



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO QUÍMICO E ISOLAMENTO DE FLAVONOIDES DE
Myrcia spp. OCORRENTES EM AMAZÔNIA DE TERRA FIRME

ADRIANA CAVALCANTE DE SOUZA LOPES

Manaus-AM
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ADRIANA CAVALCANTE DE SOUZA LOPES

ESTUDO QUÍMICO E ISOLAMENTO DE FLAVONOIDES *Myrcia*
spp. OCORRENTES EM AMAZÔNIA DE TERRA FIRME

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Batista Machado

Manaus-AM
2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L864e Lopes, Adriana Cavalcante de Souza
 Estudo químico e isolamento de flavonoides de Myrcia spp.
 ocorrentes em Amazônia de terra firme / Adriana Cavalcante de
 Souza Lopes. 2015
 126 f.: il. color; 31 cm.

 Orientador: Prof. Dr. Marcos Batista Machado
 Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do
 Amazonas.

 1. Myrcia spp.. 2. Flavonoides. 3. Hipoglicemiante. 4.
 Antioxidante. 5. Rmn. I. Machado, Prof. Dr. Marcos Batista II.
 Universidade Federal do Amazonas III. Título

**“ESTUDO QUÍMICO E ISOLAMENTO DE
FLAVONOIDES *Myrcia* spp. OCORRENTES EM
AMAZÔNIA DE TERRA FIRME”**

Adriana Cavalcante de Souza Lopes

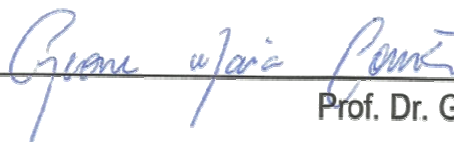
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada em 29 de Outubro de 2015

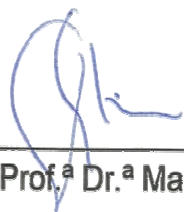
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcos Batista Machado
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof. Dr. Geone Maia Correa
(Membro UFAM)



Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Belém Pinheiro
(Membro UFAM)

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 29 de Outubro de 2015.

Dedico este trabalho a minha família, em especial
minha querida mãe e a meu amado esposo por todo
apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus da minha vida por Seu tão grande amor, por suprir todas as minhas necessidades e por permitir a conclusão deste sonho.

À minha mãe, Antônia Cavalcante, minha intercessora tão querida, tão constante, tão fiel...

Ao meu amado esposo Manoel Neto, por seu amor dedicado a mim, por sua compreensão e por todo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amados irmãos, Andréia e Alex pelos momentos alegres.

Ao meu querido Pai, Raimundo de Souza, por sempre incentivar-me nos estudos.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Batista Machado, por acreditar no meu potencial desde a iniciação científica, por todo incentivo e ajuda até nos momentos de enfermidade, por sua paciência e dedicação por tantos ensinamentos e pela oportunidade de realizar este sonho. Muito obrigada!

Ao professor Dr. Anderson Barison e a doutoranda Lívia, pelos espectros de RMN e ajuda na determinação estrutural em mistura.

Aos doutorandos Felipe e Richardson pela grande ajuda no fracionamento cromatográfico e na obtenção dos espectros de massas.

À Dr.^a Anália Duarte, pela ajuda na coleta do material botânico.

Ao Dr. Emerson Lima e ao farmacêutico Leonard, pelos ensaios hipoglicemiantes.

Aos professores do PPGQ, pelos ensinamentos.

Aos colegas do grupo NEQUIMA, Jacy, Sidney, Raimundo Jr., Andrezza, Elizanne, Jaqueline, Kidney, Carla, Rodolfo e Ayrton, pela ajuda em vários momentos.

Aos amigos desde a graduação, Elzalina, Sarah, Odaléia e Marcos pela Amizade e pelos momentos agradáveis.

Aos amigos e colegas que fiz durante o mestrado, Thaís Nobre, Fátima, Bruna, Felipe Moura, Danielle, Renan, Fabiana, Samirimi, Sídny e Orlando.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao CNPQ, à FAPEAM e à FINEP pelo suporte financeiro destinado ao desenvolvimento deste projeto.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

“Acaso alguém ensinará ciência a Deus? [...]”

Jó 21:22

RESUMO

Myrtaceae constitui-se uma das maiores e mais importantes famílias de Angiospermas da flora brasileira. Representantes desta família estão distribuídos nos diferentes biomas brasileiros. *Myrcia* constitui-se um dos maiores gêneros pertencentes à família Myrtaceae em número de espécies e estudos químicos e biológicos. Estudos químicos de *Myrcia* spp. revelaram a presença de substâncias do tipo terpênica, fenólica e flavonoídica, as quais são responsáveis por diversas atividades químicas e biológicas. Este trabalho objetivou descrever o estudo químico de *M. bracteata*, *M. citrifolia* e *M. fenestrata* coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus (AM), bem como avaliar os potenciais antioxidante e hipoglicemiante dos extratos, frações e substâncias isoladas. Os fracionamentos por CLAE do extrato em acetato de etila dos caules e das folhas de *M. bracteata* resultaram no isolamento de quatro flavonoides glicosilados. Esses foram caracterizados, principalmente, por RMN e EM, como sendo duas dihidroflavonas (naringenina-7-O- β -glicosídeo e eriodictiol-7-O- β -glicosídeo), um dihidroflavonol (astilbina) e um flavonol (quercitrina). As Análises de Variância dos resultados de capacidade sequestrante do radical livre DPPH• revelaram que os extratos não aquosos das três espécies de *Myrcia* apresentaram os menores valores de CS_{50%} (entre 37-51 %). Dentre esses extratos, os etanólicos de folhas e de caules de *M. bracteata* apresentaram sinais nos espectros de RMN de ¹H característicos de substâncias flavonoídicas. O extrato aquoso sequencial das folhas de *M. bracteata* (MBF $\pi\beta\alpha$) e a naringenina-7-O- β -glicosídeo apresentaram efeitos inibitórios da atividade enzimática da α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* em 20,60 \pm 0,08 e 23,27 \pm 1,86 %, respectivamente. O extrato aquoso direto das folhas de *M. fenestrata* (MFF α) apresentou resposta inibitória frente à enzima α -glicosidase de intestino de ratos, cujo valor é 55 \pm 3%. Portanto, a espécie *M. bracteata* evidenciou ser uma fonte de flavonoides com atividades antioxidante e hipoglicemiante, dos quais três ainda não foram descritos no gênero e na família. Portanto, este trabalho contribui com o conhecimento da química de produtos naturais de matrizes vegetais da Amazônia.

Palavras-chaves: *Myrcia bracteata*, *M. citrifolia*, *M. fenestrata*, antioxidante, hipoglicemiante, flavonoides, fenólicos, CLAE, EM, RMN

ABSTRACT

Myrtaceae constitutes one of the largest and most important Angiosperm families of the Brazil flora and is concentrated in a single tribe: Myrteae (three sub-tribes: Myrciinae, Eugeniinae, and Myrtinae). Species of this family have been distributed in almost all Brazilian biomes. The *Myrcia* spp. constitutes one of the largest genus belonging to Myrtaceae in number species and chemical and biological studies. These chemical studies of *Myrcia* spp. have revealed the presence of terpenes, phenolics, and flavonoids, which are responsible for several chemical and biological activities. This dissertation describes the chemical study of *Myrcia bracteata*, *M. citrifolia*, and *M. fenestrata* collected in the Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus (AM), as well as evaluates the antioxidant and hypoglycemic potentials of the extracts, fractions, and isolated compounds. The HPLC fractionation of the stems and leaves ethyl acetate extract from *Myrcia bracteata* had resulted in the isolation of four glycosylated flavonoids. These were characterized, particularly by NMR and MS, as two dihydroflavones (naringenin-7-*O*-glucoside and eriodictyol-7-*O*-glucoside), one dihydroflavonol (astilbin) and one flavanol (quercitrin). The ANOVA of the results sequestering ability of free radical DPPH• has revealed that the non-aqueous extracts of three species of *Myrcia* (except the leaves aqueous extract of *M. fenestrata*) have the lowest values of CS₅₀ (between 37-51%). Among these extracts, the leaves and stems ethanol extracts of *M. bracteata* have shown signs of the flavonoid hydrogens type in the ¹H NMR spectra. The sequential aqueous extract of *M. bracteata* and naringenin-7-*O*-glucoside have exhibit inhibitory effects of α-glucosidase enzyme activity by *Saccharomyces cerevisiae* of 20.60 ± 0.08 and 23.27 ± 1.86%, respectively. The leaves aqueous direct extract from *Myrcia fenestrata* was the only sample that showed inhibitory response against the α-glucosidase enzyme of the intestine of rats, whose value is 55 ± 3%. Therefore, the species *M. bracteata* shows a source of the antioxidant and hypoglycemic flavonoids, among which three were not yet described on genus and family. Therefore, this work has contributed to the knowledge of the Chemistry of Natural Products from plants of the Amazônia bioma.

Keywords: *Myrcia bracteata*, *M. citrifolia*, *M. fenestrata*, antioxidant, hypoglycemic, flavonoids, phenolics, HPLC, MS, NMR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem Landsat (2003) da região de Manaus e dos limites da Reserva Ducke.(font: Siglab/Inpa).....	20
Figura 2. <i>Myrcia bracteata</i> depositada em herbário do INPA. (Fonte: splink.org.br).....	31
Figura 3. <i>Myrcia citrifolia</i> depositada em herbário do INPA. (Fonte: splink.org.br).....	32
Figura 4. <i>Myrcia fenestrata</i> depositada em herbário do INPA. (Fonte: splink.org.br).....	33
Figura 5. Ilustração da reação entre o DPPH• e uma amostra antioxidante (potencialmente redutora). Imagem adaptada de (Boligon, Machado e Athayde, 2014) e (Liang e Kitts, 2014).	36
Figura 6. Mecanismo proposto para a clivagem da ligação glicosídica por α -glicosidases (Fonte: (Krasikov, Karelov e Firsov, 2001).....	37
Figura 7. Ilustração do Fracionamento por SPE do extrato acetato de etila dos caules de <i>Myrcia bracteata</i> (MBCp). Fonte: (Lanças, 2008).	43
Figura 8. Cromatograma da amostra MBC π _50%. Substância 2 isolada com tempo de retenção de 9,60, e substância 1 isolada com tempo de retenção de 10,80.	45
Figura 9. Cromatograma da amostra MBF π . Substância 3 isolada com tempo de retenção de 6,34, e substância 4 isolada com tempo de retenção de 9,25.	45
Figura 10. Gráfico das massas dos extratos de <i>Myrcia</i> spp.....	51
Figura 11. Biplot da análise por PCA dos extratos de folhas de <i>Myrcia</i> spp.....	51
Figura 12. Biplot da análise por PCA dos extratos não aquosos das folhas de <i>Myrcia</i> spp.....	52
Figura 13. Biplot da análise por PCA dos extratos de caules de <i>Myrcia</i> spp.....	53
Figura 14. Perfil de massas das replicatas do extrato MCCp no modo negativo.	54
Figura 15. Espectro de RMN ¹ H do extrato MCCp	55
Figura 16. Biplot da análise por PCA dos extratos de caules de <i>Myrcia</i> spp. excluindo o extrato MCCp.....	56
Figura 17. Estruturas moleculares das substâncias isoladas de <i>Myrcia bracteata</i>	58
Figura 18. Espectro de CLAE-DAD-EM do extrato MBC π _50%.	60
Figura 19. Espectro de CLAE-DAD-EM do extrato MBF π	61
Figura 20. Principais correlações observadas nos experimentos de gHMBC para 1.	63
Figura 21. Principais correlações observadas nos experimentos de gHMBC para 2.	65
Figura 22. Principais correlações observadas nos experimentos de gHMBC para 3.	67
Figura 23. Principais correlações observadas nos experimentos de gHMBC para 4.	69
Figura 24. Valores de CS ₅₀ dos extratos de <i>Myrcia</i> spp.....	71
Figura 25. Valores de CI ₅₀ dos extratos de <i>Myrcia</i> spp.....	72
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H do extrato MBC π	76
Figura 27. Espectros de Massas das triplicas do extrato MBC π	77
Figura 28. Espectro de RMN ¹ H do extrato MBF π	78
Figura 29. Perfil de Massas das triplicas do extrato MBF π	79
Figura 30. Espectro de Massas da fração MBC π _50%.	80
Figura 31. Espectro de RMN ¹³ C da substância 1.	81
Figura 32. gHSQC da substância 1.	82
Figura 33. Ampliações das correlações por gHSQC da substância 1.	83
Figura 34. Espectro de RMN ¹ H da substância 1.	84
Figura 35. Ampliações do espectro de RMN ¹ H da substância 1.....	85
Figura 36. gHMBC da substância 1.	86

Figura 37. Ampliações das correlações por gHMBC da substância 1.	87
Figura 38. Espectro de RMN ¹ H da substância 2.	88
Figura 39. Ampliações do espectro de RMN ¹ H da substância 2.	89
Figura 40. gHSQC da substância 2.	90
Figura 41. Ampliações das correlações por gHSQC da substância 2.	91
Figura 42. gHMBC da substância 2.	92
Figura 43. Ampliações das correlações por gHMBC da substância 2.	93
Figura 44. Espectro de RMN ¹ H da substância 3.	94
Figura 45. Ampliações do espectro de RMN ¹ H da substância 3.	95
Figura 46. gHSQC da substância 3.	96
Figura 47. Ampliações das correlações por gHSQC da substância 3.	97
Figura 48. gHMBC da substância 3.	98
Figura 49. Ampliações das correlações por gHMBC da substância 3.	99
Figura 50. Espectro de RMN ¹ H da substância 4.	100
Figura 51. Ampliações do espectro de RMN ¹ H da substância 4.	101
Figura 52. gHSQC da substância 4.	102
Figura 53. Ampliações das correlações de gHSQC da substância 4.	103
Figura 54. gHMBC da substância 4.	104
Figura 55. Ampliações das correlações de gHMBC da substância 4.	105
Figura 56. Espectro de RMN ¹ H do extrato etanólico sequenciado de <i>Myrcia bracteata</i> caule (MBCπβ).	106
Figura 57. Espectro de RMN ¹ H do extrato etanólico direto de <i>Myrcia bracteata</i> caule (MBCβ).	107
Figura 58. Espectro de RMN ¹ H do extrato etanólico sequenciado de <i>Myrcia bracteata</i> folhas (MBFπβ).	108
Figura 59. Espectro de RMN ¹ H do extrato etanólico direto de <i>Myrcia bracteata</i> folha (MBFβ). ...	109
Figura 60. Espectro de RMN ¹ H do extrato etanólico direto de <i>Myrcia citrifolia</i> folhas (MCFβ). ...	110
Figura 61. Espectro de RMN ¹ H do extrato etanólico sequenciado de <i>Myrcia citrifolia</i> folhas (MCFπβ).	111
Figura 62. Espectro de RMN ¹ H do extrato etanólico sequenciado de <i>Myrcia fenestrata</i> caules (MFCπβ).	112
Figura 63. Espectro de RMN ¹ H do extrato etanólico direto de <i>Myrcia fenestrata</i> caules (MFCβ). ..	113
Figura 64. Espectro de RMN ¹ H do extrato aquoso direto de <i>Myrcia fenestrata</i> folhas (MFFα). ...	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estruturas química de substâncias presentes em espécies pertencentes a diferentes gêneros de Myrtaceae	22
Quadro 2. Estruturas químicas e efeito biológico de substâncias presentes em espécies de <i>Myrcia</i> ...	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Extratos de <i>Myrcia</i> spp.	50
Tabela 2. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H de flavonoides (Bohm, 1999).	57
Tabela 3. Dados de RMN ¹³ C e ¹ H da substância 1 (14,1 T, DMSO- <i>d</i> ₆).	64
Tabela 4. Dados de RMN ¹³ C e ¹ H da substância 2 (14,1 T, DMSO- <i>d</i> ₆)	65
Tabela 5. Dados de RMN ¹³ C e ¹ H da substância 3 (14,1 T, DMSO- <i>d</i> ₆)	67
Tabela 6. Dados de RMN ¹³ C e ¹ H da substância 4 (14,1 T, DMSO- <i>d</i> ₆).	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

d = Dupleteo.

dd = Duplo dupleteo.

J = Constante de acoplamento.

m = multipleteo.

m/z = Relação massa/carga.

s = Sinpleteo.

dt = Duplo tripleteo.

t = Tripleteo.

dI = Dupleteo largo.

sl = sinpleteo largo.

q = quadrupleteo.

[*M - H*]⁻ = Molécula desprotonada.

ANOVA = Análise de Variância.

APCI = Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Ionização Química à Pressão Atmosférica).

CLAE-DAD-EM = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hinfenada aos detectores de Arranjo de Diodo e Espectrômetro de Massas.

DMSO-*d*₆ = Dimetilsulfoxido hexadeuterado

DPPH = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).

EM = Espectrometria de Massas.

*g*HSQC = Heteronuclear Single Quantum Correlation (Correlação Heteronuclear Única Quântica).

*g*HMBC = Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Correlação Heteronuclear de Múltipla Ligação).

PCA – Principal Components Analysis (Análise de componentes principais).

RMN = Ressonância Magnética Nuclear.

SPE – Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida).

UV = Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

δ = Deslocamento Químico

$[\alpha]_D$ = Rotação Óptica

tr = tempo de retenção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1. A AMAZÔNIA DE TERRA FIRME: RESERVA FLORESTAL ADOLPHO DUCKE (RFAD)	19
3.2. MYRTACEAE	20
3.3. GÊNERO <i>MYRCIA</i>	23
3.3.1. <i>A Química do gênero Myrcia</i>	23
3.3.2. <i>Myrcia bracteata</i> (Rich.) DC.....	30
3.3.3. <i>Myrcia citrifolia</i> (Rich.) DC.....	31
3.3.4. <i>Myrcia fenestrata</i> DC.....	32
3.4. INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS VEGETAIS	33
3.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	34
3.6. ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1. INSTRUMENTOS.....	38
4.2. MATERIAIS E REAGENTES	40
4.3. LOCALIZAÇÃO E COLETA DAS ESPÉCIES DE <i>MYRCIA</i>	40
4.4. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS ESPÉCIES DE <i>MYRCIA</i> SELECIONADAS	41
4.5. OBTENÇÃO DOS PERFIS ESPECTROMÉTRICOS POR EM E RMN DE ¹ H DOS EXTRATOS DE <i>MYRCIA</i> SPP.	43
4.6. METODOLOGIA DE ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE <i>MYRCIA BRACTEATA</i>	44
4.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DO RADICAL LIVRE DPPH•.....	46
4.8. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL HIPOGLICEMIANTE FRENTE A ENZIMA α -GLUCOSIDASE DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> DE INTESTINO DE RATOS.....	47
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1. ANÁLISE DO MÉTODO DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>MYRCIA</i> SPP.....	49
5.2. ANÁLISE DOS PERFIS QUÍMICOS DOS EXTRATOS DE <i>MYRCIA</i> SPP.	51
5.3. SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	58
5.4. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS DE <i>MYRCIA BRACTEATA</i>	59
5.5. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE 1 E 2.....	62
5.6. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE 3	66
5.7. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE 4.....	68
5.8. CONSIDERAÇÕES BIOSINTÉTICAS SOBRE 1-4	70
5.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE <i>MYRCIA</i> SPP.....	70
5.10. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HIPOGLICEMIANTE DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E DOS EXTRATOS DE <i>MYRCIA</i> SPP. FRENTE A ENZIMA α -GLUCOSIDASE DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> E DE INTESTINO DE RATOS.	71
6. CONCLUSÃO	73
7. REFERÊNCIAS	115

1. INTRODUÇÃO

O Brasil abriga cerca de 20% de toda biodiversidade mundial. Mais de 55.000 espécies de plantas compõem a flora brasileira, isto é um sexto do total das plantas registradas no planeta. O país conta com alguns dos biomas mais ricos em número de espécies vegetais – a Amazônia, a Mata Atlântica e o Cerrado. Os recursos vegetais brasileiros, além de fontes de alimentos, podem ser utilizados para obtenção de fibras, madeira, pigmentos, condimentos, aromas e princípios ativos para produção de medicamentos e cosméticos (Ambiente, 2012; Coradin, Siminski e Reis, 2011).

A floresta Amazônica responde por cerca de 25% das florestas remanescentes do planeta, e no Brasil ela ocupa quase a metade do território nacional, tendo grande valor estratégico e econômico para o país. Estudo realizado pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) aponta a existência de mais de 300 espécies de plantas amazônicas (nativas e introduzidas) todas catalogadas com potenciais fitoterápicos, aromáticos, cosméticos, medicinais e para decorações (Oliveira *et al.*, 2008; Amazônia, 2015).

Para a maioria da população Amazônica, as plantas medicinais servem como principal forma de cuidados a saúde, isto se deve em parte por preferência cultural e também por causa do difícil acesso e custo de produtos farmacêuticos alopáticos. Para um grande número de pessoas da Região, as plantas medicinais oferecem os únicos tratamentos disponíveis para vários tipos de doenças (Elisabetsky e Wannmacher, 1993).

Espécies do gênero *Myrcia*, pertencente à família Myrtaceae, têm sido frequentemente utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças gastrointestinais, infecciosas e hemorrágicas, além de serem empregadas como anti-inflamatórias e analgésicas. Segundo Cruz e Kaplan (2004), as partes mais usadas são as folhas, os caules e as cascas. Espécies de *Myrcia* são ainda popularmente utilizadas no tratamento do diabetes mellitus. Estudos fitoquímicos com a espécie *Myrcia multiflora*, conhecida no Brasil como “pedra-hume-caá”, descrevem a ocorrência de flavonoides glicosilados capazes de inibir a atividade enzimática da aldose redutase e α -glicosidase responsáveis pelas complicações do diabetes mellitus (Bnouham *et al.*, 2006; Yoshikawa *et al.*, 1998; Matsuda, Nishida e Yoshikawa, 2002).

Apesar de toda importância atribuída às espécies de *Myrcia*, principalmente para fins medicinais, seu potencial ainda é pouco explorado e um grande número de espécies permanece sem qualquer estudo químico ou biológico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a composição química das espécies *Myrcia bracteata* DC., *M. citrifolia* (Aubl.) DC. e *M. fenestrata* (Rich.) DC. (Myrtaceae) coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke (AM), bem como avaliar os potenciais antioxidante e hipoglicemiante dos extratos, frações e substâncias isoladas.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar os perfis químicos dos extratos obtidos utilizando a Espectrometria de Massas (EM) assistida por ferramentas quimiométricas (PCA e HCA), e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Isolar os constituintes químicos presentes nos extratos selecionados empregando métodos cromatográficos (CLAE - em modo semi-preparativo e preparativo);
- Determinar as estruturas químicas dos constituintes isolados a partir dos extratos das espécies de *Myrcia* empregando principalmente a EM e a RMN de 1D e 2D;
- Avaliar o potencial antioxidante e hipoglicemiante dos extratos em acetato de etila, etanólico e aquoso das espécies estudadas bem como das suas frações e substâncias isoladas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A Amazônia de Terra Firme: Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD)

A Amazônia ocupa aproximadamente seis milhões de quilômetros quadrados da América do Sul, sendo constituída por diferentes tipos de vegetação. Cerca de 65% dessa região é coberta por um tipo de floresta denominada floresta de terra firme, caracterizada principalmente pela elevada riqueza e diversidade de espécies (Lima Filho *et al.*, 2001). Segundo Oliveira e Amaral (2004) A floresta amazônica é o maior reservatório natural da diversidade vegetal do planeta.

Na cidade de Manaus (AM) no km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010) está localizada a Reserva Florestal Adolpho Ducke, (Figura 1, p.20) esta reserva tem 10.072 ha e sua vegetação principal é mata de terra firme (Ribeiro *et al.*, 1999). A RFAD serve como suporte para todos os segmentos das pesquisas do INPA e de outras instituições nacionais e internacionais, dentre elas a Universidade Federal do Amazonas (Inpa, 2015).

Ribeiro *et al.*, (1999) registraram na RFAD um total de 2.175 espécies de plantas vasculares distribuídas em mais de cem famílias em 1/5 da área total da reserva, onde a maioria pertence ao grupo das arbóreas representando 54% desse total. Dentre as famílias com representantes predominantemente arbóreos destacam-se: Leguminosae, Lauraceae, Sapotaceae, Chrysobalanaceae, Moraceae, Burseraceae, Lecythidaceae, Apocynaceae e Myristicaceae, Myrtaceae e Annonaceae. Souza (1999) identificou um total de 65 espécies de Myrtaceae distribuídas nos gêneros *Blepharocalyx* (1), *Myrciaria* (1), *Calycolpus* (3), *Calyptranthes* (7), *Eugenia* (28), *Marlierea* (3) e *Myrcia* (19).



Figura 1. Imagem Landsat (2003) da região de Manaus e dos limites da Reserva Ducke.(font: Siglab/Inpa).

3.2. Myrtaceae

Myrtaceae constitui-se uma das principais famílias de Angiospermas (The Plant List, 2013), sendo representada por aproximadamente 5.500 espécies pertencentes a 142 gêneros e 17 tribos (Wilson, 2011; Cruz *et al.*, 2013). Tem como centro de diversidade os trópicos úmidos, nomeadamente a América do Sul, Austrália e Ásia Tropical (Lucas *et al.*, 2007). Estudos recentes de análises moleculares identificaram a subdivisão das 17 tribos em duas subfamílias, a Psiloxylloideae de frutos capsulares (duas tribos) e a Myrtoideae de frutos carnosos (quinze tribos) (Wilson *et al.*, 2005) (Wilson, 2011).

Espécies dos gêneros pertencentes à Myrtaceae são comumente cultivadas como especiarias (*Pimenta* sp., *Syzygium* sp.), por fornecer madeira e sombra (*Eucalyptus* sp.), por seus óleos essenciais (*Eucalipto* sp., *Callistemon* sp. e *Metrosideros* sp.), e por seus frutos comestíveis (*Eugenia* sp., *Plinia* sp., *Syzygium* sp.) (Govaerts *et al.*, 2008).

No Brasil, estima-se a existência de 23 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies todas pertencentes à subfamília Myrtoideae, constituindo assim uma das maiores famílias botânicas da flora brasileira (Sobral *et al.*, 2015; Landrum e Kawasaki, 1997).

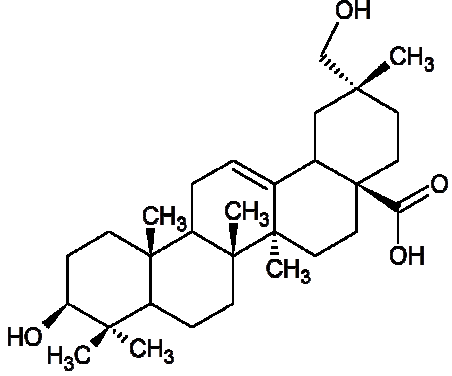
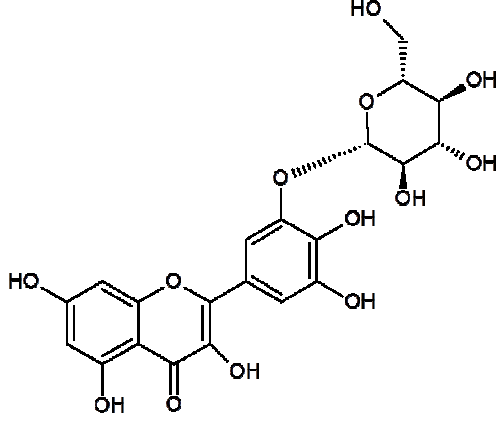
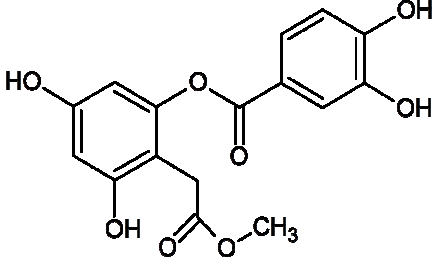
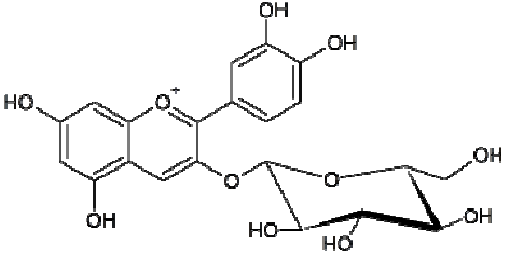
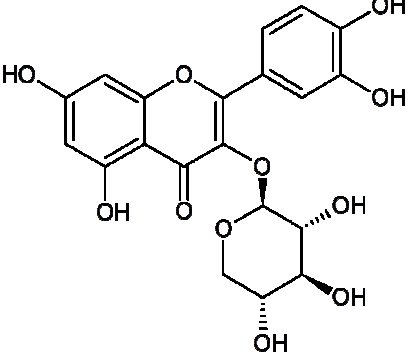
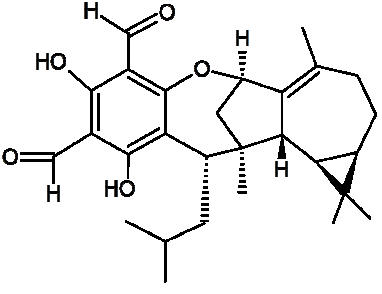
Algumas espécies de Myrtaceae conhecidas no Brasil são a goiabeira (*Psidium guajava*), a pitangueira (*Eugenia uniflora*), a pedra-ume-caá (*Myrcia* spp. e/ou *Eugenia puniceifolia*.), a jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*), o jambo (*Syzygium malaccense*) e o camu-camu (*Myrciaria dubia*), todas essas espécies produzem frutos carnosos e contribuem para a economia do país (Cruz e Kaplan, 2004; Sobral *et al.*, 2013).

Além de sua grande importância para o ecossistema e para a economia as espécies de Myrtaceae apresentam excelentes propriedades farmacológicas, destacando-se atividade antidiarréica (*Myrcia bracteata* e *Eugenia cauliflora*), no emprego do combate ao câncer (*Myrcia amazonica*) e no tratamento do diabetes (*Myrcia multiflora* e *Syzygium cumini*) (Cruz e Kaplan, 2004).

Quanto à composição Química dos óleos essenciais das espécies pertencentes à Myrtaceae, estudos realizados revelam a predominância das seguintes classes de compostos: monoterpenos/sesquiterpenos, compostos alifáticos e aromáticos (incluindo fenilpropanoides) (Stefanello *et al.*, 2010). Sesquiterpenos são os componentes principais da maioria dos óleos, seguido de monoterpenos (Padovan *et al.*, 2014).

A partir de espécies dessa família foram identificados e/ou isolados substâncias de natureza triterpênica, fenólicas, derivados do floroglucinol, cromenos, estilbeno, taninos e flavonoides (Zhu *et al.*, 2013; Stefanello *et al.*, 2010; Zoghbi *et al.*, 2003). O quadro 01 apresenta alguns exemplos dos principais compostos presentes em espécies de Myrtaceae.

Quadro 1. Estruturas químicas de substâncias presentes em espécies pertencentes a diferentes gêneros de Myrtaceae

<p>Folhas de <i>Eugenia brasiliensis</i></p>  <p>Ácido 29-hidroxi-oleanólico (Magina <i>et al.</i>, 2012)</p>	<p>Frutos de <i>Syzygium cumini</i></p>  <p>Miricetina 3- O –glucosídeo (Faria, Marques e Mercadante, 2011)</p>
<p>Frutos de <i>Myrciaria cauliflora</i></p>  <p>Jaboticabina (Reynertson <i>et al.</i>, 2006)</p>	<p>Frutos de <i>Neomitrantes obscura</i></p>  <p>Cianidina 3-O-glucoside (Gouvea <i>et al.</i>, 2015)</p>
<p>Folhas de <i>Psidium guajava</i></p>  <p>Quercetina-3-O-β-D-xilopiranosídeo (Zhu <i>et al.</i>, 2013)</p>	<p>Frutos de <i>Eucalyptus globulus</i></p>  <p>Eucalyptal D (Wang <i>et al.</i>, 2012)</p>

Dentre os gêneros pertencentes à Myrtaceae destaca-se o gênero *Myrcia*, pertencente à subfamília Myrtoideae, segundo maior gênero da família com cerca de 700 espécies distribuídas na América Central e América do Sul. (Landrum e Kawasaki, 1997; Lucas *et al.*, 2011; World Checklist of Selected Plant Families, 2015).

3.3. Gênero *Myrcia*

No Brasil, o gênero *Myrcia* está representado por 260 espécies não endêmicas distribuídas nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. (Sobral *et al.*, 2015). A Mata Atlântica brasileira é um dos centros de diversidade de espécies de *Myrcia* com aproximadamente 250 espécies (Stehmann *et al.*, 2009; Sobral *et al.*, 2015).

Em levantamento mais recente são listadas 55 nomes de espécies de *Myrcia* para a região Amazônica, e na Reserva Florestal Adolpho Ducke – Amazonas, Brasil, uma amostra representativa de floresta amazônica de terra firme, foram identificadas 19 espécies de *Myrcia* (Sobral *et al.*, 2015; Souza, 1999).

Espécies de *Myrcia* são bastante utilizadas na medicina popular como, hipoglicemiantes, antidiarréico, adstringente, diurético, antimicrobiano e antitumoral, entre outros (Cruz e Kaplan, 2004; Borges, Alves, Sampaio, *et al.*, 2013; Vareda, P. M. *et al.*, 2014). Destaca-se no gênero as espécies conhecidas popularmente como pedra-ume-caá (*Myrcia amazonica* DC., *M. citrifolia* (Aubl.) Urb., *M. guianensis* (Aubl.) DC., *M. multiflora* (Lam.) DC., *M. salicifolia* DC. e *M. speciosa* (Amshoff) McVaugh e *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) frequentemente usada no tratamento do diabetes bem como responsáveis por outras ações farmacológicas, tais como cicatrizante e diurética (Silva *et al.*, 2015). A seguir, são descritos estudos que apresentam a composição química e os potenciais biológicos de algumas espécies de *Myrcia* descritas na literatura.

3.3.1. A Química do gênero *Myrcia*

Os óleos essenciais dos galhos finos, folhas e flores de espécies de *Myrcia* são caracterizados por notável teor de sesquiterpenos cíclicos seguido de monoterpenos (Limberger *et al.*, 2004; Candido *et al.*, 2010; Stefanello *et al.*, 2010; Stefanello, Pascoal e Salvador, 2011; Sa *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2013; Santos, *et al.*, 2014), e possuem diversos potenciais biológicos tais como, anti-inflamatório, antisséptico (Andrade *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014), antibacteriano (Alarcón *et al.*, 2009; Silva, Uetanabaro e Lucchese, 2013) e larvicida (Lima *et al.*, 2011).

As folhas e galhos finos de três espécies de *Myrcia* ocorrentes na Amazônia (*M. bracteata*; *M. cuprea* e *M. sylvatica*) foram hidrodestilados e analisados por CG-MS, os resultados evidenciaram 106 compostos, dos quais sete são majoritários, (*E*)-nerolidol e (*E*)- β -farneseno em *M. bracteata*, myrceno e β -cariofileno em *M. cuprea* e espatulenol, *cis*-calameneno e selin-11-en-4- α -ol em *M. sylvatica* (Zoghbi *et al.*, 2003).

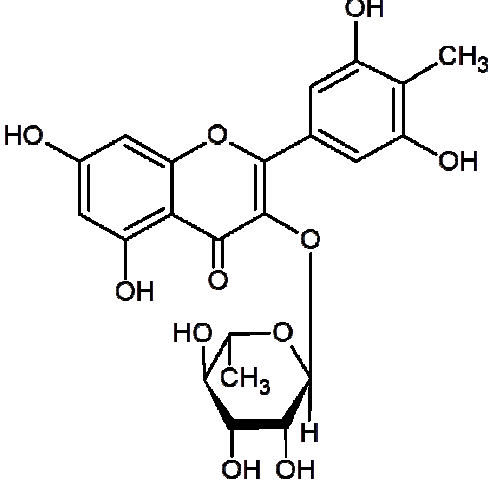
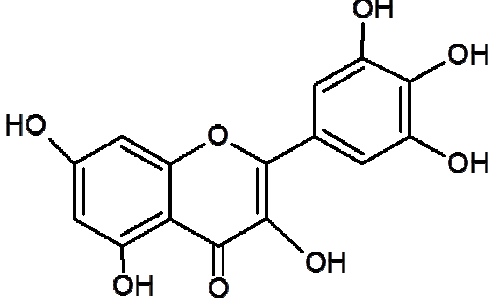
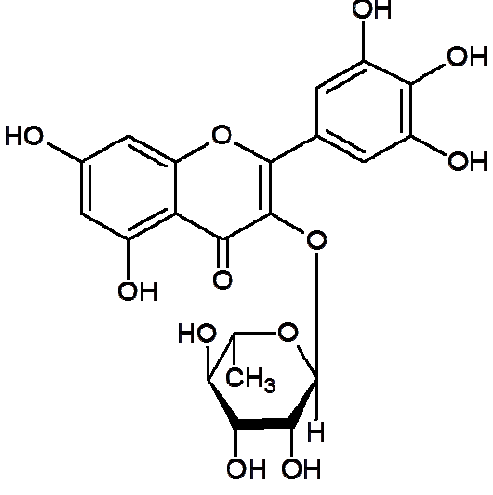
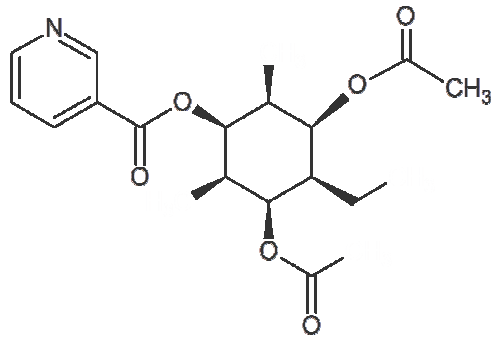
Os principais constituintes químicos fixos encontrados em espécies de *Myrcia* reportados na literatura são substâncias fenólicas principalmente da classe dos flavonoides. No estudo realizado por (Moresco *et al.*, 2014) o flavonoide miricitrina é o principal constituinte dos extratos acetato de etila das espécies *M. splendens* e *M. palustris*. O estudo químico das folhas de *Myrcia multiflora*, utilizada como medicinal no tratamento do diabetes (Patel *et al.*, 2012), proporcionou a elucidação e caracterização de cinco flavonas glicosiladas miriciacitrina I-V e dois glicosídeos de acetofenona (mirciafenonas A e B), ver quadro 2, foram isolados ainda desta matriz flavonoides tais como miricitrina, quercitrina e guaijaverina. Os resultados do estudo farmacológico mostraram que os flavonoides miriciacitrina I-V apresentam potencial hipoglicemiante por inibição a atividade enzimática da aldose redutase (Yoshikawa *et al.*, 1998; Matsuda *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2002).

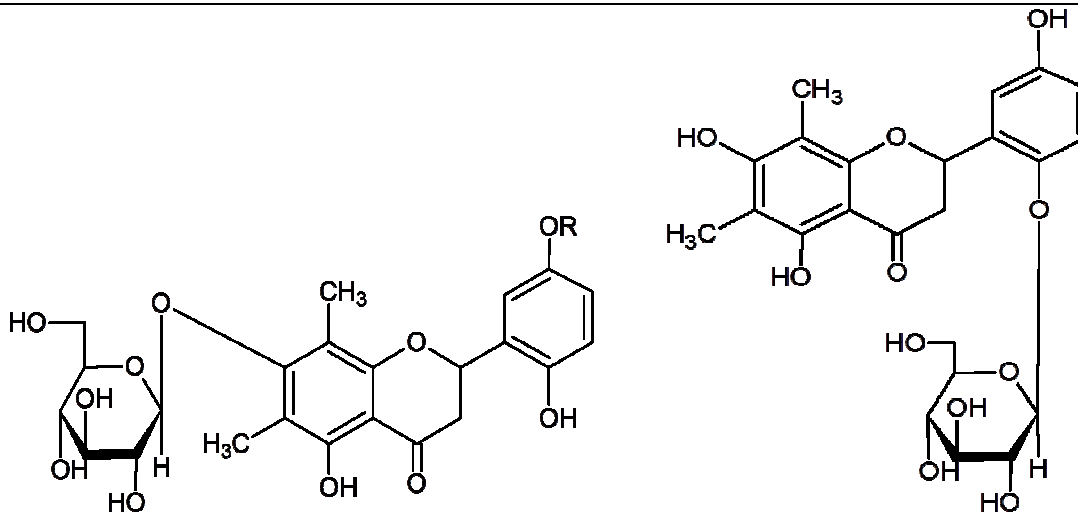
Como resultados dos estudos de avaliação dos perfis qualitativos e quantitativos dos extratos de folhas de *Myrcia bella*, realizados por Saldanha e colaboradores (2013), foram identificados onze flavonoides-*O*-glicosilados e seis derivados de flavonoides acilados de miricetina e quercetina, juntamente com dois glicosídeos de kaempferol e ácidos fenólicos como o ácido caféico, galato de etila, ácido gálico e ácido quínico. Foram caracterizados neste estudo 24 constituintes (Saldanha *et al.*, 2013). O extrato hidroalcoólico de folhas dessa mesma espécie apresentou como principais constituintes, agliconas de flavonoides e flavonoide-*O*-glicosídeos derivados de quercetina e miricetina, o qual foi capaz de reduzir a glicemia em camundongos diabéticos. Os resultados deste trabalho evidenciam o potencial hipoglicemiante do extrato hidroalcoólico de folhas de *Myrcia bella* (Vareda *et al.*, 2012; Vareda, P. M. P. *et al.*, 2014).

A partição aquosa do extrato metanólico a 70% de *M. uniflora* foi capaz de inibir a atividade *in vitro* da enzima peroxidase (TPO) em 50%, e a partir desse extrato foram isolados e identificados com auxílio de técnicas cromatográficas (CLAE e MPLC) e espectrométricas (UV e RMN ^1H e ^{13}C) os flavonoides: mearnsitrina e miricitrina, ver quadro 2 (Ferreira *et al.*, 2006).

A partir dos extratos de acetato de etila das folhas de *Myrcia tomentosa* foram isolados os flavonoides avicularina e juglanina, relatados pela primeira vez em espécies de Myrtaceae da região neotropical (Imatomi *et al.*, 2013). Cerqueira e colaboradores (2013) isolaram e identificaram um éster nicotínico chamado myrciaine a partir da espécie *Myrcia blanchetiana*, este foi obtido do extrato hexânico dos caules com auxílio de métodos cromatográficos e a partir das folhas por dióxido de carbono em estado supercrítico.

Quadro 2. Estruturas químicas e efeito biológico de substâncias presentes em espécies de *Myrcia*.

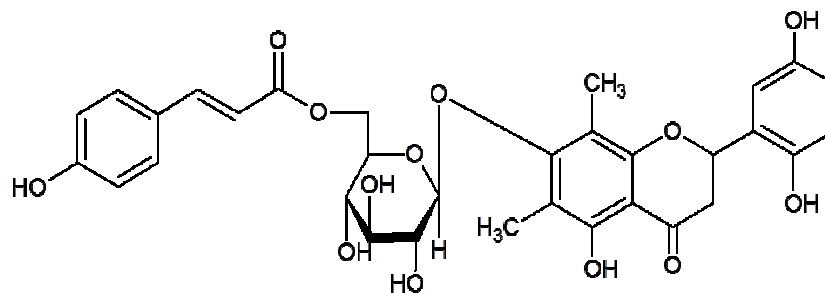
 <p style="text-align: center;">Mearnsitrina</p> <p>Presente nos ramos (folhas e caules) de <i>Myrcia uniflora</i>. Inibidora da enzima Tireoide peroxidase. (Ferreira <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p style="text-align: center;">Miricetina</p> <p>Presente nas folhas de <i>Myrcia lingua</i> Berg. Inibidora da catepsina B (Uma cisteína-protease envolvida na progressão tumoral). (Ramalho <i>et al.</i>, 2015)</p>
 <p style="text-align: center;">Miricitrina</p> <p>Miricitrina presente nos ramos (folhas e caules) de <i>Myrcia uniflora</i>, <i>M. splendens</i>, <i>M. multiflora</i> e <i>M. palustris</i>. Inibidora das enzimas Tireoide peroxidase, aldose redutase, e α-glicosidase. (Matsuda, Nishida e Yoshikawa, 2002; Ferreira <i>et al.</i>, 2006; Moresco <i>et al.</i>, 2014)</p>	 <p style="text-align: center;">Mirciaine</p> <p>Presente nas folhas e nos Caules de <i>Myrcia blanchetiana</i> Não apresenta atividade biológica descrita na literatura. (Cerqueira <i>et al.</i>, 2013)</p>



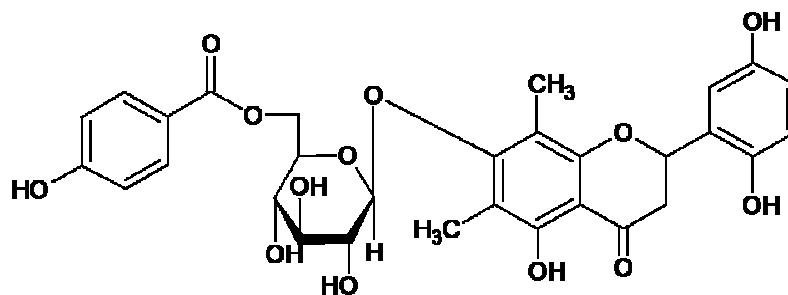
Mirciacitrina I: R = H

Mirciacitrina III

Mirciacitrina II: R = CH₃



Mirciacitrina IV

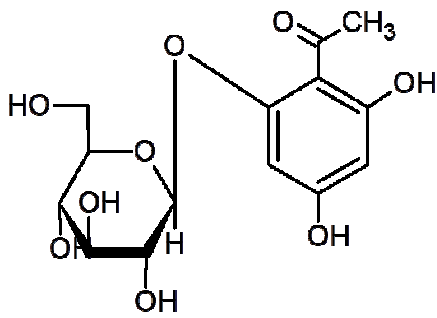


Myrciacitrina V

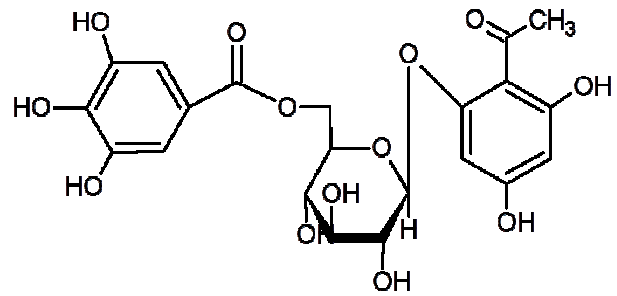
Presentes nas folhas de *Myrcia multiflora*.

Inibidoras da aldose redutase.

(Yoshikawa *et al.*, 1998; Matsuda, Nishida e Yoshikawa, 2002)

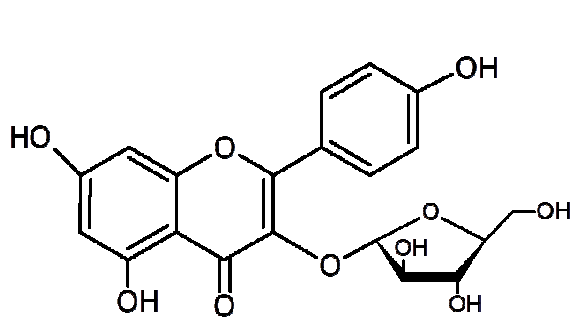


Myrciafenona A

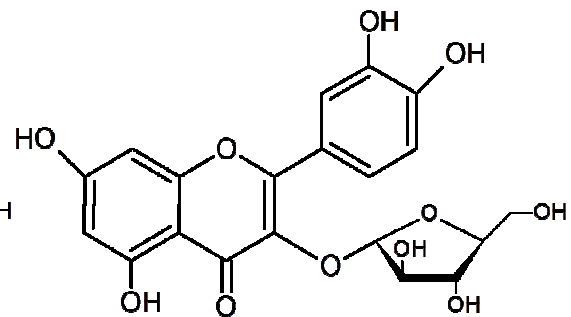


Myrciafenona B

Presentes nas folhas de *Myrcia Multiflora*.
 Inibidora da aldose redutase e α -glucosidase.
 (Yoshikawa *et al.*, 1998)

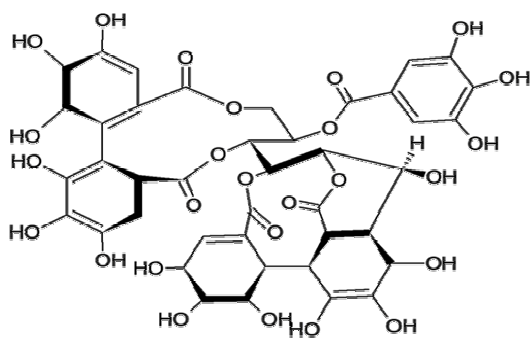


Avicularina

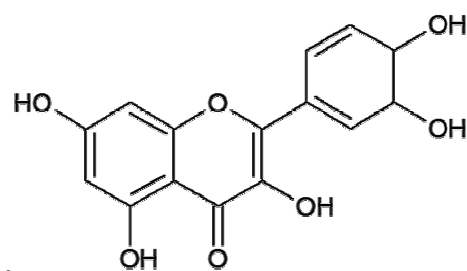


Juglanina

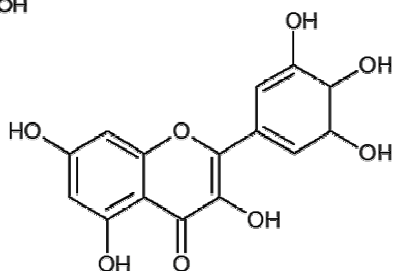
Presentes nas folhas de *Myrcia tomentosa* Glaz.
 Inibidoras da atividade de coleóptilo.
 (Imatomi *et al.*, 2013)



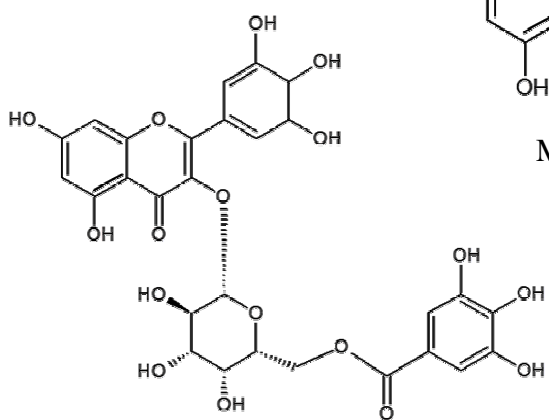
Casuarinina



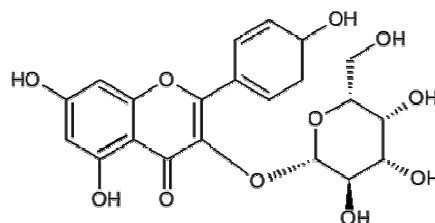
Quercetina



Miricetina



Miricetina 3-O- β -D-(6-galoi)
galactopiranosideo



Kaempferol 3-O- β -
galactopiranosideo

Presentes nas folhas de *Myrcia palustris*
Inibidoras da α -glicosidase.
(Wubshet *et al.*, 2015)

Apesar da importância deste gênero para a farmacologia e para a medicina popular, muitas espécies ainda não apresentam estudos químicos e biológicos. As espécies *Myrcia bracteata*, *Myrcia citrifolia* e *Myrcia fenestrada* selecionadas para este estudo, carecem de estudos objetivando a investigação dos seus constituintes químicos fixos e seus potenciais biológicos.

3.3.2. *Myrcia bracteata* (Rich.) DC.

Myrcia bracteata (Rich.) DC., conhecida popularmente por “murta cabeluda” é usada na medicina popular como antidesintérica e antisséptica (Stefanello *et al.*, (2011). Tem como sinonímia: *Eugenia hirsuta* Ruiz & Pav., *Myrcia hirtellifolia* Gleason e *Myrcia lanceolata* Cambess (Sobral *et al.*, 2015).

Zoghbi e colaboradores (2003) analisaram os óleos voláteis das folhas de *M. bracteata* (Rich.) e relataram a presença de (*E*)-nerolidol, (*E*)- β -farneseno, espatulenol, β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, *trans*-murola-3, 5-dieno, Cadina *trans*-1, 4-dieno, β -elemeno, α -bisabolol, β -selineno, α -selineno e δ -cadineno. Sendo (*E*)-nerolidol, (*E*)- β -farneseno e spatulenol os componentes majoritários.



PLANTAE DICOTYLEDON MYRTALES MYRTACEAE
Myrcia bracteata (Rich.) DC.. Det: Silva, M.F. da
 07/1966

Figura 2. *Myrcia bracteata* depositada em herbário do INPA. (Fonte: splink.org.br)

3.3.3. *Myrcia citrifolia* (Rich.) DC.

Myrcia citrifolia (Aubl.) Urb. é uma das espécies conhecida no Brasil como pedrame-caá (Silva *et al.*, 2015). Segundo Jorge e colaboradores (2000), *Myrcia citrifolia* é indicada no tratamento do diabetes. De acordo com Sobral e colaboradores (2015), essa espécie é nativa do Brasil com domínios fitogeográficos na Amazônia e no cerrado, com centro de distribuição geográfica nos Estados do Amazonas e Pará. Tem como sinónímia: *Myrtus citrifolia* Aubl., *Aulomyrcia acetosans* (Poir) O. Berg., *Aulomyrcia jacquiniana* O.Berg., *Eugenia acetosans* Poir., *Myrcia coriacea* DC., *Myrcia paniculata* (Jacq.) Krug & Urb., *Myrcia vernicosa* DC., *Myrtus acetosans* (Poir.) Spreng., *Myrtus coriacea* Vahl., *Myrtus cotinifolia* J.F.Gmel., *Myrtus marginata* (Pers.) Spreng., *Aulomyrcia citrifolia* (Aubl.) Amshoff (Sobral *et al.*, 2015).

A literatura relata apenas um estudo envolvendo a espécie *M. citrifolia* e suas sinónímias, este estudo apresenta o isolamento de β -amirina e eucaliptina (5 hidroxí-4',7-

dimetoxi-6,8-dimetilflavona) a partir dos extratos de éter de petróleo das folhas de *Myrcia citrifolia* (Aubl.) (Gottlieb *et al.*, 1972).



Figura 3. *Myrcia citrifolia* depositada em herbário do INPA. (Fonte: splink.org.br)

3.3.4. *Myrcia fenestrata* DC.

A espécie *Myrcia fenestrata* ocorre em floresta de terra firme, pode ser encontrada no Brasil nas regiões Norte (Amazonas, Pará) e Centro-oeste (Mato Grosso). O levantamento de sinônimas envolvendo a espécie *Myrcia fenestrata* não apresentou resultados (Sobral *et al.*, 2015).

O estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *M. fenestrata* realizado por Souza e Machado (2011) proporcionou o isolamento das substâncias espatulenol, sesquiterpeno previamente descrito em óleos essenciais de espécies do gênero *Myrcia* (Zoghbi *et al.*, 2003; Limberger *et al.*, 2004) e ácido betulínico, um triterpeno lupânico que exibe uma variedade de atividades biológicas incluindo a inibição do vírus da imunodeficiência humana

(HIV), antibacteriana, antimalárica, antiinflamatória, antihelmíntica e propriedades antioxidantes (Yogeeswari e Sriram, 2005).



PLANTAE DICOTYLEDON MYRTALES MYRTACEAE
Myrcia fenestrata DC.

Figura 4. *Myrcia fenestrata* depositada em herbário do INPA. (Fonte: splink.org.br)

3.4. Investigação Química de Extratos Vegetais

As plantas possuem habilidades de produzir compostos químicos que servem de defesa contra predadores, essas substâncias de defesas são conhecidas como metabólitos secundários ou aleloquímicos (Fattorusso e Tagliatalata-Scafati, 2008). Os metabólitos secundários são mediadores em processos de interação das plantas com o meio ambiente, a capacidade das plantas de sintetizar estes compostos em respostas a necessidades específicas é um processo contínuo ao longo da evolução das diferentes linhagens de plantas (Pichersky e Gang, 2000). O metabolismo secundário é uma expressão da individualidade das espécies e as substâncias naturais produzidas apresentam ampla diversidade funcional e estrutural, tais como terpenoides, flavonoides, lignoides e alcaloides (Dewick, 2009). Os produtos naturais

são produzidos por razões fisiológicas específicas, sociais ou predatórias, estando, portanto, relacionados com a ecologia dos organismos produtores. As substâncias químicas tóxicas, por exemplo, proporcionam defesa contra herbívoros, pragas ou plantas concorrentes, já os atrativos voláteis e agentes de coloração atraem animais (ex.: insetos e pássaros) polinizadores e/ou advertem outras espécies (Dudareva e Pichersky, 2000; Bennett e Wallsgrove, 1994). É a partir do metabolismo secundário que as plantas fornecem a maior parte dos produtos naturais farmacologicamente ativos (Dewick, 2009).

Os estudos químicos das plantas são incentivados pela importante utilidade dos produtos naturais principalmente como fonte de compostos bioativos para a produção de medicamentos. A Química de Produtos Naturais se dedica principalmente à caracterização estrutural, avaliação de propriedades químicas e biológicas, bem como investiga as rotas biossintéticas das substâncias produzidas por esses metabólitos secundários de plantas e microrganismos (Sarker D., Latif e Grayi., 2005).

Os estudos químicos de metabólitos secundários exigem técnicas eficientes de isolamento, purificação e caracterização. Dentre as metodologias disponíveis atualmente destacam-se os métodos cromatográficos e espectrométricos, sendo as Cromatografias Líquida e Gasosa de Alta Eficiência (CLAE e CG), Espectrometria de Massas (EM) e a Ressonância Magnética Nuclear as principais técnicas amplamente utilizadas na investigação fitoquímica (Braz Filho, 2010) (Do *et al.*, 2014) (Sarker D., Latif e Grayi., 2005).

Considerando os avanços das técnicas analíticas atuais, a Cromatografia Líquida de Alta Performanse com detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM), aparentemente tem sido a ferramenta mais utilizada em metodologias de análise de perfis químicos de constituintes fixos presentes em matrizes naturais (Konishi *et al.*, 2007) (Phillipson, 2007; Leme *et al.*, 2014).

3.5. Atividade Antioxidante

Antioxidantes são substâncias que podem atrasar ou inibir danos causados por radicais livres. Os radicais livres são moléculas reativas que podem interferir em reações fisiológicas normais. A reatividade dos radicais livres se deve a instabilidade dessas moléculas, por possuírem elétrons desemparelhados (Fib, 2009). A presença dos radicais livres no organismo é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais, pois causam oxidação de

substâncias químicas ocorrentes nas reações metabólicas. No organismo a formação de radicais livres ocorre via ação catalítica de enzimas, durante o processo de transferência de elétrons ocorrentes no metabolismo celular (fatores endógenos) e pela exposição a fatores exógenos (ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, cigarro, entre outros.) (Bianchi e Antunes, 1999).

Substâncias antioxidantes podem ser obtidas na alimentação, sendo encontradas na sua maioria nos vegetais (Bianchi e Antunes, 1999). Dentre as substâncias antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos são os compostos fenólicos, tais como os flavonoides (Arora, Nair e Strasburg, 1998). Os compostos fenólicos têm sido extremamente investigados ao longo dos anos, e estudos comprovam a íntima relação dos potenciais antioxidantes dos alimentos com o teor de substâncias fenólicas (Sant'ana *et al.*, 2011).

Vários ensaios têm sido utilizados para estimar a capacidade antioxidante de alimentos e substâncias puras (Thaipong *et al.*, 2006). DPPH, ABTS, FRAP e ORAC são alguns dos ensaios utilizados para medir a capacidade antioxidante por método de captura de radicais livres. Dentre estes se destaca o método de captura do radical livre 2, 2 - difenil -1 - picrilhidrazil (DPPH•) (Brand-Williams *et al.*, 1995), baseado no mecanismo de reação química ilustrado na Figura 5, o teste com DPPH• avalia a capacidade de captura do radical livre por substâncias antioxidantes produzindo com isto um decréscimo na absorvância bem como o desaparecimento da cor violeta do DPPH• (Boligon, Machado e Athayde, 2014; Liang e Kitts, 2014).

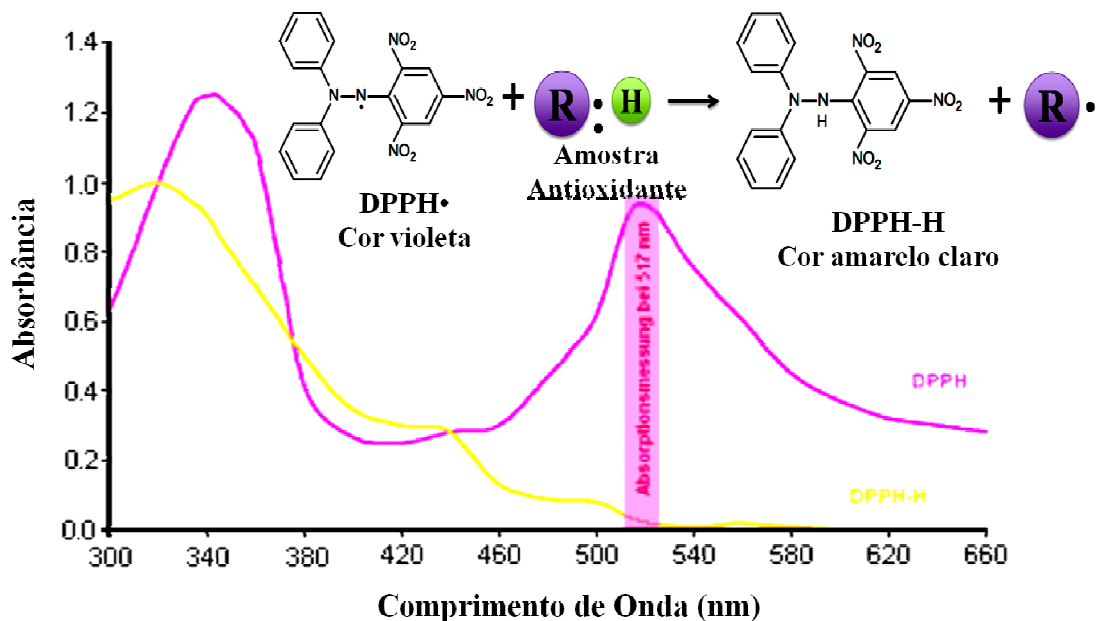


Figura 5. Ilustração da reação entre o DPPH• e uma amostra antioxidante (potencialmente redutora). Imagem adaptada de (Boligon, Machado e Athayde, 2014) e (Liang e Kitts, 2014).

3.6. Atividade Hipoglicemiante

O diabetes mellitus é uma doença crônica degenerativa caracterizada por hiperglicemia crônica (Alto nível de glicemia). Apresenta distúrbios no metabolismo dos carboidratos, proteínas e gorduras devido à incapacidade do pâncreas em secretar insulina e/ou transportar glicose para o interior das células, levando a hiperglicemia. Em suas formas mais graves, pode desenvolver e levar ao coma e, na ausência de tratamento eficaz, a morte (Alberti *et al*, 1998). Dentre os tratamentos eficientes no controle da glicemia estão os antiglicemiantes orais que podem atuar por diferentes mecanismos de ação tais como, aumento do suprimento insulínico, aumento da ação insulínica e ainda inibição da enzima α -glicosidase (Inzucchi, 2002).

As enzimas do tipo α -glicosidase são responsáveis pela clivagem hidrolítica das ligações α -glicosídicas (Figura 6). Esta enzima atua durante a digestão na degradação dos oligossacarídeos e dos polissacarídeos provenientes da alimentação, liberando as unidades monossacarídicas de carboidratos, aumentando assim a glicemia e agravando o quadro clínico de pacientes diabéticos (Krasikov, Karelov e Firsov, 2001; Borges De Melo e Carvalho, 2006; Ferreira *et al.*, 2011).

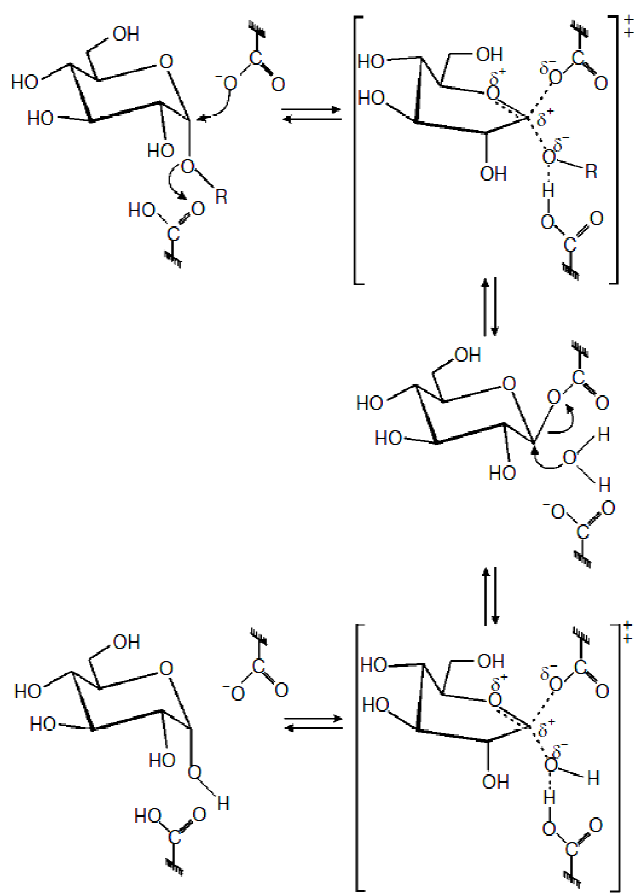


Figura 6. Mecanismo proposto para a clivagem da ligação glicosídica por α -glicosidasas (Fonte: (Krasikov, Karelov e Firsov, 2001).

O uso de plantas como alternativa no tratamento e prevenção de doenças é prática que perdura há muitos anos (De Pasquale, 1984). O grande interesse em drogas de origem vegetal é devido a várias razões, a saber, o uso exagerado e/ou incorreto de drogas sintéticas causarem efeitos colaterais indesejáveis e por o acesso a drogas de origem vegetal pela população ser maior (Rates, 2001). Diversas espécies de plantas são utilizadas etnofarmacologicamente como alternativas no tratamento do diabetes e dentre elas destacam-se espécies pertencentes à família Myrtaceae as quais são conhecidas popularmente como insulina vegetal (Marles e Farnsworth, 1995; Bnouham *et al.*, 2006; Sharma, Balomajumder e Roy, 2008; (Cruz e Kaplan, 2004; Bnouham *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2008; Baliga *et al.*, 2011; Gavillan-Suarez *et al.*, 2015). Dentre os compostos químicos encontrados em Myrtaceae os flavonoides, principalmente os *O*-glicosilados, estão intimamente relacionados com o potencial hipoglicemiante dessas espécies.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Instrumentos

A secagem do Material vegetal foi realizada em estufa com circulação de ar, marca De Leo Equipamentos Laboratoriais.

Para moagem dos caules das espécies de *Myrcia* foi utilizado moinho de quatro facas marca Fortinox do tipo Willye e modelo STAR FT-50 e para moagem das folhas utilizou-se liquidificador marca BLACK & DECKER®.

A pesagem do material vegetal foi realizada em balança semi-analítica marca Shimadzu modelo BL3200H com precisão de 0,01 g e pesagem máxima de 3200 g.

Para a Extração foi utilizada Lavadora Ultrassônica de marca UNIQUE e modelo USC4880.

Os extratos orgânicos em soluções foram concentrados em evaporador rotatório marca FISATOM e modelo 801 com banho-maria de mesma marca e modelo 550, equipado com bomba de vácuo de marca TECNAL e modelo Te-058 e um sistema refrigerador de líquidos de circuito fechado marca FISATOM e modelo 850.

Os extratos aquosos em solução foram congelados e liofilizados em liofilizador CHRIST modelo Alpha 2-4 LSC. As pesagens de extratos, amostras, padrões comerciais e reagentes para o preparo de soluções estoque foram realizadas em balança analítica Shimadzu Ay-220 com precisão de 0,0001 g e pesagem máxima de 220 g.

Os experimentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hifenada aos detectores de Arranjos de Diodos e Espectrômetros de Massas (CLAE-DAD-EM) foram realizados em um cromatógrafo (Thermo Scientific, Acella®) hifenados em linha aos detectores de Arranjo de Diodos (Thermo Scientific, Acella®) e Espectrômetro de massas (Thermo scientific, LCQ FLEET). Foi utilizada uma coluna de fase reversa modelo C₁₈ (2) 100 A Phenomenex® (150 x 4,6 mm, 5 µm) com uma pré-coluna de mesma fase.

As separações cromatográficas em escala preparativa e semi-preparativa foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu® (CBM-20A), equipado com desgaseificador DGU-20A, sistema binário de solventes LC-6AD e um detector de UV SPD-20A, os quais também foram operados em escala analítica para adequação dos métodos desenvolvidos

empregando a coluna analítica supracitada. Para as separações em escala semi-preparativa e preparativa foram empregados as colunas de fase estacionária C₁₈ (2) 100 A Phenomenex[®] (250 x 15 mm, 5 µm) e 100 A Phenomenex[®] (250 x 10 mm, 5 µm), respectivamente, ambas com colunas de guarda de mesma fase.

Os espectros de massas foram obtidos em um Espectrômetro de Massas Thermo scientific modelo LCQ FLEET equipado com dispositivo de inserção direta das amostras via análise por injeção em fluxo contínuo. As amostras foram analisadas no modo de ionização química à pressão atmosférica (APCI) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MSⁿ), sob as seguintes condições: voltagem do capilar 35 V, voltagem do spray 3,14 kV, temperatura do capilar 240 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 12 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi *m/z* 100-1000.

O software Xcalibur versão 1.0 (Thermo scientific[®]) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos. As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas da Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados em parceria com o Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, sob a supervisão do professor Dr. Andersson Barison e da doutoranda Lívia Dutra. Os espectros de RMN unidimensionais (¹H e ¹³C) e bidimensionais (gHSQC – Heteronuclear Single Quantum Correlation e gHMBC Heteronuclear Multiple Bond Correlation) foram obtidos em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C (Bruker[®] Avance III 600). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (*J*) foram registradas em (Hz). Foram utilizados os programas TopSpin 3.1 e ACD/RMN Processor Academic Edition (ACD/Labs 12.01) para a manipulação dos espectros de RMN.

A determinação do potencial antioxidante frente ao radical livre DPPH foi realizada empregando uma leitora de microplacas de Marca BioTek e modelo ELx800 utilizando microplacas de 96 poços.

Os ensaios hipoglicemiantes foram desenvolvidos em parceria com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), sob a supervisão do professor Dr. Emerson Lima Silva e com auxílio do graduando em Ciências Farmacêuticas Leonard Domingo Rosales Acho. Foi realizado empregando uma incubadora para microplacas marca AGIMAXX e modelo AG-4P e leitor de microplacas marca Beckman Coulter e modelo DTX 800 para microplacas de 96 poços.

4.2. **Materiais e reagentes**

Etanol, metanol e acetato de etila (Tedia, Fairfield, OH, EUA) foram utilizados nos procedimentos de extração para obtenção dos extratos e a obtenção de cromatoplasmas (Macherey-Nagel). Para o preparo dos extratos aquosos foi utilizado água tipo destilada. Metanol Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) grau HPLC e água Milli-Q (Millipore®) foram utilizados como fase móvel em experimentos de CLAE e Extração em Fase Sólida (SPE).

Para o sistema de filtração dos extratos foram utilizados suportes universais, funis simples e papel de filtro. Para extração em fase sólida (EFS) utilizou-se um cartucho de C18 (Strata™ from phenomenex) acoplado a kitassato e sistema de vácuo.

O 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) (Sigma-Aldrich®) foi utilizado na determinação da atividade sequestradora de radicais livres, e quercetina (Sigma-Aldrich®) foi utilizada como padrão.

No preparo das amostras para os experimentos de RMN foram utilizados solventes deuterados (CDCl₃, DMSO-*d*₆, e D₂O) (≥99.9% D), adquiridos da Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL, Andover, Massachusetts, EUA).

4.3. **Localização e coleta das espécies de Myrcia**

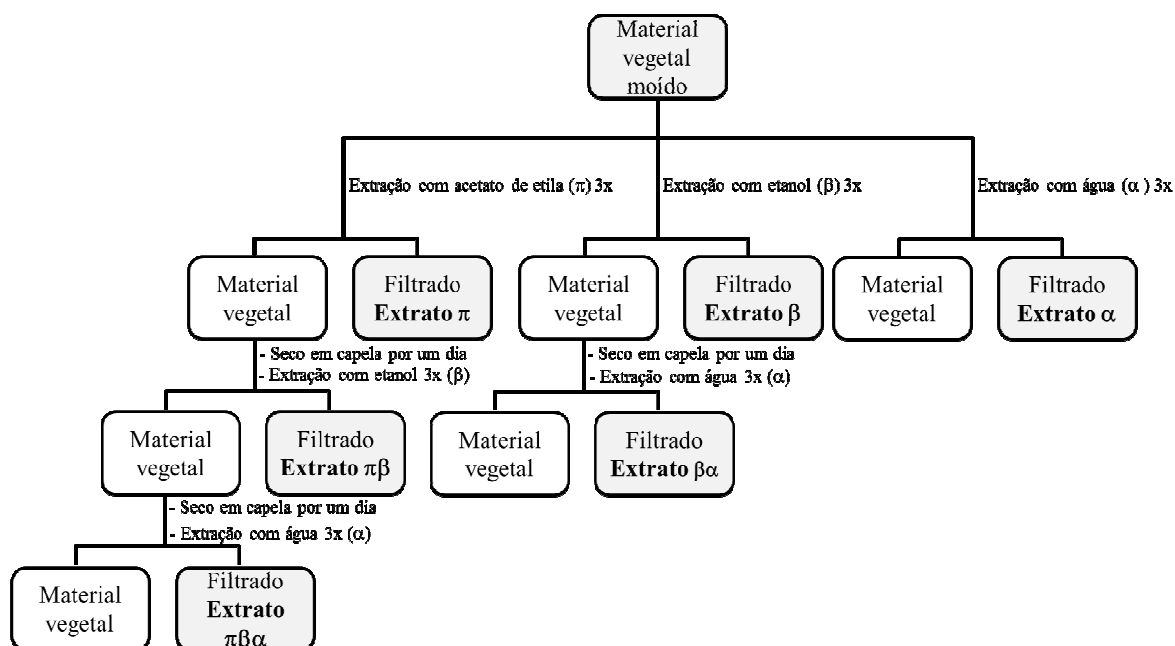
A coleta das espécies de *Myrcia* foi realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD) com auxílio da botânica Dra. Maria Anália Duarte de Souza e seguindo o mapa das trilhas, usadas pelo Projeto Flora da Reserva Ducke e dos marcos para localização das árvores marcadas (Ribeiro *et al.*, 1999). A coleta foi realizada em agosto de 2013, onde foram coletadas 220g de folhas e 806g de caules de *Myrcia bracteata* (número de identificação da árvore - 3880), 764g de folhas e 900g de caules de *Myrcia citrifolia* (número de identificação da árvore - 3012) e 172g de folhas e 370g de caules de *Myrcia fenestrata* (número de identificação da árvore - 3834).

4.4. Obtenção dos extratos e frações das espécies de *Myrcia* selecionadas

As folhas e os caules dessas três espécies vegetais, separadamente, foram limpos e após assepsia correta foram secos ao ar livre por duas semanas, seguido por secagem em estufa com circulação de ar a 40°C por aproximadamente uma semana e posteriormente foram moídos em moinho de facas. Dividiu-se o material vegetal moído (folhas e caules) em três grupos com três alíquotas cada. Cada grupo foi submetido à extração com diferentes solventes empregando-se o método do triângulo de seletividade proposto por Snyder e Kirkland (Snyder e Kirkland, 1979; Snyder *et al.*, 1993) com adaptações. Selecionou-se os solventes: acetato de etila (π), etanol (β) e água (α) a partir do seu grupo químico (segundo triângulo de seletividade), toxicidade e disponibilidade. O volume de solvente utilizando foi de 20:1 em relação à massa do material vegetal.

Realizou-se a extração com auxílio de ultrassom obedecendo ao tempo de 20 minutos de extração e em seguida filtrou-se cada solução separadamente. Cada alíquota foi extraída três vezes. Uma parte do material vegetal que inicialmente foi extraído com acetato de etila foi em seguida submetido à extração com etanol e posteriormente com água. Outra alíquota do material vegetal foi extraída inicialmente com etanol e em seguida com água. E finalmente, uma terceira alíquotado do material vegetal foi extraída apenas com água. Desta forma foram obtidos seis tipos de extratos em triplicata de caules, bem como de folhas (Esquema 1).

Esquema 1. . Esquema da obtenção dos extratos



Após a filtragem, as soluções orgânicas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida em temperatura inferior a 50°C e 80 rpm. As soluções aquosas foram congeladas e submetidas à liofilização. Em seguida ambos os extratos foram analisados por EM e RMN de ¹H, e submetidos à avaliação do potencial antioxidante e hipoglicemiante.

Uma alíquota de 348,0 mg do extrato em acetato de etila dos caules de *Myrcia bracteata* foi diluída em 5 mL de MeOH/H₂O 1:1 e submetida ao fracionamento por Extração em Fase Sólida (C18, , MeOH/H₂O 1:1 e MeOH 100%) sob pressão reduzida, obtendo-se duas frações MBCp_50% (231,8 mg) e MBCp_100% (110 mg) (Figura 7).

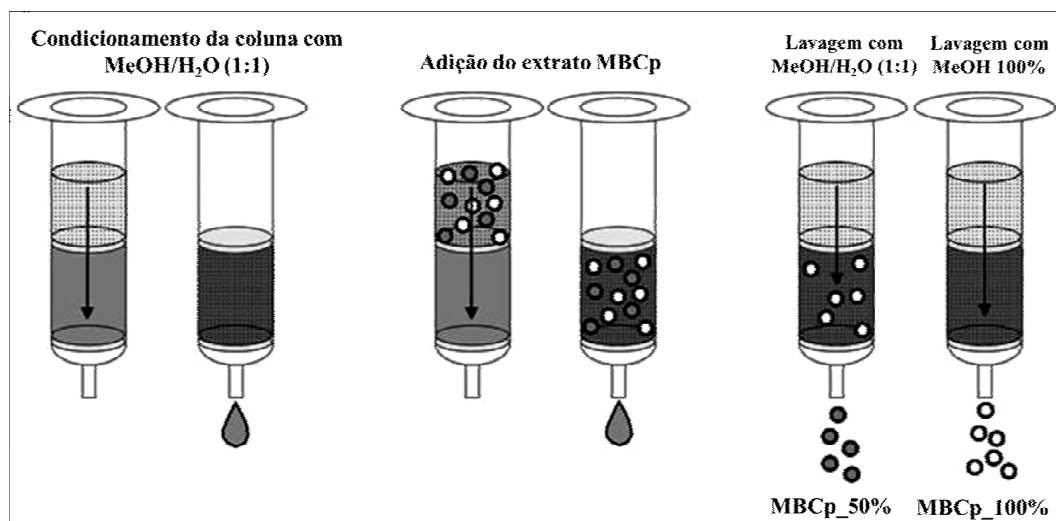


Figura 7. Ilustração do Fracionamento por SPE do extrato acetato de etila dos caules de *Myrcia bracteata* (MBCp). Fonte: (Lanças, 2008).

4.5. Obtenção dos perfis espectrométricos por EM e RMN de ¹H dos extratos de *Myrcia* spp.

Os perfis químicos dos extratos das folhas e dos caules de *Myrcia* spp. foram obtidos empregando a técnica de espectrometria de massas com analisador do tipo *ion-trap* e ionização do tipo APCI (modo negativo). Todas as aquisições dos perfis espectrométricos foram feitas em janela espectral de 100 a 1000 *m/z*. Os íons presentes nos espectros obtidos de cada extrato foram exportados para o programa Microsoft ExcelTM onde foi realizado o pré-tratamento adequado (adequação de matriz por inserção de zeros para dados ausentes). Essa matriz de dados foi importado para os softwares The UnscraberTM 10.2, e MinitabTM 13.0 para a realização das análises estatísticas descritas no item 4.10.

Foram obtidos experimentos de RMN de ¹H de todos os extratos em DMSO-*d*₆. Os extratos foram analisados quanto à presença de sinais nas regiões de hidrogênios aromáticos e hidrogênios fenólicos. Os extratos com os melhores perfis espectrométricos (EM e RMN de ¹H) foram submetidos a métodos de separação cromatográfica e a análises de RMN 1D e 2D para isolamento e determinação estrutural.

4.6. Metodologia de isolamento dos constituintes químicos presentes nos extratos de *Myrcia bracteata*

Os extratos em acetato de etila dos caules e das folhas de *Myrcia bracteata* (MBCp e MBFp) e suas frações, cujos espectros de RMN de ^1H apresentam sinais nas regiões de hidrogênios aromáticos e fenólicos (δ 6,1 – 7,3 e 11,8 – 12,0), foram analisados por CLAE-DAD-EM em escala analítica (C18, MeOH \rightarrow H $_2$ O 35-100% em 20 min, 200-400 nm e 100-1000 m/z) empregando uma alíquota de 1,0 mg/mL, previamente filtrado em filtro de seringa com membrana de PTFE (0,22 μm), volume de injeção da amostra de 20 μL e taxa de fluxo mantida a 1,0 mL/min.

Delineado os perfis cromatográficos do extrato MBFp e da fração MBCp_50% obtidos por CLAE-DAD-EM quanto à presença de substâncias fenólicas/flavonoídicas, estes foram fracionados por CLAE-UV-semi-preparativa e CLAE-UV-preparativa, respectivamente. Utilizou-se o mesmo método cromatográfico de separação empregado na escala analítica (C18, MeOH \rightarrow H $_2$ O 35-100% em 20 min, 251 e 280 nm com manutenção de 100% de MeOH por 10 min) com um fluxo de 7,5 mL/min e volume de injeção de 500 μL para ambas as amostras. Todas as amostras fracionadas para o isolamento foram diluídas em MeOH, centrifugadas e filtradas em filtros de seringa. Os picos individuais eluídos da coluna foram coletados por múltiplas injeções. A cada injeção as amostras eluídas em cada pico foram analisadas por EM a fim de observar a reprodutibilidade de cada uma das injeções.

As frações coletadas a partir dos picos referentes aos flavonoides (Figuras 8 e 9) foram separadas e mensuradas suas massas, obtendo-se **1** (36,8 mg) e **2** (59,5 mg) a partir de MBCp_50%, e **3** (19,9 mg) e **4** (7,7 mg) a partir de MBFp.

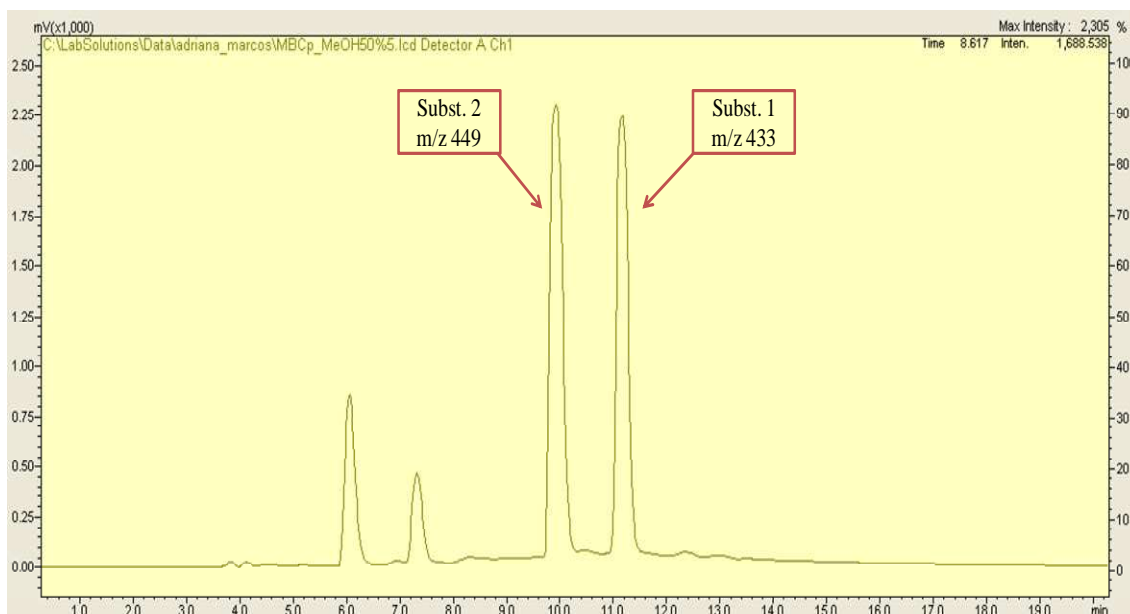


Figura 8. Cromatograma da amostra MBC π _50%. Substância 2 isolada com tempo de retenção de 9,60, e substância 1 isolada com tempo de retenção de 10,80.



Figura 9. Cromatograma da amostra MBFp. Substância 3 isolada com tempo de retenção de 6,34, e substância 4 isolada com tempo de retenção de 9,25.

As quatro substâncias foram submetidas a análises por RMN 1D (^1H e ^{13}C) e 2D (gHSQC e gHMBC).

4.7. Determinação da atividade sequestradora do radical livre DPPH•.

A determinação da atividade antioxidante dos extratos de *Myrcia* spp. Foi realizada utilizando o radical livre DPPH• e adaptando a metodologia previamente descrita na literatura por (Moein *et al.*, 2010) com adaptações. Uma alíquota de 3,9 mg do radical livre 2, 2 - difenil -1 - picrilhidrazil (DPPH•) foi pesada em balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com metanol (Concentração final de 100 µM). Uma solução de quercetina na concentração de 1,0 mg/mL foi preparada como padrão. Foram preparadas soluções das amostras e dos padrões nas concentrações de 1,0, 0,1 e 0,01 mg/mL. Adicionou-se à microplaca de 96 poços 20 µL da amostra, ou padrão, em 200 µL de DPPH•. Este procedimento foi realizado em triplicata, e incubado ao abrigo da luz. Após incubação por 30 minutos foi realizada a leitura da amostra em espectrômetro de ultravioleta/visível no comprimento de onda de 490 nm.

Com a obtenção dos valores de absorbância foi calculado a atividade antioxidante (AA%) utilizando a **equação 1**.

$$\text{Equação 1: } 100 - \frac{[(A)amostra - (A)branco]}{(A)controle} \times 100$$

Foram selecionadas as amostras que apresentaram AA% maior que 50% para as concentrações de 0,1 e 0,01 mg/mL e realizado o procedimento de obtenção da curva analítica e calculado a capacidade de captura de 50% dos radicais livres presentes em solução de DPPH• 100 µM.

Para o cálculo do CS₅₀ das amostras selecionadas foram preparadas 5 diluições próximas da concentração observada com AA% próximo de 50%. Repetiu-se o procedimento para o preparo da solução de DPPH• e da solução padrão. A solução padrão foi diluída nas concentrações de 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL e 1,25 µg/mL (O CS₅₀ tem valor aproximado de 14 µg/mL em 490 nm). Adicionou-se novamente 20mL da amostra ou padrão com 200ml de DPPH• em microplaca de 96 poços e incubado ao abrigo de luz, o procedimento foi realizado em triplicata e após 30 minutos de incubação foi realizada a leitura da amostra em espectrômetro de ultravioleta/visível no comprimento de onda de 490 nm.

4.8. **Determinação do potencial hipoglicemiante frente a enzima α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* de intestino de ratos.**

O método realizado consiste na verificação da capacidade de uma amostra em inibir a produção de glicose, liberada na quebra do substrato pela enzima. As amostras foram avaliadas frente às enzimas α -glucosidase proveniente de intestino de rato e do fungo *Saccharomyces cerevisiae*. As enzimas foram dissolvidas em tampão fosfato 10mM (pH 6,9). O substrato utilizado no ensaio foi *p*-nitrofenil-L- α -D-glucopiranosídeo também dissolvido em tampão fosfato pH 6,9. Para o ensaio foi utilizado 30 μ L da amostra com 170 μ L da solução enzimática em microplaca de 96 poços, e incubada a 37 °C por 5 min. Após incubação, as absorbâncias em 405 nm foram adquiridas, em seguida foram adicionados 100 μ L do substrato (reagente de cor) ao poço contendo a amostra e a solução enzimática e imediatamente foram obtidas novas leituras espectrofotométricas em 405 nm a cada 5 minutos de incubação a 37°C, até que a absorbância do controle positivo (solvente+enzima+substrato) aproximasse do valor unitário “1”. As amostras foram diluídas em várias concentrações, de modo a obter linearidade em relação à porcentagem de inibição da amostra. Utilizou-se a arcabose como controle positivo. Foi calculada a Concentração inibitória usando a **equação 1**.

Os resultados obtidos foram processados a fim de se obter uma curva analítica e calcular a capacidade de inibição de 50% da produção de glicose (IC₅₀).

4.9. **Análise estatística**

As análises estatísticas dos dados foram realizadas avaliando-se o tipo de distribuição dos dados empregando-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. A comparação múltipla de dados, cuja distribuição é normal (teste de normalidade), foi realizada empregando-se uma análise paramétrica do tipo ANOVA (Análise de Variância), utilizando o teste Tukey. Foi adotado um valor de 5% de significância.

Os dados espectrométricos obtidos dos diferentes extratos de *Myrcia* ssp. foram exportados para o Excel onde foram pré-tratados (inserção de valores nulos para ausência de medidas de massas) e em seguida exportado para o software quimiométrico the Unscrambler 10.2. A matriz de dados foi transposta e normalizada por área total. Os dados de intensidade relativa dos íons transpostos e normalizados foram analisados por dois métodos multivariados

não supervisionados: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Hierárquica de Cluster (HCA). A PCA foi realizada empregando-se os algoritmos NIPALS para pequenos fatores de dados ou SVD para grandes fatores de dados, conjuntamente com validação cruzada e peso 1,00 para todos os pontos, os quais foram centrados na média. A HCA foi empregada utilizando o método de Wards.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise do método de obtenção dos extratos de *Myrcia* spp.

A massa média dos extratos e seus respectivos rendimentos obtidos a partir das três espécies de *Myrcia* são apresentados na Tabela 1 e Figura 10. Para os extratos aquosos apenas uma alíquota significativa de cada extrato foi liofilizada para investigação dos perfis químicos (EM e RMN ^1H) e avaliação do potencial antioxidante, e hipoglicemiante. A análise por ANOVA dos dados de rendimento não apresentou um padrão de agrupamento por espécie. No entanto pode-se observar a formação de um agrupamento composto pelos extratos acetato de etila, os quais apresentaram os rendimentos mais baixos, exceto pelo extrato acetato de etila das folhas de *Myrcia citrifolia*. Pode-se observar que os rendimentos dos extratos não aquosos obtidos pelo método de extração sequenciada não apresentaram diferença significativa dos obtidos por extração direta.

Tabela 1. Extratos de *Myrcia* spp.

Espécie	Parte da planta	Tipo de extrato	Código	Massa média do extrato (g)	Rendimento%
<i>M. bracteata</i>	Folha	acetato de etila (π)	MBFp	0,43±0,05 ^{ab}	1,86
<i>M. bracteata</i>	Folha	etanólico (β)	MBFb	2,59±0,18 ^g	11,13
<i>M. bracteata</i>	Folha	etanólico sequenciado($\pi\beta$)	MBFpb	1,97±0,10 ^{ef}	8,47
<i>M. bracteata</i>	Folha	aquoso (α)	MBFa	1,00	-
<i>M. bracteata</i>	Folha	aquoso sequenciado ($\beta\alpha$)	MBFba	0,20	-
<i>M. bracteata</i>	Folha	aquoso sequenciado ($\pi\beta\alpha$)	MBFpba	3,00	-
<i>M. bracteata</i>	Caule	acetato de etila (π)	MBCp	0,20±0,03 ^a	0,23
<i>M. bracteata</i>	Caule	etanólico (β)	MBCb	3,39±0,28 ^{hi}	3,78
<i>M. bracteata</i>	Caule	etanólico sequenciado($\pi\beta$)	MBCpb	3,08±0,32 ^h	3,44
<i>M. bracteata</i>	Caule	aquoso (α)	MBCa	3,64	-
<i>M. bracteata</i>	Caule	aquoso sequenciado ($\beta\alpha$)	MBCba	0,58	-
<i>M. bracteata</i>	Caule	aquoso sequenciado ($\pi\beta\alpha$)	MBCpba	0,27	-
<i>M. citrifolia</i>	Folha	acetato de etila (π)	MCFp	1,19±0,02 ^d	2,38
<i>M. citrifolia</i>	Folha	etanólico (β)	MCFb	3,13±0,22 ^h	6,26
<i>M. citrifolia</i>	Folha	etanólico sequenciado($\pi\beta$)	MCFpb	3,19±0,23 ^h	6,37
<i>M. citrifolia</i>	Folha	aquoso (α)	MCFa	7,89	-
<i>M. citrifolia</i>	Folha	aquoso sequenciado ($\pi\beta\alpha$)	MCFpba	7,12	-
<i>M. citrifolia</i>	Caule	acetato de etila (π)	MCCp	0,24±0,04 ^a	0,49
<i>M. citrifolia</i>	Caule	etanólico (β)	MCCb	1,76±0,35 ^e	3,52
<i>M. citrifolia</i>	Caule	etanólico sequenciado($\pi\beta$)	MCCpb	1,30±0,06 ^d	2,60
<i>M. citrifolia</i>	Caule	aquoso (α)	MCCa	1,23	-
<i>M. citrifolia</i>	Caule	aquoso sequenciado ($\beta\alpha$)	MCCba	0,31	-
<i>M. citrifolia</i>	Caule	aquoso sequenciado ($\pi\beta\alpha$)	MCCpba	0,44	-
<i>M. fenestrata</i>	Folha	acetato de etila (π)	MFFp	0,29±0,01 ^{ab}	1,82
<i>M. fenestrata</i>	Folha	etanólico (β)	MFFb	1,28±0,25 ^d	7,99
<i>M. fenestrata</i>	Folha	etanólico sequenciado($\pi\beta$)	MFFpb	0,86±0,07 ^c	5,40
<i>M. fenestrata</i>	Folha	aquoso (α)	MFFa	1,14	-
<i>M. fenestrata</i>	Folha	aquoso sequenciado ($\beta\alpha$)	MFFba	0,99	-
<i>M. fenestrata</i>	Folha	aquoso sequenciado ($\pi\beta\alpha$)	MFFpba	0,65	-
<i>M. fenestrata</i>	Caule	acetato de etila (π)	MFCp	0,80±1,14 ^a	1,95
<i>M. fenestrata</i>	Caule	etanólico (β)	MFCb	1,03±0,16 ^{cd}	2,50
<i>M. fenestrata</i>	Caule	etanólico sequenciado($\pi\beta$)	MFCpb	0,71±0,10 ^c	1,73
<i>M. fenestrata</i>	Caule	aquoso (α)	MFCa	0,62	-
<i>M. fenestrata</i>	Caule	aquoso sequenciado ($\beta\alpha$)	MFCba	0,89	-
<i>M. fenestrata</i>	Caule	aquoso sequenciado ($\pi\beta\alpha$)	MFCpba	0,18	-

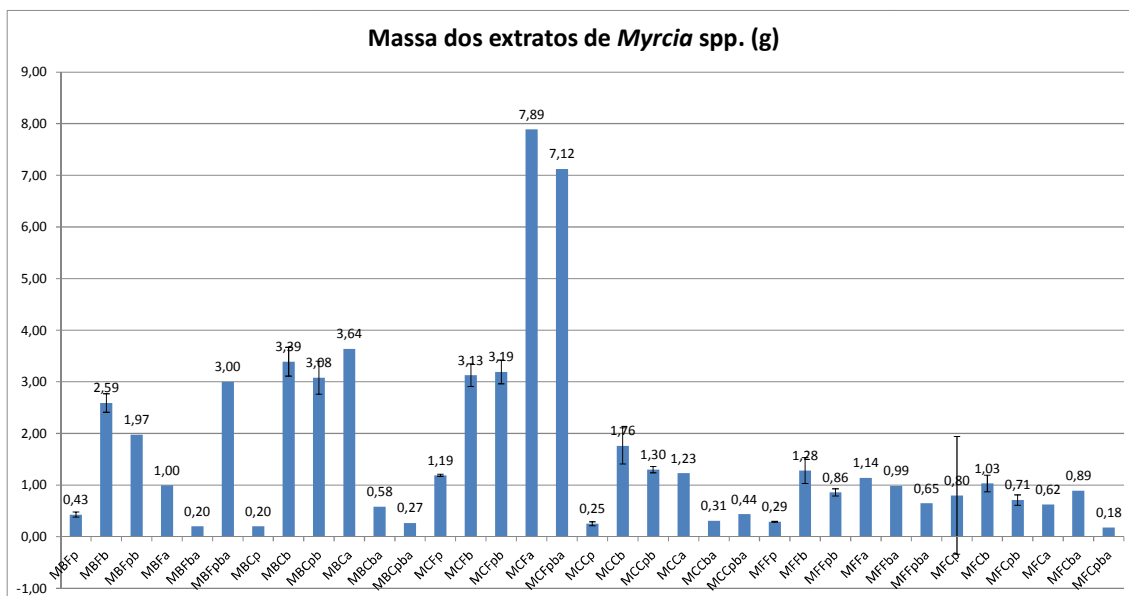


Figura 10. Gráfico das massas dos extratos de *Myrcia* spp..

5.2. Análise dos perfis químicos dos extratos de *Myrcia* spp.

Análise dos perfis químicos obtidos por Espectrometria de Massas assistido por PCA revelou uma composição distinta entre os extratos aquosos e não aquosos de folhas de *Myrcia* spp. (Figura 11).

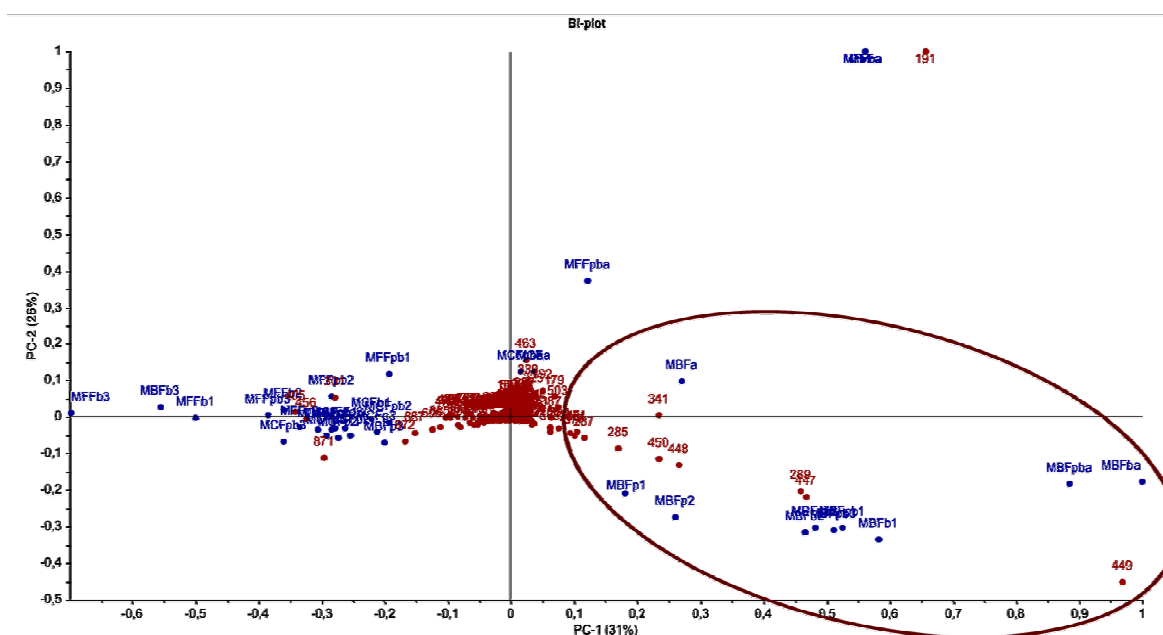


Figura 11. Biplot da análise por PCA dos extratos de folhas de *Myrcia* spp..

A análise dos dados de massas dos extratos não aquosos de folhas de *Myrcia* spp. por PCA evidenciou uma composição química distinta de *Myrcia bracteata* das demais espécies, com destaque para os íons de m/z 447, 289 e 449 (Figura 12).

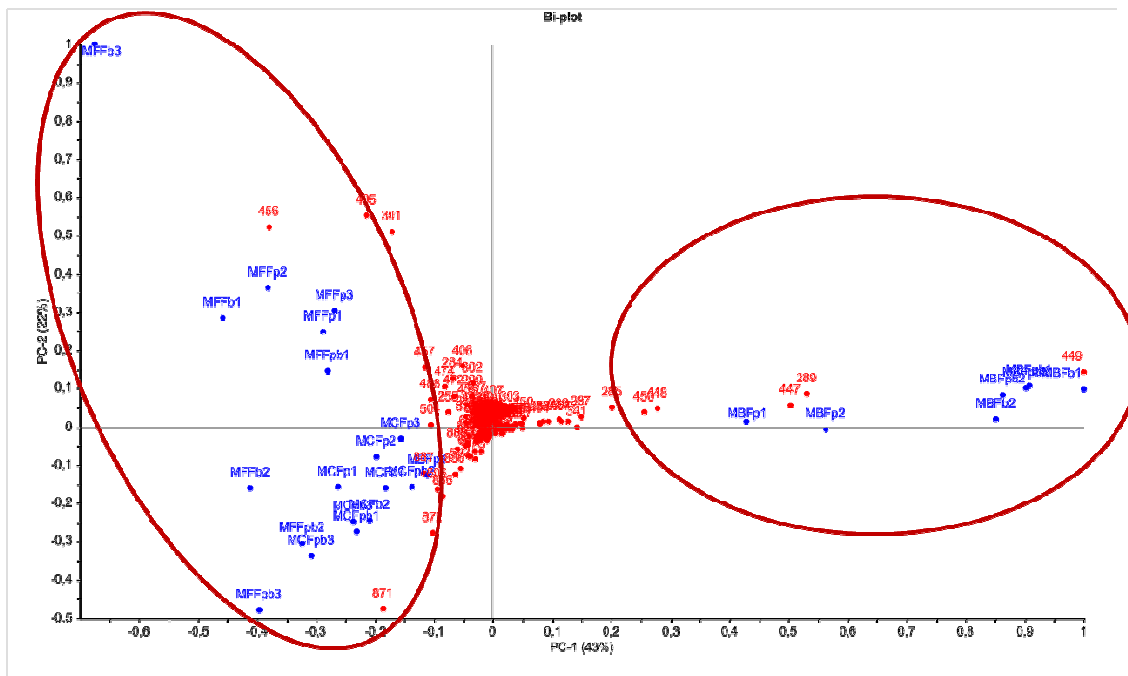


Figura 12. Biplot da análise por PCA dos extratos não aquosos das folhas de *Myrcia* spp..

A análise quimiométrica realizada com os extratos de caules de *Myrcia* spp. revelou a presença de dois agrupamentos, sendo um agrupamento composto pelos extratos de *M. bracteata* e outro composto pelos extratos de *M. citrifolia* e *M. fenestrata*, bem como uma elevada influência no modelo para o extrato em acetato de etila de *Myrcia citrifolia*, evidenciando uma composição química distinta dos demais extratos, apresentando como íon característico o m/z 488 (Figura 13).

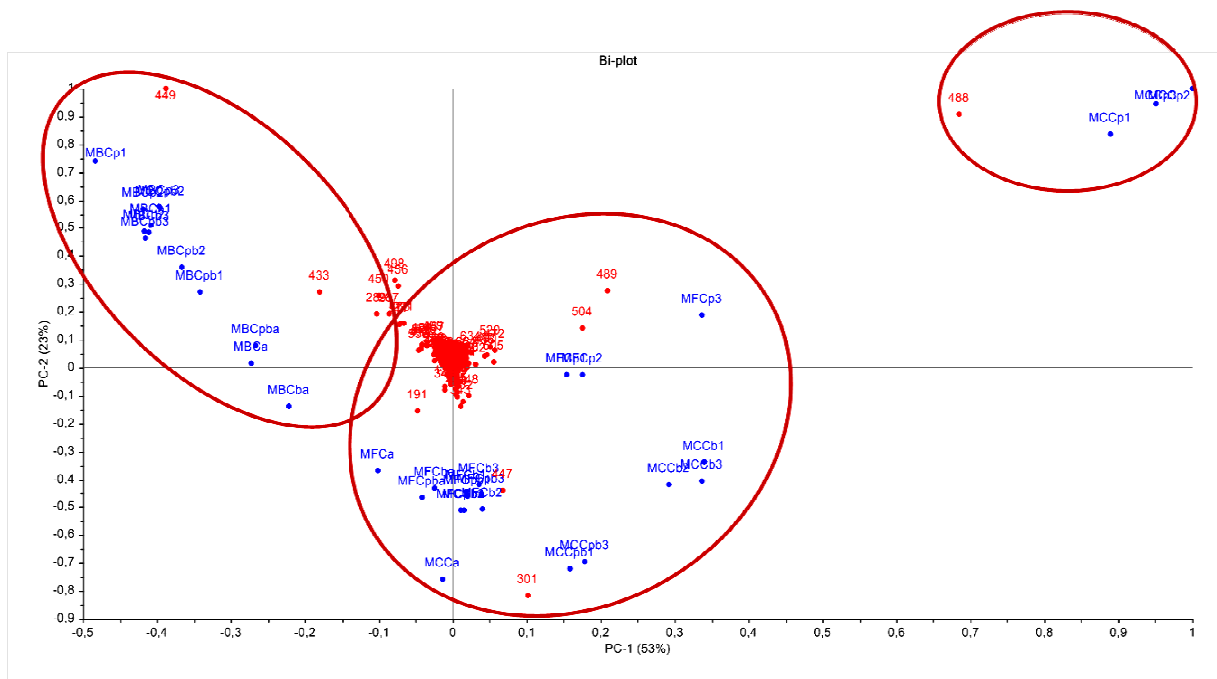


Figura 13. Biplot da análise por PCA dos extratos de caules de *Myrcia* spp.

O espectro de Massas desse extrato (Figura 14) revela a presença de um constituinte químico majoritário caracterizado pelo íon m/z 487 $[M-H]^-$. A análise do espectro de RMN de 1H dessa amostra evidenciou se tratar de uma substância terpênica (Figura 15).

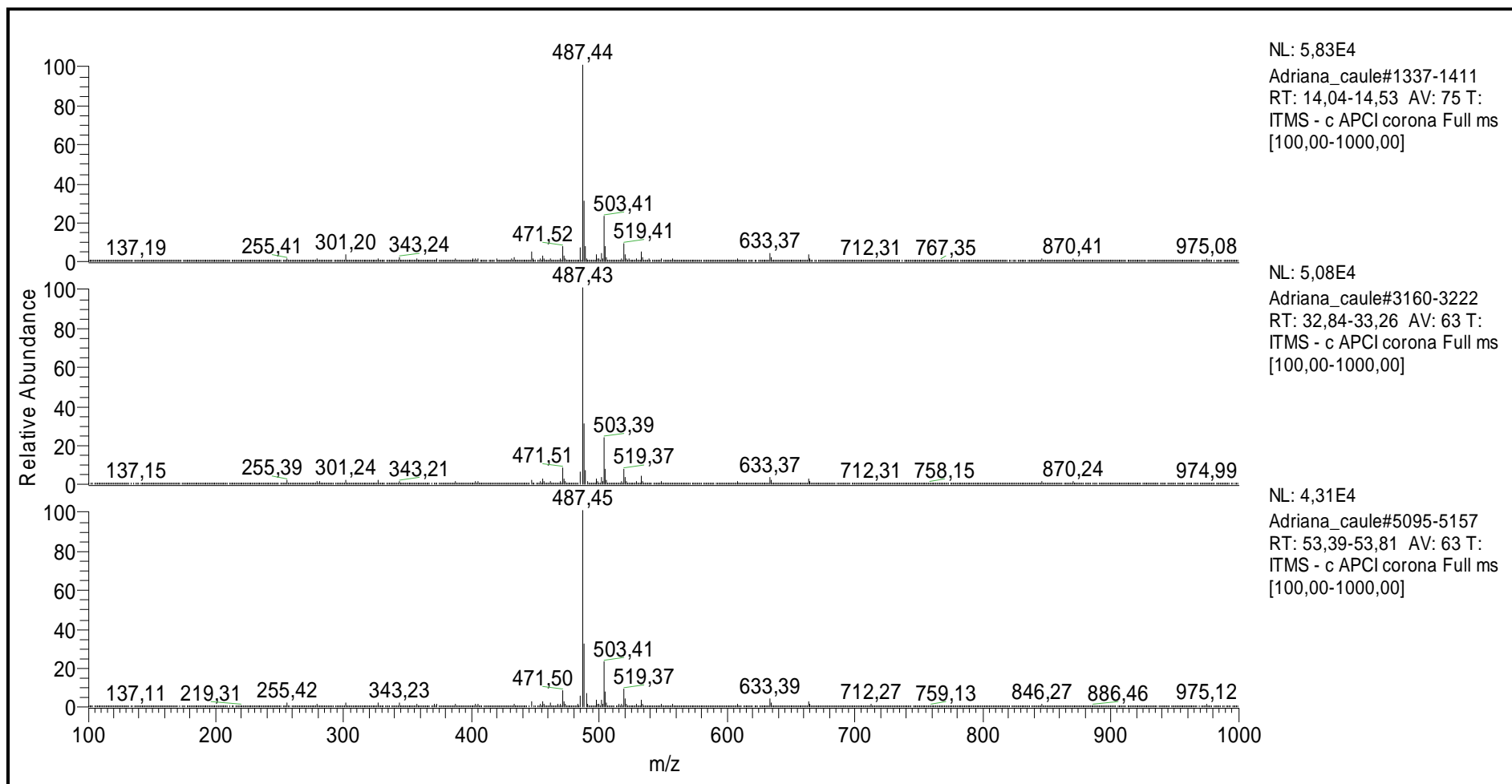


Figura 14. Perfil de massas das replicatas do extrato MCCp no modo negativo.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	3.1195	Comment	Prof. Marcos	Date	09 Nov 2014 15:38:08				
Date Stamp	09 Nov 2014 15:38:08			File Name	C:\Users\Adriana Souza\Documents\Adriana\Adriana ^\RMN\nequima_mccp\1\fid				
Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H	Number of Transients	32	Origin	spect	Original Points Count	32768
Owner	RMN600BIO	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg	Receiver Gain	20.54	SW(cyclical) (Hz)	10504.20
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	4892.5898	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	10503.88	Temperature (degree C)	30.000

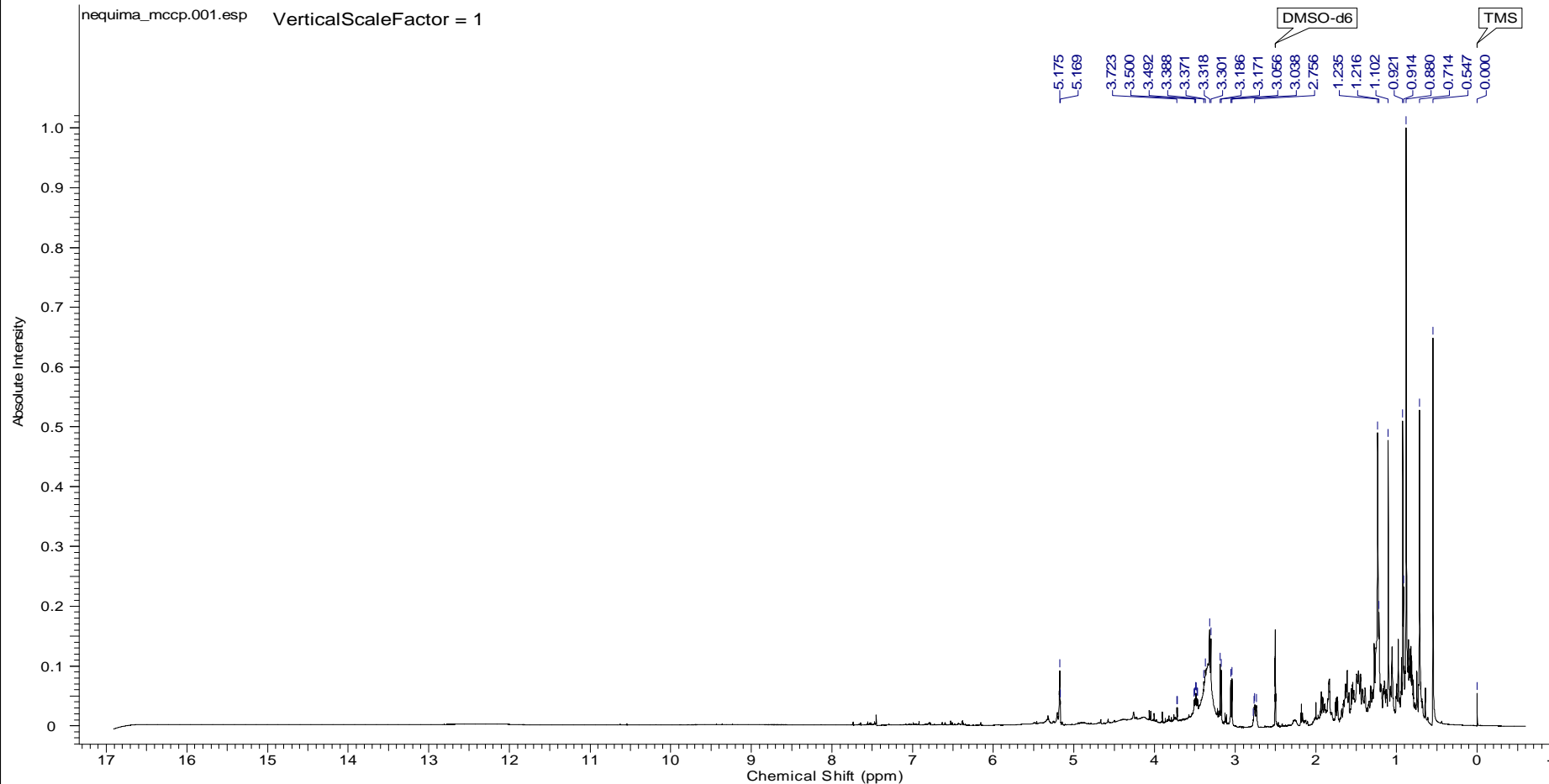


Figura 15. Espectro de RMN ^1H do extrato MCCp

Sendo assim uma nova PCA foi realizada, excluindo o extrato de caule de *M. citrifolia*, cuja análise evidenciou uma composição química dos caules distinta entre as espécies, com destaque para os íons de m/z 433 e 449, característicos em *M. bracteata*.

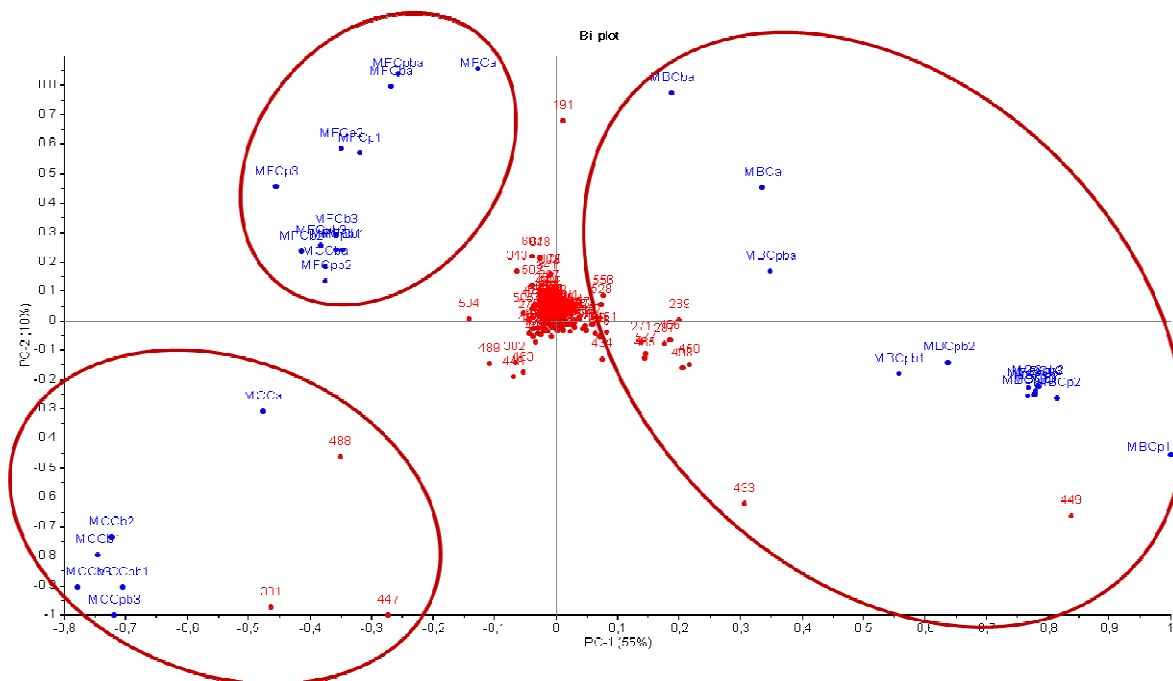


Figura 16. Biplot da análise por PCA dos extratos de caules de *Myrcia* spp. excluindo o extrato MCCp.

Foram analisados os espectros de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$ ou D_2O) de todos os extratos obtidos das espécies de *Myrcia* avaliando a presença de sinais de deslocamento químico característicos para substâncias flavonoídicas. A presença de sinais com deslocamento químico (δ) entre 11-14 ppm no espectro de RMN ^1H (característico de grupo -OH ligado ao carbono cinco dos flavonoides) evidenciou a presença dessa classe de compostos em alguns extratos analisados. O hidrogênio fenólico apresenta este tipo de deslocamento devido a forte influência que o oxigênio ligado a C-5 e o oxigênio da carbonila exercem sobre ele (Harborne *et al.*, 1975). Considerando que a estrutura das flavanonas, por exemplo, não apresenta o grupo -OH ligado ao carbono cinco, outros sinais de deslocamento químico de hidrogênio também foram considerados para a identificação de substâncias flavonoídicas nos extratos de *Myrcia* spp. (Tabela 2).

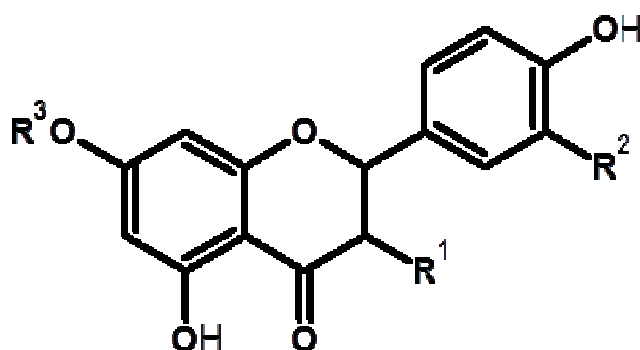
Tabela 2. Deslocamentos químicos de RMN ^1H de flavonoides (Bohm, 1999).

Posição	δ
H-5	7.7-8.2
H-6	5.7-6.4
H-8	5.9-6.5
H-2 (isoflavonoides)	7.6-7.9
Chalcona α -protonada	6.7-7.4
Chalcona β -protonada	7.3-7.7
Hidrogênio benzílico de Aurona	6.5-6.7
H-3 (flavonas)	Cerca de 6.3
H-2 (flavonas)	5.0-5.5
H-2 (dihidroflavonol)	4.8-5.0
H-3 (dihidroflavonol)	4.1-4.3
Hidrogênio metoxílico	3.5-4.1
H-3 (flavononas)	Cerca de 2.8

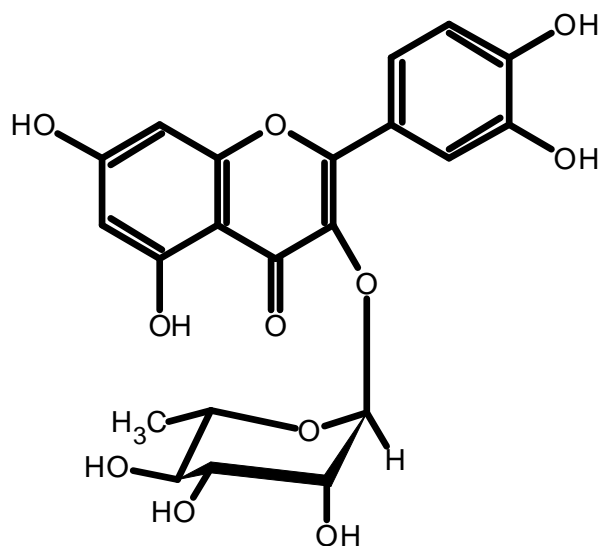
Os espectros de RMN ^1H mostram sinais característicos de substâncias flavonoídicas e glicosídicas para os extratos acetato de etila (π) dos caules e das folhas de *Myrcia bracteata* (MBF π e MBC π). As análises por EM evidenciam massas moleculares próximas e estruturas químicas muito semelhantes à de flavonoides glicosilados. (Figura 26 - Figura 29, pgs. 76 - 79).

5.3. Substâncias isoladas

Os fracionamentos por CLAE do extrato acetato de etila dos caules e das folhas de *Myrcia bracteata* resultaram no isolamento e na determinação estrutural de quatro substâncias glicosiladas pertencentes à classe dos flavonoides, sendo duas dihidroflavonas a naringenina - 7-*O*-glucosídeo (**1**) e o eriodictiol-7-*O*-glucosídeo (**2**), um dihidroflavonol a astilbina (**3**) e o flavonol quercitrina (**4**) (Figura 17).



	R ¹	R ²	R ³
1	H,H	H	Glc
2	H,H	OH	Glc
3	<i>O</i> -Ram	OH	H



4

Figura 17. Estruturas moleculares das substâncias isoladas de *Myrcia bracteata*.

5.4. Considerações gerais sobre isolamento e identificação estrutural das substâncias de *Myrcia bracteata*

O extrato MBC π foi purificado por SPE, esta etapa de purificação foi necessária para reter os constituintes que solubilizam em metanol, porém precipitam na presença de água. O clean-up utilizando adsorção em fase sólida é o método eficiente utilizado na "limpeza" de amostra e separação de constituintes indesejados (Lanças, 2008). Foram obtidas por SPE as frações MBC π _50% e MBC π _100%, as quais foram analisadas por espectrometria de massas. A análise dos espectros de massas revelou a presença das substâncias flavonoídicas na fração MBC π _50% (Figura 30, pg. 80).

A análise dos espectros de CLAE-DAD-EM de MBC π _50% evidenciou duas bandas de absorção em tempos de retenção de 6,49 e 8,05 min referentes aos íons m/z 449,23 [M-H]⁻ e m/z 433,21 [M-H]⁻ respectivamente. Os perfis de UV apresentam bandas de absorção mais intensas em 210 e 284 nm para o íon m/z 449,23 [M-H]⁻ e 213, 223 e 283 nm para o íon m/z 433,21 [M-H]⁻ (Figura 18 pg. 60). As bandas de absorção na faixa de UV / visível do espectro de absorção associada a capturada pelo detector de PDA no intervalo de 210-600 nm é indicativo de substância flavonoídica. A maioria dos picos de absorção de flavonoides apresenta-se em duas regiões entre 210-290 nm (banda II) e outra entre 320-380 nm ou 470-540 nm (banda I) (Rice-Evans e Packer, 2003). Desta fração foram obtidos os flavonoides **1** e **2**.

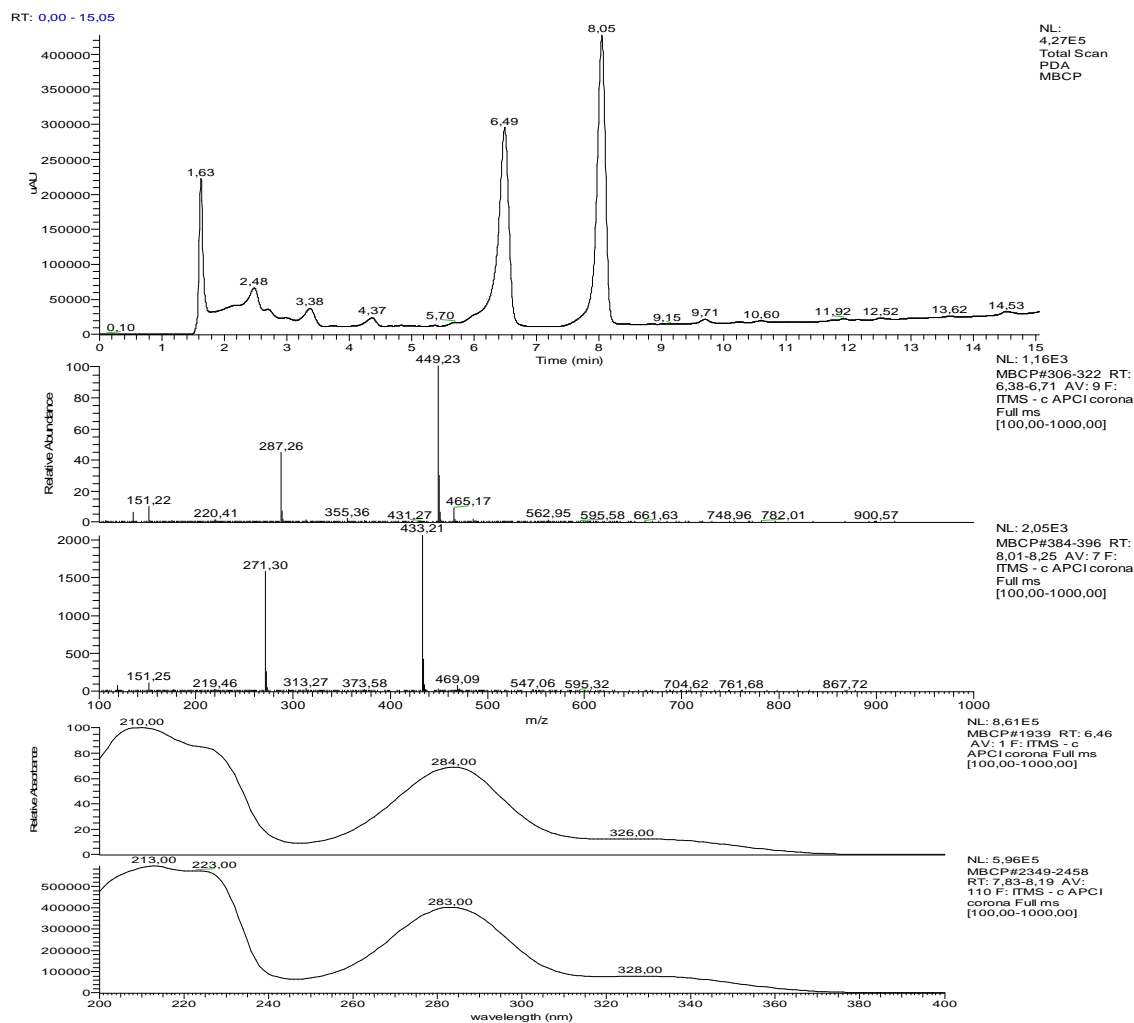


Figura 18. Espectro de CLAE-DAD-EM do extrato MBF π _50%.

O cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM em escala analítica da amostra MBF π apresentou dois picos mais intensos com tempos de retenção de 8,06 e 9,71 correspondentes aos íons m/z 449,24 $[M-H]^-$ e m/z 447,23 $[M-H]^-$ respectivamente. Os perfis de UV destes íons apresentaram bandas com máximo de absorção em 214 e 290 nm para o íon m/z 449,24 $[M-H]^-$ e 209, 256 e 351 nm para o íon m/z 447,23 $[M-H]^-$ (Figura 19, pg. 61). A interpretação dos cromatogramas sugere a presença de uma estrutura contendo um flavonol ou flavona, pois a faixa de detecção em PDA de 320-350 nm é comum à maioria das flavonas e flavonóis (Rice-Evans e Packer, 2003). A partir deste extrato foram isolados os flavonoides **3** e **4**.

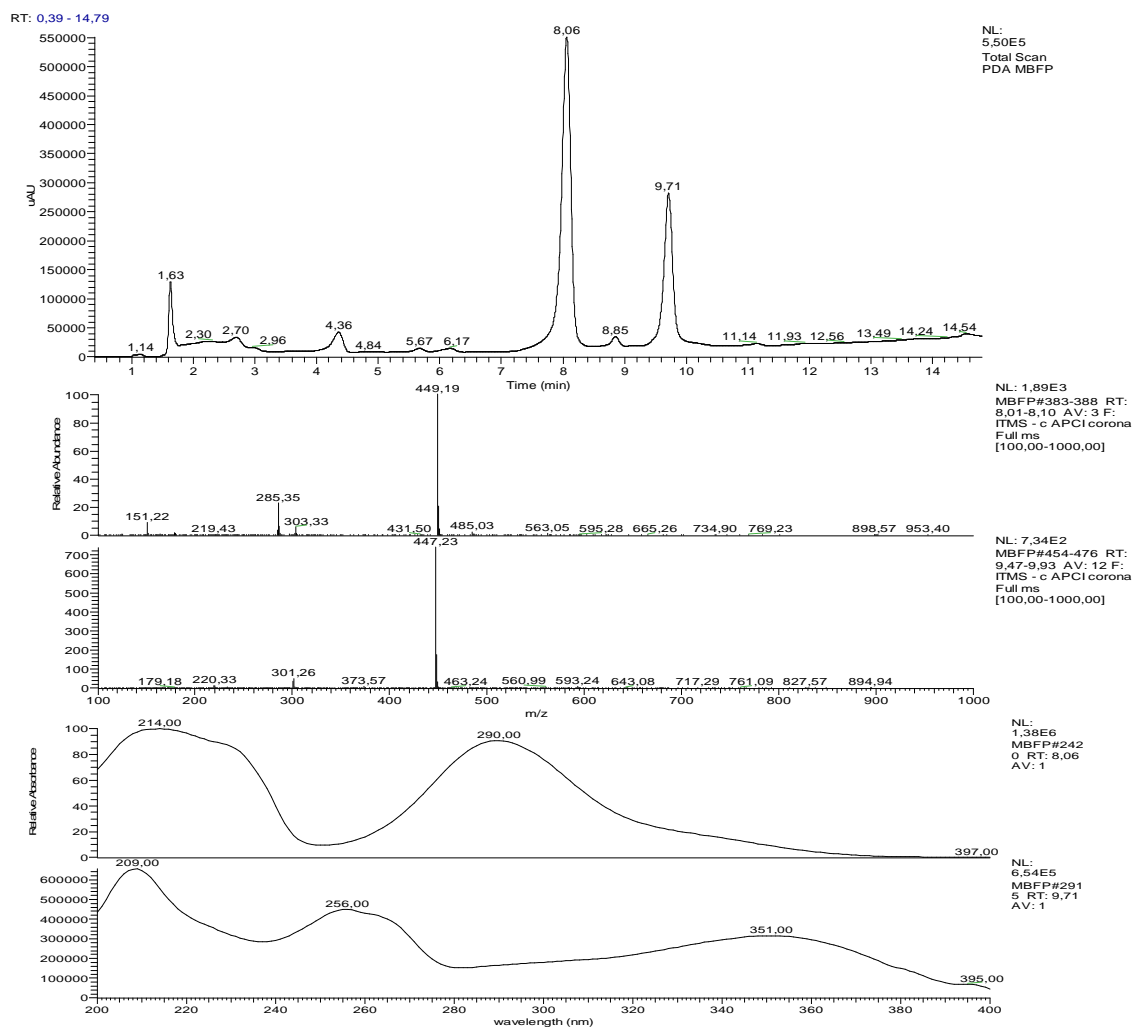


Figura 19. Espectro de CLAE-DAD-EM do extrato MBF π .

Para o isolamento das substâncias presentes nos extratos MBF π e MBC π utilizou-se a técnica de CLAE em escala preparativa e semi-preparativa. A técnica de fracionamento por CLAE tem possibilitado melhores resultados em análises de produtos naturais por ser uma ferramenta de separação eficiente a qual não necessita de grandes quantidades de amostras e possibilita a separação de substâncias com tempos de retenção próximos (Konishi *et al.*, 2007; Toffali *et al.*, 2011; Kristensen, Engelsen e Dragsted, 2012). Vários métodos de fracionamento por CLAE são relatados na literatura para a detecção e isolamento de flavonoides glicosilados (Cho *et al.*, 2004; Saldanha, Vilegas e Dokkedal, 2013; Moresco *et al.*, 2014).

5.5. Determinação estrutural de 1 e 2

A substância **1** (contendo 36,8 mg) apresenta-se como um sólido amorfo de cor marrom com sinal intenso de m/z 433 [M-H]⁻. Os experimentos de RMN de ¹³C e gHSQC e gHMBC de **1** (Figuras 31 – 37, pgs. 81-87) mostram a presença de 19 sinais sendo 7 característicos de átomos de carbono quaternários e vários sinais na região espectral de átomos de carbono aromáticos entre δ_C 166 e δ_C 95. O sinal em δ_C 197,1 é característico de carbonila conjugada, bem como os sinais em δ_C 78,6 e 42,1 de átomo de carbono metínico oxigenado e metilênico, respectivamente. Foram observados para a substância **1** sinais característicos de monossacarídeo (δ_C 99,6 C-1'', δ_C 73,0 C-2'', δ_C 76,3 C-3'', δ_C 69,5 C-4'', δ_C 77,1 C-5'' e δ_C 60,6 C-6''), cujos deslocamentos químicos estão em conformidade com os da glicose (Harborne *et al.*, 1975). A análise desses dados espectrais sugere um esqueleto flavonoídico do tipo flavanona (2,3-dihidroflavona) glicosilada (Figura 20, pg. 63).

A substância **2** (contendo 59,5 mg) apresenta-se como um sólido amorfo amarelo com sinal intenso de m/z 449 [M-H]⁻. Os dados de RMN de 1D e 2D da substância **2** (Figuras 38-43, pgs. 88-93) apresentam-se similares aos da substância **1** sugerindo ser também uma flavanona monoglicosilada (Figura 21, pg. 65). Os dados de RMN de ¹H de **1** e **2** em DMSO-*d*₆ apresentam-se similares e com padrões de acoplamento característicos de átomos de hidrogênio de flavanonas. A substância **1** apresenta um RMN de ¹H (Figuras 34 e 35, pgs. 84 e 85) com dois dubletos com integral para dois hidrogênios cada, mutuamente *ortho* acoplados, em δ_H 7,33 (*d*, $J = 8,4$ Hz) e em 6,80 (*d*, $J = 8,4$ Hz) compatíveis com H-2'/6' e H-3'/5' do anel B dissustituído monoxigenado em C-4'. Enquanto, a substância **2** apresenta um espectro de RMN ¹H com um singlete aromático em δ_H 6,89 Hz (*sl*) compatível com H-2' e outro duas vezes mais intenso em δ_H 6,76 Hz (*sl*, H-5' e H-6') do anel aromático B trissustituído dioxigenado nas posições C-3' e C-4'. Os sinais aromáticos referentes a um par de dubletos em **1** [δ_H 6,16 (*d*, $J = 2,4$ Hz) e 6,13 (*d*, $J = 2,4$ Hz)] e **2** [δ_H 6,15 (*d*, $J = 2,4$ Hz) e 6,13 (*d*, $J = 2,4$ Hz)] foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, do anel A tetrassustituído. A constante de acoplamento de 17,4 Hz dos átomos de hidrogênio H-3 nos dois compostos é indicativo de acoplamento geminal. Adicionalmente, os deslocamentos químicos de tais átomos de hidrogênio sugerem as posições *pseudo-equatorial* [**1**: δ_H 3,34 (*m*)] e [**2**: δ_H 3,27 (*m*)] e *pseudo-axial* [**1**: δ_H 2,75 (*dd*, $J = 17,4$ e 3,0 Hz)] e [**2**: δ_H 2,74 (*dd*, $J = 17,4$ e 3,0 Hz)]. Os sinais de deslocamento químico de um duplo dubleto em **1** [δ_H 5,50 (*dd*, $J = 12,6$ e 3,0 Hz)] e **2** [δ_H 5,43 (*dd*, $J = 12,6$ e 3,0 Hz)] atribuídos ao H-2 de ambas as

moléculas confirma o pseudo segmento O – CH(2) – CH₂(3), característico de estruturas de flavanonas. As análises dos espectros de RMN ¹H de **1** e **2** corroboram com a presença de uma glicose em ambas as substâncias, com um dubleto em δ_H 4,96 (*d*, *J* = 7,2 Hz) para **1** e δ_H 4,96 (*d*, *J* = 7,2 Hz) para **2**, característicos de átomos de hidrogênio anomérico e os sinais δ_H 3,67 (*dd*, *J* = 12,0 e 3,0 Hz) e δ_H 3,44 (*q*, *J* = 6,0 Hz) para **1** e δ_H 3,67 (*d*, *J* = 10,8 Hz) e δ_H 3,45 (*dd*, *J* = 12,0 e 5,4 Hz) para **2**, referente aos átomos de hidrogênio metilênicos na posição C-6''. As constantes de acoplamento do hidrogênio anomérico maior ou igual a 7 permite sugerir uma ligação β–glicosídica entre o açúcar e a aglicona para **1** e **2**.

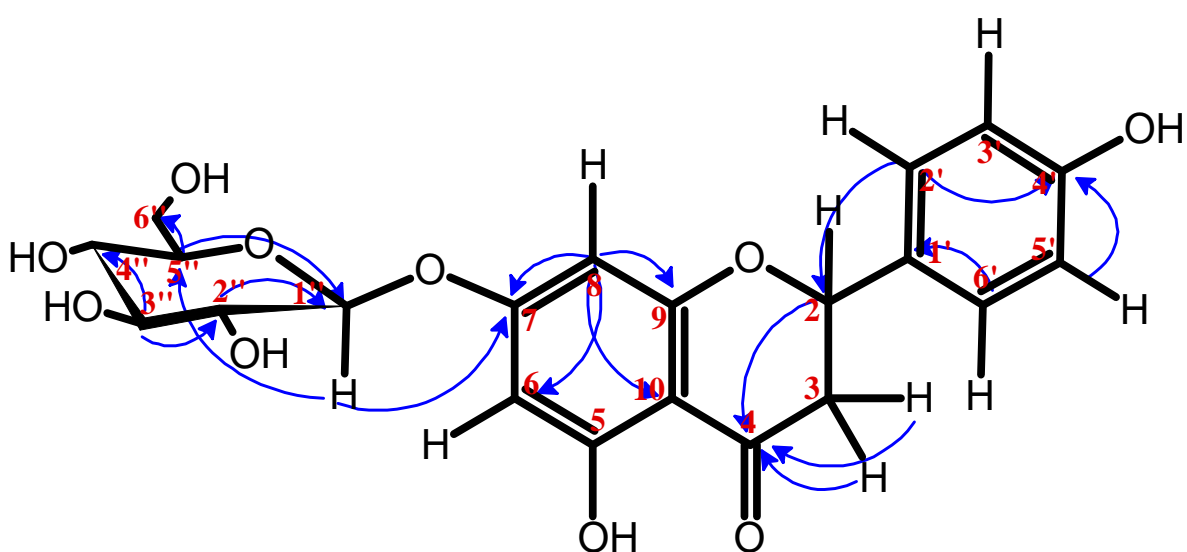


Figura 20. Principais correlações observadas nos experimentos de gHMBC para **1**.

As posições dos átomos de carbono (Tabela 3 e 4) foram fixadas com base nas análises detalhadas dos mapas de correlação gHMBC (Figuras 36 e 37, 42 e 43, pgs. 86 e 87, 92 e 93), bem como a posição do açúcar o qual apresenta correlação a longa distância entre o hidrogênio anomérico H-1'' [$\delta_{\text{H}} 4,96$ (d , $J = 8,4$ Hz) : **1**, $\delta_{\text{H}} 4,96$ (d , $J = 7,2$ Hz): **2**] e o carbono quaternário do anel A na posição C-7 ($\delta_{\text{C}} 165,3$ **1** e **2**).

Tabela 3. Dados de RMN ^{13}C e ^1H da substância **1** (14,1 T, DMSO- d_6).

Posição	1		
	^{13}C (δ)*	^1H (mult., J em Hz)	gHMBC (^1H - ^{13}C)
2	78,6	5,50 (<i>dd</i> , 12,6, 3,0)	H-2', H-6', Hax-3
3	42,1	2,75 Hax (<i>dd</i> , 17,4, 3,0) 3,34 Heq (<i>m</i>)	
4	197,1		H-8, H-2, Hax-3 e Heq-3
5	162,9	12,03 H-OH (<i>sl</i>)	H-6
6	96,5	6,13 (<i>d</i> , 4)	H-8
7	165,3		H-6, H-8, H-1''
8	95,4	6,16 (<i>d</i> , 2,4)	H-6
9	162,7		H-8
10	103,2		H-6, H-8
1'	128,6		Hax-3
2'	128,4	7,33 (<i>d</i> , 8,4)	H-2, H-3', H-5', H-6'
3'	115,2	6,80 (<i>d</i> , 8,4)	H-2', H-5', H-6'
4'	157,8		H-2', H-3', H-5', H-6'
5'	115,2	6,80 (<i>d</i> , 8,4)	H-2', H-3' H-6'
6'	128,4	7,33 (<i>d</i> , 8,4)	H-2, H-2', H-3', H-5'
1''	99,6	4,96 (<i>d</i> , 7,2)	H-2'', H-5''
2''	73,0	3,21 (<i>td</i> , 8,4, 3,6)	H-3''
3''	76,3	3,27 (<i>tl</i> , 9,0, 8,4)	H-2'', H-4'', H-5''
4''	69,5	3,15 (<i>td</i> , 8,4, 3,0)	H-3'', H-5'', Hb-6''
5''	77,1	3,38 (<i>m</i>)	H-1'', H-3'', Ha-6''
6''	60,6	3,45 Ha (<i>dd</i> , 12,0, 5,4) 3,68 Hb (<i>dd</i> , 12,0, 3,0)	H-5''

*Os dados de RMN ^{13}C foram atribuídos com auxílio dos experimentos de gHSQC e gHMBC.

As análises em conjunto dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e dos mapas de correlação gHSQC e gHMBC corroboram com os dados da literatura permitindo identificar as substâncias **1** e **2** como a naringenina 7-*O*- β -D-glicosídeo (Figura 20, pg. 63) e o eriodictiol 7-*O*- β -D-glicosídeo (Figura 21, pg. 65), respectivamente (Ehab *et al.*, 2010), (Moretti *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 2008). Estas duas substâncias não possuem relatos de isolamentos ou identificação em espécies de Myrtaceae. Esses dois flavonoides apresentam atividade antioxidante (Cho *et al.*, 2004) e hipoglicemiante (Hu *et al.*, 2012).

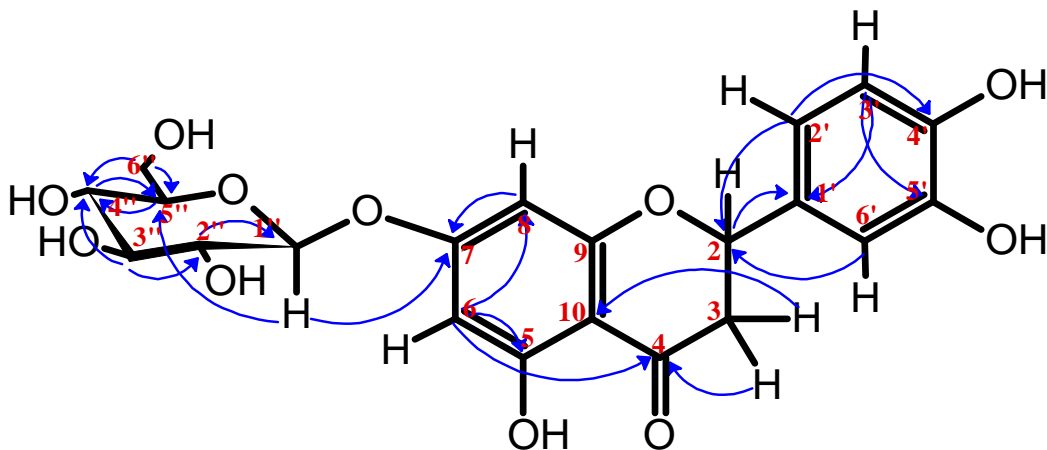


Figura 21. Principais correlações observadas nos experimentos de gHMBC para **2**.

Tabela 4. Dados de RMN ^{13}C e ^1H da substância **2** (14,1 T, $\text{DMSO-}d_6$)

Posição	2			
	$^{13}\text{C}^*$ (δ)	^1H (mult., J em Hz)	gHMBC	^{13}C
2	78,5	5,43 (<i>dd</i> , 12,6, 3,0)	H-3, H-2', H-5, H-6'	
3	41,9	2,74 <i>Hax</i> (<i>dd</i> , 17,4, 3) 3,27 <i>Heq</i> (<i>m</i>)		
4	197		H-2 f, <i>Hax</i> -3 , <i>Heq</i> -3, H-8	
5	162,8	12,05 H-O (<i>sl</i>)	H-8	
6	96	6,13 (<i>d</i> , 2,4)	H-8	
7	165,3		H-8, H-1''	
8	96,1	6,15 (<i>d</i> , 2,4)	H-6	
9	n			
10	103,4		H-6, H-8	
1'	129,2		<i>Heq</i> -3, H-2, H-2', H-5', H-6'	
2'	114,2	6,89 (<i>sl</i>)	H-2, H-5', H-6'	
3'	146,2		H-2'	
4'	145,5		H-5'	
5'	115,2	6,76 (<i>sl</i>)		
6'	118	6,76 (<i>sl</i>)	H-2'	
1''	99,5	4,96 (<i>d</i> , 7,2)	H-2'', H-5''	
2''	73	3,22 (<i>m</i>)	H-3''	
3''	76,2	3,27 (<i>m</i>)	H-2'', H-4'', H-5''	
4''	69,6	3,15 (<i>m</i>)	H-3'', H-5'', Ha-6''	
5''	77,1	3,37 (<i>m</i>)	H-1'', H-3'', Hb-6''	
6''	60,4	3,45 <i>Ha</i> (<i>dd</i> , 12,0, 5,4) 3,67 <i>Hb</i> (<i>d</i> , 10,8)	H-5''	

*Os dados de RMN ^{13}C foram atribuídos com auxílio dos experimentos de gHSQC e gHMBC.

5.6. Determinação estrutural de **3**

A substância **3** (contendo 19,9 mg) apresenta-se como um sólido amorfo de cor amarela clara. O Espectro de Massas de **3** revela um sinal intenso de m/z 449,19 [M-H]⁻. A análise conjunta do espectro de RMN de ¹H (Figura 44 e 45, pgs. 94 e 95) e dos mapas de correlações gHSQC (Figura 46 e Figura 47, pgs 96 e 97) e gHMBC (Figura 48 e Figura 49, pgs. 98 e 99) de **3** sugere um esqueleto de um dihidroflavonol glicosilado, caracterizado pelos dubletos em δ_H 5,23 (*d*, $J = 9,6$ Hz) e δ_H 4,63 (*d*, $J = 9,6$ Hz) que apresentam correlação direta com os sinais de carbono em δ_C 82,2 e δ_C 76,4, respectivamente, atribuídos aos átomos de carbono C-2 e C-3 do anel C da aglicona. Os sinais aromáticos em δ_H 6,74 (*d*, $J = 1,2$ Hz) com integral para dois hidrogênios e em 6,88 (*sl*) são característicos dos átomos de hidrogênio do anel B trissubstituído dioxigenado em C-3' (δ_C 146,5) e C-4' (δ_C 146,9). Os sinais em δ_H 5,87 (*d*, $J = 2,0$ Hz) H-6 e δ_H 5,89 (*d*, $J = 2,0$ Hz) H-8 evidenciam a dissustituição do anel A nas posições C-5 (δ_C 96,2) e C-7 (δ_C 96,8).

O dubleto em δ_H 4,05 (*d*, $J = 0,9$ Hz) equivalente a um hidrogênio anomérico, quatro sinais de átomos de hidrogênio carbinólicos em δ_H 3,34 (*m*), δ_H 3,41 (*dd*, $J = 9,6$ e 3,0 Hz), δ_H 3,13 (*t*, $J = 9,6$ Hz) e δ_H 3,88 (*dq*, $J = 9,3$ Hz e 6,3) e um dubleto na região dos átomos de hidrogênio metílicos δ_H 1,05 (3H *d*, $J = 6,3$ Hz) corroboram com os dados descritos na literatura para a identificação de uma unidade glicosídica do tipo ramnose (Harborne *et al.*, 1975). A posição da ligação do substituinte ramnosídico pode ser determinada com base na análise do mapa de correlação gHMBC (Figura 49, pg. 99) o qual evidencia a correlação do H-1'' (hidrogênio anomérico) com C-3 da aglicona (δ_C 76,3). A magnitude da constante de acoplamento ($J = 0,9$ Hz) do hidrogênio anomérico sugere que a ligação entre o dihidroflavonol e a ramnose seja α -glicosídica, os dados espectrais obtidos de **3** (Tabela 5) são compatíveis com os dados da literatura para a diidroquercetina 3-O- α -L-ramnosídeo (Figura 22, pg. 67) (Harborne *et al.*, 1975). Ao contrário da maioria dos monossacarídeos que ocorrem naturalmente na forma dextrógira (D), a rhamnose é encontrada naturalmente na forma levógira como L-rhamnose (Dewick, 2009). A análise polarimétrica dessa substância evidenciou o desvio da luz plano-polarizada para a direita $\{[\alpha]_D^{30} = +14,94$ (c. 10 mg/mL)}, o que está em conformidade para a substância (+)-(2*R*,3*R*)-astilbina (Haiqiu *et al.*, 2011).

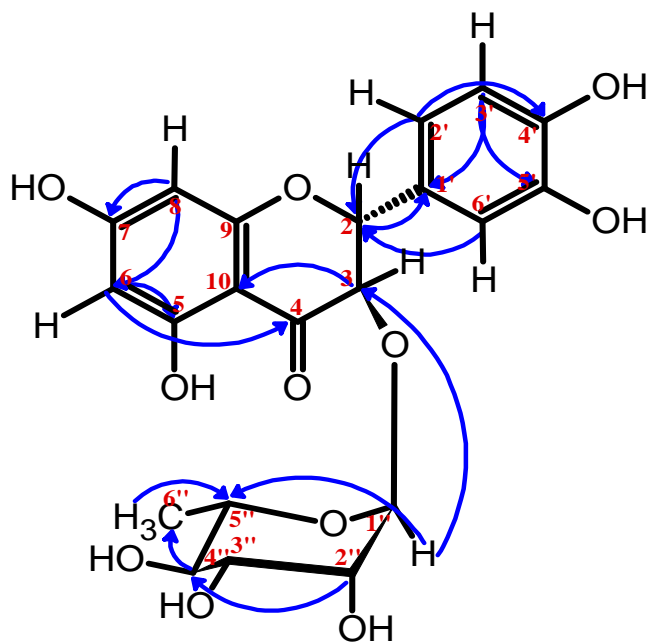


Figura 22. Principais correlações observadas nos experimentos de gHMBC para **3**.

Tabela 5. Dados de RMN ^{13}C e ^1H da substância **3** (14,1 T, DMSO- d_6)

Posição	3		
	$^{13}\text{C}^*$ (δ)	^1H (mult., J em HZ)	gHMBC (^1H - ^{13}C)
2	82,2	5,23 (<i>d</i> , 9,6)	H-3, H-2', H-6'
3	76,4	4,63 (<i>d</i> , 9,6)	H-2
4	195,3		H-2, H-3
5	163,5	11,8 H-O (<i>sl</i>)	H-6
6	96,2	5,87 (<i>d</i> , 2,0)	H-8
7	168,1		H-6
8	96,8	5,89 (<i>d</i> , 2,0)	H-6
9	164,5		H-8
10	101,9		H-6
1'	127,9		H-2, H-3, H-5', H-6'
2'	115,6	6,88 (<i>s</i>)	H-2, H-6'
3'	146,5		H-5' H-6'
4'	146,9		H-2'
5'	116,2	6,74 (<i>d</i> , 1,2)	
6'	119,6	6,74 (<i>d</i> , 1,2)	H-2, H-2'
1''	100,8	4,05 (<i>d</i> , 0,9)	H-3, H-5''
2''	70,8	3,34 (<i>m</i>)	H-1'', H-4''
3''	71,1	3,41 (<i>dd</i> , 9,6, 3,0)	H-1'', H-4''
4''	72,3	3,13 (<i>t</i> , 9,6, 9,6)	H-2'', H-3'', H-6''
5''	69,6	3,88 (<i>dq</i> , 9,6, 6,3, 6,3, 6,3)	H-1'', H-4'', H-6''
6''	18,24	1,05 (3H <i>d</i> , 6,3)	H-4''

*Os dados de RMN ^{13}C foram atribuídos com auxílio dos experimentos de gHSQC e gHMBC.

Ainda não se encontra descrita na literatura a ocorrência desta substância em espécies de Myrtaceae. Segundo a literatura essa substância apresenta atividades anti-inflamatória e inseticida (Haiqiu et al., 2011).

5.7. Determinação estrutural de 4.

A substância **4** (contendo 7,7 mg) apresenta-se como um sólido amorfo de cor amarela. O Espectro de Massas dessa substância revela o íon de m/z 447,23 [M-H]⁻. Os dados espectrais de RMN 1D (Figuras 50 e 51, pgs. 100 e 101) e 2D (Figuras 52 -55, pgs. 102 - 105) da substância **4** evidenciam sinais que corroboram com valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento característico de flavonol: dois dubletos com acoplamento em *meta* [δ_H 6,38 (*d*, $J = 1,8$ Hz) e 6,20 (*d*, $J = 1,8$ Hz)] compatíveis respectivamente com H-6 e H-8 do anel A tetrassubstituído e oxigenado nas posições C-5 e C-7; os sinais em δ_H 7,31 (*d*, $J = 2,4$ Hz), δ_H 6,87 (*d*, $J = 8,2$ Hz) e δ_H 7,26 (*dd*, $J = 8,2$ e 2,4 Hz) atribuídos ao H-2', H-5' e H-6' do Anel B 3,4-dihidroxilado. Os sinais com deslocamentos químicos na região dos átomos de hidrogênio carbinólicos [δ_H 5,26 (*d*, $J = 1,2$ Hz), δ_H 3,98 (*dd*, $J = 3,0$ e 1,8 Hz), δ_H 5,51 (*dd*, $J = 9,6$ e 3,6 Hz), δ_H 3,15 (*t*, $J = 9,6$ e 9,0 Hz) e δ_H 3,22 (*m*)] e um sinal na região dos átomos de hidrogênio metílicos δ_H 0,82 (*d*, $J = 6,0$ Hz) equivalente a três átomos de hidrogênio evidenciam a presença de uma rhamnose. A ligação entre o flavonol e a rhamnose foi determinada com base na correlação observada por gHMBC entre o H-1'' e o C-3 (Figura 54 e Figura 55, pgs.104 e 105).

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono primários, secundários e terciários da substância **4** (Tabela 6) foram atribuídos com base nos mapa de correlação gHSQC, os deslocamentos dos carbonos quaternários foram atribuídos com base no mapa de correlação a longa distância, gHMBC. Com base nos dados espectrais obtidos pode-se identificar a substância **4** como a quercetina 3-*O*- α -L-rhamnosídeo (Figura 23, pg. 69) (Harborne *et al.*, 1975; Agrawal, 1989). Essa substância apresenta atividade hipoglicemiante (Vareda *et al.*, 2014) e ocorre nas espécies *Myrcia bela*, *M. palustris* e *M. multiflora* (Saldanha, 2013; Wubshet, 2015; Matsuda, 2002).

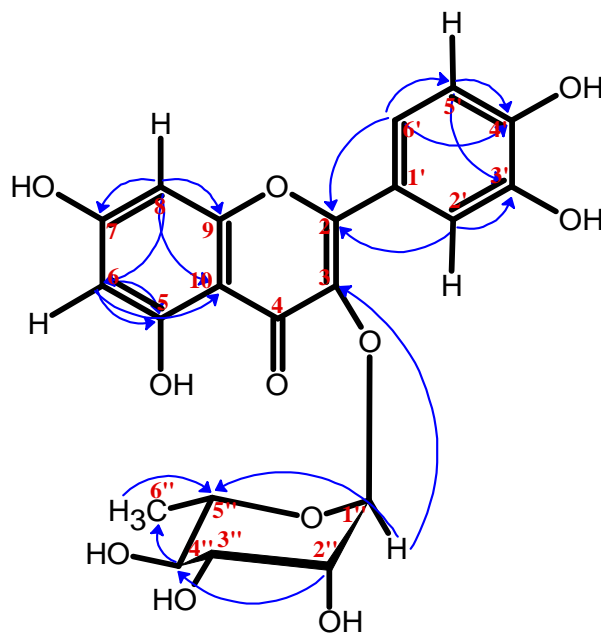


Figura 23. Principais correlações observadas nos experimentos de gHMBC para **4**.

Tabela 6. Dados de RMN ^{13}C e ^1H da substância **4** (14,1 T, $\text{DMSO-}d_6$).

Posição	$^{13}\text{C}^*$ (δ)	^1H (mult., J em HZ)	^1H	gHMBC (^1H - ^{13}C)
2	158			H-2', H-6'
3	135,2			H-1''
4	178,7			
5	162,3			H-6
6	99,5	6,20 (<i>d</i> , 1,8)		H-8
7	165,4			H-6, H-8
8	94,4	6,38 (<i>d</i> , 1,8)		H-6
9	157,5			H-8
10	104,9			H-6, H-8
1'	122,1			H-2'
2'	116,4	7,31 (<i>d</i> , 2,4)		
3'	146,2			H-5, H-6'
4'	149,5			H-5, H-6'
5'	116,2	6,87 (<i>d</i> , 8,2)		H-6'
6'	121,9	7,26 (<i>dd</i> , 8,2, 2,4)		H-5'
1''	101,7	5,26 (<i>d</i> , 1,2)		H-2''
2''	69,9	3,98 (<i>dd</i> , 1,8, 3,0)		
3''	70,3	3,51 (<i>dd</i> , 9,6, 3,6)		
4''	71,1	3,15 (<i>t</i> , 9,6, 9,0)		H-2'', H-3'', H-5'', H-1'', H-4'', H-6''
5''	70,5	3,22 (<i>m</i>)		
6''	18,37	0,82 (<i>d</i> , 6,0)		H-4''

*Os dados de RMN ^{13}C foram atribuídos com auxílio dos experimentos de gHSQC e gHMBC.

5.8. Considerações biossintéticas sobre 1-4

A aglicona dos flavonoides isolados dos caules de *Myrcia bracteata* apresentam o mesmo intermediário biossintético, sugerindo a mesma configuração absoluta para C-2 de **1-3**. A flavanona naringenina é formada pela ciclização da tetrahidroxichalcona catalisada pela enzima chalcona isomerase, que induz o fechamento estereoespecífico do anel C (adição *sin* sobre a dupla ligação *trans*) formando a (2*S*)-flavanona. E por subseqüentes etapas de ações enzimáticas as flavanonas (ex. naringenina e eriodictiol) são convertidas a outros flavonoides entre eles os dihidroflavonois, flavonóis e flavonas. Contudo, a literatura reporta o isolamento do (2*S*)-eriodictiol-7-*O*-β-D-glicosídeo juntamente com um diastereoisomero, (2*R*)-eriodictiol-7-*O*-β-D-glicosídeo (Pan *et al.*, 2008).

A substância **3** apresenta valor de desvio da luz plano-polarizada $\{[\alpha]_D^{30} = +14,94$ (c. 10 mg/mL)} em conformidade com a substância (+)-(2*R*,3*R*)-astilbina (Haiqiu *et al.*, 2011). Sugere-se portanto, que as substâncias **1** e **2** também apresentem a mesma configuração absoluta para C-2 (*R*). Sendo assim, faz-se necessário realizar as curvas de Dicroísmo Circular para as substâncias **1-3** e compará-las com as descritas na literatura (Haiqiu, 2011; Pan, 2008; Moretti, 1998).

5.9. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Myrcia* spp.

Os resultados de CS₅₀ dos extratos foram obtidos com base na análise das curvas de calibração dos extratos que apresentaram Atividade Antioxidante (AA%) acima de 50% nas concentrações de 0,1 e 0,01 mg/mL. A ANOVA utilizando o teste Tukey (p < 0,05) dos dados de CS₅₀ revelaram que os extratos não aquosos das três espécies de *Myrcia* estudadas apresentam valores abaixo do esperado como resultados de capacidade sequestrante do radical livre DPPH•, apesar disso, os espectros de RMN de ¹H desses extratos evidenciam sinais com deslocamentos químicos característicos de substâncias fenólicas/flavonoídicas (Figuras 56 - 63, pgs. 106 - 113). Os extratos aquosos das espécie apresentam os maiores valores de CS₅₀ (Figura 24, pg. 71), bem como ausência de sinais flavonoídicos nos espectros de RMN de ¹H, a boa atividade antioxidante pode estar relacionada com a presença de substâncias fenólicas nestes extratos.

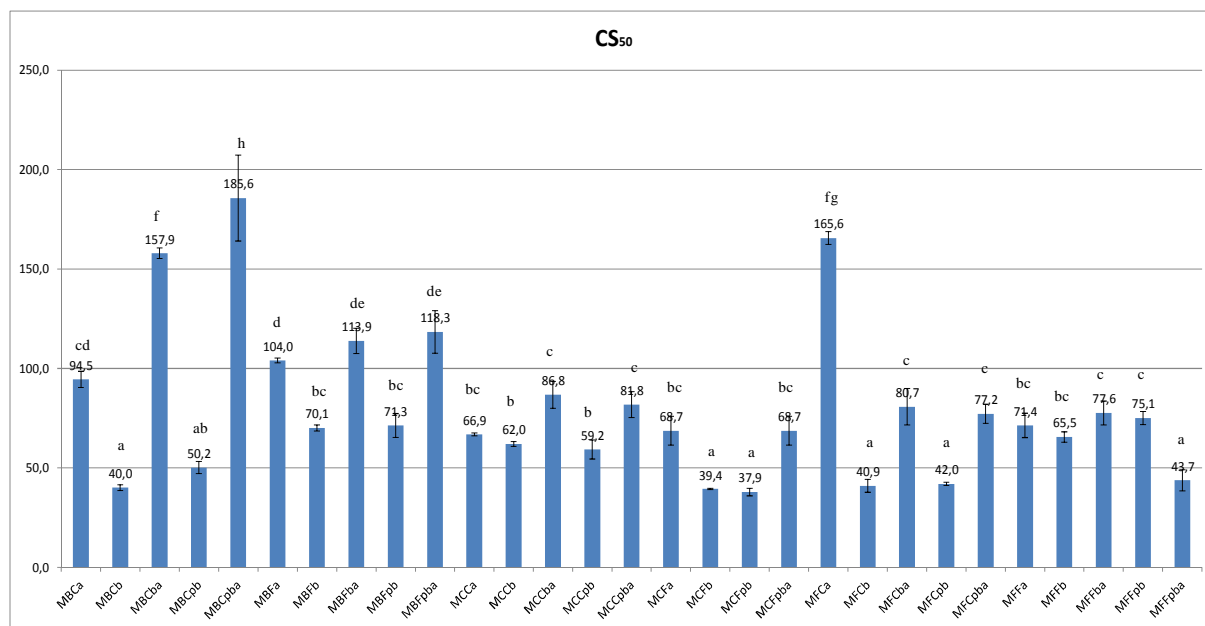


Figura 24. Valores de CS₅₀ dos extratos de *Myrcia* spp..

5.10. Avaliação do potencial hipoglicemiante das substâncias isoladas e dos extratos de *Myrcia* spp. frente a enzima α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* e de intestino de ratos.

A partir das amostras que obtiveram resposta linear de inibição enzimática de α -glucosidase, obtida do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, foi possível calcular os valores de CI₅₀ (Concentração de Inibição a 50%) (Figura 25, pg. 72). Os resultados de inibição enzimática da α -glucosidase não apresentam um padrão de resposta por tipo de sistema extrator, parte da planta ou por espécie de *Myrcia* spp.. Portanto, não foi possível realizar uma ANOVA visto que os resultados não apresentam distribuição normal. A análise do gráfico (Figura 25) evidenciou que o extrato MBFpba e a substância **1** apresentam os melhores efeitos inibitórios da atividade enzimática em $20,60 \pm 0,08$ e $23,27 \pm 1,86$ %, respectivamente. O resultado observado para essa dihidroflavona corrobora com descritos na literatura, os quais evidenciam que esse flavonoide glicosilado apresenta potencial hipoglicemiante (Cho et al., 2004).

O extrato aquoso das folhas de *Myrcia fenestrata* (MFFa) foi a única amostra que apresentou resposta inibitória da atividade da enzima α -glucosidase de intestino de ratos acima de 50% (55 ± 3 % de inibição enzimática), no entanto não foram identificadas as substâncias presentes no extrato capazes de inibir a atividade enzimática. O espectro de RMN ¹H desse

extrato apresenta sinais na região característica de hidrogênio de açúcares (Figura 64, pg.114). A literatura, no entanto, relaciona a atividade inibitório de tais enzimas à presença de flavonoides, glicosídeos cianogênicos, compostos fenólicos, alcalóides, terpenóides, entre outros (Vareda et al., 2012; Vareda, P. M. P. et al., 2014; Negri, 2005).

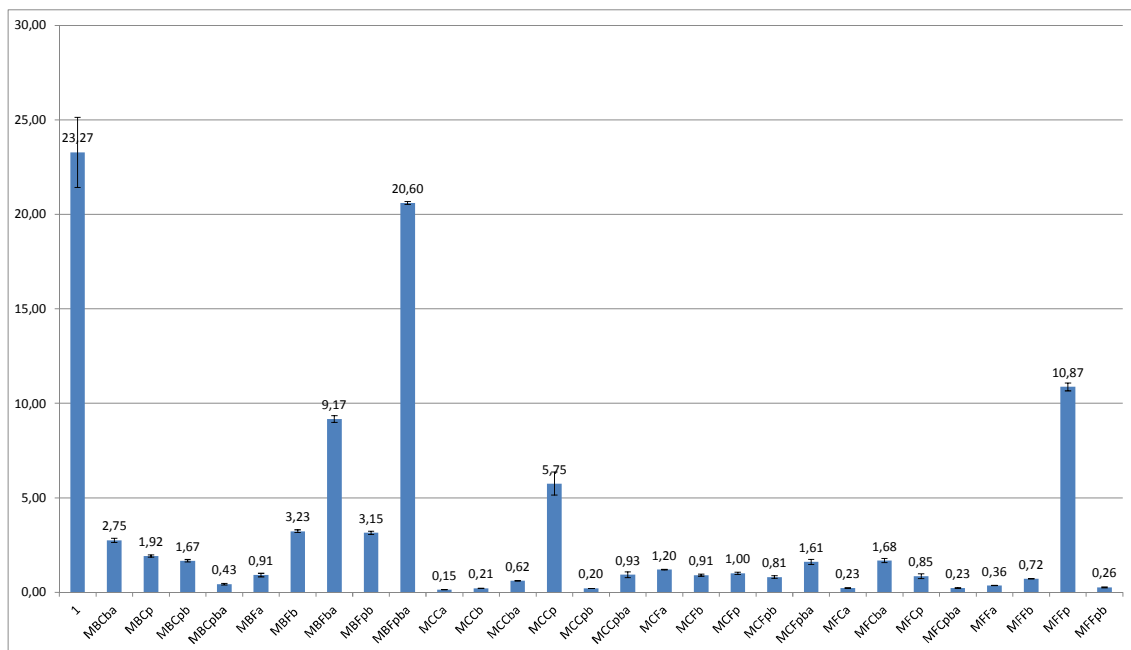


Figura 25. Valores de CI₅₀ dos extratos de *Myrcia* spp..

6. CONCLUSÃO

O estudo do perfil químico dos 35 extratos obtidos a partir de caules e de folhas de *Myrcia bracteata*, *M. citrifolia* e *M. fenestrata* empregando métodos cromatográficos e espectrométricos, assistidos por ferramentas quimiométricas, mostrou-se eficiente na seleção da espécie e dos extratos ricos em flavonoides glicosilados. Os extratos em acetato de etila de caules e de folhas de *M. bracteata* apresentaram baixo rendimento em massa e baixa complexidade química o que os tornou propício ao fracionamento cromatográfico. Conclui-se que, utilizando o solvente acetato de etila e aumentando o tempo de extração poder-se-á melhorar os rendimentos obtidos para esses dois extratos.

O método cromatográfico de isolamento mostrou-se eficiente para o isolamento de duas dihidroflavonas [naringenina-7-*O*-glucosídeo (**1**) e eriodictiol-7-*O*-glucosídeo (**2**)], um dihidroflavonol (astilbina, **3**) e um flavonol (quercitrina, **4**) a partir dos extratos de caules e de folhas de *M. bracteata*, cujas as estruturas química foram identificadas com base principalmente nas análises por RMN 1D, 2D e EM. Os flavonoides **1** e **2**, bem como **3** e **4** apresentam tempos de retenção cromatográficos muito próximos, justificando o emprego de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

A análise estatística dos resultados da capacidade sequestrante frente ao radical livre DPPH• evidenciou que os extratos etanólicos possuem uma maior atividade antioxidante em relação aos extratos aquosos de *Myrcia* spp., o que pode ser explicado em parte pela presença majoritária de substâncias fenólicas/flavonoídicas nesses extratos.

A partir dos resultados de inibição enzimática da α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* pode-se observar que o extrato aquoso sequencial de folhas de *Myrcia bracteata* e **1** (naringenina-7-*O*-glucosídeo) apresentam os melhores efeitos inibitórios. O resultado observado para essa dihidroflavona corrobora com descritos na literatura, os quais evidenciam que esse flavonoide glicosilado apresenta atividade hipoglicemiante (Cho et al., 2004).

Diversas espécies de *Myrcia* conhecidas como insulina vegetal e pedra-ume-caá são encontradas em vários locais da Amazônia (Silva et al., 2015), e oferecem alternativas no combate aos sintomas da hiperglicemia. Considerando o potencial hipoglicemiante descrito na literatura para algumas espécies desse gênero, entende-se a necessidade de estudos mais detalhados com as espécies *Myrcia bracteata*, *M. fenestrata* e *M. citrifolia*. Em especial a espécie *M. bracteata*, a qual evidencia os melhores potenciais antioxidante e hipoglicemiante,

bem como se mostra rica em constituintes flavonoídicos glicosilados, cujos potenciais anti-inflamatório, inseticida, antioxidante e antidiabético são significativos.

Este estudo é de grande relevância para o conhecimento científico do gênero *Myrcia*, pois descreve o isolamento e a determinação estrutural de quatro flavonoides glicosilados, sendo três ainda não identificados nesse gênero e inéditos na família Myrtaceae. É importante ressaltar que as espécies estudadas ainda não apresentam estudos químicos envolvendo seus constituintes fixos. Portanto, este trabalho contribui com o conhecimento da química de produtos naturais de matrizes vegetais da Amazônia.

ANEXO

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	3.1457	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004	Date	28 Sep 2014 12:04:32
Date Stamp	28 Sep 2014 12:04:32	File Name	C:\Users\Adriana Souza\Documents\Adriana\Adriana ^^RMN\MBCp\11\fid		
Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Owner	RMN600BIO	Points Count	32768
Receiver Gain	31.35	SW(cyclical) (Hz)	10416.67	Solvent	DMSO-d6
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	10416.35	Temperature (degree C)	29.995
				Origin	spect
				Pulse Sequence	zg
				Spectrum Offset (Hz)	4837.1948

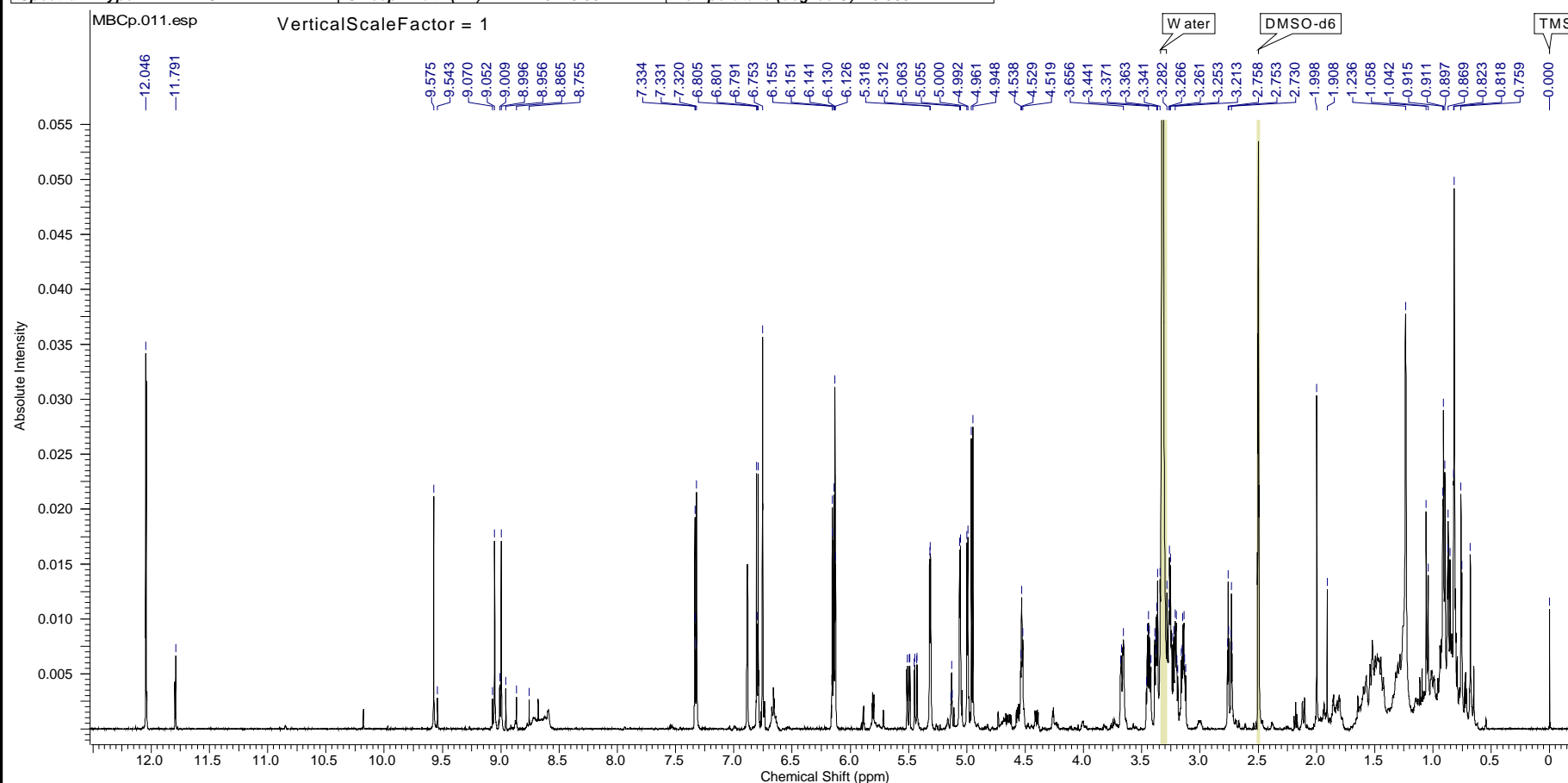


Figura 26. Espectro de RMN ¹H do extrato MBCπ.

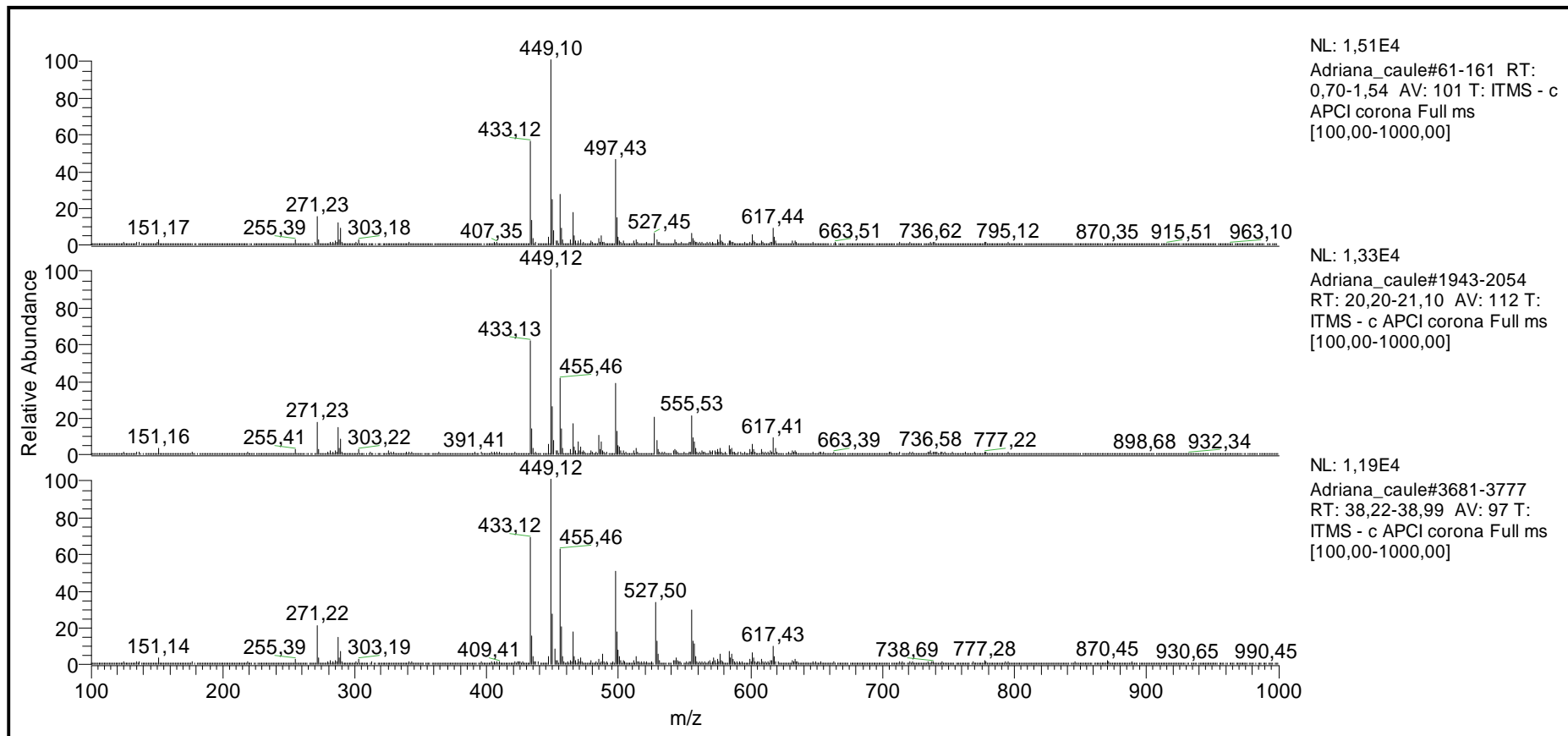


Figura 27. Espectros de Massas das triplicas do extrato MBC π .

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	3.1982	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004	Date	28 Sep 2014 13:23:28
Date Stamp	28 Sep 2014 13:23:28	File Name	C:\Users\Adriana Souza\Documents\Adriana\Adriana ^\RMN\MBFp\11\fid		
Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Owner	RMN600BIO	Points Count	32768
Receiver Gain	36.62	SW(cyclical) (Hz)	10245.90	Solvent	DMSO-d6
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	10245.59	Temperature (degree C)	30.003
				Spectrum Offset (Hz)	4756.6460

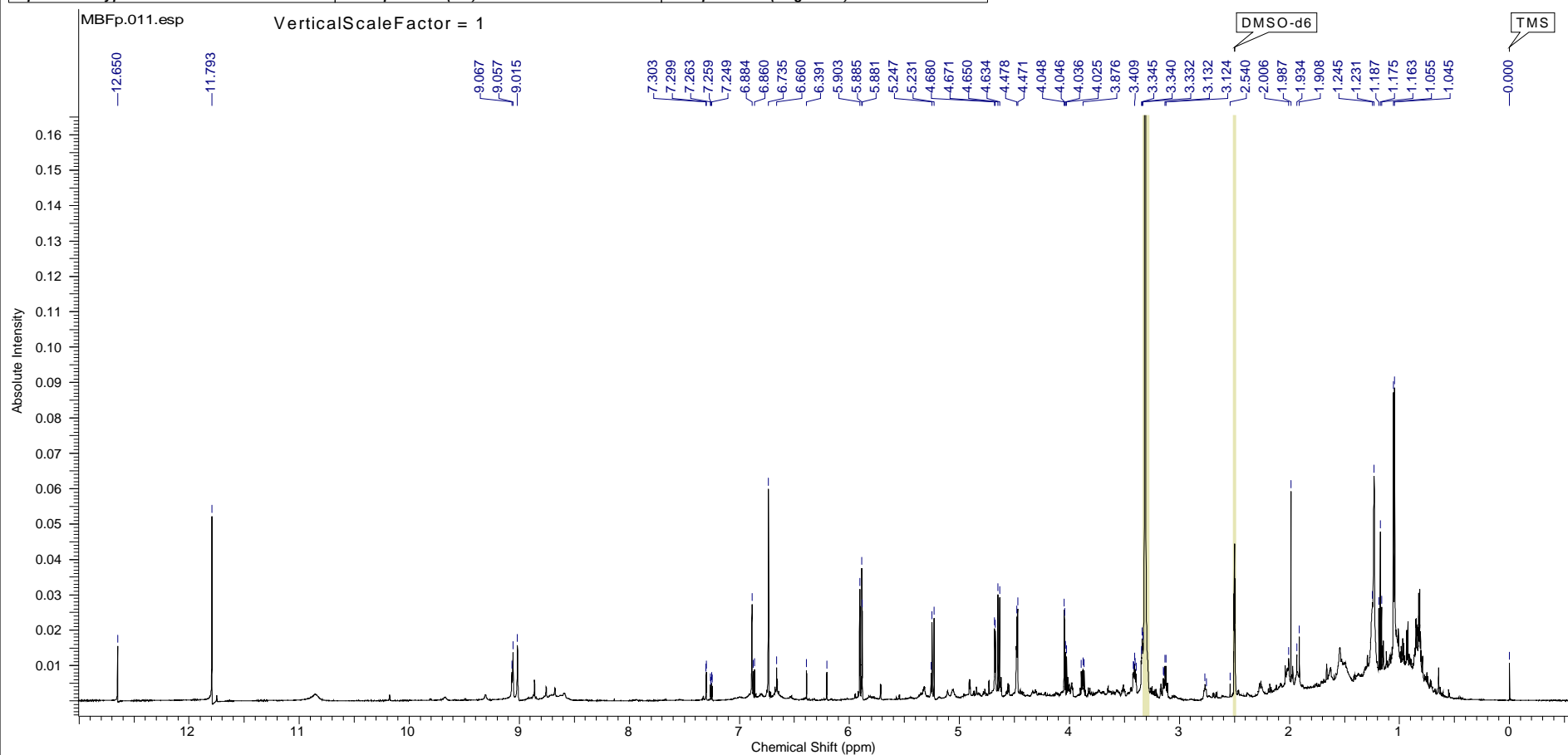


Figura 28. Espectro de RMN ¹H do extrato MBFπ.

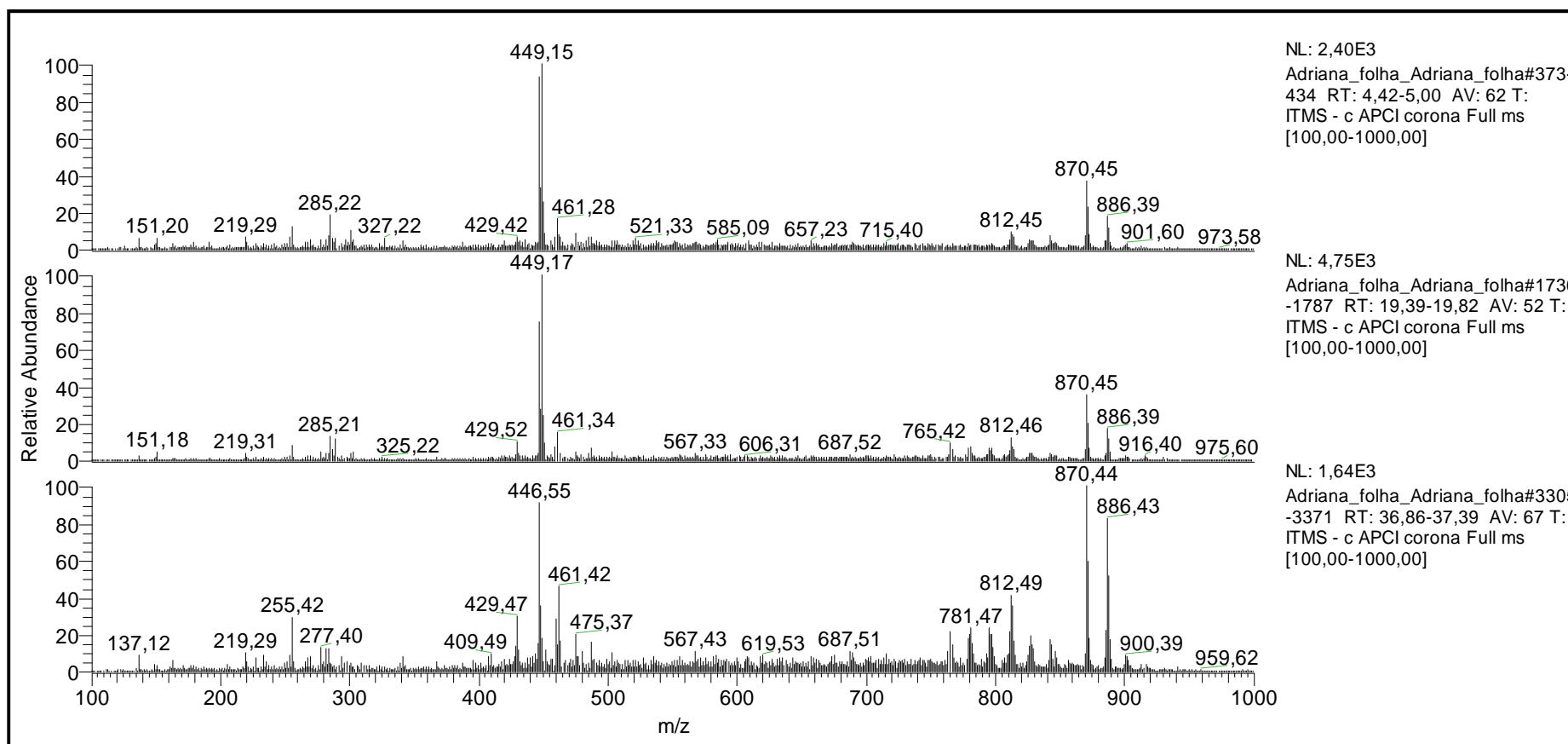


Figura 29. Perfil de Massas das triplicas do extrato MBF π .

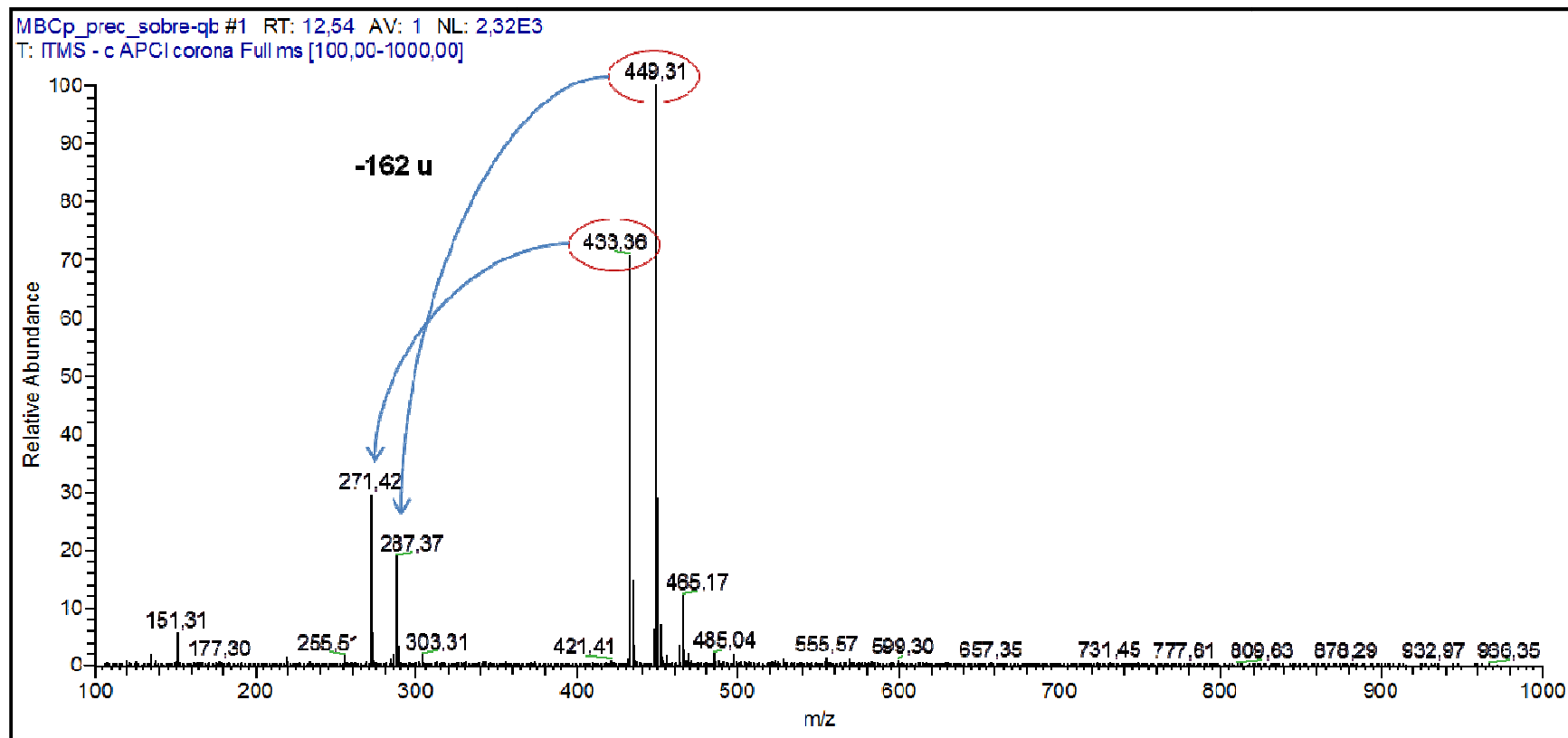


Figura 30. Espectro de Massas da fração MBC π _50%.

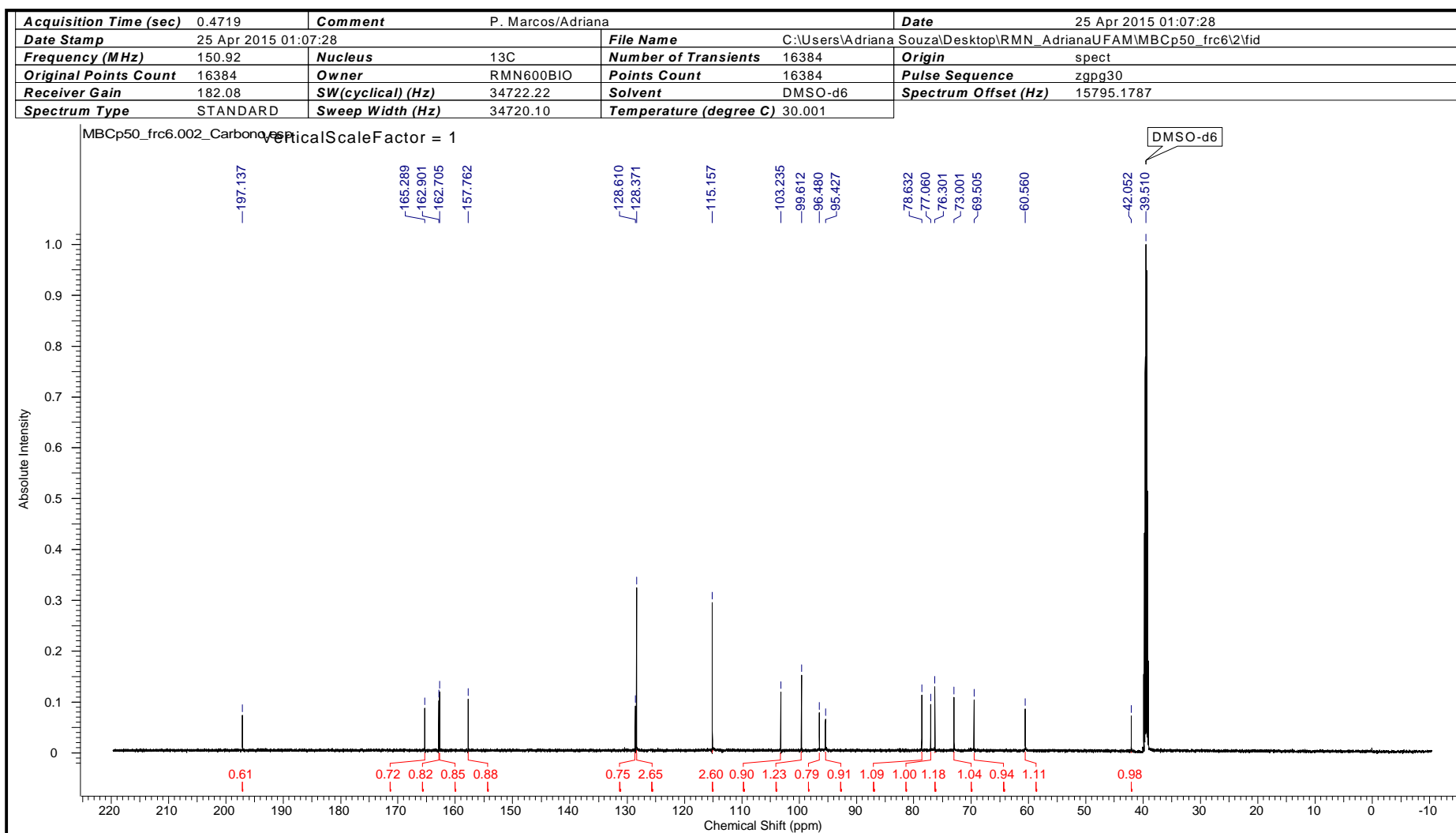


Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C da substância 1.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	(0.1106, 0.0077)	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004
Date	24 Apr 2015 19:06:42		
File Name	C:\Users\Adriana Souza\Desktop\RMN_AdrianaUFAMMBc50_frc6\200\ser		
Frequency (MHz)	(600.13, 150.92)	Nucleus	(1H, 13C)
Number of Transients	8	Origin	spect
Original Points Count	(1024, 256)	Owner	RMN600BIO
Points Count	(1024, 2048)	Pulse Sequence	hsqcetgpsisp2.2
Solvent	DMSO	Spectrum Type	HSQC
Sweep Width (Hz)	(9250.22, 33096.41)	Temperature (degree C)	30.246
Title	P. Marcos/Adriana		

MBCp50_frc6.200_2.esp

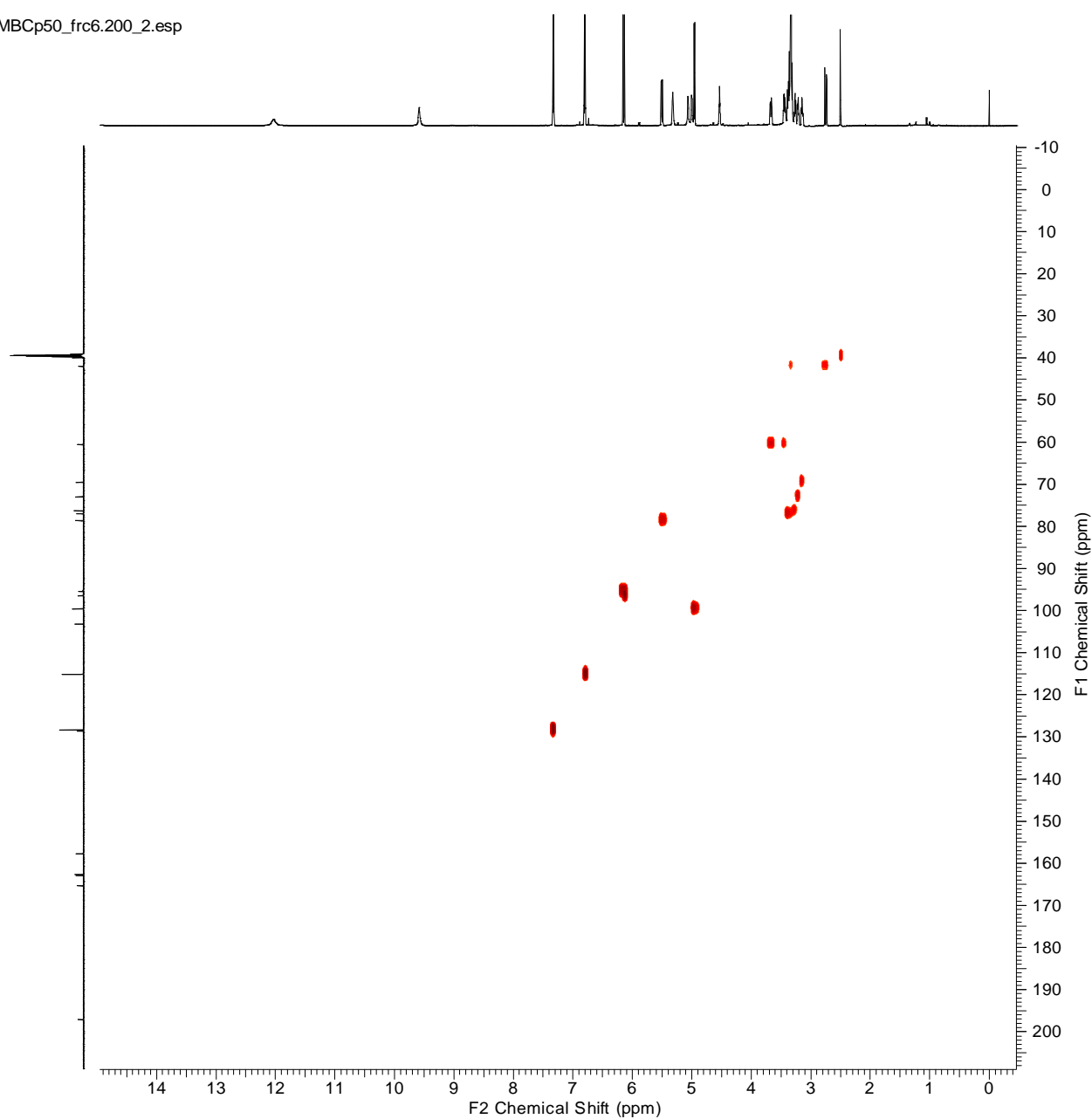


Figura 32. gHSQC da substância 1.

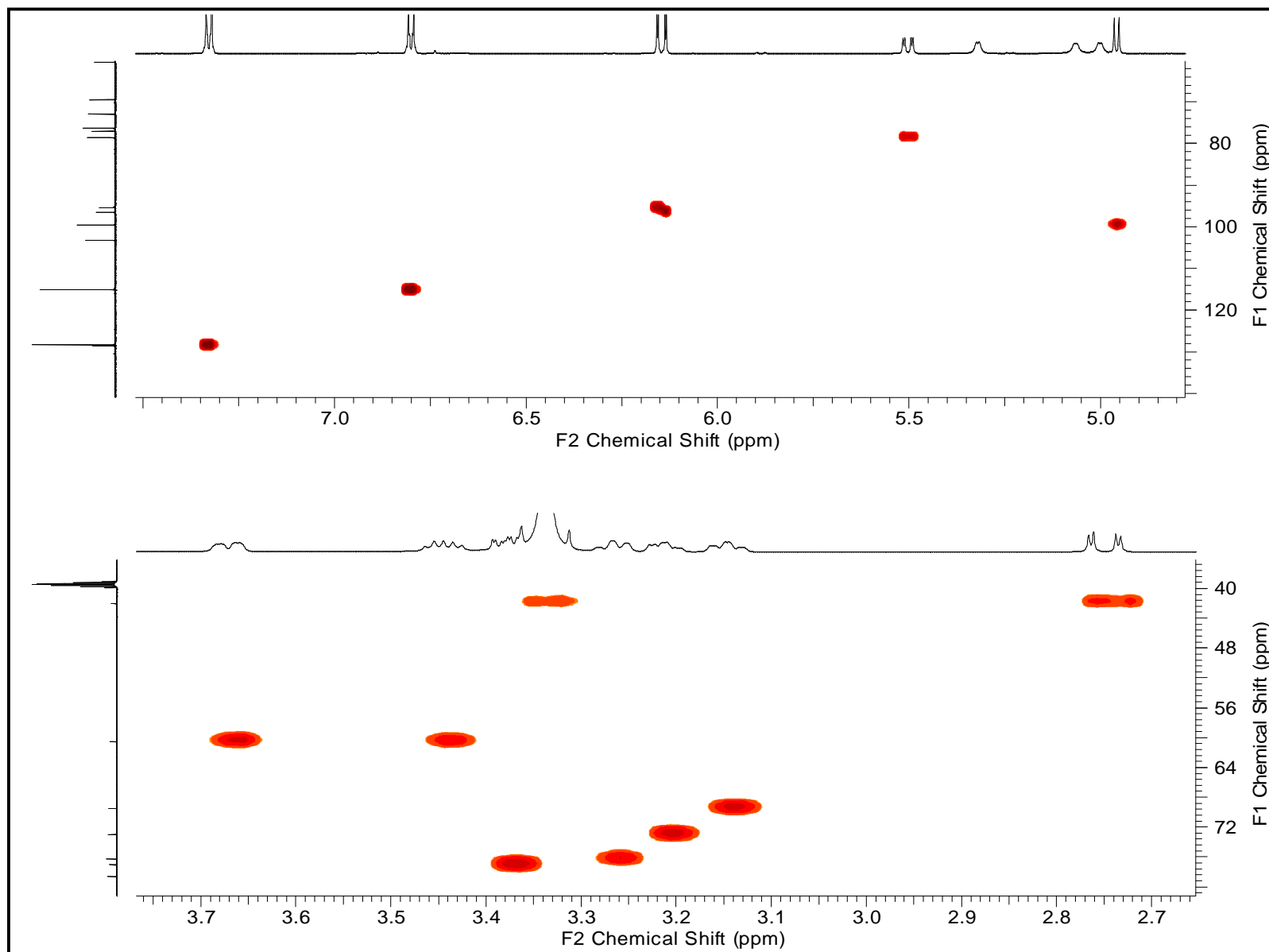


Figura 33. Ampliações das correlações por gHSQC da substância 1.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	3.5389	Comment	P. Marcos/Adriana		Date	24 Apr 2015 09:39:28			
Date Stamp	24 Apr 2015 09:39:28	File Name	C:\Users\Adriana Souza\Desktop\RMN_AdrianaUFAM\MBCp50_frc6\1\fid						
Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8	Origin	spect	Original Points Count	32768
Owner	RMN600BIO	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg	Receiver Gain	55.95	SW(cyclical) (Hz)	9259.26
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	4348.8960	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	9258.98	Temperature (degree C)	30.000

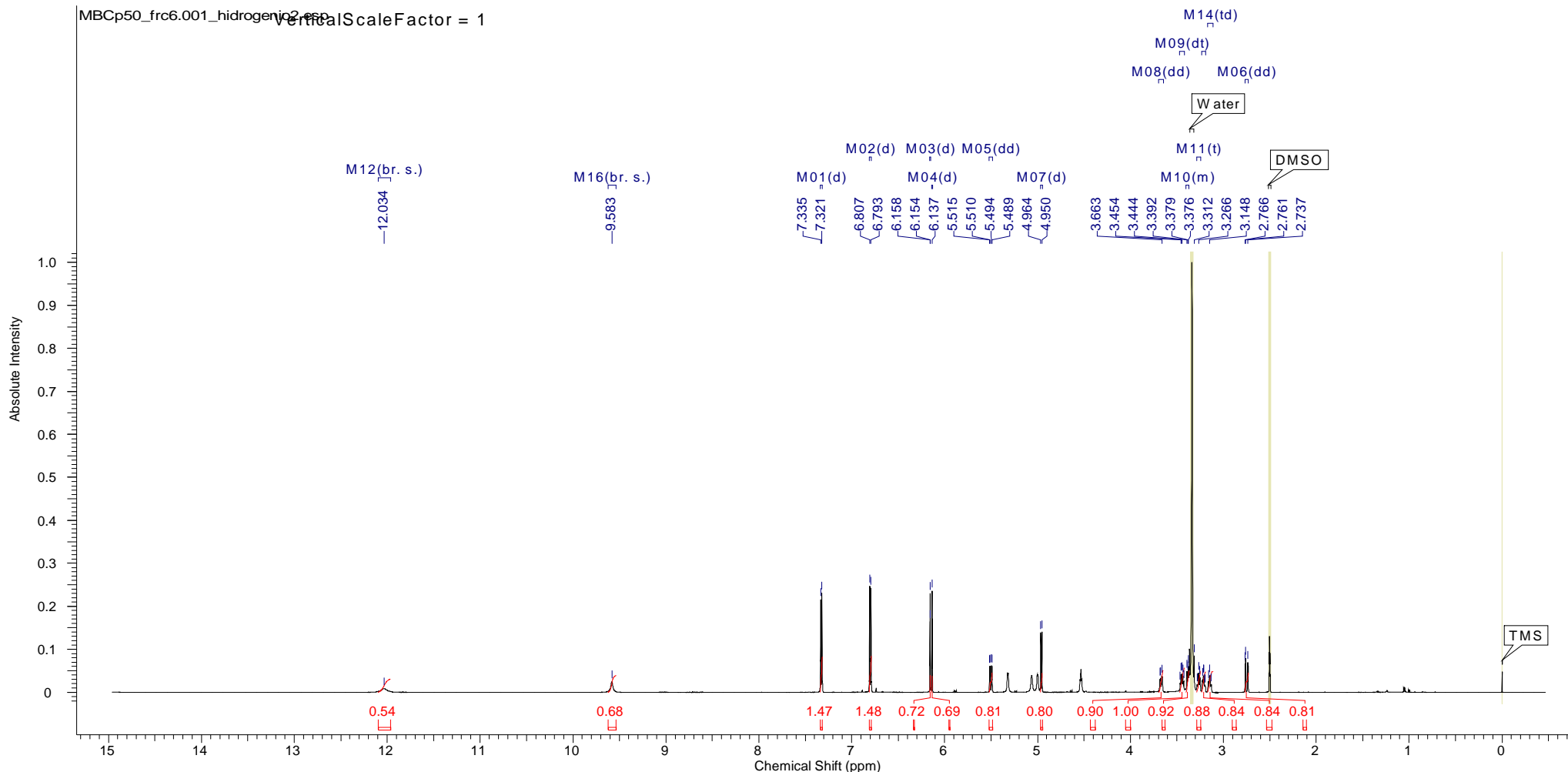


Figura 34. Espectro de RMN ^1H da substância 1.

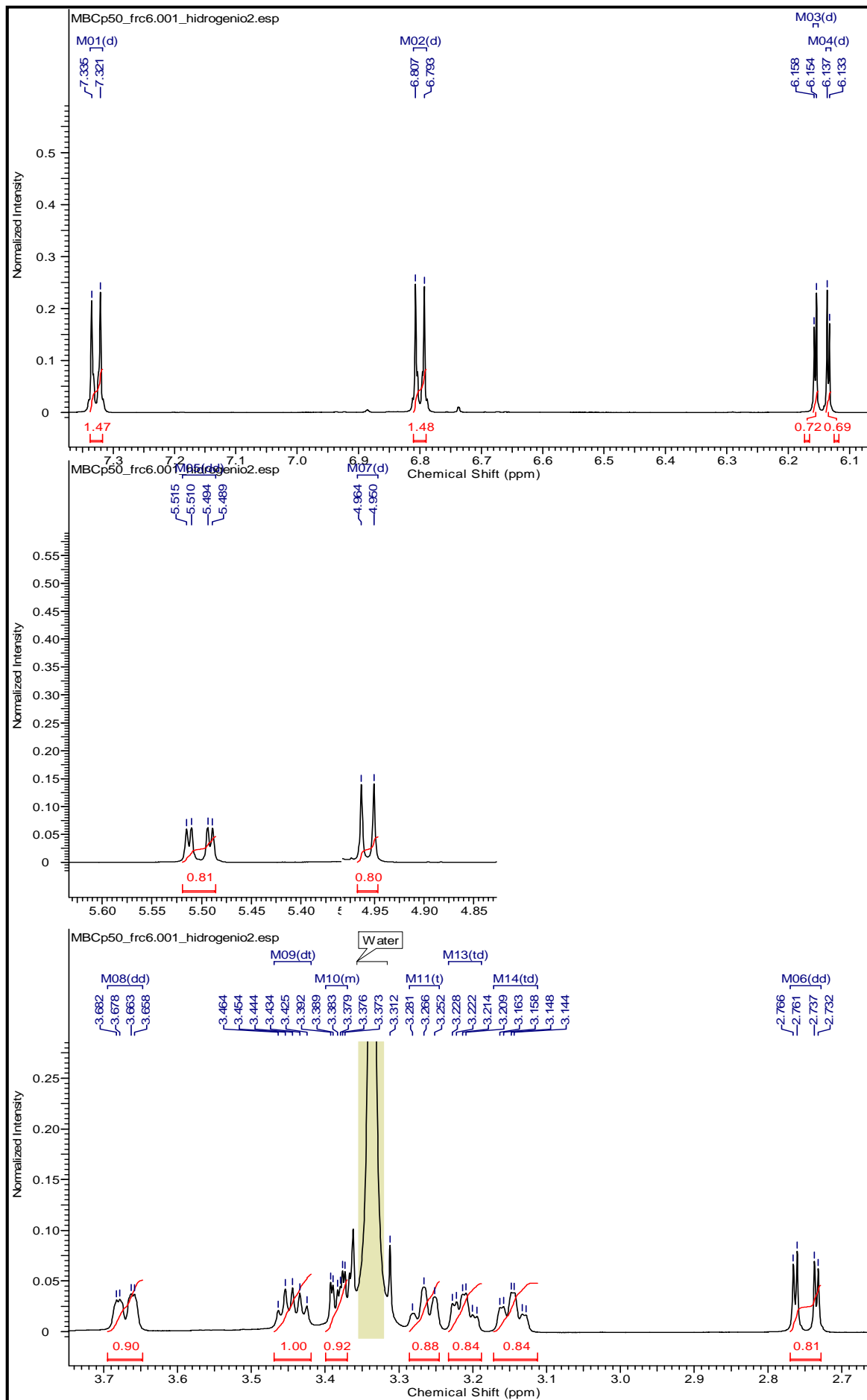


Figura 35. Ampliações do espectro de RMN ^1H da substância **1**.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	(0.1106, 0.0083)	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004
Date	24 Apr 2015 20:45:58		
File Name	C:\Users\Adriana Souza\Desktop\RMN_AdrianaUFAM\MBCp50_frc6\300\ser		
Frequency (MHz)	(600.13, 150.92)	Nucleus	(1H, 13C)
Number of Transients	16	Origin	spect
Original Points Count	(1024, 312)	Owner	RMN600BIO
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	hmbcgp1pndqf
Solvent	DMSO	Spectrum Type	HMBC
Sweep Width (Hz)	(9250.22, 37557.27)	Temperature (degree C)	29.491
Title	P. Marcos/Adriana		

MBCp50_frc6.300_2.esp

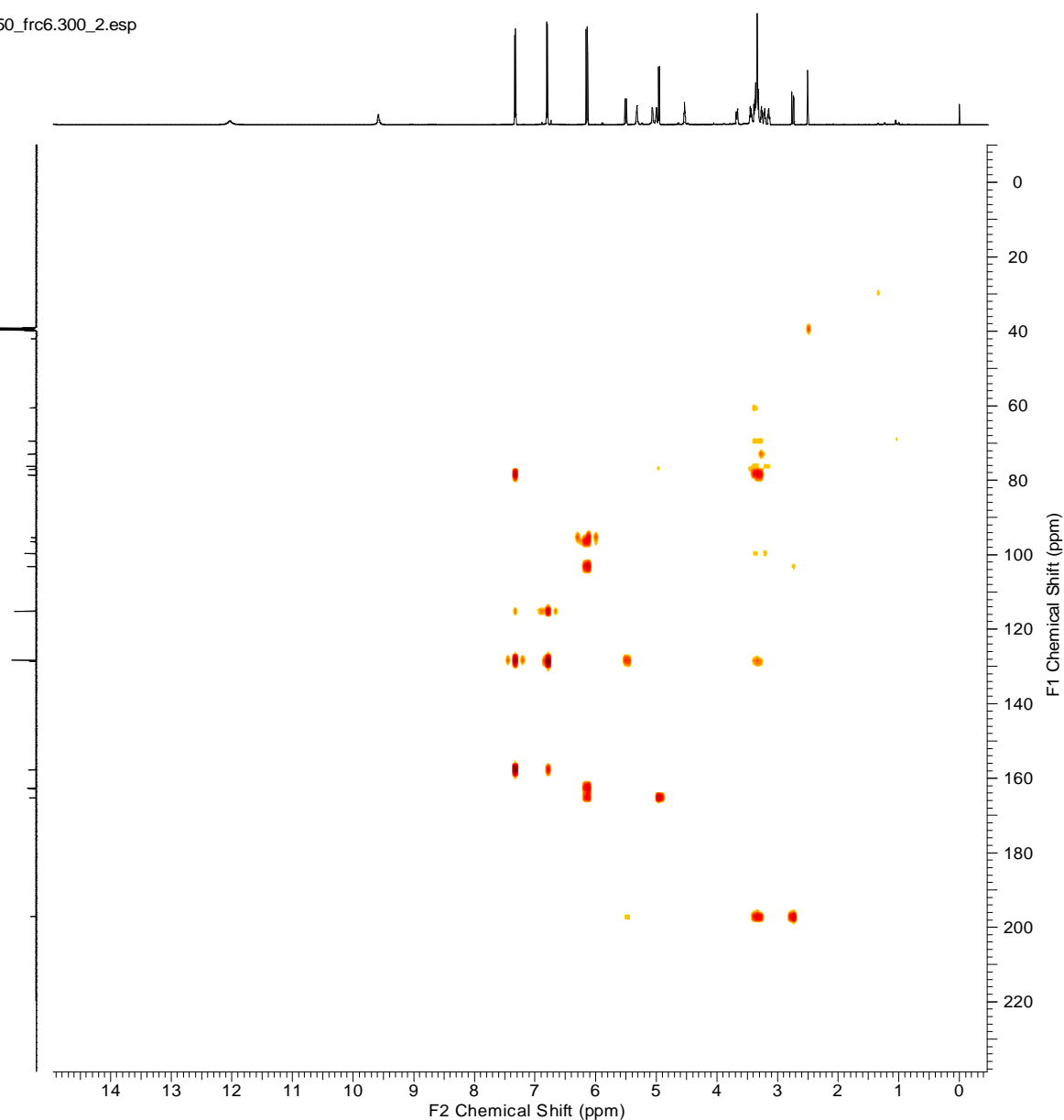


Figura 36. gHMBC da substância 1.

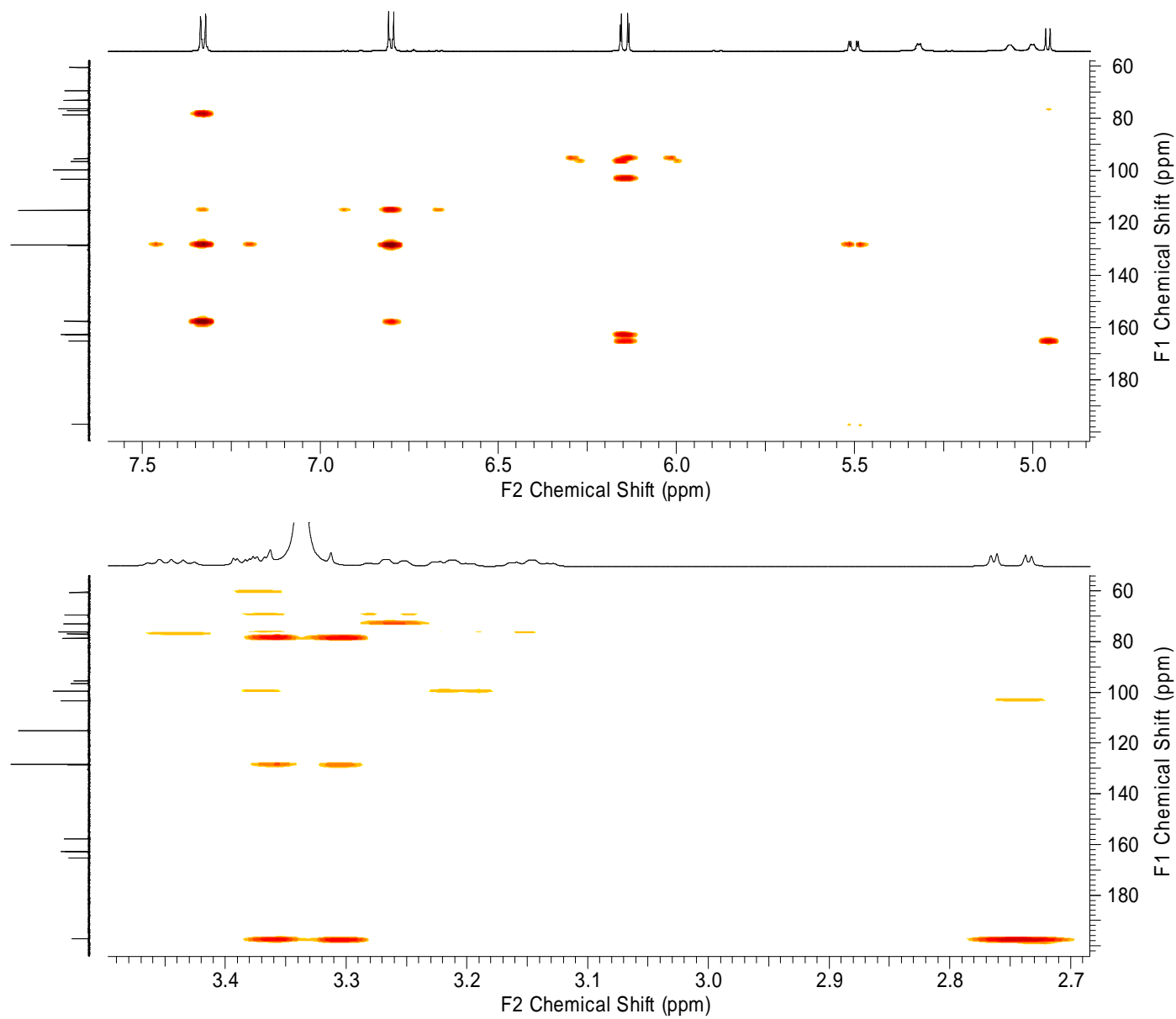


Figura 37. Ampliações das correlações por gHMBC da substância **1**.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	3.3423	Comment	P. Marcos/Adriana		Date	24 Apr 2015 09:07:28			
Date Stamp	24 Apr 2015 09:07:28		File Name	C:\Users\Adriana Souza\Desktop\RMN_AdrianaUFAM\MBCp50_frc51\fid					
Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Owner	RMN600BIO	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg	Receiver Gain	51.80	SW(cyclical) (Hz)	9803.92
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	4672.6304	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	9803.62	Temperature (degree C)	30.011

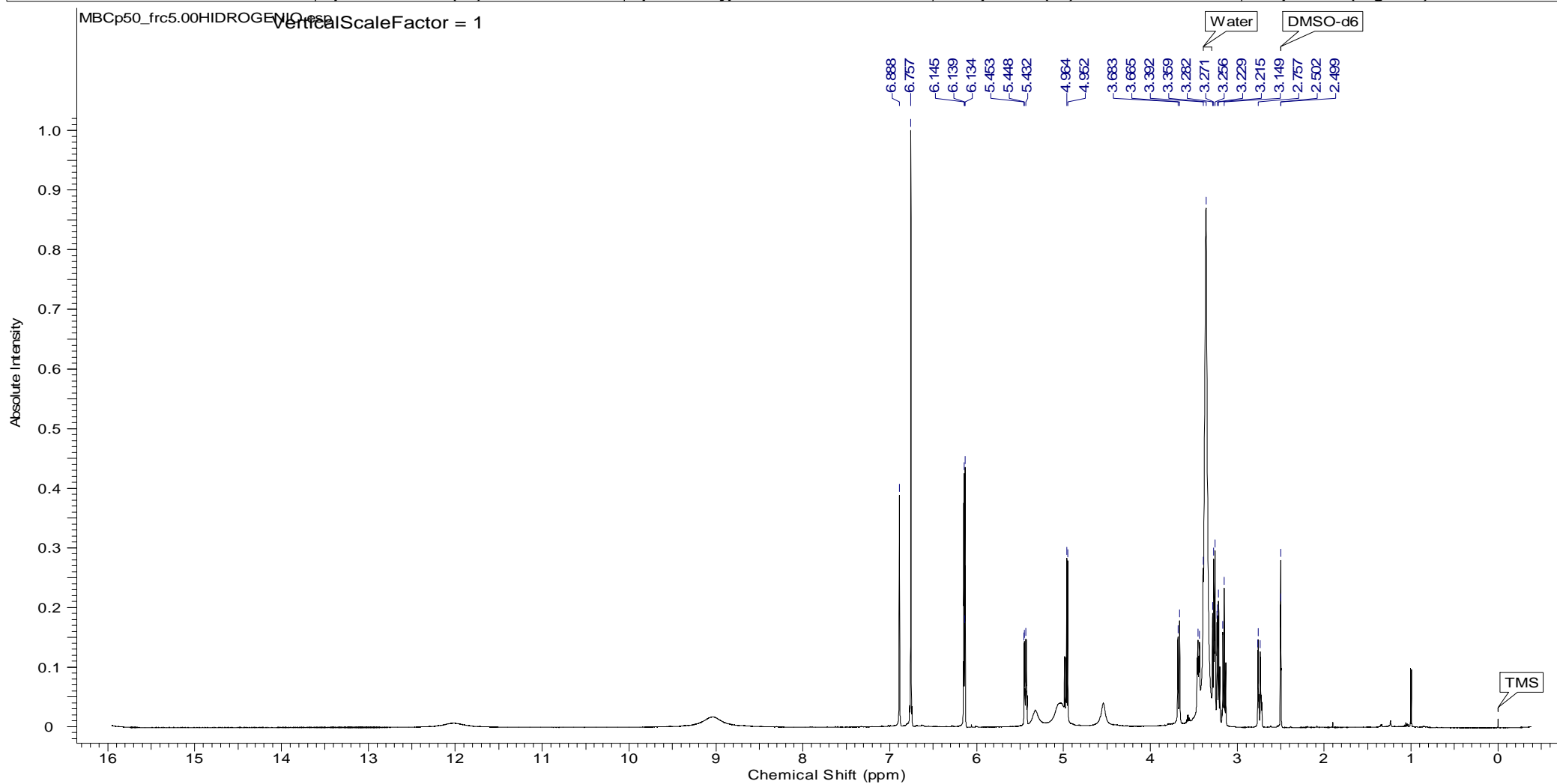


Figura 38. Espectro de RMN ^1H da substância 2.

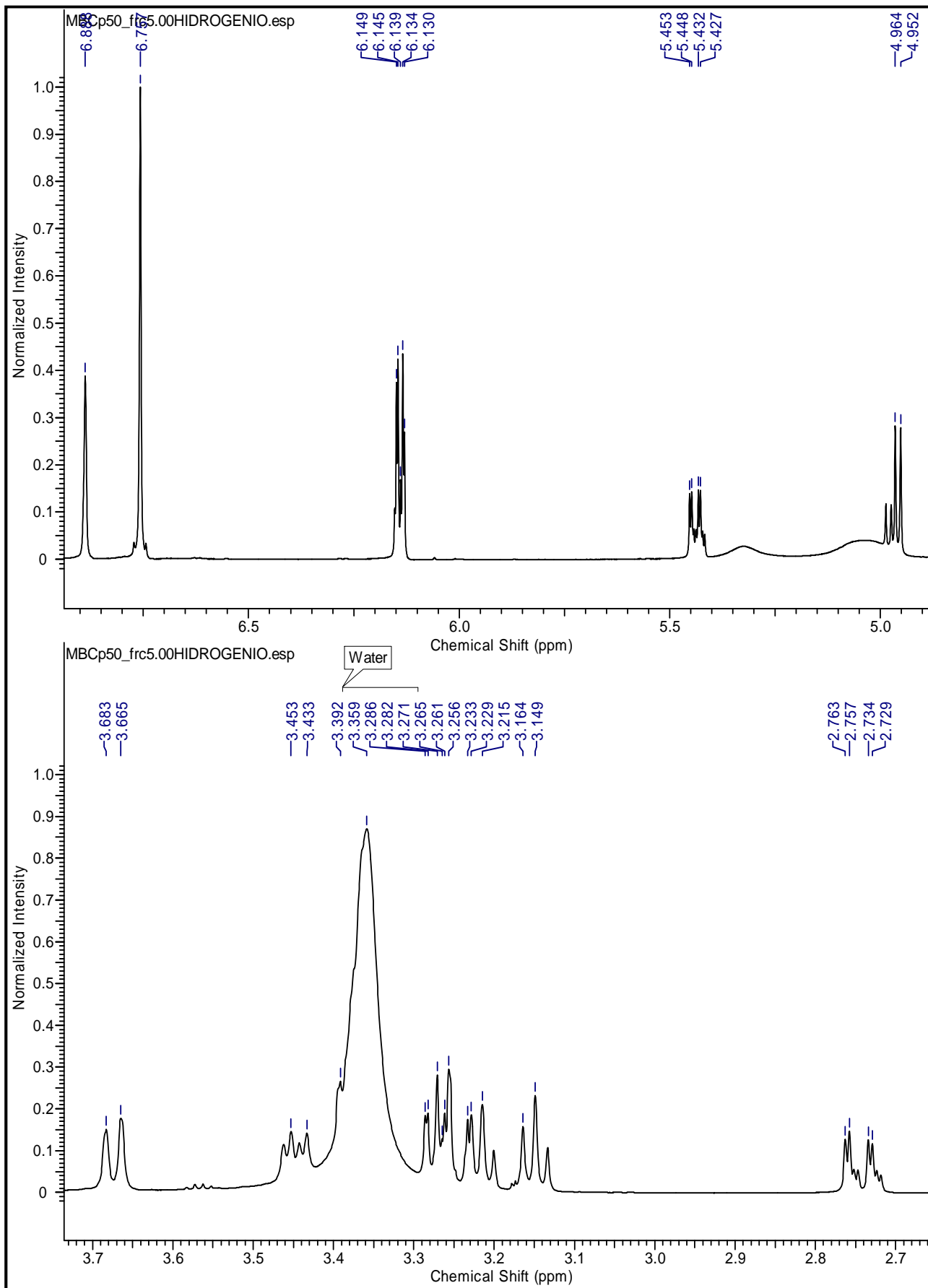


Figura 39. Ampliações do espectro de RMN ^1H da substância **2**.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	(0.1044, 0.0060)	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004
Date	24 Apr 2015 09:35:50		
File Name	C:\Users\Adriana Souza\Desktop\RMN_AdrianaUFAM\MBCp50_frc5\200\ser		
Frequency (MHz)	(600.13, 150.92)	Nucleus	(1H, 13C)
Number of Transients	8	Origin	spect
Original Points Count	(1024, 200)	Owner	RMN600BIO
Points Count	(1024, 2048)	Pulse Sequence	hsqcetgpsisp2.2
Solvent	DMSO	Spectrum Type	HSQC
Sweep Width (Hz)	(9794.35, 33096.41)	Temperature (degree C)	30.185
Title	P. Marcos/Adriana		

MBCp50_frc5.200.esp

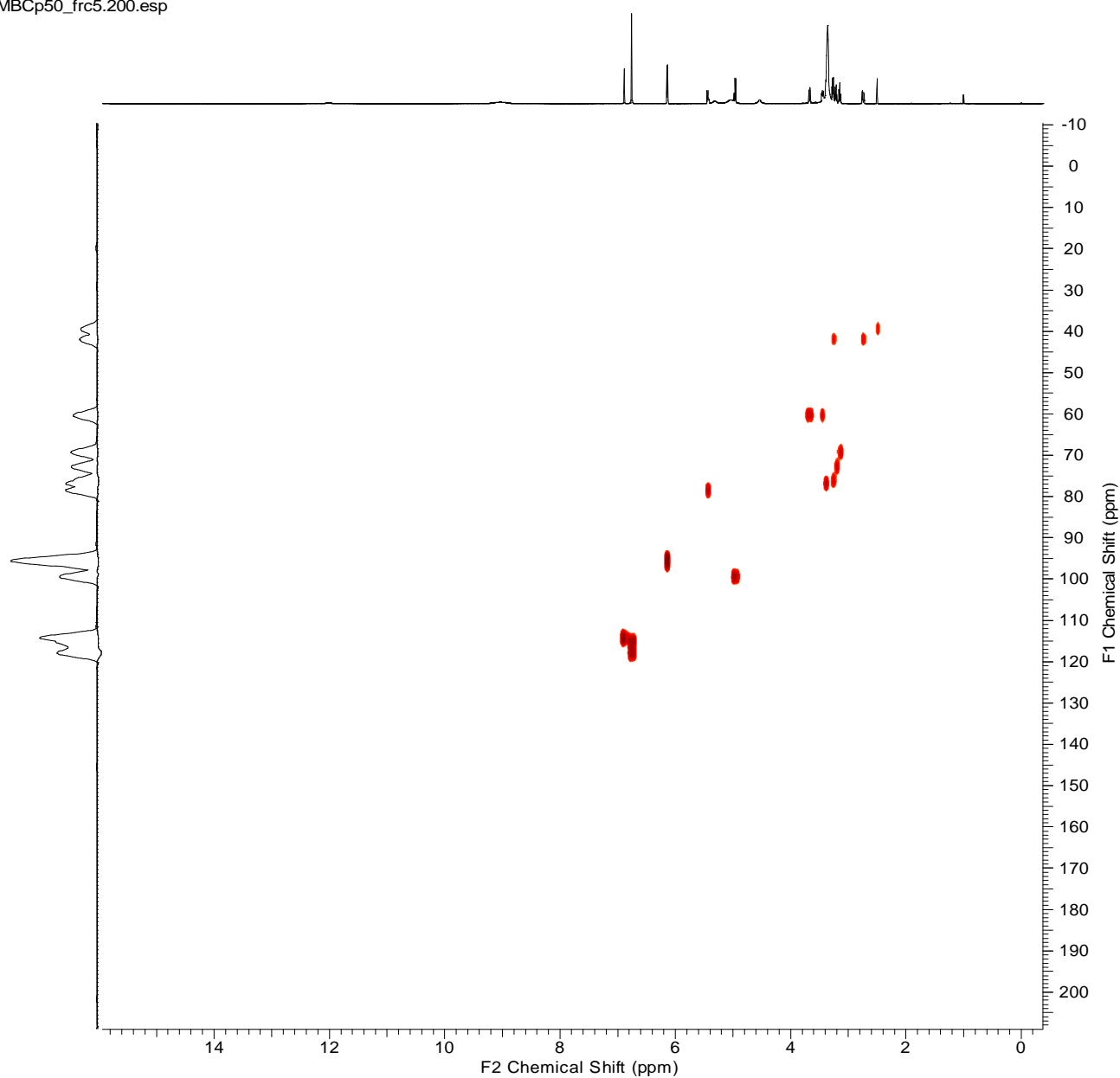


Figura 40. gHSQC da substância 2.

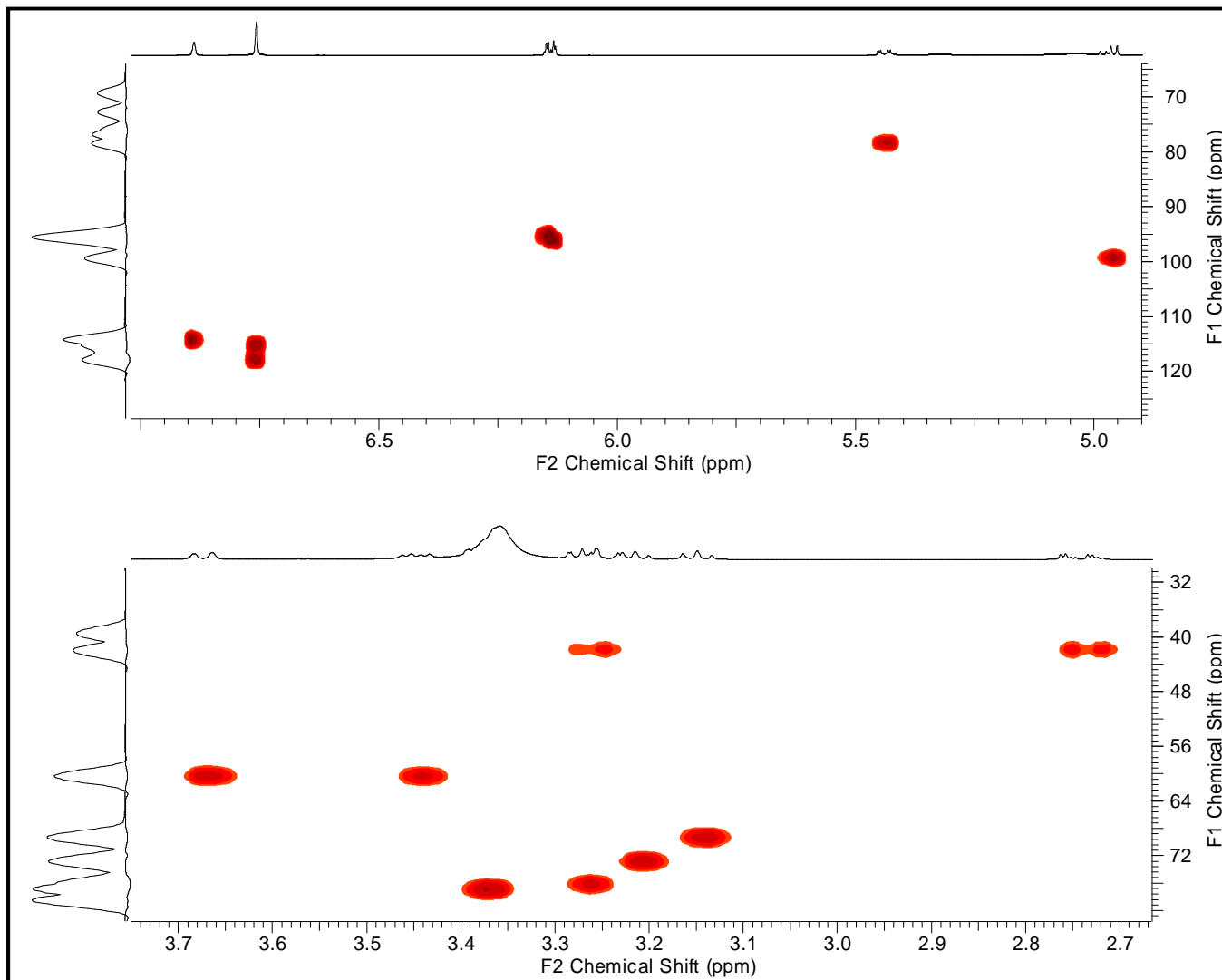


Figura 41. Ampliações das correlações por gHSQC da substância **2**.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	(0.1044, 0.0059)	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004
Date	24 Apr 2015 10:46:30		
File Name	C:\Users\Adriana Souza\Desktop\RMN_AdrianaUFAMMBc50_frc5\300\ser		
Frequency (MHz)	(600.13, 150.92)	Nucleus	(1H, 13C)
Number of Transients	16	Origin	spect
Original Points Count	(1024, 223)	Owner	RMN600BIO
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	hmbcgpplpndqf
Solvent	DMSO	Spectrum Type	HMBC
Sweep Width (Hz)	(9794.35, 37557.27)	Temperature (degree C)	29.502
Title	P. Marcos/Adriana		

MBCp50_frc5.300.esp

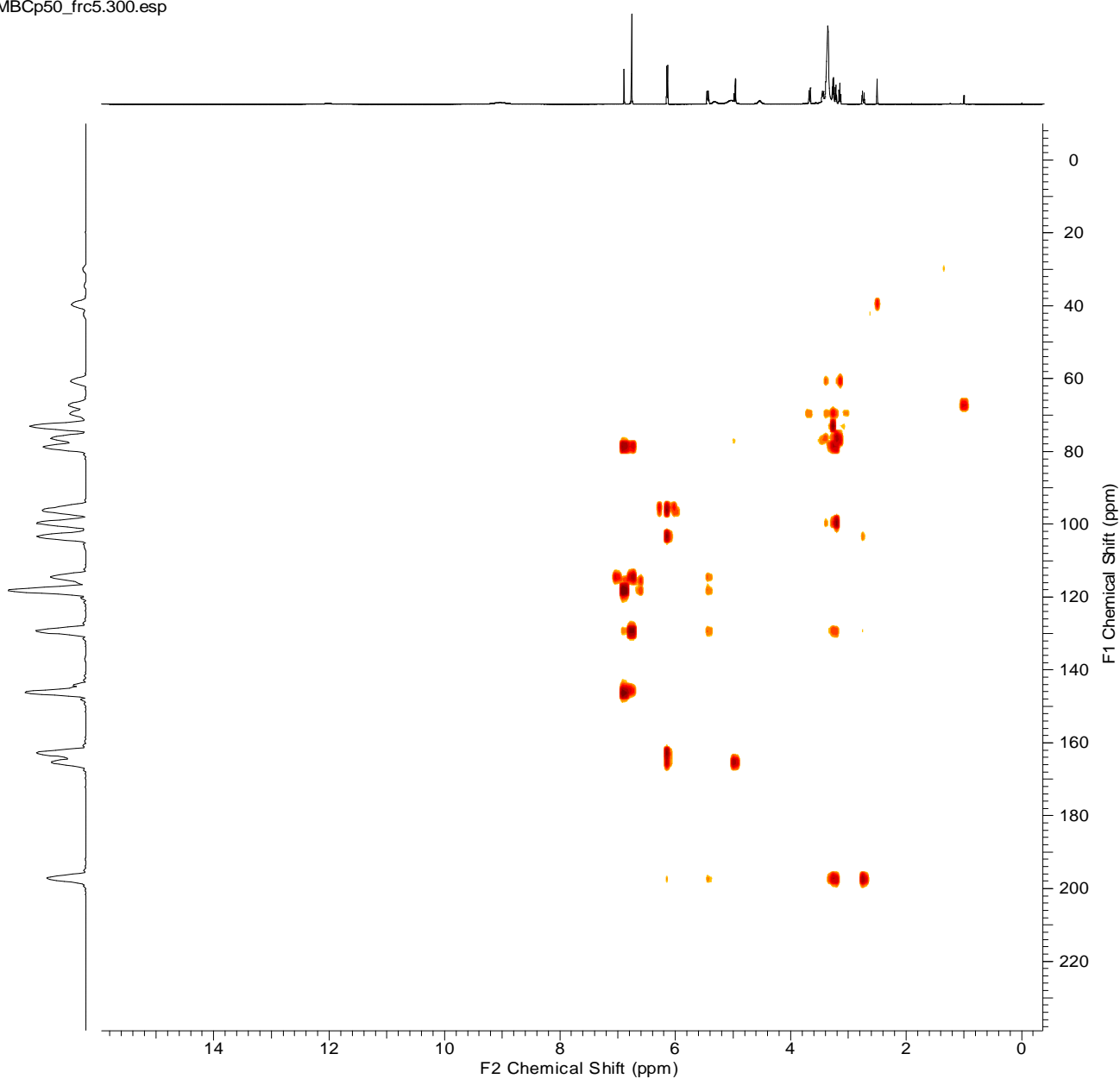


Figura 42. gHMBC da substância 2.

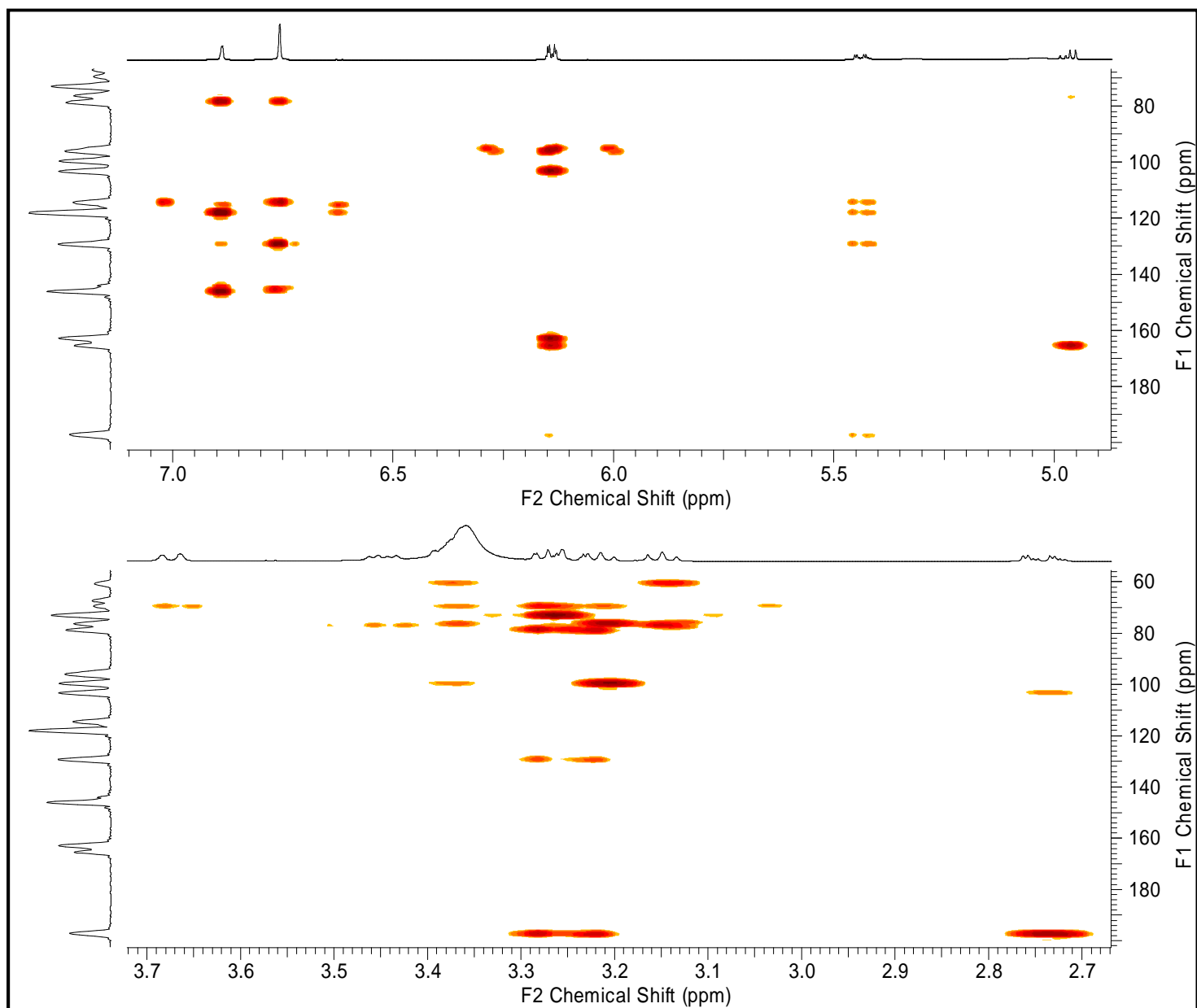


Figura 43. Ampliações das correlações por gHMBC da substância **2**.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	3.3161	Comment	P. Marcos/Adriana		Date	24 Apr 2015 09:33:04			
Date Stamp	24 Apr 2015 09:33:04		File Name	C:\Users\Adriana Souza\Desktop\RMN_AdrianaUFAMMBFp_frc3\1fid					
Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Owner	RMN600BIO	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg	Receiver Gain	118.73	SW(cyclical) (Hz)	9881.42
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	4647.1455	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	9881.12	Temperature (degree C)	30.002

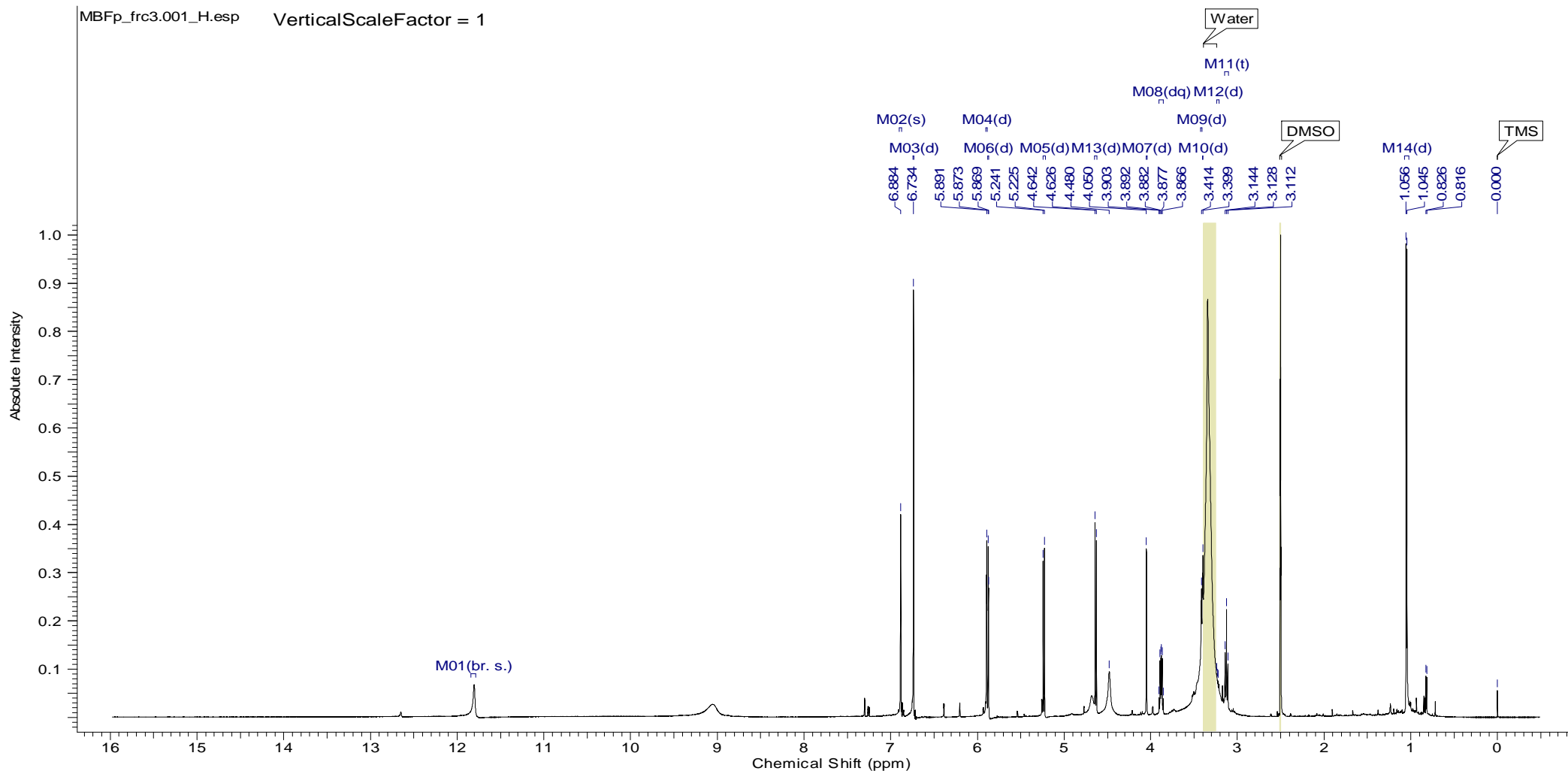


Figura 44. Espectro de RMN ^1H da substância 3.

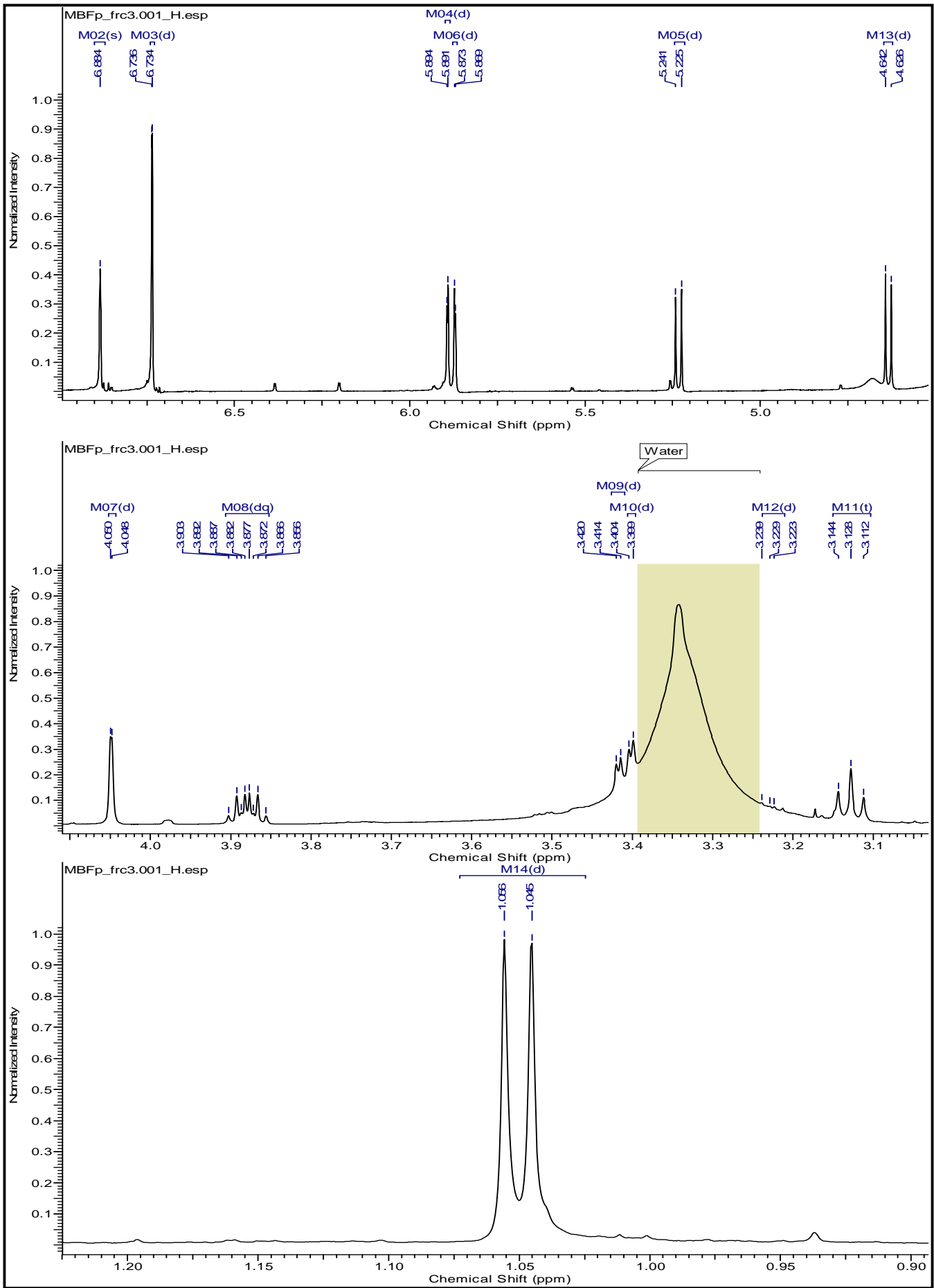


Figura 45. Ampliações do espectro de RMN ^1H da substância 3.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	(0.1036, 0.0077)	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004
Date	24 Apr 2015 16:02:22		
File Name	C:\Users\Adriana Souza\Desktop\RMN_AdrianaUFAMMBFp_frc3\200\ser		
Frequency (MHz)	(600.13, 150.92)	Nucleus	(1H, 13C)
Number of Transients	8	Origin	spect
Original Points Count	(1024, 256)	Owner	RMN600BIO
Points Count	(1024, 2048)	Pulse Sequence	hsqcetgpsisp2.2
Solvent	DMSO	Spectrum Type	HSQC
Sweep Width (Hz)	(9871.77, 33096.41)	Temperature (degree C)	30.181
Title	P. Marcos/Adriana		

hsqc.esp

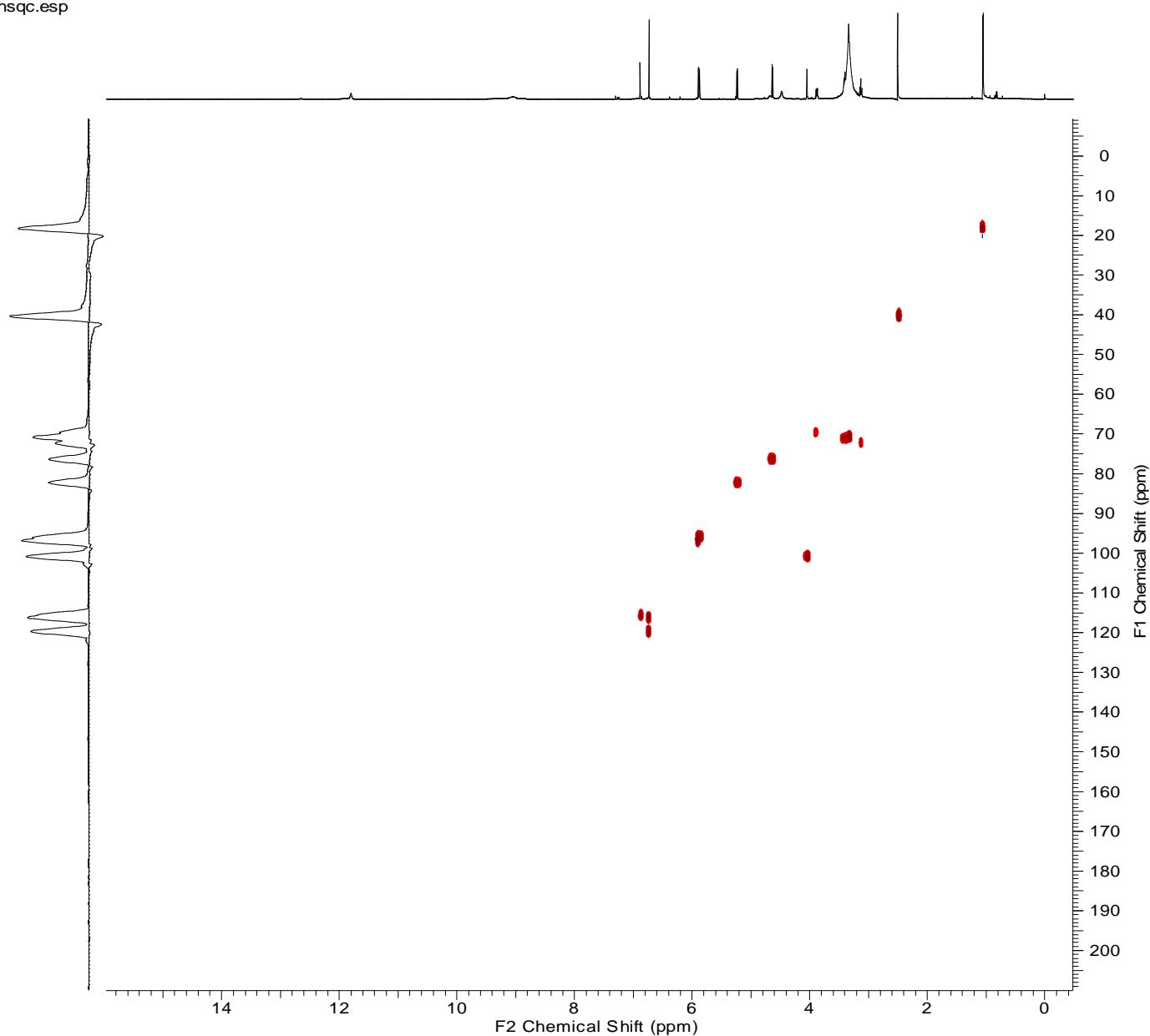


Figura 46. gHSQC da substância 3.

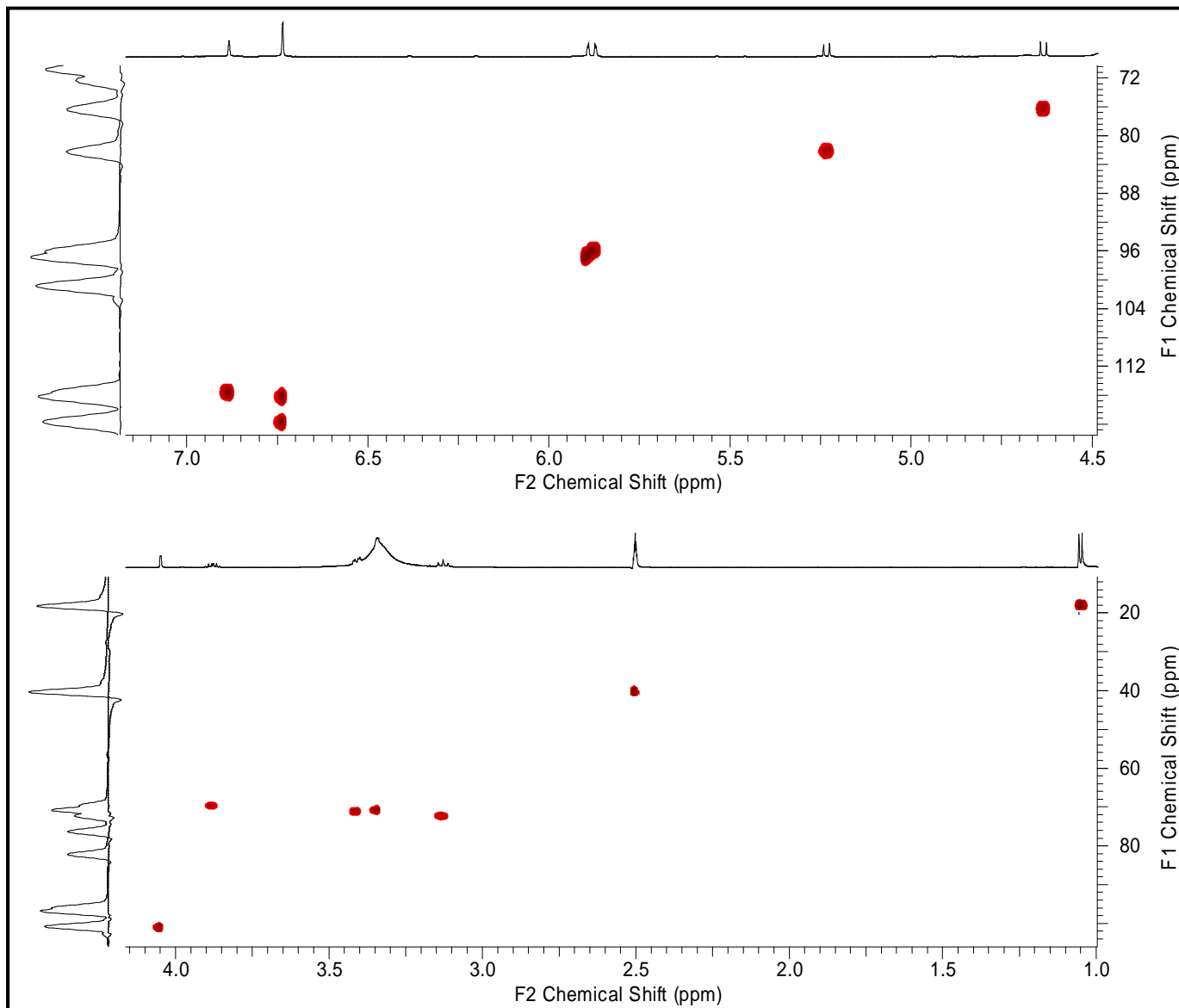


Figura 47. Ampliações das correlações por gHSQC da substância **3**.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	(0.1036, 0.0083)	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004
Date	24 Apr 2015 17:41:02		
File Name	C:\Users\Adriana Souza\Desktop\RMN_AdrianaUFAMMBFp_frc3\300\ser		
Frequency (MHz)	(600.13, 150.92)	Nucleus	(1H, 13C)
Number of Transients	16	Origin	spect
Original Points Count	(1024, 312)	Owner	RMN600BIO
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	hmbcgplpndqf
Solvent	DMSO	Spectrum Type	HMBC
Sweep Width (Hz)	(9871.77, 37557.27)	Temperature (degree C)	29.514
Title	P. Marcos/Adriana		

hmbc.esp

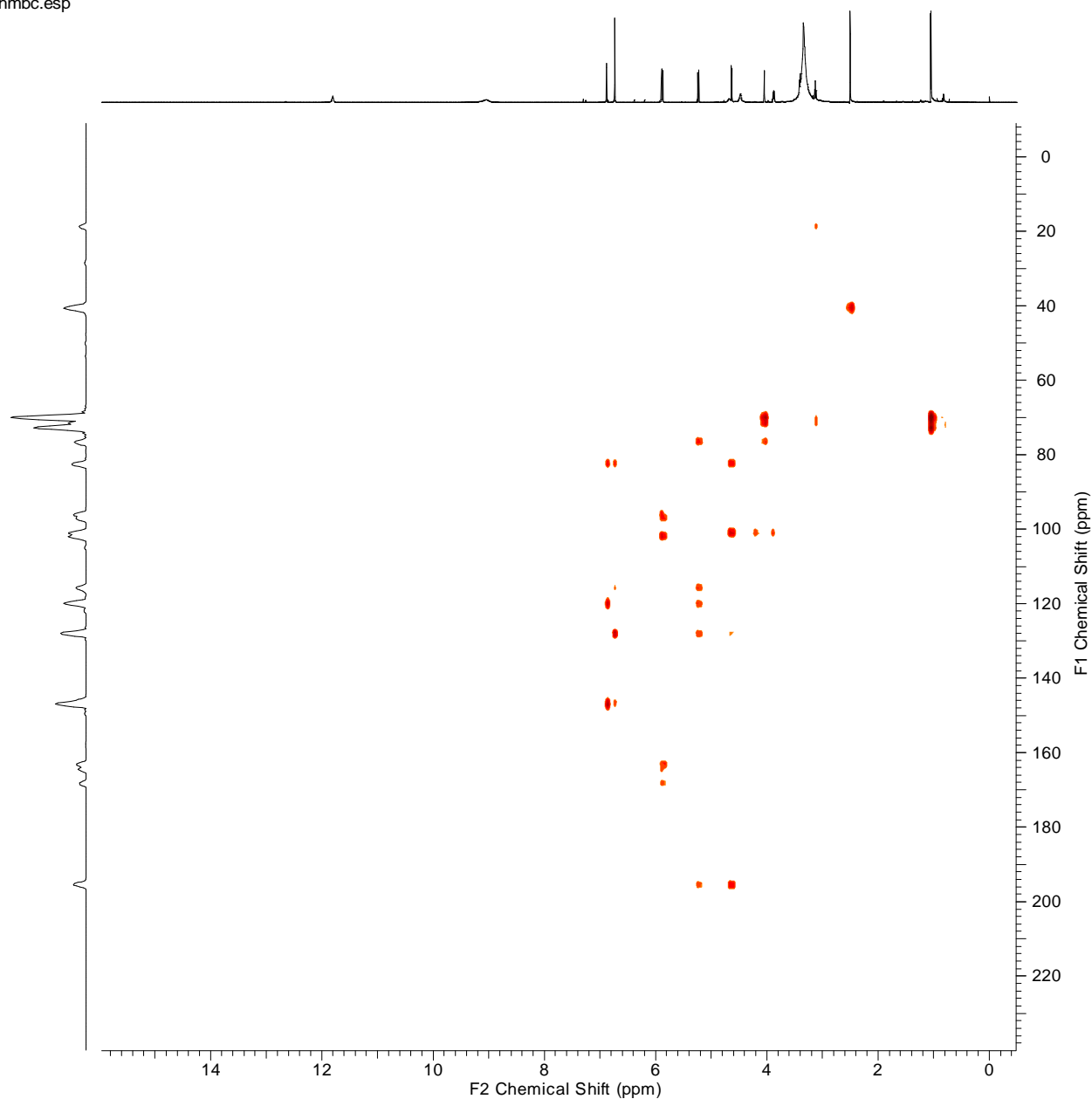


Figura 48. gHMBC da substância 3.

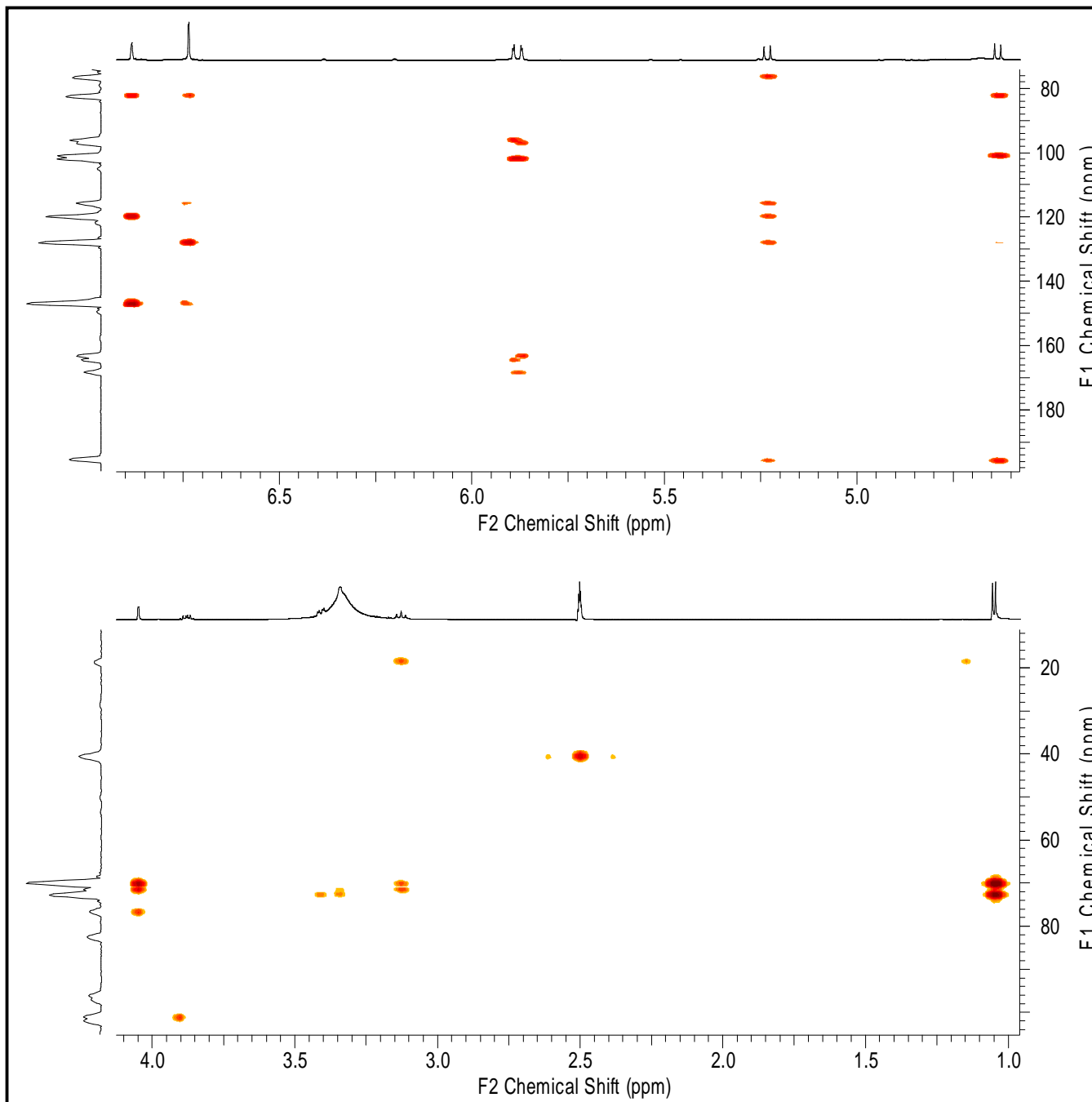


Figura 49. Ampliações das correlações por gHMBC da substância **3**.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	3.3030	Comment	P. Marcos/Adriana		Date	24 Apr 2015 09:24:32			
Date Stamp	24 Apr 2015 09:24:32	File Name	C:\Users\Adriana Souza\Desktop\RMN_AdrianaUFAM\MBFp_frc4\1\fid						
Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Owner	RMN600BIO	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg	Receiver Gain	118.73	SW(cyclical) (Hz)	9920.63
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	4640.1553	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	9920.33	Temperature (degree C)	30.005

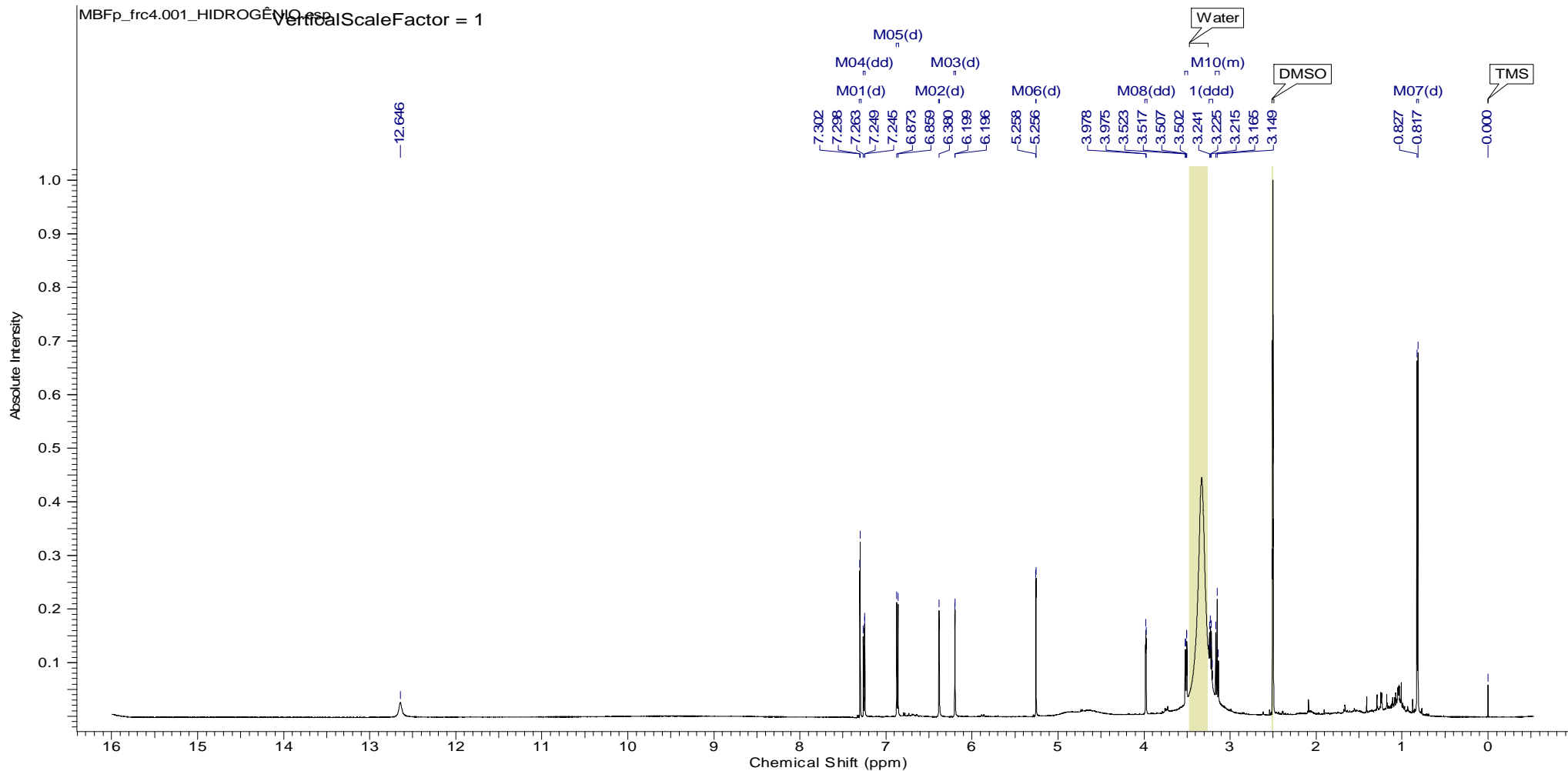


Figura 50. Espectro de RMN ^1H da substância 4.

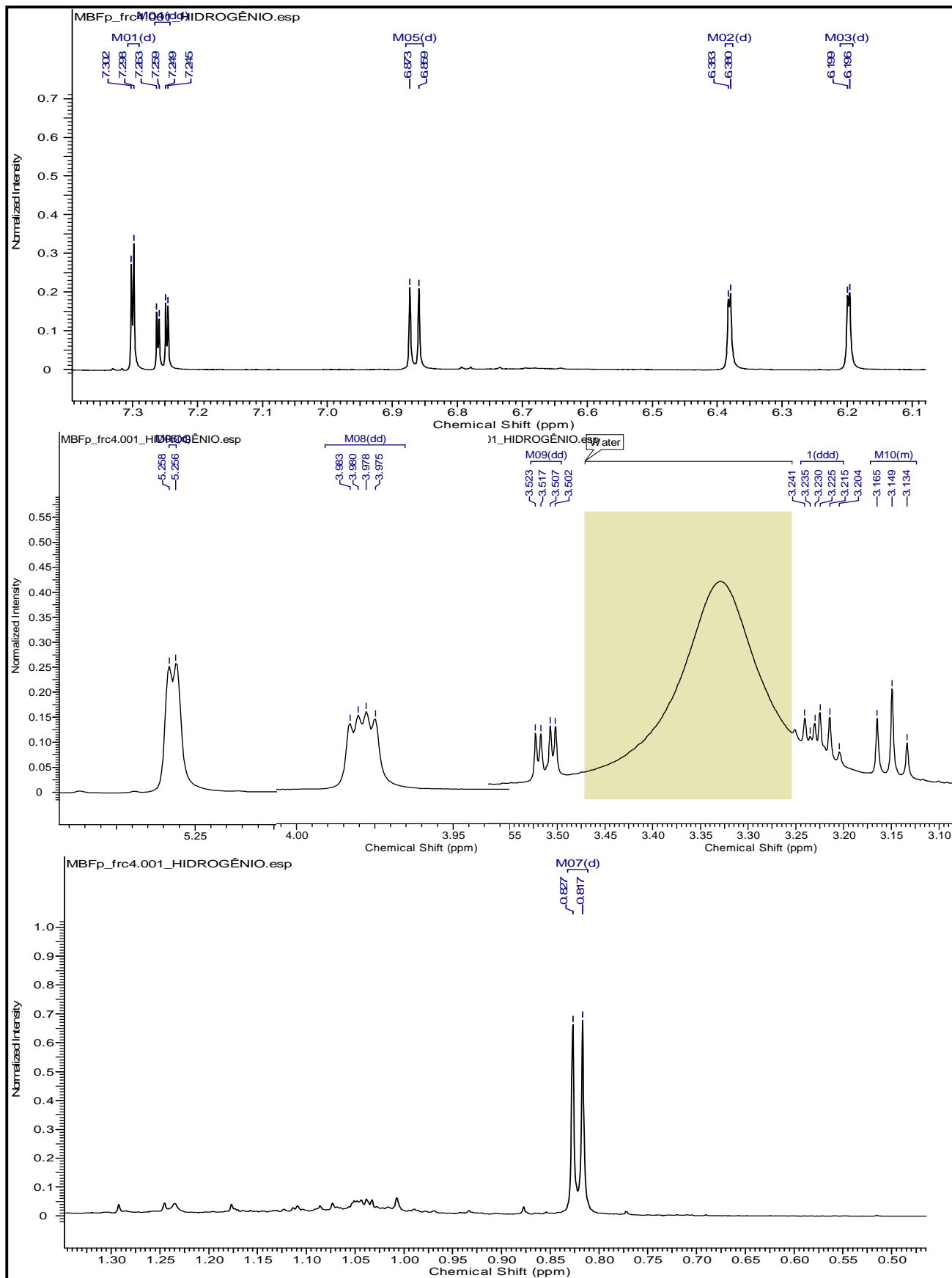


Figura 51. Ampliações do espectro de RMN ^1H da substância 4.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	(0.1032, 0.0077)	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004
Date	24 Apr 2015 13:34:28		
File Name	C:\Users\Adriana Souza\Desktop\RMN_AdrianaUFAMMBFp_frc4\200\ser		
Frequency (MHz)	(600.13, 150.92)	Nucleus	(1H, 13C)
Number of Transients	8	Origin	spect
Original Points Count	(1024, 256)	Owner	RMN600BIO
Points Count	(1024, 2048)	Pulse Sequence	hsqcetgpsisp2.2
Solvent	DMSO	Spectrum Type	HSQC
Sweep Width (Hz)	(9910.95, 33096.41)	Temperature (degree C)	30.127
Title	P. Marcos/Adriana		

MBFp_frc4.200.esp

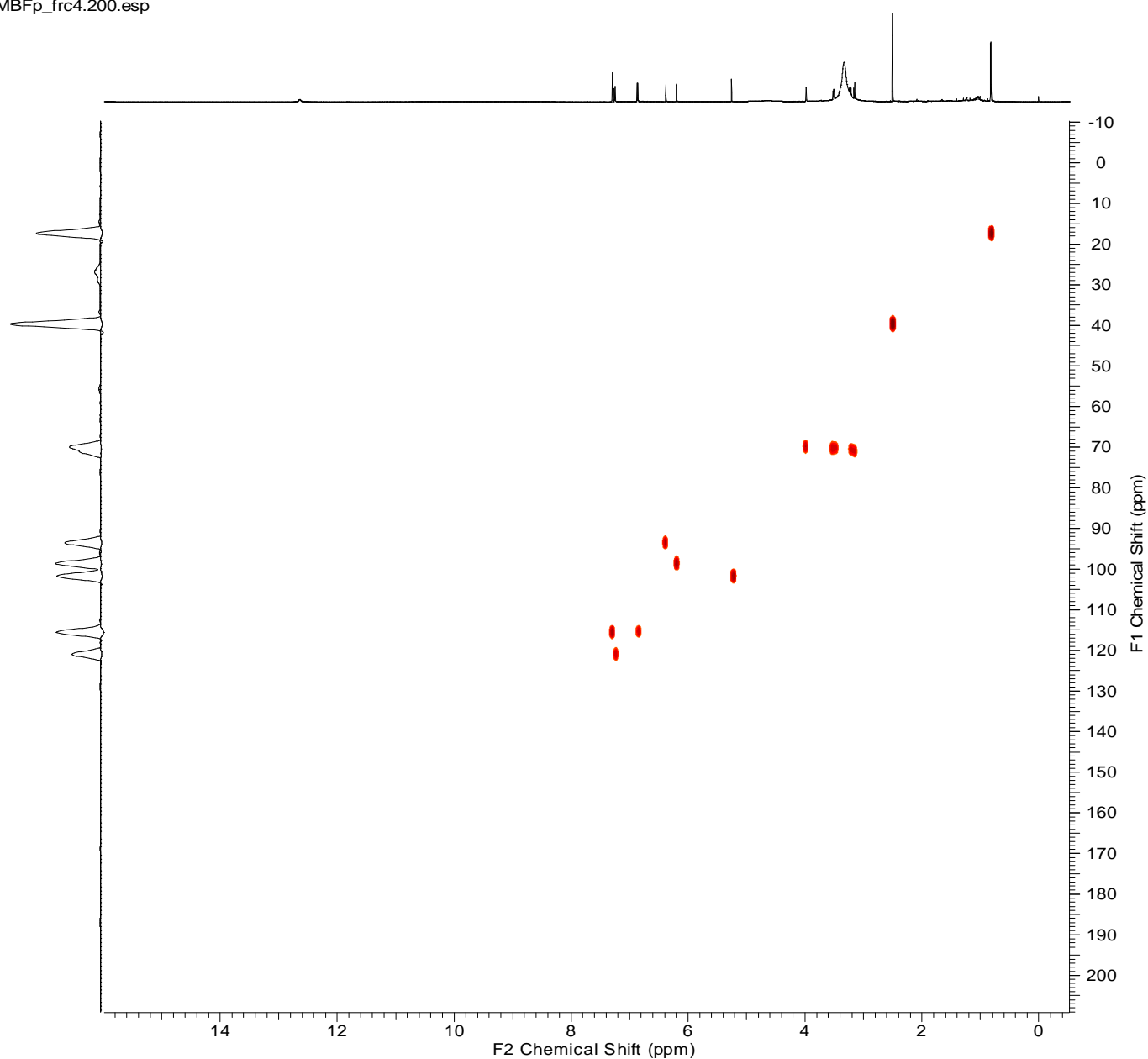


Figura 52. gHSQC da substância 4.

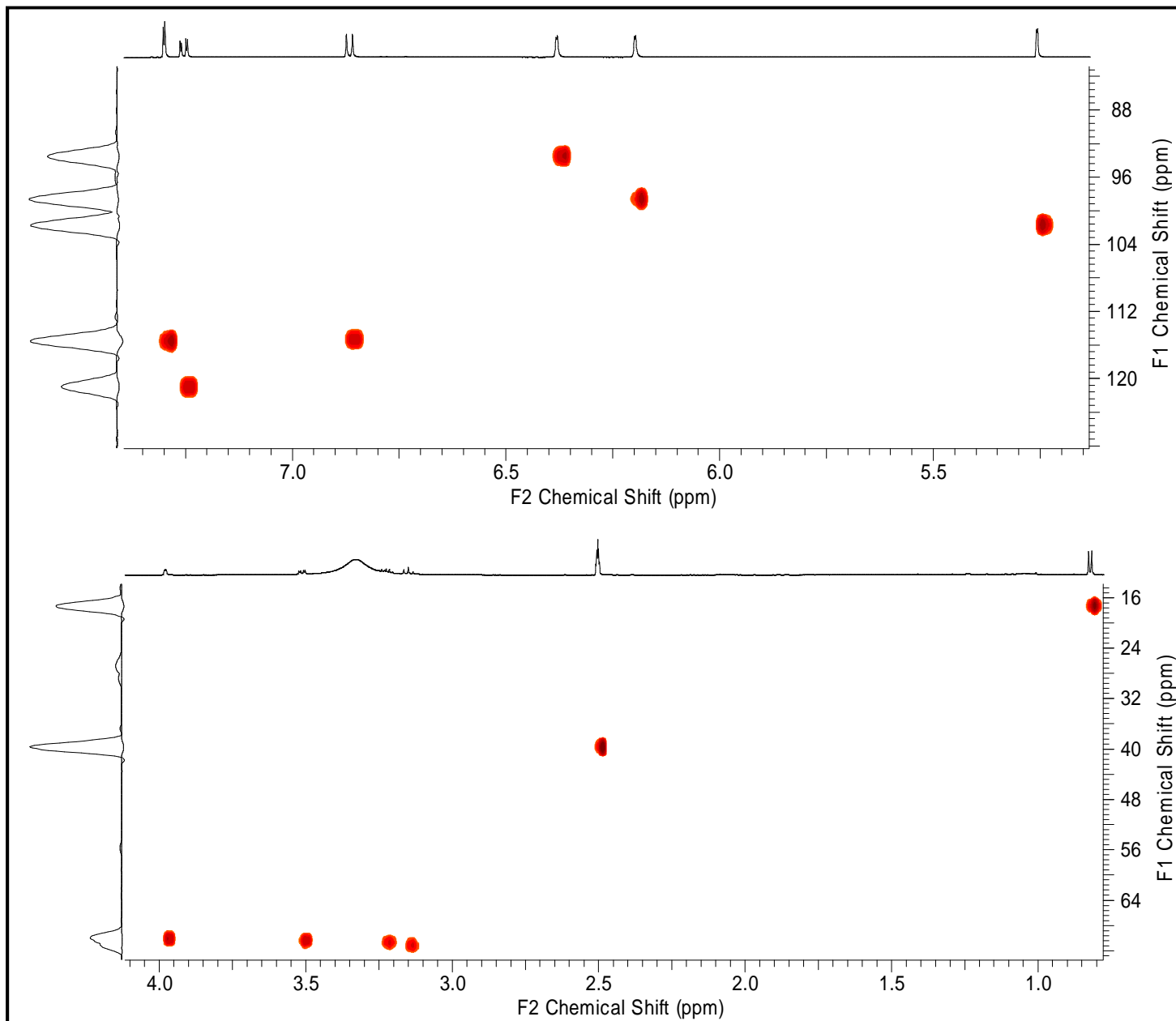


Figura 53. Ampliações das correlações de gHSQC da substância **4**.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	(0.1032, 0.0082)	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004
Date	24 Apr 2015 15:12:08		
File Name	C:\Users\Adriana Souza\Desktop\RMN_AdrianaUFAM\MBFp_frc4\300\ser		
Frequency (MHz)	(600.13, 150.92)	Nucleus	(1H, 13C)
Number of Transients	16	Origin	spect
Original Points Count	(1024, 309)	Owner	RMN600BIO
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	hmbcgp1pndqf
Solvent	DMSO	Spectrum Type	HMBC
Sweep Width (Hz)	(9910.95, 37557.27)	Temperature (degree C)	29.525
Title	P. Marcos/Adriana		

MBFp_frc4.300.esp

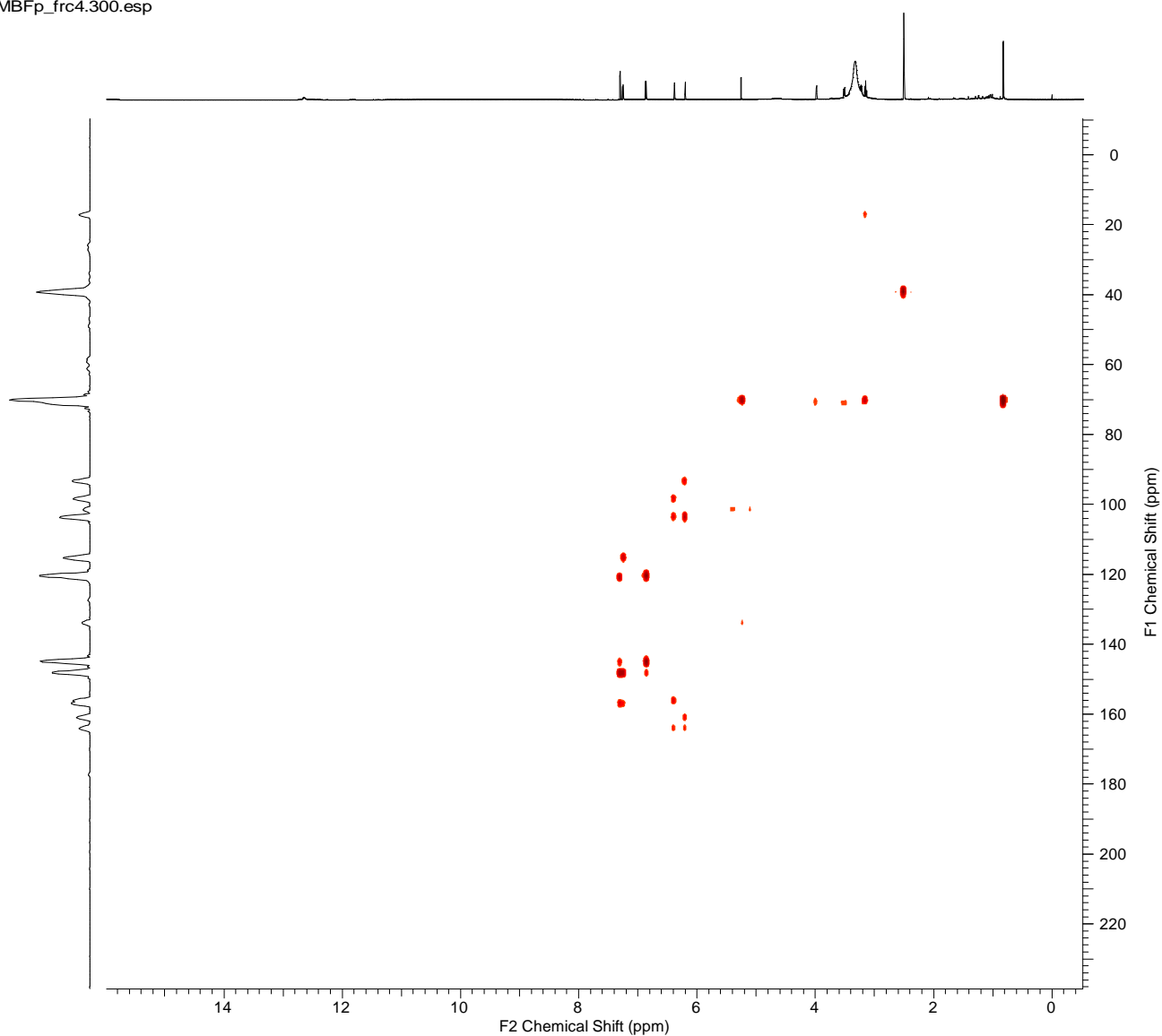


Figura 54. gHMBC da substância 4.

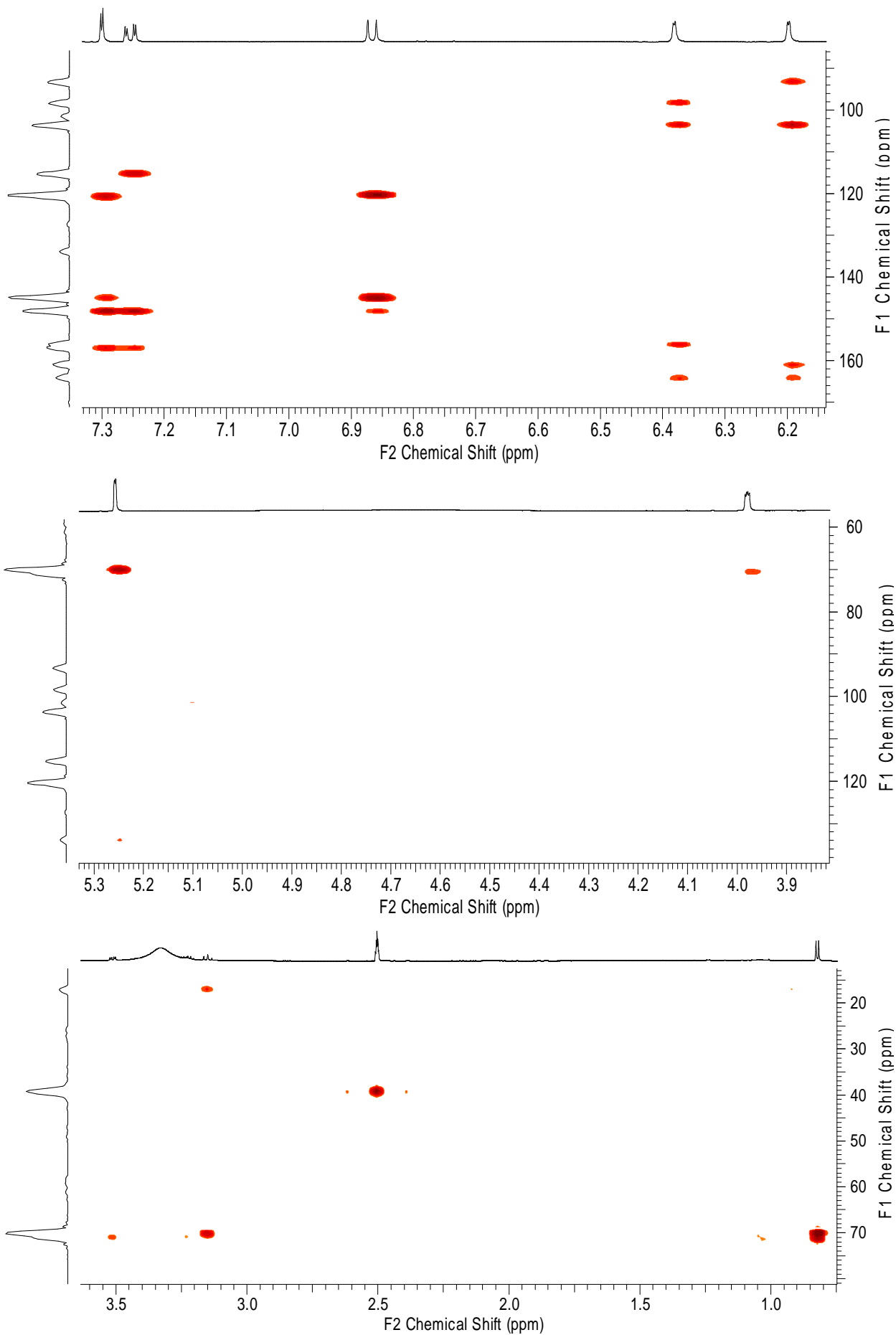


Figura 55. Ampliações das correlações de gHMBC da substância **4**.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	3.4603	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004	Date	06 Sep 2014 08:29:04
Date Stamp	06 Sep 2014 08:29:04	File Name	C:\Users\Adriana Souza\Documents\Adriana\Adriana ^\RMN\MBCpb1\fid		
Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Owner	RMN600BIO	Points Count	32768
Receiver Gain	24.93	SW(cyclical) (Hz)	9469.70	Solvent	DMSO-d6
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	9469.41	Temperature (degree C)	30.000
				Spectrum Offset (Hz)	4530.9644

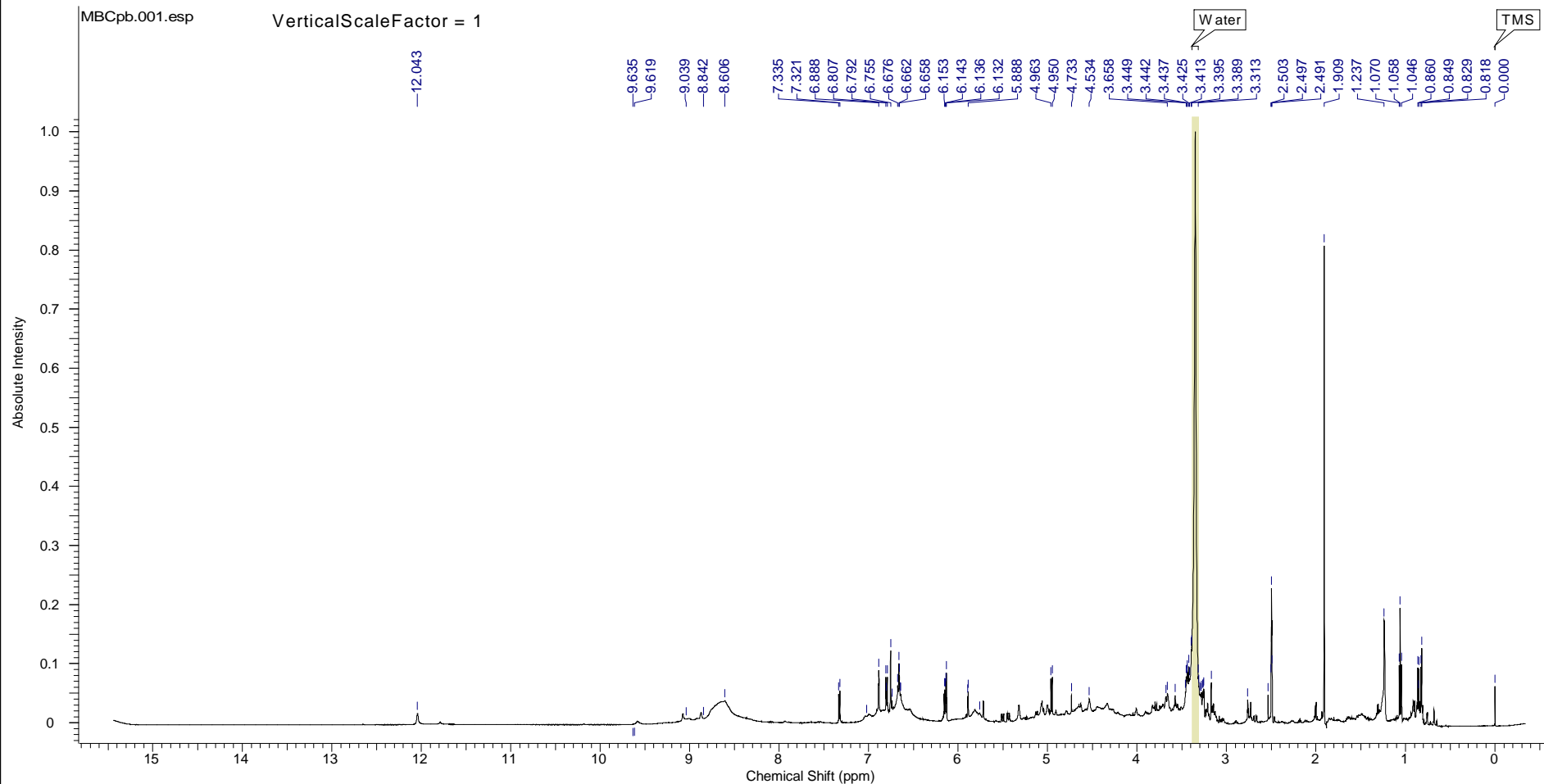


Figura 56. Espectro de RMN ¹H do extrato etanólico sequenciado de *Myrcia bracteata* caule (MBCπβ).

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	3.5389	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004	Date	06 Sep 2014 10:13:36		
Date Stamp	06 Sep 2014 10:13:36	File Name	C:\Users\Adriana Souza\Documents\Adriana\Adriana ^\RMN_AdrianaUFAM\MBCb\1\fid				
Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H	Number of Transients	32	Origin	spect
Original Points Count	32768	Owner	RMN600BIO	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg
Receiver Gain	31.35	SW(cyclical) (Hz)	9259.26	Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	4409.6489
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	9258.98	Temperature (degree C)	29.998		

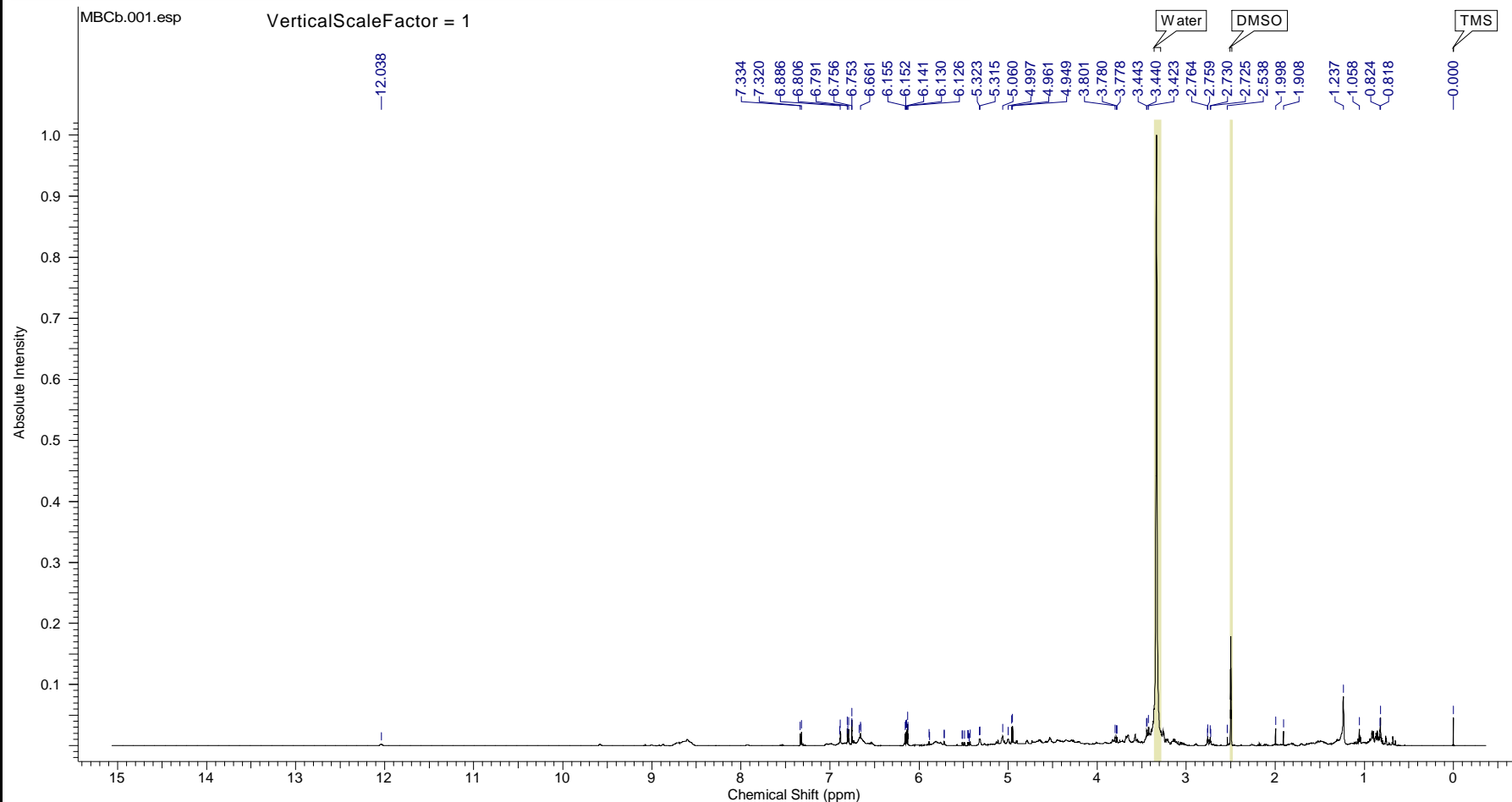


Figura 57. Espectro de RMN ^1H do extrato etanólico direto de *Myrcia bracteata* caule (MBC β).

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	3.2681	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004		Date	06 Sep 2014 08:44:00	
Date Stamp	06 Sep 2014 08:44:00	File Name	C:\Users\Adriana Souza\Documents\Adriana\Adriana ^\RMN\MBFpb\1\fid				
Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H	Number of Transients	4	Origin	spect
Original Points Count	32768	Owner	RMN600BIO	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg
Receiver Gain	23.31	SW(cyclical) (Hz)	10026.74	Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	4585.6860
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	10026.43	Temperature (degree C)	30.003		

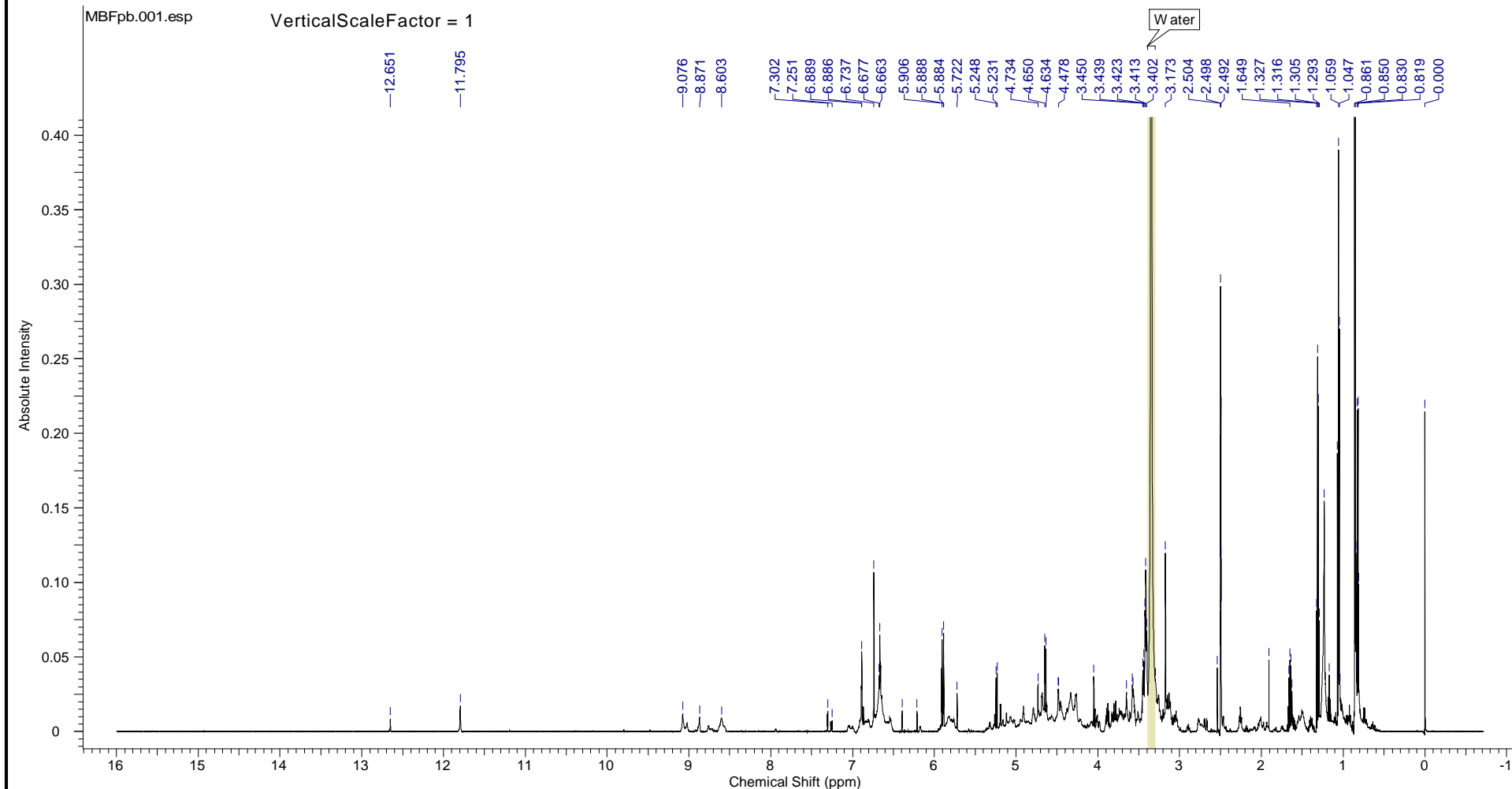


Figura 58. Espectro de RMN ^1H do extrato etanólico sequenciado de *Myrcia bracteata* folhas (MBFπβ).

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	3.4865	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004	Date	06 Sep 2014 10:30:40		
Date Stamp	06 Sep 2014 10:30:40	File Name	C:\Users\Adriana Souza\Documents\Adriana\Adriana ^\RMN_AdrinaUFAM\MBFb\1\fid				
Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Original Points Count	32768	Owner	RMN600BIO	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg
Receiver Gain	23.31	SW(cyclical) (Hz)	9398.50	Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	4469.3623
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	9398.21	Temperature (degree C)	30.009		

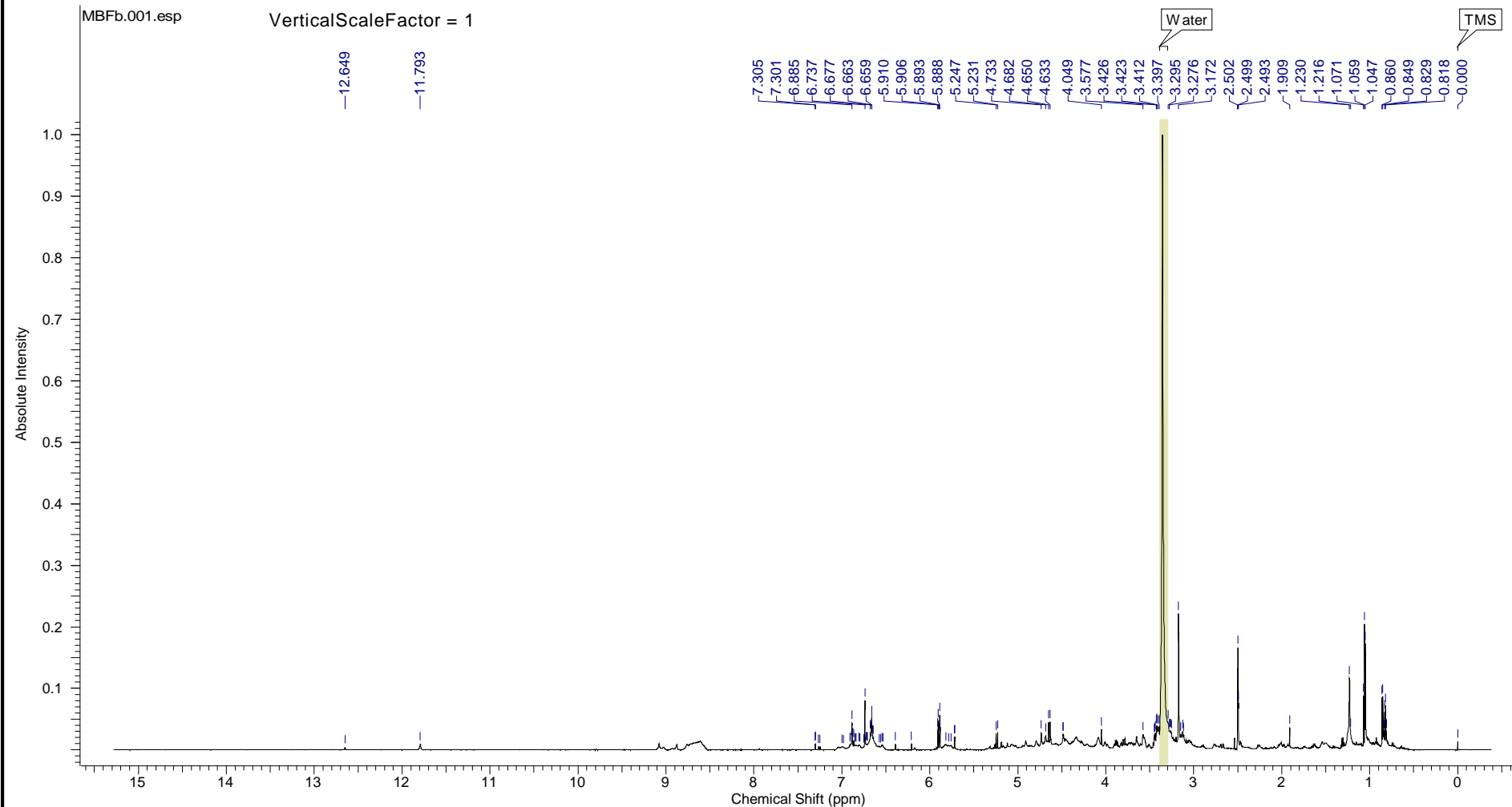


Figura 59. Espectro de RMN ^1H do extrato etanólico direto de *Myrcia bracteata* folha (MBF β).

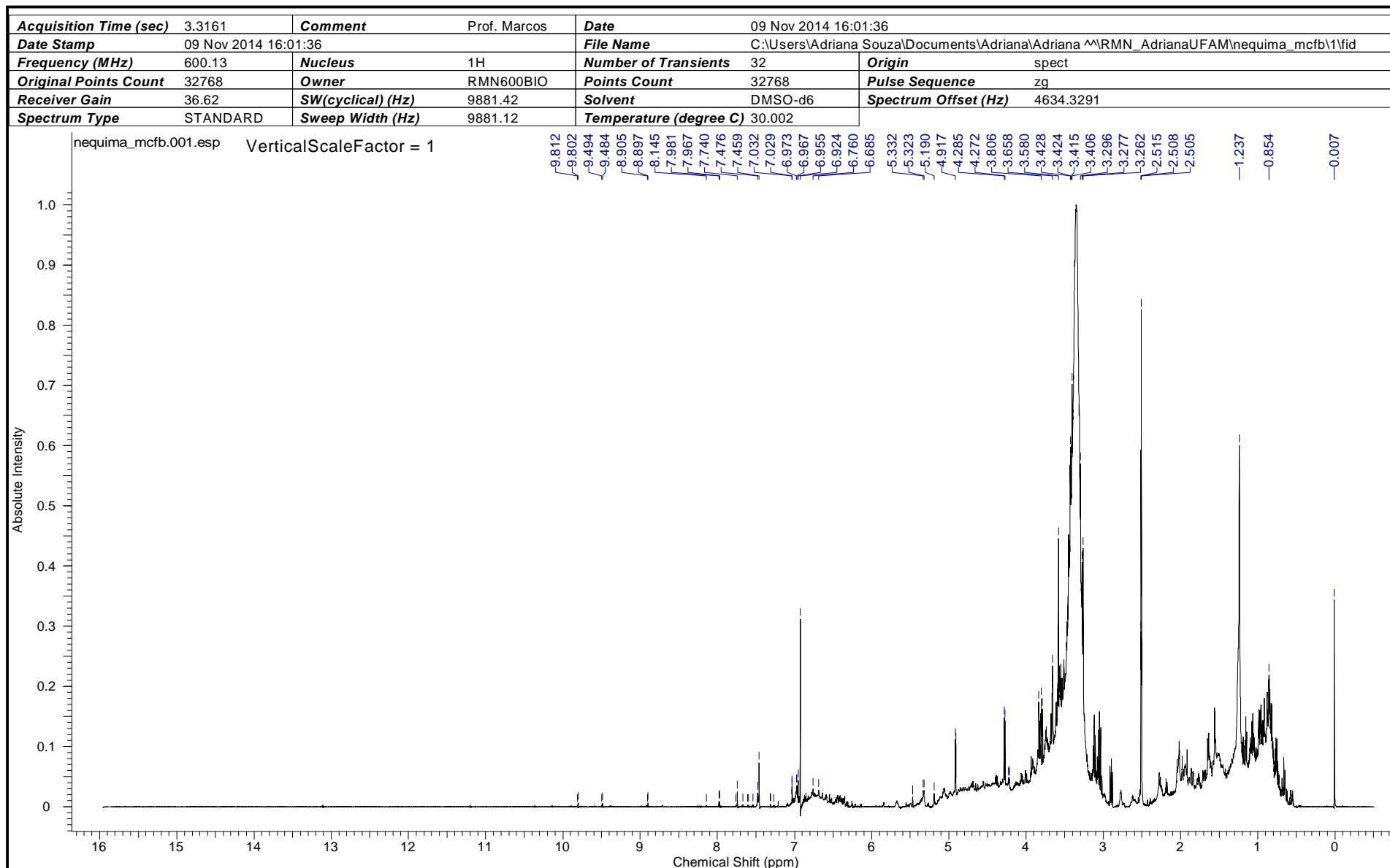


Figura 60. Espectro de RMN ^1H do extrato etanólico direto de *Myrcia citrifolia* folhas (MCF β).

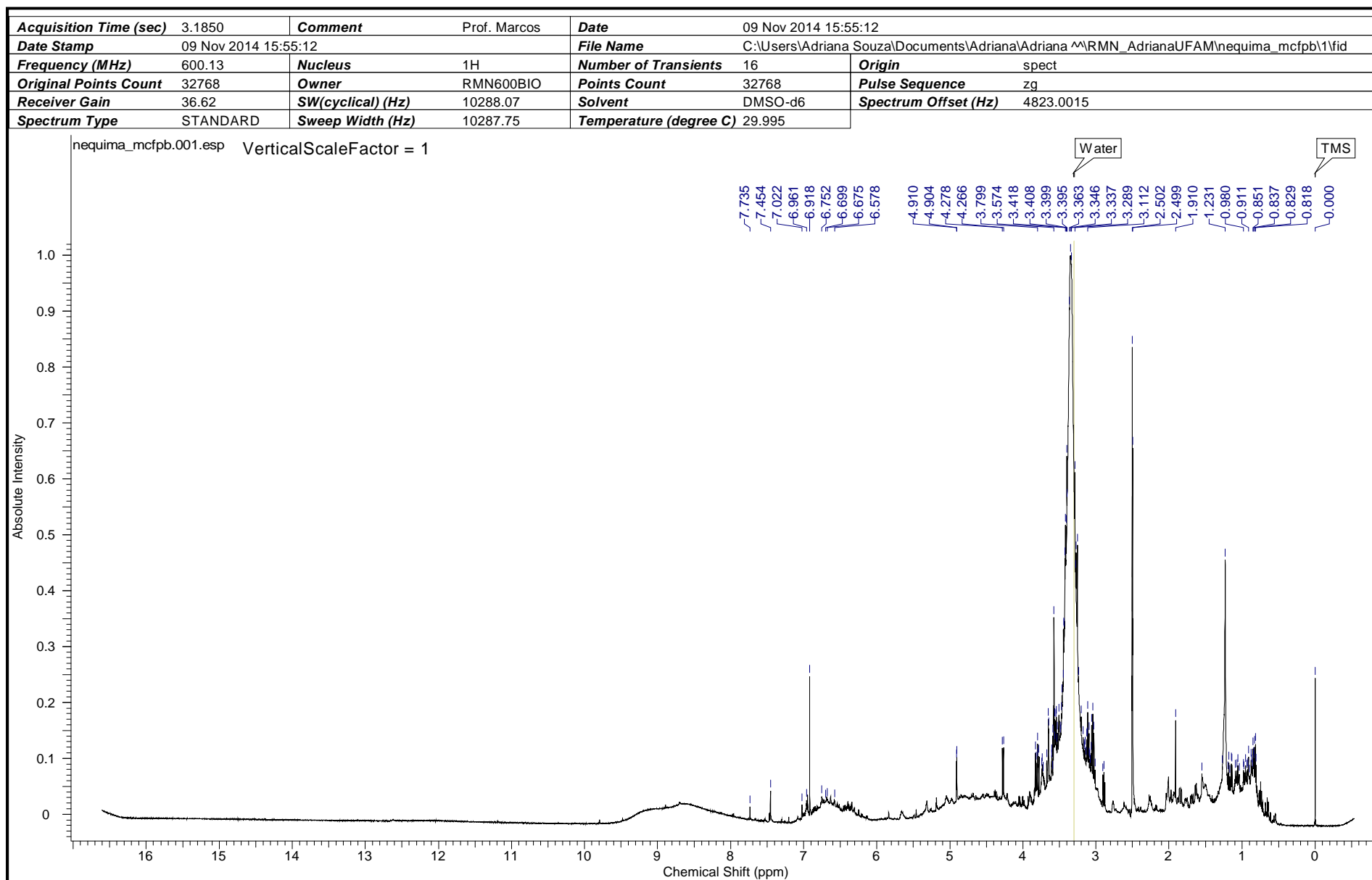


Figura 61. Espectro de RMN ^1H do extrato etanólico sequenciado de *Myrcia citrifolia* folhas (MCF $\pi\beta$).

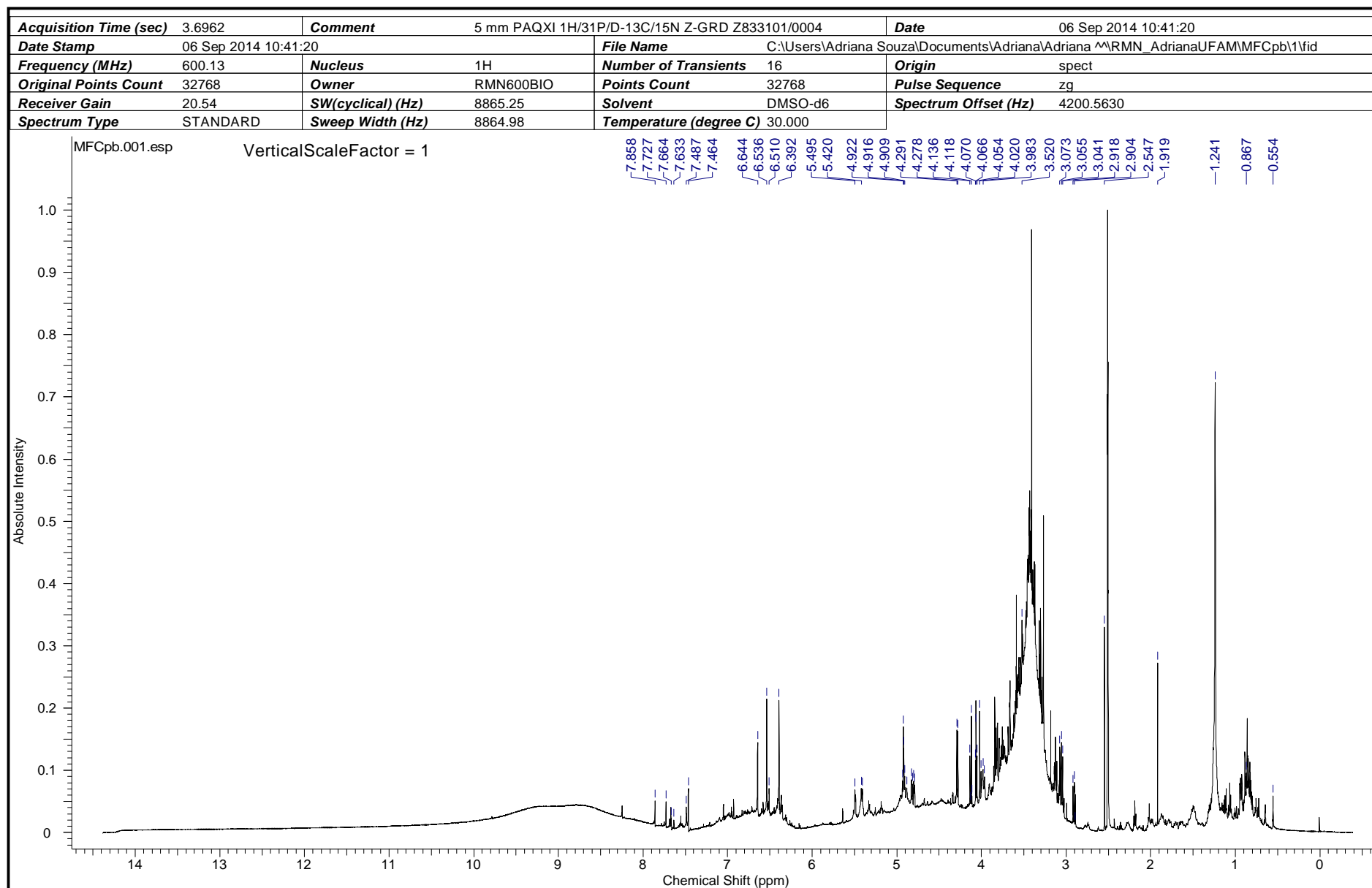


Figura 62. Espectro de RMN ^1H do extrato etanólico sequenciado de *Myrcia fenestrata* caules (MFCπβ).

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	4.0108	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004	Date	06 Sep 2014 10:26:24		
Date Stamp	06 Sep 2014 10:26:24	File Name	C:\Users\Adriana Souza\Documents\Adriana\Adriana ^\RMN_AdrianaUFAMMFCb\1\fid				
Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Original Points Count	32768	Owner	RMN600BIO	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg
Receiver Gain	31.35	SW(cyclical) (Hz)	8169.94	Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	3823.8391
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	8169.69	Temperature (degree C)	30.000		

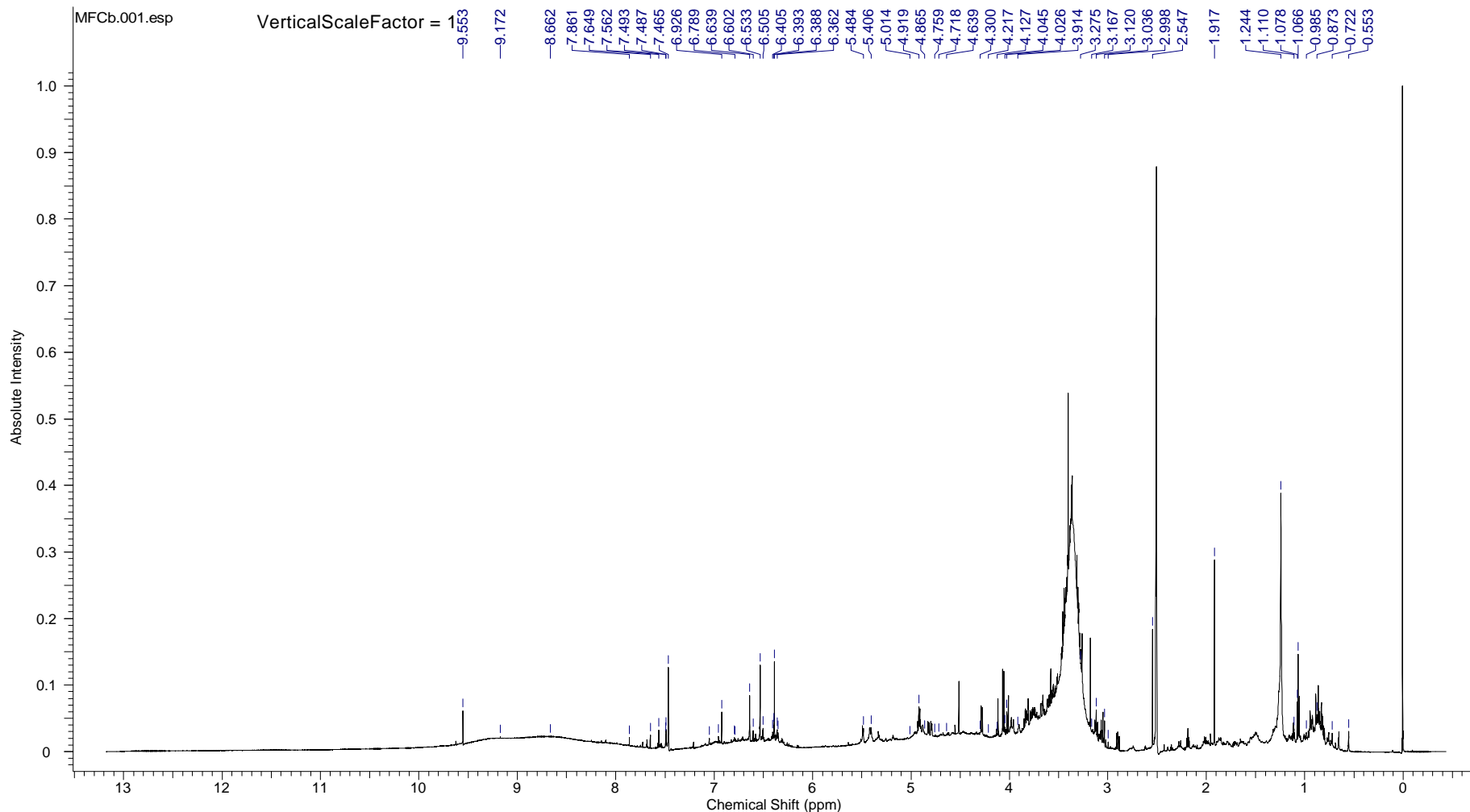


Figura 63. Espectro de RMN ^1H do extrato etanólico direto de *Myrcia fenestrata* caules (MFC β).

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	3.4603	Comment	5 mm PAQXI 1H/31P/D-13C/15N Z-GRD Z833101/0004		Date	06 Sep 2014 09:58:40	
Date Stamp	06 Sep 2014 09:58:40	File Name	C:\Users\Adriana Souza\Documents\Adriana\RMN - Adriana\UFAM\MFFa1\ffd				
Frequency (MHz)	600.13	Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Original Points Count	32768	Owner	RMN500B10	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg
Receiver Gain	20.54	SW(cyclical) (Hz)	9469.70	Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	4442.3838
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	9469.41	Temperature (degree C)	29.995		

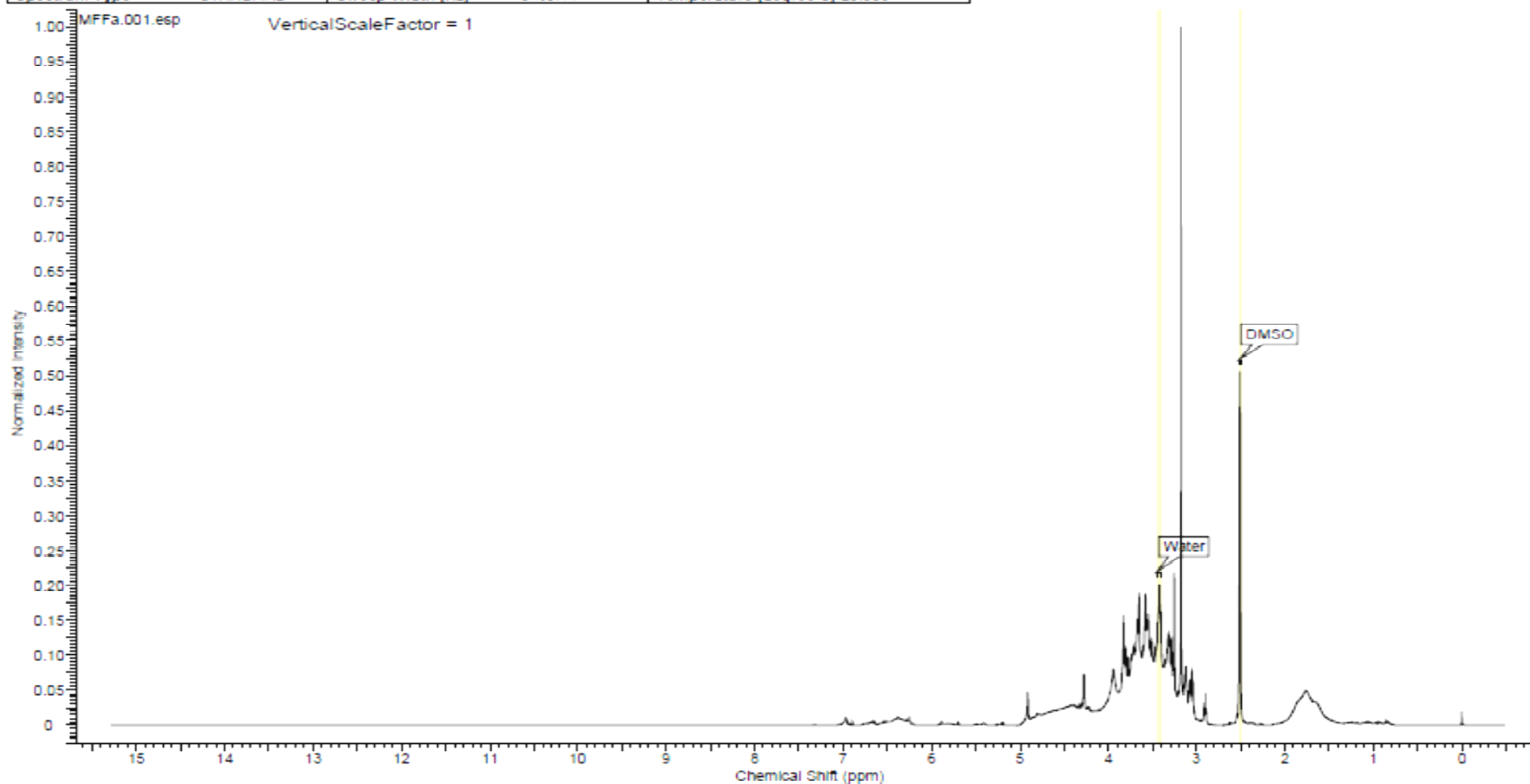


Figura 64. Espectro de RMN ^1H do extrato aquoso direto de *Myrcia fenestrata* folhas (MFF α).

7. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Elsevier, 1989. ISBN 9780444874498. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=aSDwAAAAMAAJ> >.

ALARCÓN, L. D. et al. Composición y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Myrcia fallax* (Rich.) D.c. de Venezuela. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 75, n. 2, p. 221-227, 2009-04 2009. ISSN 1810-634X.

ALBERTI, K.; ZIMMET, P. Z.; CONSULTATION, W. H. O. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus - Provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**, v. 15, n. 7, p. 539-553, Jul 1998. ISSN 0742-3071. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000074777700003 >.

AMAZÔNIA, A. D. A. A. Z.-P. Ervas da Amazônia. 2015. Disponível em: < <http://www.portalamazonia.com.br/secao/amazoniadeaz/interna.php?id=1058> >. Acesso em: 25/03/2015.

AMBIENTE, M. Flora é reconhecida como uma das mais importantes do mundo. Portal Brasil, 2012. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2012/04/flora-brasileira> >. Acesso em: 13/01/2015.

ANDRADE, G. S. et al. Phytochemical screening, antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Myrcia pubiflora* in mice. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 181-188, Jan-Feb 2012. ISSN 0102-695X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297789400027 >.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Structure–Activity Relationships for Antioxidant Activities of a Series of Flavonoids in a Liposomal System. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584997004589> >.

BALIGA, M. S. et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1776-1789, Aug 2011. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000293759400011 >.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence - mechanisms. **New Phytologist**, v. 127, n. 4, p. 617-633, 1994.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BNOUHAM, M. et al. Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). **International Journal of Diabetes & Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 1-25, 14/02/2016 2006. ISSN 1606-7754.

BOHM, B. A. **Introduction to Flavonoids**. Taylor & Francis, 1999. ISBN 9789057023538. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=TXsiFVVuCqMC> >.

BOLIGON, A. A.; MACHADO, M. M.; ATHAYDE, M. L. Technical Evaluation of Antioxidant Activity. **Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 7, p. 517-522, 2014. ISSN 2161-0444. Disponível em: < <http://www.omicsonline.org/open-access/technical-evaluation-of-antioxidant-activity-2161-0444.1000517.php?aid=28118> >.

BORGES DE MELO, E.; CARVALHO, I. α e β -glucosidases como alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos. **Quim. Nova**, v. 29, p. 840-843, 2006.

BORGES, L. L. et al. Influence of environmental factors on the composition of essential oils from leaves of *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. **Boletim Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromaticas**, v. 12, n. 6, p. 572-580, Nov 2013. ISSN 0717-7917. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000328816500003 >.

_____. Environmental factors affecting the concentration of phenolic compounds in *Myrcia tomentosa* leaves. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 2, p. 230-238, Mar-Apr 2013. ISSN 0102-695X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000316963100006 >.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085> >.

BRAZ FILHO, R. PHYTOCHEMICAL CONTRIBUTION TO DEVELOPMENT OF A EMERGENT COUNTRY. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010. ISSN 0100-4042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274726800040 >.

CANDIDO, C. S. et al. EFFECTS OF MYRCIA OVATA CAMBESS. ESSENTIAL OIL ON PLANKTONIC GROWTH OF GASTROINTESTINAL MICROORGANISMS AND BIOFILM FORMATION OF ENTEROCOCCUS FAECALIS. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 621-627, Jul-Oct 2010. ISSN 1517-8382. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000278872800012 >.

CERQUEIRA, M. D. D. et al. Myrciaine, a new nicotinic ester from *Myrcia blanchetiana* (Myrtaceae). **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 11, p. 1421-1423, Mar 13 2013. ISSN 0040-4039.

CHO, M. J. et al. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 13, p. 1771-1782, Oct 2004. ISSN 0022-5142. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000224044300022 >.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011. ISBN 978-85-7738-153-1.

CRUZ, A. V. D. 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, ago./dez 2004. ISSN 2179-8087.

CRUZ, F. D. et al. Phylogenetic analysis of the genus *Hexachlamys* (Myrtaceae) based on plastid and nuclear DNA sequences and their taxonomic implications. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 172, n. 4, p. 532-543, Aug 2013. ISSN 0024-4074.

DE PASQUALE, A. PHARMACOGNOSY - THE OLDEST MODERN SCIENCE. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 1984. ISSN 0378-8741.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3rd. John Wiley & Sons Ltd, 2009. ISBN 978-0-470-74168-9.

DO, T. K. T. et al. Secondary metabolites isolation in natural products chemistry: Comparison of two semipreparative chromatographic techniques (high pressure liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography). **Journal of Chromatography A**, v. 1325, p. 256-260, Jan 2014. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000330256200033 >.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. **Plant Physiology**, v. 122, n. 3, p. 627-633, Mar 2000. ISSN 0032-0889. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000086903200002 >.

EHAB, A. R. et al. Flavanone Glycosides from *Gleditsia caspia*. **Journal of Natural Products**, v. 3, p. 35-46, 2010. ISSN 0974-5211.

ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. THE STATUS OF ETHNOPHARMACOLOGY IN BRAZIL. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, n. 2-3, p. 137-143, Mar 1993. ISSN 0378-8741. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993KZ08500007 >.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolao (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1571-1578, Jun 15 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000287952000010 >.

FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. **Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis, and Biology**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. : Weinheim, 2008. ISBN 978-3-527-31521-5.

FERREIRA, A. C. F. et al. Inhibition of thyroid peroxidase by *Myrcia uniflora* flavonoids. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 351-355, Mar 2006. ISSN 0893-228X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000236459700002 >.

FERREIRA, E. A. et al. The 2',4',6'-Trihydroxyacetophenone Isolated from *Myrcia multiflora* Has Antiobesity and Mixed Hypolipidemic Effects with the Reduction of Lipid Intestinal Absorption. **Planta Medica**, v. 77, n. 14, p. 1569-1574, Sep 2011. ISSN 0032-0943. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295806000002 >.

FIB. OS ANTIOXIDANTES. FOOD INGREDIENTS BRASIL. 6 2009.

GAVILLAN-SUAREZ, J. et al. Chemical profile and in vivo hypoglycemic effects of *Syzygium jambos*, *Costus speciosus* and *Tapeinochilos ananassae* plant extracts used as diabetes adjuvants in Puerto Rico. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, Jul 2015. ISSN 1472-6882. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000358201500002 >.

GOTTLIEB, O. R.; DASILVA, M. L.; MAIA, J. G. S. CHEMISTRY OF BRAZILIAN MYRTACEAE .3. EUCALYPTIN FROM EUGENIA AND MYRCIA SPECIES. **Phytochemistry**, v. 11, n. 3, p. 1185-&, 1972. ISSN 0031-9422. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1972L566500060 >.

GOUVEA, 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, Oct 15 2015. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000355027100036 >.

GOVAERTS, R. et al. **World checklist of myrtaceae**. 2008. 455 ISBN 978-1-84246-391-8.

HARBORNE, J. B. et al. Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. In: (Ed.). **The Flavonoids**: Springer US, 1975. p.45-77. ISBN 978-0-12-324602-8.

IMATOMI, M. et al. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 29-35, Feb 2013. ISSN 0305-1978. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000315078200007 >.

INPA, R. E. E. Reservas Biológicas do INPA. 09/02/2015 2015. Disponível em: <<https://www.inpa.gov.br/reservas/reservas2.php>>. Acesso em: 09/02/2015.

INZUCCHI, S. E. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 287, p. 360-372, 2002.

JORGE, L. I. F.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA, M. D. L. P. Foliar anatomy of pedra-hume-cao (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia punicifolia*, Myrtaceae). **Acta Amazonica**, v. 30, n. 1, p. 49-57, Marco 2000. ISSN 0044-5967. Disponível em: <<Go to ISI>://BIOABS:BACD200000268530 >.

KONISHI, Y. et al. Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to expedite dereplication of natural products. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 1187-1197, Feb 2007. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243839900048 >.

KRASIKOV, V. V.; KARELOV, D. V.; FIRSOV, L. M. α -Glucosidases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 66, n. 3, p. 267-281, 2001. ISSN 0006-2979. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/A%3A1010243611814>>.

KRISTENSEN, M.; ENGELSEN, S. B.; DRAGSTED, L. O. LC-MS metabolomics top-down approach reveals new exposure and effect biomarkers of apple and apple-pectin intake. **Metabolomics**, v. 8, n. 1, p. 64-73, Feb 2012. ISSN 1573-3882. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000301041600007 >.

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, Oct-Dec 1997. ISSN 0007-196X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000071391400014 >.

LANÇAS, F. M. Avanços Recentes e Tendências Futuras das Técnicas de Separação: Uma visão pessoal. **Scientia Chromatographica**, v. 0, n. 0, p. 17-44, 2008.

LEME, G. M. et al. HPLC-DAD method for metabolic fingerprinting of the phenotyping of sugarcane genotypes. **Analytical Methods**, v. 6, n. 19, p. 7781-7788, 2014. ISSN 1759-9660. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000342178500027 >.

LIANG, N.; KITTS, D. D. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 19180-19208, Nov 2014. ISSN 1420-3049. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000345564300125 >.

LIMA FILHO, D. D. A. D. et al. Floristic inventory of three hectares of "terra firme" forest in the petroleum drilling region of the Urucu River in the Amazon State, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 31, n. 4, p. 565-579, Outubro-Dezembro 2001. ISSN 0044-5967. Disponível em: <<Go to ISI>://BIOABS:BACD200200119038 >.

LIMA, M. A. A. et al. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 55, p. 11716-11720, Sep 21 2011. ISSN 1684-5315. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000298538000050 >.

LIMBERGER, R. P. et al. Essential oils from *Myrcia* species native to Rio Grande do Sul. **Quimica Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, Nov-Dec 2004. ISSN 0100-4042. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000225686800014 >.

LUCAS, E. J. et al. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). **Taxon**, v. 56, n. 4, p. 1105-1128, Nov 2007. ISSN 0040-0262. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251484400010 >.

_____. PHYLOGENETICS, MORPHOLOGY, AND EVOLUTION OF THE LARGE GENUS MYRCIA S.L. (MYRTACEAE). **International Journal of Plant Sciences**, v. 172, n. 7, p. 915-934, Sep 2011. ISSN 1058-5893. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297459100008 >.

MAGINA, M. D. A. et al. BIOACTIVE TRITERPENES AND PHENOLICS OF LEAVES OF *Eugenia brasiliensis*. **Quimica Nova**, v. 35, n. 6, p. 1184-1188, 2012 2012. ISSN 0100-4042.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytochemistry**, v. 2, n. 2, p. 137-189, 1995. ISSN 0944-7113. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711311800590> >.

MARTINS DOS SANTOS, G. C. et al. Essential Oil from *Myrcia ovata*: Chemical Composition, Antinociceptive and Anti-Inflammatory Properties in Mice. **Planta Medica**, v. 80, n. 17, p. 1588-1596, Nov 2014. ISSN 0032-0943.

MATSUDA, H. et al. Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 6, p.

788-795, Jun 2002. ISSN 0009-2363. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175915200010 >.

MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of myrciacitrins III, IV, and V. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 3, p. 429-431, Mar 2002. ISSN 0009-2363.

MOEIN, M. et al. **Analysis of antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of *Juniperus excelsa* M. B subsp. *Polycarpos* (K. Koch) Takhtajan essential oil.** 2010. 128-131 Disponível em: <<http://www.phcogres.com/article.asp?issn=0974-8490>>.

MORESCO, H. H. et al. Myricitrin as the main constituent of two species of *Myrcia*. **J. Appl. Pharm. Sci.**, v. 4, n. 2, p. 1-7, 7 pp., 2014. ISSN 2231-3354.

MORETTI, C. et al. A novel antiprotozoal aminosteroid from *Saracha punctata*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 11, p. 1390-1393, 1998. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031791054&partnerID=40&md5=5a2c7055d1dd0b22944f1a313c7981a9>>.

Negri G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Abr./jun. 2005;41(2):121-42. ISSN 1516-9332. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322005000200002>.

OLIVEIRA, A. N. D.; AMARAL, I. L. D. Floristic and phytosociology of a slope forest in Central Amazonia, Amazonas, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 21-34, January 2004. ISSN 0044-5967. Disponível em: <<Go to ISI>://BIOABS:BACD200400341445 >.

OLIVEIRA, A. N. D.; DO AMARAL, I. L. Floristic and phytosociology of a slope forest in Central Amazonia, Amazonas, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 21-34, January 2004. ISSN 0044-5967. Disponível em: <<Go to ISI>://BIOABS:BACD200400341445 >.

OLIVEIRA, M. L. et al. **Reserva Ducke: A biodiversidade amazônica através de uma grade**. Manaus: 2008. ISBN 978-85-99387-06-1.

PADOVAN, A. et al. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 3, p. 695-716, Sep 2014. ISSN 1568-7767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000340619400007 >.

PAN, J. et al. Separation of flavanone enantiomers and flavanone glucoside diastereomers from *Balanophora involucrata* Hook. f. by capillary electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography on a C18 column. **Journal of Chromatography A**, v.

1185, n. 1, p. 117-129, 2008. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967308001301>>.

PATEL, D. K. et al. Pharmacologically tested aldose reductase inhibitors isolated from plant sources-A concise report. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 5, p. 388-400, Sep 2012. ISSN 1672-3651. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000309035800014 >.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2960-2972, Nov-Dec 2007. ISSN 0031-9422. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000252586300028 >.

PICHERSKY, E.; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 10, p. 439-445, Oct 2000. ISSN 1360-1385. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000089920700011 >.

RAMALHO, S. D. D. S., LORENA R. F. et al. Evaluation of flavonols and derivatives as human cathepsin B inhibito. **Natural Product Research**, 2015. ISSN 1478-6419.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, May 2001. ISSN 0041-0101. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000165916300001 >.

REYNERTSON, K. A. et al. Bioactive depsides and anthocyanins from jaborcaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1228-1230, Aug 2006. ISSN 0163-3864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000240020000025 >.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus: Reserva Florestal Adolpho Ducke, 1999.

RICE-EVANS, C. A.; PACKER, L. **Flavonoids in Health and Disease, Second Edition**. Taylor & Francis, 2003. ISBN 9780824755249. Disponível em: <
<https://books.google.com.br/books?id=1VwRM5w36ikC>>.

SA, F. A. S. et al. Essential oils in aerial parts of *Myrcia tomentosa*: composition and variability. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1233-1240, Nov-Dec 2012. ISSN 0102-695X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000312200500005 >.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8402-8416, Jul 2013. ISSN 1420-3049. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000330300900069 >.

SANT'ANA, L. D. O. et al. Comparação dos ensaios DPPH, ABTS e FRAP para estimar a capacidade antioxidante de extratos de méis silvestres e de laranjeira. In: SBQ, 34° Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis - SC.

SANTOS, G. C. M. D. et al. Essential Oil from *Myrcia ovata*: Chemical Composition, Antinociceptive and Anti-Inflammatory Properties in Mice. **Planta Medica**, v. 80, n. 17, p. 1588-1596, Nov 2014. ISSN 0032-0943.

SARKER D., S.; LATIF, Z.; GRAYI., A. **Natural Products Isolation**. New Jersey: Humana Press Inc, 2005. ISBN 1-59259-955-9.

SHARMA, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2376-2383, 2008. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691508001506> >.

SHARMA, B. et al. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 697-705, Oct 1 2008. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256205800021 >.

SILVA, A. D. N.; UETANABARO, A. P. T.; LUCCHESI, A. M. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Myrcia alagoensis* (Myrtaceae). **Natural Product Communications**, v. 8, n. 2, p. 269-271, Feb 2013. ISSN 1934-578X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315369000035 >.

SILVA, F. K. S. D. et al. LEVANTAMENTO DAS ESPÉCIES CONHECIDAS COMO PEDRA-UME-CAÁ (MYRTACEAE), COM ÊNFASE NAS COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ, BRASIL. **Biota Amazônia**, v. 5, n. 1, p. 7-15, 2015. ISSN 2179-5746.

SNYDER, L. R.; CARR, P. W.; RUTAN, S. C. The Retention Process in Reversed-Phase Liquid Chromatography Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. **Journal of Chromatography A**, v. 656, n. 1, p. 537-547, 1993. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002196739380818S> >.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 1979.

SOBRAL, M. et al. Myrtaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro., 2013. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171> >. Acesso em: 22 Mai. 2015.

_____. Myrtaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro., 2015. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171> >. Acesso em: 22 Mai. 2015.

SOUZA, A. C. D.; MACHADO, M. B. **Terpenos e Atividade Antioxidante de *Myrcia fenestrata* DC.** 35° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Florianópolis - SC 2011.

STEFANELLO, M. E. A. et al. Composition and seasonal variation of essential oils of *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtectata*, Myrtaceae. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 82-86, Jan-Mar 2010. ISSN 0102-695X.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A.; SALVADOR, M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011. ISSN 1612-1872. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000287545200003 >.

STEHMANN, J. R. et al. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009. 516.

THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 669-675, 2006/11// 2006. ISSN 0889-1575. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157506000081> >.

THE PLANT LIST. Myrtaceae. p. Versão 1.1, 2013. Disponível em: < <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Myrtaceae/> >.

TOFFALI, K. et al. Novel aspects of grape berry ripening and post-harvest withering revealed by untargeted LC-ESI-MS metabolomics analysis. **Metabolomics**, v. 7, n. 3, p. 424-436, Sep 2011. ISSN 1573-3882. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000293912300010 >.

VAREDA, P. M. et al. Hypoglycemic effect of the extract of *Myrcia bella* Cambess. through modulation of protein expression involved on glucose metabolism in liver of streptozotocin diabetic mice. **Planta Medica**, v. 80, n. 16, p. 1361-1361, Nov 2014. ISSN 0032-0943.

VAREDA, P. M. P. et al. *Myrcia bella* Leaf Extract Presents Hypoglycemic Activity via PI3k/Akt Insulin Signaling Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014 2014. ISSN 1741-427X.

_____. Hypoglycemic and hypolipidemic activities of *Myrcia bella* Cambess. in streptozotocin - diabetic mice. **Planta Medica**, v. 78, n. 11, p. 1140-1141, Aug 2012. ISSN 0032-0943.

WANG, J. et al. Eucalyptals D and E, new cytotoxic phloroglucinols from the fruits of *Eucalyptus globulus* and assignment of absolute configuration. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 21, p. 2654-2658, May 2012. ISSN 0040-4039. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000303429600019 >.

WILSON, P. G. **The Families and Genera of Vascular Plants, Flowering Plants Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae**. 2011. ISBN 978-3-642-14396-0 (Print) 978-3-642-14397-7 (Online).

WILSON, P. G. et al. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, n. 1, p. 3-19, Mar 2005. ISSN 0378-2697. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000227444000002 >.

World Checklist of Selected Plant Families. Royal Botanic Gardens, Kew, 2015. Disponível em: <<http://www.kew.org/science-conservation/research-data/science-directory/projects/phylogeny-myrcia-sl-myrtaceae>>. Acesso em: 27 May. 2015.

WUBSHET, S. G. et al. High-resolution bioactivity profiling combined with HPLC–HRMS–SPE–NMR: α -Glucosidase inhibitors and acetylated ellagic acid rhamnosides from *Myrcia palustris* DC. (Myrtaceae). **Phytochemistry**, v. 116, n. 0, p. 246-252, 2015. ISSN 0031-9422. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942215001314>>.

YOGEE SWARI, P.; SRIRAM, D. Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 657-666, 2005. ISSN 0929-8673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000227158900003 >.

YOSHIKAWA, M. et al. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): Structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 1, p. 113-119, Jan 1998. ISSN 0009-2363. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000071829100015 >.

ZHU, Y. et al. Preparative Isolation and Purification of Five Flavonoid Glycosides and One Benzophenone Galloyl Glycoside from *Psidium guajava* by High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC). **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 15648-15661, Dec 2013. ISSN 1420-3049. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000330315700077 >.

ZOGHBI, M. D. et al. Essential oils from three Myrcia species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, n. 5, p. 421-424, Sep-Oct 2003. ISSN 0882-5734. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185220600013 >.