EFMT-Ac).

3.2.2. Determinação Quantitativa de Flavonoides e Ácidos Fenólicos em Folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella*

Para uma quantificação mais exata das substâncias fenólicas previamente identificadas, procedeu-se uma nova extração de acordo com a metodologia própria do Laboratório de Cromatografia Líquida, da Embrapa Agroindústria de Alimentos. As frações livres e hidrolisadas de folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella* (respectivamente, EC-L, EC-H, MT-L e MT-H) foram analisadas por CLAE-DAD, nas mesmas condições cromatográficas anteriores, e a quantificação performada por padronização externa. Os teores das substâncias identificadas estão descritos na Tabela 13. Os cromatogramas obtidos para cada espécie estão disponíveis na Figura 46. Além disso, a Figura 47 compara os espectros de UV/Visível dos analitos e dos padrões analíticos, indicando a identidade de cada substância fenólica.

Tabela 13. Teores de substâncias fenólicas, em $\mu\text{g.g}^{-1}$, em folhas de *Myrtaceae spp.*

<i>Ácidos Fenólicos</i>	<i>Eugenia copacabanensis</i>		<i>Myrciaria tenella</i>	
	EC-L	EC-H	MT-L	MT-H
Ácido clorogênico	1511,92 ± 264,33	-	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	-	35,84 ± 19,36	-	30,21 ± 19,60
Ácido elágico	729,69 ± 124,18	-	636,10 ± 142,64	16,82 ± 2,94
Flavonoides				
(+)-catequina	-	715,08 ± 52,83	-	173,92 ± 48,81
(-)-epicatequina	-	200,23 ± 11,92	-	52,77 ± 15,97
Quercetina 3- <i>O</i> -galactosídeo (Hiperosídeo)	357,27 ± 43,97	-	285,44 ± 53,77	47,68 ± 3,68
Quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo (Isoquercitrina)	103,20 ± 17,70	-	429,15 ± 192,18	-
Quercitrina	768,08 ± 113,97	75,25 ± 9,75	-	-
Quercetina	-	-	35,21 ± 5,94	-

Quanto aos teores, a fração livre de folhas de *E. copacabanensis* (EC-L) apresentou elevado teor de ácido clorogênico ($1511,92 \mu\text{g.g}^{-1}$), quercitrina ($768,68 \mu\text{g.g}^{-1}$) e ácido elágico ($729,69 \mu\text{g.g}^{-1}$). Como já observado anteriormente, outros derivados de quercetina também apresentaram teores médios, como os derivados com padrão de substituição em C-3 de galactose e glicose, com, respectivamente, $357,27$ e $103,20 \mu\text{g.g}^{-1}$. Para a fração hidrolisada (EC-H), destacam-se a presença de flavanóis e do ácido *p*-cumárico, com alto teor da (+)-

catequina (715,08 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). O flavonoide quercitrina também foi detectado na fração EC-H, com teor cerca de 10 vezes menor em relação a fração EC-L (75,25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Sobre as frações de folhas de *M. tenella*, a fração MT-L apresentou como constituintes majoritários o ácido elágico (636,10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e os flavonóis quercetina 3-*O*-glicosídeo (429,15 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e quercetina 3-*O*-galactosídeo (285,44 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). A aglicona quercetina também foi observada na fração MT-L, em baixo teor (35,21 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Similar a fração hidrolisada EC-H, os teores de (+)-catequina (173,92 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), (-)-epicatequina (52,77 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e ácido *p*-cumárico (30,21 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) também foram determinados na fração hidrolisada MT-H. O flavonol quercetina 3-*O*-galactosídeo (47,68 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e o ácido elágico (16,82 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) também foram detectados após a etapa de hidrólise.

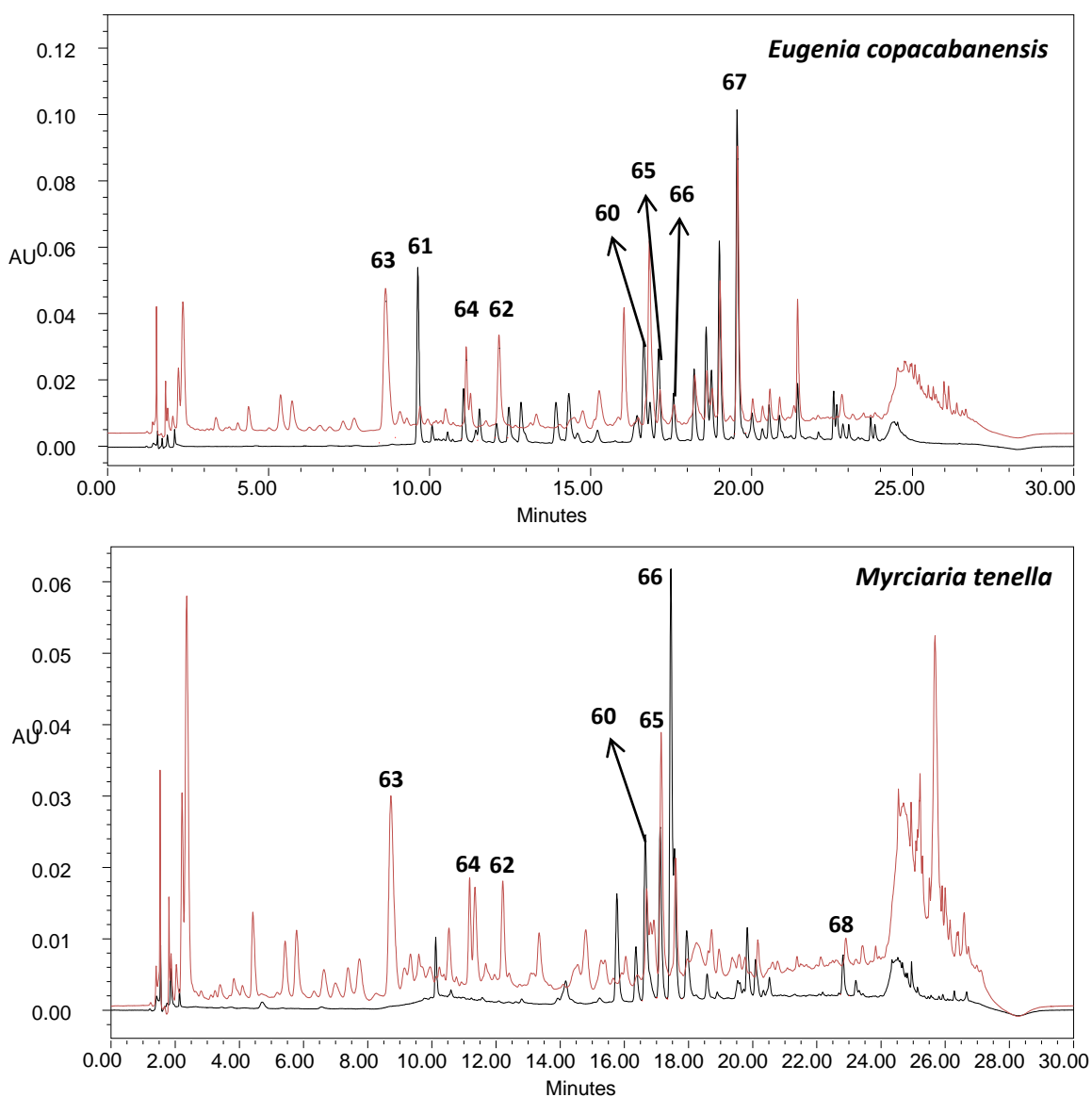


Figura 46. Cromatograma por CLAE-DAD das frações livres (em preto, 370 nm) e hidrolisadas (em vermelho, 270 nm) de folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella*, com as substâncias identificadas: ácido elágico (60), ácido clorogênico (61), ácido *p*-cumárico (62), (+)-catequina (63), (-)-epicatequina (64), hiperosídeo (65), isoquercitrina (66), quercitrina, (67) e quercetina (68).

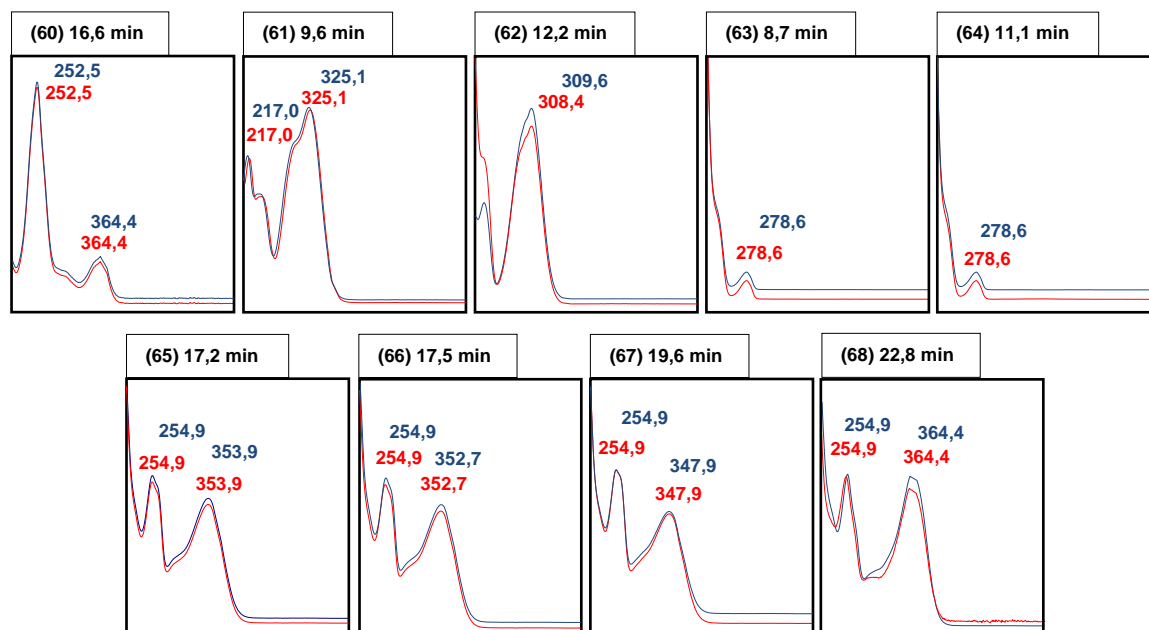


Figura 47. Comparação entre espectros de UV das substâncias fenólicas encontradas em folhas de *Myrtaceae spp.* (em vermelho) e dos padrões analíticos (em azul): ácido elágico (60), ácido clorogênico (61), ácido *p*-cumárico (62), (+)-catequina (63), (-)-epicatequina (64), hiperosídeo (65), isoquercitrina (66), quercitrina (67) e quercetina (68).

A presença de determinadas substâncias fenólicas nas frações hidrolisadas, como os flavanóis (+)-catequina e (-)-epicatequina e o ácido *p*-cumárico, sugere que as substâncias fenólicas encontradas naturalmente nas folhas destas espécies possam estar ligadas covalentemente, principalmente através de funções oxigenadas, com outras substâncias. Este fato é comum em metabólitos secundários, como nas classes dos taninos condensados e ainda nos derivados acilados de flavonoides (ligados a ácidos fenólicos ou outros ácidos orgânicos). A etapa de hidrólise foi eficiente para romper estas ligações e contribuir para a identificação destas substâncias na forma livre através de análise por CLAE-DAD.

Todos os resultados de caracterização por CLAE-DAD dos extratos e frações de folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella* foram publicados no ano de 2021 em um artigo científico no periódico *Chemistry & Biodiversity* (MARTINS et al., 2021). Os próximos resultados das análises por CLAE-DAD-EM contribuem para a confirmação destes resultados iniciais.

3.2.3. Desreplicação por CLAE-DAD-EM dos extratos e frações de folhas de *Eugenia copacabanensis*

Novas análises instrumentais foram realizadas pelo presente autor em um sistema CLAE-DAD-EM, disponibilizado pela professora Dra. Rosane N. Castro no IQ/UFRRJ. Foram avaliadas todas as frações contendo substâncias fenólicas, isto é, EFEC-D, EFEC-Ac, EFEC-Bu, EC-L e EC-H. Além disso, aliados aos perfis cromatográficos observados anteriormente no sistema CLAE-DAD, as frações obtidas a partir da coluna de Sephadex com a partição EFEC-Ac foram analisadas paralelamente, contribuindo para a proposta final de identificação das substâncias fenólicas presentes nas folhas de *E. copacabanensis*. A Tabela 14 apresenta todas as substâncias propostas para os extratos e as frações de folhas da espécie, por comparação dos dados cromatográficos (tempos de retenção nos dois sistemas hifenados empregados no presente estudo) e espectroscópicos (espectros de UV, espectros de massas e íons moleculares/moléculas desprotonadas). Os resultados para as frações da partição EFEC-Ac serão discutidos no próximo subtópico.

A desreplicação por CLAE-DAD-EM possibilitou a confirmação de 11 substâncias fenólicas previamente identificadas pelo sistema CLAE-DAD em extratos de folhas de *E. copacabanensis*, exceto o ácido siríngico e o flavonoide hiperosídeo. Além destes, foi proposta a identificação de mais 22 substâncias fenólicas, divididas em diferentes classes metabólicas, resultando em um total de 33 substâncias identificadas.

Entre as classes observadas, foi confirmada a presença de ácidos fenólicos, como os derivados de ácidos benzoico e cinâmico. A análise por CLAE-DAD-EM corroborou alguns resultados prévios, como a presença majoritária do ácido 3-*O*-cafeoilquínico (m/z para $[M - H]^-$ 354, **61**), conhecido comercialmente como o ácido clorogênico. Este foi detectado em todas as frações EC-L, EFEC-D, EFEC-Ac e EFEC-Bu, exceto a fração hidrolisada, apresentando elevada intensidade na fração livre e na partição butanólica do extrato metanólico de folhas de *E. copacabanensis*. Além disso, foi observado na partição EFEC-D um derivado metílico do ácido clorogênico (**69**) em t_R superior na análise cromatográfica, em que o espectro de UV/Visível apresenta as mesmas duas bandas de absorção do ácido clorogênico, referente a região do UVB em 300-330 nm para ácidos cinâmicos, e a razão m/z da molécula desprotonada ($[M - H]^-$) de 368 indica um acréscimo de 14 Da. A Figura 48 apresenta os espectros UV/Vis e de massas, indicando os íons formados, para as duas substâncias identificadas.

Os demais ácidos fenólicos já tinham sido detectados anteriormente, como, por exemplo, o ácido *p*-cumárico sendo proposto mais uma vez apenas na fração hidrolisada EC-H e sugerindo a sua presença na matriz vegetal através de ligação covalente com outros metabólitos secundários como, por exemplo, flavonoides acilados.

A desreplicação por CLAE-DAD-EM também permitiu a proposta de identificação de diferentes taninos hidrolisáveis e condensados, em que os dados espectroscópicos por EM complementaram as informações preliminares do detector de arranjo de diodos. O ácido gálico, um dos mais simples ácidos fenólicos obtidos na via do chiquimato, é responsável pela formação de duas subclasses de taninos hidrolisáveis. Os galotaninos são ésteres de ácido gálico com polialcoóis, sobretudo a glicose, enquanto os elagitaninos também são ésteres de glicose porém com ácido hexahidróxidifenílico, formado a partir do acoplamento oxidativo entre unidades de ácido gálico (DEWICK, 2009). Nos extratos e partições de folhas de *E. copacabanensis*, foi proposta a identificação de um galotanino (digaloilhexose, **79**) e três elagitaninos (dois isômeros de strictinina – galoil-hexahidro-difenil-hexose, **78** e **80**, e isômero da tellimagrandina I - digaloil-hexahidro-difenil-hexose, **81**), em que os espectros de UV/Vis apresentam bandas de absorção similares aos do ácido gálico (Figura 49 e Figura 50). O galato de metila (**58**) também foi detectado como um dos componentes majoritários das partições EFEC-D e EFEC-Ac. A comparação deste resultado com a fração livre EC-L e o destaque para o ácido gálico (**55**) sugere que o galato de metila possa ser um artefato do processo extrativo clássico de maceração empregado no presente trabalho. Esta possibilidade foi observada para os ésteres metílicos de ácidos graxos, em que grupos carboxílicos presentes nas moléculas podem sofrer reação de transesterificação na presença de solventes alcoólicos (MALTESE et al., 2009).

Quanto aos taninos condensados, estes são considerados pequenos polímeros das catequinas ou flavan-3-óis (DEWICK, 2009). A diversidade estrutural ocorre através da ligação das catequinas com outros metabólitos, como unidades hexosídicas ou galoídicas, ou pela condensação entre flavan-3-óis. As folhas de *E. copacabanensis* demonstraram uma variedade de substâncias com espectros de UV/Vis similar aos dos padrões de (+)-catequina e (-)-epicatequina. No presente trabalho, através da comparação com a literatura das razões m/z das moléculas desprotonadas, foi proposta a identificação de oito derivados de catequinas e taninos condensados, com destaque para os isômeros de procianidina tipo B, o acoplamento do tipo C-C e a perda de 2 Da observadas para os dímeros de catequina (Figura 51).

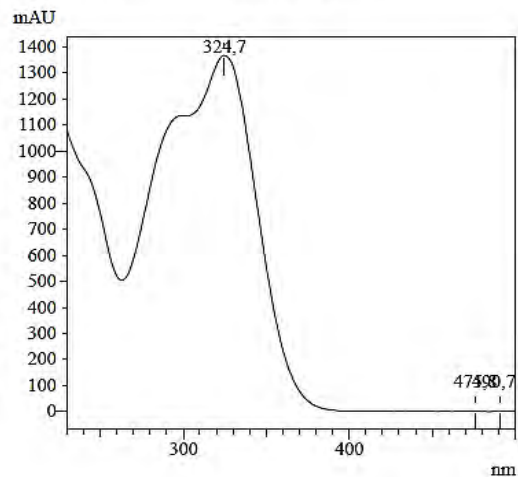
Tabela 14. Proposta de identificação de substâncias, através de desreplicação por CLAE-DAD-EM, nos extratos/frações de folhas de *E. copacabanensis*.

N	Substância (Fórmula Molecular)	t _R (min): CLAE-DAD-EM (CLAE-DAD)	UV (máx)	MM (g/mol)	[M – H] ⁻	Extrato/Fração (Em negrito, quando majoritário)
<i>Ácidos fenólicos</i>						
55	Ácido gálico (C ₇ H ₆ O ₅)	2,8 (2,1)	215,7/ 270,3	170	169	EC-L; EC-H; EFEC-D; EFEC-Ac; EFEC-Bu
56	Ácido protocateuico (C ₇ H ₆ O ₄)	6,2 (4,0)	258,4/ 294,1	154	-	EFEC-D
57	Ácido <i>p</i> -hidróxibenzoico (C ₇ H ₆ O ₃)	10,0 (6,7)	254,9	138	-	EFEC-D
61	Ácido clorogênico (C ₁₆ H ₁₈ O ₉)	10,7 (9,6)	217,0/ 325,1	354	353	EC-L; EFEC-D; EFEC-Ac; EFEC-Bu
62	Ácido <i>p</i> -cumárico (C ₉ H ₈ O ₃)	16,4 (12,2)	308,4	136	-	EC-H
69	Derivado metílico do ácido clorogênico (C ₁₇ H ₂₀ O ₉)	17,8 (-)	217,0/ 325,8	368	367	EFEC-D
<i>Flavan-3-óis ou Catequinas/Taninos Condensados</i>						
63	(+)-catequina (C ₁₅ H ₁₄ O ₆)	10,6 (8,6)	278,6	290	289	EC-H
70	Isômero procianidina tipo B (C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂)	11,8 (10,4)	277,9	578	577	EC-L; EFEC-Ac
64	(-)-epicatequina (C ₁₅ H ₁₄ O ₆)	13,4 (11,1)	278,6	290	289	EC-L; EC-H; EFEC-D; EFEC-Ac; EFEC-Bu
71	Isômero 3-galoil procianidina tipo B (C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆)	15,6 (12,6)	208,2/ 274,2	730	729	EC-L; EFEC-Ac
72	Derivado catequínico 449	16,5 (-)	202,6/ 273,9	450	449	EC-L
73	Derivado catequínico 463	16,7 (-)	202,9/ 273,9	464	463	EC-L; EFEC-Ac
74	Isômero hexosil procianidina tipo B (C ₃₆ H ₃₆ O ₁₇)	17,8 (14,9)	278,6	740	739	EC-L; EFEC-Ac

75	Isômero 3,3'-digaloil procianidina tipo B (C ₄₄ H ₃₄ O ₂₀)	18,1 (15,7)	204,1/ 275,5	882	881	EFEC-Ac
76	Isômero (-)-epicatequina galato (C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀)	18,9 (16,1)	203,4/ 275,9	442	441	EC-L; EC-H; EFEC-Ac; EFEC-Bu
77	Isômero hexosil catequina (C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁)	23,1 (21,4)	278,8	452	451	EFEC-D
<i>Derivados Ácido Gálico/Taninos Hidrolisáveis</i>						
78	Isômero strictinina (C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈)	9,6 (6,4)	205,3/ 257,4	634	633	EC-L; EFEC-Ac; EFEC-Bu
79	Digaloil hexose (C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄)	10,2 (9,6)	207,0/ 274,7	484	483	EC-L; EFEC-Ac
58	Galato de Metila (C ₈ H ₈ O ₅)	10,6 (7,9)	215,8/ 270,3	184	183	EFEC-D; EFEC-Ac
80	Isômero strictinina (C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈)	10,7 (9,9)	205,5/ 256,1	634	633	EC-L; EFEC-Bu
81	Isômero tellimagrandina I (C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂)	16,2 (13,6)	207,2/ 272,1	786	785	EC-L; EFEC-Ac
60	Ácido elágico (C ₁₄ H ₆ O ₈)	18,4 (16,6)	252,5/ 364,4	302	301	EC-L; EFEC-D; EFEC-Ac; EFEC-Bu
<i>Flavonóis Glicosilados</i>						
66	Quercetina 3-O-glicosídeo – Isoquercitrina (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂)	19,4 (17,5)	254,9/ 352,7	464	463	EFEC-D; EFEC-Ac
82	Isômero quercetina pentosídeo (C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁)	20,0 (-)	255,3/ 352,4	434	433	EFEC-D; EFEC-Ac
83	Isômero quercetina pentosídeo (C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁)	20,4 (-)	255,3/ 352,4	434	433	EFEC-D; EFEC-Ac
84	Isômero quercetina pentosídeo (C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁)	20,8 (-)	254,9/ 351,6	434	433	EC-L; EC-H; EFEC-D; EFEC-Ac
67	Quercetina 3-O-rhamnosídeo – Quercitrina (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁)	21,2 (19,6)	254,9/ 347,9	448	447	EC-L; EC-H; EFEC-D; EFEC-Ac
85	Isômero kaempferol pentosídeo (C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀)	21,6 (-)	265,1/ 345,9	418	417	EFEC-D; EFEC-Ac

86	Isômero kaempferol pentosídeo (C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀)	21,8 (-)	264,4/ 335,5	418	417	EFEC-D; EFEC-Ac
87	Isômero kaempferol pentosídeo (C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀)	22,2 (-)	265,1/ 343,8	418	417	EFEC-D
88	Kaempferol 3- <i>O</i> -rhamnosídeo (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀)	22,6 (-)	263,3/ 341,4	432	431	EC-L; EC-H; EFEC-D; EFEC-Ac
89	Isômero Kaempferol galoilhexosídeo (C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅)	23,6 (22,6)	264,5/ 346,6	600	599	EC-L; EFEC-Ac
90	Isômero Kaempferol galoilhexosídeo (C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅)	23,8 (22,7)	264,6/ 347,5	600	599	EC-L; EFEC-Ac

Retention Time : 10,741 min
Compound Name : Ácido Clorogênico



Retention Time : 17,801 min
Compound Name : Ácido Metilclorogênico

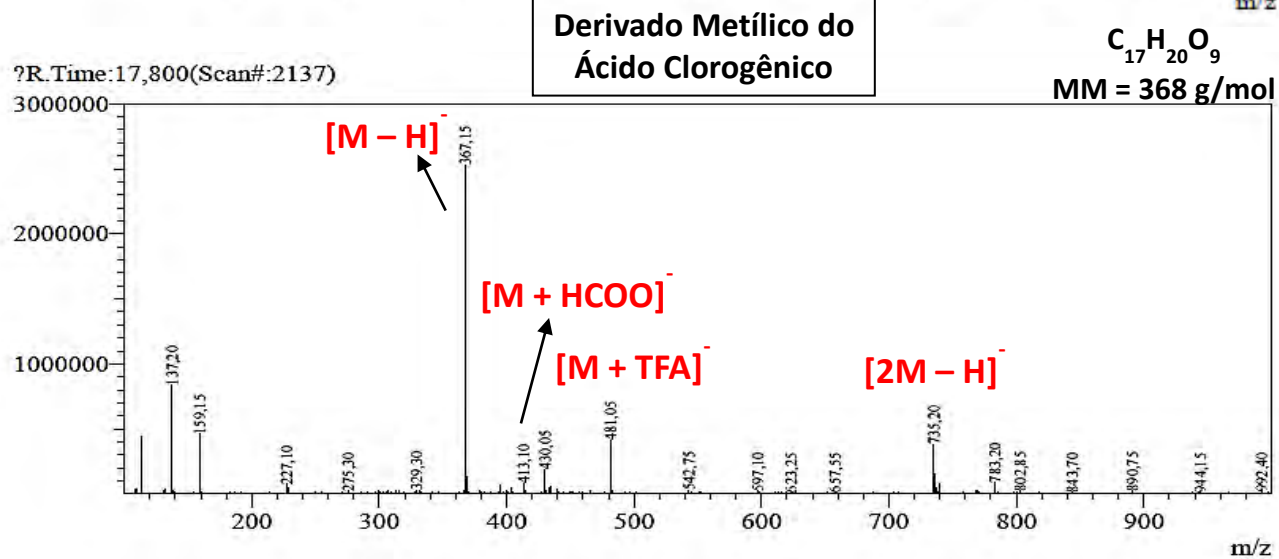
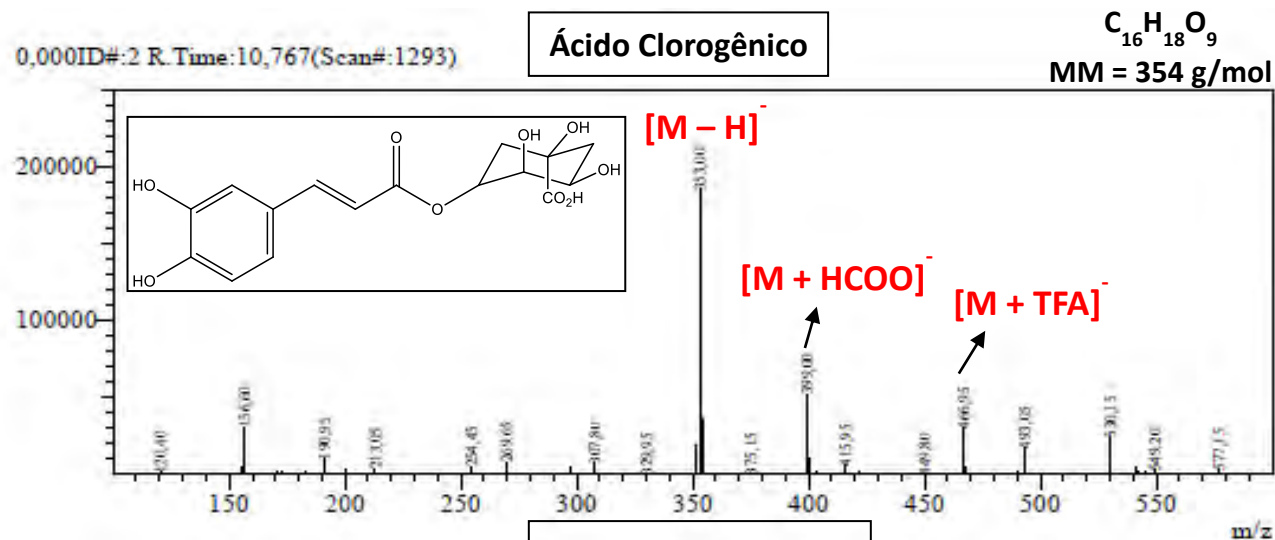
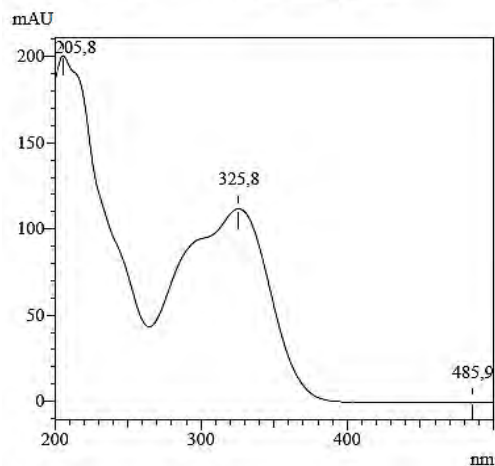
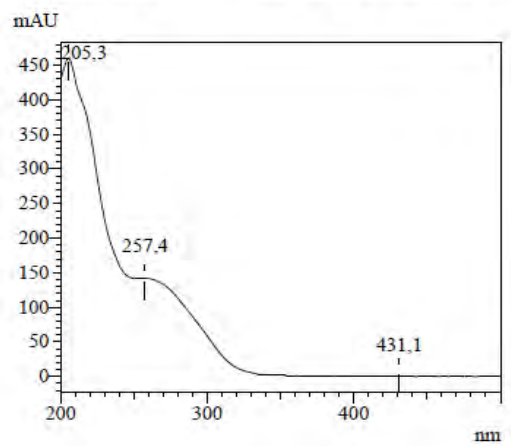


Figura 48. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para o ácido clorogênico (61) e o derivado metílico do ácido clorogênico (69).

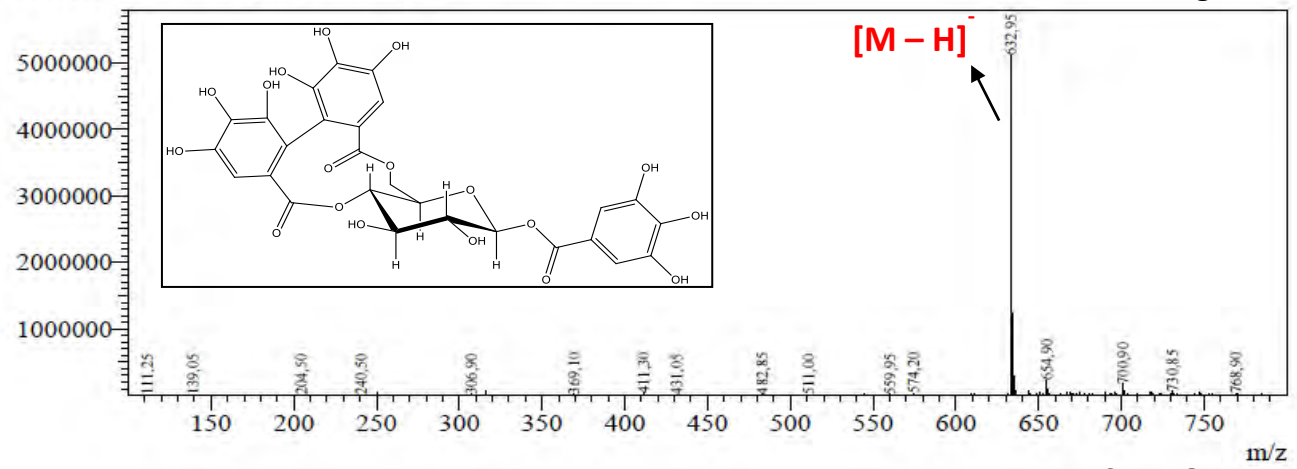
Retention Time : 9,653 min
 Compound Name : Derivado Ácido Gálico 633

UV Spectrum



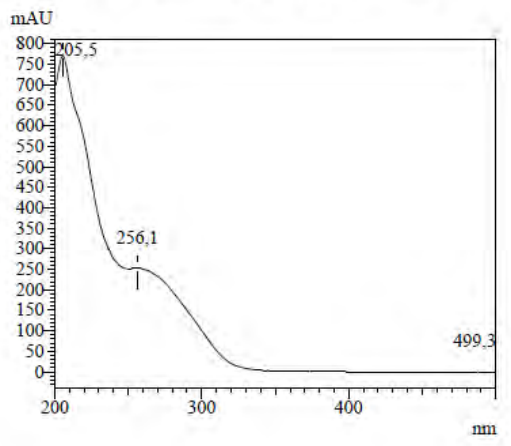
0,000ID#:3 R.Time:9,675(Scan#:1162) **Isômero Estrictinina**

$C_{16}H_{18}O_9$
 MM = 634 g/mol



Retention Time : 10,758 min
 Compound Name : Derivado Ácido Gálico 633

UV Spectrum



ID#:5 R.Time:10,767(Scan#:1293) **Isômero Estrictinina**

$C_{16}H_{18}O_9$
 MM = 634 g/mol

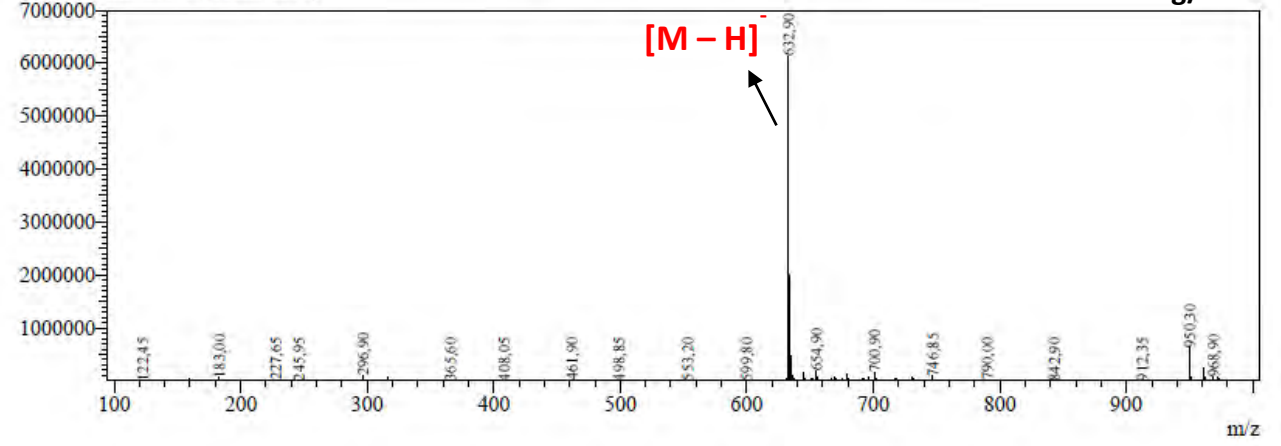
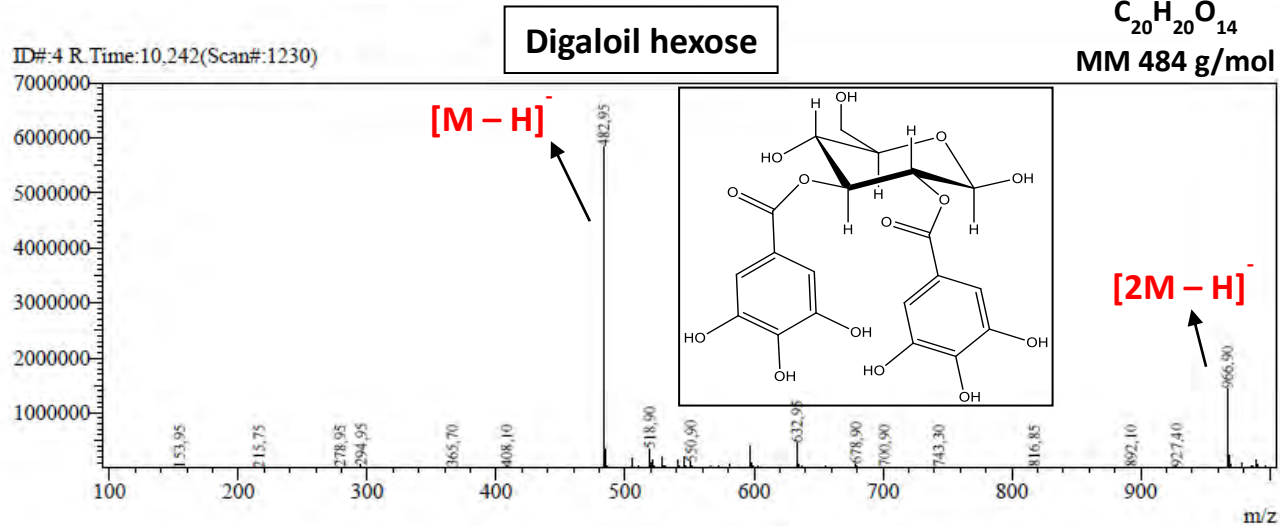
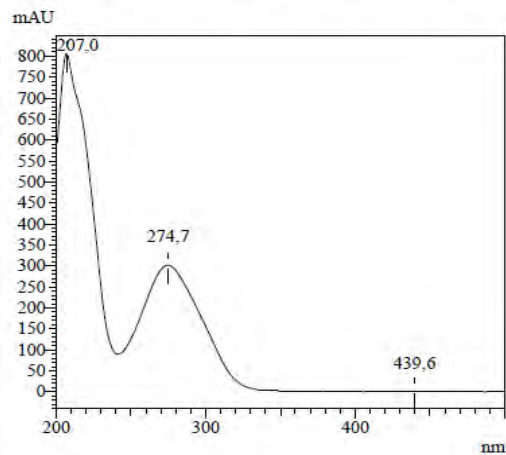


Figura 49. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para os isômeros de estrictinina (78 e 80).

Retention Time : 10,231 min
Compound Name : Derivado Ácido Gálico 483



Retention Time : 16,170 min
Compound Name : Derivado Ácido Gálico 785

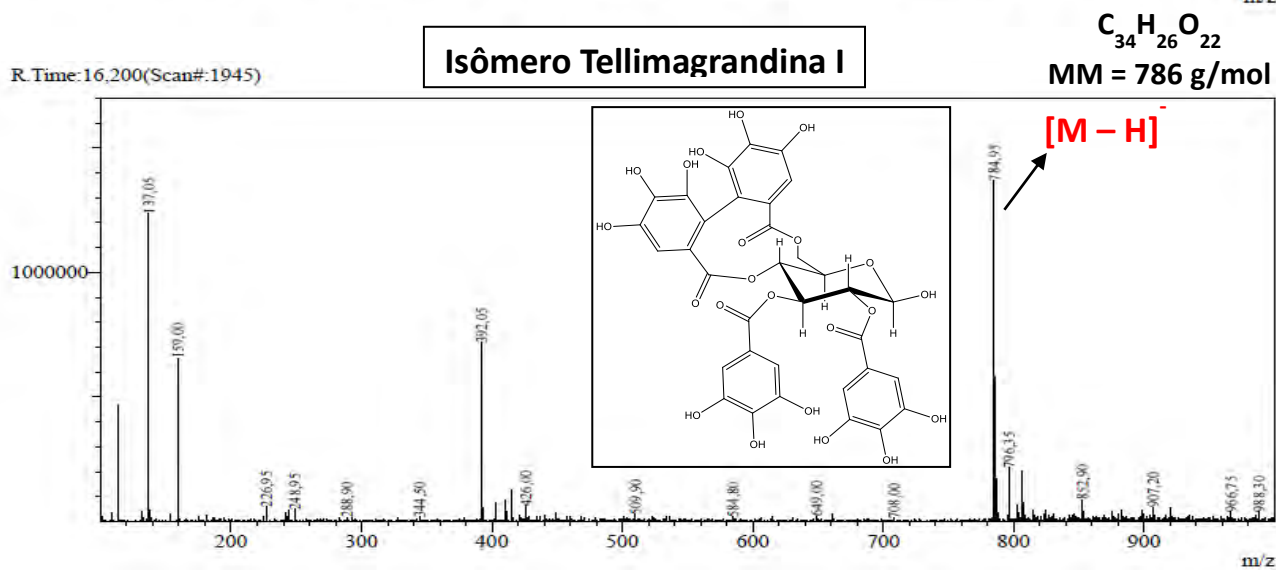
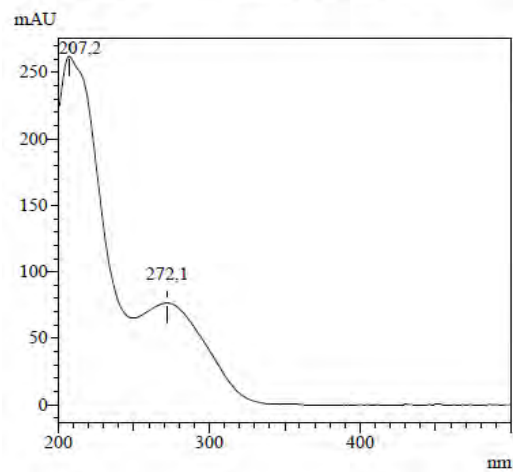
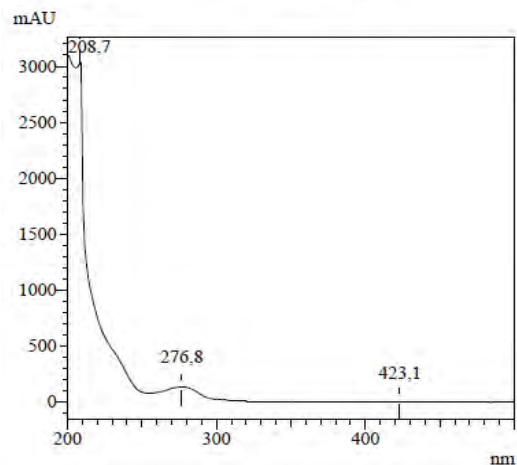
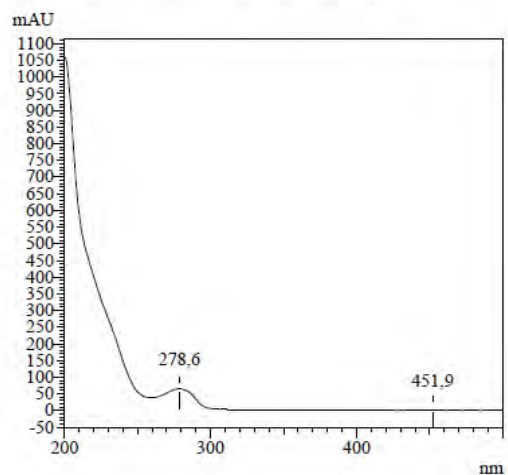


Figura 50. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para o digaloil-hexose (78) e o isômero de tellimagrandina I (81).

Retention Time : 11,876 min
Compound Name : Procianidina 577



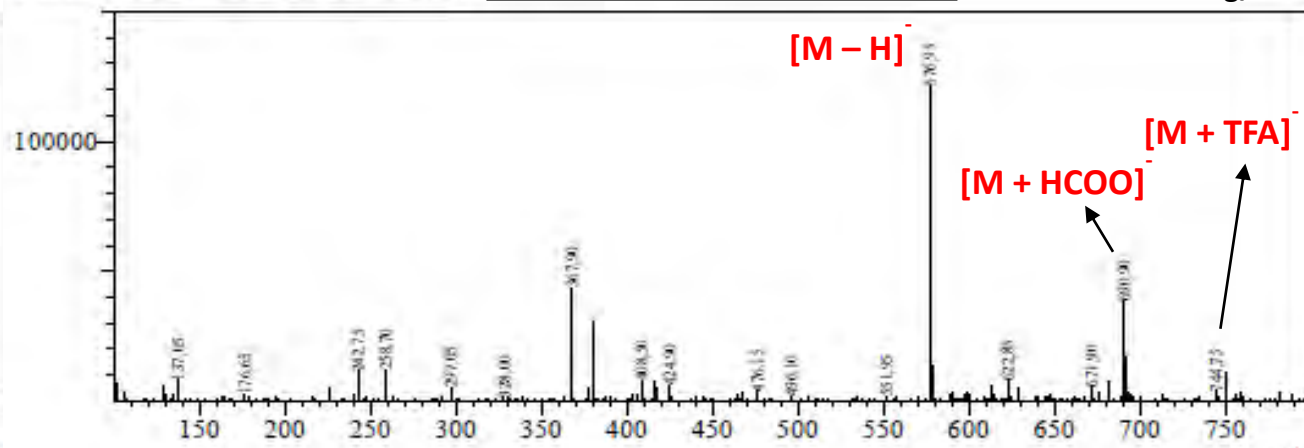
Retention Time : 17,817 min
Compound Name : Derivado Catequina 739



0,000ID#:3 R.Time:11,850(Scan#:1423)

Isômero Procianidina tipo B

$C_{30}H_{26}O_{12}$
MM = 578 g/mol



Isômero Hexosil Procianidina tipo B

$C_{36}H_{36}O_{17}$
MM = 740 g/mol

R.Time:17,800(Scan#:2137)

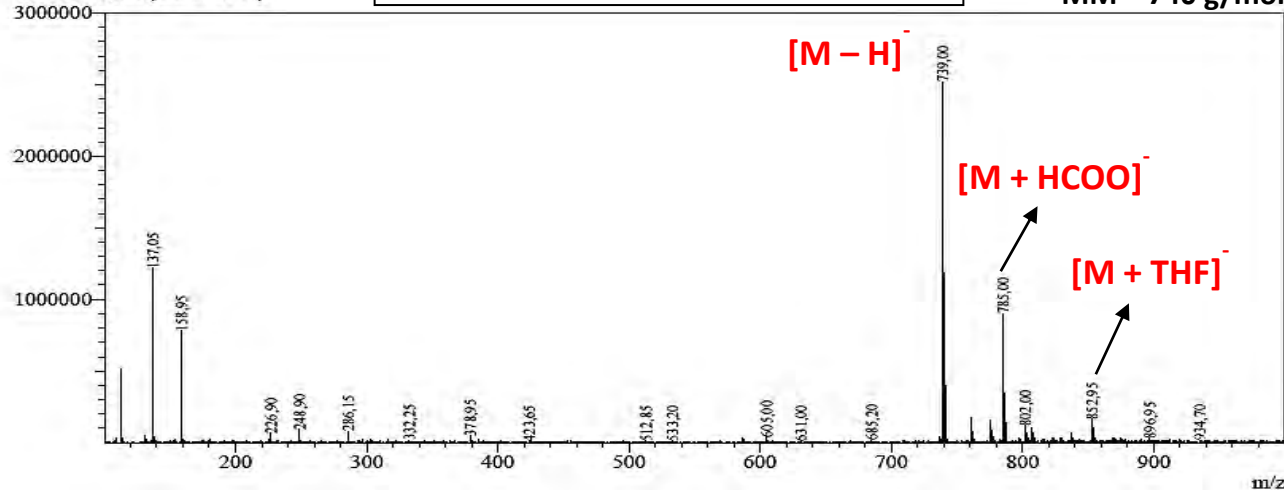


Figura 51. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para os isômeros de procianidina tipo B (70) e de hexosil procianidina tipo B (74).

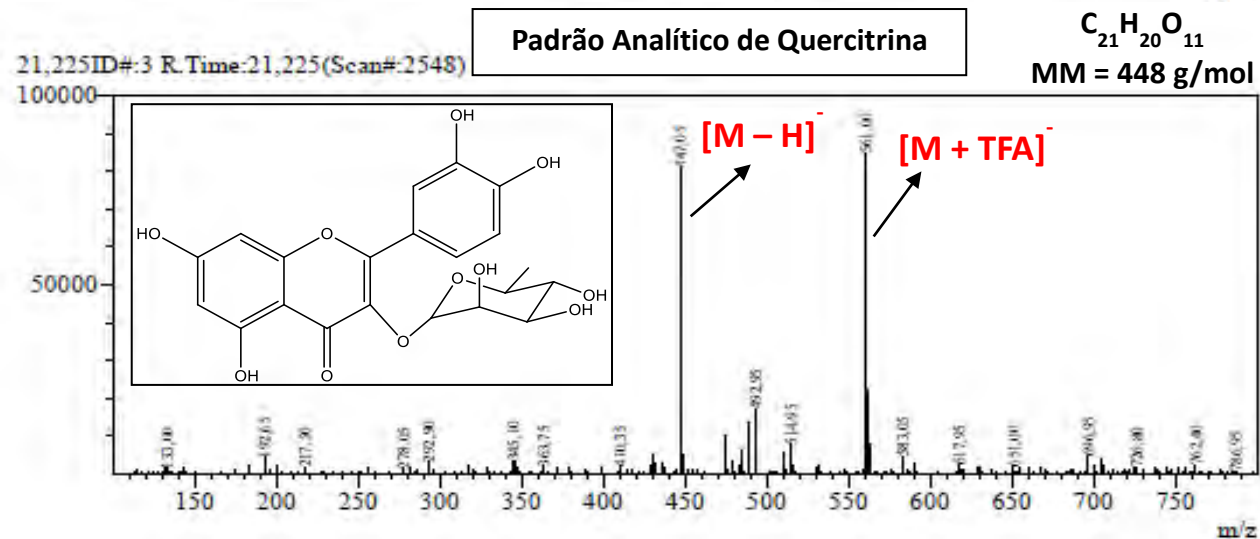
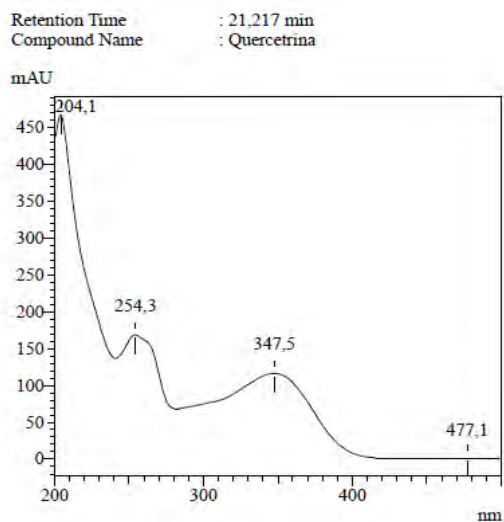
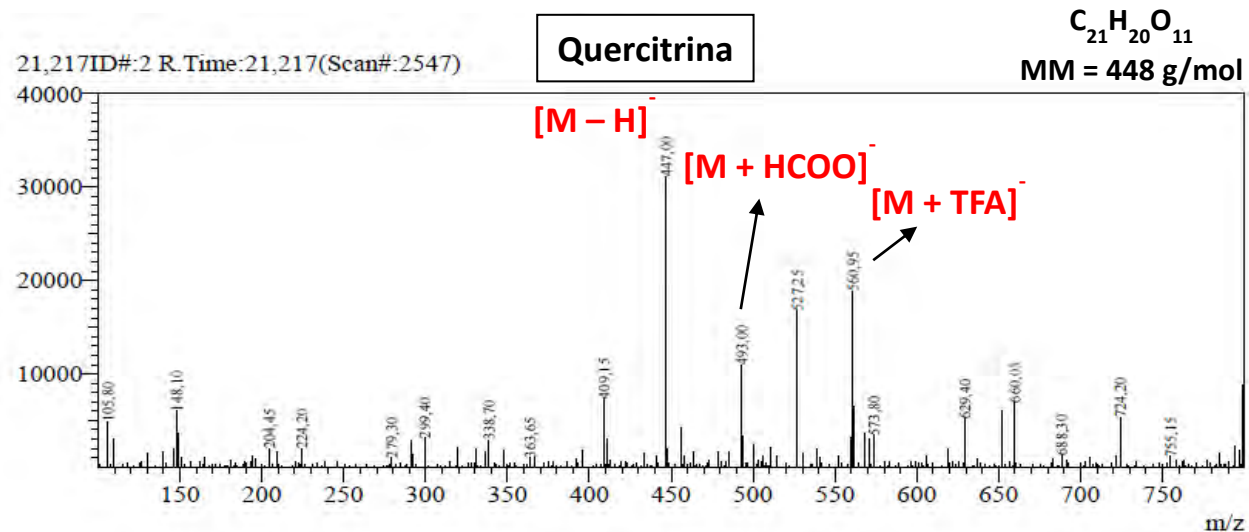
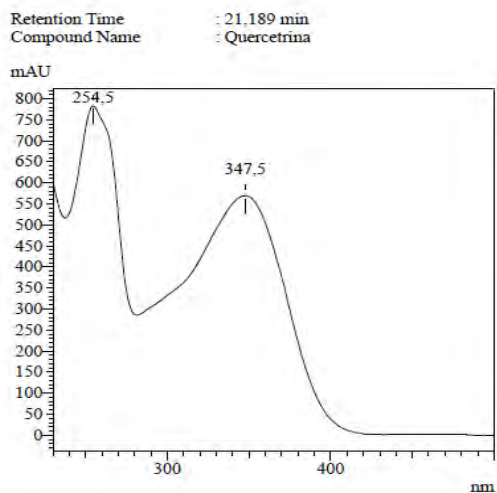


Figura 52. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para a quercitrina (67) e o padrão analítico de quercitrina.

Outra característica para a espécie botânica, confirmada através da análise por CLAE-DAD-EM, foi a diversidade estrutural de flavonóis, prioritariamente derivados de quercetina e canferol (ou kaempferol). A quercitrina (**67**), componente majoritário das partições do extrato metanólico das folhas de *E. copacabanensis*, foi novamente detectado nas novas análises nas frações EC-L, EC-H, EFEC-D e EFEC-Ac, através do seu espectro de UV/Vis e da molécula desprotonada ($[M - H]^-$) de m/z 447. A comparação com o padrão analítico confirmou a identidade deste flavonol (Figura 52). Além da quercitrina, outros dez derivados glicosilados com unidades pentosídicas e hexosídicas dos flavonóis quercetina e kaempferol também foram observados, como o kaempferol 3-*O*-rhamnosídeo isolado em folhas de *E. copacabanensis* por (JUNIOR et al., 2014).

Considerando que grande parte destas substâncias fenólicas foi proposta como presentes na partição EFEC-Ac, esta foi direcionada para etapas de purificação em coluna de sílica gel e Sephadex e posterior análise nos sistemas cromatográficos instrumentais.

3.2.4. Análise das frações da partição EFEC-Ac

A partição EFEC-Ac foi fracionada inicialmente em coluna de sílica gel, sendo obtidos quatro frações de interesse. A primeira fração EFEC-Ac 11-18 (28,1 mg) demonstrou uma composição majoritária de quercetina (**68**, t_R 24,2 min; $\lambda_{m\acute{a}x}$ 252,5/364,4 nm; $[M - H]^-$ 301). Este flavonol ainda não havia sido relatado para esta espécie através dos experimentos anteriores do presente trabalho, porém JUNIOR e colaboradores (2014) já tinham isolado no trabalho anterior. Em relação ao fracionamento em cromatografia clássica, a quercetina (na forma de aglicona) foi eluído primeiro em detrimento dos seus derivados glicosilados, o que é justificado pela ausência justamente de substituintes hexosídicos/pentosídicos, que aumentam significativamente a polaridade dos flavonoides e conseqüentemente a retenção na coluna de sílica gel. Nesta mesma fração, foram observados por CLAE-DAD-EM picos relacionados ao galato de metila (**58**, t_R 10,6 min; $\lambda_{m\acute{a}x}$ 215,8/270,3 nm; $[M - H]^-$ 183) e ao flavonol kaempferol (**91**, t_R 24,7 min; $\lambda_{m\acute{a}x}$ 264,9/366,4 nm; $[M - H]^-$ 285) (Figura 53 e 54).

Posteriormente, para confirmação das fórmulas estruturais das substâncias majoritárias, a mistura foi analisada através de RMN 1H e ^{13}C , em experimentos uni- e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC). Todos os espectros estão disponíveis nas Figura 55 a 61.

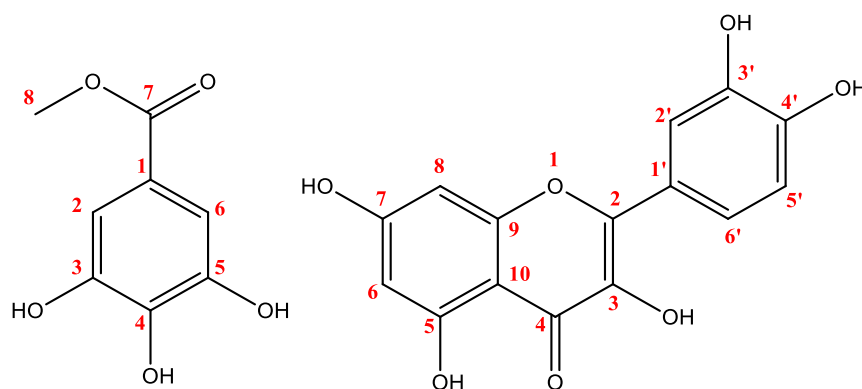
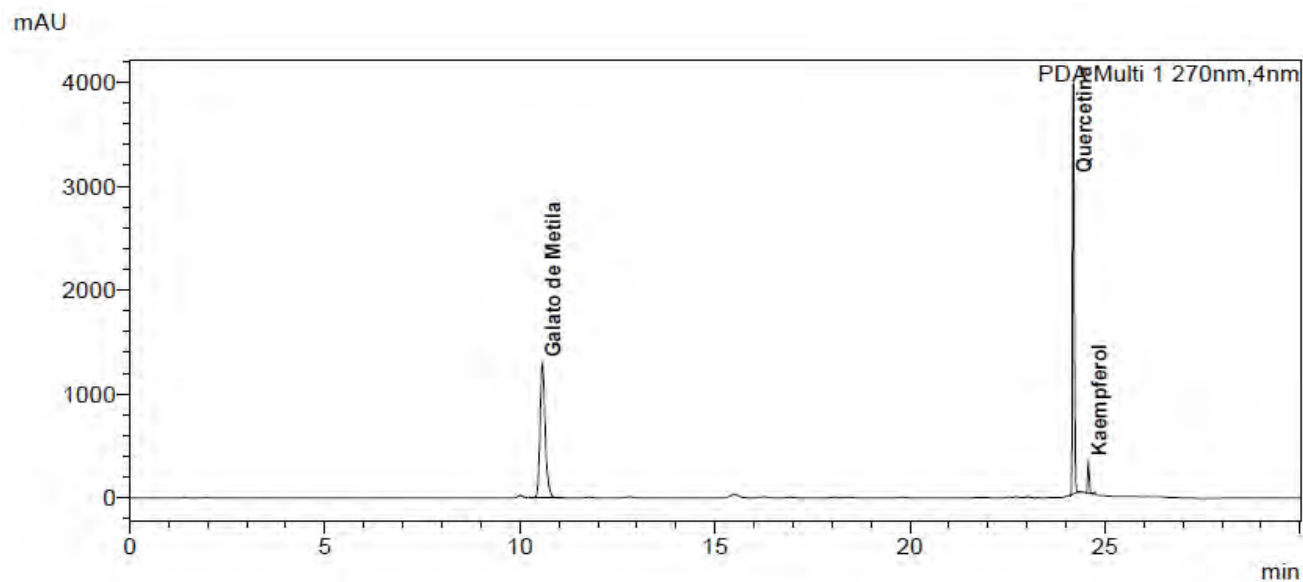


Figura 53. Estrutura química com numeração da cadeia carbônica do galato de metila (**58**) e quercetina (**68**).

No espectro de 1H , foram observados seis sinais com diferentes multiplicidades, referentes aos hidrogênios ligados aos anéis aromáticos das duas substâncias. Dentre estes, o sinal mais intenso, um singlete em 7,06 ppm (2H), foi relacionado aos hidrogênios do galato de metila (H-2 e H-6). Um singlete em 3,83 ppm (3H) corresponde aos hidrogênios do grupo éster (H-8), sendo a posição do grupo metílico confirmado através da simetria do anel

aromático e a equivalência química dos núcleos de hidrogênio (H-2 e H-6) e carbono (C-2 e C-6, C-3 e C-5) do anel aromático. As correlações observadas no experimento HMBC confirmaram as informações previamente extraídas do espectro de ^1H . As atribuições referentes aos diferentes núcleos do galato de metila, bem como publicados na literatura científica, estão disponíveis na Tabela 15.

Os demais sinais observados no espectro de ^1H foram relacionados à quercetina. Os sinais em 6,41 ppm (d, 1H) e 6,20 (d, 1H) correspondem aos hidrogênios do anel A (H-8 e H-6), com a constante de acoplamento (J) de 1,8 Hz indicando a posição *meta* entre estes núcleos. Os sinais em 7,76 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,66 (dd, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 1,9$ Hz, 1H) e 6,90 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H) também indicaram os acoplamentos *orto* e *meta* dos prótons presentes no anel B da quercetina, correspondendo, respectivamente aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5'. O espectro de ^{13}C apresentou diferentes sinais de carbono em sistema aromático na faixa entre 93-165 ppm. Os sinais em 175,95 ppm (δ_{C} , C=O) e 135,14 ppm (δ_{C} , $\text{C}_{\text{sp}2}\text{-OH}$) confirmaram a substância como um flavonoide do tipo flavonol (ligação dupla entre C-2 e C-3, substituinte hidroxila no C-3 e grupamento carbonila no C-4). Os sinais obtidos nos experimentos de HSQC e HMBC foram essenciais para a confirmação da quercetina na mistura. A Tabela 15 também descreve todas as atribuições para a quercetina, incluindo a comparação com dados disponíveis na literatura.



Retention Time : 24,194 min
Compound Name : quercetina

0,000ID#: 2 R.Time: 24,183(Scan#: 2903)

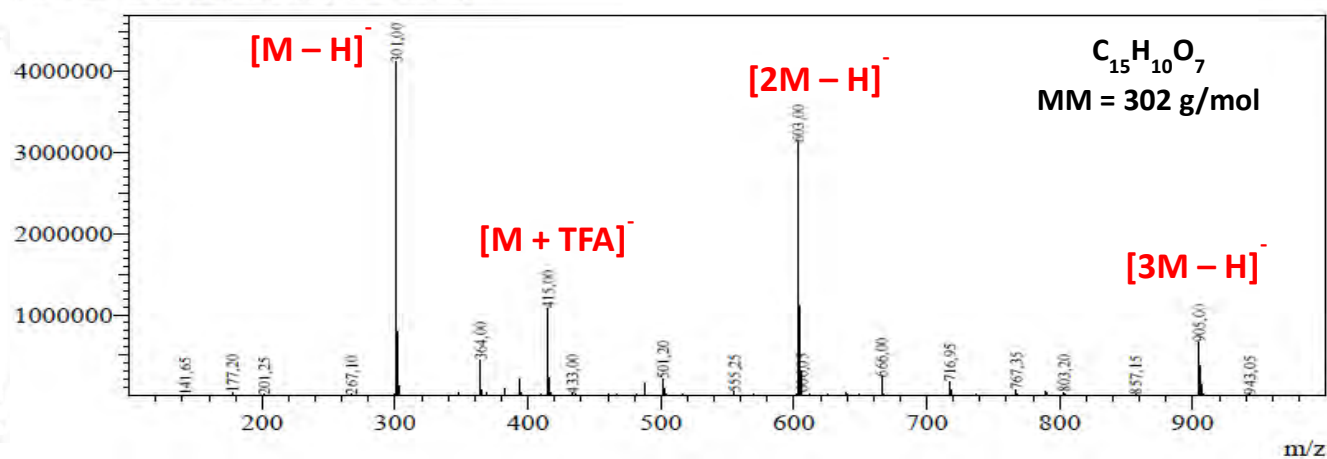
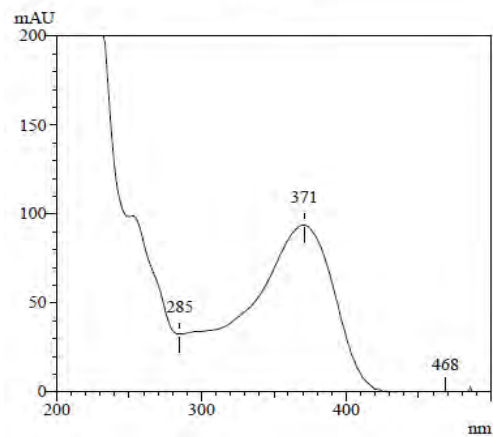


Figura 54. Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM, com os espectros de UV/Vis e de massas da quercetina (68).

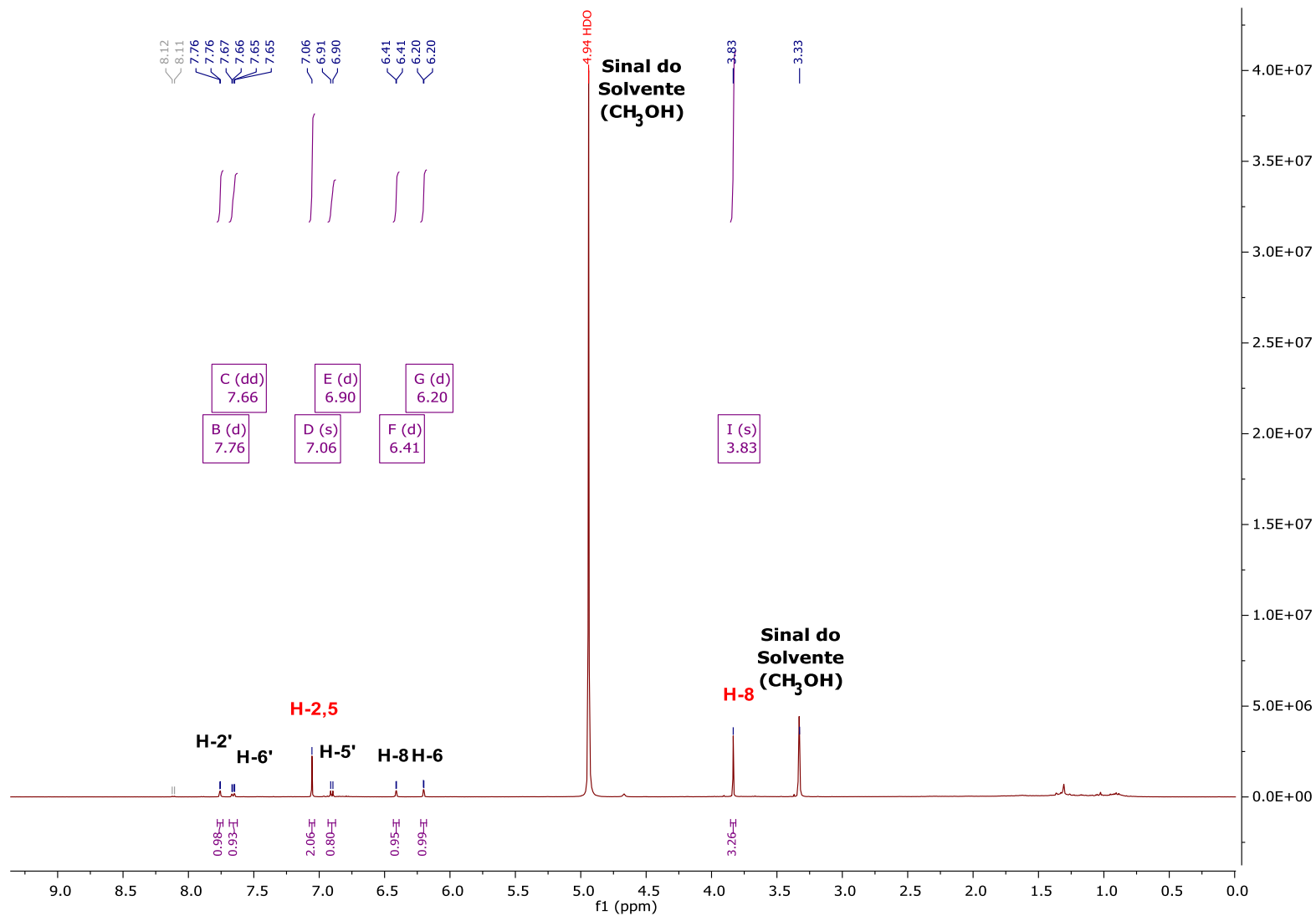


Figura 55. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18, com correlação, em preto, para os sinais da quercetina (**68**) e, em vermelho, para o galato de metila (**58**).

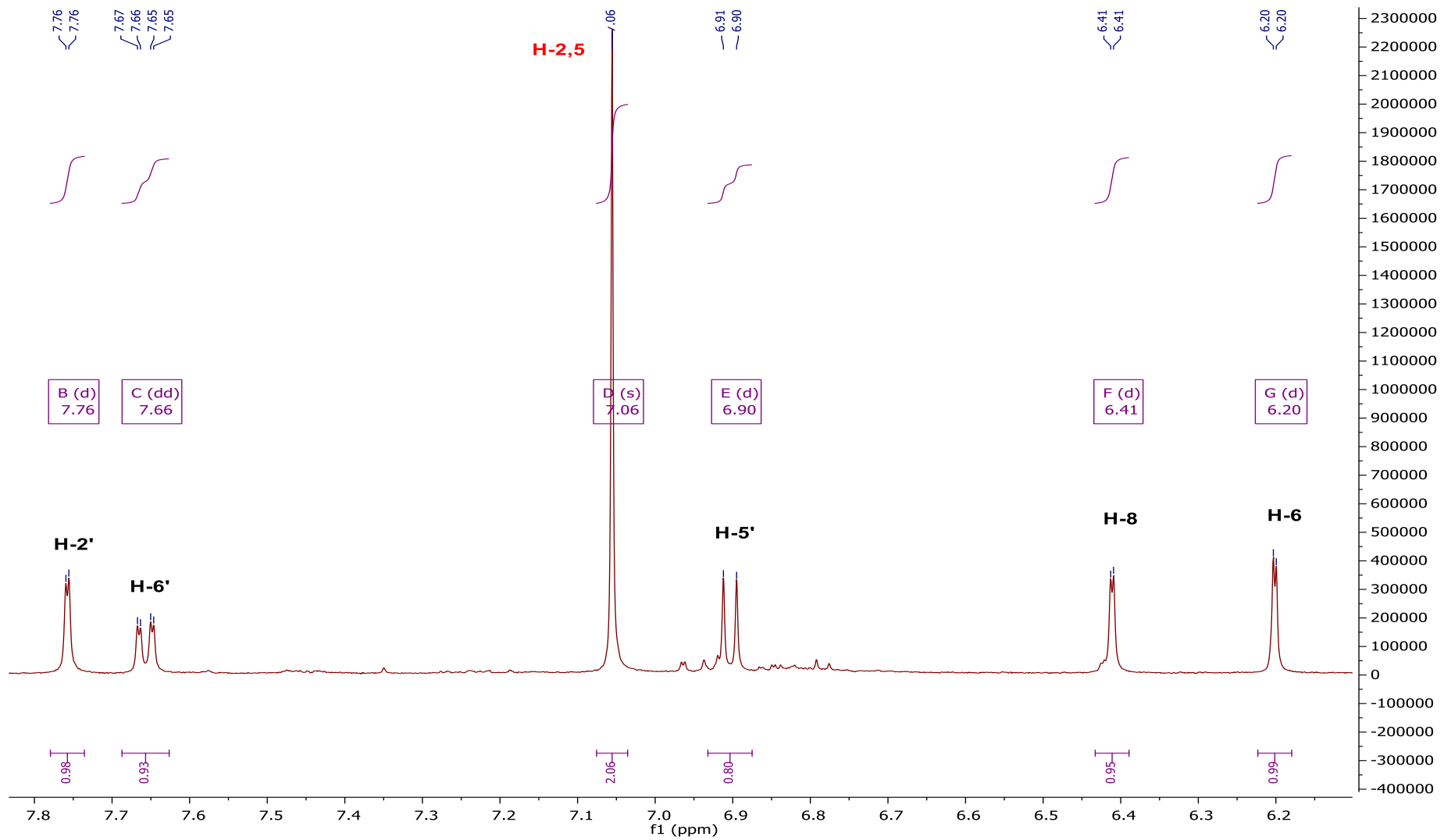


Figura 56. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18, com expansão na região de 6,0-8,0 ppm e correlação, em preto, para os sinais da quercetina (**68**) e, em vermelho, para o galato de metila (**58**).

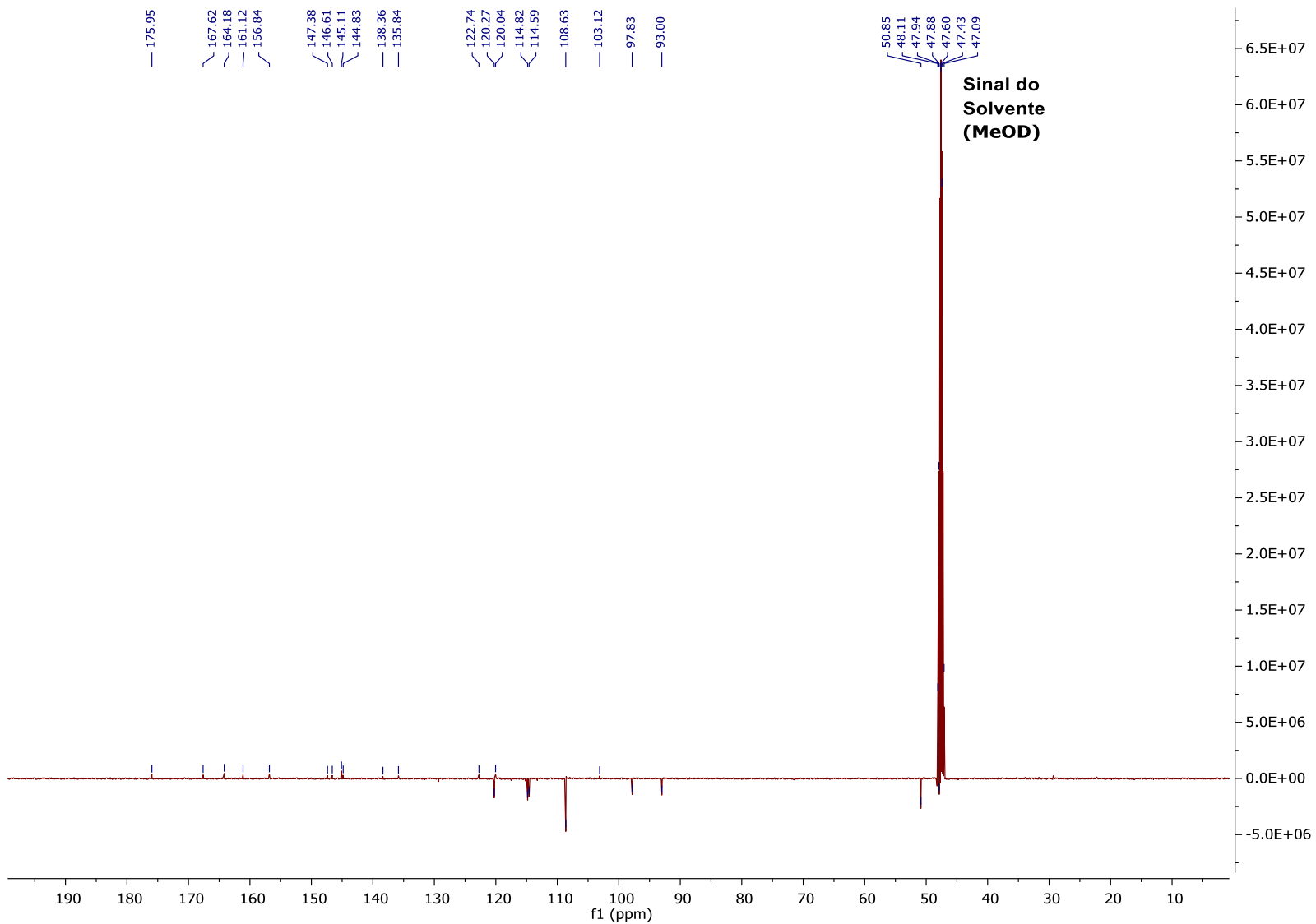


Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18.

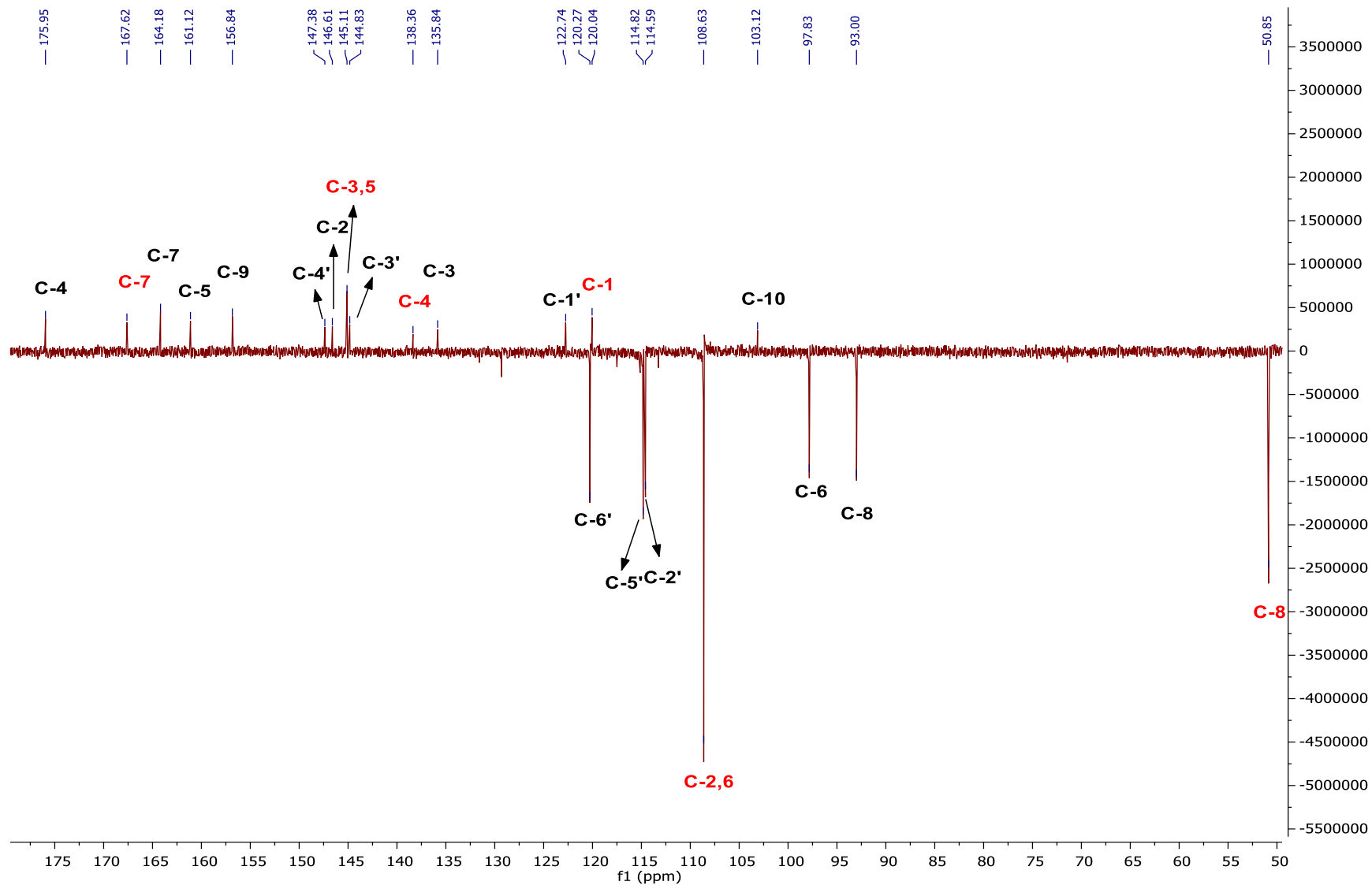


Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18, com expansão na região de 5,0-180,0 ppm e correlação, em preto, para os sinais da quercetina (**68**) e, em vermelho, para o galato de metila (**58**).

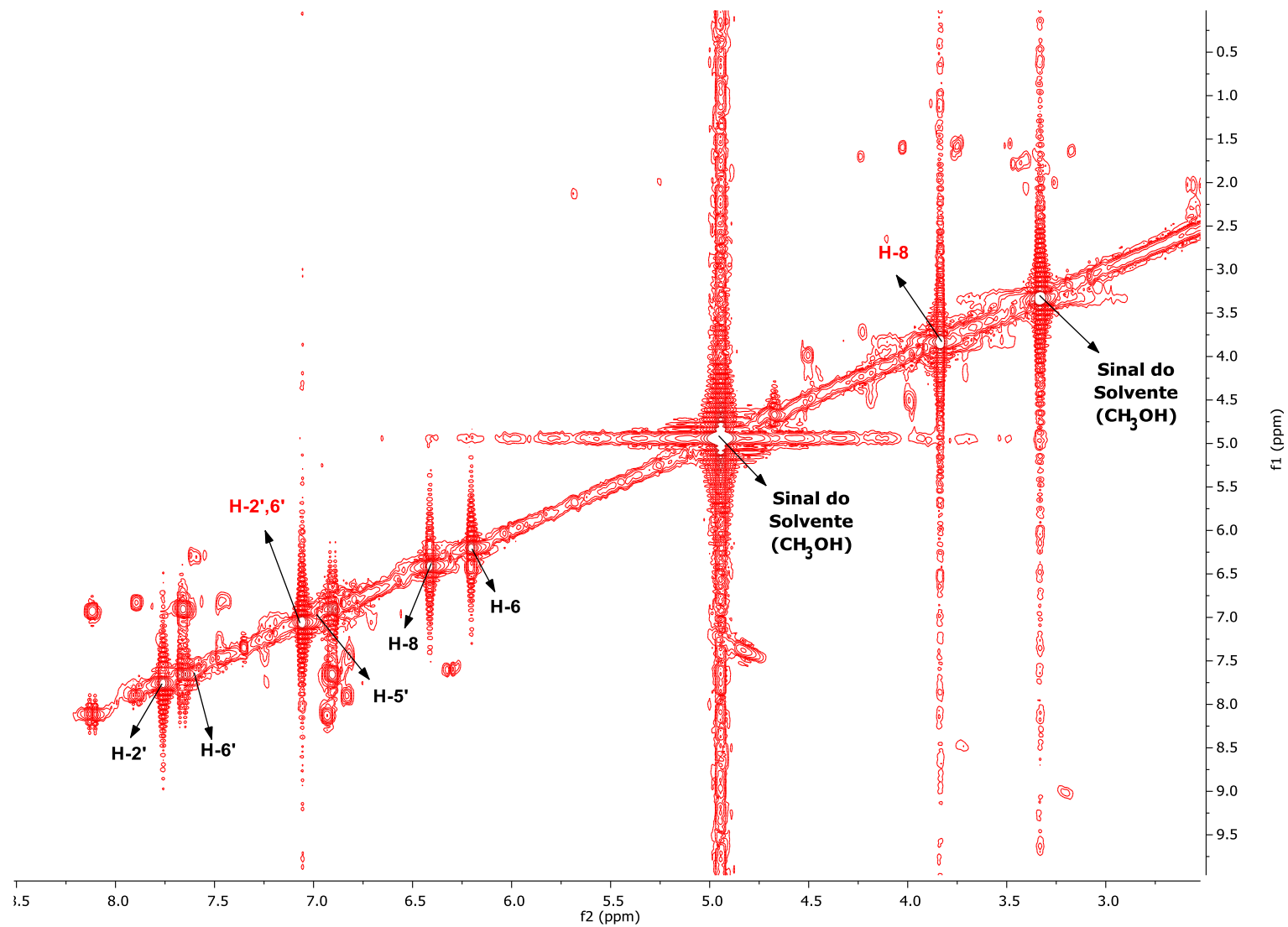


Figura 59. Expansão do mapa de contorno COSY (500/500 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18, com correlação, em preto, para os sinais da quercetina (**68**) e, em vermelho, para o galato de metila (**58**).

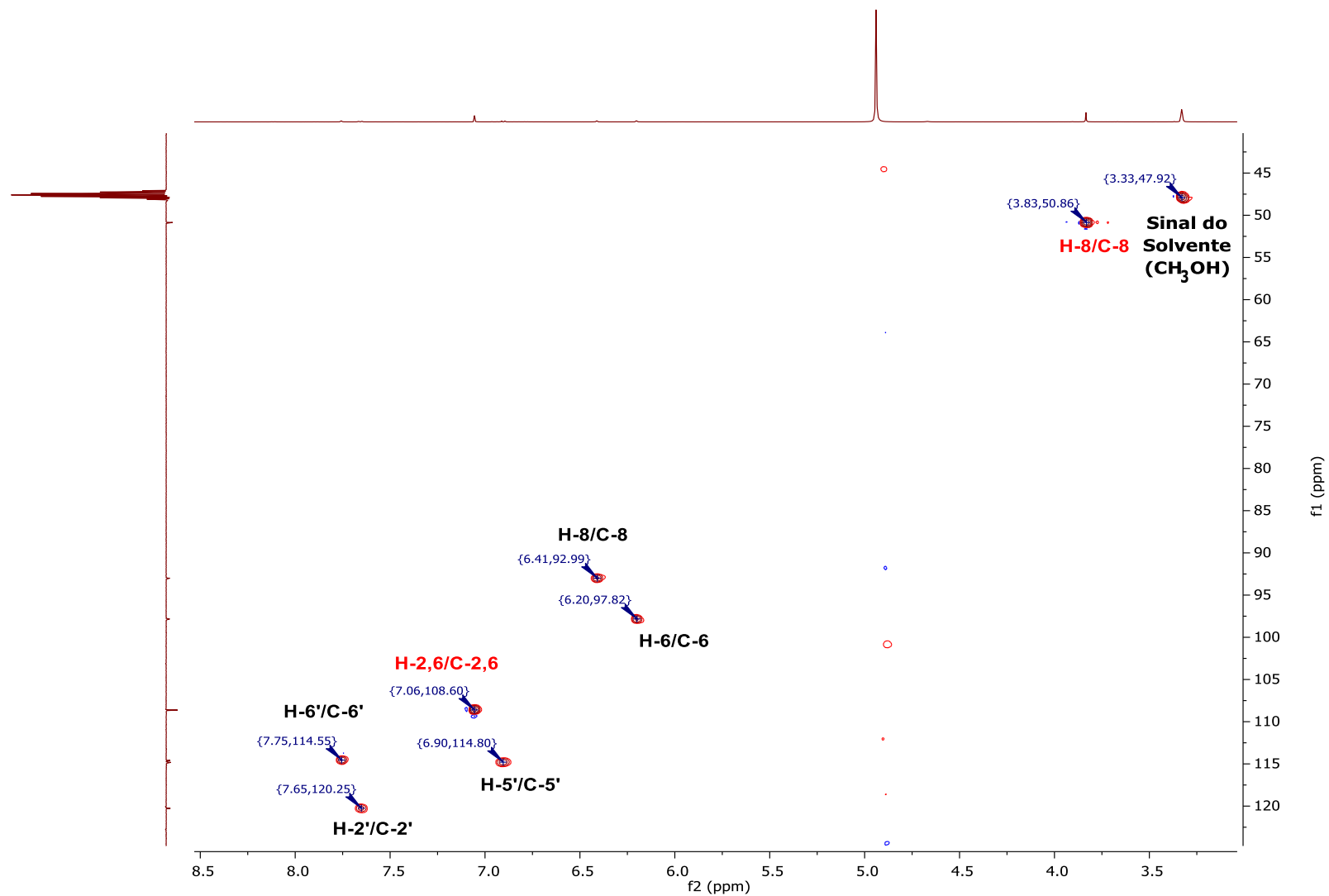


Figura 60. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/125 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18, com correlação, em preto, para os sinais da quercetina (68) e, em vermelho, para o galato de metila (58).

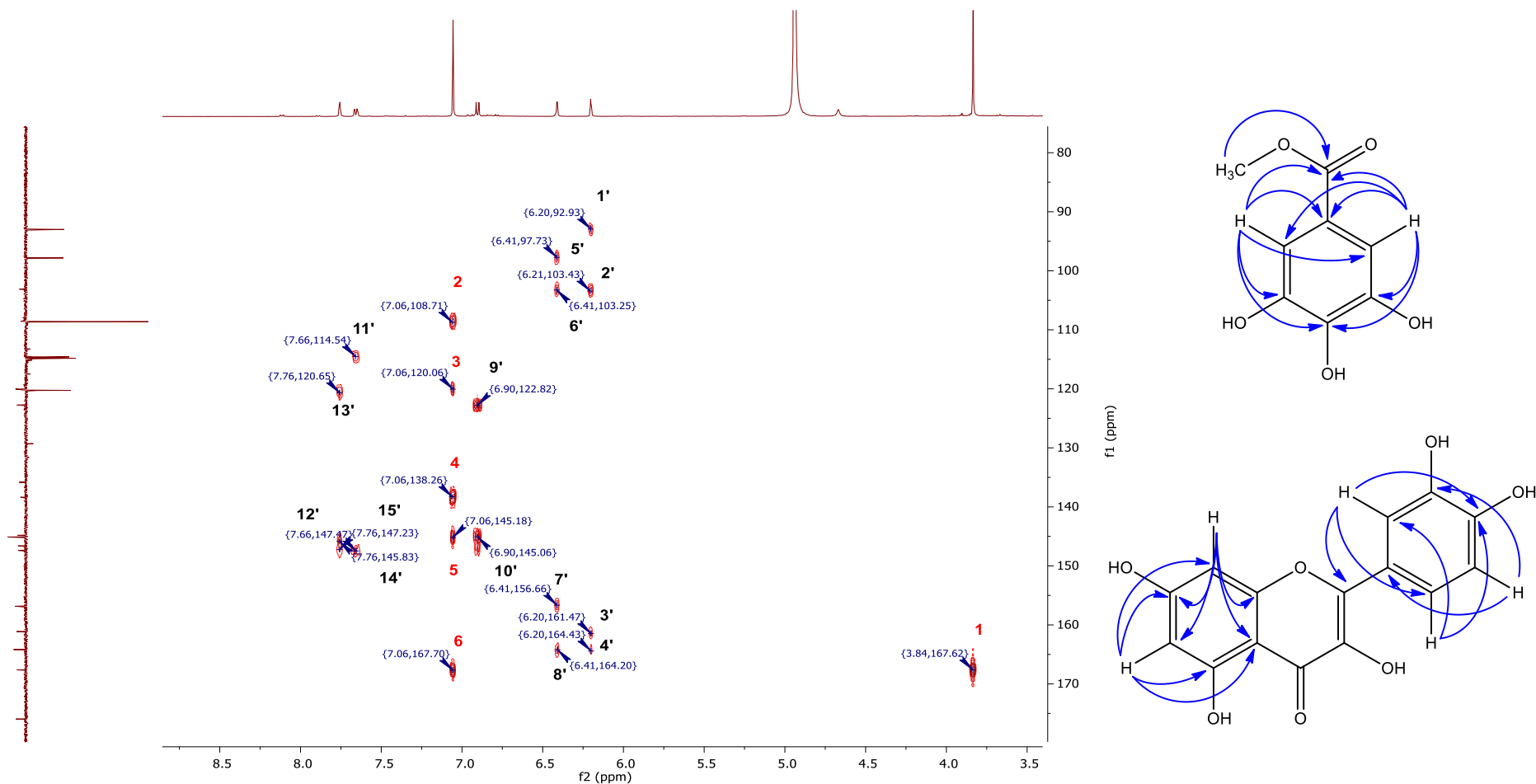


Figura 61. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, MeOD) da fração EFEC-Ac 11-18, com correlação, em preto, para os sinais da quercetina (**68**) e, em vermelho, para o galato de metila (**58**), com suas respectivas estruturas químicas.

Símbolos:

1: ${}^3J_{H-8/C-7}$; 2: ${}^3J_{H-2/C-6}$, H-6/C-2; 3: ${}^2J_{H-2/C-1}$, H-6/C-1; 4: ${}^3J_{H-2/C-4}$, H-6/C-4; 5: ${}^2J_{H-2/C-3}$, H-6/C-5; 6: ${}^3J_{H-2/C-7}$, H-6/C-7.

1': ${}^3J_{H-6/C-8}$; 2': ${}^3J_{H-6/C-10}$; 3': ${}^2J_{H-6/C-5}$; 4': ${}^2J_{H-6/C-7}$; 5': ${}^3J_{H-8/C-6}$; 6': ${}^3J_{H-8/C-10}$; 7': ${}^2J_{H-8/C-9}$; 8': ${}^2J_{H-8/C-7}$; 9': ${}^3J_{H-5'/C-1'}$;

10': ${}^3J_{H-5'/C-3'}$; 11': ${}^3J_{H-6'/C-2'}$; 12': ${}^3J_{H-6'/C-4'}$; 13': ${}^3J_{H-2'/C-6'}$; 14': ${}^3J_{H-2'/C-1}$; 15': ${}^3J_{H-2'/C-4'}$.

Tabela 15. Deslocamentos químicos, em ppm, para ^1H e ^{13}C obtidos experimentalmente na fração EFEC-Ac 11-18.

Galato de Metila							Quercetina						
n	$\delta_{\text{H exp}}$	$\delta_{\text{C exp}}$	$\delta_{\text{H lit}}^1$	$\delta_{\text{C lit}}^1$	$\delta_{\text{H lit}}^2$	$\delta_{\text{C lit}}^2$	n	$\delta_{\text{H exp}}$	$\delta_{\text{C exp}}$	$\delta_{\text{H lit}}^3$	$\delta_{\text{C lit}}^3$	$\delta_{\text{H lit}}^4$	$\delta_{\text{C lit}}^4$
1	-	120,04	-	119,7	-	121,1	1	-	-	-	-	-	-
2,6	7,06 (s, 2H)	108,63	6,96 (s, 2H)	108,9	7,06 (s, 2H)	109,9	2	-	146,61	-	147,28	-	n.d.
3,5	-	145,11	-	145,9	-	145,6	3	-	135,84	-	136,14	-	n.d.
4	-	138,36	-	138,8	-	138,5	4	-	175,95	-	176,27	-	n.d.
7	-	167,62	-	166,7	-	168,8	5	-	161,12	-	161,10	-	n.d.
8	3,83 (s, 3H)	50,86	3,72 (s, 3H)	51,9	3,83 (s, 3H)	52,0	6	6,20 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H)	97,83	6,19 (d, $J = 2,1$ Hz)	98,65	6,20	97,94
-	-	-	-	-	-	-	7	-	164,18	-	164,30	-	n.d.
-	-	-	-	-	-	-	8	6,41 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H)	93,00	6,42 (d, $J = 2,1$ Hz)	93,85	6,42	93,14
-	-	-	-	-	-	-	9	-	156,84	-	156,60	-	n.d.
-	-	-	-	-	-	-	10	-	103,12	-	103,45	-	n.d.
-	-	-	-	-	-	-	1'	-	122,74	-	122,40	-	n.d.
-	-	-	-	-	-	-	2'	7,76 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H)	114,59	7,66 (d, $J = 2,1$ Hz)	115,47	7,68	114,87
-	-	-	-	-	-	-	3'	-	144,83	-	145,49	-	n.d.
-	-	-	-	-	-	-	4'	-	147,38	-	148,13	-	n.d.
-	-	-	-	-	-	-	5'	6,90 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	114,82	6,88 (d, $J = 8,4$ Hz)	116,05	6,90	115,36
-	-	-	-	-	-	-	6'	7,66 (dd, $J = 8,5, 1,9$ Hz, 1H)	120,27	7,53 (dd, $J = 8,4, 2,1$ Hz)	120,51	7,54	119,84

¹CARVALHO et al., 2010; ²THANG et al., 2018; ³ZHANG et al., 2014; ⁴HMDB, 2021. Solvente DMSO nas referências 1 e 3. n.d. – não detectado.

As demais três frações da partição **EFEC-Ac** foram purificadas em coluna de Sephadex. Devido a diversidade estrutural de substâncias fenólicas, as frações obtidas, em sua maioria, consistiram em misturas contendo taninos hidrolisáveis, derivados catequínicos e flavonóis glicosilados. Para o experimento **SEP-ECA**, foi obtido a fração SEP-ECA 3-4 (2 mg), rica em ácido gálico (**55**), com pureza de 67% na análise por CLAE-DAD (Figura 62). Como discutido anteriormente, as frações demonstraram uma presença destacada do galato de metila, o derivado éster metílico do ácido gálico, o que pode contribuir para o isolamento de uma menor quantidade deste ácido fenólico. O ácido gálico é considerado um dos mais simples e abundantes nos tecidos vegetais (DEWICK, 2009).

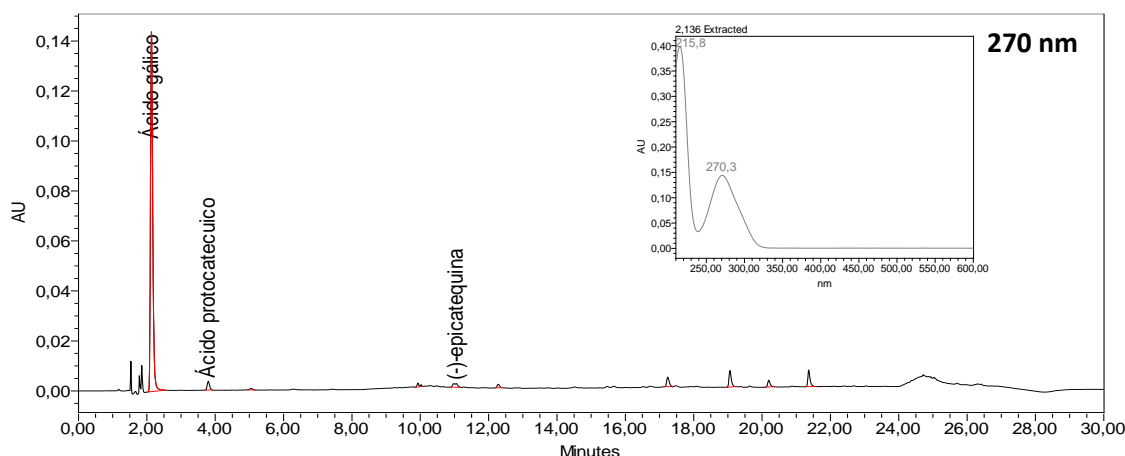


Figura 62. Cromatograma por CLAE-DAD de uma fração rica em ácido gálico (**55**).

As demais frações do experimento SEP-ECA apresentaram uma variedade de derivados catequínicos e taninos condensados. A fração SEP-ECA 27-33 (48,0 mg) consistiu em uma mistura de taninos isômeros da procianidina tipo B (**70**), do hexosil procianidina tipo B (**74**) e da tellimagrandina I (**81**), além de conter dois isômeros de kaempferol galoil-hexosídeo (**89** e **90**). A fração SEP-ECA 46-67 (110,9 mg) apresentou composição majoritária dos taninos isômeros de 3-galoil procianidina tipo B (**71**) e 3,3'-digaloil procianidina tipo B (**75**) e do derivado catequínico (-)-epicatequina galato (**76**). Estas substâncias foram previamente propostas através da desreplificação por CLAE-DAD-EM da partição EFEC-Ac. Por exemplo, a Figura 63 demonstra o cromatograma da fração SEP-ECA 46-67 e os constituintes majoritários.

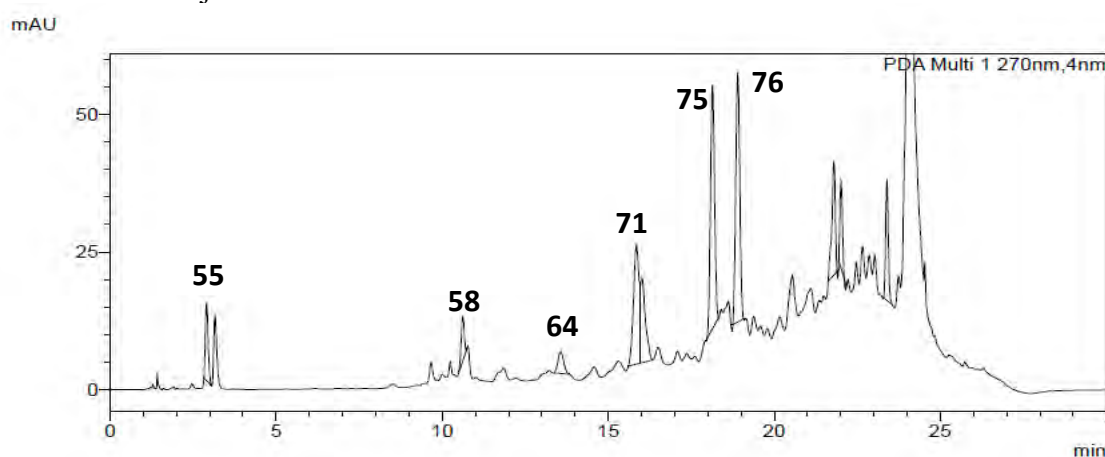


Figura 63. Cromatograma por CLAE-DAD-EM da fração SEP-ECA 46-67, com a composição majoritária dos isômeros 3-galoil procianidina tipo B (**71**), 3,3'-digaloil procianidina tipo B (**75**) e (-)-epicatequina galato (**76**). Outros componentes identificados foram ácido gálico (**55**), galato de metila (**58**) e (-)-epicatequina (**64**).

O segundo experimento, **SEP-ECB**, conduziu a duas frações com composição distinta. A primeira fração de interesse, de código SEP-ECB 12-19 (47,1 mg) foi majoritariamente constituída de quercitrina (**67**) e outros flavonóis glicosilados, como o hiperosídeo (**65**) e a isoquercitrina (**66**). Os espectros UV/Vis apresentaram o padrão característica para os flavonóis, já discutido anteriormente, com duas bandas de absorção, em 255-265 nm e 345-355 nm (Figura 64). Devido à sua diversidade estrutural, esta amostra foi injetada diretamente em sistema IES-QTdV-EM, em que foram observados os íons majoritários, de m/z 471,0909, 487,0930, 457,0740 e 441,0777, respectivamente em ordem de intensidade (Figura 65). Para todos os íons, foram detectados adutos com sódio $[M + Na]^+$, resultando em um acréscimo de 23 Da nos íons detectados. A fragmentação promovida por EM-EM (Figura 65) possibilitou a confirmação das agliconas quercetina (m/z 325) e kaempferol (m/z 309). O mecanismo de fragmentação consiste na quebra da ligação entre a aglicona e a unidade hexosídica ou pentosídica, conforme a Figura 66 demonstra para a quercitrina através do rearranjo 1,3 de hidrogênio. A identidade dos flavonóis glicosilados foi sugerida na Tabela 16, com os erros de identificação calculados abaixo de 5 ppm, ideal para espectrômetros de massas de alta resolução (MILMAN, 2015).

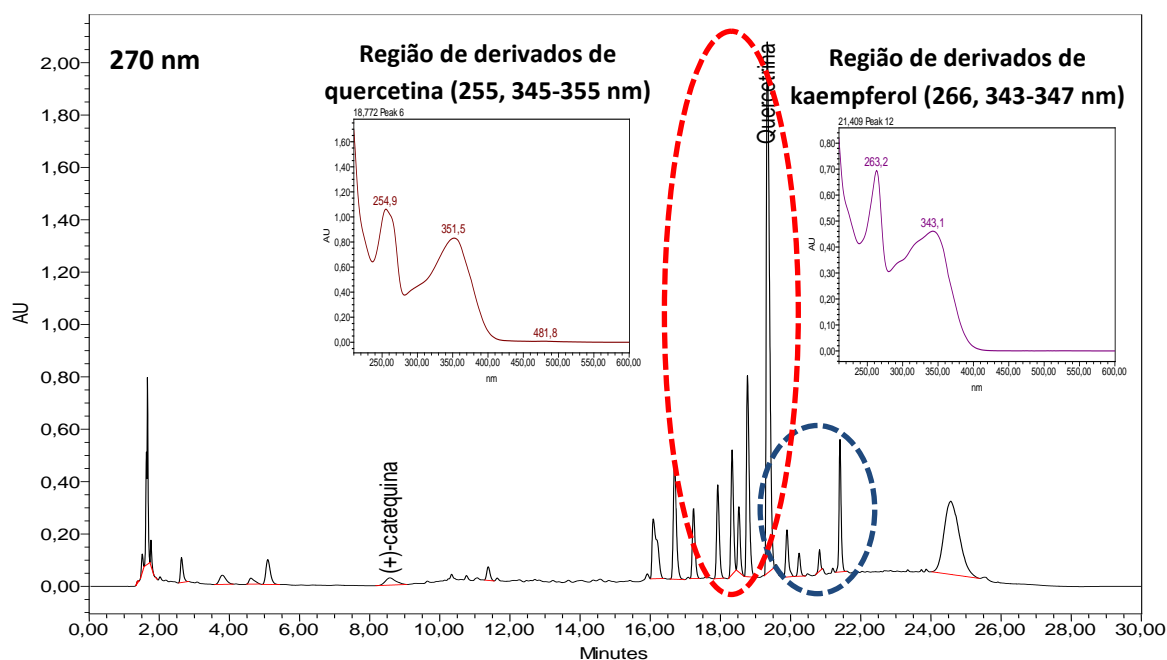


Figura 64. Cromatograma por CLAE-DAD da fração SEP-ECB 12-19.

A segunda fração, SEP-ECB 20-29 (60,0 mg), apresentou no cromatograma (Figura 67) uma mistura de três taninos hidrolisáveis, sendo dois isômeros de strictinina (**78** e **80**) e um isômero digaloil hexose (**79**), todos relatados anteriormente no estudo de desreplicação das partições por CLAE-DAD-EM. A análise por IES-QTdV-EM (Figura 67) demonstrou a presença majoritária do aduto de sódio de m/z 657,0673, referente aos dois isômeros de strictinina, com erro de identificação de 3,50 ppm. O mecanismo de fragmentação para estes isômeros da strictinina foi proposto na Figura 68, através da formação no resíduo do ácido hexahidroxidifenílico de uma lactona de anel de 7 membros e a consequente ocorrência do aduto de m/z 337 no resíduo galoil-hexose.

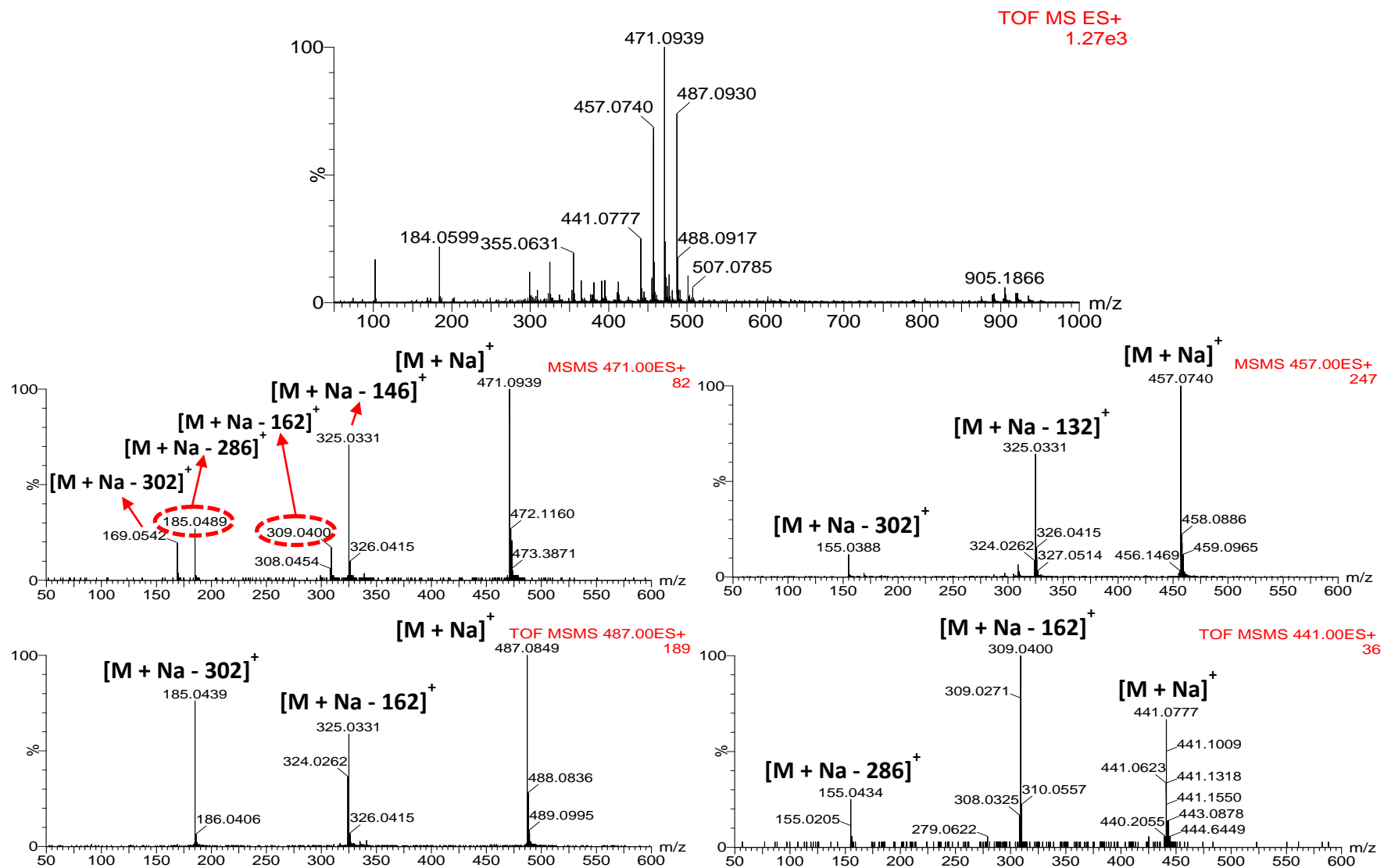


Figura 65. Espectros de massas de alta resolução por EM e EM-EM da fração SEP-ECB 12-19 e o grupo de flavonoides presentes.

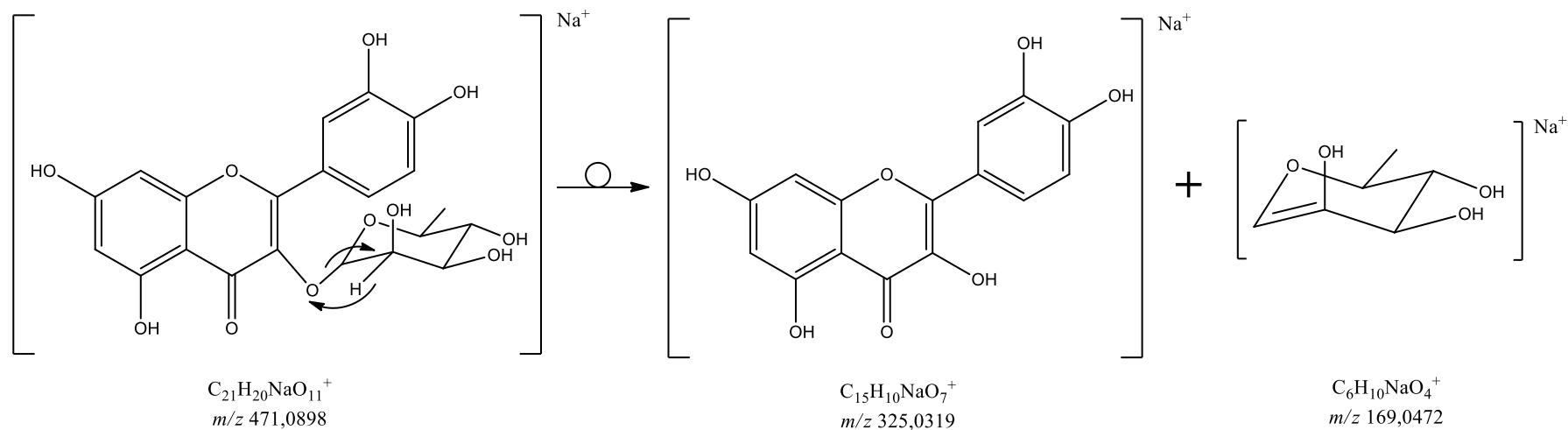


Figura 66. Mecanismo de fragmentação por EM-EM proposto para a quercitrina (67).

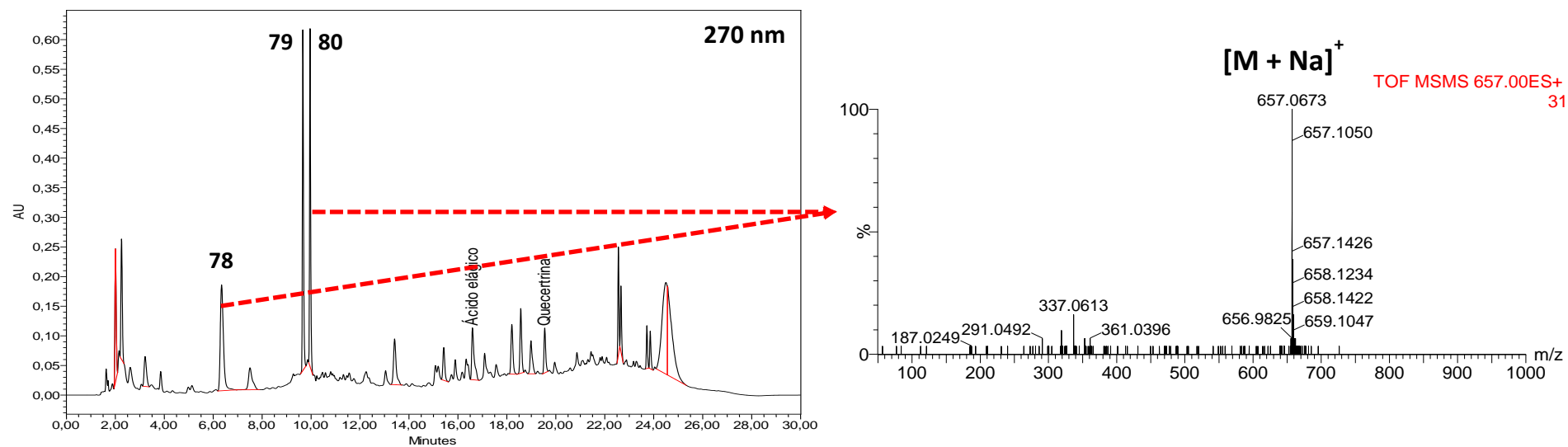


Figura 67. Cromatograma por CLAE-DAD e espectro de massas por EM-EM da fração SEP-ECB 20-29, com isômeros da estrictinina (78 e 80) e digaloiil-hexose (79).

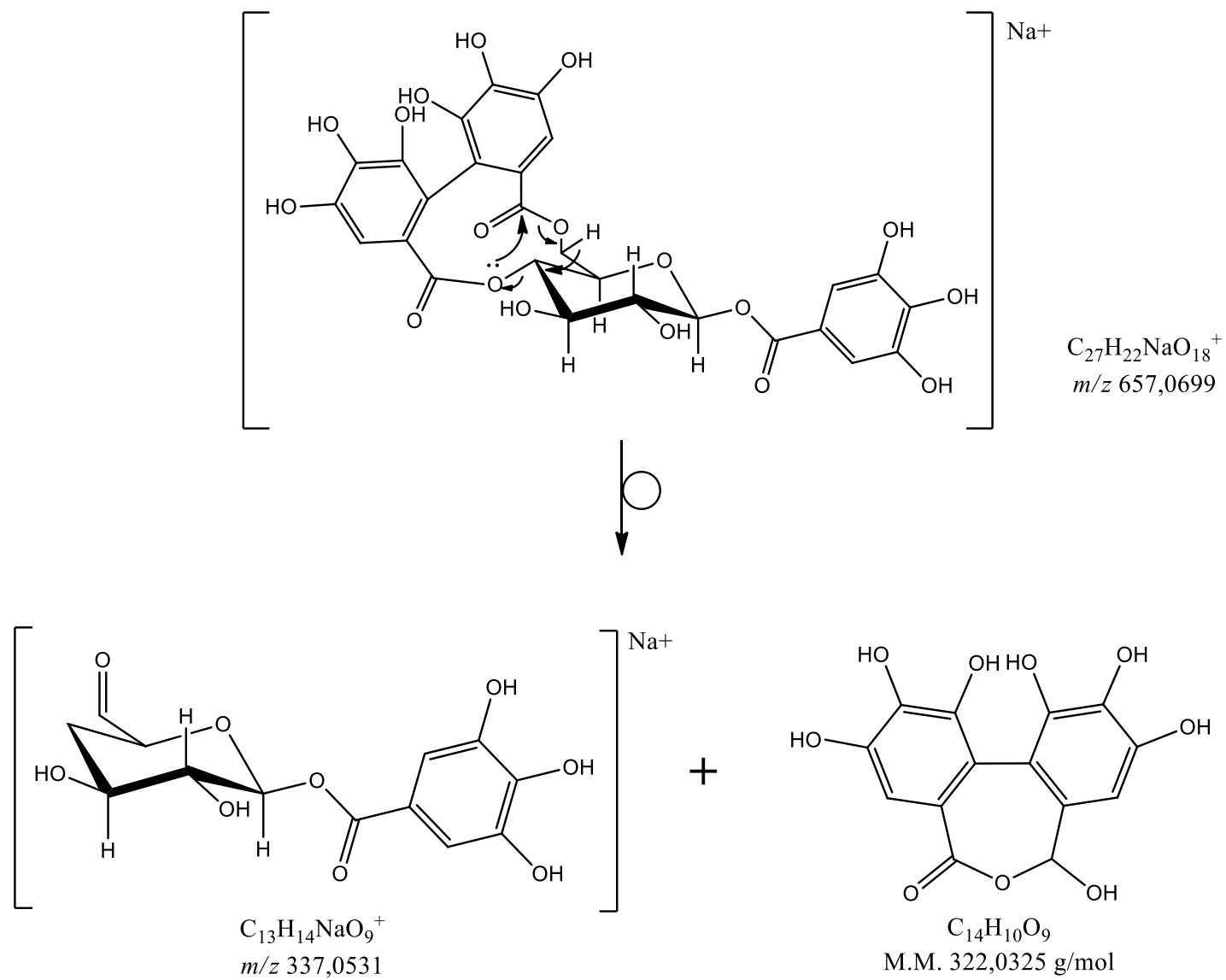


Figura 68. Mecanismo de fragmentação por EM-EM proposto para os isômeros de estroctinina (**78** e **80**).

Tabela 16. Proposta de identificação de flavonoides na fração SEP-ECB 12-19.

N	Substância (Fórmula Molecular)	t _R (min)	UV (máx)	MM (g/mol)	[M - H] ⁻	[M + Na] ⁺ (m/z _{cal})	Erro (ppm)	EM-EM
65	Quercetina 3- <i>O</i> -galactosídeo Hiperosídeo (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂)	19,0	254,6; 353,1	464	463	487,0849 (487,0846)	0,62	325,0331 ([M + Na - Rhamnosil] ⁺) 185,0489 ([M + Na - Quercetina] ⁺)
66	Quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo Isoquercitrina (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂)	19,4	254,9; 352,7	464	463	487,0849 (487,0846)	0,62	325,0331 ([M + Na - Rhamnosil] ⁺) 185,0489 ([M + Na - Quercetina] ⁺)
83	Isômero quercetina pentosídeo (C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁)	20,4	255,3; 352,4	434	433	457,0740 (457,0741)	0,22	325,0331 ([M + Na - Pentosil] ⁺) 155,0388 ([M + Na - Quercetina] ⁺)
92	Isômero kaempferol hexosídeo (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁)	20,5	264,5; 346,9	448	447	471,0909 (471,0898)	2,34	309,0400 ([M + Na - Hexosil] ⁺) 185,0489 ([M + Na - Kaempferol] ⁺)
84	Isômero quercetina pentosídeo (C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁)	20,8	254,9; 351,6	434	433	457,0740 (457,0741)	0,22	325,0331 ([M + Na - Pentosil] ⁺) 155,0388 ([M + Na - Quercetina] ⁺)
67	Quercetina 3- <i>O</i> -rhamnosídeo Quercitrina (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁)	21,2	254,9; 347,9	448	447	471,0909 (471,0898)	2,34	325,0331 ([M + Na - Rhamnosil] ⁺) 169,0542 ([M + Na - Quercetina] ⁺)
85	Isômero kaempferol pentosídeo (C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀)	21,6	265,1; 345,9	418	417	441,0777 (441,0792)	3,40	309,0400 ([M + Na - Pentosil] ⁺) 155,0434 ([M + Na - Kaempferol] ⁺)
86	Isômero kaempferol pentosídeo (C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀)	21,8	264,4; 335,5	418	417	441,0777 (441,0792)	3,40	309,0400 ([M + Na - Pentosil] ⁺) 155,0434 ([M + Na - Kaempferol] ⁺)
87	Isômero kaempferol pentosídeo (C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀)	22,2	265,1; 343,8	418	417	441,0777 (441,0792)	3,40	309,0400 ([M + Na - Pentosil] ⁺) 155,0434 ([M + Na - Kaempferol] ⁺)
88	Kaempferol 3- <i>O</i> -rhamnosídeo (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀)	22,6	263,3; 341,4	432	431	-	-	-

O último experimento **SEP-ECC** conduziu a obtenção de uma fração SEP-ECC 23-75 (156,6 mg), com intensidade destacada para o ácido elágico (**60**), lactona do ácido gálico. O cromatograma por CLAE-DAD-EM (Figura 69) demonstra este resultado e sugere a presença de outras substâncias fenólicas após 24 min de corrida cromatográfica.

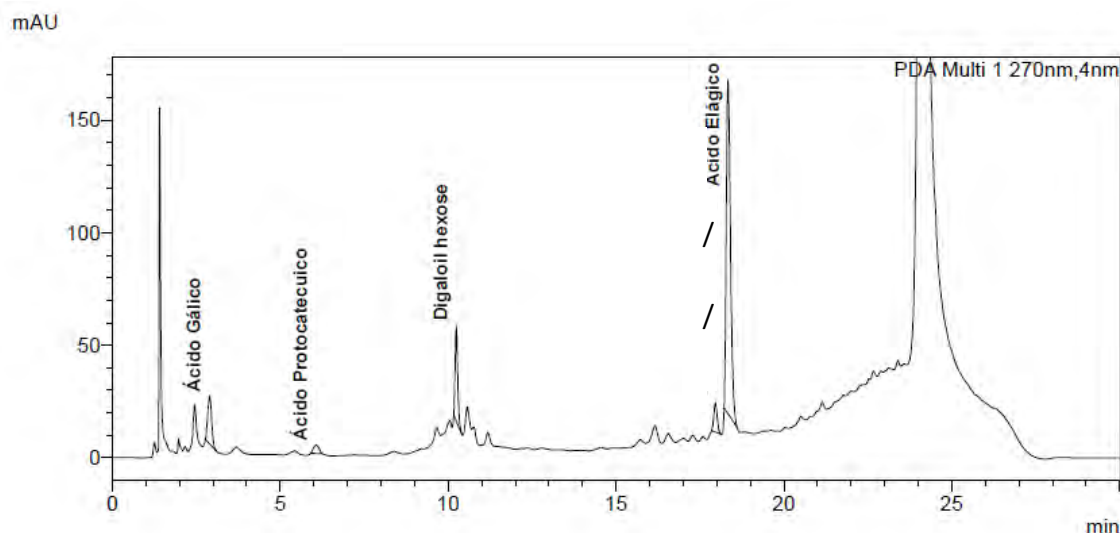


Figura 69. Cromatograma por CLAE-DAD-EM da fração SEP-ECC 23-75.

Este resultado indica que outras substâncias fenólicas estão presentes nos extratos e frações de folhas de *E. copacabanensis* e não foram identificadas através do presente trabalho, como, por exemplo, taninos de maior massa molecular. Portanto, ainda existe um potencial de estudo fitoquímico das folhas de *E. copacabanensis* para pesquisas futuras.

Em resumo, foram identificados um total de 37 substâncias fenólicas diferentes nas partições e frações do extrato de folhas de *E. copacabanensis* através dos sistemas CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM, sendo 36 metabólitos inéditos para a espécie botânica.

3.2.5. Desrepliação por CLAE-DAD-EM das frações de folhas de *Myrciaria tenella*

As análises no sistema CLAE-DAD-EM também foram empregadas para as partições EFMT-D, EFMT-Ac, EFMT-Bu e as frações MT-L e MT-H. A mesma estratégia foi adotada para as propostas de identificação das substâncias, incluindo os perfis cromatográficos prévios por CLAE-DAD e a avaliação paralela das frações obtidas após etapas de fracionamento da partição EFMT-Ac. A Tabela 17 apresenta todas as substâncias propostas para os extratos e as frações de folhas da espécie, incluindo os dados cromatográficos e espectroscópicos. Foram propostas através da desrepliação por CLAE-DAD-EM um total de 19 substâncias, com a confirmação de 11 substâncias e a indicação de outros 8 metabólitos secundários.

As partições e frações de folhas de *M. tenella* demonstraram uma menor diversidade de substâncias fenólicas, quando comparado aos resultados da espécie *E. copacabanensis*. Foi observada como característica para a espécie a presença de derivados do ácido elágico e derivados do flavonol quercetina, com unidades hexosídicas e de ácido gálico.

Em relação a cada subclasse observada, os quatro ácidos fenólicos observados já tinham sido detectados nas análises por CLAE-DAD, de maneira similar aos flavan-3-óis (+)-catequina e (-)-catequina na fração hidrolisada EC-H. Este resultado sugere que as catequinas podem estar presentes nas folhas de *M. tenella* como taninos condensados de alta massa molecular, visto que não foram detectadas substâncias derivadas mono- ou dissustituídas ou ainda dímeros como as procianidinas, como na espécie *E. copacabanensis*.

Entre os derivados do ácido elágico, foram detectadas, sobretudo na partição EFMT-Ac, cinco substâncias com espectros de UV/Vis característico da estrutura química, com duas bandas de absorção em 254 e 364 nm e maior intensidade para a banda I. Apenas duas foram identificadas com maior confiabilidade, sendo o próprio ácido elágico (m/z para $[M - H]^-$ 301, **60**), constituinte majoritário da maioria das amostras analisadas, e o ácido 3,3'-*O*-dimetil elágico (m/z para $[M - H]^-$ 329, **96**), destacados na Figura 70. Para outros três derivados, não foram observados derivados de ácido elágico similares nas bases de dados empregadas, sendo identificadas pela m/z da molécula desprotonada. Os derivados do ácido elágico 381 (**93**), 395 (**94**) e 409 (**95**), conforme a Figura 71, sugerem apresentar substituintes similares ligados ao núcleo cromofórico, com acréscimo de grupos metilênicos (CH_2) pela diferença de 14 Da.

Quanto aos flavonóis, foram detectadas sete substâncias diferentes com o mesmo padrão de espectro de UV/Vis. Os flavonóis hiperosídeo ($[M - H]^-$ m/z 463, **65**), isoquercitrina ($[M - H]^-$ m/z 463, **66**) e quercetina ($[M - H]^-$ m/z 301, **68**) foram confirmados através da análise por CLAE-DAD-EM. Além destes, foram observados dois derivados conjugados a dois grupos (uma unidade de hexose e outra de ácido gálico). Baseado na ordem de eluição, a proporção entre os picos e a possível co-eluição dos derivados hexosídicos em algumas frações analisadas, sugeriu-se a identidade da quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)-galactosídeo ($[M - H]^-$ m/z 615, **98**) e da quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)-glicosídeo ($[M - H]^-$ m/z 615, **99**). As Figura 72 e Figura 73 demonstram os espectros dos pares dos derivados hexosídicos e galoilhexosídicos de quercetina. Outros dois flavonóis, um derivado de quercetina 480 ($[M - H]^-$ m/z 479, **97**) e um isômero da quercetina glicuronídeo ($[M - H]^-$ m/z 477, **100**), também foram observados por desreplicação das partições e frações de folhas de *M. tenella*.

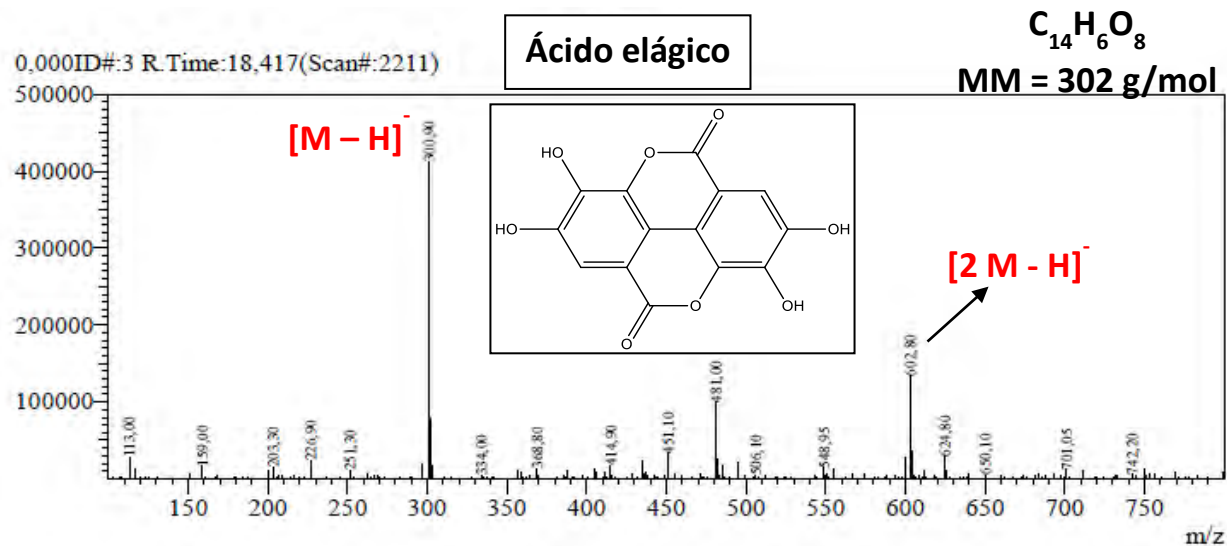
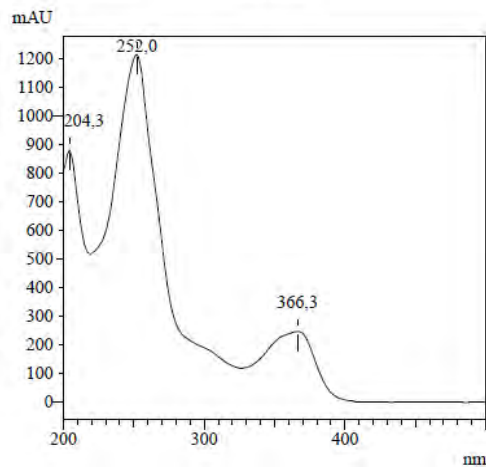
Semelhantemente ao processo de fracionamento da partição EFEC-Ac para folhas de *E. copacabanensis*, o estudo prosseguiu com a purificação em coluna de sílica gel e Sephadex da partição EFMT-Ac, que apresentou grande parte dos derivados de ácido elágico e flavonóis.

Tabela 17. Proposta de identificação de substâncias, através de desreplicação por CLAE-DAD-EM, nos extratos/frações de folhas de *M. tenella*.

N	Substância (Fórmula Molecular)	t _R (min): CLAE-DAD- EM (CLAE-DAD)	UV (máx)	MM (g/mol)	[M – H] ⁻	Extrato/Fração (Em negrito, quando majoritário)
<i>Ácidos fenólicos</i>						
55	Ácido gálico (C ₇ H ₆ O ₅)	2,8 (2,1)	215,7/ 270,3	170	169	MT-L; EFMT-D; EFMT-Ac; EFMT-Bu
56	Ácido protocatecuico (C ₇ H ₆ O ₄)	6,2 (4,0)	258,4/ 294,1	154	-	EFMT-D; EFMT-Ac
59	Ácido siringíco (C ₉ H ₁₀ O ₅)	12,8 (10,7)	273,8	138	-	EFMT-D; EFMT-Ac
62	Ácido <i>p</i> -cumárico (C ₉ H ₈ O ₃)	16,4 (12,2)	308,4	136	-	MT-H; EFMT-D
<i>Catequinas/Taninos Condensados</i>						
63	(+)-catequina (C ₁₅ H ₁₄ O ₆)	10,6 (8,6)	278,6	290	289	MT-H
64	(-)-epicatequina (C ₁₅ H ₁₄ O ₆)	13,4 (11,1)	278,6	290	289	MT-H
<i>Derivados Ácido Gálico/Taninos Hidrolisáveis</i>						
58	Galato de metila (C ₈ H ₈ O ₅)	10,6 (7,9)	215,8/ 270,3	184	183	MT-L; EFMT-D; EFMT-Ac
93	Derivado ácido elágico 382	17,3 (14,6)	252,5/ 356,3	382	381	EFMT-Ac
60	Ácido Elágico (C ₁₄ H ₆ O ₈)	18,4 (16,6)	252,5/ 364,4	302	301	MT-L; MT-H; EFMT-D; EFMT-Ac; EFMT-Bu
94	Derivado ácido elágico 396	20,8 (18,2)	251,2/ 342,3/354,6	396	395	MT-L; EFMT-D; EFMT-Ac; EFMT-Bu
95	Derivado ácido elágico 410	22,4 (20,3)	246,9/ 357,3	410	409	MT-L; EFMT-D; EFMT-Ac; EFMT-Bu
96	Ácido 3,3'- <i>O</i> -dimetil elágico	24,2	250,1/	330	329	EFMT-D; EFMT-Ac;

	(C ₁₆ H ₁₀ O ₈)	(23,4)	364,4			EFMT-Bu
<i>Flavonóis e Derivados Glicosilados</i>						
97	Derivado quercetina 480	16,4 (-)	263,9/ 352,5	480	479	EFMT-Ac
98	Quercetina 3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -galoil)-galactosídeo (C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆)	17,9 (15,9)	256,1/ 262,0/352,7	616	615	EFMT-D; EFMT-Ac
99	Quercetina 3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -galoil)-glicosídeo (C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆)	18,1 (16,5)	256,1/ 264,3/356,3	616	615	EFMT-D; EFMT-Ac
65	Quercetina 3- <i>O</i> -galactosídeo – Hiperosídeo (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂)	19,0 (17,2)	254,6/ 353,1	464	463	MT-L; MT-H; EFMT-D; EFMT-Ac
100	Isômero quercetina glicuronídeo (C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃)	19,2 (17,5)	254,6/ 352,8	478	477	MT-L; EFMT-D; EFMT-Ac; EFMT-Bu
66	Quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo – Isoquercitrina (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂)	19,4 (17,7)	254,9/ 352,7	464	463	MT-L; EFMT-D; EFMT-Ac
68	Quercetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)	24,2 (-)	269,6/ 354,5	302	301	MT-L

Retention Time : 18,234 min
Compound Name : Ácido Elágico



Retention Time : 24,205 min
Compound Name : Derivado Ácido Elágico 329

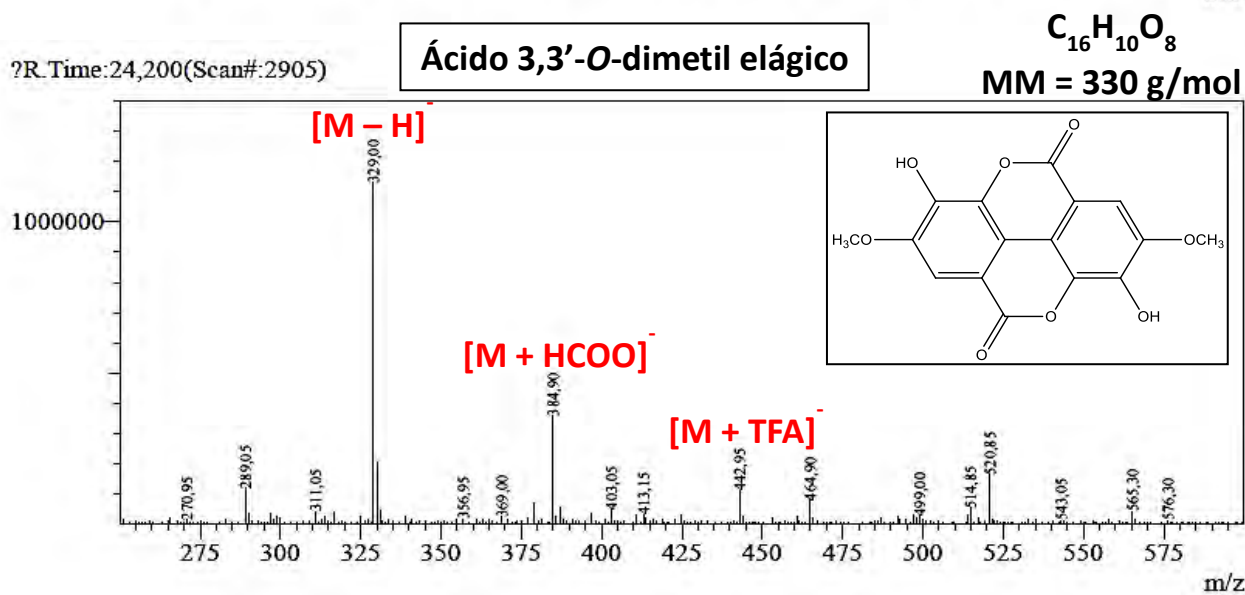
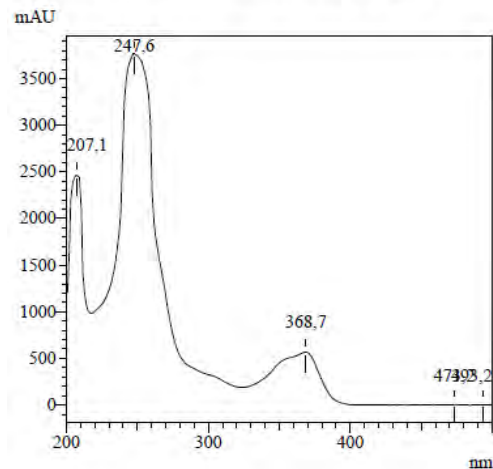
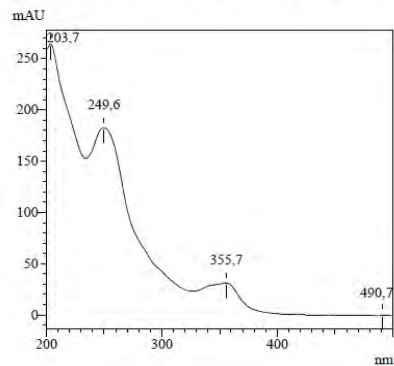
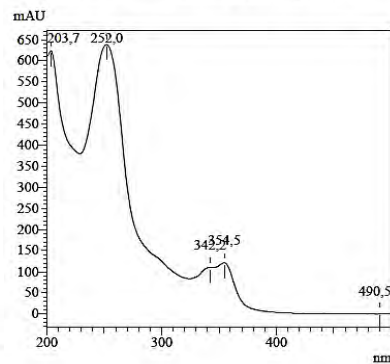


Figura 70. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para o ácido elágico (60) e o ácido 3,3'-O-dimetil-elágico (96).

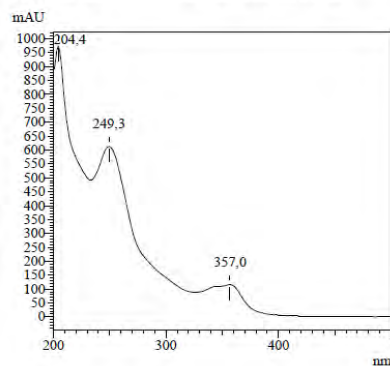
Retention Time : 17.334 min
Compound Name : Derivado Ácido Elágico 381



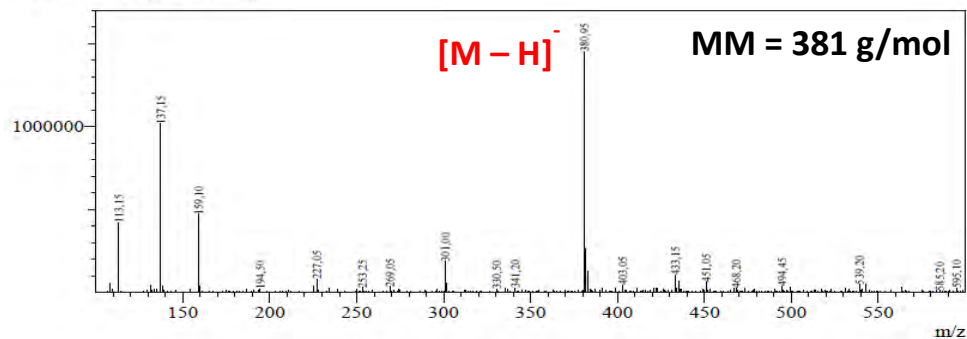
Retention Time : 20.615 min
Compound Name : Derivado Ácido Elágico 395



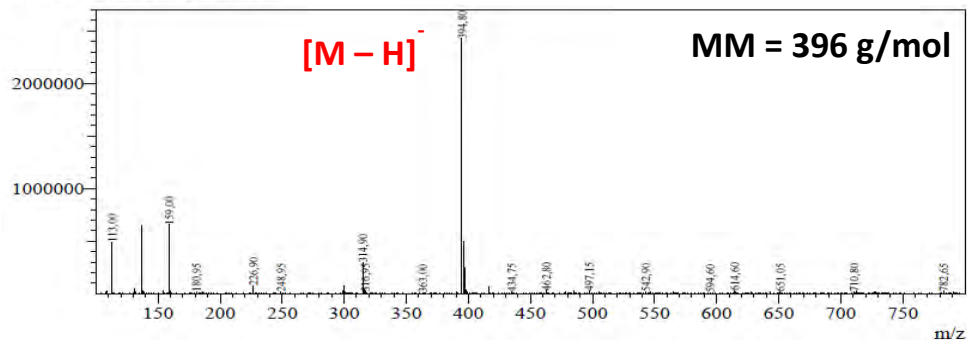
Retention Time : 22.297 min
Compound Name : Derivado Ácido Elágico 409



?R_Time:17,333(Scan#:2081)



0,000R_Time:20,800(Scan#:2497)



?R_Time:22,300(Scan#:2677)

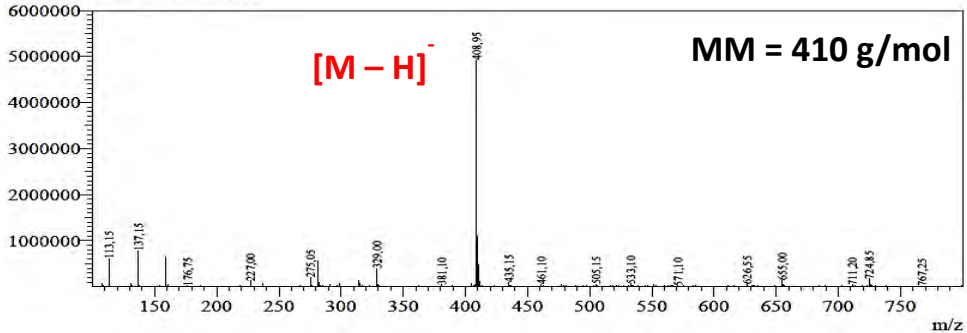
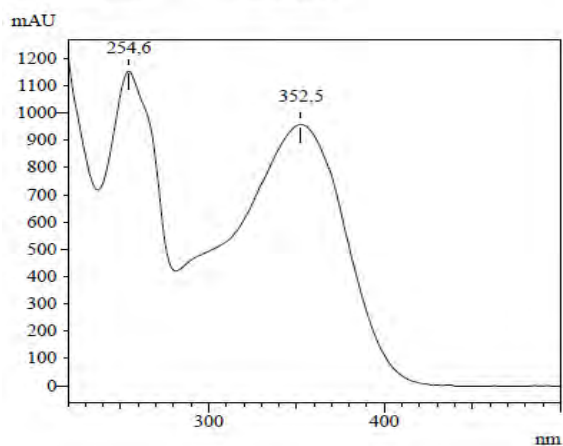


Figura 71. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para os derivados do ácido elágico 382 (93), 396 (94) e 410 (95).

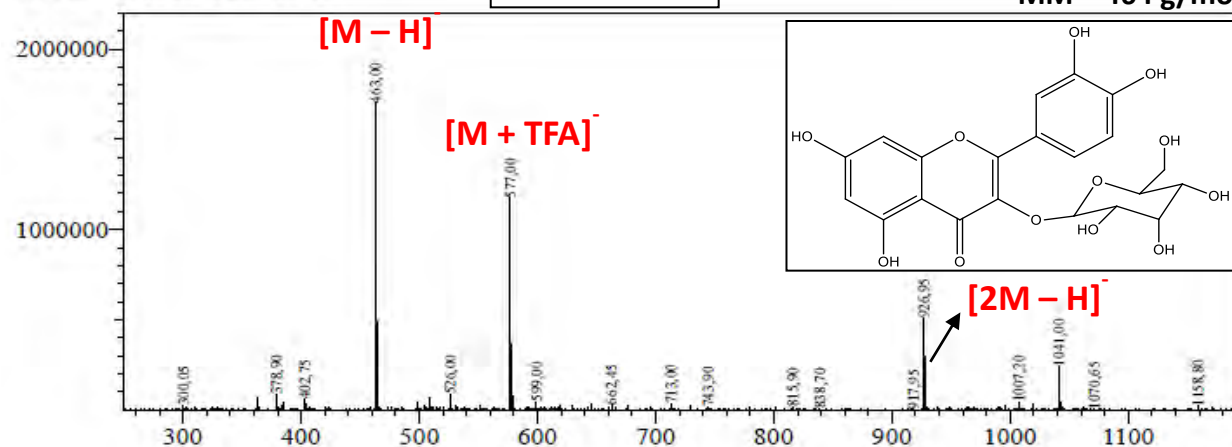
Retention Time : 18,949 min
Compound Name : Hexosídeo



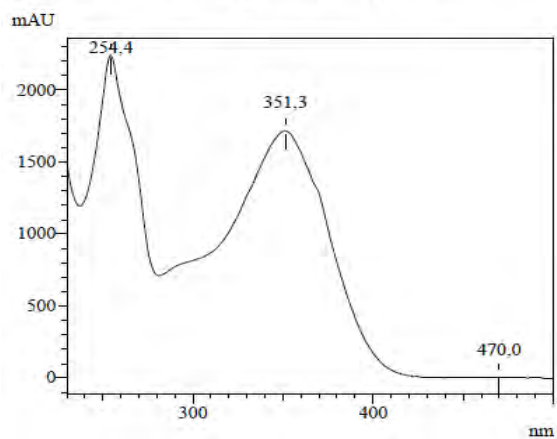
?R.Time:18.900(Scan#:2269)

Hiperosídeo

$C_{21}H_{20}O_{12}$
MM = 464 g/mol



Retention Time : 19,292 min
Compound Name : Quercetina 3-O-glicosídeo



?R.Time:19.300(Scan#:2317)

Isoquercitrina

$C_{21}H_{20}O_{12}$
MM = 464 g/mol

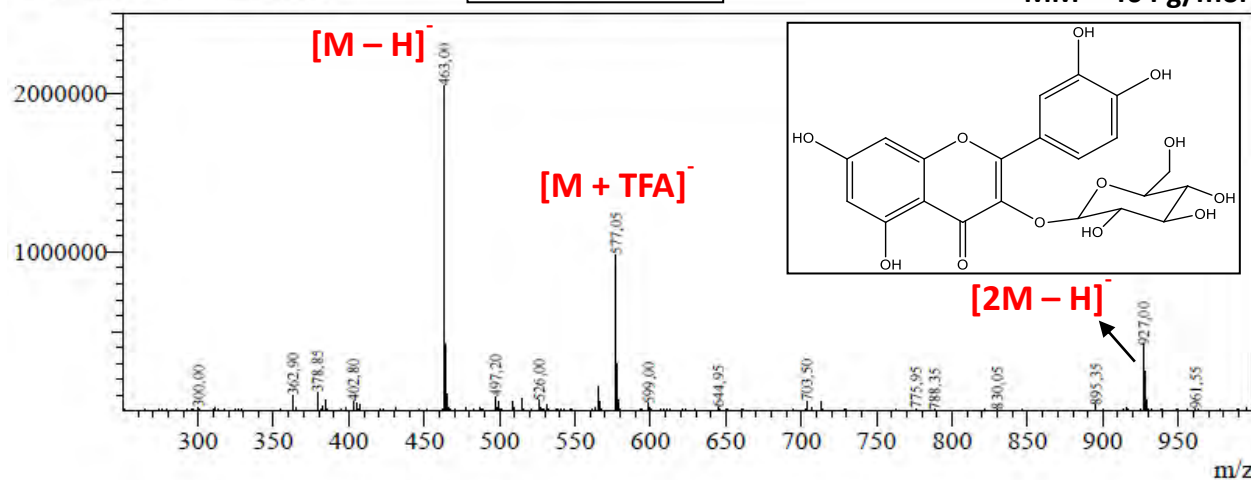


Figura 72. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para os flavonóis hiperosídeo (65) e isoquercitrina (66).

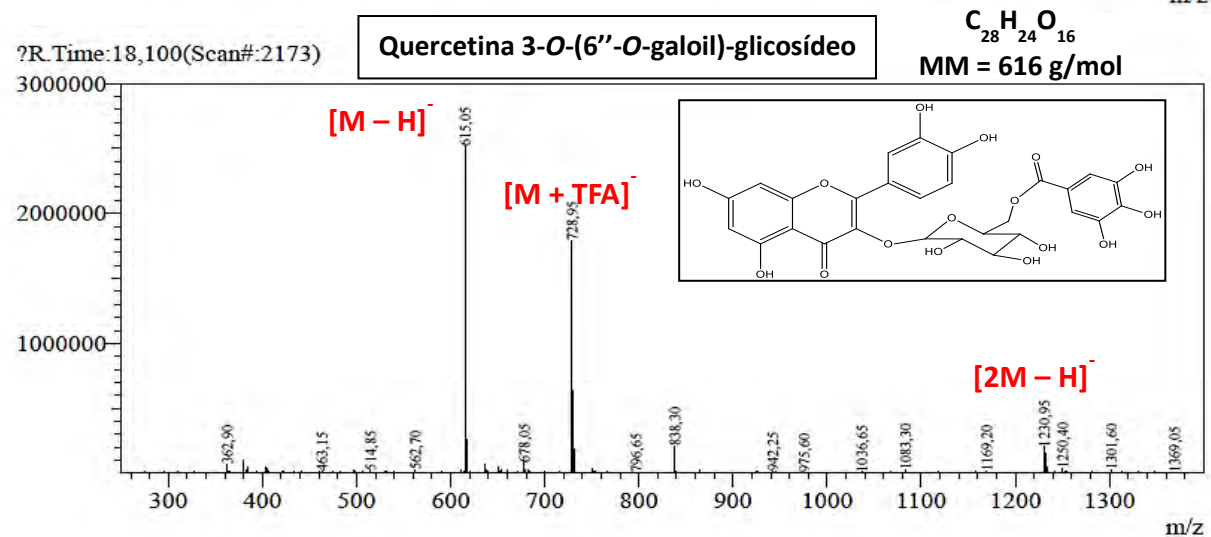
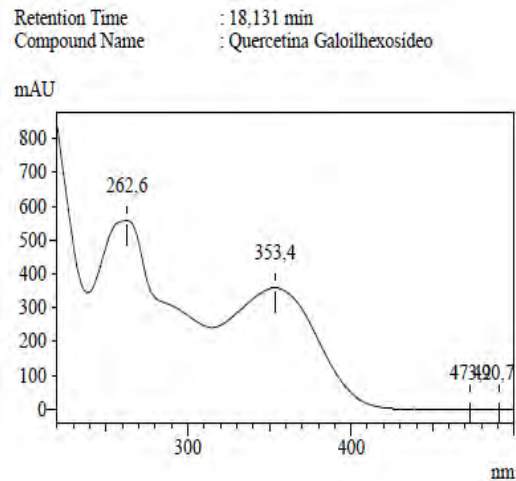
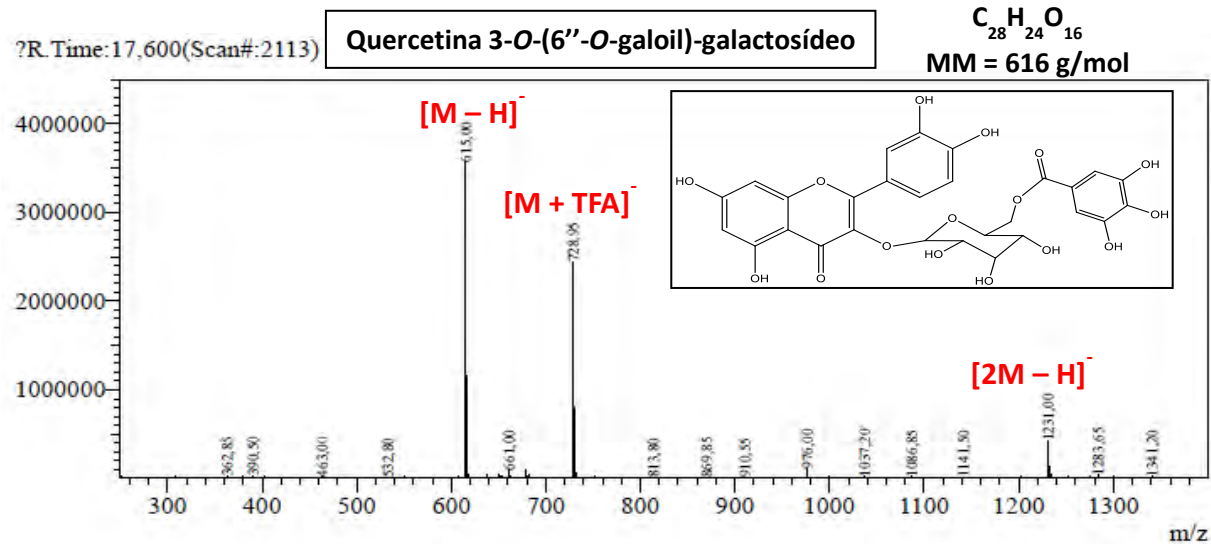
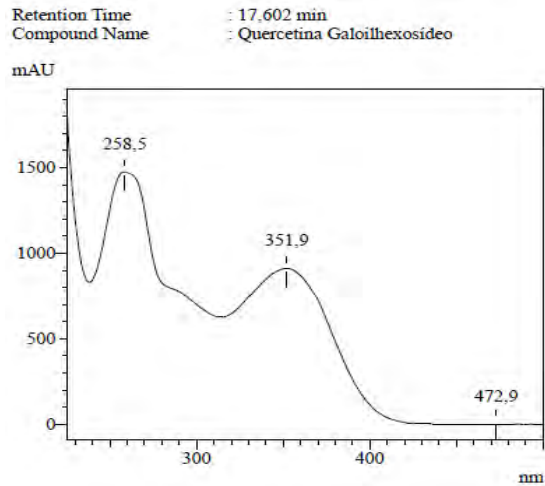


Figura 73. Espectros de UV/Vis e de massas obtidos para os flavonóis quercetina 3-O-(6''-O-galoil)-galactosídeo (**98**) e quercetina 3-O-(6''-O-galoil)-glicosídeo (**99**).

3.2.6. Análise das frações em Sephadex da partição EFMT-Ac

A partir do fracionamento em coluna de sílica gel da partição **EFMT-Ac**, foram obtidos quatro frações de interesse, em que a primeira fração EFMT-Ac 7-12 (19,4 mg, Figura 74) demonstrou composição majoritária de quercetina (**68**), similar à fração EFEC-Ac 11-18. Isto demonstra que a quercetina, um dos flavonoides mais encontrados e estudados do reino vegetal (BILER et al., 2017), também é o principal flavonoide presentes nas folhas das duas espécies da família Myrtaceae, o que é observado na prática pela ocorrência de diferentes derivados identificados no presente trabalho. Além do presente trabalho, apenas o trabalho recente de Ribeiro e colaboradores (2019) identificou em extrato de folhas de *M. tenella* outro derivado de quercetina, a rutina, que apresenta na posição C-3 do anel cromano uma ligação com uma unidade de rhamnose e outra de glicose.

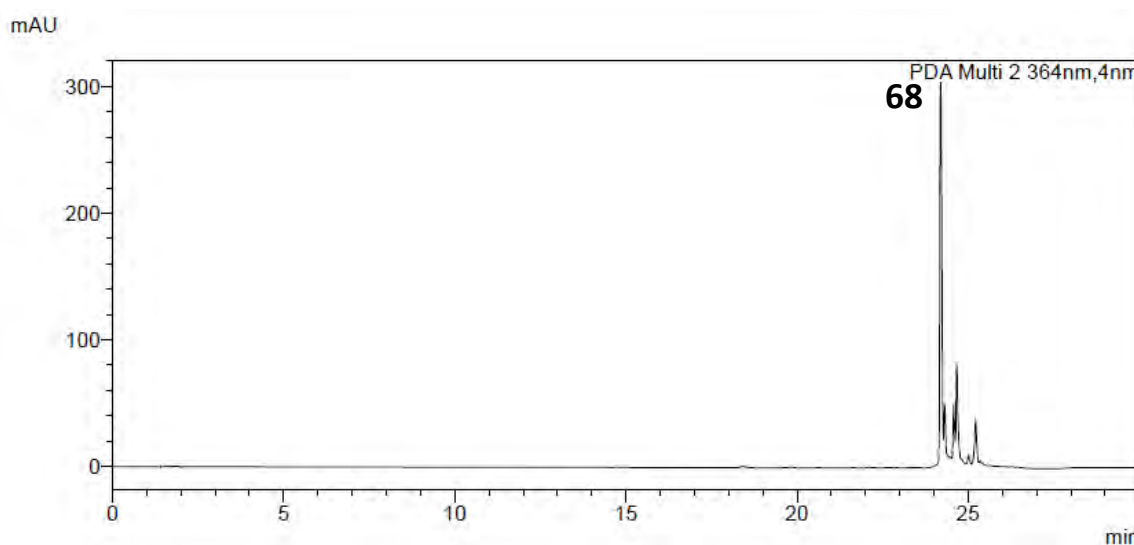


Figura 74. Cromatograma por CLAE-DAD-EM da fração EFMT-Ac 7-12, com destaque para a presença de quercetina (**68**).

As demais frações de interesse foram purificadas em coluna de Sephadex. O primeiro experimento, **SEP-MTA**, conduziu a duas frações distintas. A primeira fração, SEP-MTA 4-5 (12,5 mg), apresentou uma mistura de cinco substâncias: três derivados do ácido benzoico, ácido *p*-hidróxibenzoico (**57**), ácido vanílico (**101**) e ácido siríngico (**59**), e dois derivados de ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico (**62**) e ácido ferúlico (**102**). Estes dois grupos de substâncias apresentaram os padrões característicos nos espectros UV/Vis com, respectivamente, bandas de absorção na região de UVC e de UVB, como discutido anteriormente. A Figura 75 apresenta o cromatograma por CLAE-DAD, obtido com excelente resolução cromatográfica, e os respectivos espectros UV/Vis. Um sexto componente foi observado com t_R 13,46 min e banda de absorção em 296,3 nm, porém a comparação com os padrões analíticos e a biblioteca não contribuíram para a proposta de identificação. Sendo assim, consideramos que neste estudo de *M. tenella* ocorre um metabólito secundário com núcleo central do tipo 1,3,5-trimetóxi-benzeno, que apresenta comprimento de onda de máxima absorção próximo a 290 nm.

Além desta fração, a partir do primeiro experimento, foi isolado o ácido 3,3-*O*-dimetil elágico (**96**) na fração SEP-MTA 6-8 (25,4 mg), um dos derivados do ácido elágico observados na desreplicação por CLAE-DAD-EM. A presença de dois grupos metoxilas não altera significativamente a absorção de luz na região do ultravioleta pelo cromóforo em comparação ao ácido elágico (**60**) e, por isso, foi observada as duas bandas de absorção em

250,1 e 364,64 nm, com a banda I relativamente mais intensa que a banda II. Porém, esta substituição favorece uma diminuição de polaridade da substância, o que pode ser observado na prática pelo aumento do tempo de retenção no sistema CLAE-DAD em relação ao ácido elágico (t_R , respectivamente, de 23,3 e 16,6 min). Para a confirmação da estrutura química, procedeu-se o isolamento da substância por coleta automatizada através do mesmo sistema CLAE-DAD analítico e o emprego da válvula seletora de canais Rheodyne®. Esta estratégia será descrita com maior riqueza de detalhes no Capítulo III. Duas análises diferentes de espectrometria de massas foram adotadas, sendo obtidas diferentes respostas que confirmaram a identidade da substância. O espectro de massas de íons totais por IES(+)-QTdV-EM identificou a presença do aduto de sódio de m/z 353 e a formação de dímero (m/z 683) e trímero (m/z 1013). Quando selecionado o íon m/z 683 e empregada uma energia de colisão sobre este íon, foi observada a formação do aduto de sódio de m/z 353 no espectro por EM-EM, demonstrando uma molécula de MM 330 g/mol. De modo similar, o espectro de massas obtido por CLAE-DAD-EM, com a técnica de IES(-)-Q, foi observado a molécula desprotonada de m/z 329, contribuindo para a proposta da substância. A Figura 76 sintetiza todos os dados instrumentais obtidos para o ácido 3,3'-*O*-dimetil elágico.

Os dois experimentos seguintes, **SEP-MTB** e **SEP-MTC**, corroboraram para o isolamento e a identificação dos mesmos derivados de quercetina. A fração SEP-MTB 47-71 (65,4 mg) foi obtida a partir do segundo experimento como uma mistura dos flavonóis quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)-galactosídeo (**98**), quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)-glicosídeo (**99**), hiperosídeo – quercetina 3-*O*-galactosídeo (**65**) e isoquercitrina – quercetina 3-*O*-glicosídeo (**66**), com a presença também do ácido elágico (**60**). Como pode ser observado na Figura 77, os espectros UV/Vis, a ordem de eluição e a intensidade dos picos no cromatograma por CLAE-DAD contribuíram para a proposta de identificação. Porém as principais respostas foram os espectros de massas e seus respectivos íons assinalados. A Figura 77 detalha todas estas informações no cromatograma por CLAE-DAD e nos dois espectros por EM-EM obtidos para esta fração.

O espectro de massas por EM obtido pela técnica de IES(+)-QTdV-EM demonstrou a presença de dois íons majoritários de m/z 487,0881 e 639,0972, em que seus espectros de massas por EM-EM indicaram a fragmentação e formação da aglicona quercetina como aduto de sódio ($[M + Na]^+$, m/z 325) para ambos os analitos. Para o primeiro íon, a formação da quercetina correspondeu a perda de 162 Da entre os sinais registrados, referentes a uma unidade de hexose eliminada pelo mecanismo de rearranjo de 1,3 de hidrogênio, similar ao justificado para a quercitrina em folhas de *E. copacabanensis* (demonstrado na Figura 66). Para a formação do íon base deste primeiro espectro, a perda de 302 Da indicou a eliminação da aglicona quercetina. O mesmo fato observado também foi relatado para o segundo espectro, em que a perda de 302 Da referente a aglicona quercetina gerou a formação do íon de m/z 337. Este sinal corresponde ao aduto de sódio do resíduo galoilhexose, indicando que as duas moléculas ligadas a quercetina apresentam uma ligação covalente entre si. Os flavonoides encontram-se na forma natural como derivados glicosilados e solúveis em água e, em especial, os flavonóis apresentam preferencialmente os substituintes no C-3 devido ao grupo hidroxila com caráter mais ácido (DEWICK, 2009). Levando em consideração todas as informações levantadas, incluindo os erros de identificação em ppm e os espectros de massas por IES(-)-Q já apresentados na Figura 73, a proposta de identificação foi confirmada como os pares quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)-galactosídeo (**98**) e quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)-glicosídeo (**99**); e hiperosídeo – quercetina 3-*O*-galactosídeo (**65**) e isoquercitrina – quercetina 3-*O*-glicosídeo (**66**).

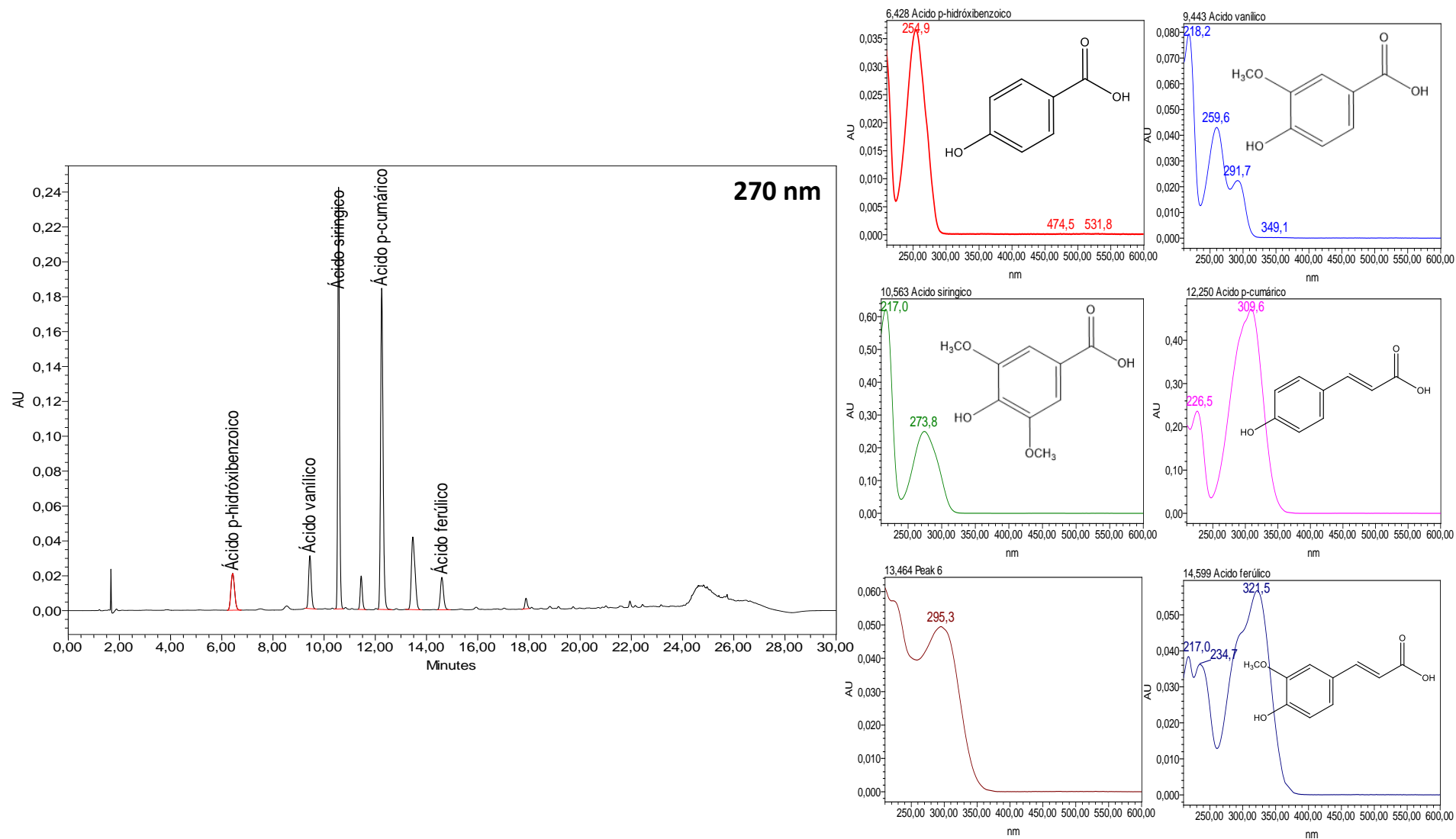
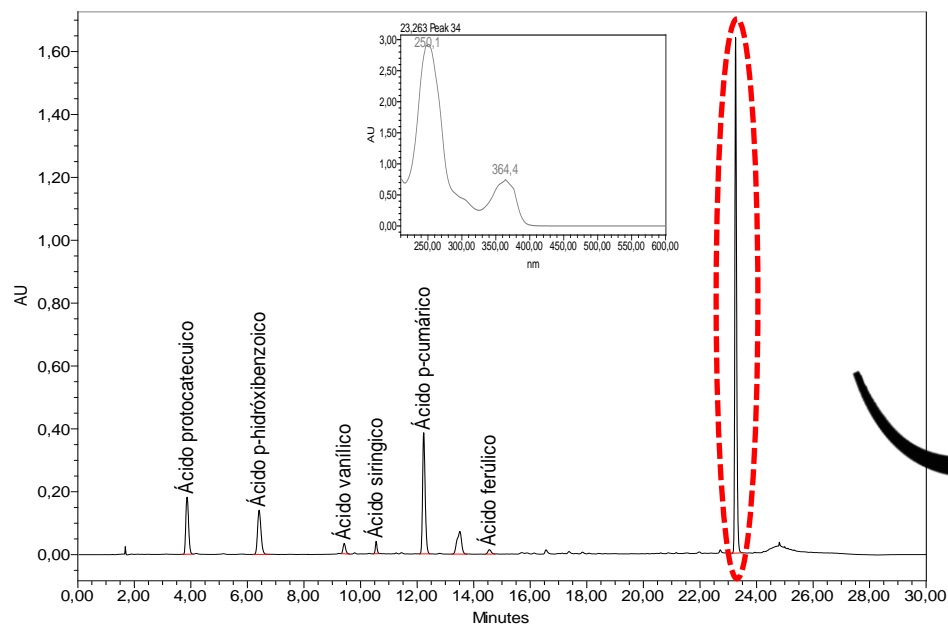
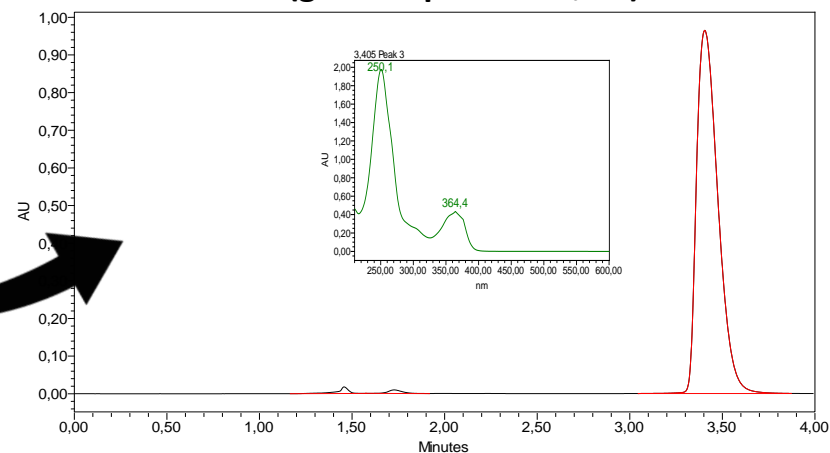


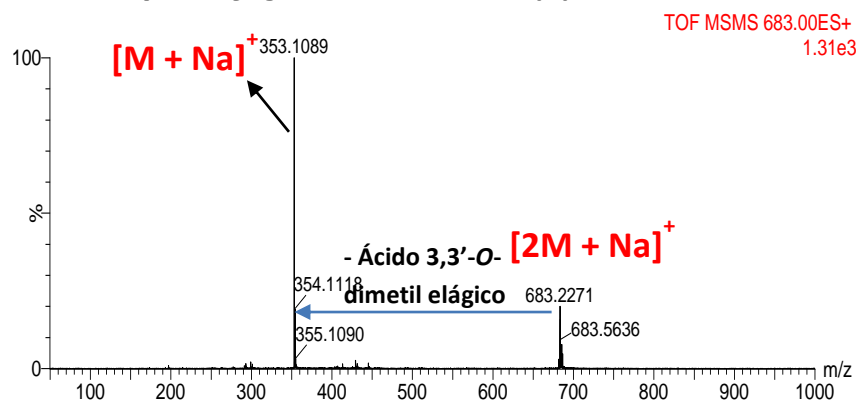
Figura 75. Cromatograma por CLAE-DAD e espectros UV/Vis dos ácidos fenólicos: ácido *p*-hidróxibenzoico (**57**), ácido vanílico (**101**), ácido síringico (**59**), ácido *p*-cumárico (**62**) e ácido ferúlico (**102**).



Isolado em CLAE-DAD analítico
(grau de pureza 98,5%)



Análise por Injeção Direta em IES(+)-QTdV-EM



Espectro de Massas por IES(-)

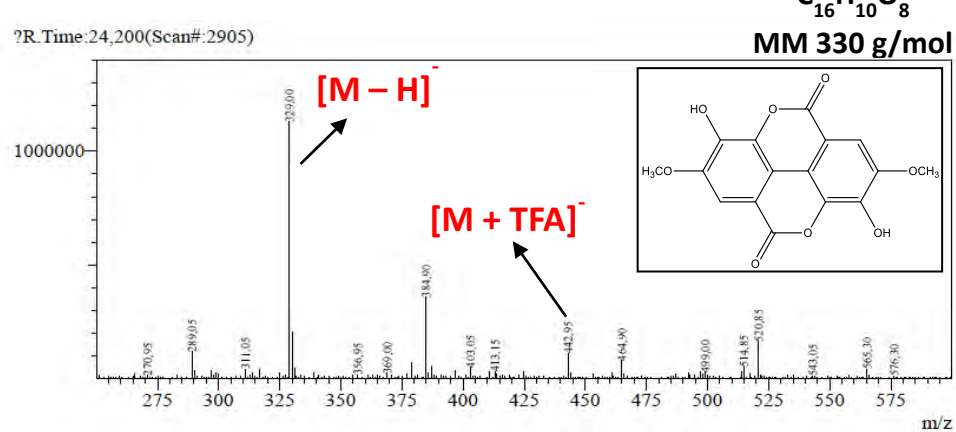
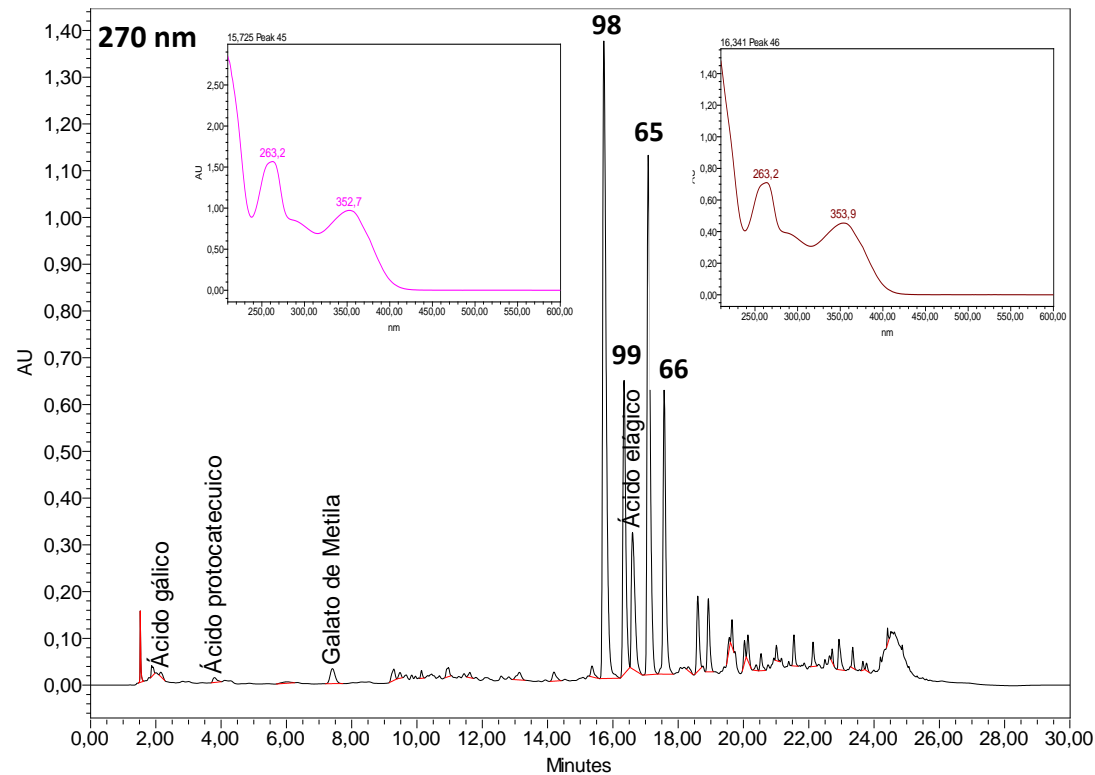
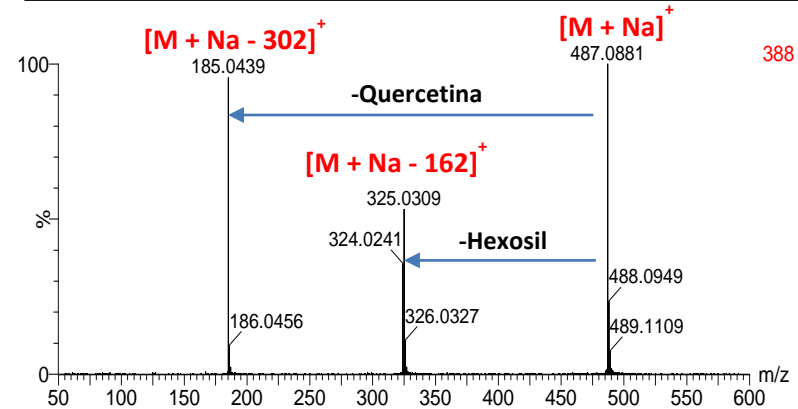


Figura 76. Cromatograma por CLAE-DAD da fração SEP-MTA 6-8 e da substância isolada ácido 3,3'-O-dimetil elágico (96), com seus espectros de UV/Vis e de massas por diferentes técnicas.



Quercetina Hexosídeo - $C_{21}H_{20}O_{12}$
 MM = 464 g/mol $[M + Na]^+$ 487,0846 Erro de 7,19 ppm



Quercetina Galoilhexosídeo - $C_{28}H_{24}O_{16}$
 MM = 616 g/mol $[M + Na]^+$ 639,0954 Erro de 2,82 ppm

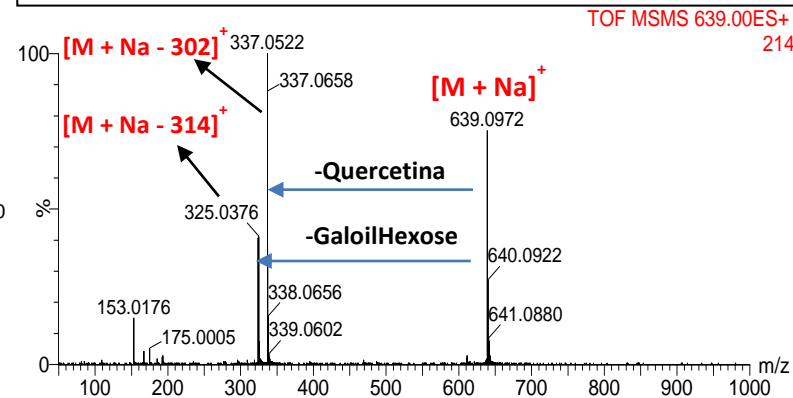


Figura 77. Cromatograma por CLAE-DAD da fração SEP-MTB-47-71, com as substâncias quercetinas 3-*O*-(6''-*O*-galoil)-galactosídeo (**98**) e 3-*O*-(6''-*O*-galoil)-glicosídeo (**99**) hiperosídeo (**65**) e isoquercitrina (**66**), incluindo os espectros de UV/Vis e por EM-EM.

O terceiro experimento SEP-MTC conduziu a duas frações ricas em cada grupo de derivados de quercetina. A fração SEP-MTC 41-55 (153,7 mg) apresentou majoritariamente os flavonóis hiperosídeo (**65**) e isoquercitrina (**66**), enquanto a fração SEP-MTC 56-67 (98,7 mg) consistiu em uma mistura majoritária de quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)-galactosídeo (**98**) e quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)-glicosídeo (**99**). As Figura 78 e Figura 79 apresentam os cromatogramas das duas frações obtidos no sistema CLAE-DAD-EM.

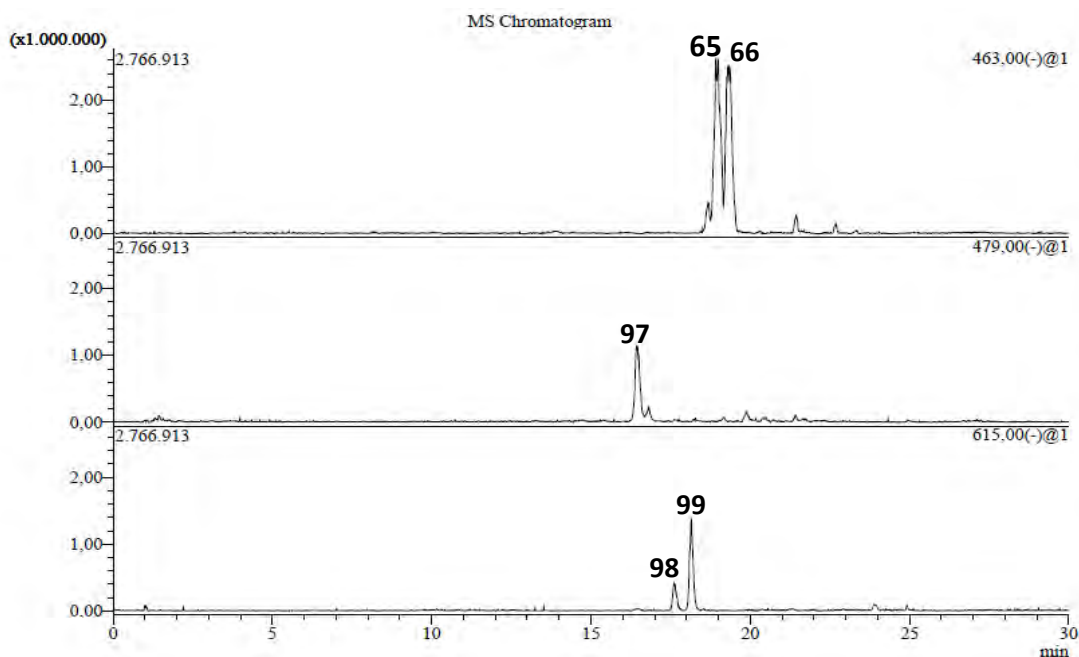


Figura 78. Cromatograma por CLAE-DAD-EM da fração SEP-MTC 41-55.

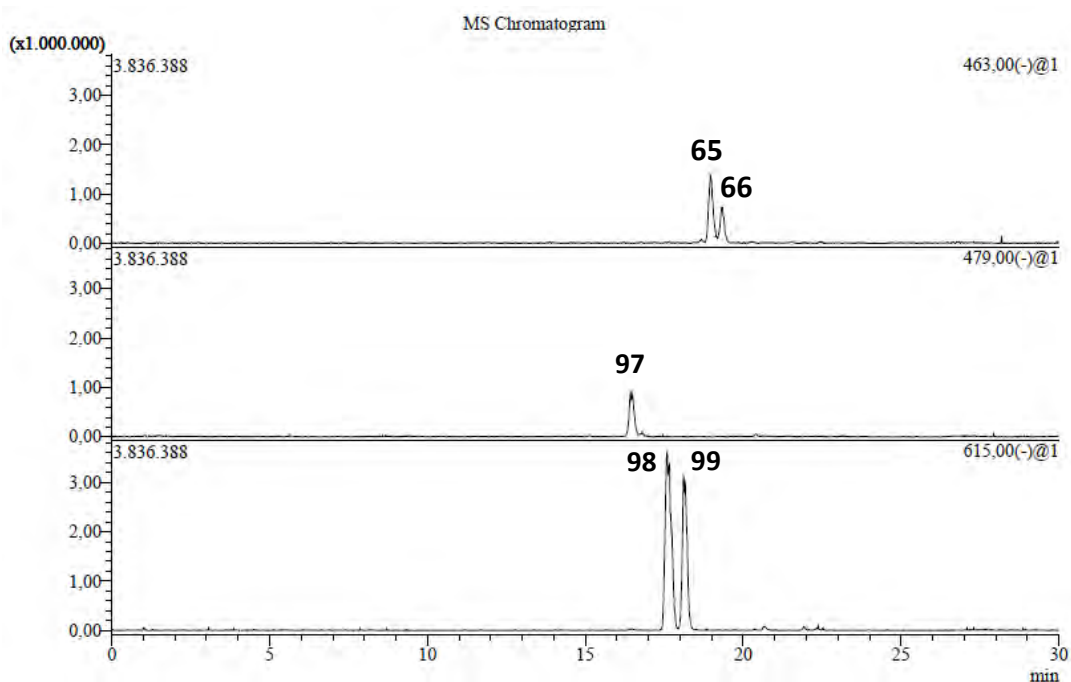


Figura 79. Cromatograma por CLAE-DAD-EM da fração SEP-MTC 56-67.

Em resumo, um total de 23 substâncias fenólicas foram identificados a partir das análises por CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM nas diferentes nas partições e frações do extrato de folhas de *M. tenella*, com todos os 23 metabólitos inéditos para a espécie botânica.

3.3. Isolamento de Outros Metabólitos Secundários em Folhas de Myrtaceae spp.

3.3.1. Elucidação estrutural da substância 103 (EFEC-H, folhas de *E. copacabanensis*)

A desreplicação por CG-EM das frações obtidas da partição hexânica das folhas de *E. copacabanensis* forneceu uma fração **EFEC-H 38-46** (1,1 g) com a presença majoritária de um sesquiterpeno, indicado por um único *spot* cujo a revelação em placa cromatográfica de CCD com vanilina sulfúrica apresentou coloração arroxeadada. A análise por CG-EM revelou um pico majoritário de t_R 16,6 min, com a rampa de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, e porcentagem relativa de 61,7%. O espectro de massas obtido para a substância **103** indicou um íon molecular de m/z 252 ($[\text{M}]^+$, 1) e um íon base de m/z 99 ($[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}]^+$, 100). A comparação do espectro de massas com as bibliotecas disponíveis sugeriu um sesquiterpeno com esqueleto carbônico do tipo clovano (anel triciclo[6.3.1.0^{1,5}]dodecano, Figura 80). Um derivado com este esqueleto, o clovandiol (4,4,8-trimetiltriciclo[6.3.1.0^{1,5}]dodecan-2,9-diol), foi isolado no trabalho anterior do grupo de pesquisa por Junior e colaboradores (2014) no extrato hexânico de folhas de *E. copacabanensis* e também identificado no presente trabalho também na partição hexânica das folhas desta espécie.

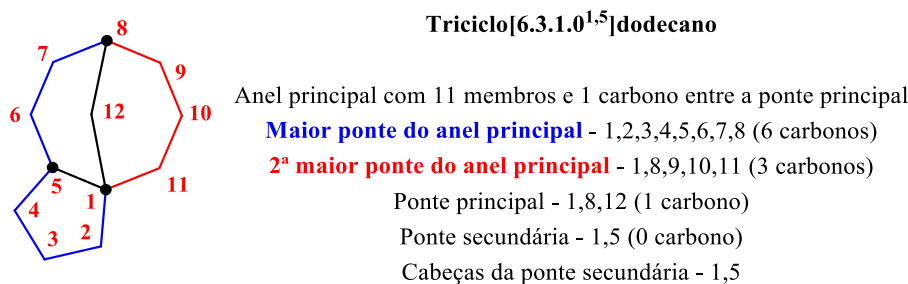


Figura 80. Estrutura química referente ao esqueleto clovano.

A confirmação da identidade da substância **103** apenas foi possível através das análises uni- e bidimensionais de RMN ^1H e ^{13}C , com a comparação dos dados de RMN do clovandiol, relatado por Junior e colaboradores (2014) para a espécie *E. copacabanensis*, e das correlações obtidas por 2D. Esta substância foi identificada como 2-metóxi-clovan-9-ol (2-metóxi-4,4,8-trimetiltriciclo[6.3.1.0^{1,5}]dodecan-9-ol), com a estrutura química destacada na Figura 81. As Figura 82 a Figura 90 apresentam todos os espectros de RMN para o 2-metóxi-clovan-9-ol, incluindo os espectros referentes ao derivado acetilado (**103a**) preparado através de tratamento com anidrido acético e piridina. A Figura 91 demonstra o espectro de absorção na região do infravermelho para esta substância. A Tabela 18 descreve todas as atribuições para os núcleos de ^1H e ^{13}C da estrutura deste sesquiterpeno e comparação com os dados do clovandiol.

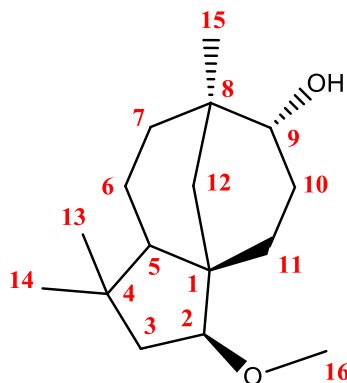


Figura 81. Estrutura química do sesquiterpeno 2-metóxi-clovan-9-ol (**103**).

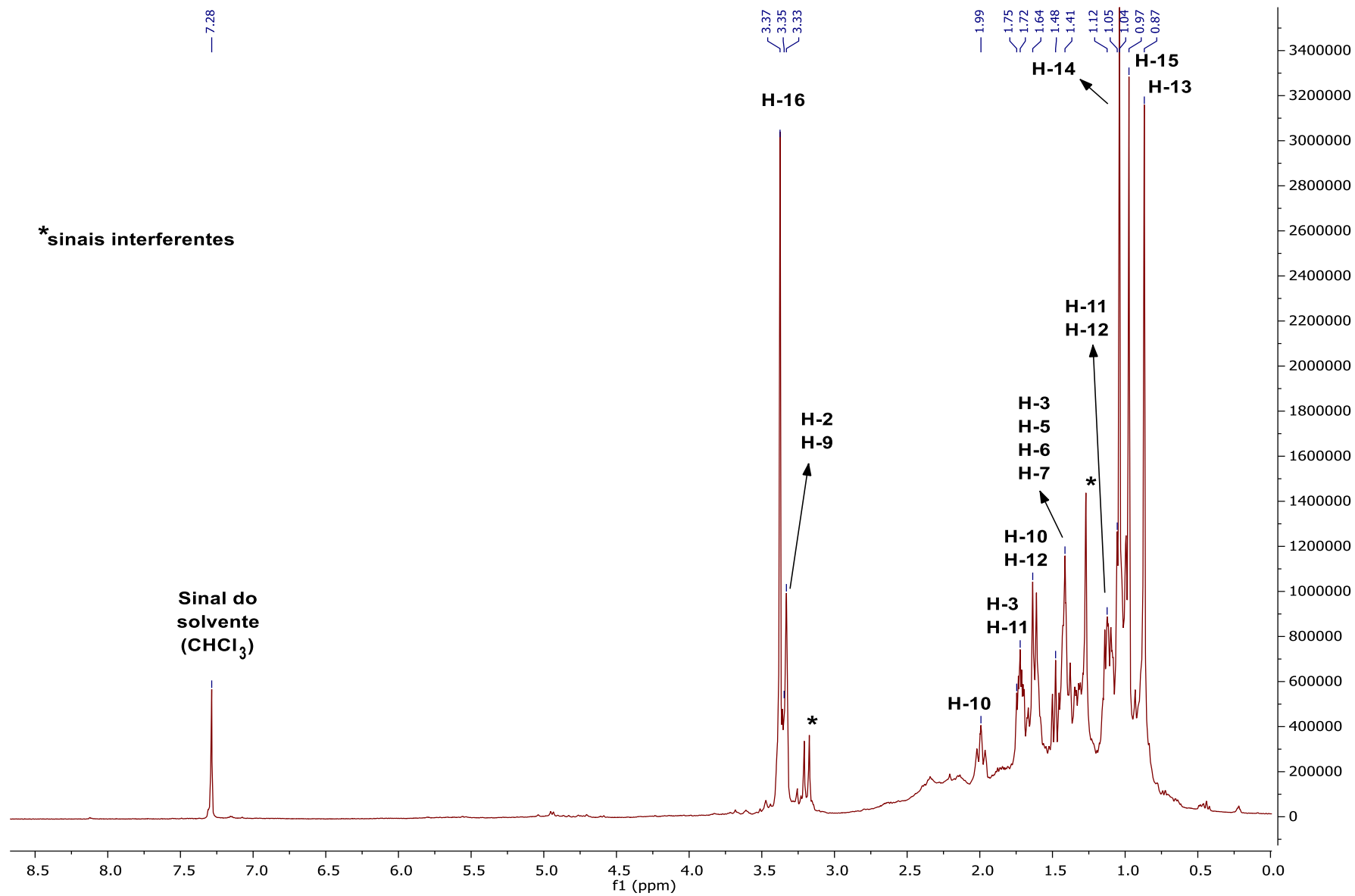


Figura 82. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do 2-metóxi-clovan-9-ol (**103**).

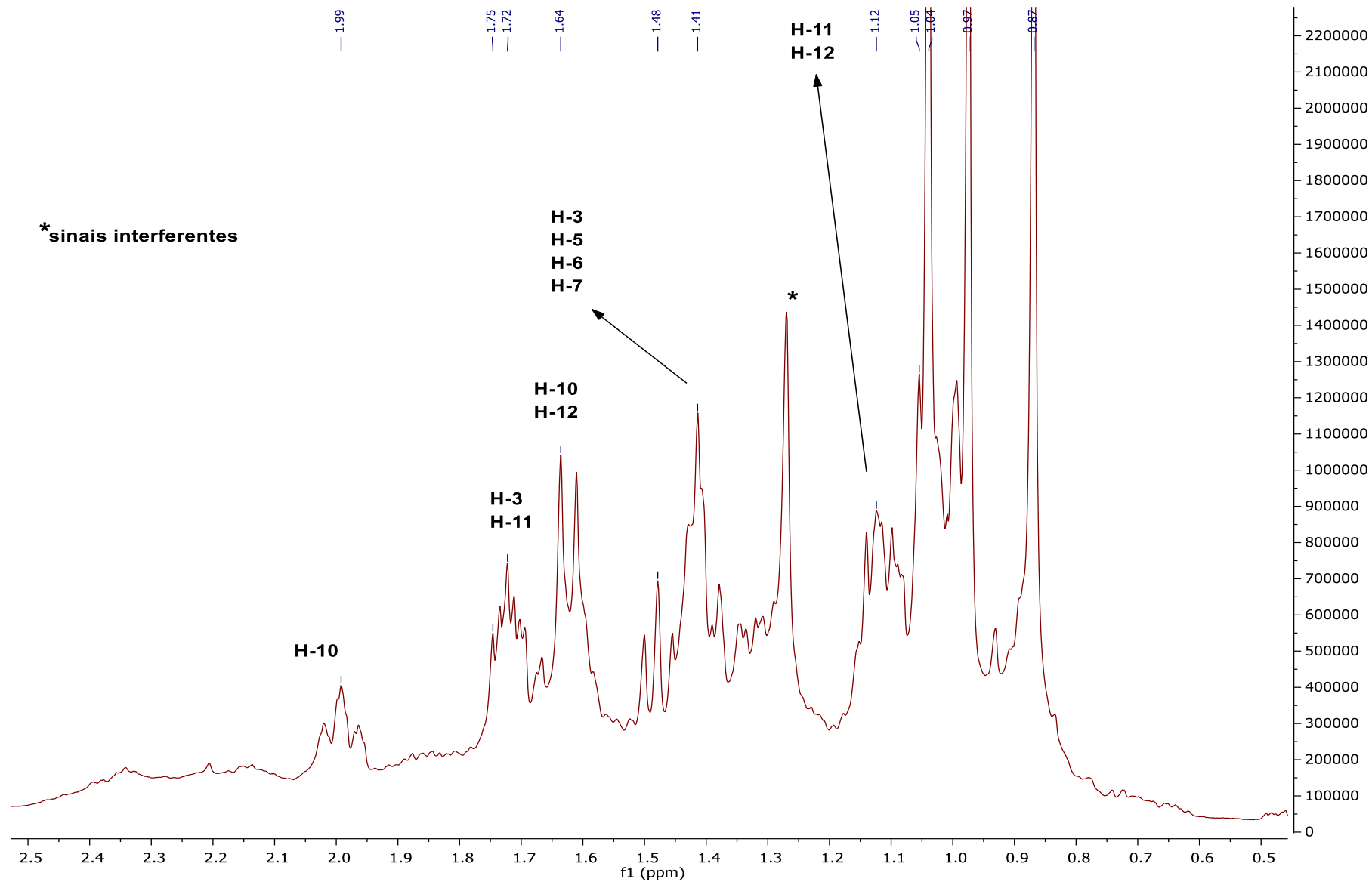


Figura 83. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃), entre 0,0-2,5 ppm, do 2-metóxi-clovan-9-ol (**103**).

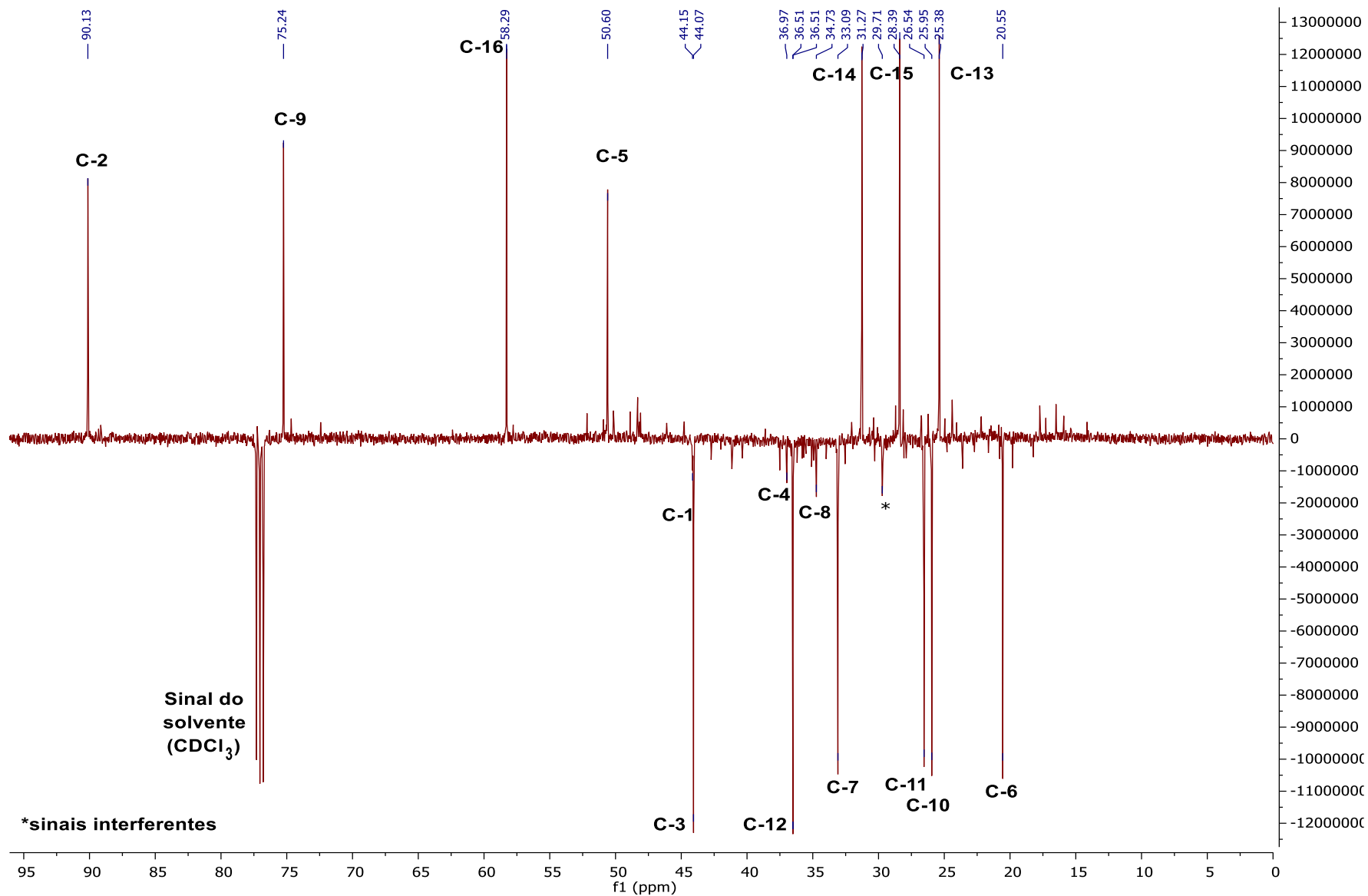


Figura 84. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do 2-metóxi-clovan-9-ol (**103**).

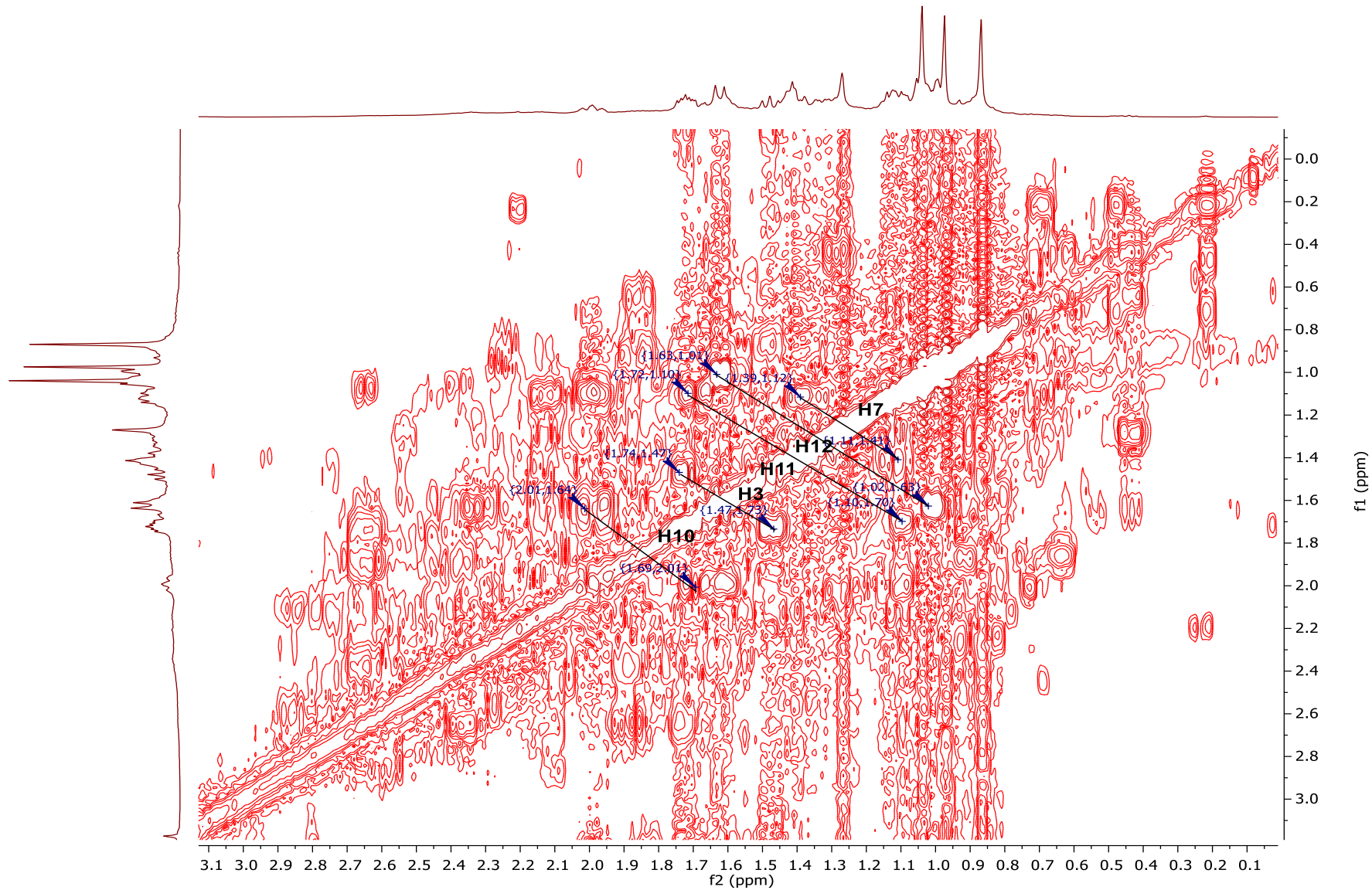


Figura 85. Expansão do mapa de contorno COSY (500/500 MHz, CDCl₃) do 2-metóxi-clovan-9-ol (**103**).

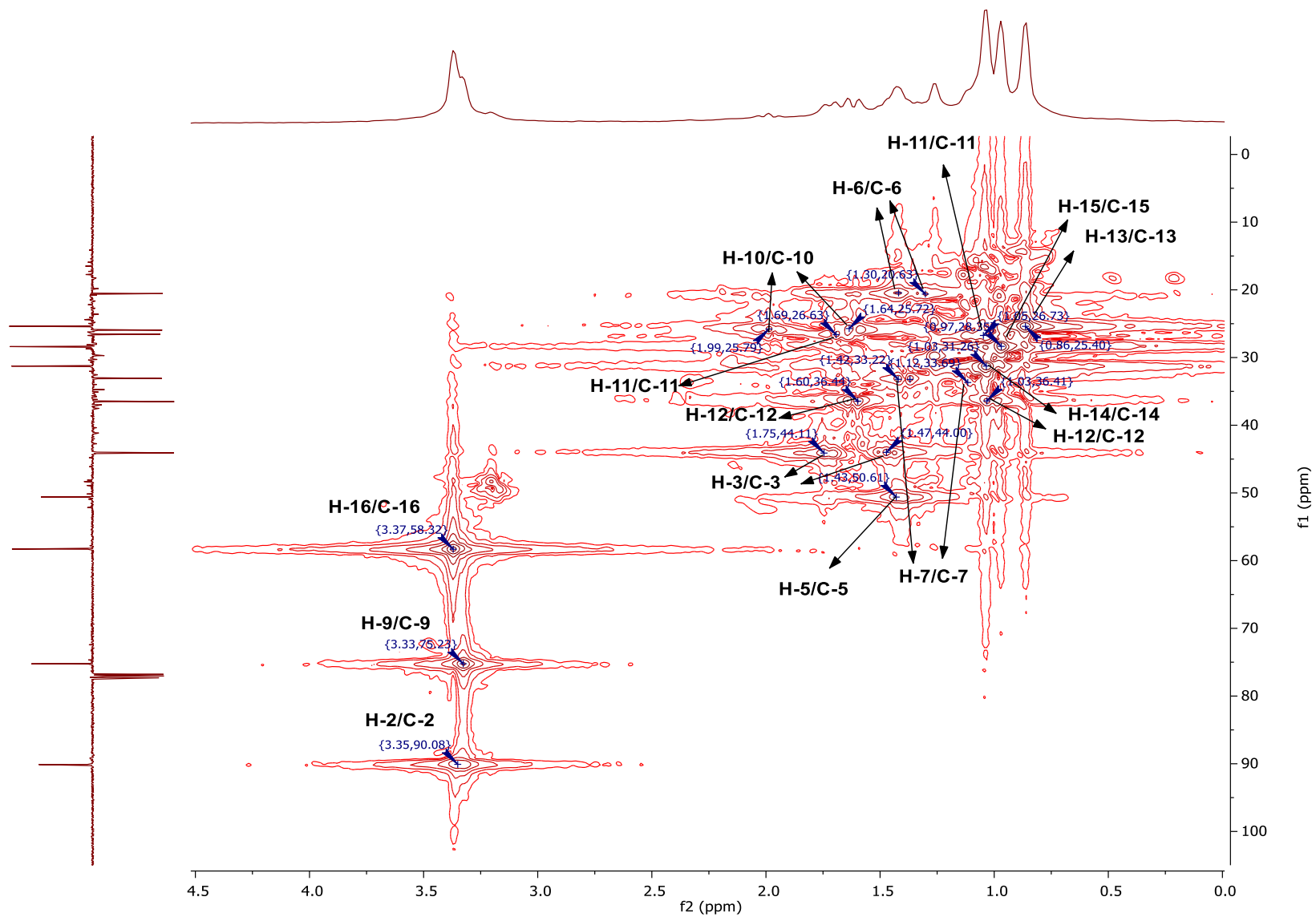


Figura 86. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/125 MHz, CDCl₃), entre 0,0-4,5 ppm, do 2-metóxi-clovan-9-ol (**103**).

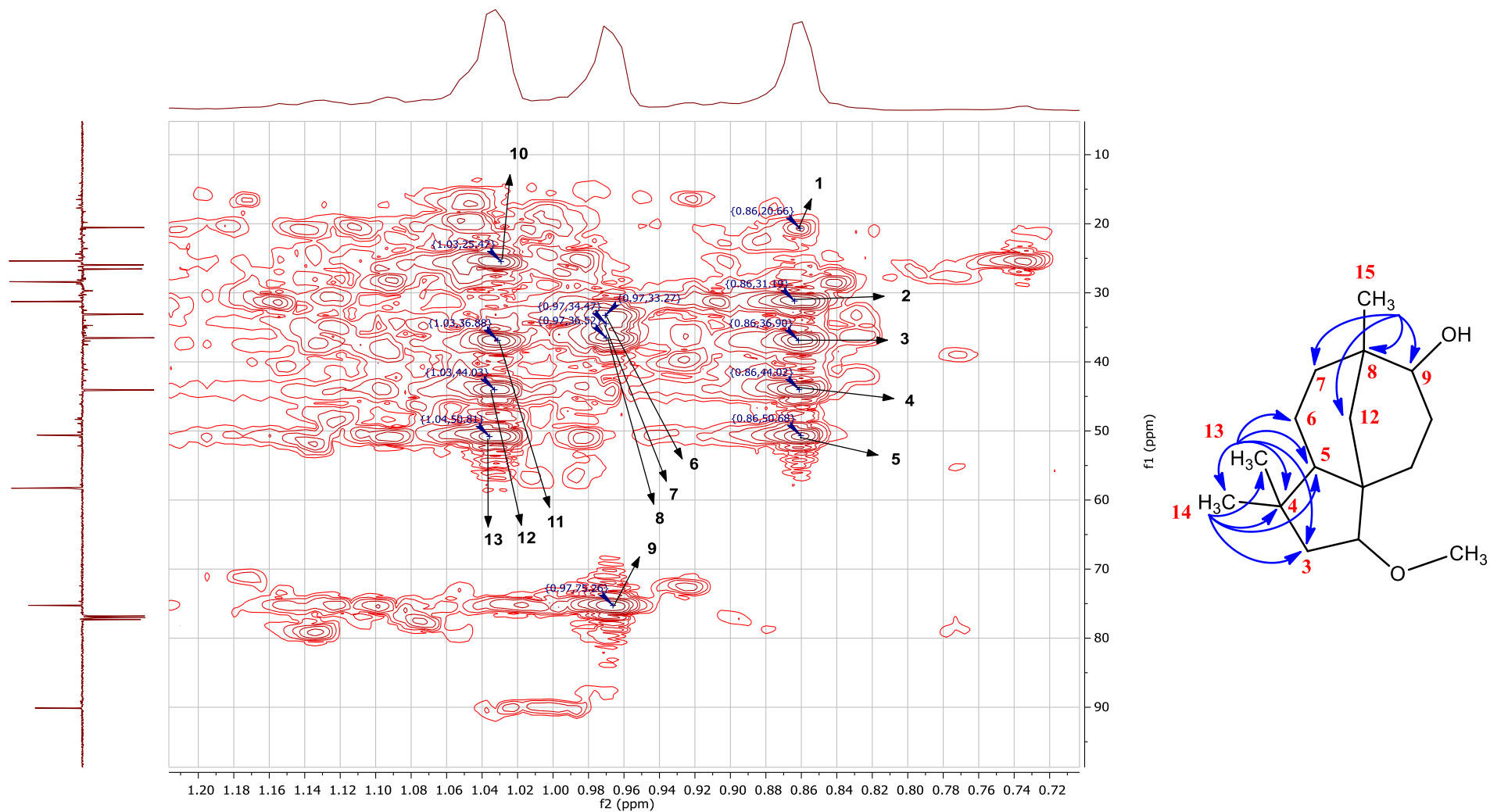


Figura 87. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, CDCl_3), entre 0,7-1,2 ppm, do 2-metóxi-clovan-9-ol (**103**).

Símbolos:

1: $^4J_{\text{H-13/C-6}}$; 2: $^3J_{\text{H-13/C-14}}$; 3: $^2J_{\text{H-13/C-4}}$; 4: $^3J_{\text{H-13/C-3}}$; 5: $^3J_{\text{H-13/C-5}}$; 6: $^3J_{\text{H-15/C-7}}$; 7: $^2J_{\text{H-15/C-8}}$; 8: $^3J_{\text{H-15/C-12}}$; 9: $^3J_{\text{H-15/C-9}}$; 10: $^3J_{\text{H-14/C-13}}$; 11: $^2J_{\text{H-14/C-4}}$; 12: $^3J_{\text{H-14/C-3}}$; 13: $^3J_{\text{H-14/C-5}}$.

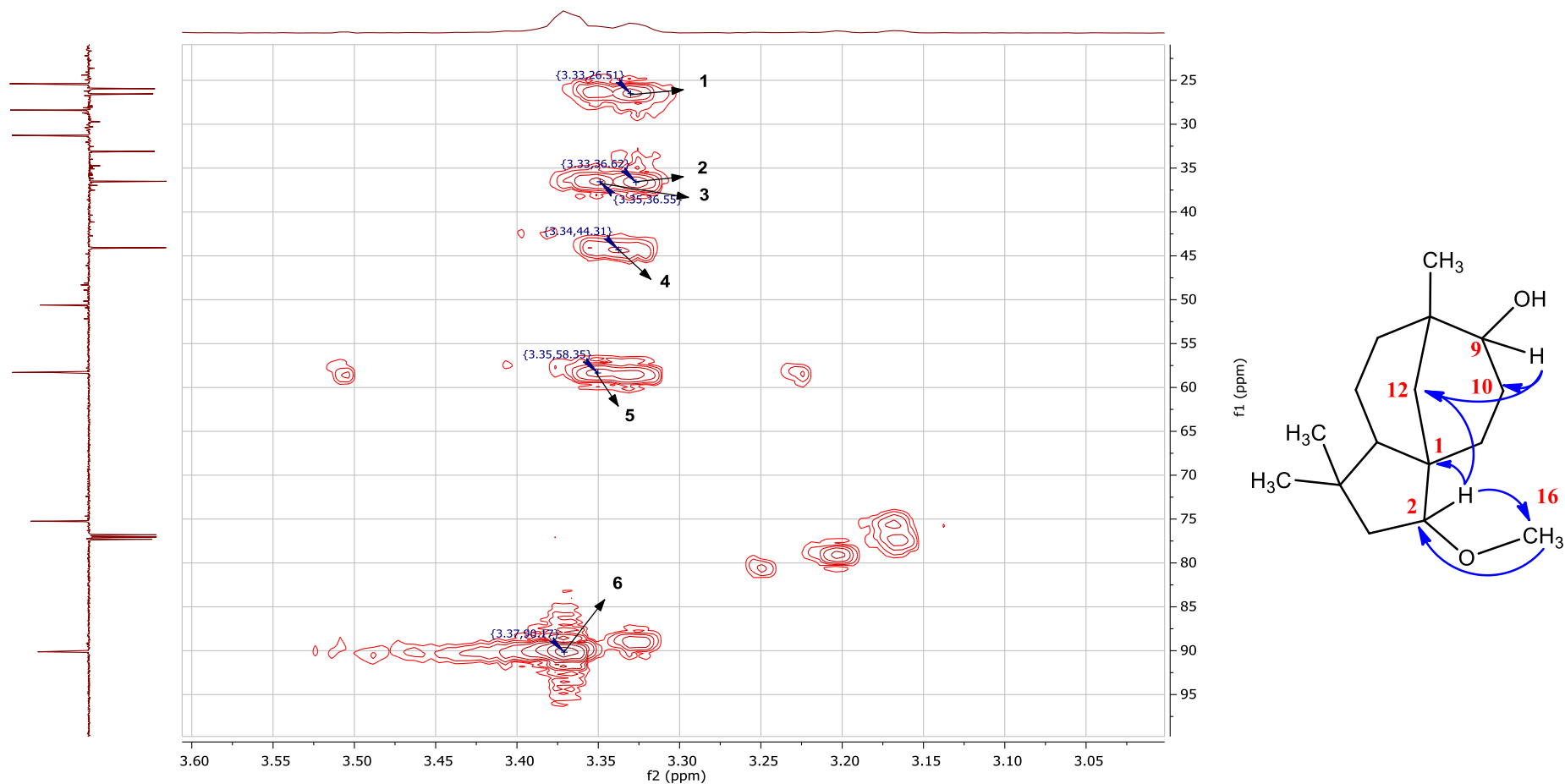


Figura 88. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, CDCl_3), entre 3,0-3,6 ppm, do 2-metóxi-clovan-9-ol (103).

Símbolos:

1: ${}^3J_{\text{H-9/C-11}}$; 2: ${}^3J_{\text{H-9/C-12}}$; 3: ${}^3J_{\text{H-2/C-12}}$; 4: ${}^2J_{\text{H-2/C-1}}$; 5: ${}^3J_{\text{H-2/C-16}}$; 6: ${}^3J_{\text{H-16/C-2}}$.

Tabela 18. Deslocamentos químicos, em ppm, para ^1H e ^{13}C obtidos experimentalmente para o 2-metóxi-clovan-9-ol e a comparação com os dados da literatura, incluindo o sesquiterpeno clovandioli.

N	2-metóxi-clovan-2-ol				Clovandioli			
	$\delta_{\text{H exp}}$	$\delta_{\text{C exp}}$	$\delta_{\text{H lit}}^1$	$\delta_{\text{C lit}}^1$	$\delta_{\text{H lit}}^2$	$\delta_{\text{C lit}}^2$	$\delta_{\text{H lit}}^3$	$\delta_{\text{C lit}}^3$
1	-	44,15	-	44,2	-	44,3	-	37,9
2	3,34 (m, 1H)	90,13	3,32 (dd, 1H, 2 α)	90,1	3,31 (m, 1H)	90,3	3,82 (dd, $J_1 = 10, J_2 = 5,8$, 1H)	80,8
3	1,75 e 1,47 (m, 2 H)	44,07	1,72 (dd, 1H, 3 α) 1,47 (dd, 1H, 3 β)	44,0	1,70 e 1,45 (m, 2H)	44,2	1,72 (dd, $J_1 = 5,7, J_2 = 12$, H _A) 1,52 (d, $J = 1,5$, H _B)	47,5
4	-	36,97	-	37,0	-	37,1	-	43,9
5	1,43 (m, 1H)	50,60	1,42 (m, 1H, 5 β)	50,6	1,40 (m, 1H)	50,7	1,45 (dd, $J_1 = 3,2, J_2 = 7,8$, 1H)	50,5
6	1,30-1,42 (m, 2H)	20,55	1,30-1,44 (2H)	20,5	1,40 (m, 2H)	20,7	1,30 (m, 2H)	26,6
7	1,42 e 1,10 (m, 2H)	33,09	1,40 (m, H, 7 α) 1,05-1,15 (H, 7 β)	33,1	2,33 (m, 2H)	33,2	1,55 (t, $J = 13$, H _A) 0,95 (sl, H _B)	35,5
8	-	34,73	-	34,7	-	34,9	-	34,7
9	3,33 (dd, $J = 1$ Hz, 1H)	75,24	3,33 (m, 1H, 9 β)	75,2	3,30 (m, 1H)	75,4	3,35 (sl, 1H)	75,1
10	1,99 e 1,64 (m, 2H)	25,95	1,98 (dddd, 1H, 10 β) 1,56-1,66 (1H, 10 α)	26,0	1,61 (m, 2H)	26,1	2,05 (m, 2H)	25,9
11	1,69 e 1,05 (m, 2H)	26,54	1,69 (brdd, 1H, 3 β) 1,05-1,15 (1H, 11 α)	26,5	1,98 e 1,66 (m, 2H)	26,7	1,10 (m, 2H)	20,6
12	1,60 e 1,03 (m, 2H)	36,51	1,56-1,66 (1H, 12') 0,99 (m, 1H, 12)	36,5	1,61 e 1,25 (m, 2H)	36,7	1,40 (m, 2H)	33,1
13	0,86 (s, 3H)	25,38	0,86 (s, 3H, 13 α)	25,4	0,85 (s, 3H)	25,5	0,87 (s, 3H)	25,4
14	1,03 (s, 3H)	31,27	1,03 (brs, 3H, 14 β)	31,2	1,02 (s, 3H)	31,4	1,05 (s, 3H)	31,4
15	0,97 (s, 3H)	28,39	0,97 (s, 3H)	28,4	0,96 (s, 3H)	28,5	0,97 (s, 3H)	28,3
16	3,37 (s, 3H)	58,29	3,36 (s, 3H)	58,2	3,35 (s, 3H)	58,4	-	-

¹COLLADO et al., 1996; ²AFOLAYAN et al., 2018; ³JUNIOR et al., 2014.

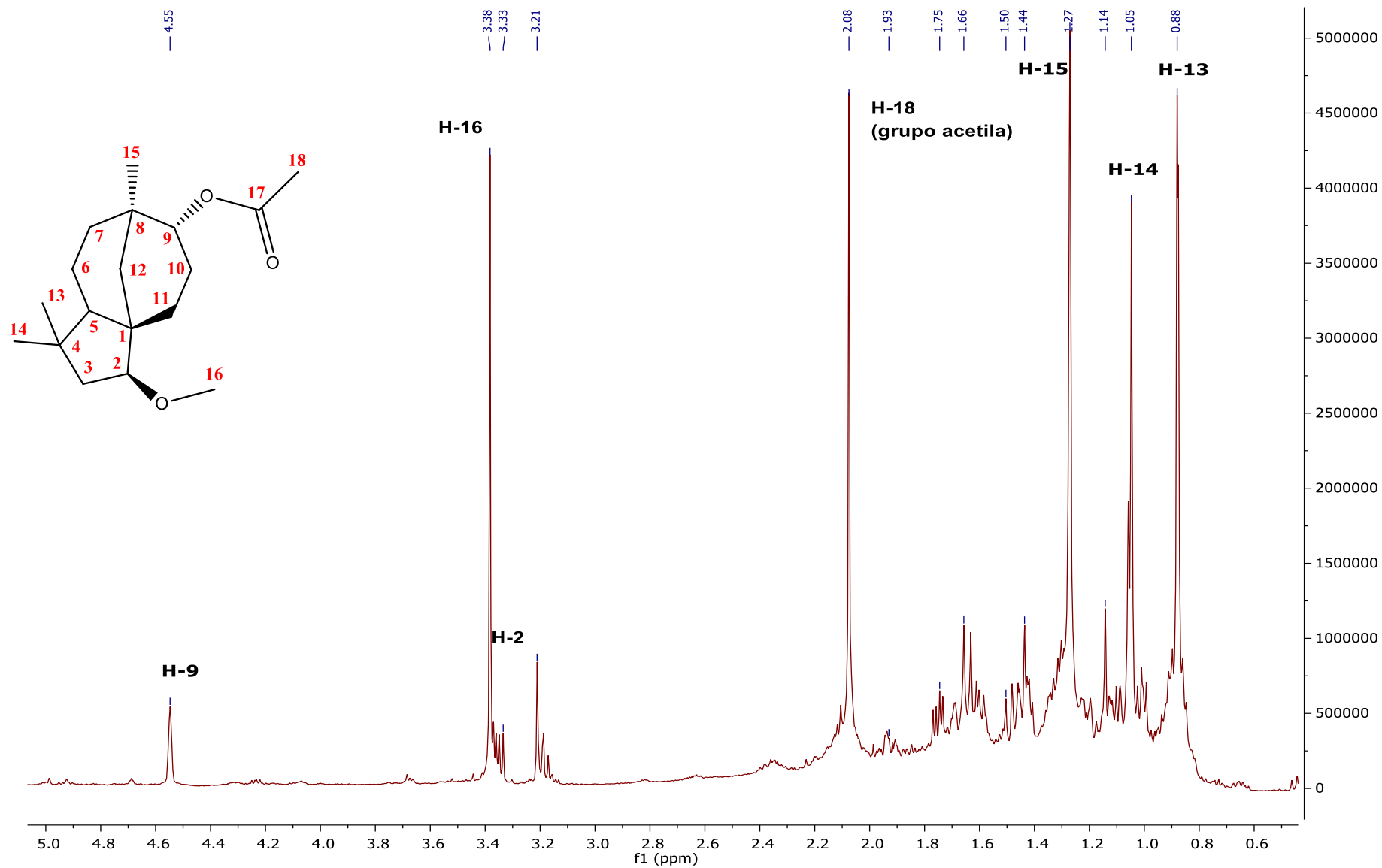


Figura 89. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do produto derivado 9-acetil-2-metóxi-clovano (**103a**).

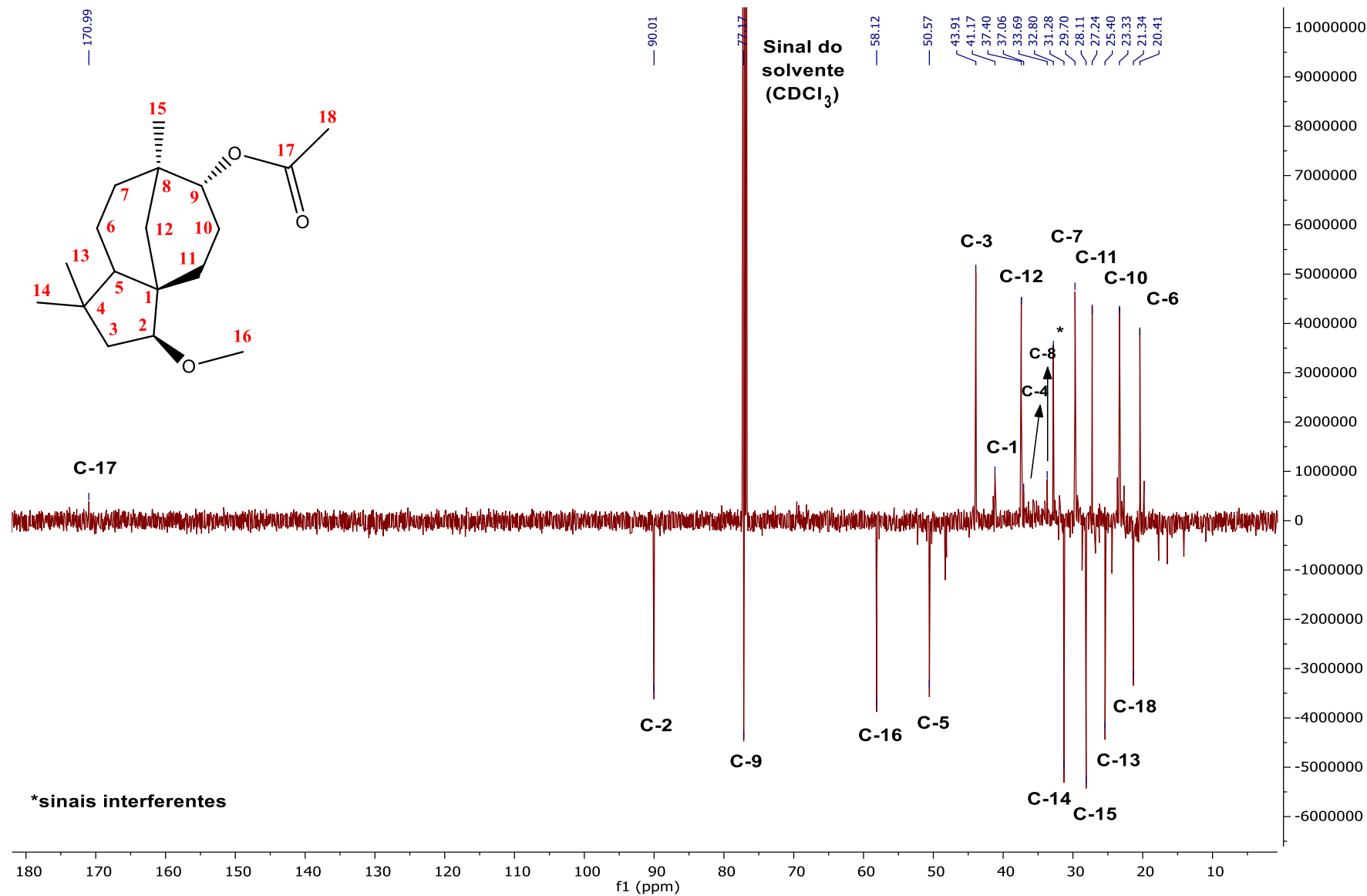


Figura 90. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do produto derivado 9-acetil-2-metóxi-clovano (103a).

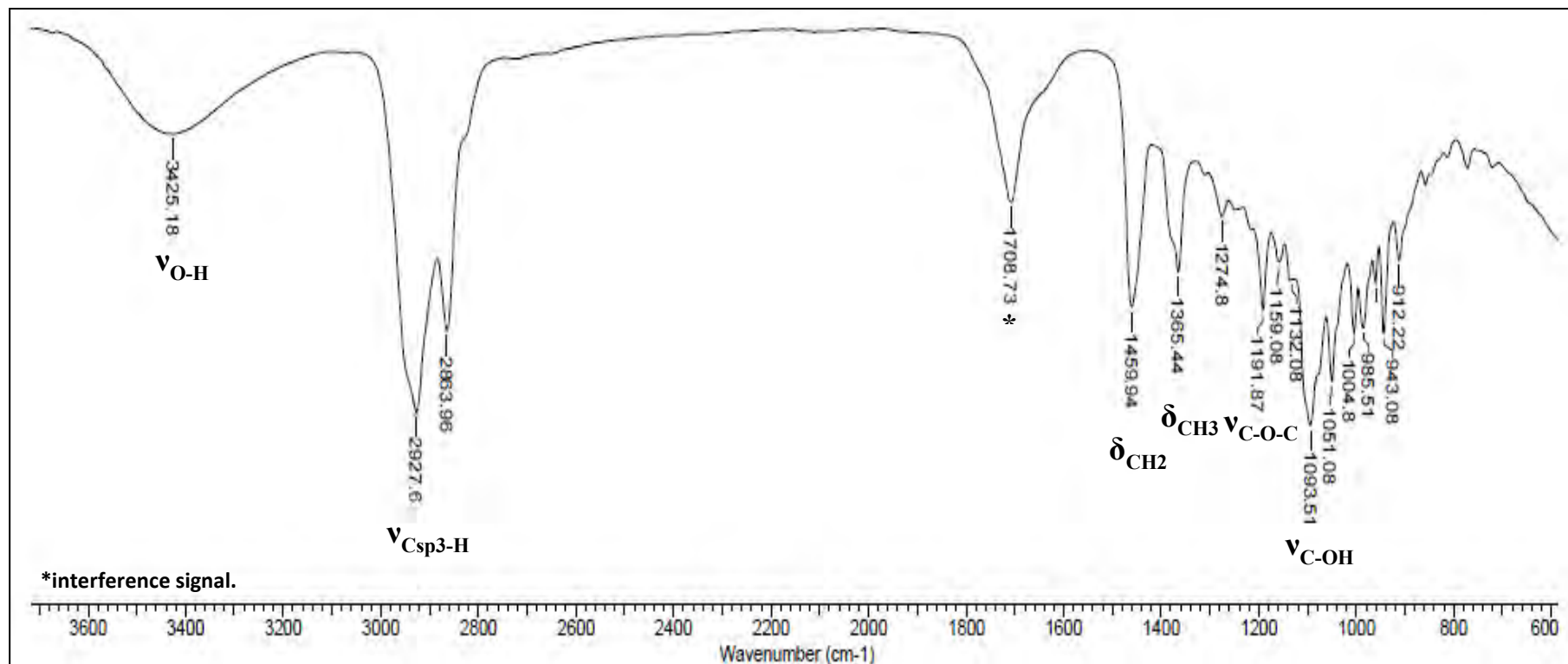


Figura 91. Espectro de infravermelho da fração rica em 2-metóxi-clovan-9-ol (103).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C confirmaram a presença de um grupo metoxila na estrutura química, através da diferença do deslocamento químico do C-2 em relação ao clovandiol (δ_{CH} 80,8 para 90,1 ppm) e a inclusão de dois sinais característicos desta função orgânica (δ_{CH_3} 58,3 ppm e δ_{H} 3,34, singleto, 3 H). Além disso, os grupos metílicos foram observados como três sinais do tipo singleto em 0,86 (H-13), 0,97 (H-15) e 1,03 ppm (H-14), com seus respectivos sinais nos espectros de RMN ^{13}C . Todas estas ligações químicas foram visualizadas na análise bidimensional de RMN. Os experimentos COSY e HSQC foram fundamentais para confirmar as identidades dos hidrogênios geminais, que são química e magneticamente diferentes entre si, dos seis grupos metilênicos (CH_2) presentes no anel tricíclico, incluindo os deslocamentos químicos dos núcleos de carbono (C-3, C-6, C-7, C-10, C-11 e C-12).

Outros experimentos foram realizados para enriquecimento da discussão da identificação da substância **103**. A preparação do produto acetilado **103a**, um derivado do tipo clovano ainda não relatado na literatura, serviu para confirmar a posição do sinal do H-9 (sl) com o deslocamento para δ_{H} em 4,55, permitindo perceber o sinal do H-2 como o dd em δ_{H} 3,34 (Figura 89). A análise complementar por espectroscopia na região de infravermelho indicou a presença da banda larga referente ao grupo hidroxila, em 3425 cm^{-1} , e a ausência de sinais característicos de grupos carbonílicos e de ligações insaturadas para a substância **103**, constituinte majoritário nas frações analisadas.

Para o isolamento do sesquiterpeno, foram ainda realizadas duas etapas independentes de purificação da fração EFEC-H 38-46 (72,5 e 9,2 mg). Além disso, com o objetivo de isolar uma maior quantidade da substância para futuros testes biológicos, foi realizada uma nova partição hexânica do extrato metanólico e o consequente fracionamento em coluna de sílica gel, resultando em uma terceira fração de 102,6 mg. As três frações obtidas separadamente corresponderam ao isolamento do 2-metóxi-clovan-9-ol, conforme a placa cromatográfica por CCD disposta na Figura 92, alcançando uma pureza cromatográfica por CG-EM de 83%, conforme Figura 93. O espectro de massas obtido para estas substâncias está disponível na Figura 94, com os mecanismos de fragmentação propostos para a obtenção dos principais íons produtos observados apresentado em seguida nas Figura 95 e Figura 96.

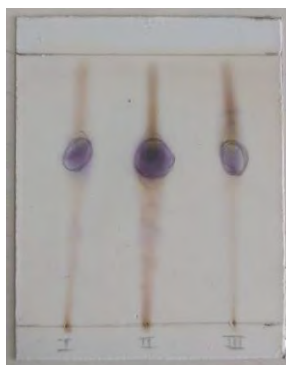


Figura 92. CCD em sílica gel das frações de 2-metóxi-clovan-9-ol, com eluição diclorometano:acetato de etila (1:1, v/v).

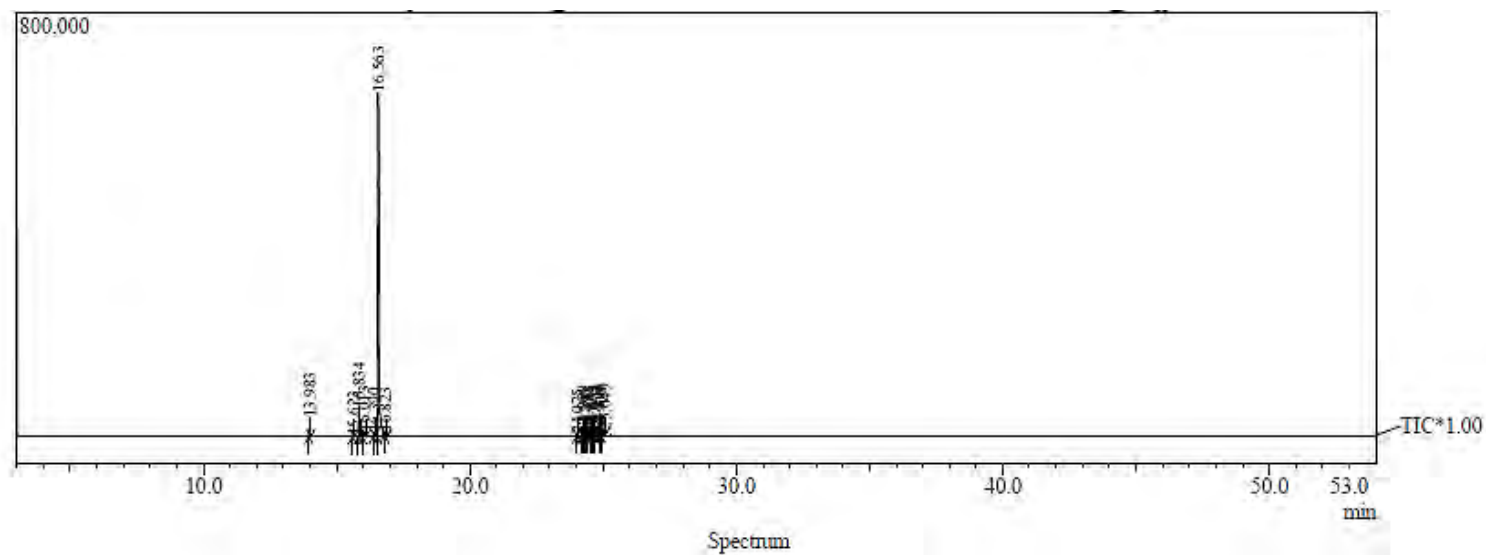


Figura 93. Cromatograma por CG-EM da fração rica em 2-metóxi-clovan-9-ol (**103**).

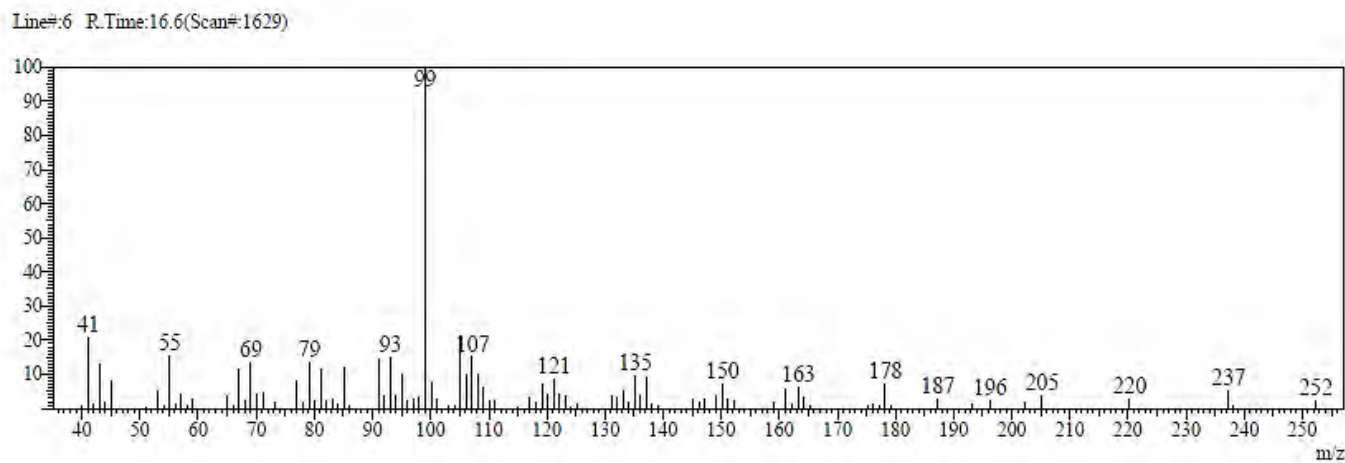


Figura 94. Espectro de massas por CG-EM do sesquiterpeno 2-metóxi-clovan-9-ol (**103**).

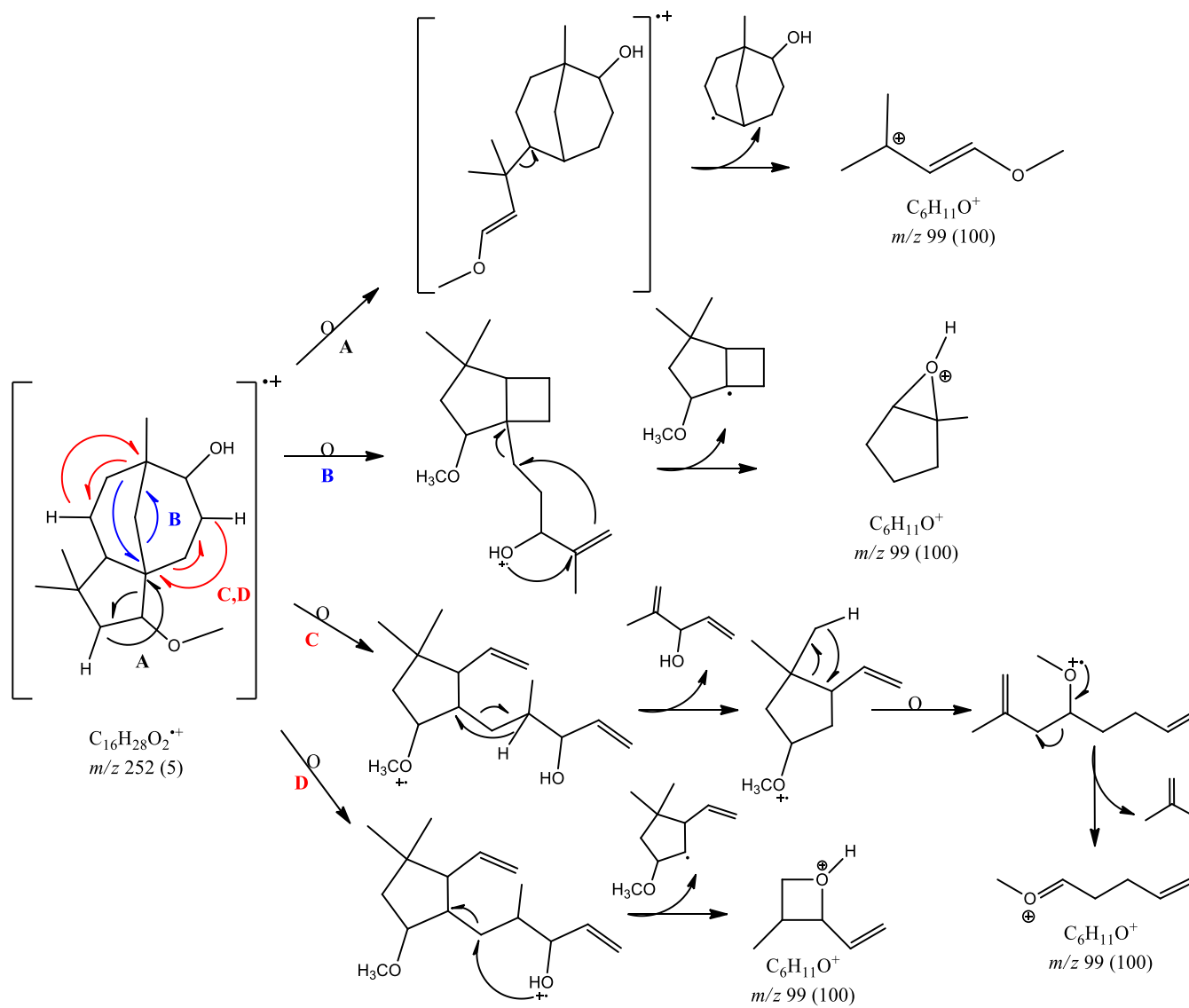


Figura 95. Proposta de mecanismo de fragmentação do 2-metóxi-clovan-9-ol (**103**) e formação do íon base m/z 99.

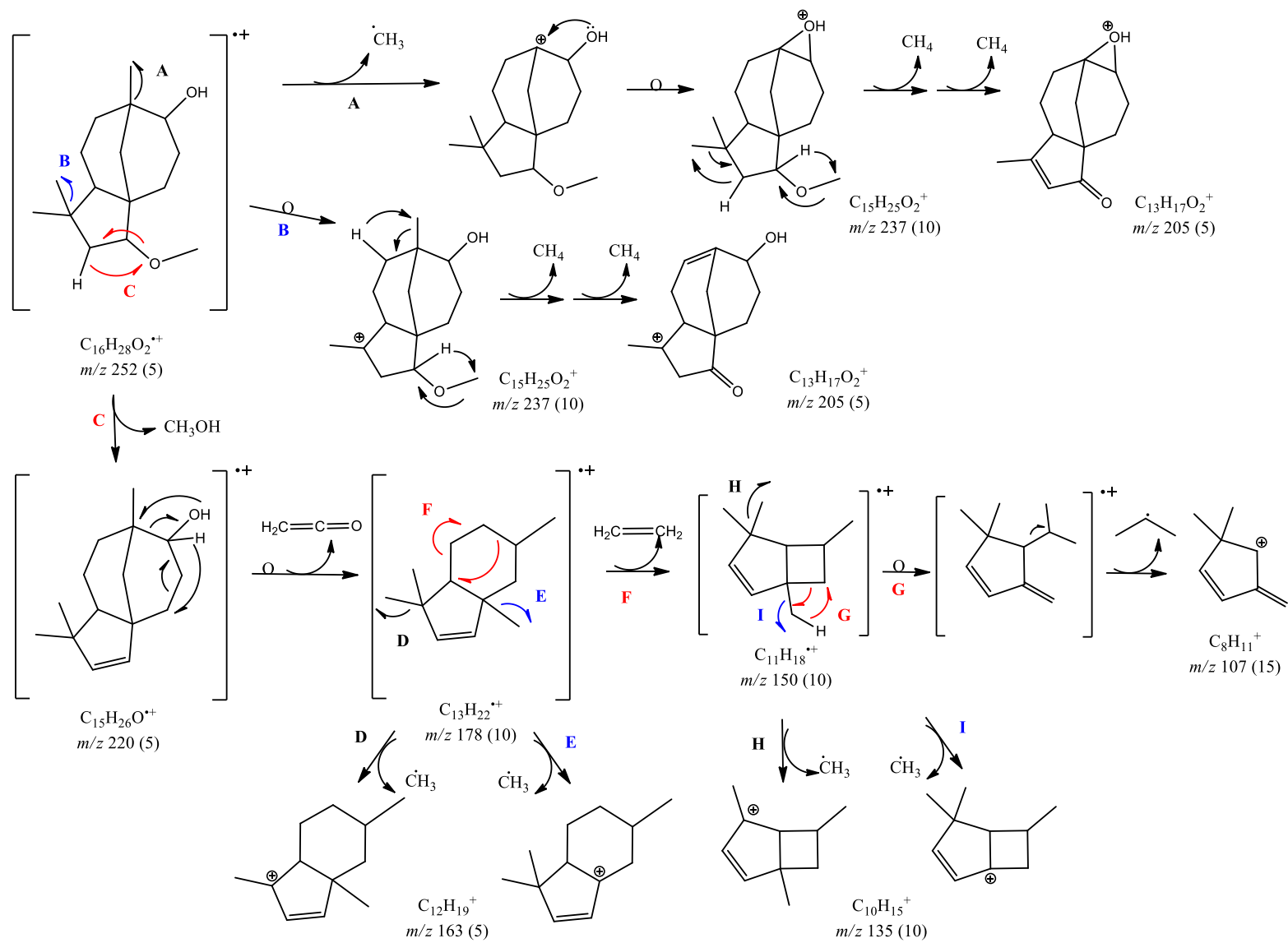


Figura 96. Proposta de mecanismo de fragmentação do 2-metóxi-clovan-9-ol (103) e formação dos demais íons produtos.

Quanto ao conhecimento fitoquímico sobre este metabólito, existem poucos estudos sobre o isolamento deste composto na literatura científica. Na década de 90, o 2-metoxi-clovan-9-ol foi relatado pela primeira vez na literatura através de síntese orgânica, por meio da ciclização e rearranjo do sesquiterpeno óxido de cariofileno (COLLADO et al., 1996). No entanto, apenas em 2018, foi isolado pela primeira vez naturalmente de *Piliostigma thonningii*, uma planta medicinal cultivada na Nigéria (AFOLAYAN et al., 2018). No presente trabalho, o sesquiterpeno 2-metóxi-clovan-9-ol é descrito pela primeira vez na família Myrtaceae e consequentemente na espécie *E. copacabanensis*. Apenas dois estudos relataram potencial biológico do 2-metóxi-clovan-9-ol, como a atividade antifúngica moderada contra *Botrytis cinerea* (COLLADO et al., 1998) e a atividade antiprotozoária e seletividade contra *Trypanosoma brucei* (AFOLAYAN et al., 2018).

3.3.2. Identificação de outras substâncias lipofílicas a partir da fração EFEC-H'

Na nova partição hexânica executada (EFEC-H'), duas frações demonstraram composição química destacada com substâncias já conhecidas na literatura e identificadas nas folhas de *E. copacabanensis* através do presente estudo de desreplicação por CG-EM (MARTINS et al., 2021). A fração EFEC-H' 1-10 (327,6 mg) apresentou uma substância majoritária em t_R 17,6 min no cromatograma por CG-EM, com porcentagem relativa de 44,7% e íon molecular de m/z 270 ($[M]^+$, 4). A comparação do espectro de massas com os dados prévios e os bancos de dados confirmou a substância como o éster de ácido graxo hexadecanoato de metila ou palmitato de metila (10, Figura 97), derivado de um ácido graxo com ocorrência abundante na natureza.

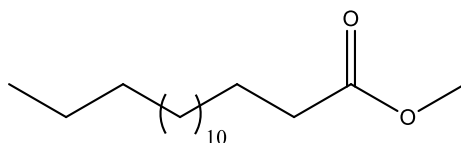


Figura 97. Estrutura química do éster metílico do ácido hexadecanoico ou palmítico (16:0) – hexadecanoato ou palmitato de metila (10).

O espectro de massas (Figura 98) apresentou, além do íon molecular m/z 270, como íon base o fragmento de m/z 74 ($[C_3H_6O_2]^+$, 100), oriundo de um mecanismo por rearranjo de McLafferty com o H na posição γ à carbonila. Além disso, foi observado o padrão de fragmentação pela perda sucessiva de 14 Da, característico na ionização por elétrons para substâncias que apresentam longas cadeias alquílicas, como os ácidos graxos e seus derivados. Este mecanismo por clivagem heterolítica simples explicam também a formação do íon de m/z 87 ($[C_4H_7O_2]^+$, 65). A Figura 99 demonstra estes mecanismos para formação dos íons produtos, amplamente conhecidos na literatura científica.

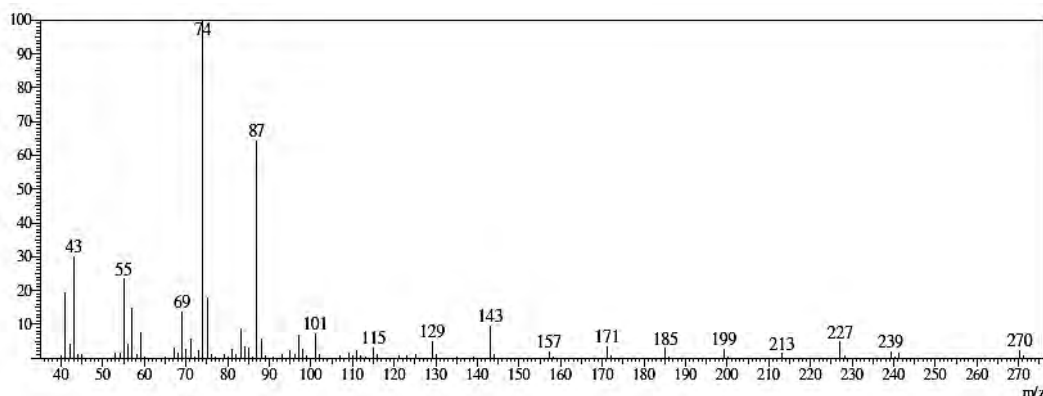


Figura 98. Espectro de massas por CG-EM do palmitato de metila (10).

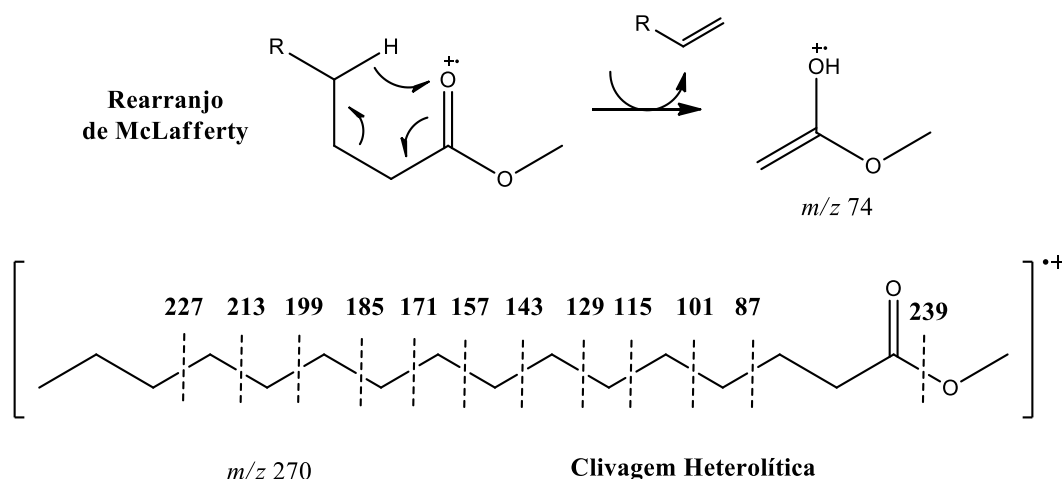


Figura 99. Mecanismos de fragmentação para o palmitato de metila (**10**).

A análise unidimensional de RMN ^1H e ^{13}C confirmou a presença majoritária desta substância, conforme Tabela 19 e Figura 100 e Figura 101. Foram observados destacadamente os sinais de carbonila do grupo éster, dos grupos metílico e metoxílico e dos grupos metilênicos. Todos os deslocamentos químicos experimentais estão de acordo com o descrito na literatura científica.

Tabela 19. Deslocamentos químicos, em ppm, para ^1H e ^{13}C obtidos para o palmitato de metila e comparação com os dados da literatura (CHEMICALBOOK, [s.d.], [s.d.]).

n	$\delta_{\text{H exp}}$	$\delta_{\text{C exp}}$	$\delta_{\text{H lit}}$	$\delta_{\text{C lit}}$
1	-	174,43	-	174,29
2	2,32 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H)	34,12	2,29	34,16
3	1,62 (m, 2H)	24,96	1,62	25,03
4-13		29,68		29,24
14	1,27 (sl, 24H)	31,91	1,26	32,00
15		22,67		22,76
16	0,90 (m, 3H)	14,09	0,88	14,14
17	3,68 (s, 3H)	51,40	3,62	51,39

A segunda fração, **EFEC-H' 15-21**, foi purificada em coluna de sílica gel, resultando no isolamento da mistura de terpenos espatulenol (**30**, $[\text{M}]^+$ m/z 220), α - e β -amirina (**44** e **45**, $[\text{M}]^+$ m/z 426), com 152,0 mg. Estas também foram identificadas através da comparação dos espectros de massas (Figura 102) com as bibliotecas disponíveis. Embora apresentem isomeria com outros triterpenos e sejam isômeros de posição entre si, os triterpenos α - e β -amirina podem ser identificados pela ocorrência do íon m/z 218 ($[\text{C}_{16}\text{H}_{26}]^+$, 80), geralmente íon base do espectro de massas e formado a partir de mecanismo de retro Diels-Alder iniciado através da ligação dupla $\Delta^{12,13}$ na estrutura pentacíclica (anel do tipo oleanano para β -amirina e anel taraxasterano para α -amirina). Para a β -amirina, foi ainda observado o íon m/z 203 ($[\text{C}_{15}\text{H}_{23}]^+$, 70), que pode ser explicado pela diferença de anel, resultando em dois grupos metílicos no C-20 e favorecendo um mecanismo por clivagem heterolítica simples e formação de carbocátion mais estável. Todos os mecanismos propostos estão disponíveis na Figura 103.

Assim como o palmitato de metila, estes terpenos já tinham sido identificados no estudo de desreplicação por CG-EM (MARTINS et al., 2021). Além disso, os isômeros triterpênicos α - e β -amirina também já tinham sido isolados em extrato hexânico de folhas de *E. copacabanensis*, sendo portanto característico para esta espécie botânica (JUNIOR et al., 2014).

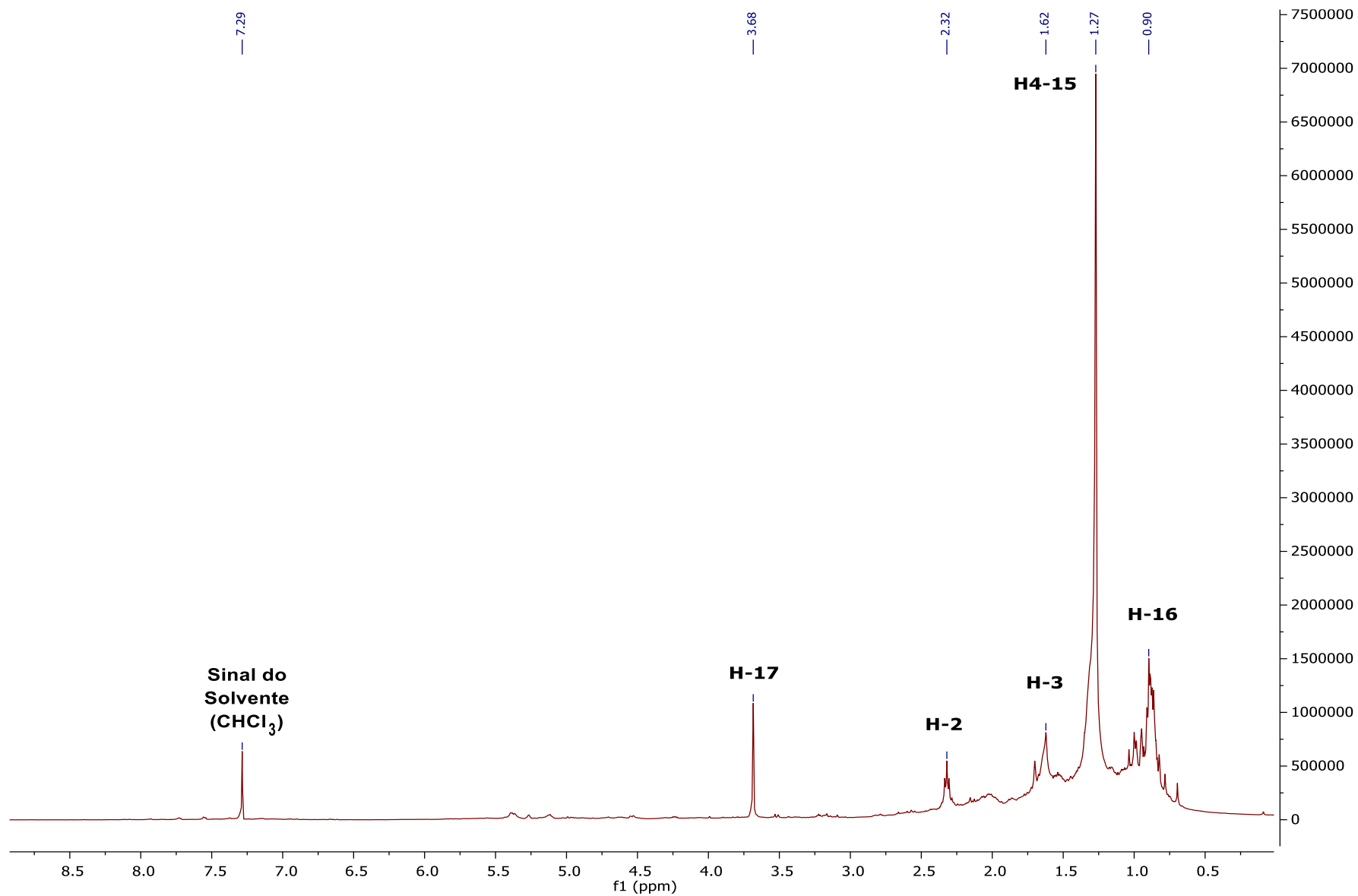


Figura 100. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração EFEC-H' 1-10, com composição majoritária do palmitato de metila (**10**).

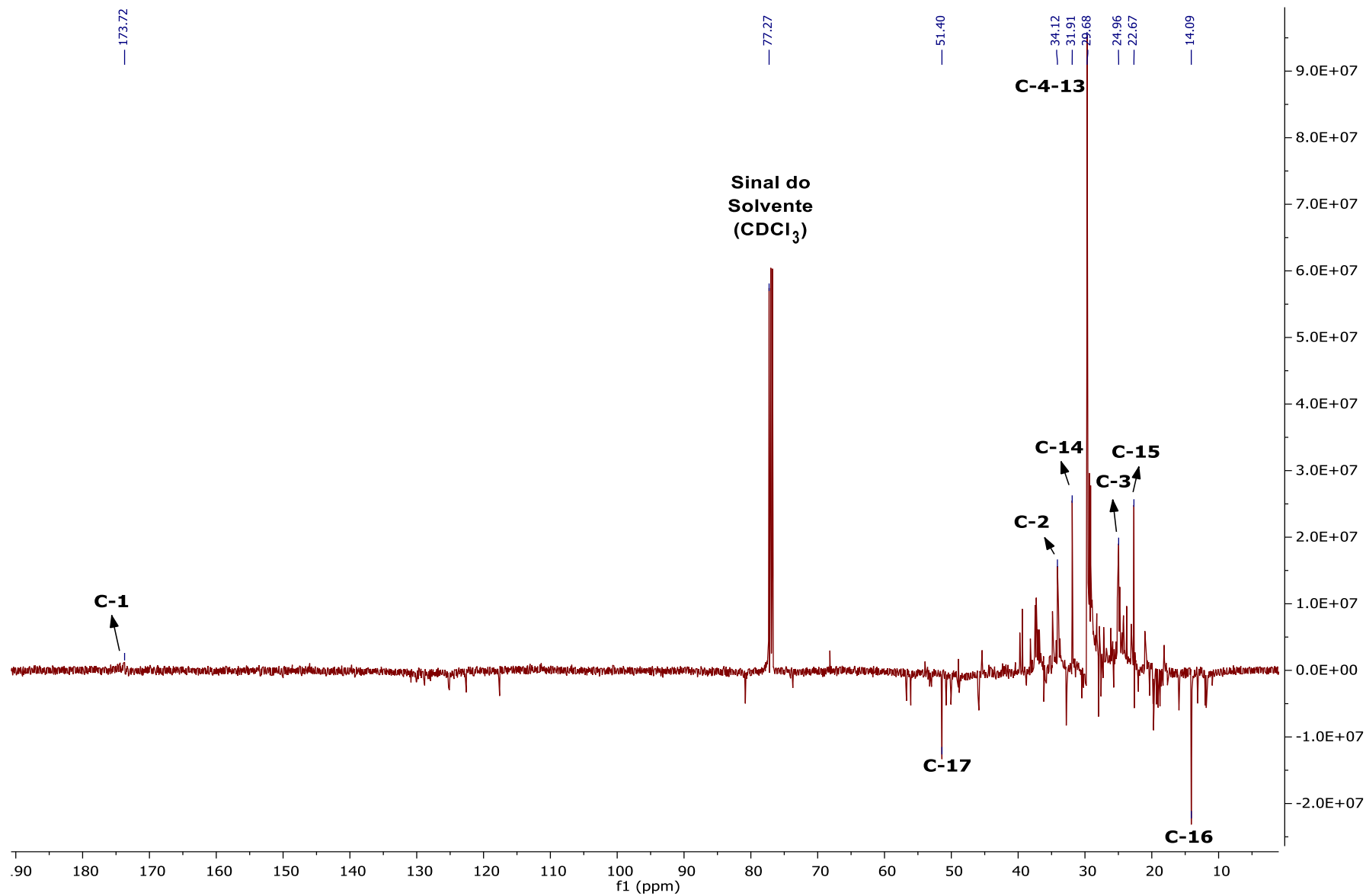
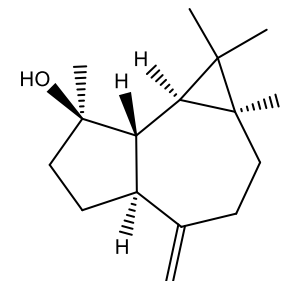
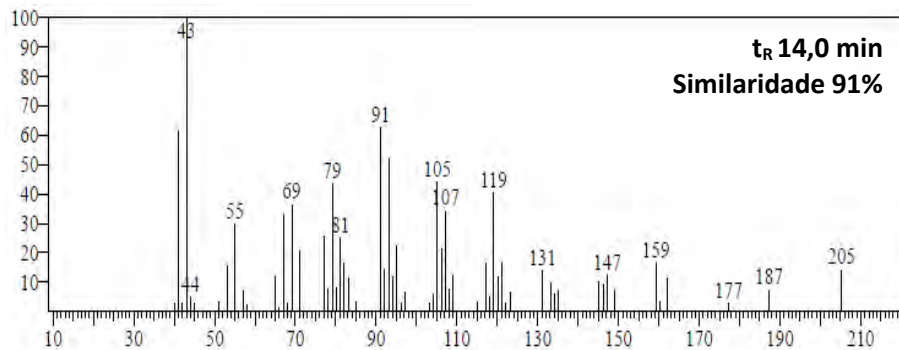
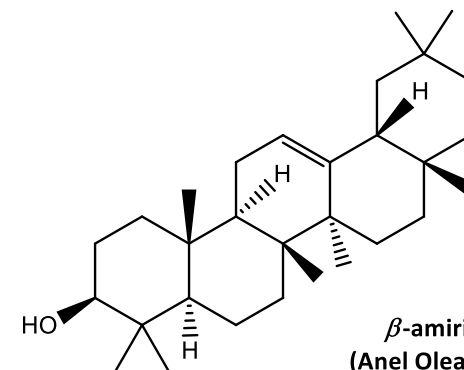
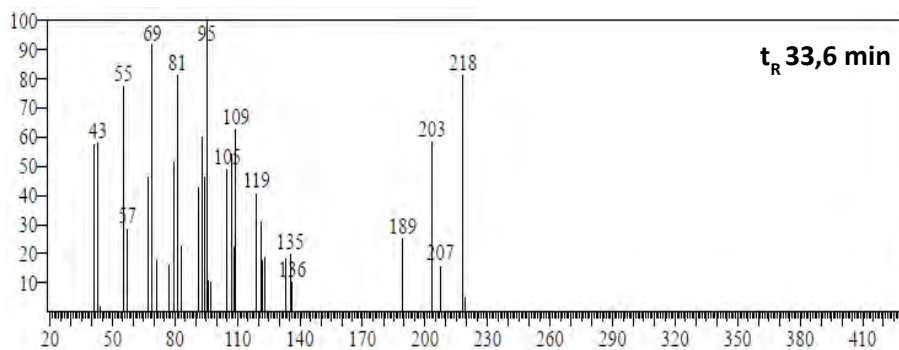


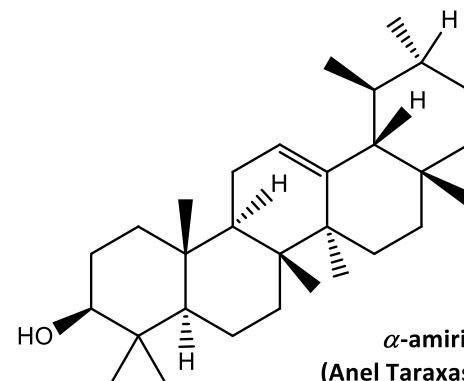
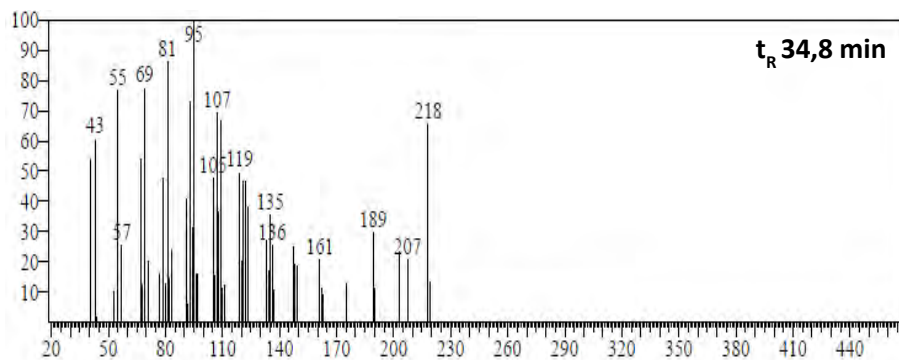
Figura 101. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) da fração EFEC-H' 1-10, com composição majoritária do palmitato de metila (10).



Espatulenol



β-amirina
(Anel Oleanano)



α-amirina
(Anel Taraxasterano)

Figura 102. Espectros de massas obtido por CG-EM dos terpenos espatulenol (30), α- e β-amirina (44 e 45).

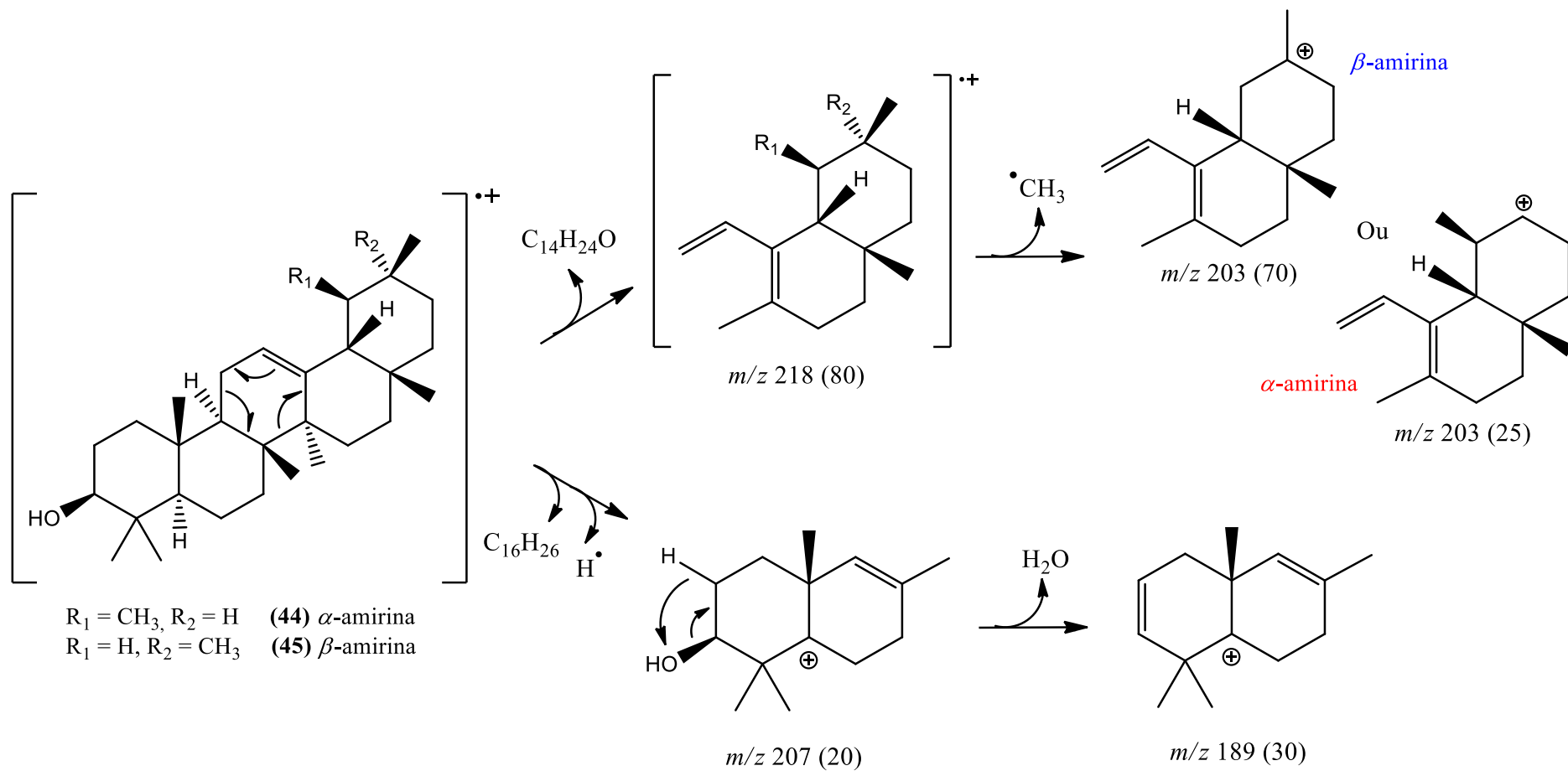


Figura 103. Proposta de mecanismo de fragmentação para os isômeros α - e β -amirina (44 e 45) e a formação dos principais íons produtos.

3.3.3. Elucidação estrutural da substância 104 (EFMT-D, folhas de *M. tenella*)

Para o estudo fitoquímico das folhas de *M. tenella*, procedeu-se o fracionamento em coluna de sílica gel da partição em diclorometano (EFMT-D), similar aos processos empregados para as partições EFMT-H e EFMT-Ac. As análises por CCD e por CG-EM das frações EFMT-D 18-19 e 20-24 demonstraram a presença de uma substância majoritária com íon molecular m/z 238 ($[M]^+$, 5) e t_R de 26,1 min. O espectro de massas obtido por CG-EM ainda revelou a presença do íon base com m/z 195 ($[C_{10}H_{11}O_4]^+$, 100), em que a comparação com as bases de dados sugeriu um derivado de acetofenona trissubstituído com grupos metoxílicos. Anteriormente no Capítulo I, foi possível sugerir a presença do 2',4',6'-trimetóxfenil-butano, com similar padrão de substituição no anel aromático, no óleo essencial das folhas de *M. tenella*.

A elucidação estrutural da substância **104** foi possível através da purificação destas frações reunidas em coluna de Sephadex. A fração obtida foi analisada novamente por CG-EM e por experimentos uni- e bidimensionais de RMN 1H e ^{13}C . A estrutura foi confirmada como a 2-metil-1-(2',4',6'-trimetóxfenil)-propan-1-ona ou conglomerona (Figura 104). A Tabela 20 contém todas as atribuições para os diferentes núcleos de H e C da substância **104**, assinalados de acordo com os espectros de RMN (Figura 105 a Figura 111).

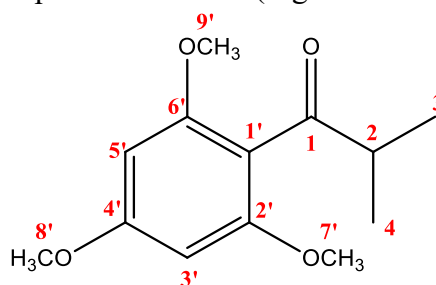


Figura 104. Estrutura química da conglomerona (**104**).

Tabela 20. Deslocamentos químicos, em ppm, para 1H e ^{13}C obtidos experimentalmente para a conglomerona e comparação com os dados da literatura (D'AMICO et al., 2011).

n	δ_H exp	δ_C exp	δ_H lit	δ_C lit
1	-	208,68	-	208,0
2	3,02 (sept, 1H)	42,10	3,03 (m, 1H)	41,7
3,4	1,13 (d, 6H)	17,84	1,13 (d, $J = 8$ Hz, 6H)	18,0
1'	-	110,17	-	113,0
2', 6'	-	158,02	-	158,0
3', 5'	6,12 (s, 2H)	90,58	6,12 (s, 2H)	90,0
4'	-	161,99	-	161,0
7', 9'	3,78 (s, 6H)	55,76	3,78 (s, 6H)	55,8
8'	3,83 (s, 3H)	55,4	3,84 (s, 3H)	55,4

Para confirmação do sistema aromático, os sinais em singlete para 2H em 6,12 ppm confirmaram um anel tetrassubstituído simétrico, com os sinais em singlete para 6H e 3H em 3,78 e 3,83 ppm referente aos hidrogênios dos grupos metoxílicos ligados ao anel aromático. Os deslocamentos químicos e a multiplicidade dos sinais em 3,02 e 1,13 ppm indicaram a presença de uma unidade isopropila. Através dos espectros bidimensionais, foi possível confirmar que a carbonila (δ_C 208,68 ppm), com deslocamento correspondente ao grupo cetona, está ligado realmente as unidades isopropila e trimetóxfenil, confirmando a estrutura proposta. A comparação com a literatura corrobora para a elucidação estrutural da conglomerona (**104**), obtida na partição EFMT-D.

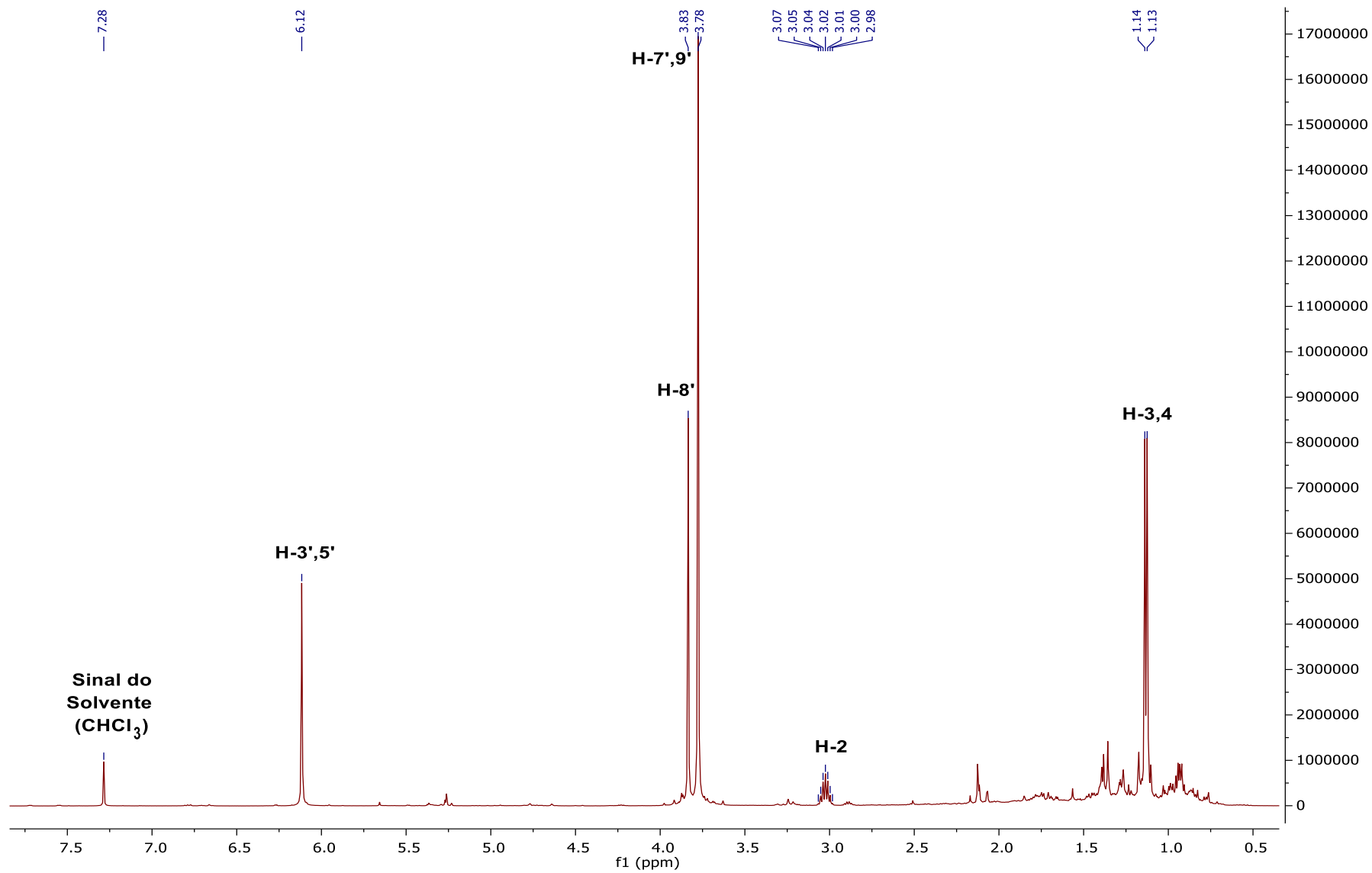


Figura 105. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da fração rica em conglomerona (**104**).

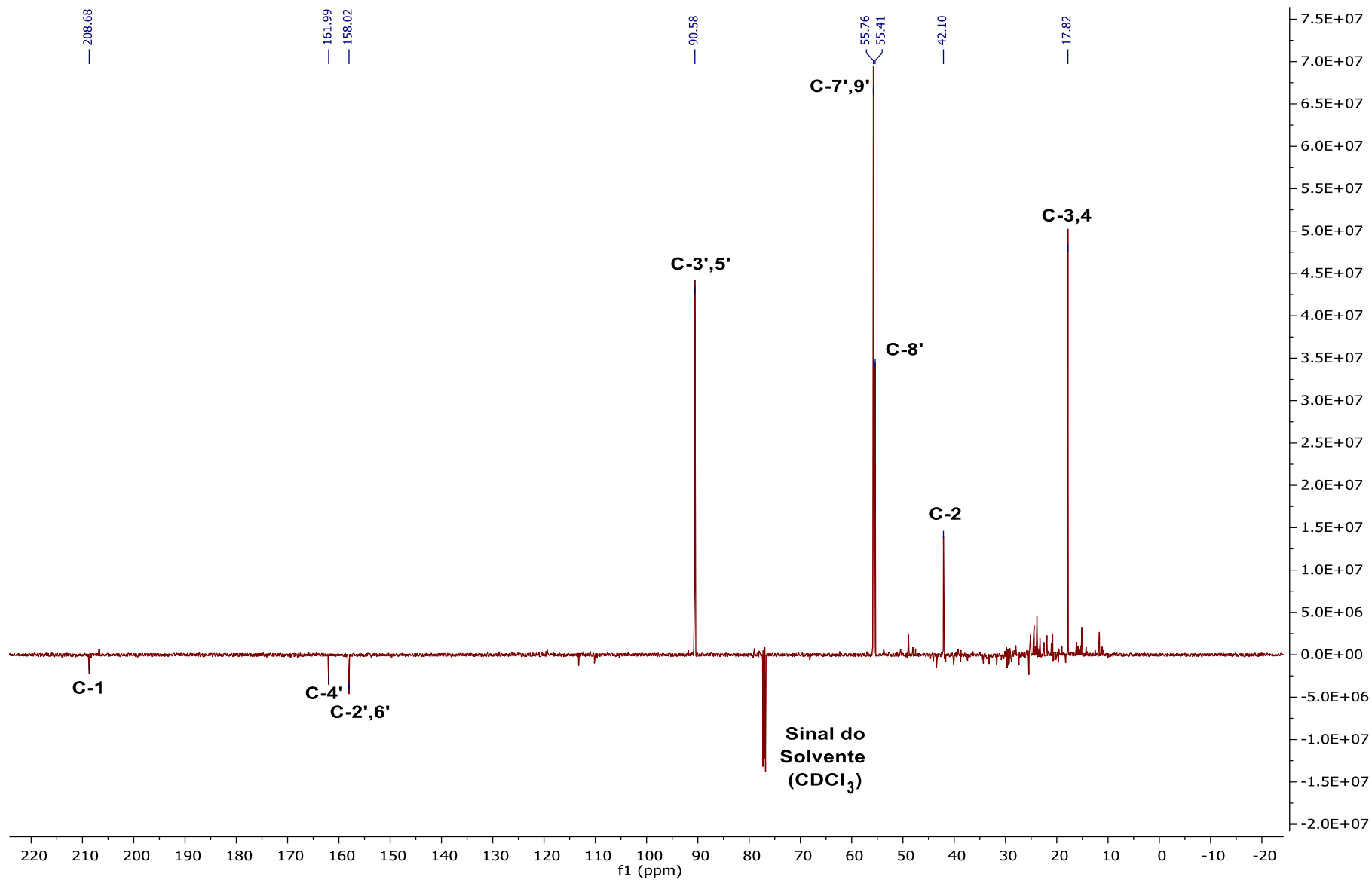


Figura 106. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da fração rica em conglomerona (104).

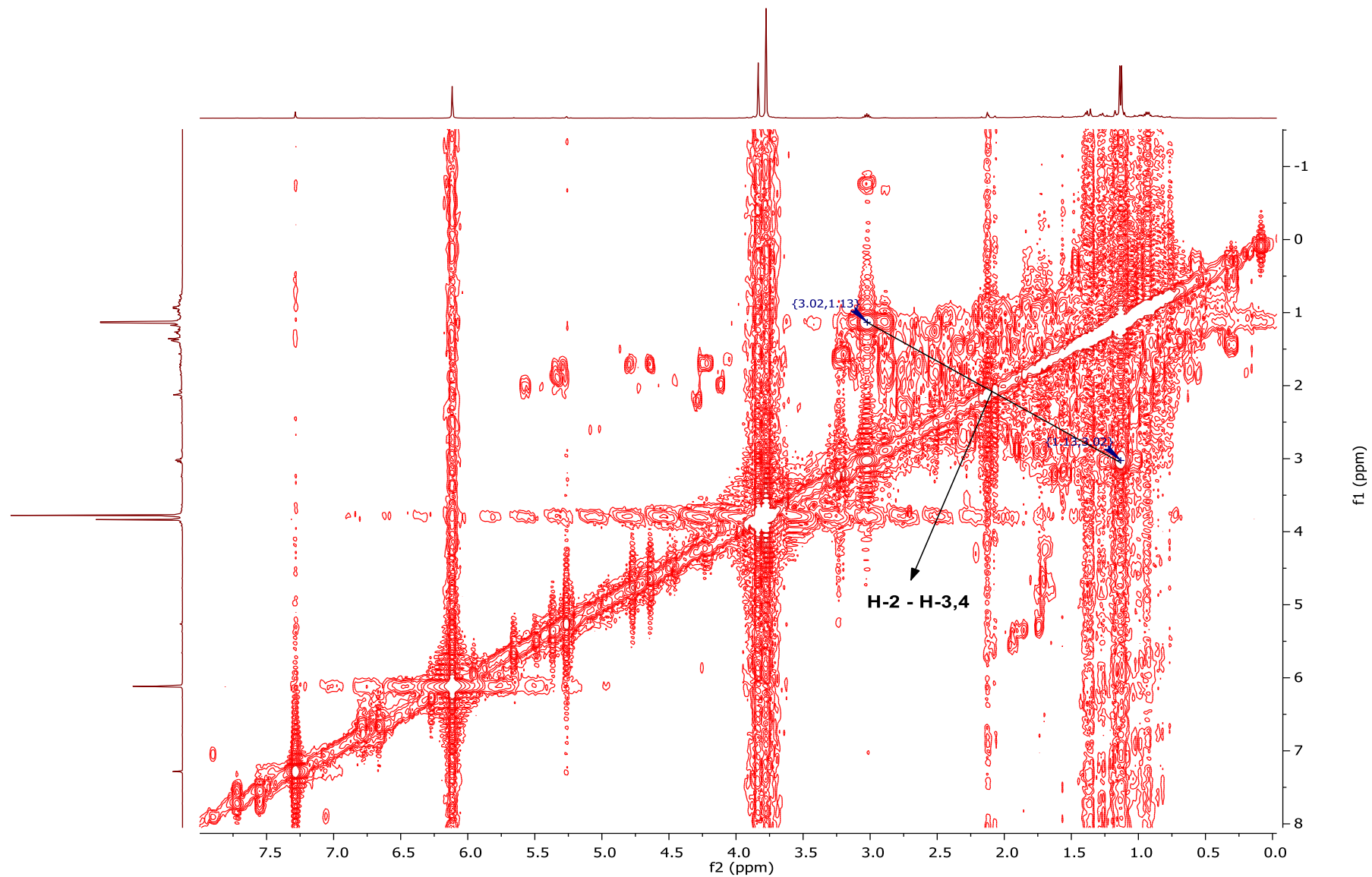


Figura 107. Expansão do mapa de contorno COSY (500/500 MHz, CDCl₃) da fração rica em conglomerona (**104**).

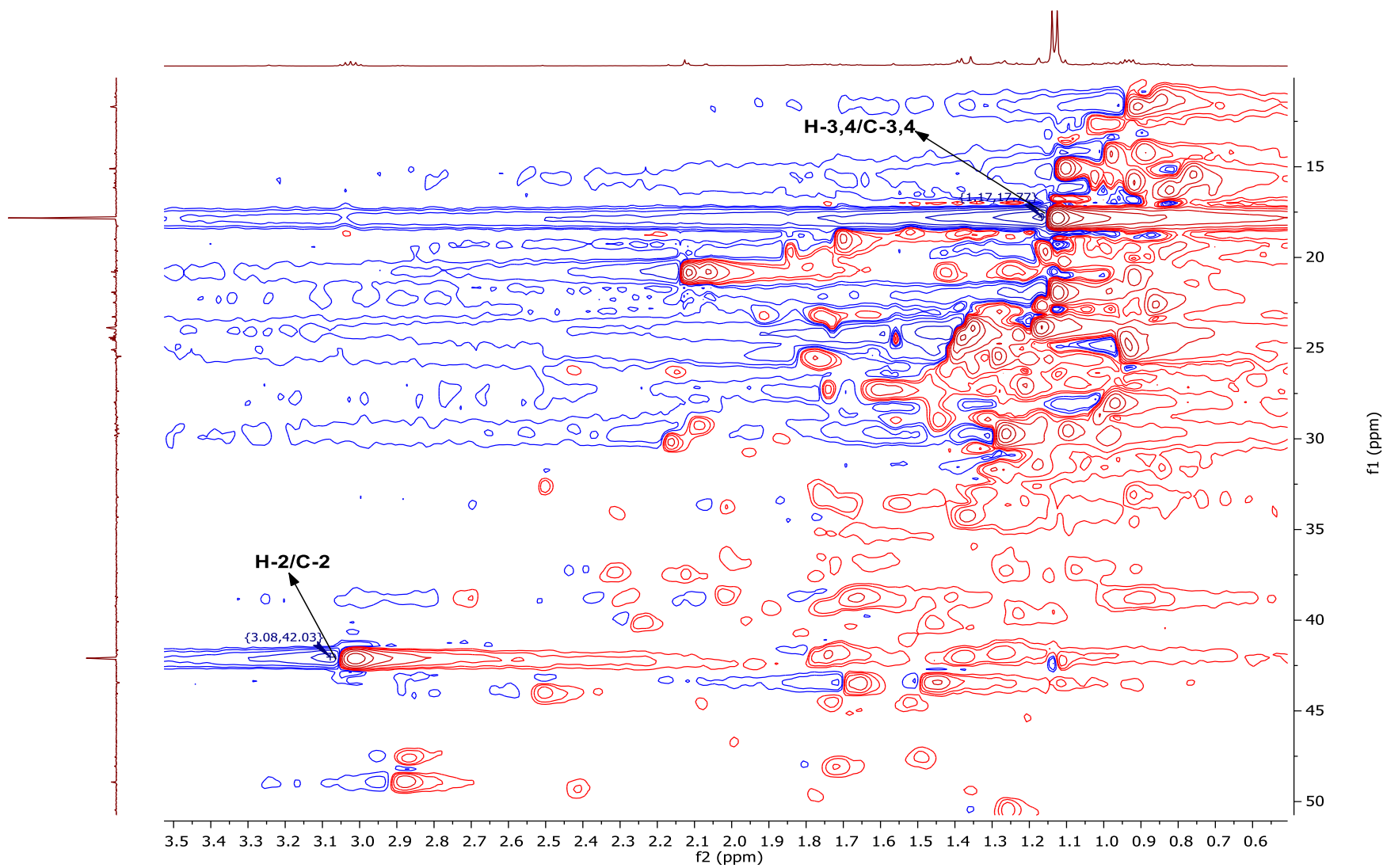


Figura 108. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/125 MHz, CDCl_3), na região entre 0,5-3,5 ppm, da fração rica em conglomerona (**104**).

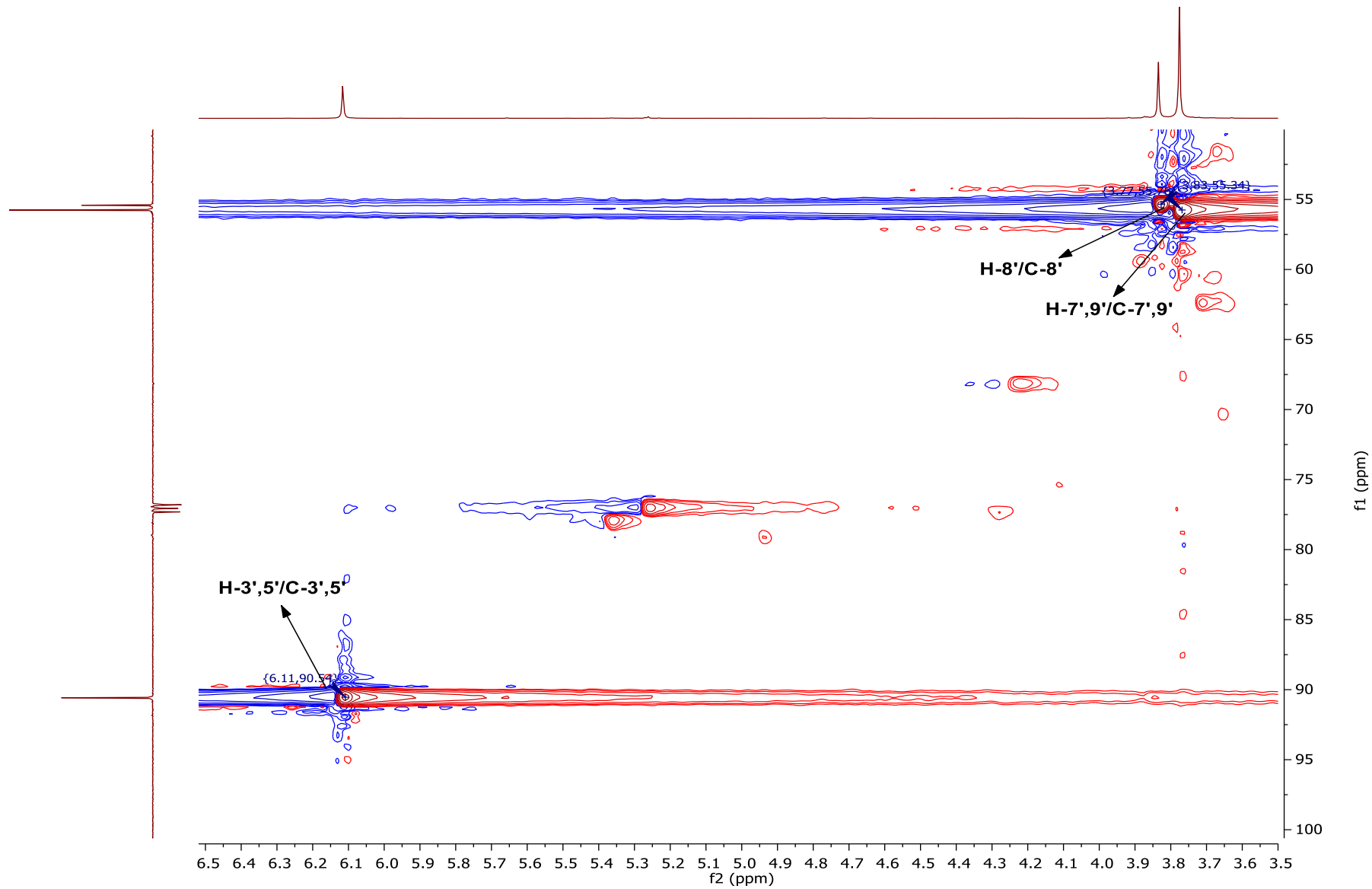


Figura 109. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/125 MHz, CDCl_3), na região entre 3,5-6,5 ppm, da fração rica em conglomerona (**104**).

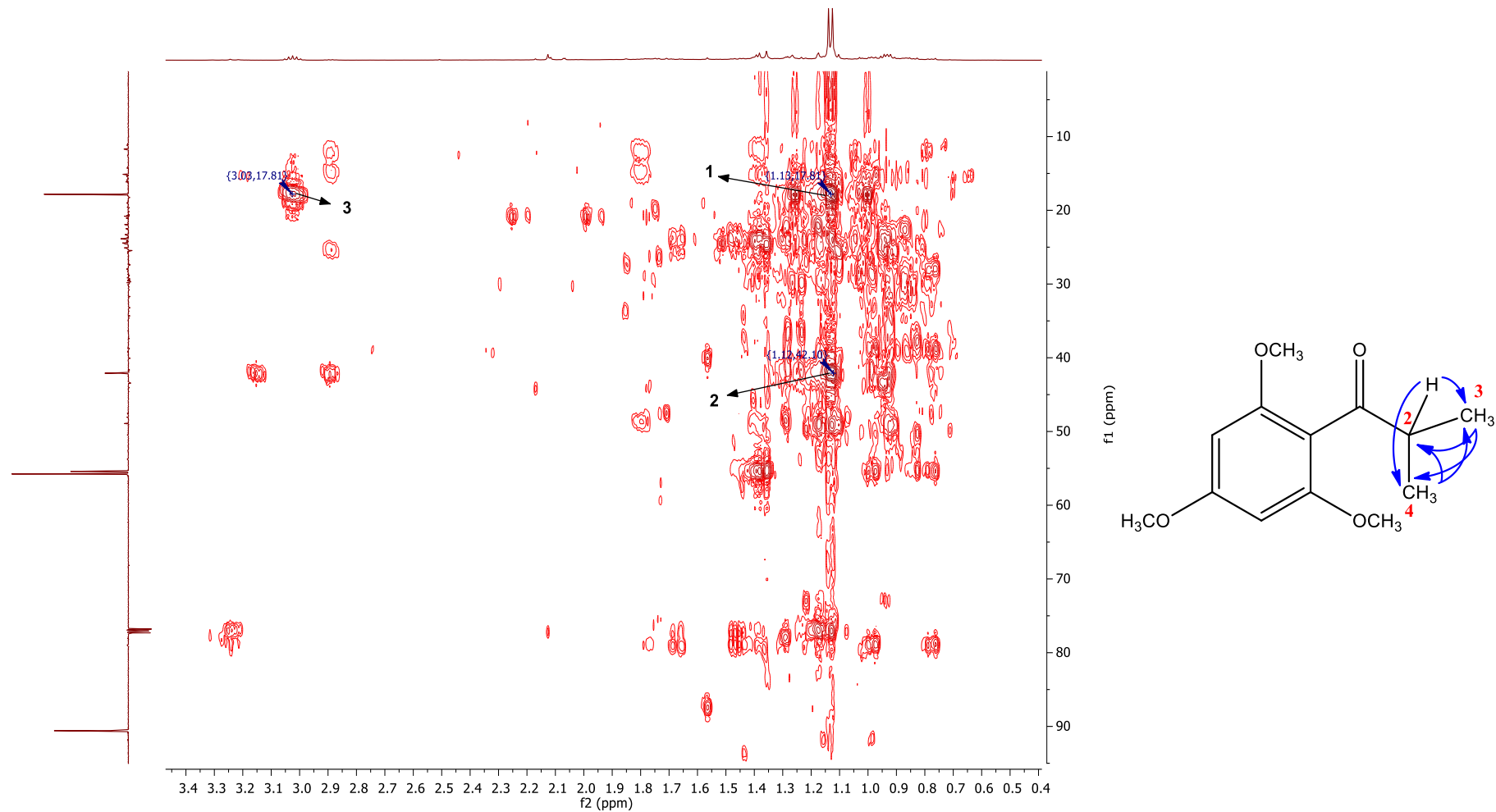


Figura 110. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, CDCl_3), na região entre 0,5-3,5 ppm, da fração rica em conglomerona (**104**).

Símbolos:

1: $^3J_{\text{H-3/C-4}}$, H-4/C-3 ; 2: $^2J_{\text{H-3,4/C-2}}$; 3: $^2J_{\text{H-2/C-3,4}}$.

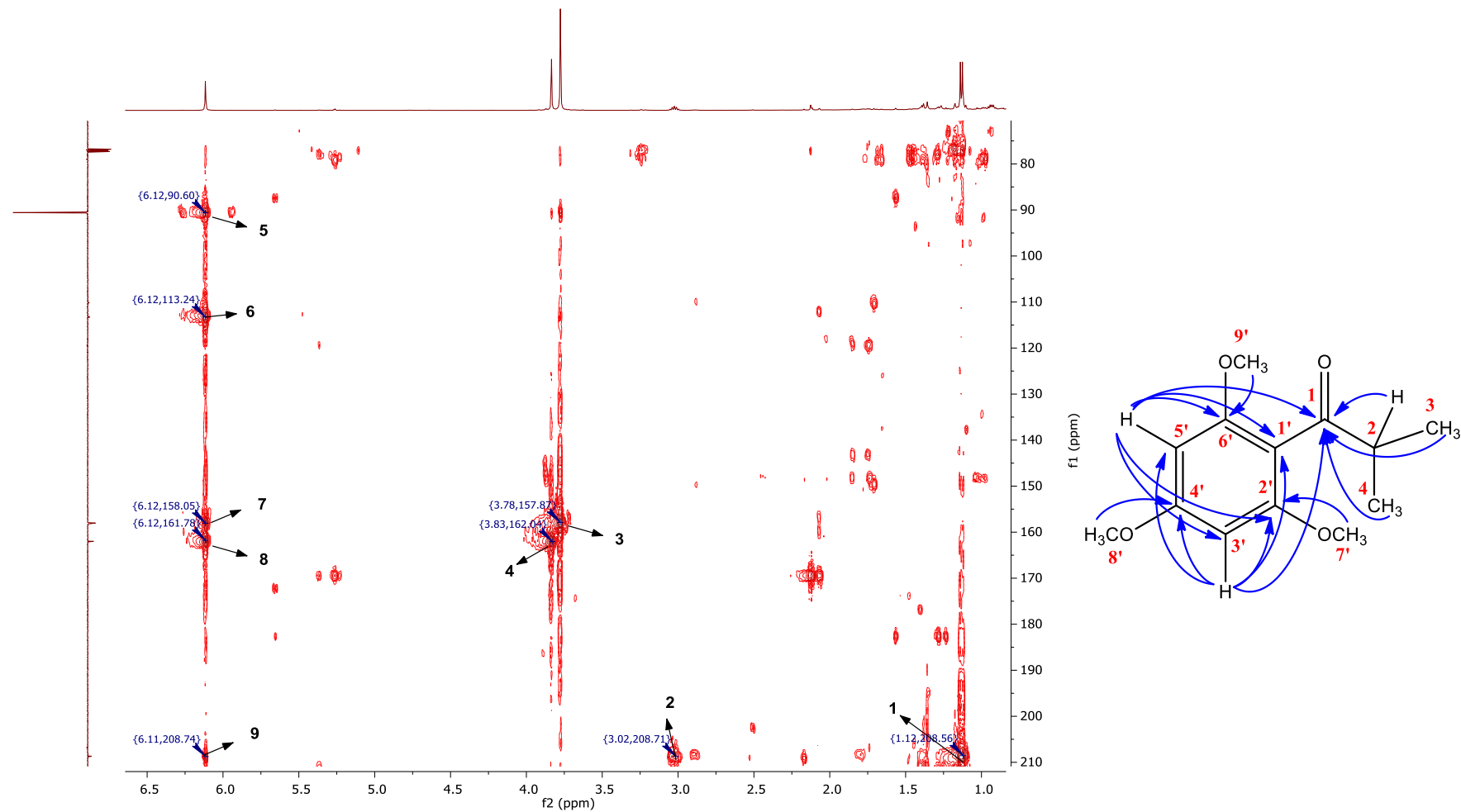


Figura 111. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, CDCl₃), na região entre 1,0-6,5 ppm, da fração rica em conglomerona (**104**).

Símbolos:

1: ${}^3J_{\text{H-3,4/C-1}}$; 2: ${}^2J_{\text{H-2/C-1}}$; 3: ${}^3J_{\text{H-7'/C-2'}}$, H-9'/C-6'; 4: ${}^3J_{\text{H-8'/C-4'}}$; 5: ${}^3J_{\text{H-3'/C-5'}}$, H-5'/C-3'; 6: ${}^3J_{\text{H-3',5'/C-1'}}$; 7: ${}^2J_{\text{H-3'/C-2'}}$, H-5'/C-6'; 8: ${}^2J_{\text{H-3',5'/C-4'}}$; 9: ${}^4J_{\text{H-3',5'/C-1}}$.

O espectro de massas por CG-EM está disponibilizado na Figura 112. A proposta de fragmentação para a formação do íon base m/z 195 por clivagem heterolítica simples foi proposto na Figura 113, com a adição da formação dos íons de m/z 196 e 180 pelos mecanismos, respectivamente, de rearranjo 1,3 de hidrogênio e de formação de uma benzolactona com anel de 4 membros.

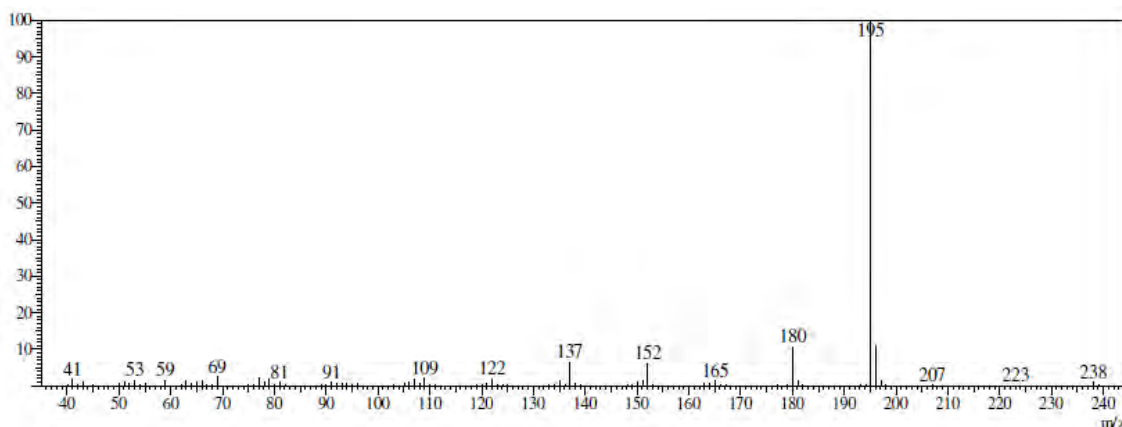


Figura 112. Espectro de massas, obtido por CG-EM, da conglomerona (**104**).

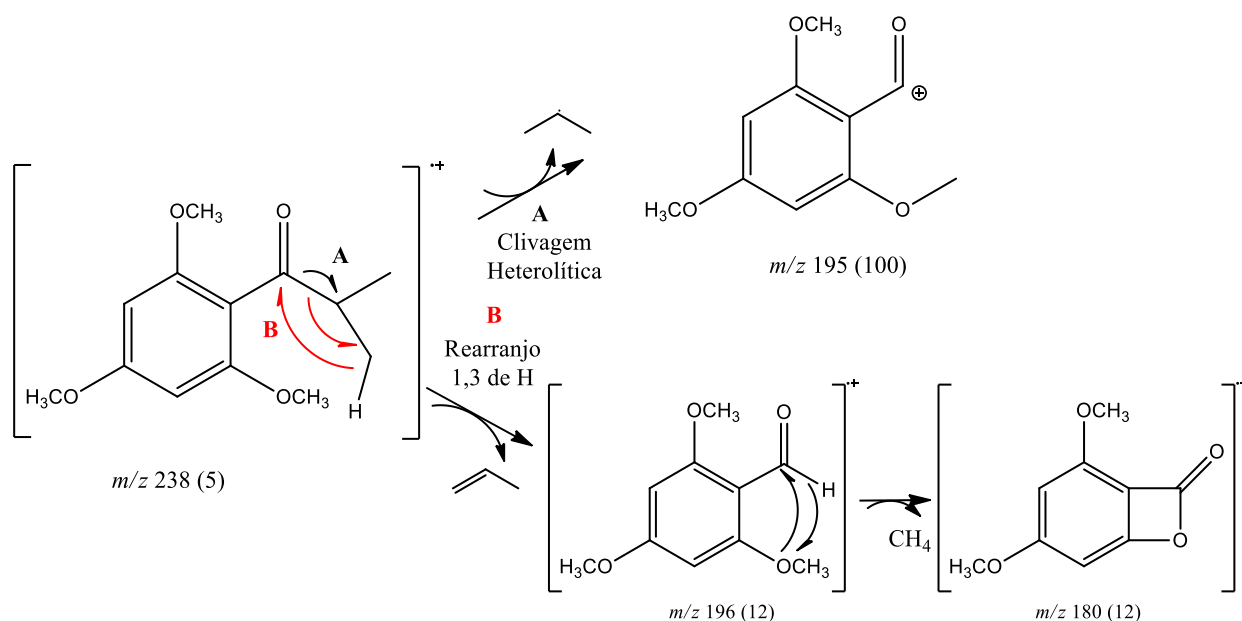


Figura 113. Proposta de mecanismo de fragmentação para a conglomerona (**104**) e a formação dos principais íons produtos.

Em relação a este metabólito secundário, a conglomerona é um derivado obtido através da via biossintética dos policetídeos, formado inicialmente através das reações de condensação de Claisen (reação de condensação entre dois ésteres e formação de um β -cetoéster) do isobutirilCoA com unidades de malonilCoA (DEWICK, 2009). Esta substância foi identificada pela primeira vez ainda na década de 30 e, atualmente, é reportada para diferentes espécies de Myrtaceae como *Myrcianthes cysplatensis*, *Eucalyptus suberea* e *E. brevistylis* (LAHEY & JONES, 1939; D'AMICO et al., 2011; GOODGER et al., 2016). Além disso, a substância isolada conglomerona apresentou atividade antimicrobiana contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (D'AMICO et al., 2011).

3.4. Avaliação das Atividades Biológicas de Folhas de Myrtaceae spp.

3.4.1. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* das partições de EFEC e EFMT

Em paralelo ao projeto de identificação das substâncias presentes nas partições de EFEC e EFMT, foram realizados dois estudos de avaliação biológica do mesmo material quanto ao seu potencial antioxidante. O primeiro experimento consistiu nos ensaios de captura dos radicais sintéticos DPPH e ABTS enquanto o segundo estudo foi executado no Laboratório de Estresse Oxidativo em Microrganismos (LEOM-IQ-UFRRJ) e coordenado pelo professor Dr. Cristiano Jorge Riger para a avaliação do potencial antioxidante através do modelo de *Saccharomyces cerevisiae*. Ambos os estudos foram publicados junto aos resultados de desreplicação por CG-EM e CLAE-DAD em um número da revista *Chemistry & Biodiversity* (MARTINS et al., 2021).

Para o primeiro estudo, foram empregados dois métodos referentes a ensaios *in vitro* de captura de radicais coloridos, estáveis e não biológicos, amplamente adotados na literatura científica para avaliação indireta do potencial antioxidante devido a facilidade, rapidez e simplicidade das metodologias (PRIOR et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2008). Os resultados obtidos pelo próprio autor estão disponíveis na Tabela 21.

Tabela 21. Resultados para os ensaios indiretos de capturas de radicais sintéticos para os extratos brutos e partições de folhas de Myrtaceae spp.

Extratos/Partições	CE ₅₀ DPPH (mg/mL)	ABTS (mmol Trolox/g)
EFEC	0,15	1,66
EFEC-H	2,91	0,30
EFEC-D	1,51	0,68
EFEC-Ac	0,18	2,60
EFEC-Bu	0,41	1,42
EFMT	0,78	0,34
EFMT-H	-*	-*
EFMT-D	5,98	0,10
EFMT-Ac	0,38	1,35
EFMT-Bu	1,29	0,12
Quercetina	0,09	4,37
Ácido Ascórbico	0,02	8,01

*não quantificável.

Os extratos brutos e partições mais polares das duas espécies demonstraram menor CE₅₀ e, conseqüentemente, maior potencial antioxidante. Este resultado sugere a contribuição das substâncias fenólicas como os ácidos fenólicos, os flavonóis, os derivados de ácido elágico, os taninos hidrolisáveis e condensados, identificados no estudo de desreplicação.

Os extratos EFEC (CE₅₀ 0,15 mg/mL), EFEC-Ac (CE₅₀ 0,18 mg/mL) e EFEC-Bu (CE₅₀ 0,41 mg/mL) apresentaram os melhores resultados para folhas de *E. copacabanensis*. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Junior e colaboradores (2014), que relataram que extratos brutos de folhas e ramos de *E. copacabanensis* produziram melhores resultados antioxidantes em ensaios DPPH. Quando comparadas às amostras de *E. copacabanensis*, as frações das folhas de *M. tenella* apresentaram menor potencial antioxidante, com resultados superiores para EFMT-Ac (CE₅₀ 0,38 mg/mL) e EFMT (CE₅₀ 0,78 mg/mL). No entanto, os resultados para folhas de *M. tenella* também foram semelhantes aos relatados por Ribeiro e

colaboradores (2019), com um maior potencial antioxidante revelado pelo ensaio DPPH para extração etanólica, metanólica e aquosa final.

Para o ensaio com radical ABTS⁺, EFEC-Ac (2,60 mmol Trolox/g), EFEC (1,66 mmol Trolox/g) e EFEC-Bu (1,42 mmol Trolox/g) também produziram os melhores resultados. Entre as amostras de *M. tenella*, apenas a fração acetato de etila (EFMT-Ac) demonstrou um maior potencial antioxidante e similar a espécie *E. copacabanensis* (1,35 mmol Trolox/g). Além disso, todos os padrões de antioxidantes apresentam resultados superiores aos de qualquer extrato e partição de folhas de Myrtaceae spp. A quercetina e o ácido ascórbico são conhecidos como antioxidantes importantes e apresentaram resultados superiores a todas as amostras analisadas.

O segundo estudo, com o modelo de *S. cerevisiae*, amplificou os resultados obtidos quanto à avaliação do potencial antioxidante do material das duas espécies botânicas. Este trabalho em parceria com a equipe do LEOM (IQ-UFRRJ) gerou dois trabalhos de conclusão de curso para duas alunas do curso de Química Industrial da UFRRJ. Os principais resultados obtidos foram:

- Teste de toxicidade celular: O monitoramento através do ensaio com resazurina revelou qualitativamente que as concentrações estudadas de 0,25 a 2,500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das partições em acetato de etila e butanol das duas espécies não alteraram a viabilidade celular da cepa de *S. cerevisiae*;
- Teste de viabilidade celular: O ensaio com exposição de 2 h das células às partições EFMT-Ac, EFMT-Bu, EFEC-Ac e EFEC-Bu, demonstrou que nenhuma delas apresentou toxicidade significativa nas concentrações 0,14 e 4,00 mg.mL^{-1} contra a cepa BY4741, principalmente em comparação ao ensaio controle positivo com solução a 2,0 mM de peróxido de hidrogênio;
- Teste de viabilidade celular em cepa deficiente de glutatona: Com o mesmo teste repetido com a cepa Δgsh1 , os experimentos com a menor concentração (0,14 mg.mL^{-1}) demonstraram resultado similar ao controle, enquanto os experimentos com as mesmas partições na concentração superior (4,00 mg.mL^{-1}) apresentaram um aumento da viabilidade celular de no mínimo 86% (EFMT-Ac). Os resultados confirmaram a ausência de citotoxicidade nas concentrações testadas.
- Teste de atividade antioxidante: O experimento foi realizado individualmente com as duas cepas, com pré-tratamento de 2 h com as partições de cada espécie e exposição por 2 h a solução a 2,0 mM de peróxido de hidrogênio. Para a cepa BY4741, nenhum tratamento foi estatisticamente igual ao controle positivo, demonstrando uma relevante ação antioxidante, com destaque para a fração EFEC-Ac na menor concentração testada (0,14 mg.mL^{-1}). Os resultados foram similares para a cepa Δgsh1 , sendo proporcional uma maior atividade antioxidante com o aumento da concentração testada.

A Figura 114 apresenta os gráficos referentes aos quatro ensaios de viabilidade celular com as duas cepas de *S. cerevisiae* empregadas.

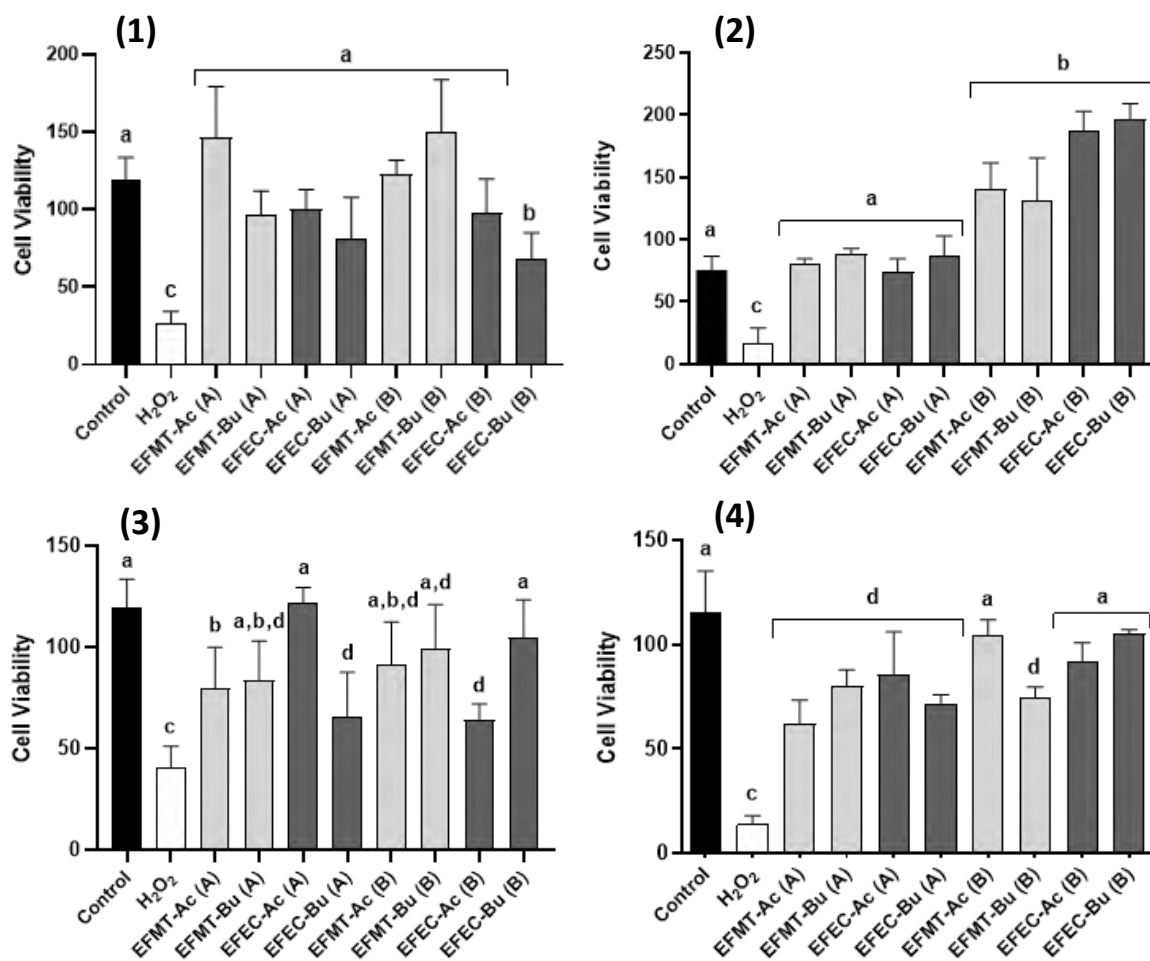


Figura 114. Gráficos de viabilidade celular para os quatro ensaios diferentes com as partições em acetato de etila e butanol de folhas de *M. tenella* (EFMT-Ac e EFMT-Bu) e *E. copacabanensis* (EFEC-Ac e EFEC-Bu) nas concentrações de 0,14 mg.mL⁻¹ (A) e 4,00 mg.mL⁻¹ (B). Os resultados (1) e (2) correspondem aos ensaios de toxicidade com as cepas BY4741 e $\Delta gsh1$ e os resultados (3) e (4) aos ensaios de atividade antioxidante com as respectivas cepas. Diferentes letras indicam resultados estatisticamente diferentes para cada tratamento ($p < 0.05$).

Em geral, estes resultados demonstraram que todas as partições em acetato de etila e butanol, com diversidade estrutural de substâncias fenólicas, apresentaram resultados expressivos na proteção celular contra o estresse oxidativo causado pelo H₂O₂, com maior influência para células deficientes em seu sistema de defesa e com a deleção do sistema de defesa antioxidante sendo efetivamente compensada pela presença dos extratos.

3.4.2. Avaliação da atividade acaricida da fração EFEC-H 38-46

A fração EFEC-H 38-46, que apresentou composição majoritária do sesquiterpeno 2-metóxi-clovan-9-ol, foi testada quanto ao potencial acaricida contra carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus*. Esta avaliação em específica foi selecionada devido a tendência de estudo de novos acaricidas de origem natural, em que os terpenos e óleos essenciais tem recebido destaque e, principalmente para esta espécie de carrapatos bovinos, mais pesquisados devido a sua ampla resistência, alcance e importância econômica (BENELLI & PAVELA, 2018; NWANADE et al., 2020).

O trabalho realizado em parceria com a zootecnista e doutoranda em Ciências Veterinárias (IV-UFRRJ) Paula Marchesini no Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP-UFJF) demonstrou resultados promissores do 2-metoxi-clovan-9-ol contra o controle do carrapato *R. microplus*, ainda não publicados na literatura científica. Entre os principais resultados, podemos destacar:

- Teste de pacote de larvas (*Larval packet test – LPT*): A fração rica em 2-metoxi-clovan-9-ol (EFEC-H 38-46) foi eficaz contra larvas de *R. microplus*, com taxa de mortalidade superior a 90% na concentração de 50 mg.mL⁻¹ (Tabela 22). Estes resultados estão de acordo com a literatura científica, que identificou que as larvas de *R. microplus* não alimentadas apresentam sensibilidade a compostos botânicos (MARCHESINI et al., 2018; CASTRO et al., 2019);

Tabela 22. Mortalidade em % (média ± desvio padrão) de larvas não-alimentadas de *R. microplus* tratadas com diferentes concentrações da fração rica em 2-metóxi-clovan-9-ol.

Tratamentos	Mortalidade (%)
Controle	0,0 ^a ± 0,0
3,125 mg.mL ⁻¹	0,0 ^a ± 0,0
6,25 mg.mL ⁻¹	9,5 ^a ± 7,6
12,5 mg.mL ⁻¹	27,9 ^{ab} ± 5,5
25,0 mg.mL ⁻¹	39,1 ^b ± 9,8
50,0 mg.mL ⁻¹	93,6 ^c ± 5,1

Diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos (p < 0.05).

Controle: Etanol 50% + DMSO 1%.

- Teste de imersão de fêmeas adultas (*Adult immersion test – AIT*): A fração EFEC-H 38-46 também reduziu significativamente a quantidade de ovos e a viabilidade de fêmeas ingurgitadas (alimentadas) de *R. microplus* (Tabela 23). O peso das fêmeas antes da oviposição não diferiu estatisticamente entre todos os tratamentos (p > 0,05). Para os parâmetros peso dos ovos, porcentagem de eclosão larval e porcentagem controle, já foi observada diferença significativa (p < 0,05) na menor concentração testada (12,5 mg.mL⁻¹) quando comparada ao teste controle. O percentual de controle variou de 55,7 a 92,9%, com valores percentuais de controle superiores a 90% nas três maiores concentrações; Outros estudos relatam esta redução significativa na quantidade e viabilidade de ovos, como Marchesini e colaboradores (2020) com o extrato metanólico de *Acmella oleracea* (jambu) e a substância isolada espilantol; e também para OEs ricos em sesquiterpenos, como OE rico em nerolidol de *Baccharis dracunculifolia*, por Lage e colaboradores (2015), e OE rico em β-cariofileno de *Psidium guajava*, por Castro e colaboradores (2019);
- Cálculo estatístico de CL₅₀ para os dois ensaios experimentais: Os valores preditos de CL₅₀ indicaram valores baixos para larvas não alimentadas (21,76 mg.mL⁻¹) e fêmeas ingurgitadas (11,13 mg.mL⁻¹) de *R. microplus* (Tabela 24). Embora as larvas sejam comumente mais suscetíveis ao material botânico do que as fêmeas ingurgitadas devido à diferença fisiológica, o resultado observado foi oposto, sugerindo que a principal substância desta fração de *E. copacabanensis* teve diferentes mecanismos de ação para alterar a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas, melhorando o efeito contra a viabilidade dos ovos e apresentando menor CL₅₀ para este ensaio em vez da mortalidade larval.

Tabela 23. Parâmetros obtidos no teste de imersão de larvas adultas (média \pm desvio padrão), tratados com diferentes concentrações da fração rica em 2-metóxi-clovan-9-ol.

Tratamentos	Massa das fêmeas antes da oviposição (mg)	Massa dos ovos (mg)	Porcentagem de Eclosão Larval (%)	Porcentagem Controle (%)
Controle (n)	204,7 ^a \pm 11,4 (10)	116,3 ^a \pm 38,2 (10)	88,7 ^a \pm 4,2 (10)	-
12,5 mg.mL⁻¹ (n)	201,5 ^a \pm 7,1 (10)	64,2 ^b \pm 35,0 (10)	70,0 ^b \pm 10,6 (08)	55,7
25,0 mg.mL⁻¹ (n)	201,6 ^a \pm 12,6 (10)	79,1 ^{ab} \pm 14,8 (10)	46,2 ^b \pm 26,1 (10)	64,0
50,0 mg.mL⁻¹ (n)	203,0 ^a \pm 17,3 (10)	46,6 ^b \pm 33,0 (10)	17,5 ^{bc} \pm 22,5 (08)	92,0
100,0 mg.mL⁻¹ (n)	202,2 ^a \pm 18,3 (10)	56,8 ^b \pm 29,8 (10)	15,8 ^c \pm 21,7 (09)	91,1
150,0 mg.mL⁻¹ (n)	202,7 ^a \pm 15,5 (10)	27,9 ^c \pm 25,3 (10)	11,4 ^c \pm 10,2 (07)	92,9

Tabela 24. Concentração letal (CL₅₀), em mg.mL⁻¹, da fração rica em 2-metóxi-clovan-9-ol, obtido de folhas de *E. copacabanensis*, contra larvas não-alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

	CL ₅₀	IC	Valor de <i>p</i>
Larvas não-alimentadas	21,76	20,70 – 22,81	< 0,01
Fêmeas ingurgitadas	11,13	9,96 – 12,29	< 0,01

IC – Intervalo de confiança (95%).

Todos estes resultados contribuíram para que o sesquiterpeno 2-metóxi-clovan-9-ol, obtido do extrato das folhas de *E. copacabanensis*, seja destacado como potencial acaricida natural contra larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

4 CONCLUSÃO

O estudo de desreplicação dos extratos metanólicos e partições de folhas de *E. copacabanensis* e *M. tenella* conduziu a identificação de um total de 104 metabólitos secundários, sendo muitos pertencentes a algumas classes de produtos naturais característicos da família Myrtaceae.

Na primeira etapa do estudo, foi proposta a identificação por CG-EM nas partições hexânicas das duas espécies botânicas de 49 substâncias, incluindo sesquiterpenos, triterpenos, esteroides, ésteres de ácidos graxos e tocoferóis. A segunda etapa, que consistiu na desreplicação pelas técnicas de CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM, contribuiu para a identificação de outras 44 substâncias, entre ácidos fenólicos, flavonoides, derivados catequínicos, derivados do ácido elágico, taninos condensados e taninos hidrolisáveis. Outros experimentos adicionais também geraram resultados importantes, como os 5 carotenoides quantificados por CLAE-DAD e outras 6 substâncias relatadas através das etapas de purificação e isolamento de metabólitos.

Em relação a cada espécie botânica, foi proposta a identificação de um total de 78 substâncias para os extratos de folhas de *E. copacabanensis*, sendo 67 relatadas pela primeira vez para a espécie botânica. Destacam-se o 2-metóxi-clovan-9-ol, outro sesquiterpeno derivado do anel clovano relatado para *E. copacabanensis*; os teores de ácido clorogênico, o galato de metila e quercitrina; e o perfil químico variado de flavonóis, derivados catequínicos, taninos condensados e hidrolisáveis.

Para a espécie *M. tenella*, o presente estudo conduziu a identificação de 64 substâncias, dentre as quais 53 inéditas para a espécie botânica. Os resultados mais importantes incluíram o perfil químico de ácido elágico e derivados e a presença majoritária dos flavonóis 3-*O*-galoil-galactosídeo, quercetina 3-*O*-galoil-glicosídeo, hiperosídeo e isoquercitrina.

Os trabalhos em parceria geraram resultados promissores quanto à avaliação biológica das amostras obtidas no estudo, com destaque para o potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* das partições em acetato de etila e butanol das duas espécies botânicas; e a significativa atividade acaricida da fração rica em 2-metóxi-clovan-9-ol (*E. copacabanensis*) frente aos carrapatos da espécie *R. microplus*.

Todo o estudo fitoquímico relatado no presente capítulo consiste em uma valiosa contribuição para o conhecimento da composição química e potencial biológico de duas espécies pouco conhecidas da família Myrtaceae, oriundas de uma área de restinga do estado do Rio de Janeiro.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ANTOCIANINAS EM FRUTOS DE *Myrcia eriopus*

RESUMO

Myrcia eriopus DC. (Myrtaceae) é uma espécie nativa e endêmica do Brasil que produz frutos com cor indicativa de antocianinas. Nenhuma informação sobretudo quanto a composição química destes frutos foi encontrada na literatura científica. Este trabalho teve como objetivo caracterizar as substâncias fenólicas, principalmente as antocianinas, presentes nos frutos de *M. eriopus*, e indicar seu potencial antioxidante. Foram empregados dois sistemas instrumentais *offline*, CLAE-DAD e IES-QTdV-EM, para a caracterização química e dois métodos espectrofotométricos *in vitro* para a avaliação antioxidante. Cinco antocianinas glicosiladas, delphinidina 3-*O*-glicosídeo (1), cianidina 3-*O*-glicosídeo (2), petunidina 3-*O*-glicosídeo (3), peonidina 3-*O*-glicosídeo (4) e malvidina 3-*O*-glicosídeo (5), foram isoladas e identificadas através dos sistemas mencionados e da comparação com padrões analíticos e literatura científica. O pó liofilizado de frutos de *M. eriopus* apresentou um elevado teor de antocianinas (1878,14 mg/100 g), com maiores teores das substâncias 1 e 3. Os resultados também incluíram a presença de ácido gálico (6) e miricetina (7), além do potencial antioxidante determinado através dos ensaios DPPH e ABTS (CE₅₀ 2419 µg/mL e 339 µmol Trolox/g). Este é o primeiro relato sobre a composição química dos frutos de *M. eriopus*, contribuindo para o conhecimento desta espécie.

Palavras-chave: antocianinas, *Myrcia eriopus*, potencial antioxidante.

ABSTRACT

Myrcia eriopus DC. (Myrtaceae) is a native and endemic Brazilian species which produces fruits with of a color indicative of anthocyanins. No information about chemical composition of these fruits was found in the scientific literature. This study aimed to characterize the phenolic compounds, especially anthocyanins, present in *M. eriopus* fruits, and to demonstrate their antioxidant potential. Two offline instrumental systems HPLC-DAD and ESI-QToF-MS were employed for the chemical characterization, and two *in vitro* spectrophotometric assays were adopted for the antioxidant evaluation. Five different glycosylated anthocyanins, namely delphinidin 3-*O*-glucoside (**1**), cyanidin 3-*O*-glucoside (**2**), petunidin 3-*O*-glucoside (**3**), peonidin 3-*O*-glucoside (**4**) and malvidin 3-*O*-glucoside (**5**), were isolated and identified by the two offline systems and the comparison to the analytical standards and scientific literature. The lyophilized powder of *M. eriopus* fruits showed a high anthocyanin content (1878.14 mg/100 g), with greater levels of the compounds **1** and **3**. The results also included the presence of gallic acid (**6**) and myricetin (**7**), and an antioxidant potential in DPPH and ABTS assays (EC_{50} 2419 μ g/mL and 339 μ mol Trolox/g). This is the first report about the chemical composition of *M. eriopus* fruits, contributing to the knowledge of this species.

Keywords: anthocyanins, *Myrcia eriopus*, antioxidant potential.

1 INTRODUÇÃO

Entre as diferentes espécies nativas e endêmicas do Brasil, podemos mencionar a espécie *Myrcia eriopus* DC. Esta planta tem ocorrência nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do território brasileiro, sendo encontrada nos biomas Mata Atlântica e Cerrado. A espécie produz pequenos frutos maduros de coloração arroxeada (FORZZA et al., 2010; ROSA & ROMERO, 2012). Nenhuma informação quanto ao nome popular, usos tradicionais, composição química ou atividade biológica relacionadas à espécie *M. eriopus* está disponível na literatura científica. Apenas exsicatas coletadas *in loco* são encontradas em sites de herbários, como a Figura 115.



Figura 115. Exsicata da espécie *M. eriopus* (HERBÁRIO VIRTUAL - UFJF, [s.d.]).

Entretanto, esta espécie pertence ao gênero *Myrcia*, em que existem estudos com isolamento de flavonoides, taninos, derivados de acetofenonas e terpenos e com potencial biológico (CASCAES et al., 2015). Uma estratégia para a valorização desta espécie é o estudo dos frutos devido a coloração característica da presença de antocianinas. Estes metabólitos ocorrem em diferentes órgãos vegetais como flores, frutos e sementes, sendo localizados principalmente nos vacúolos celulares devido a sua solubilidade (LIU et al., 2018). Hibiscus, rosa vermelha, violeta, lavanda, uva, mirtilo ou *blueberry* e cranberry são espécies conhecidas como fontes destas antocianinas.

Quanto à sua estrutura química, estas substâncias são uma subclasse de flavonoides com núcleo básico do cátion 2-fenilbenzopirílio (ou cátion flavílio) e glicosilação no C-3. Esta estrutura possibilita a absorção de energia luminosa na região do ultravioleta e visível e, por isso, uma ampla faixa de coloração do laranja ao azul nos órgãos vegetais (SANTIAGO et al., 2016; LIU et al., 2018). Uma alta proteção contra inúmeros fatores bióticos e abióticos de stress e as propriedades antioxidantes estão relacionadas a estas substâncias nas plantas. Além disso, os estudos científicos tem associado as antocianinas como papel fundamental na redução de doenças crônicas e degenerativas em humanos (KHOO et al., 2017; LIU et al., 2018).

Nos últimos anos, o Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos tem focado em pesquisas de valorização de mirtáceas através do perfil de antocianinas e sua potencial aplicação tecnológica (GOUVÊA et al., 2015; SANTIAGO et al., 2016, 2018; NASCIMENTO et al., 2017). O presente capítulo teve como objetivo caracterizar por CLAE-DAD e IES-QTdV-EM a composição de substâncias fenólicas, em especial as antocianinas, presentes em frutos de *M. eriopus*. Adicionalmente, foi determinado indiretamente o potencial antioxidante do pó liofilizado destes frutos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais e Equipamentos

Os experimentos foram realizados com os seguintes solventes: acetona, acetonitrila e acetato de etila grau HPLC (Tedia[®], EUA), ácido fosfórico grau de pureza 85% (Spectrum[®], EUA), e metanol grau LC-MS (Merck[®], Alemanha). A água purificada foi obtida através de sistema Milli-Q[®] Gradient 10A Millipore[®] e Elix[®]/RiOs[™] 5 systems (EUA). Outras substâncias utilizadas foram hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) da Spectrum[®] (EUA); e padrões analíticos de ácido ascórbico, quercetina, rutina e curcumina da Merck[®] (Sigma Aldrich, EUA). Os ensaios de captura de radicais foram realizados com 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e ácido (±)-6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), adquiridos da Merck[®] (Sigma Aldrich, EUA), e o sal diamônico de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS[™]) da Roche (Brazil).

2.2. Coleta do Material Vegetal

Frutos maduros de *M. eriopus* foram coletados no mês de setembro de 2019 no bairro de Guaratiba, localizado no município do Rio de Janeiro – RJ (23°00'30.4" S, -43°32'11.2" W), pelo professor Dr. Marcelo da C. Souza, com exsicata depositada no Herbário da UFRRJ (RBR 55135).

2.3. Processamento dos Frutos de *M. eriopus*

Inicialmente, todos os frutos foram lavados em água corrente, sendo realizada a separação manual da parte comestível (casca + polpa) das sementes. Foram pesados individualmente quinze frutos, incluindo as sementes e as partes comestíveis, com a determinação da massa média e proporção média para estes frutos. A umidade da parte comestível foi determinada por gravimetria. Após as pesagens, a parte comestível foi direcionada para secagem em liofilizador de bancada modelo L101 (Liobras, Brasil) à -40°C por 24 h. O produto seco foi moído em moinho analítico modelo A11 (IKA[®], Brasil) e estocado em embalagens metálicas herméticas à temperatura ambiente. O procedimento está esquematizado na Figura 116.

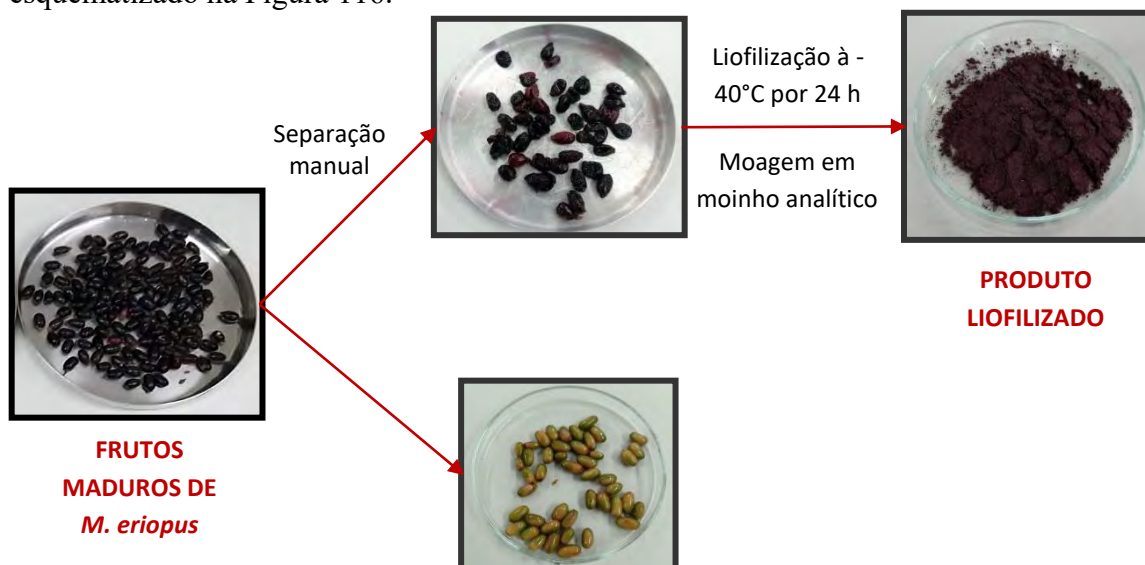


Figura 116. Esquema do preparo do pó liofilizado dos frutos de *M. eriopus* (PLME).

2.4. Análise Quantitativa por CLAE-DAD das Antocianinas do Pó Liofilizado dos Frutos de *M. eriopus* (PLME)

Para caracterização do perfil de antocianinas, empregou-se a metodologia de extração por SANTIAGO et al. (2010). O método consistiu inicialmente na extração das antocianinas em banho de ultrassom com solução metanólica de ácido fórmico a 10% (v/v) e posterior centrifugação e recolhimento do extrato para balão volumétrico. O processo extrativo foi repetido até o esgotamento da coloração do sobrenadante e do resíduo sólido. Procedeu-se ainda a concentração de uma alíquota através de secagem sob ar comprimido e solubilização em uma solução contendo metanol e ácido fórmico em água (10:4,5:85,5 v/v).

A determinação do perfil das antocianinas foi realizada de acordo com o método de GOUVÊA et al. (2015) em sistema cromatográfico com coluna de fase reversa BDS Hypersil™ Thermo Scientific Thermo Scientific C₁₈ (100 mm x 4,6 mm x 2,4µm) e modo de eluição em gradiente de solução aquosa de ácido fórmico a 5% (v/v) e acetonitrila, conforme Tabela 25.

Tabela 25. Gradiente de eluição para o método por CLAE-DAD para antocianinas (GOUVÊA et al., 2015).

Tempo (min)	Fase A (% v/v)	Fase B (% v/v)
0,00	95,0	5,0
2,00	93,0	7,0
10,00	90,0	10,0
15,00	87,0	13,0
16,50	80,0	20,0
18,00	95,0	5,0
20,00	95,0	5,0

O perfil de antocianinas foi determinado por comparação dos tempos de retenção e espectros de UV-Vis (200-600 nm) com padrões analíticos, sendo a quantificação realizada por padronização externa e o resultado expresso em equivalência a cianidina 3-*O*-glicosídeo (g/100 g massa úmida). Todos os padrões analíticos de antocianinas foram isolados em laboratório de acordo com o método de GOUVÊA et al. (2012).

2.5. Análise por IES-QTdV-EM das Antocianinas de PLME

As antocianinas majoritárias presentes no pó liofilizado dos frutos de *M. eriopus* foram individualmente coletados no sistema CLAE através do mesmo método analítico previamente utilizado. Uma adaptação com a válvula de seis canais Rheodyne® conectada na saída da coluna permitiu uma coleta automatizada e o isolamento de cada antocianina (GOUVÊA et al., 2012), conforme Figura 117.

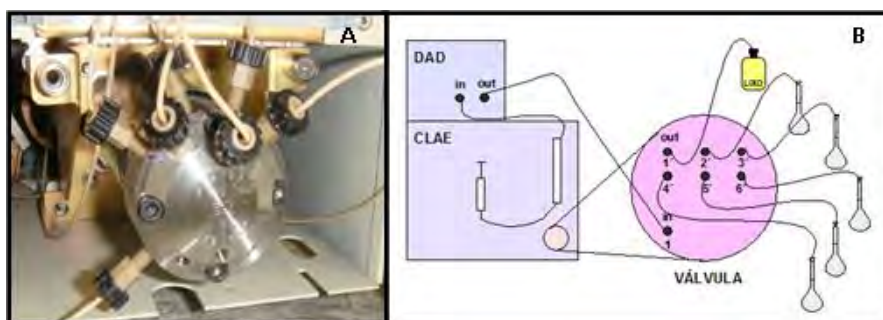


Figura 117. Válvula Rheodyne e o esquema de coleta automatizada.

Cada fração foi analisada novamente por CLAE-DAD, sendo determinado o grau de pureza, e em seguida injetadas diretamente no espectrômetro de massas de alta resolução IES-QTdV-EM modelo Synapt™ G1 (Waters®, EUA). A fonte de ionização por eletrospray (IES) foi operada no modo positivo, com energias no capilar, cone de amostragem e de extração de, respectivamente, 3,0 kV, 25,0 V e 4,0 V, temperatura de 120°C e gás de dessolvatação N₂ com velocidade de 12,5 L/min à 500°C. Para os experimentos de EM-EM, as energias de colisão foram aplicadas no *trap* e no *transfer*, em uma faixa de 10,0 a 25,0 V. As massas exatas e os padrões de fragmentação induzido por EM-EM foram os parâmetros utilizados para a confirmação da estrutura química de cada antocianina.

2.6. Análise por CLAE-DAD de Outras Substâncias Fenólicas de PLME

O produto liofilizado em pó ainda foi caracterizado em relação ao perfil de substâncias fenólicas, através dos métodos adaptados de NASCIMENTO et al. (2017) e SANTIAGO et al., (2018) descritos previamente no Capítulo II.

2.7. Ensaio espectrofotométrico de captura de radicais sintéticos DPPH e ABTS⁺

O potencial biológico do PLME foi avaliado indiretamente através dos métodos espectrofotométricos por captura dos radicais DPPH e ABTS⁺, também anteriormente descritos no Capítulo II. Neste estudo, foram empregados os padrões de ácido ascórbico, quercetina, rutina e curcumina como controle positivo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação das Antocianinas Presentes no PLME por CLAE-DAD e IES-QTdV-EM

Para a obtenção do produto em pó liofilizado dos frutos de *M. eriopus* (PLME), inicialmente foram determinadas as massas médias dos frutos e de suas partes divididas. O fruto maduro inteiro teve massa média de $0,68 \pm 0,08$ g, com $51,9 \pm 4,9\%$ referente à parte comestível (polpa + casca) e $48,1 \pm 4,9\%$ à semente. Ainda em relação aos resultados preliminares, a análise de umidade demonstrou uma média de $79,8 \pm 1,6\%$ (p/p) para a parte comestível dos frutos de *M. eriopus*.

A partir da parte comestível, foi obtido o produto PLME, em que procedeu-se a análise no sistema *offline* CLAE-DAD/IES-QTdV-EM. Cinco picos majoritários foram observados no cromatograma obtido por CLAE-DAD em fase reversa, em que os espectros de UV/Vis apresentaram duas bandas de absorção próximas a 275 e 520 nm e que estão relacionados às antocianinas (associadas ao anel A e ao anel B, respectivamente). O isolamento de cada antocianina usando uma válvula de seleção de seis canais Rheodyne® adaptada em um sistema analítico permitiu análises de EM e EM-EM, em alta resolução. Os espectros de EM-EM revelaram a perda de 162 Da para todas as substâncias, sugerindo clivagem da ligação entre a estrutura da antocianidina e uma unidade de hexose. A Figura 118 resume todos os dados experimentais obtidos para as cinco antocianinas.

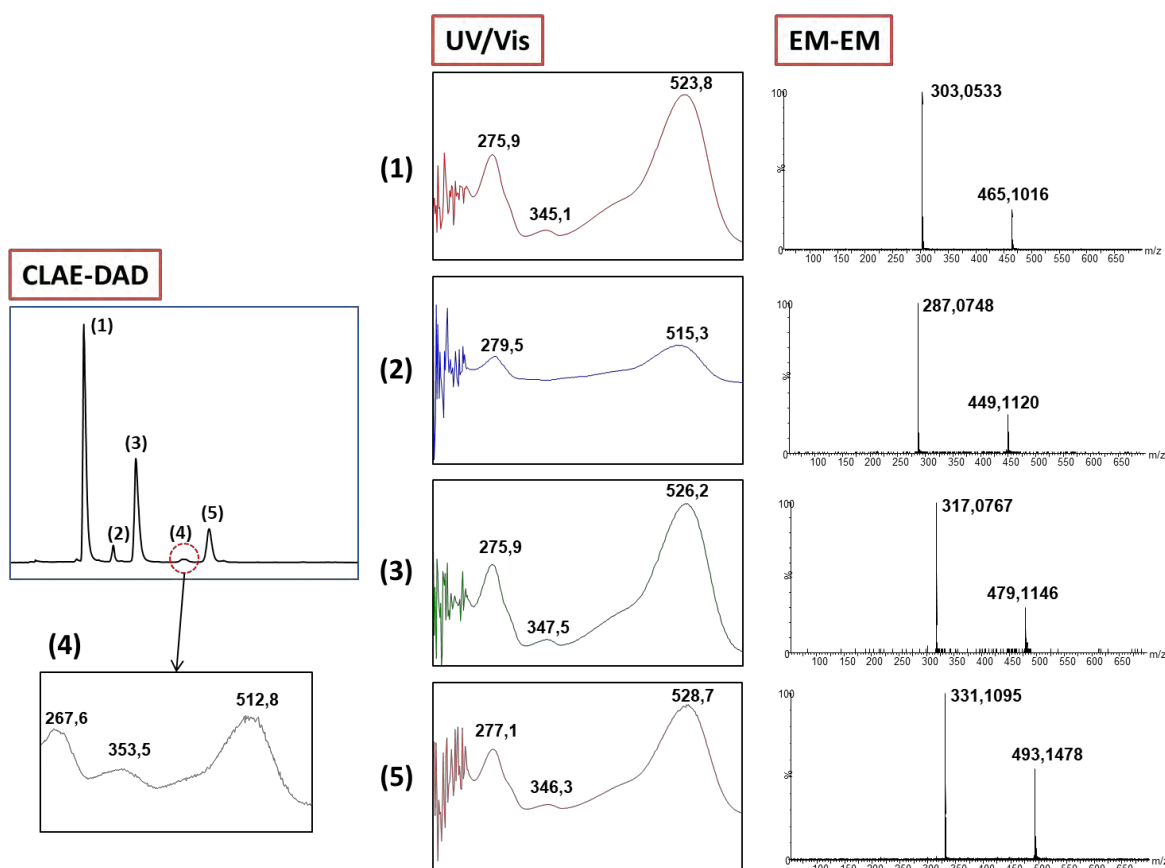


Figura 118. Esquema ilustrativo da investigação das antocianinas através dos espectros obtidos por CLAE-DAD e IES-QTdV-EM a partir do pó liofilizado de frutos de *M. eriopus*: delphinidina 3-*O*-glicosídeo (1, $t_R = 5,3$ min); cianidina 3-*O*-glicosídeo (2, $t_R = 7,1$ min); petunidina 3-*O*-glicosídeo (3, $t_R = 8,9$ min); peonidina 3-*O*-glicosídeo (4, $t_R = 11,3$ min); e malvidina 3-*O*-glicosídeo (5, $t_R = 13,4$ min).

As substâncias **1** e **3** corresponderam aos picos majoritários do cromatograma por CLAE-DAD. A substância **1** (t_R 5,3 min) apresentou as bandas de absorção em λ_{max} 275,9 e 523,8 nm, além dos íons molecular e produto, respectivamente, de m/z 465,1016 ($[M_1]^+$) e 303,0469 ($[M_1 - C_6H_{10}O_5]^+$). Esta foi identificada como a delfinidina 3-*O*-glicosídeo (ou mirtilina). A substância **3** apresentou um tempo de retenção superior à substância **1** na cromatografia em fase reversa (t_R 8,9 min), porém com um similar espectro de UV/Vis (λ_{max} 275,9 e 526,2 nm). Este dado espectroscópico indicou um grupo cromóforo semelhante e, conseqüentemente, estruturas químicas próximas para as duas antocianinas. A análise por EM-EM demonstrou um íon molecular com m/z 479,1146 ($[M_3]^+$) e um íon produto m/z 317,0702 ($[M_3 - C_6H_{10}O_5]^+$). As diferenças em relação ao tempo de retenção e ao íon molecular de 14 Da entre as substâncias **1** e **3** sugerem a presença de um grupo metoxila. Assim, estes resultados permitiram a identificação da substância **3** como a petunidina 3-*O*-glicosídeo, com um substituinte metoxila ligado ao C-3' do anel B.

Uma observação semelhante foi possível para a substância **5**, com um aumento ainda maior quanto ao tempo de retenção e à massa exata. Assim, a substância **5** (t_R 13,4 min; λ_{max} 277,1 e 528,7 nm; m/z 493,1478 - $[M_5]^+$ e 331,1028 - $[M_5 - C_6H_{10}O_5]^+$) foi identificada como a malvidina 3-*O*-glicosídeo (oenina), com dois grupos metoxila em C-3' e C-5'.

Dois outros picos menores, correspondente as substâncias **2** e **4**, demonstraram espectros UV/Vis com deslocamento hipsocrômico na banda II localizada na região do Visível, sugerindo um padrão de substituição inferior para o anel B em comparação com antocianinas de anel B trissubstituído. A substância **2** (t_R 7,2 min) foi identificada como a cianidina 3-*O*-glicosídeo (crisantemina), uma das mais encontradas em alimentos, com espectro UV/Vis com bandas de absorção em λ_{max} 279,5 e 515,3 nm e íon molecular e produto de m/z , respectivamente, 449,1120 ($[M_2]^+$) e 287,0748 ($[M_2 - C_6H_{10}O_5]^+$). Quando comparado à substância **1**, observa-se que a substância **2** teve mais retenção na fase reversa e uma diferença de massa de 16 Da entre seus íons moleculares, sugerindo uma estrutura química com um grupo hidroxila a menos em relação a delfinidina 3-*O*-glicosídeo e, portanto, corroborando com a identificação como cianidina 3-*O*-glicosídeo.

Este raciocínio comparativo dos dados cromatográficos e espectroscópicos também foi empregado para a identificação da substância **4** (t_R 11,3 min e λ_{max} 267,6 e 512,8 nm), que não foi isolado devido à sua menor intensidade, sugerindo que esta estrutura como a peonidina 3-*O*-glicosídeo, uma antocianina de anel B dissustituída com um grupo hidroxila e um grupo metoxila. Além disso, todas as estruturas químicas (Figura 119) foram confirmadas por comparação dos dados experimentais com os padrões analíticos das antocianinas. A Tabela 26 resume todos os dados experimentais obtidos, com o mecanismo de fragmentação proposto para as antocianinas disponibilizado na Figura 120, através do mesmo mecanismo de rearranjo 1,3 de hidrogênio justificado para os flavonóis glicosilados no Capítulo II.

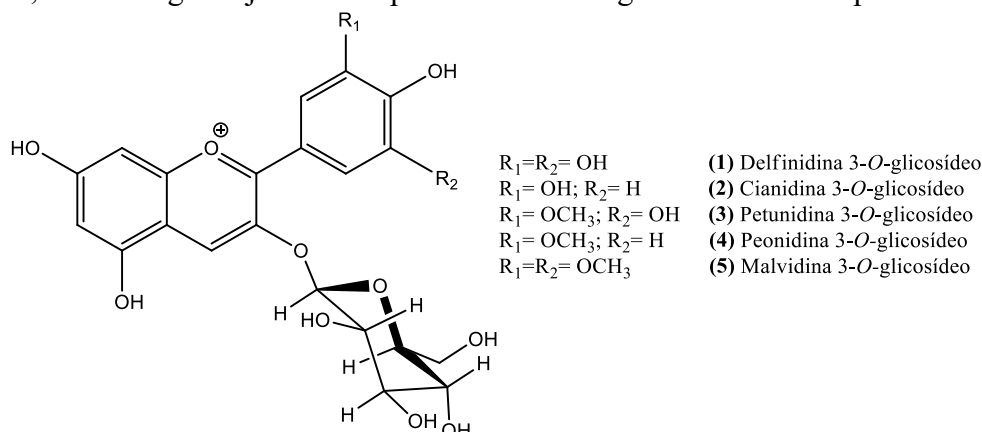


Figura 119. Estruturas químicas das antocianinas identificadas em frutos de *M. eriopus*.

Tabela 26. Antocianinas identificadas nos frutos de *M. eriopus*.

n	Substância (Fórmula Molecular)	t _R (min)	UV (máx)	MM (g/mol)	[M] ⁺	Erro (ppm)	EM-EM
1	Delfinidina 3- <i>O</i> -glicosídeo Mirtillina (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂ ⁺)	5,3	275,9/ 523,8	465	465,1016	2,15	303,0469 [M - C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺
2	Cianidina 3- <i>O</i> -glicosídeo Crisantemina (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ ⁺)	7,2	279,5/ 515,3	449	449,1120	9,57	287,0748 [M - C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺
3	Petunidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂ ⁺)	8,9	275,9/ 526,2	479	479,1146	7,51	317,0702 [M - C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺
4	Peonidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁ ⁺)	11,3	267,6/ 512,8	463	-	-	-
5	Malvidina 3- <i>O</i> -glicosídeo Oenina (C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂ ⁺)	13,4	277,1/ 528,7	493	493,1478	> 10	331,1028 [M - C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺

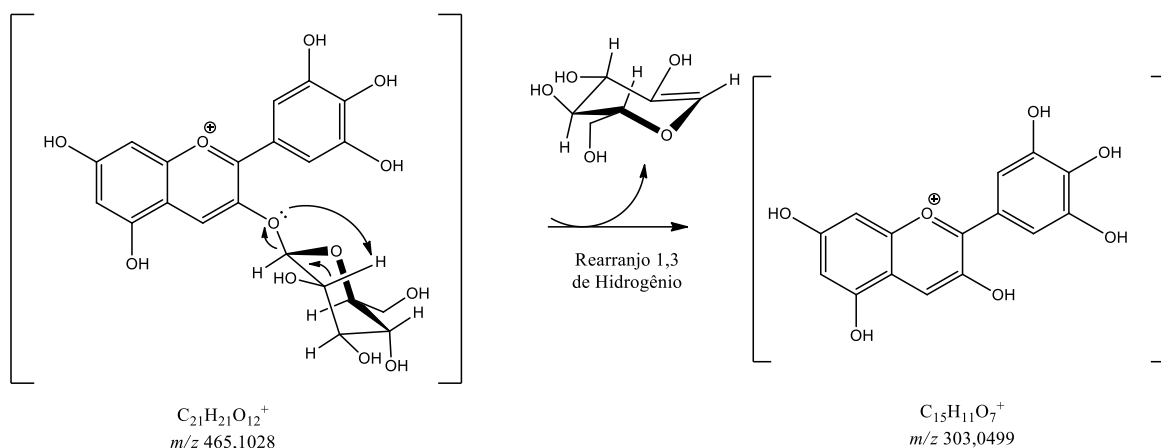


Figura 120. Mecanismo de fragmentação proposto para a delfinidina 3-*O*-glicosídeo (1), similar para as demais antocianinas glicosiladas.

Os frutos de *M. eriopus* apresentaram um perfil diversificado de antocianinas, com cinco das seis antocianidinas mais comuns encontradas em plantas superiores. Estes frutos podem ser classificados por esta diversidade e incluídas no grupo de frutas determinadas pelo açúcar (*sugar-determined fruit*) devido à presença do mesmo tipo de carboidrato (glicose) ligado a diferentes antocianidinas (WU & PRIOR, 2005). Um perfil de antocianinas similar foi obtido por GOUVEA et al. (2014) com os extratos de uva-preta (*Vitis sp.*). Por tal razão, foi realizada a caracterização por CLAE-DAD de uvas roxas (*Vitis sp.*) obtidas comercialmente. A comparação direta dos cromatogramas (Figura 121) indica a similaridade, porém, para os frutos de *M. eriopus*, foi observada a maior intensidade das antocianinas com anel B trissubstituído, sugerindo um possível padrão de biossíntese favorecido. Outros *sugar-determined fruit* conhecidos são mirtilo, cranberry, cereja, acerola e jamelão (WU; PRIOR, 2005; BRITO et al., 2007).

Quanto ao teor total de antocianinas, o produto PLME apresentou 1878,14 mg ci-3-*O*-glic eqv/100 g base úmida, que foi 2 a 3 vezes maior do que outros pós de cascas de frutas publicadas como jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O.Berg - 504,39 mg/100 g) e jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels - 878,56 mg/100 g) (SANTIAGO et al., 2016, 2018). Apenas o pó de grumixama obtido por liofilização (*Eugenia brasiliensis* Lam - 4837,2 mg/100 g) apresentou nível de antocianina superior ao PLME (NASCIMENTO et al., 2017).

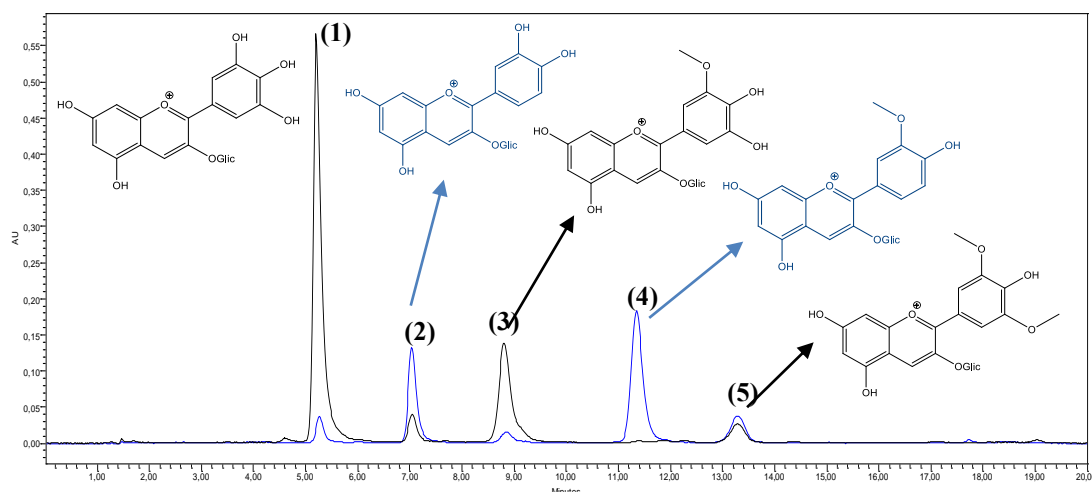


Figura 121. Comparação entre os cromatogramas por CLAE-DAD do PLME (em preto) e das uvas roxas (em azul): delphinidina 3-*O*-glicosídeo (1), cianidina 3-*O*-glicosídeo (2), petunidina 3-*O*-glicosídeo (3), peonidina 3-*O*-glicosídeo (4), e malvidina 3-*O*-glicosídeo (5).

Em relação ao perfil de antocianinas, a delphinidina 3-*O*-glicosídeo ($1256,09 \pm 100,66$ mg ci-3-glic eqv/100 g base úmida) e a petunidina 3-*O*-glicosídeo ($462,29 \pm 42,67$ mg/100 g) apresentaram teores majoritários e destacados em relação às demais. Outras antocianinas incluíram $66,37 \pm 8,36$ mg/100 g de cianidina-3-*O*-glicosídeo e $93,40 \pm 5,98$ mg/100 g de malvidina-3-*O*-glicosídeo. Estes resultados demonstraram que os frutos de *M. eriopus* podem ser considerados uma nova fonte de antocianinas glicosiladas.

3.2. Outros Resultados para a Caracterização do PLME

A metodologia de análise de substâncias fenólicas por CLAE-DAD já empregada nesta tese foi aplicada para o PLME. As antocianinas delphinidina 3-*O*-glicosídeo, cianidina 3-*O*-glicosídeo e petunidina 3-*O*-glicosídeo também foram detectadas nesta nova análise. Além destas, outras duas substâncias foram identificadas em comparação com os padrões analíticos. A substância 6 apresentou um baixo tempo de retenção (t_R 2,1 min) e um espectro de UV/Vis com uma única banda de absorção de $\lambda_{m\acute{a}x}$ 265,5 nm, sendo identificado como o ácido gálico. A substância 7 apresentou um maior tempo de retenção (t_R 19,8 min) e duas bandas de absorção no espectro UV/Vis ($\lambda_{m\acute{a}x}$ 252,5 nm e 362,4 nm), similar aos flavonóis quercetina e kaempferol. Esta substância foi identificada como o flavonol não-glicosilado miricetina. O padrão de substituição do anel B é similar as antocianinas majoritárias, contribuindo para a sugestão da biossíntese favorecida de flavonoides com o anel B trissubstituído. Outros picos também demonstraram espectros característicos de flavonóis, com duas bandas de absorção em 250-270 e 340-370 nm. As Figura 122 e Figura 123 apresentam, respectivamente, as estruturas químicas das duas substâncias e o cromatograma obtido por CLAE-DAD.

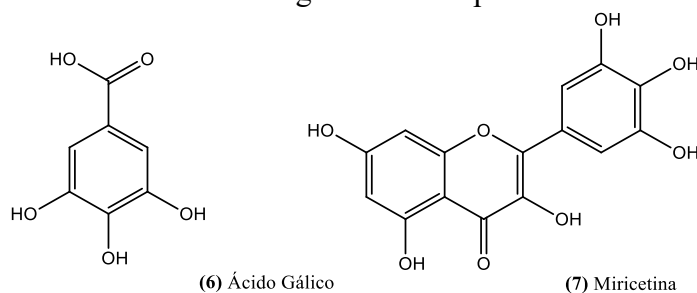


Figura 122. Estruturas químicas das outras substâncias fenólicas identificadas no PLME.

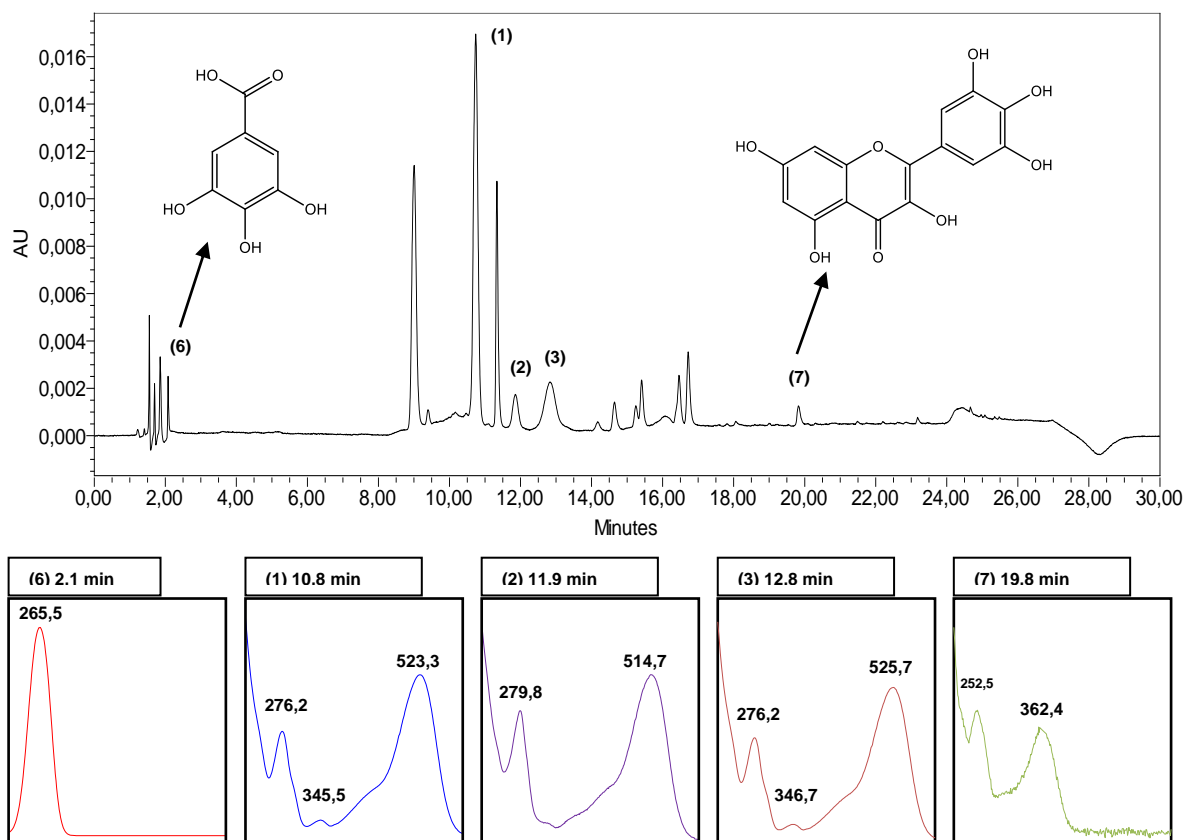


Figura 123. Cromatograma de substâncias fenólicas obtidas por CLAE-DAD, com a identificação do ácido gálico (6), delphinidina 3-O-glicosídeo (1), cianidina 3-O-glicosídeo (2), petunidina 3-O-glicosídeo (3), e miricetina (7).

Experimentos *in vitro* mostraram o potencial antioxidante do PLME, com CE_{50} de 2,419 $\mu\text{g/mL}$ para o ensaio do radical DPPH e 339 $\mu\text{mol Trolox/g}$ massa úmida para o ensaio $ABTS^{\cdot+}$. Estes valores foram muito inferiores aos dos compostos bioativos usados como controles positivos, como ácido ascórbico (CE_{50} 22 $\mu\text{g/mL}$ e 8007 $\mu\text{mol Trolox/g}$), quercetina (CE_{50} 155 $\mu\text{g/mL}$ e 5793 $\mu\text{mol Trolox/g}$), rutina (CE_{50} 339 $\mu\text{g/mL}$ e 1417 $\mu\text{mol Trolox/g}$) e curcumina (CE_{50} 417 $\mu\text{g/mL}$ e 2881 $\mu\text{mol Trolox/g}$). Porém, quando o resultado do PLME foi comparado com outros frutos, por exemplo, nos ensaios de $ABTS^{\cdot+}$, este demonstrou uma ótima resposta contra todas os frutos brasileiros não-convencionais relatados por RUFINO et al. (2010), como jamelão (29,7 $\mu\text{mol Trolox/g}$), jaboticaba (37,5 $\mu\text{mol Trolox/g}$), acerola - *Malpighia emarginata* (96,6 $\mu\text{mol Trolox/g}$) e camu-camu - *Myrciaria dubia* (153 $\mu\text{mol Trolox/g}$).

4 CONCLUSÕES

O estudo do Capítulo III conduziu a identificação de cinco antocianinas glicosiladas nos frutos de *M. eriopus* através de dois sistemas instrumentais *offline* (CLAE-DAD e IES-QTdV-EM). As antocianinas delphinidina 3-*O*-glicosídeo, cianidina 3-*O*-glicosídeo, petunidina 3-*O*-glicosídeo, peonidina 3-*O*-glicosídeo e malvidina 3-*O*-glicosídeo foram identificadas através de comparação com padrões analíticos.

Através da técnica de liofilização da parte comestível dos frutos, foi obtido um produto em pó com alta concentração total de antocianinas, com teores majoritários das antocianinas trissubstituídas no anel B delphinidina 3-*O*-glicosídeo e petunidina 3-*O*-glicosídeo. Este resultado foi superior a outros produtos em pó obtidos anteriormente pelo mesmo grupo de pesquisa.

Outras duas substâncias fenólicas (ácido gálico e miricetina) também foram identificadas. O pó liofilizado de frutos de *M. eriopus* apresentou um maior potencial antioxidante nos ensaios *in vitro* quando comparados à outros frutos brasileiros não-convencionais.

Este é o primeiro registro científico quanto à composição química deste fruto, contribuindo para o conhecimento de espécies ainda não exploradas da família Myrtaceae. Por tal razão, todo o estudo já foi publicado em um artigo científico na *Natural Product Research*, no presente ano (MARTINS et al., 2021).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho resultou em uma tese de doutorado com diversidade de informações quanto à espécies nativas e pouco estudadas da família Myrtaceae e localizadas na área de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro.

A análise de diferentes matrizes vegetais resultou na identificação de substâncias de diferentes classes metabólicas como terpenos (mono-, sesqui-, di- e triterpenos), ácidos fenólicos, flavonóis e flavanóis, taninos hidrolisáveis e condensados, antocianinas, entre outros. Esta diversidade estrutural é uma característica das espécies pertencentes a esta família botânica.

Toda a produção científica obtida está relatada no ANEXO II. É importante ressaltar que os resultados alcançados neste trabalho de doutorado proporcionam um maior conhecimento fitoquímico e, portanto, impactam positivamente na preservação destas espécies brasileiras nativas.

Como perspectiva futura, existe a possibilidade ainda da caracterização das substâncias de elevada massa molecular (superior a 1000 Da), em especial os taninos, por técnicas de alta resolução, como as análises nos sistemas CLAE-DAD-EM-EM, e os isolamentos destes taninos hidrolisáveis e condensados.

O estudo biológico de substâncias já isoladas neste trabalho deve ser enfatizado nos trabalhos posteriores, como os derivados galoilglicosiladas de quercetina, o sesquiterpeno 2-metóxi-clovan-9-ol e o derivado 9-acetil-2-metóxiclovano, entre outros.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFOLAYAN, M. et al. Phytochemical study of *Piliostigma thonningii*, a medicinal plant grown in Nigeria. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, n. 10, p. 2325–2330, 2018.
- AMIGOS JB. **05** - *Eugenia copacabanensis*. Disponível em: <<https://www.amigosjb.org.br/galeria/dezembro-2015/#jp-carousel-7603>>. Acesso em: 3 novembro de 2021.
- ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. DAS G. B.; SILVA, A. C. M. Constituents of the Essential Oil of *Myrciaria tenella* (DC.) O. Berg. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 1, p. 93–94, 2006.
- ANOUAR, E. H. et al. UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 79–89, 2012.
- APEL, M. A. et al. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p. 433–438, 2010.
- ARRUDA, R. DO C. DE O.; VICTÓRIO, C. P. Leaf Secretory Structure and Volatile Compounds of *Eugenia copacabanensis* Kiaersk. (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 5, p. 1–6, 2011.
- BARLOW, J. et al. The future of hyperdiverse tropical ecosystems. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. 517–526, 2018.
- BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of Essential Oils**. Third edition. | Boca Raton : CRC Press, [2020]: CRC Press, 2020.
- BENELLI, G.; PAVELA, R. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks—A systematic review. **Acta Tropica**, v. 179, p. 47–54, 2018.
- BERLINCK, R. G. S. et al. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, p. 706–710, 2017.
- BILER, M. et al. Quercetin and its analogues: optical and acido–basic properties. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 39, p. 26870–26879, 2017.
- BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224–233, 2014.
- BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil de 1988**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm>. Acesso em 01 de novembro de 2021.
- BRASIL. Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição Federal, o Artigo 1, a alínea j do Artigo 8, a alínea c do Artigo 10, o Artigo 15 e os §§ 3º e 4º do Artigo 16 da Convenção sobre Diversidade Biológica, promulgada pelo Decreto nº 2.519, de 16 de março de 1998; dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade; revoga a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001; e dá outras providências. **Diário**

Oficial da União: Brasília, DF, 20 de maio de 2015.

BRASIL. Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016. Regulamenta a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. **Diário Oficial da União:** Brasília, DF, 11 de maio de 2016.

BRAZ-FILHO, R. Química de Produtos Naturais: Importância, interdisciplinariedade, dificuldades e perspectiva. A peregrinação de um pacatubano. **Química Nova**, v. 17, n. 5, p. 405–445, 1994.

BRITO, E. S. et al. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9389–9394, 2007.

CACHET, T. et al. IOFI recommended practice for the use of predicted relative-response factors for the rapid quantification of volatile flavouring compounds by GC-FID. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 31, n. 3, p. 191–194, 2016.

CARNEVALE NETO, F. et al. Dereplication of Natural Products Using GC-TOF Mass Spectrometry: Improved Metabolite Identification by Spectral Deconvolution Ratio Analysis. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 3, n. 59, 2016.

CARVALHO, M. G. et al. Chemical constituents of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr (pau jacaré). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 3, p. 561–567, set. 2010.

CASCAES, M. M. et al. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 10, p. 23881–23904, 2015.

CASTRO, K. N. C. et al. Acaricidal activity of cashew nut shell liquid associated with essential oils from *Cordia verbenacea* and *Psidium guajava* on *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 4, p. 297–304, 2019.

CAVALCANTI, A. S. et al. Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 356–362, 2015.

CHEMICALBOOK. **Methyl palmitate(112-39-0) 1H NMR**. Disponível em: <https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_112-39-0_1HNMR.htm>. Acesso em: 13 de novembro de 2021a.

CHEMICALBOOK. **Methyl palmitate(112-39-0) 13C NMR**. Disponível em: <https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_112-39-0_13CNMR.htm>. Acesso em: 13 de novembro de 2021b.

COELHO, M. A. N. et al. Flora do estado do Rio de Janeiro: avanços no conhecimento da diversidade. **Rodriguésia**, v. 68, p. 1–11, 2017.

COLECIONANDO FRUTAS. **Bapuana (*Eugenia copacabanensis*)**. Disponível em: <<https://www.colecionandofrutas.com.br/eugeniacopacabanensis.htm>>. Acesso em: 3 de

novembro de 2021.

COLLADO, I. G. et al. The Biotransformation of Some Clovanes by *Botrytis cinerea*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 11, p. 1348–1351, 1998.

COLLADO, I. G.; HANSON, J. R.; MACÍAS-SÁNCHEZ, A. J. The cleavage of caryophyllene oxide catalysed by tetracyanoethylene. **Tetrahedron**, v. 52, n. 23, p. 7961–7972, 1996.

CONAMA. Resolução CONAMA nº 303, de 20 de março de 2002. Dispõe sobre parâmetros, definições e limites de Áreas de Preservação Permanente. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 13 de maio de 2002.

COUNCIL OF EUROPE. **Guidance on essential oils in cosmetic products**. European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, 2016.

CRUZ A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47–52, 2004.

D'AMICO, E. et al. Identification of a Bioactive Compound from *Myrcianthes cysplatensis*. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, n. 25, p. 18–20, 2011.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach**. 3 ed. [s.l.]: John Wiley & Sons, 2009.

DRUMMOND, R. O. et al. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of economic entomology**, v. 66, n. 1, p. 130–133, fev. 1973.

E-JARDIM.COM. **Frutíferas - Eugenia copacabanensis/princesinha-de-copacabana**. Disponível em: <http://www.e-jardim.com/produto_completo.asp?IDProduto=57#>. Acesso em: 3 de novembro de 2021.

EISENREICH, W.; ROHDICH, F.; BACHER, A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. **Trends Plant Sci**, v. 6, n. 2, p. 78–84, 2001.

ETTRE, L. S. Nomenclature for Chromatography (IUPAC Recommendations 1993). **Pure and Applied Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 819–872, 1993.

FAURE, R.; GAYDOU, E. M.; RAKOTONIRAINY, O. Two-dimensional nuclear magnetic resonance of sesquiterpenes. Part 2. Total assignment of (+)-aromadendrene, (+)-longicyclene, and γ -gurjunene by the two-dimensional INADEQUATE method. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 3, p. 341–344, 1987.

FLORA DIGITAL/UFSC. **Myrciaria tenella**. Disponível em: <https://floradigital.ufsc.br/open_sp.php?img=22054>. Acesso em: 14 de setembro de 2021.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil, volume 1**. Rio de Janeiro, Brasil: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010a. v. 1.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil, volume 2**. Rio de Janeiro, Brasil: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010b. v. 2.

FRITSCHÉ, S.; WANG, X.; JUNG, C. Recent Advances in our Understanding of Tocopherol Biosynthesis in Plants: An Overview of Key Genes, Functions, and Breeding of Vitamin E Improved Crops. **Antioxidants (Basel)**, v. 6, n. 4, 2017.

GADKARI, P. V.; BALARAMAN, M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 122–138, 2015.

GAUDÊNCIO, S. P.; PEREIRA, F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 6, p. 779–810, 2015.

GONÇALVES, G. M. et al. Essential oil of *Myrciaria tenella* (DC.) O. Berg: effects of distillation time on its chemical composition and evaluation of its anti-inflammatory and antinociceptive effects. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, n. 4, p. 394–409, 4 jul. 2021.

GOODGER, J. Q. D. et al. Foliar Essential Oil Glands of *Eucalyptus* Subgenus *Eucalyptus* (Myrtaceae) Are a Rich Source of Flavonoids and Related Non-Volatile Constituents. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0151432, 2016.

GOUVÊA, A. C. M. S. et al. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC. **Food Science and Technology**, v. 32, p. 43–46, 2012.

GOUVÊA, A. C. M. S. et al. Isolamento das antocianinas do epicarpo de uvas-pretas (*Vitis spp.*) por CLAE/DAD e sua identificação através do sistema CLUE-QTOF-ESI/EM/EM. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 6, n. 1/2, 2014.

GOUVÊA, A. C. M. S. et al. Identification and quantification of anthocyanins in fruits from *Neomitranthes obscura* (DC.) N. Silveira an endemic specie from Brazil by comparison of chromatographic methodologies. **Food Chemistry**, v. 185, p. 277–283, 2015.

HASSAN, A. et al. Identification of Five New Triterpenoids from Ethyl acetate Bark Extract of *Holoptelea integrifolia* (Roxb.) Planch by GC-MS. **Natural products chemistry & research**, v. 06, 2018.

HENNIA, A. et al. Composition, chemical variability and effect of distillation time on leaf and fruits essential oils of *Myrtus communis* from north western Algeria. **Journal of Essential Oil Research**, v. 28, n. 2, p. 146–156, 2016.

HERBÁRIO VIRTUAL - UFJF. *Myrcia eriopus* DC. Disponível em: <<https://www.ufjf.br/floraserranegra/herbario-virtual/angiospermas/myrtaceae/myrcia-eriopus-dc/>>. Acesso em: 2 de dezembro de 2021.

HMDB. [1H, 13C]-HSQC NMR Spectrum (2D, 600 MHz, 100%_DMSO, experimental) (HMDB0005794). Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/nmr_two_d/1961>. Acesso em: 1 de novembro de 2021.

HUBERT, J.; NUZILLARD, J.-M.; RENAULT, J.-H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 1, p. 55–95, 2017.

ISEMURA, M. Catechin in Human Health and Disease. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 3, p. 528, 1 fev. 2019.

ITIS, I. T. I. S. **Myrtaceae**. Disponível em: <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=27172#null>. Acesso em: 1 de novembro de 2021.

IUPAC, I. U. OF P. AND A. C.-. **Compendium of Chemical Terminology, 2 ed. (the “Gold Book”)**. Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.

JUNIOR, A. R. C. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 37, p. 477–482, 2014.

KHOO, H. E. et al. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & nutrition research**, v. 61, n. 1, p. 1361779, 13 ago. 2017.

LAGE, T. C. A. et al. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental parasitology**, v. 148, p. 24–29, jan. 2015.

LAHEY, F. N.; JONES, T. G. H. The constitution and synthesis of Conglomerone. **University of Queensland Papers**, v. 1, n. 12, 1939.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Campinas - SP: Editora Átomo, 2016.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508–536, 1997.

LEE, S.-G. α -Pinene and myrtenol: complete ¹H NMR assignment. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 311–312, 1 abr. 2002.

LIU, Y. et al. Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review. **Frontiers in chemistry**, v. 6, p. 52, 2018.

LORENZI M. T. C.; BACHER, L. B., H. . L. **Frutas no Brasil - Nativas e Exóticas (de consumo in natura)**. 1 ed. [s.l.]: Instituto Plantarum, 2015.

LUCAS, E. J.; BÜNGER, M. O. Myrtaceae in the Atlantic forest: their role as a ‘model’ group. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 9, p. 2165–2180, 2015.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1–19, 2008.

MALTESE, F.; VAN DER KOOY, F.; VERPOORTE, R. Solvent Derived Artifacts in Natural Products Chemistry. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 3, p. 447-454, 2009.

MARCHESE, C. Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept. **Global Ecology and Conservation**, v. 3, p. 297–309, 2015.

- MARCHESINI, P. et al. Activity of the extract of *Acmella oleracea* on immature stages of *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 147–150, 2018.
- MARCHESINI, P. et al. Acaricidal activity of *Acmella oleracea* (Asteraceae) extract against *Rhipicephalus microplus*: What is the influence of spilanthal? **Veterinary Parasitology**, v. 283, p. 109170, 2020.
- MARCHIORI, J. N. C. Estudo anatômico da madeira de *Myrciaria tenella* (DC.) Berg. **Ciência e Natura**, v. 9, p. 97–103, 1987.
- MARTINS, V. C. et al. *Myrcia eripopus* DC. (Myrtaceae) fruits, a new endemic Brazilian source of bioactive anthocyanins. **Natural Product Research**, p. 1–6, 5 maio 2021.
- MARTINS, V. C. et al. Determination of the Phytochemical Composition and Antioxidant Potential of *Eugenia copacabanensis* and *Myrciaria tenella* Leaves (Myrtaceae) Using a *Saccharomyces cerevisiae* Model. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 6, p. e2100054, 1 jun. 2021.
- MILMAN, B. L. General principles of identification by mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 69, p. 24–33, 2015.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - BRASIL. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade#:~:text=O Brasil ocupa quase metade,e três grandes ecossistemas marinhos.>>. Acesso em: 1 de novembro de 2021.
- MONTEIRO, C. M. et al. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology research**, v. 111, n. 3, p. 1295–1300, set. 2012.
- MONTEIRO, S. S. et al. Leaf Essential Oil from *Eugenia luschnathiana* and *Myrciaria tenella* (Myrtaceae) from Two Different Accesses in Southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 19, n. 7, p. 1675–1683, 2016.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.
- NAKAMURA, M. J. et al. Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 6, p. 1170–1175, 2010.
- NASCIMENTO, L. S. M. et al. Characterization of Bioactive Compounds in *Eugenia brasiliensis*, Lam. (Grumixama). **Nutrition and Food Technology: Open Access**, v. 3, n. 3, p. 1–7, 2017.
- NWANADE, C. F. et al. Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 81, n. 1, p. 1–35, 2020.
- PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, p. 106, 2009.
- PACHECO, S. et al. Preparation of high purity analytical standards using high performance liquid chromatography in analytical scale. **Analytical Chemistry - An Indian Journal**, v. 12, n. 5, p. 194–197, 2013.

PACHECO, S. et al. Microscale extraction method for HPLC carotenoid analysis in vegetable matrices. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 416–419, 2014.

PACHECO, S. **Melhoria e implantação de metodologias de análise de alimentos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, p. 147, 2014.

PACHECO, S. et al. História da Cromatografia Líquida. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1225–1271, 2015.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 5ª edição ed. [s.l.] Cengage, 2016.

PILON, A. C. et al. NuBBE(DB): an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 7215, 2017.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45–61, 2002.

PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO (RJ). **Prefeitura do Rio traz de volta a vegetação de restinga para as areias da praia de Copacabana**. Disponível em: <<https://prefeitura.rio/meio-ambiente/prefeitura-do-rio-traz-de-volta-a-vegetacao-de-restinga-para-as-areias-da-praia-de-copacabana/>>. Acesso em: 3 de novembro de 2021.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 1 maio 2005.

QUEIROZ, M. C. M. et al. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 9, n. 2, p. 87–100, 2015.

REDE AMAZÔNIA SUSTENTÁVEL. **Hiperdiversidade Tropical**. Disponível em: <<https://hiperdiversidade.ambiental.media/>>. Acesso em: 1 de novembro de 2021.

RESENDE, J. D. DE S. A. et al. Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 139–142, 2012.

REVERCHON, E.; PORTA, G. DELLA; SENATORE, F. Supercritical CO₂ Extraction and Fractionation of Lavender Essential Oil and Waxes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 6, p. 1654–1658, 1 jun. 1995.

RIBEIRO, A. R. C. et al. *Myrciaria tenella* (DC.) O. Berg (Myrtaceae) Leaves as a Source of Antioxidant Compounds. **Antioxidants**, v. 8, n. 8, p. 310, 2019.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington, EUA: ILSI Press, 2001.

ROSA, P. O.; ROMERO, R. O gênero *Myrcia* (Myrtaceae) nos campos rupestres de Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 63, p. 613–633, 2012.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico**, v. 127, p. 1–4, 2007.

RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SALEHI, B. et al. Therapeutic Potential of α - and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 738, 2019.

SANTIAGO, M. C. P. A. et al. Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.). **Comunicado Técnico (Embrapa)**, 162, 2010.

SANTIAGO, M. C. P. A. et al. Characterization of jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) fruit peel powder for use as natural colorant. **Fruits**, v. 71, p. 3–8, 2016.

SANTIAGO, M. C. P. A. et al. Jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg) peel powder produced by convective drying process: a rich anthocyanin product. **Fruits**, v. 73, n. 4, p. 201–208, 2018.

SANTIAGO, M. C. P. A. et al. Análise e caracterização de taninos condensados por Cromatografia Líquida. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 61446–61462, 2020.

SBPC. **Identificação de princípios ativos isolados de plantas medicinais – biopirataria, química de produtos naturais e biodiversidade fitoquímica de plantas brasileiras, por Raimundo Braz-Filho.** Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/57ra/programas/CONF_SIMP/textos/raimundobrazfilho.htm>. Acesso em: 01 de novembro de 2021.

SCHNEIDER, N. F. Z. et al. Estudo dos compostos voláteis e atividade antimicrobiana da *Myrciaria tenella* (cambuí). *Rev. Bras. Farm.*, v. 89, n. 2, p. 131-133, 2008.

SILVA, A. V. C. et al. Fruit and seed biometry of cambuí (*Myrciaria tenella* O. Berg). *Revista Agro@mbiente On-line*, v. 6, n. 3, 2012.

SILVA, C. M. et al. Sesquiterpenoids of *Senecio bonariensis* Hook. & Arn., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 87–92, mar. 2010.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 129–151, 2015.

SISA, M. et al. Photochemistry of flavonoids. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 8, p. 5196–5245, ago. 2010.

SOARES, A. DO V. A.; MELO, K. DA C. C.; SOUTO, R. N. Conhecimento tradicional e a biodiversidade brasileira: estratégia nacional de proteção intelectual. **e-tech - Tecnologias para Competitividade Industrial**, v. 14, n. 1, p. 75–88, 2021.

SOUZA, A. M. et al. Traditional Uses, Phytochemistry, and Antimicrobial Activities of *Eugenia* Species – A Review. **Planta Med**, v. 84, n. 17, p. 1232–1248, 2018.

SOUZA, M. C. **Myrtaceae**. Disponível em: <<http://florariojaneiro.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 1 de novembro de 2021.

SOUZA, M. C. et al. Subtribo Myrciinae O. Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 49–63, 2007.

SOUZA, M. C.; MORIM, M. P. Subtribos Eugeniinae O. Berg e Myrtinae O. Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 652–683, 2008.

SPECTRA BASE (WILEY). (-)-2(10)-pinene. Disponível em: <<https://spectrabase.com/spectrum/5JNaVN9pdpD>>. Acesso em: 1 de novembro de 2021.

STEFANELLO, M. É.; PASCOAL, A. C.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chem Biodivers**, v. 8, n. 1, p. 73–94, 2011.

STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Bulletin of Entomological Research**, v. 53, n. 3, p. 563–578, 1962.

SUN, T. et al. Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. **Molecular Plant**, v. 11, n. 1, p. 58–74, 2018.

THANG, P. T. et al. Preliminary study on the chemical constituents of the leaves of *Macaranga balansae* Gagnep. **Vietnam Journal of Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 632–636, 1 out. 2018.

TOKER, R.; GÖLÜKCÜ, M.; TOKGÖZ, H. Effects of distillation times on essential oil compositions of *Origanum minutiflorum* O. Schwarz Et. and P.H. Davis. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 4, p. 330–335, 2017.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616–622, jun. 2007.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1 suppl 1, p. 763–778, 16 abr. 2018.

VALTCHO, D. Z.; TESS, A.; VICKI, S. Distillation Time Changes Oregano Essential Oil Yields and Composition but Not the Antioxidant or Antimicrobial Activities. **HortScience horts**, v. 47, n. 6, p. 777–784, 2012.

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

VITEK, R. et al. Chemical constituents and antileukemic activity of *Eugenia dysenterica*. **Natural Product Research**, v. 31, n. 16, p. 1930–1934, 2017.

WU, S.-B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 148–159, 2013.

WU, X.; PRIOR, R. L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 7, p. 2589–2599, 2005.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. L. Carotenoids-Antioxidant Properties. **Antioxidants (Basel)**, v.

7, n. 2, p. 28, 2018.

ZHANG, Y. et al. Purification and Characterization of Flavonoids from the Leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and Correlation between Their Structure and Antioxidant Activity. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105725, 26 ago. 2014.

5 ANEXO I

LISTAGEM DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS POR CLAE-DAD

- Método empregado por CLAE-DAD em fase reversa, conforme Santiago et al. (2018), executado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters® Alliance e2695 acoplado com detector de arranjo de diodos, do Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

N	Substância	tr (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
<i>Derivados do Ácido Benzoico (C₆-C₁)</i>			
1	Ácido gálico	2,108	215,8/270,3
2	Ácido protocatecuico (3,4-dihidróxibenzoico)	3,743	259,6/294,1
3		Ácido <i>p</i> -hidróxibenzoico	6,268
4	Galato de metila	7,291	215,8/271,5
5	Ácido 2,5-dihidróxibenzoico	7,640	211,1/328,7
6	Ácido 4-hidróxifenilacético	8,488	221,7/275,0
7	Ácido 2,4-dihidróxibenzoico	9,220	256,0/294,1
8	Ácido vanílico (Ácido 4-hidróxi-3-metóxibenzoico)	9,256	218,6/259,6/291,7
9	Ácido <i>m</i> -hidróxibenzoico	9,552	235,9/296,5
10	Ácido siríngico	10,413	217,0/273,8
11	Ácido elágico	16,583	252,5/364,4
<i>Derivados do Ácido Cinâmico (C₆-C₃)</i>			
12	Ácido clorogênico (Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico)	9,633	217,0/239,5/325,1
13	Ácido cafeico	9,692	217,0/322,7
14	Ácido <i>p</i> -cumárico	12,187	226,5/309,6
15	Ácido ferúlico	14,524	217,0/234,7/322,7
16	Ácido <i>m</i> -cumárico	15,239	213,5/277,4
17	Ácido sinápico	15,423	235,9/322,7
18	Ácido 3-hidróxi-4-metóxicinâmico	16,240	217,0/239,5/322,7
19	Ácido 2,5-dimetóxibenzoico	17,807	256,0/291,7
20	Ácido <i>o</i> -cumárico	18,033	212,3/276,2/323,9
21	Ácido <i>p</i> -metóxibenzoico	18,340	256,0
22	Ácido 3,4-dicafeoilquínico	20,649	217,0/243,0/326,3
23	Ácido rosmarínico	20,709	328,7
24	Ácido <i>trans</i> -cinâmico	22,888	215,8/277,4
25	Ácido <i>p</i> -metóxicinâmico	23,450	226,5/308,4
26	Ácido <i>m</i> -metóxicinâmico	24,121	215,8/277,4
<i>Outros Ácidos Orgânicos</i>			
27	Ácido 4-hidróxifenilacético	8,488	221,7/275,0
28	Ácido L-(-)-fenilático	12,661	257,2
<i>Flavan-3-óis</i>			
29	(+)-catequina	8,672	278,6
30	(-)-epicatequina	11,100	278,6
<i>Flavonóis</i>			
31	Hiperosídeo (Quercetina 3- <i>O</i> -galactosídeo)	17,006	254,9/353,9

32	Rutina (Quercetina 3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -rhamnosil)-glicosídeo)	17,174	254,9/353,9
33	Isoquercitrina (Quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo)	17,512	254,9/352,7
34	Kaempferina ou Afzelina (Kaempferol 3- <i>O</i> -rhamnosídeo)	19,144	264,3/346,7
35	Quercitrina (Quercetina 3- <i>O</i> -rhamnosídeo)	19,573	254,9/347,9
36	Kaempferol 7- <i>O</i> -glicosídeo	19,739	264,3/363,4
37	Miricetina	19,801	252,5/364,4
38	Morina	21,394	252,5/352,7
39	Quercetina	22,845	254,9/364,4
40	Kaempferol	24,546	265,5/364,4
41	Isorhamnetina	24,713	253,7/364,4
42	Rhamnetina	25,080	254,9/364,4
43	Rhamnazina	25,700	254,9/364,4
<i>Flavanonas</i>			
44	Narirutina (Naringenina 7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -rhamnosil)-glicosídeo)	19,004	212,3/283,4/329,9
45	Naringina (Naringenina 7- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> -rhamnosil)-glicosídeo)	19,852	213,5/282,2/327,5
46	Hesperidina (Hesperitina 7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -rhamnosil)-glicosídeo)	20,606	283,4/327,5
47	Neohesperidina (Hesperitina 7- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> -rhamnosil)-glicosídeo)	21,197	283,4
48	Eridictiol	22,179	286,9
49	Naringenina	24,321	212,3/288,1
50	Hesperitina	24,666	286,9
<i>Flavonas</i>			
51	Luteolina	23,034	253,7/347,9
52	Apigenina	24,469	266,7/335,9
53	Tricina	24,673	350,3

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO DISCENTE• Artigos completos referentes a tese publicados em periódicos:

1. MARTINS, V. C.; FRANÇA, L. P.; FERREIRA, Y. S.; PIRES, D. C.; CARDOSO, B.S.; SANTIAGO, M. C. P. A.; PACHECO, S.; SOUZA, M. C.; RIGER, C. J.; GODOY, R. L. O.; DE CARVALHO, M. G. Determination of the Phytochemical Composition and Antioxidant Potential of *Eugenia copacabanensis* and *Myrciaria tenella* Leaves (Myrtaceae) Using a *Saccharomyces cerevisiae* Model. *Chemistry & Biodiversity*, v. 18, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100054>.
 2. GONÇALVES, G. M.; MARTINS, V. C.; DA COSTA, A. R. H.; FERNANDES, T. F. C.; PACHECO, S.; GAMA, P. E.; SOUZA, M. C.; GODOY, R. L. O.; LAUREANO-MELO, R.; CÔRTEZ, W. S.; DE CARVALHO, M. G.; MARINHO, B. G. Essential oil of *Myrciaria tenella* (DC.) O. Berg: effects of distillation time on its chemical composition and evaluation of its anti-inflammatory and antinociceptive effects. *Journal of Essential Oil Research*, v.33, n.4, p.394-409, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1899993>.
 3. MARTINS, V. C.; SANTIAGO, M. C. P. A.; PACHECO, S.; BORGUINI, R. G.; SOUZA, M. C.; CARVALHO, M. G.; GODOY, R. L. O. *Myrcia eriopus* DC. (Myrtaceae) fruits, a new endemic Brazilian source of bioactive anthocyanins. *Natural Products Research*, v.-, p.1-6, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1919106>.
- Outros artigos completos publicados em periódicos durante o período do doutorado:
1. MAZZA, K. E. L.; SANTIAGO, M. C. P. A.; PACHECO, S.; NASCIMENTO, L. S. M.; BRAGA, E. C. O.; MARTINS, V. C.; CUNHA, C. P.; GODOY, R. L. O.; BORGUINI, R. G. Determination of Bioactive Compounds in *Clusia fluminensis* Planch. & Triana fruit's arils. *Revista Virtual de Química*, v.11, p.3-17, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20190002>.
 2. MARTINS, V. C.; GODOY, R. L. O.; GOUVEA, A. C. M. S.; SANTIAGO, M. C. P. A.; BORGUINI, R. G.; BRAGA, E. C. O.; PACHECO, S.; NASCIMENTO, L. S. M. Fraud Investigation in Commercial Coffee by Chromatography. *Food Quality and Safety*, v.2, p.121-133, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy017>.
 3. SANTIAGO, M. C. P. A.; BORGUINI, R. G.; NASCIMENTO, L. S. M.; BRAGA, E. C. O.; MARTINS, V. C.; GOUVEA, A. C. M. S.; PEIXOTO, F. M.; PACHECO, S.; NOGUEIRA, R. I.; GODOY, R. L. O. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg) peel powder produced by convective drying process: a rich anthocyanin product. *Fruits*, v.73, p.201-208, 2018. DOI: <https://doi.org/10.17660/th2018/73.4.1>.
 4. NASCIMENTO, L. S. M.; SANTIAGO, M. C. P. A.; OLIVEIRA, E. M. M.; BORGUINI, R. G.; BRAGA, E. C. O.; MARTINS, V. C.; PACHECO, S.; SOUZA, M. C.; GODOY, R. L. O. Characterization of Bioactive Compounds in *Eugenia brasiliensis*, Lam. (Grumixama). *Nutrition and Food Technology: Open Access*, v.3, p.1-7, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.16966/2470-6086.146>.

• Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo):

1. MARCHESINI, P.; MARTINS, V. C.; FRANCA, L. P.; FERREIRA, Y. S.; DUQUE, L. S.; MONTEIRO, C. M. O.; SOUZA, M. C.; GODOY, R. L. O.; CARVALHO, M. G. Efeito acaricida de uma fração rica em 2-metóxiclovan-9-ol obtida de folhas de *E. copacabanensis* Kiaersk. (Myrtaceae). In: V Jornada Fluminense de Produtos Naturais, 2019, Rio de Janeiro (RJ). V Jornada Fluminense de Produtos Naturais, 2020.
2. MARTINS, V. C.; PACHECO, S.; SOUZA, M. C.; GAMA, P. E.; GODOY, R. L. O.; CARVALHO, M. G. Efeito do Tempo de Destilação sobre a Composição Química do Óleo Essencial das Folhas de *Myrciaria tenella* O. Berg (Myrtaceae). In: V Jornada Fluminense de Produtos Naturais, 2019, Rio de Janeiro (RJ). V Jornada Fluminense de Produtos Naturais, 2020.
3. FERREIRA, Y. S.; MARTINS, V. C.; FRANCA, L. P.; JESUS, M. S. C.; PACHECO, S.; SOUZA, M. C.; GODOY, R. L. O.; CARVALHO, M. G. Identificação por HPLC-DAD de substâncias fenólicas em folhas de *Myrciaria tenella* O. Berg (Myrtaceae). In: V Jornada Fluminense de Produtos Naturais, 2019, Rio de Janeiro (RJ). V Jornada Fluminense de Produtos Naturais, 2020.
4. FERREIRA, Y. S.; MARTINS, V. C.; FRANCA, L. P.; GODOY, R. L. O.; PACHECO, S.; SOUZA, M. C.; CARVALHO, M. G. GC-MS Dereplication of Non-polar Compounds of *Myrciaria tenella* O.Berg Leaves (Myrtaceae) In: 7th Brazilian Conference on Natural Products, 2019, Rio de Janeiro (RJ). 7th Brazilian Conference on Natural Products. , 2019.
5. FRANCA, L. P.; MARTINS, V. C.; FERREIRA, Y. S.; JESUS, M. S. C.; PACHECO, S.; SOUZA, M. C.; GODOY, R. L. O.; CARVALHO, M. G. Identification of Phenolic Compounds by HPLC-DAD of *Eugenia copacabanensis* Kiaersk. Leaves (Myrtaceae) In: 7th Brazilian Conference on Natural Products, 2019, Rio de Janeiro (RJ). 7th Brazilian Conference on Natural Products, 2019.
6. MARTINS, V. C.; FRANCA, L. P.; FERREIRA, Y. S.; PACHECO, S.; SOUZA, M. C.; GODOY, R. L. O.; CARVALHO, M. G. Non-polar Compounds of *Eugenia copacabanensis* Kiaerski Leaves (Myrtaceae) by GC-MS Dereplication and NMR spectroscopy In: 7th Brazilian Conference on Natural Products, 2019, Rio de Janeiro (RJ). 7th Brazilian Conference on Natural Products, 2019.
7. MARTINS, V. C.; CARVALHO, M. G.; GODOY, R. L. O.; FRANCA, L. P.; FERREIRA, Y. S.; PACHECO, S.; SOUZA, M. C. Volatile compounds from the leaves of two Myrtaceae species In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2019, Joinville - SC. Programa e Resumos - 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2019.
8. FRANCA, L. P.; FERREIRA, Y. S.; MARTINS, V. C.; SANTOS, F. R.; SOUZA, M. C.; PACHECO, S.; GODOY, R. L. O.; CARVALHO, M. G. Constituintes químicos voláteis de folhas de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk. (Myrtaceae) In: IV Jornada Fluminense de Produtos Naturais, 2018, Seropédica - RJ. Anais da IV Jornada Fluminense de Produtos Naturais, 2018.

9. FERREIRA, Y. S.; FRANCA, L. P.; MARTINS, V. C.; SANTOS, F. R.; SOUZA, M. C.; PACHECO, S.; GODOY, R. L. O.; CARVALHO, M. G. Constituintes químicos voláteis de folhas de *Myrciaria tenella* (DC.) O.Berg (Myrtaceae) In: IV Jornada Fluminense de Produtos Naturais, 2018, Seropédica - RJ. Anais da IV Jornada Fluminense de Produtos Naturais, 2018.
10. MARTINS, V. C.; GAMA, P. E.; GOUVEA, A. C. M. S.; SOUZA, M. C.; GODOY, R. L. O.; CARVALHO, M. G. Perfil de substâncias voláteis por MEFS-CG-EM dos frutos de *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. (Myrtaceae) In: IV Jornada Fluminense de Produtos Naturais, 2018, Seropédica - RJ. Anais da IV Jornada Fluminense de Produtos Naturais, 2018.

- Capítulos de livros publicados:

1. MARTINS, VÍCTOR DE CARVALHO; Couto, Cinthia de Carvalho; Freitas-Silva, Otniel; BORGUINI, RENATA GALHARDO; Santiago, Manuela Cristina Pessanha de Araújo; Gouvêa, Ana Cristina Miranda Senna; GODOY, RONOEL LUIZ DE OLIVEIRA Desenvolvimento de método por Clue-em-em para detecção de adulterantes em café torrado e moído. In: Ciência e Tecnologia dos Alimentos; Volume 7.1ª ed. Belo Horizonte - MG: Editora Poisson, 2020, v.7, p. 127-132. ISBN: 9786586127195, Home page: https://www.poisson.com.br/livros/alimentos/volume7/Alimentos_vol7.pdf.

- Apresentação de Palestras e Minicursos:

1. MARTINS, V. C. Óleos Essenciais – Uma Alternativa Eco-Friendly para o Meio Ambiente, 2021. (Extensão, Curso de curta duração ministrado) VI JQUIM, IFRJ – Campus Nilópolis, Nilópolis-RJ.
2. ECHEVARRIA, A.; OLIVEIRA, M. C. C.; MARTINS, V. C. Mesa Redonda 'Botânica Aplicada', 2019. (Conferência ou palestra) XXXVIII Jornada Fluminense de Botânica, ICBS-UFRRJ, Seropédica-RJ.
3. MARTINS, V. C.; SOUZA, M. A. A. Produção de óleos essenciais, 2020. (Extensão, Curso de curta duração ministrado). I EVIQ, IQ-UFRRJ, Seropédica-RJ.
4. MARTINS, V. C.; SOUZA, M. A. A. Desvendando os óleos essenciais e suas aplicações, 2019. (Extensão, Curso de curta duração ministrado). I EVIQ, IQ-UFRRJ, Seropédica-RJ.
5. MARTINS, V. C.; BRAGA, E. C. O.; MAZZA, K. E. L. Análise de Alimentos por CLAE, 2018. (Extensão, Curso de curta duração ministrado) XXIII SEMATEC, IFRJ – Campus Nilópolis, Nilópolis-RJ.
6. MARTINS, V. C.; GOMES, A. O. Princípios e Aplicações da Técnica de Espectrometria de Massas, 2018. (Extensão, Curso de curta duração ministrado) IV JQUIM, IFRJ – Campus Nilópolis, Nilópolis-RJ.
7. MARTINS, V. C. Princípios e Aplicações da Técnica de Espectrometria de Massas, 2018. (Conferência ou palestra) 1ª Semana Integranrio, Unigranrio Campus Duque de Caxias, Duque de Caxias-RJ.

• Orientações (co-orientações) e supervisões concluídas:

1. Diego Moura Gonçalves. Logística Integrada dos Insumos e das Vacinas contra COVID-19 Produzidas no Brasil. 2021. Curso (Engenharia Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Co-orientação junto ao professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho. Co-orientação junto à professora Dra. Fabiola Oliveira da Cunha.
2. Liliana Princisval França. Técnicas de Isolamento e Identificação de Metabólitos Secundários das Plantas e Contribuição ao Estudo Fitoquímico de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk.. 2021. Curso (Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Inst. financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Co-orientação junto ao professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho.
3. Yasmim da Silva Ferreira. Técnicas de Isolamento e Identificação de Metabólitos Secundários das Plantas e Contribuição ao Estudo Fitoquímico de *Myrciaria tenella* (DC.) O.Berg (Myrtaceae). 2021. Curso (Engenharia Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Inst. financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Co-orientação junto ao professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho.
4. Milene Gomes de Sousa. Utilização de Subprodutos da Uva. 2017. Curso (Farmácia) - Centro Universitário da Zona Oeste. Co-orientação junto à professora Dra. Catharina E. Fingolo.

• Participação em bancas de trabalho de conclusão:

1. RIGER, C. J.; SILVA, A. P. P.; MARTINS, V. C. Participação em banca de Bárbara de Souza Cardoso. ESTUDO DA CITOTOXICIDADE E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS BRUTOS DE *Myrciaria tenella* E *Eugenia copacabanensis* EM CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae*. 2021. (Química) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
2. CASTRO, R. N.; LIMA, M. E. F.; MARTINS, V. C. Participação em banca de Rafael Ferreira dos Santos. ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA GEOPRÓPOLIS DE ABELHA SEM FERRÃO URUÇU-AMARELA (*Melipona rufiventris*)., 2021. (Química) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
3. MARQUES, C. A.; MARTINS, VÍCTOR DE CARVALHO; NASCIMENTO, A. M. Participação em banca de Thaíse Reis Simões. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton - Ericaceae): Aspectos farmacognósticos do fruto, 2019. (Química) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro.
4. COSTA, L. C.; JORDAO, A. K.; MARTINS, V. C. Participação em banca de Elaine Macedo do Nascimento. Processo Fenton Heterogêneo no Tratamento de Efluentes - Uma revisão da Literatura, 2018. (Farmácia) Centro Universitário da Zona Oeste.
5. CARVALHO, M. G.; SUZART, L. R.; MARTINS, V. C. Participação em banca de Mariana Rodrigues da Silva. Técnicas de isolamento e identificação de metabólitos especiais de plantas e contribuição ao estudo de *Cespedesia spathulata* (Ochnaceae), 2018

(Química) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

- Organização de evento científico:

1. CASTRO, R. N.; CHAVES, D. S. A.; PINTO, H. R.; MARTINS, V. C. IV Jornada Fluminense de Produtos Naturais, 2018, UFRRJ, Seropédica-RJ.