

Universidade Federal do Amazonas  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Química

Diferenciação química e determinação das atividades antioxidantes de duas espécies botânicas semelhantes: *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae* (Myrtaceae)

Kidney de Oliveira Gomes Neves

Manaus - AM

2017

Universidade Federal do Amazonas  
Departamento de Química  
Pós-Graduação em Química  
Área de Concentração: Química Orgânica

Diferenciação química e determinação das atividades antioxidantes de duas espécies botânicas semelhantes: *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae* (Myrtaceae)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pesquisa e Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, com área de concentração em Química Orgânica.

Kidney de Oliveira Gomes Neves  
Orientador: Prof. Dr. Marcos Batista Machado

Manaus - AM

2017

## Ficha Catalográfica

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

N518d Neves, Kidney de Oliveira Gomes  
Diferenciação química e determinação das atividades de duas espécies botânicas semelhantes: *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae* (Myrtaceae) / Kidney de Oliveira Gomes Neves. 2017  
151 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Marcos Batista Machado  
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Ressonância Magnética Nuclear. 2. Espectrometria de Massas.  
3. Quimiometria. 4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. 5.  
Antioxidantes. I. Machado, Marcos Batista II. Universidade Federal  
do Amazonas III. Título

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pesquisa e Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas intitulado como: “Diferenciação química e determinação das atividades antioxidantes de duas espécies botânicas semelhantes: *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae* (Myrtaceae)”.

Kidney de Oliveira Gomes Neves

Orientador: Prof. Dr. Marcos Batista Machado

---

Kidney de Oliveira Gomes Neves  
Mestrando

---

Prof. Dr. Marcos Batista Machado  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço acima de tudo a DEUS que sempre esteve ao meu lado;
- Aos meus pais, Ediney Neves e Elianay Neves que sempre me motivaram a estudar e nunca desistir dos meus sonhos;
- À minha querida namorada, Carla Santos que sempre esteve ao meu lado me apoiando e que nos dias mais difíceis bastava um sorriso seu para me alegrar;
- Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Batista Machado, por sempre acreditar no meu potencial, me incentivar e ajudar nos momentos mais difíceis, por sua paciência, dedicação, por tantos ensinamentos e pela oportunidade de realizar este sonho;
- Aos meus irmãos, Kiandro, Kilder e Kedson, todos com nomes tão esquisito quanto o meu, mas que sempre acreditaram em mim;
- Aos meus grandes amigos Arlan Junho, Jario Leal e Daniel Farias por todos os momentos divertidos;
- Às minhas amigas de isolamento/almoço/merenda, Lídia Procópio, Bruna Ribeiro, Elzalina Soares, Airi Souza, Hanna Mafra, Ingrity e Jéssica por toda paciência, ajuda durante a parte experimental e por cada conversa divertida.
- Às minhas colegas de grupo Adriana Cavalcante, Andrezza Ramos, Jaqueline, Amanda, Andreza Uchoa e ao Raimundo Junior por todo apoio;
- Aos doutores Felipe Moura e Richardson pela ajuda no fracionamento cromatográfico;
- Aos amigos e colegas que fiz durante o mestrado, Rodolfo, Leonard, Ayrton, André Ricardo, André Corrêa, Marcos Túlio, Maiara, Rochelly, Wagner, Laiane, Josiana, Kamila, Paulo Senna, Samuel, Lilian, Paula Paiva, Renan Feitosa e Renê Amorim;
- Aos meus colegas de trabalho, Greicy, Dione, Jonnes, Renata, Alrea, Marineusa, Lorenço, Vanessa, Lúcia, Pedro e Jonas pelo apoio;
- À Dr<sup>a</sup>. Anália Duarte pela ajuda na identificação do material botânico;
- Aos professores do PPGQ, pelos ensinamentos;
- À professora Fracinete Campos e seus alunos Estevan, Paola, Allan, Tati, Letícia e Jane que me acolheram em Curitiba com muito carinho;
- À CAPES pela bolsa concedida;
- Ao CNPQ, a FAPEAM e à FINEP pelo suporte financeiro destinado a desenvolvimento deste projeto;
- A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O gênero *Eugenia* pertencente à família Myrtaceae e compreende aproximadamente 1.038 espécies com ampla distribuição no bioma Amazônia. Na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD), uma amostra representativa do ecossistema Amazônia de Terra Firme localizada no estado do Amazonas, é possível encontrar espécies desse gênero, como as *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae*. Devido à complexidade do ponto de vista botânico e semelhanças entre tais espécies, este trabalho visou caracterizar a composição química e avaliar as atividades antioxidante de *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae*, afim de discriminar a composição química e corroborar na identificação morfológica dessas espécies. Os extratos obtidos dessas duas espécies de *Eugenia* foram analisados empregando-se métodos espectrométricos auxiliados por ferramentas quimiométricas. Essa metodologia mostrou-se eficiente na diferenciação da composição química entre as duas espécies semelhantes, pois direcionou o isolamento das substâncias responsáveis pela diferenciação química entre as espécies. A utilização de técnicas cromatográficas e espectrométricas hifenadas ou não, resultou na identificação do ácido rotundióico (**1**), dihidro-kempferol (**2**) e do dihidro-kampferol-3-O-[ $\beta$ -xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -raminopiranosídeo (**3**) a partir do extrato etanólico de folhas de *Eugenia lisboae*, e de cinco alquilresorcinois glicosilados, 3-O-metil-5-(1'-hidroxipentil)-resorcinol-4-O- $\beta$ -glucopiranosídeo (**4**), 3-O-metil-5-(1'-hidroxipentil)-resorcinol-4-O- $\beta$ -(6''-galoil)-glucopiranosídeo (**5**), 3-O-metil-5-(1'-hidroxipentil)-resorcinol-4-O- $\beta$ -(4'', 6''-digaloil)-glucopiranosídeo (**6**), 4-hidroxi-3-O-metil-5-pentilresorcinol-1-O-[ $\alpha$ -xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -glucopiranosídeo (**7**), 4-hidroxi-3-O-metil-5-pentilresorcinol-1-O-[ $\alpha$ -xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -(4''-galoil)-glucopiranosídeo (**8**), a partir do extrato etanólico de folhas de *Eugenia adenocalyx*. Dentre as oito substâncias descritas nesse estudo, **3**, **4**, **5** e **8** ainda não foram descritas na literatura. A identificação dessas substâncias possibilitou constatar qual a composição química está relacionada a cada espécie. A análise estatística dos resultados da capacidade sequestrante frente ao radical livre DPPH $\cdot$  e o cátion radical ABTS $^{+\cdot}$  evidenciou que os extratos etanólicos de *Eugenia adenocalyx* (EF4-3, Cl<sub>50</sub>= 90,4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; EC4-3, mEqT= 1914,7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) apresentam a melhor atividade antioxidante. Esses potenciais antioxidantes se devem a presença dos alquilresorcinois em sua composição, cujas respostas antioxidantes para os alquilresorcinois **5** são Cl<sub>50</sub> = 59,37  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e mEqT = 1879,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e **8** são Cl<sub>50</sub>= 59,33  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e mEqT= 1802,3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Portanto, este trabalho contribui com o conhecimento químico acerca do gênero *Eugenia*, bem como corroborou com os estudos taxonômicos dessas duas espécies semelhantes amazônicas.

Palavras-chaves: RMN, EM, QUIMIOMETRIA, CLAE, DPPH $\cdot$ , ABTS $^{+\cdot}$ .

## ABSTRACT

The *Eugenia* genus belongs to the Myrtaceae family and comprises approximately 1038 species with wide distribution in the Amazônia biome. In the Adolpho Ducke Forest Reserve (RFAD), a representative sample of the Terra-Firme ecosystem of Amazônia located in the Amazonas State, it is possible to find species of this genus, such as *Eugenia adenocalyx* and *Eugenia lisboae*. The *Eugenia* presents a botanical complexity and morphological similarity. This work has aimed to characterize the chemical composition and evaluate the antioxidant activities of *Eugenia adenocalyx* and *E. lisboae* in order to discriminate the chemical composition and corroborate with morphological studies of these species. The extracts obtained from these two *Eugenia* were analyzed using spectrometric methods assisted by chemometric tools. This methodology has proved to be efficient in chemical differentiation of these species, since it directs to isolation of the substances responsible for the chemical differentiation. The use of chromatographic and spectrometric techniques has resulted in the isolation and identification of rotundioic acid (**1**), di-hydro-kaempferol (**2**) and of di-hydro-kaempferol-3-O-[ $\beta$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -rhamnopyranoside (**3**) and from the ethanolic leaves extract of *E. lisboae*, besides five alkylresorcinols glycosides, 3-O-methyl-5-(1'-hydroxypentyl)-resorcinol-4-O- $\beta$ -glucopyranoside (**4**), 3-O-methyl-5-(1'-hydroxypentyl)-resorcinol-4-O- $\beta$ -(6''-galloyl)-glucopyranoside (**5**), 3-O-methyl-5-(1'-hydroxypentyl)-resorcinol-4-O- $\beta$ -(4'', 6''-di-galloyl)-glucopyranoside (**6**), 4-hydroxy-3-O-methyl-5-pentylresorcinol-1-O-[ $\alpha$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -glucopyranoside (**7**), 4-hydroxy-3-O-methyl-5-pentylresorcinol-1-O-[ $\alpha$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -(4''-galloyl)-glucopyranoside (**8**) and from the ethanolic leaves extract of *E. adenocalyx*. Among eight substances described, (**3-5**) and (**8**) have not yet been described in the literature. The identification of these substances permitted to verify which chemical composition is related to each species. The statistical analysis of the results from DPPH and ABTS methods have demonstrated that the ethanolic extracts of *E. adenocalyx* (EF4-3,  $IC_{50} = 90.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , EC4-3,  $mEqT = 1,914.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) have showed the best antioxidant activities. Being this extract slightly rich in alkylresorcinols derivative in their composition. The alkylresorcinol (**5**) presents range of values of  $IC_{50} = 59.37 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $mEqT = 1,879.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , and (**8**) indicates range of  $IC_{50} = 59.33 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $mEqT = 1,802.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Therefore, this chemical study has contributed with the chemical knowledge about the *Eugenia* genus, as well as corroborated with the taxonomic studies of both two similar Amazon species.

**KEY WORDS:** NMR, MS, CHEMOMETRY, HPLC, DPPH\*, ABTS\*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Distribuição das espécies de Myrtaceae (Página 20).
- Figura 2** – Algumas espécies de destaque “econômico” de Myrtaceae (Página 20).
- Figura 3** – Perfil químico da Família Myrtaceae (Página 21).
- Figura 4** – Espécies frutíferas de *Eugenia* ocorrentes no Brasil (Página 24).
- Figura 5** – Estabilização do radical DPPH\* por um antioxidante (Página 36).
- Figura 6** – Estabilização do radical ABTS\*\* por um antioxidante (Página 37).
- Figura 7** – Sistema utilizado para o acoplamento de CLAE-UV e CLAE-MS (Página 38).
- Figura 8** – Fluxograma do preparo dos extratos de folhas e caules das espécies *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae* (Página 42).
- Figura 9** – Fluxograma do isolamento dos constituintes do extrato de acetato de etila da *Eugenia lisboae* (AF3-1) (Página 49).
- Figura 10** – Cromatograma da amostra EF3m\_F8. Substância 3 isolada com tempo de retenção de 15,80 (Página 50).
- Figura 11** – Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico da *Eugenia lisboae* (EF3-1) (Página 51).
- Figura 12** – Cromatograma da amostra EF4m\_F5. Substância 4 isolada com tempo de retenção de 12,31, e substância 5 isolada com tempo de retenção de 16,03 (Página 52).
- Figura 13** – Cromatograma da amostra EF4m\_F5. Substância 7 isolada com tempo de retenção de 4,61, e substância 8 isolada com tempo de retenção de 5,32 (Página 53).
- Figura 14** – Fluxograma do isolamento dos constituintes a partir do extrato etanólico da *Eugenia adenocalyx* (EF4-1) (Página 54).
- Figura 15** – Gráfico Bi-plot da análise dos extratos de acetato de etila e etanol por PCA dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (Página 57).
- Figura 16** – Dendograma dos extratos de acetato de etila e etanol por HCA dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (Página 58).
- Figura 17** – Gráfico Bi-plot da análise dos extratos etanólicos por PCA dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (Página 59).

**Figura 18** – Dendograma dos extratos etanólicos por HCA dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Página 59).

**Figura 19** – Gráfico Bi-plot da análise dos extratos de acetato de etila e etanol por PCA dos espectros de massas no modo negativo (Página 60).

**Figura 20** – Dendograma dos extratos de acetato de etila e etanol por HCA dos espectros de massas no modo negativo (Página 61).

**Figura 21** – Espectro de massas da subfração SF10 (Página 62).

**Figura 22.** – Espectro de fragmentação do íon de  $m/z$  501 no espectrômetro de baixa resolução (Página 62).

**Figura 23** – Fragmentação do íon de  $m/z$  501 no espectrômetro de massas de alta resolução (Página 62).

**Figura 24** – Estrutura da Substância 1 (ácido rotundióico) (Página 64).

**Figura 25** – Principais correlações observadas no HMBC para substância 2 (Página 66).

**Figura 26** – Principais correlações observadas no COSY e HMBC para substância 3 (Página 69).

**Figura 27** – Principais correlações observadas no HMBC para substância 4 (Página 72).

**Figura 28** – ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  387 (Página 73).

**Figura 29** – Estrutura do fragmento de  $m/z$  225 observado no ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  387 (Página 74).

**Figura 30** – Principais correlações observadas no HMBC para substância 5 (Página 75).

**Figura 31** – ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  539, CID = 21 eV (Página 77).

**Figura 32** – ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  313, CID = 23 eV (Página 77).

**Figura 33** – Estrutura do fragmento de  $m/z$  225 observado no ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  539 (Página 78).

**Figura 34** – Estrutura do fragmento de  $m/z$  225 observado no ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  313 (Página 78).

**Figura 35** – ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  691, CID = 21 eV (Página 79).

**Figura 36** – ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  539 referente a substância 6, CID = 21 eV (Página 79).

**Figura 37** – ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  539 referente a substância 5, CID = 21 eV (Página 80).

**Figura 38** – Estrutura do fragmento de m/z 539 observado no ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 691 (Página 80).

**Figura 39** – Estrutura do fragmento de m/z 313 e m/z 169 observado no ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 691 (Página 80).

**Figura 40** – Principais correlações observadas no COSY e HMBC para substancia 7 (Página 82).

**Figura 41** – ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 503 referente a substância 7, CID = 18 eV (Página 84).

**Figura 42** – Estruturas dos fragmentos observados no ESI(-)-MS/MS para íon de m/z 503 (Página 84).

**Figura 43** – Principais correlações observadas no HMBC para substancia 8 (Página 86).

**Figura 44** – ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 655 referente a substância 8, CID = 23 eV (Página 87).

**Figura 45** – ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 445, CID = 20 eV (Página 88).

**Figura 46** – Estruturas dos fragmentos observados no ESI(-)-MS/MS para íon de m/z 655 (Página 88).

**Figura 47** – Estruturas dos fragmentos observados no ESI(-)-MS/MS para íon de m/z 445 (Página 89).

**Figura 48** – Boxplot da Análise de Variância dos valores de Cl<sub>50</sub> obtidos a partir dos extratos etanólicos e de acetato de etila de *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae* (Página 91).

**Figura 49** – Boxplot da Análise de Variância dos valores de mTeq obtidos a partir dos extratos etanólicos e de acetato de etila de *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae* (Página 92).

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1** – Substâncias isoladas a partir de espécies de Myrtaceae (Página 22).

**Quadro 2** – Características morfológicas das espécies *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae* (Página 26).

**Quadro 3** – Substâncias isoladas a partir de *Eugenia* spp (Página 30).

**Quadro 4** – Principais tipos de ensaios antioxidante baseados em HAT e ET (Página 36).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Código dos extratos obtidos por coleta (Página 41).

**Tabela 2** – Rendimento dos extratos por coleta (Página 55).

**Tabela 3** – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da substância **1** (11,4 T,  $\text{CDCl}_3$ ) (Página 64).

**Tabela 4** – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da Substância **2** (11,4 T,  $\text{DMSO-}d_6$ ) (Página 66).

**Tabela 5** – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da Substância **3** (11,4 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Página 69).

**Tabela 6** – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da Substância **4** (11,4 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Página 72).

**Tabela 7** – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da Substância **5** (11,4 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Página 76).

**Tabela 8** – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da Substância **7** (11,4 T  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Página 83).

**Tabela 9** – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da Substância **8** (11,4 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Página 86).

**Tabela 10** – Valores de  $\text{Cl}_{50}$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e  $\text{mEqT}$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para os extratos (Página 89).

**Tabela 11** – Valores de  $\text{Cl}_{50}$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e  $\text{mEqT}$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para as substâncias isoladas (Página 90).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABTS:</b>	(2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinaq-6-ácido sulfônico))
<b>ANOVA:</b>	Análise de Variância
<b>CLAE:</b>	Cromatografia Líquida de alta eficiência
<b>UV-EM:</b>	Detector de Ultravioleta hifenado a espectrômetro de massas
<b>DAD-EM:</b>	Detector de Arranjos de Diodos hifenado a espectrômetro de massas
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>:</b>	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
<b>DPPH:</b>	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
<b><i>d</i>:</b>	Dubleto
<b><i>dd</i>:</b>	Duplo dubleto
<b><i>ddd</i>:</b>	Duplo duplo dubleto
<b><i>dt</i>:</b>	Duplo tripleto
<b>EM:</b>	Espectrometria de Massas
<b>ESI:</b>	<i>Electrospray ionization</i>
<b>ET:</b>	<i>Electron Transfer</i>
<b>HAT:</b>	<i>Hydrogen Atom Transfer</i>
<b>HSQC:</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
<b>HMBC:</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<b>HCA:</b>	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
<b><i>J</i>:</b>	Constante de acoplamento
<b><i>m</i>:</b>	Multiplete
<b><i>m/z</i>:</b>	Relação massa/carga
<b>PCA:</b>	<i>Principal Components Analysis</i>
<b><i>ppm</i>:</b>	parte por milhão
<b><i>q</i>:</b>	Quadruplete
<b>Q-TOF:</b>	<i>Quadropole Time of Flight Mass</i>
<b>RMN:</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RFAD:</b>	Reserva Florestal Adolpho Duck
<b><i>s</i>:</b>	Singleto
<b><i>t</i>:</b>	Tripleto
<b>[M - H]<sup>-</sup>:</b>	Molécula desprotonada

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\delta$ : Deslocamento Químico

$t_R$ : Tempo de retenção

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. Objetivos.....	18
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. Revisão bibliográfica.....	19
3.1. <i>Eugenia</i> .....	24
3.1.1. Classificação taxonômica de <i>Eugenia</i> .....	25
3.1.3. A química de <i>Eugenia</i> .....	26
3.2. Atividade antioxidante.....	35
3.3. A importância das técnicas cromatográficas e espectrométricas no estudo dos Produtos Naturais.....	37
4. Metodologia.....	40
4.1. Reagentes e solventes.....	40
4.2. Coleta e identificação do material Vegetal.....	40
4.3. Preparo dos extratos de <i>Eugenia adenocalyx</i> e <i>E. lisboae</i> .....	40
4.4. Determinação das atividades antioxidantes.....	43
4.4.1. Determinação da capacidade sequestradora do radical DPPH'.....	43
4.4.2. Determinação da capacidade sequestradora do cátion radical ABTS <sup>•+</sup> ..	43
4.4.3. Análise estatística.....	44
4.5. Análise espectroscópica e espectrométrica.....	44
4.5.1. Análise por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup> H.....	44
4.5.2. Análise por Espectrometria de Massas.....	45
4.5.3. Análise quimiométrica dos dados de RMN de <sup>1</sup> H e EM.....	46
4.6. Identificação dos constituintes químicos da <i>Eugenia lisboae</i> . .....	47
4.7. Identificação dos constituintes químicos da <i>Eugenia adenocalyx</i> .....	51
5. Resultados e discussão.....	55
5.1. Rendimento dos extratos vegetais.....	55
5.2. Análise preliminar do perfil químico dos extratos.....	55
5.3. Análise quimiométrica por RMN de <sup>1</sup> H.....	57
5.4. Análise quimiométrica por EM.....	60
5.5. Identificação dos constituintes químicos de <i>Eugenia</i> .....	61
5.5.1. Determinação estrutural da substância 1.....	61

5.5.2.	Determinação estrutural da substância 2. ....	65
5.5.3.	Determinação estrutural da substância 3. ....	67
5.5.4.	Determinação estrutural da substância 4. ....	70
5.5.5.	Determinação estrutural da substância 5. ....	74
5.5.6.	Determinação estrutural da substância 6. ....	79
5.5.7.	Determinação estrutural da substância 7. ....	81
5.5.8.	Determinação estrutural da substância 8. ....	85
5.6.	Análise dos potenciais antioxidantes dos extratos e substâncias isoladas de <i>Eugenia adenocalyx</i> e <i>Eugenia lisboae</i> . ....	89
6.	Conclusão .....	93
7.	Referências .....	95
8.	Anexo .....	101

## 1. Introdução

Myrtaceae constitui uma das mais importantes e maiores famílias dentre as Angiospermas localizadas no Brasil (Souza, 2015). As espécies de Myrtaceae destacam-se pelo seu vasto potencial econômico, uma vez que seus frutos são muito utilizados na alimentação em forma de sucos, geleias, sorvete e mesmo *in natura*, podendo-se destacar as espécies *Psidium guajava* e *Eugenia uniflora*, conhecidas popularmente como goiabeira e pitangueira, respectivamente (Lorenzi, 2006).

Dentre os gêneros que constituem a família Myrtaceae, *Eugenia* é o maior em número de espécies, com aproximadamente 73% de suas espécies localizadas no Brasil (Souza, 2015). No bioma Amazônia, constituído por vários ecossistemas, dentre os quais o ecossistema da Amazônia de Terra Firme, destaca-se a Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD), uma amostra representativa desse ecossistema. Essa área de proteção ambiental está localizada na borda norte do perímetro urbano da cidade de Manaus (capital do Estado do Amazonas), abriga várias dessas espécies, como a *Eugenia punicifolia* usada no tratamento de problemas estomacais e diabéticos (Ribeiro *et al.*, 1999).

Espécies de *Eugenia* apresentam em sua composição química taninos condensados e hidrolisáveis, triterpenos, fenilpropanoides, flavonoides (Ghai *et al.*, 2014; Junior *et al.*, 2014), compostos fenólicos (Dan *et al.*, 2010) e diglicosídeos (Magina, 2008), cujas atividades antioxidantes e antitumorais, em parte já foram exploradas. No entanto, devido à grande diversidade de espécies de *Eugenia*, o mesmo ainda carece de estudos sobre sua composição química e suas atividades biológicas.

Poucos são os estudos sobre as espécies *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae*, dentre os quais se destaca a dissertação de mestrado em Química intitulado “Caracterização Química e Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais das Folhas de *Eugenia spp.* (Myrtaceae) ocorrentes na Amazônia de Terra Firme” desenvolvido por Azevedo (2014). Nesse estudo, Azevedo descreve a composição química aos óleos essenciais de *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae*, cujos perfis cromatográficos são semelhantes (*Pearson* = 0,63), porém distinto

visto que a *E. adenocalyx* apresenta teores significativos de monoterpenos (17,94%, principalmente  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno).

Outro trabalho envolvendo as espécies em destaque consiste no estudo taxonômico de *Eugenia* spp. ocorrentes na RFAD, intitulado “Estudos em *Eugenia* L. (Myrtaceae) na Amazônia Central: taxonomia com o uso de ferramentas morfoanatômicas” (Souza, 2015). Esse estudo evidenciou a partir de caracteres morfológicos e anatômicos que essas duas espécies, antes denominadas afins por McVough (Mcvaugh, 1959) e nomeadas como *Eugenia citrifolia* e *E. aff. citrifolia*, respectivamente (Souza, 2015), apresentam caracteres morfológicos e anatômicos distintos, porém semelhantes. Souza (2015) reclassificou-as como *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae*, respectivamente, sendo essa última descrita como uma nova espécie de *Eugenia* (Souza, 2016).

Portanto, a proposta desse estudo é investigar a composição dos constituintes químicos fixos presentes nas espécies *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae*, empregando-se técnicas cromatográficas e espectrométricas, visando discriminar como a composição química pode corroborar na diferenciação botânica dessas duas espécies. Além disso, pretende-se determinar os potenciais antioxidantes dos extratos e das substâncias isoladas a partir dessas matrizes.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

- Estudar a composição química de duas espécies botânicas semelhantes: *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae*, bem como avaliar os potenciais antioxidantes das substâncias isoladas e dos extratos dessas espécies.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Analisar o perfil químico dos extratos de *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae* por Espectrometria de Massas e de Ressonância Magnética Nuclear;
- Isolar e caracterizar as substâncias de *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae* responsáveis pelas semelhanças e diferenças espectrais;
- Avaliar as atividades antioxidantes das substâncias isoladas e dos extratos das folhas e dos caules de *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae* obtidos em três períodos distintos de coleta.

### 3. Revisão bibliográfica

Com o avanço da ciência nos últimos anos, principalmente na área dos produtos naturais, substâncias bioativas presentes nas plantas tornaram-se populares como agentes terapêuticos complementares ou alternativos para gerir e/ou tratar doenças crônicas. Estudos têm mostrado que partes das plantas como as folhas, os caules e as frutas têm diferentes substâncias bioativas que podem agir sozinhas ou juntas em vários fatores fisiopatológicos alvos de doenças crônicas, como antidiabéticos, anti-câncer, antioxidante e anti-inflamatório (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2005; Vilar *et al.*, 2008; Devalaraja *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2015).

O Brasil apresenta uma ampla biodiversidade, com vários biomas distintos, destacando-se o bioma Amazônia, o qual apresenta milhares de espécies vegetais pertencentes a diversas famílias, dentre as quais destaca-se a família Myrtaceae que constitui um grupo complexo que apesar de estar bem representada em diversidade ainda apresenta poucos estudos (Souza, 2015; Souza *et al.*, 2016).

#### 3.1. Considerações gerais sobre Myrtaceae

No atual sistema taxonômico, Myrtaceae pertence ao grupo das Angiospermas, cuja divisão é Magnoliophyta, classe Magnoliopsida e ordem Myrtales (Bremer *et al.*, 2009). No mundo, a família Myrtaceae compreende cerca de 142 gêneros com aproximadamente 5.500 espécies, sendo a segunda maior família da ordem. Essa família apresenta uma distribuição predominante nas regiões tropicais e subtropicais, entretanto, a maior parte de suas espécies concentra-se na região neotropical (Figura 1), podendo ocorrer desde o México até a Argentina (Romagnolo e Souza, 2006).

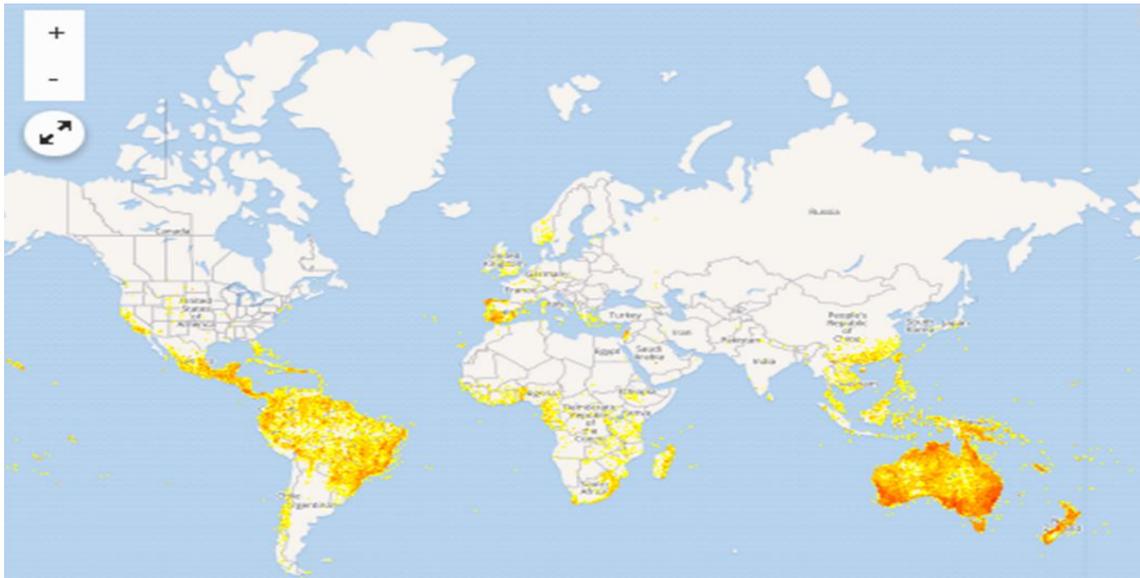


Figura 1 Distribuição das espécies de Myrtaceae (Global Biodiversity Information Facility, 2017)

Do ponto de vista econômico, o *Eucalyptus* spp. (eucalipto) com diversas espécies de rápido crescimento é cultivado principalmente para obtenção de madeira e utilizado para a produção de mourões, postes, carvão e na fabricação de papel. Já os botões florais de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) são muito utilizados como especiaria na culinária mundial (Figura 2) (Souza e Lorenzi, 2008).

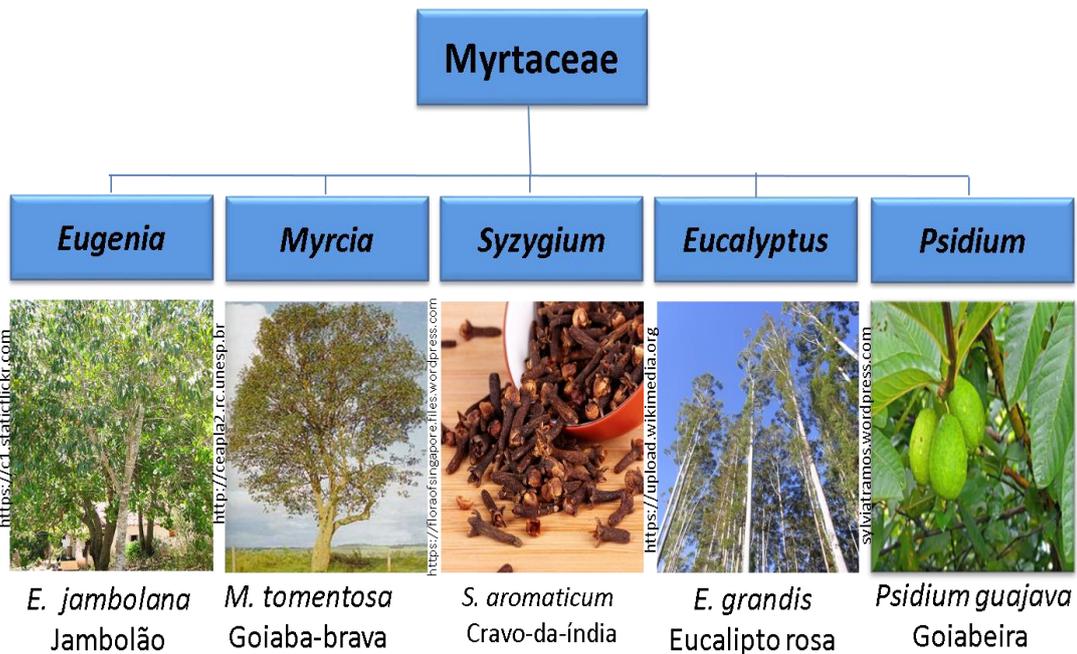


Figura 2 Algumas espécies de destaque “econômico” de Myrtaceae.

Representando uma das maiores famílias da flora brasileira, Myrtaceae distribui-se em 26 gêneros com aproximadamente 1000 espécies já catalogadas. Dentre as regiões do Brasil, a Floresta Atlântica e as áreas de Restinga

apresentam o maior número de espécies pertencentes aos gêneros *Eugenia*, *Marlierea*, *Gomidesia* e *Myrcia*.

Quanto ao perfil químico das espécies de Myrtaceae (Figura 3), o mesmo caracteriza-se pela presença de taninos, terpenos (mono-, sesqui- e triterpenos), flavonoides, derivados do floroglucinol, cromenos, estilbenoides e outros (Cruz e Kaplan, 2004).

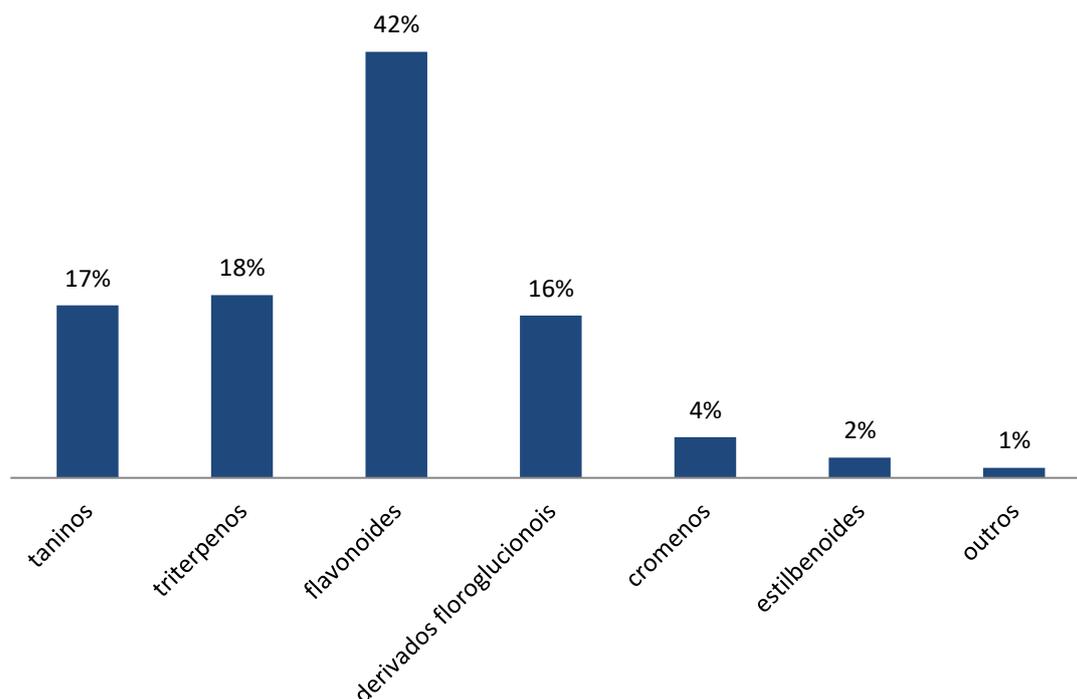


Figura 3 Perfil químico da Família Myrtaceae (Adaptado de CRUZ e KAPLAN, 2004).

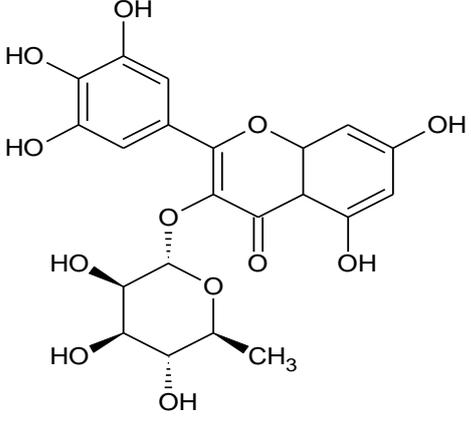
Estudos relatam a presença de substâncias isoladas de folhas e caules de espécies pertencentes à família Myrtaceae, como a miricitrina, um flavonoide isolado das folhas e caules de *Myrcia splendens* e *Myrcia palustris*. A miricitrina e seus extratos de origem apresentaram capacidade sequestradora do radical DPPH, onde foi constatado que os extratos brutos apresentam um potencial antioxidante melhor do que a própria substância isolada (Moresco *et al.*, 2014). Além da miricitrina, o ácido betulínico, um triterpeno do tipo lupânico isolado a partir de folhas de *Eugenia grandis*, possui atividade biológica e farmacológica incluindo antioxidante, antitumoral, anti-HIV e anti-inflamatório (Pisha *et al.*, 1995; Manoharan *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2015).

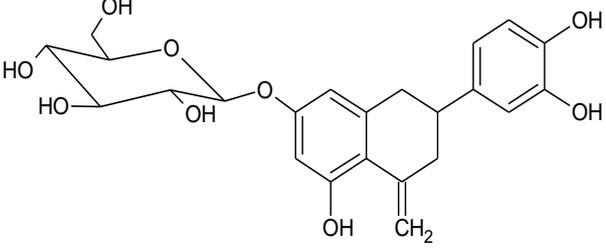
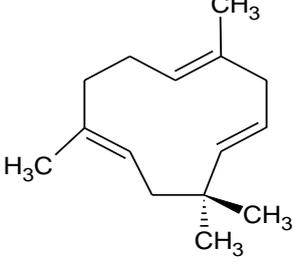
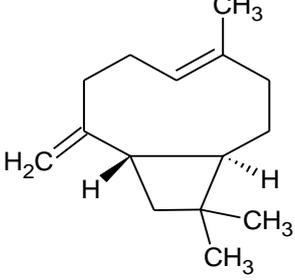
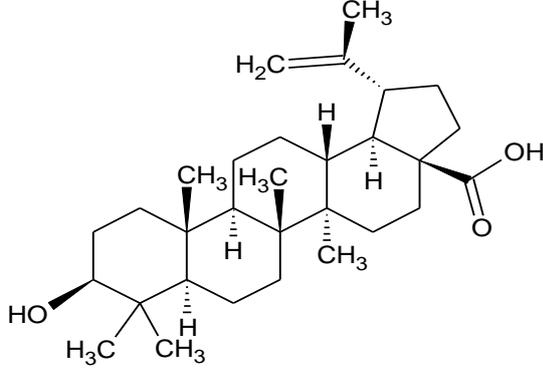
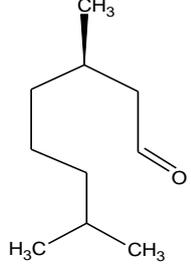
O fracionamento do extrato acetato de etila dos caules e das folhas de *Myrcia bracteata* resultou no isolamento e na determinação estrutural de quatro substâncias glicosiladas pertencentes à classe dos flavonoides, sendo duas dihidroflavonas a naringenina - 7-O-glucosídeo e o eriodictiol-7-O-glucosídeo, um dihidroflavonol a astilbina e o flavonol quercitrina (Lopes, 2015).

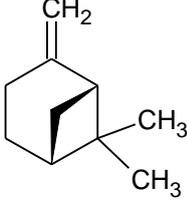
Visando analisar os perfis cromatográficos e espectrométricos dos óleos essenciais de espécies de *Eugenia*, foi identificado o sesquiterpeno  $\alpha$ -humuleno como um dos constituintes da *Eugenia magna* e *E. ramossi*. Além deste, foi isolado como constituinte majoritário o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno, assim como o  $\alpha$ -humuleno apresenta atividades biológicas, tais como anti-inflamatória e anticancerígena (Potzernheim *et al.*, 2006; Legault, 2007; Azevedo, 2014).

Dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* foi isolado como constituinte majoritário o monoterpene citronelal. Para o óleo essencial de *Eucalyptus grandis* foram isolados como constituintes majoritários o  $\beta$ -pineno e o terpineno. Essas espécies apresentam propriedade antibacteriana frente a bactérias Gram negativas (Estanislau *et al.*, 2001). O Quadro 1 mostra algumas substâncias isoladas a partir de espécies pertencentes a diferentes gêneros de Myrtaceae.

Quadro 1 Algumas substâncias isoladas a partir de espécies de Myrtaceae.

Espécie	Parte da planta	Estrutura química das substâncias	Referência
<i>Myrcia splendens</i> e <i>Myrcia palustris</i>	Folhas	 <p>(miricitrina)</p>	(Moresco <i>et al.</i> , 2014)

<i>Myrcia bracteata</i>	Folhas	 <p>(eriodictiol 7-O-β-D-glicosídeo)</p>	(Lopes, 2015)
<i>Eugenia magna</i> e <i>Eugenia ramosii</i>	Folhas	 <p>(α-humuleno)</p>  <p>(β-cariofileno)</p>	(Azevedo, 2014)
<i>Eugenia grandis</i>	Folhas	 <p>(ácido betulínico)</p>	(Manoharan <i>et al.</i> , 2007)
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Folhas	 <p>(citronelal)</p>	(Estanislau <i>et al.</i> , 2001)

<i>Eucalyptus grandis</i>	Folhas	 <p>(β-pineno)</p>	(Estanislau <i>et al.</i> , 2001)
---------------------------	--------	---	-----------------------------------

### 3.1. *Eugenia*

*Eugenia* é um dos maiores gêneros de Myrtaceae, constituído por aproximadamente 1038 espécies, das quais cerca de 390 encontram-se no Brasil, sendo 302 endêmicas (Sobral, 2015). Na Figura 4 encontram-se algumas espécies frutíferas pertencentes ao gênero *Eugenia*. Apresentando uma ampla distribuição no bioma Amazônia, *Eugenia* ocorre majoritariamente em ecossistema de Terra Firme (Morais *et al.*, 2014), e em também em ecossistema de Várzea (Carim *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2009)



Figura 4 Espécies frutíferas de *Eugenia* ocorrentes no Brasil.

### 3.1.1. Classificação taxonômica de *Eugenia*

A classificação taxonômica de *Eugenia*, descrita por Cronquist, é apresentada a seguir (Cronquist, 1981):

REINO: Plantae

Classe: Magnoliopsida

SUBCLASSE: Rosidae

ORDEM: Myrtales

FAMÍLIA: Myrtaceae

SUBFAMÍLIA: Myrtoideae

TRIBO: Myrtae

SUBTRIBO: Eugeniinae

GÊNERO: *Eugenia*

Localizada no estado do Amazonas, a Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD), local cujo levantamento florístico ainda está sendo realizado pelo Projeto Flora da Reserva Ducke (INPA-DFID), relata que metade das espécies de Myrtaceae pertencentes ao gênero *Eugenia*. Algumas dessas espécies pertencentes a esse gênero são utilizadas para a prevenção e tratamento de doenças, como exemplo, para o tratamento de diarreia, reumatismo, febre, colesterol, diabetes, resfriado e males do fígado (Cruz e Kaplan, 2004).

### 3.1.2. Complexidade morfológica do gênero *Eugenia*

Estudos sobre a morfologia das espécies de *Eugenia* evidenciam a presença de espécies pertencentes ao mesmo complexo morfológico, como a *E. adenocalyx* que faz parte do complexo morfológico da *Eugenia lisboae*, *E. conduplicata*, *E. dittocrepis*, *E. ochrophloea*, *E. peregrina* e *E. schottiana*. A grande semelhança morfológica entre essas espécies acaba por dificultar a identificação das mesmas, resultando em espécimes comumente incluídas ou identificadas como “aff.” (afins) ou “cf.” (Souza, 2015).

Após análises taxonômicas recentes e novas comparações com espécies desse complexo morfológico foi possível definir as diferenças morfológicas entre

espécies *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae* (Souza, 2015). No entanto, estudos sobre a composição química dessas espécies são úteis para detalhar ainda mais as suas diferenças, além de contribuir para os estudos posteriores sobre espécies de *Eugenia*. O Quadro 2 lista as principais diferenças do ponto de vista morfológico entre as espécies *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae*.

Quadro 2 Características morfológicas das espécies *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae* (adaptado de Souza, 2015).

<i>Eugenia adenocalyx</i>	<i>Eugenia lisboae</i>
Râmulos achatados, lisos, cinza.	Râmulos cilíndricos, estriados, cinza ou marrons.
Folhas largo-elípticas ou ovaladas, ápice acuminado.	Folhas elípticas, estreitadas, ápice agudo a acuminado.
Inflorescências glomeruladas, pedicelos 3 mm de comprimento; pétalas obovadas.	Inflorescências fasciculadas, pedicelos >5mm de comprimento; pétalas unguiculadas.
Frutos globosos, oblatos, ca. 15-18 mm diâmetro., pericarpo glandular-rugoso, succulento.	Frutos (sub)globosos ou elipsoides, 8-10 x 6-7 mm; pericarpo não glanduloso, não succulento.

### 3.1.3. A química de *Eugenia*

Na Amazônia, *Eugenia* apresenta um elevado número de espécies, resultando em sua complexidade do ponto de vista botânico e químico. *Eugenia* apresenta inúmeros estudos químico, visando assim agregar valor científico, uma vez que, os estudos podem auxiliam na diferenciação das espécies do ponto de vista químico, de forma a compreender como os metabólitos secundários podem influenciar na classificação botânica. Com isso, inúmeros são os estudos que visam identificar os metabólitos secundários das plantas com a finalidade de determinar suas estruturas e, conseqüentemente, suas atividades químicas e biológicas (Villas-Bôas e Gombert, 2006; Devalaraja *et al.*, 2011; Junior *et al.*, 2014).

*Eugenia* apresenta em sua composição química (Quadro 3) uma quantidade elevada de compostos fenólicos, como flavonoides e taninos, além de substâncias como os terpenos e seus derivados. Essas classes de

substâncias são as responsáveis por diversas atividades químicas e biológicas, com destaque para as atividades antioxidantes e antitumorais (Rique *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos em grande parte são conhecidos por apresentarem atividade antioxidante, atribuída à presença de grupos hidroxilas fenólicas que podem doar átomos de hidrogênios para os radicais livres estabilizando assim os mesmos. O radical livre formado no átomo de oxigênio é estabilizado por ressonância com o anel aromático (Huang *et al.*, 2005). Compostos fenólicos incluem os fenólicos simples, os ácidos fenólicos, ácidos hidrocínâmicos, estilbenos, flavonoides e proantocianidinas (Ferreira e Matsubara, 1997; Lelono e Tachibana, 2013).

Visando identificar a presença de substâncias fenólicas com atividades químicas e biológicas que do extrato etanólico das flores de *E. caryophyllate* foi isolado o flavonoide 2-O-(6'-O-galoil)- $\beta$ -D-glucopiranosilbenzoato de metila. *E. caryophyllate* é amplamente conhecida por seu uso tradicional na medicina caseira para o tratamento de vômito e náusea (Dan *et al.*, 2010).

A partir do extrato bruto das flores de *E. caryophyllus* foi isolado o flavonoide gossipetina 7-O-ramnopiranosídeo. Estudos sobre os extratos dessa espécie constataam a presença da atividade antiestresse, analgésica e inibição mais potente que a da aspirina contra a coagulação (Ghai *et al.*, 2014).

Das folhas de *E. uniflora* foram isolados oito compostos, dos quais dois são os triterpenos (ácido betulínico e centelloside C), três flavonoides (miricitrina, miricetina 3-O-(4''-O-galoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo e miricetina 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo) e dois megastigmanes: actinidioionosídeo e (6S,9R)-roseosídeo, sendo que os flavonoides miricitrina e miricetina 3-O-(4''-O-galoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo apresentam atividade antibacteriana contra *S. aureus* (Samy *et al.*, 2014).

As substâncias miricitrina e miricetina 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo apresentam potencial antioxidante frente ao teste do radical DPPH<sup>•</sup>. Os compostos miricetina 3-O-(4''-O-galoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo e miricetina 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo apresentam moderada atividade inibidora de crescimento de

linhagens de células cancerígenas humanas do pulmão (A549) (Samy *et al.*, 2014).

A partir do fruto de *E. pyriformis* foi isolado compostos fenólicos como ácido gálico e quercetina. Atualmente, o ácido gálico tem recebido muita atenção devido a sua potencialidade frente à eliminação de radicais livres e atividade antioxidante, já o flavonoide quercetina destaca-se por suas propriedades antioxidantes que resultam em sua capacidade de eliminação de metais radicais e íons quelantes livres. Estas propriedades permitem à quercetina inibir a peroxidação lipídica (Haminiuk *et al.*, 2014).

A partir de folhas de *E. jambolana* foram isolados e identificados dois glicosídeos flavonol acetilados e quinze polifenóis, sendo dois relatados pela primeira vez, mearnsentina 3-O-(4"-O-acetil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo e o miricetina 3-O-4"-O-acetil-2"-O-galoil, além de substâncias como o ácido gálico, galato de metilo, kaempferol, miricetina, ácido elágico, ácido 3-O-metilelágico, miricetina 3-O-(4"-O-acetil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo (miricetrina 4"-O-acetato), miricetina 4'-metil éter 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, miricitrina, ácido clorogênico, quercetrina 4"-O-acetato, quercetina 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, kaempferol 3'-D-glucuronopiranosídeo, miricetina 3-O- $\beta$ -D-glcuronopiranosídeo, anelagitanino e nilocitina. Das substâncias isoladas dessa espécie, o kaempferol é utilizado na inibição da atividade de ácidos graxos, inibindo assim, a lipogênese, além de apresentar atividade antidiabética por diminuir o glicogênio na corrente sanguínea (Mahmoud *et al.*, 2001). De seus frutos também foram isolados dois novos galataninos hidrolisáveis: jamutaninos A e B (Omar *et al.*, 2012).

O ácido 3 $\beta$ -*trans*-*p*-coumaroiloxi-2 $\alpha$ ,23-dihidroiolean-12-en-28-oico isolado do extrato de clorofórmio de *Eugenia sandwicensis* mostrou uma atividade inibitória significativa (79.2% a 4 mg.ml<sup>-1</sup>) em um 7,12-dimetilbenzantraceno induzido por cultura de órgãos mamários de ratos (Gu *et al.*, 2001).

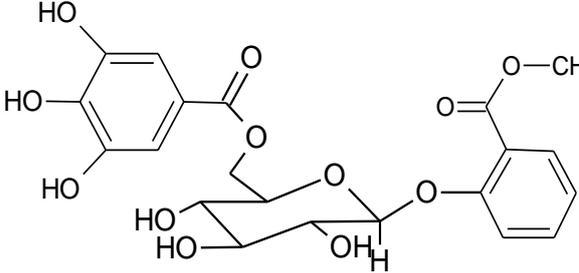
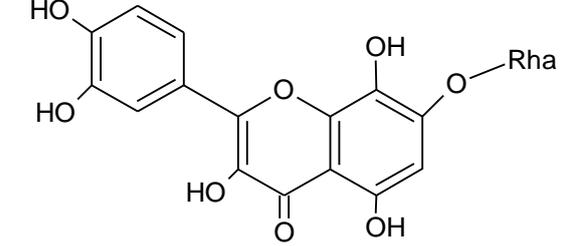
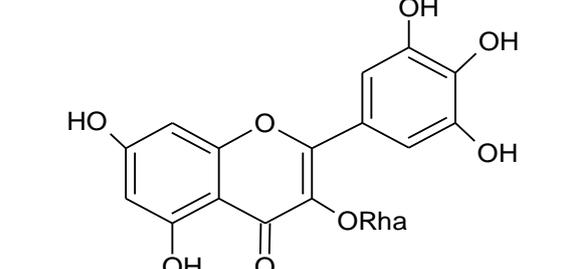
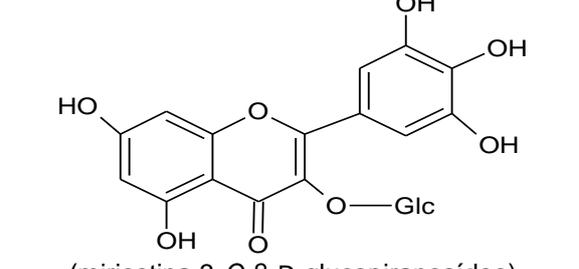
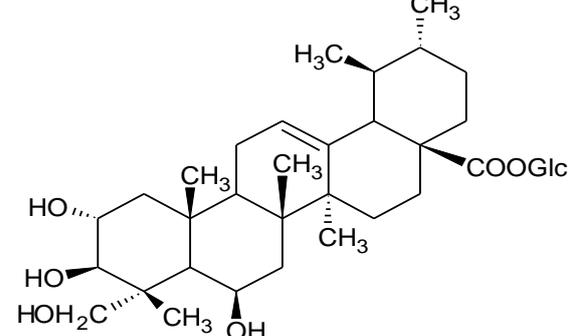
A partir das cascas da *E. polyantha* foram isolados e identificados a catequina o ácido gálico e a rutina. As substâncias isoladas foram submetidas aos testes de atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH. O catequina foi

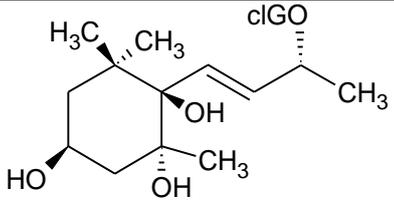
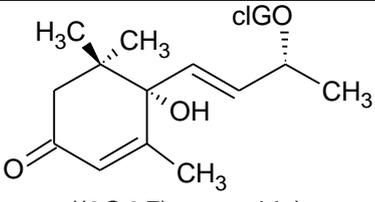
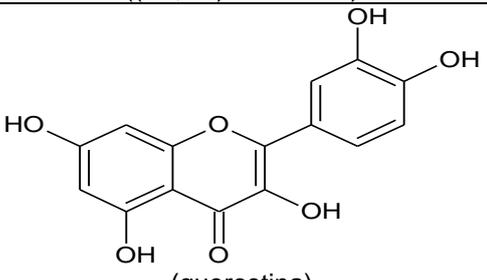
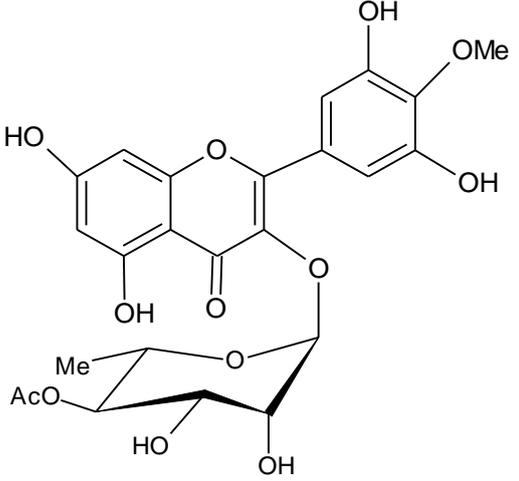
obtido da fração de butanol (81%), o ácido gálico foi isolado da fração de acetona (40%) e sua atividade antioxidante foi de 94,68% frente ao radical DPPH·. A rutina foi isolada da fração de acetato de etila. Da classe dos flavonoides, a rutina apresenta ação protetora do endotélio vascular, anti-inflamatória e antiedematosa (Lelono e Tachibana, 2013).

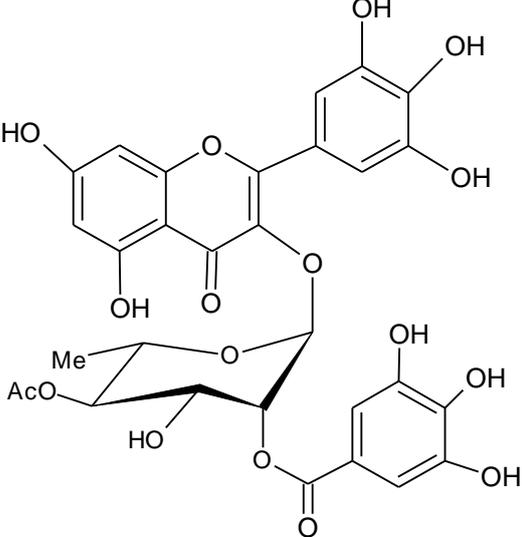
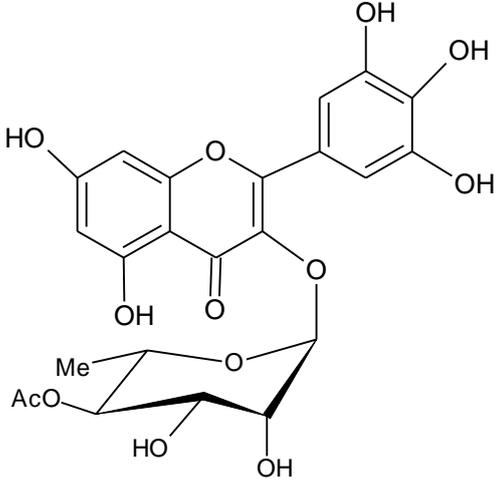
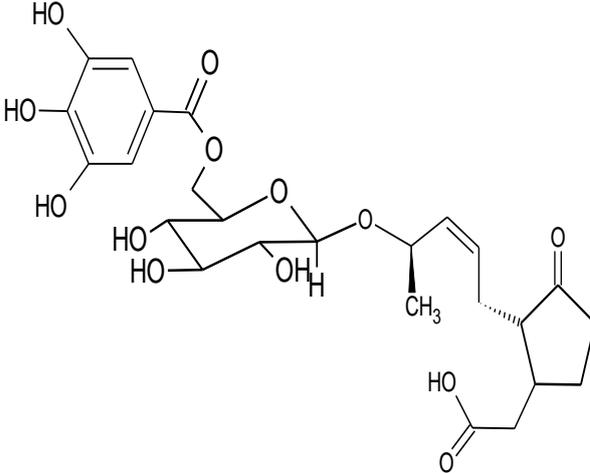
A fração de diclorometano proveniente do fruto não maduro de *Eugenia umbelliflora* foram isolados o eugenial A e B e dois novos terpenoides, eugenial C e D, cujos dados obtidos da atividade antibacteriana dessas substâncias evidenciaram uma potente atividade contra as bactérias *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, semelhante à dos antibióticos utilizados em terapias antimicrobianas (Faqueti *et al.*, 2015).

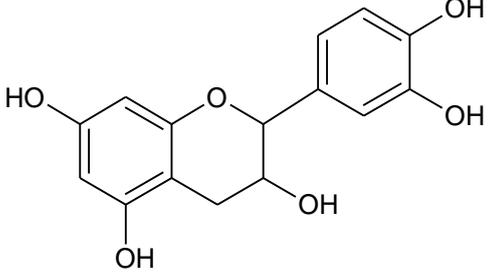
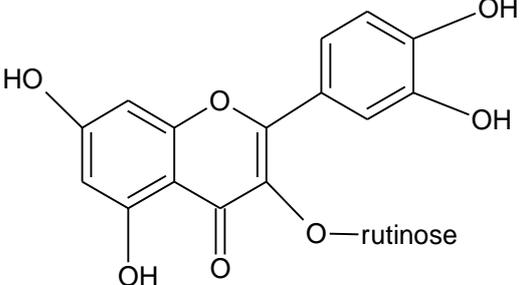
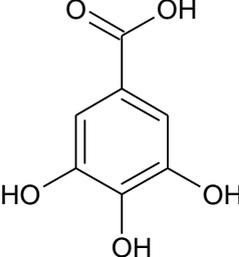
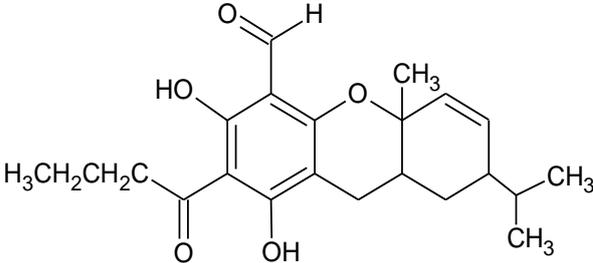
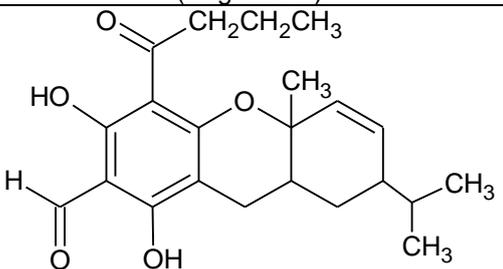
A análise direta do extrato bruto da *Eugenia catharinae* possibilitou a identificação de seis novas substâncias pertencentes ao grupo dos alquilresorcinois glicosilados (Wubshet *et al.*, 2015). Algumas substâncias pertencentes a esse grupo são descritas na literatura com atividades químicas e biológicas, dentre estas podemos destacar as atividades antioxidantes frente os ensaios de DPPH· e FRAP; e biológica, uma vez que, auxiliam na inibição do crescimento de células de câncer do cólon humano, como as linhagens de células HCT-116 e HT-26 na faixa de concentração de 5-50 mg.mL<sup>-1</sup> (Zhu *et al.*, 2011).

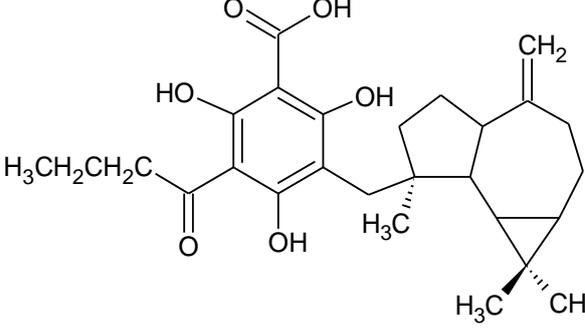
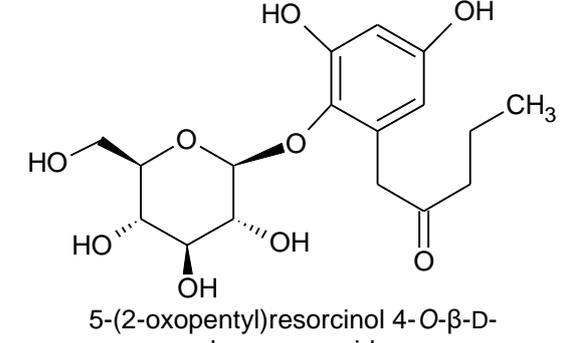
Quadro 3 Substâncias isoladas a partir de algumas *Eugenia* spp.

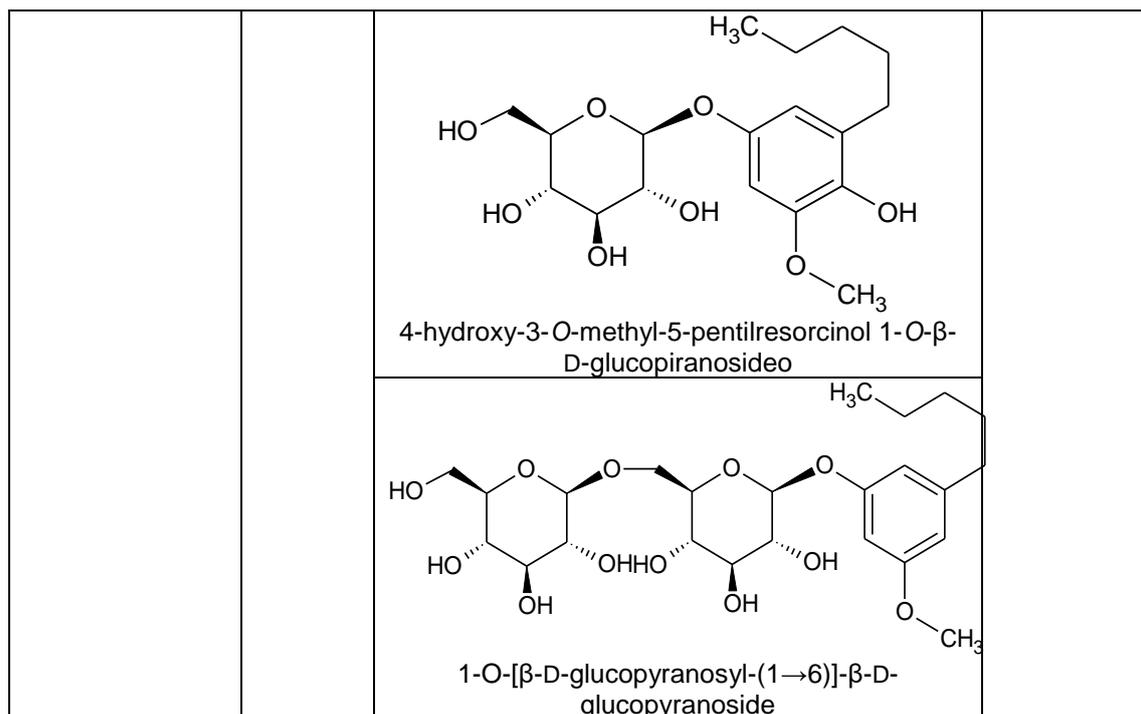
Espécie	Parte da planta	Estrutura química das substâncias	Referência
<i>Eugenia caryophyllate</i>	Flores	 <p>(2-O-(6'-O-galoil)-β-D-glucopiranosilbenzoato de metilo)</p>	(Dan <i>et al.</i> , 2010)
<i>Eugenia caryophyllus</i>	Flores	 <p>(gospipetina 7-O-ramnopiranosídeo)</p>	(Ghai <i>et al.</i> , 2014)
<i>Eugenia uniflora</i>	Folhas	 <p>(miricetina 3-O-(4''-O-galoil)-α-L-ramnopiranosídeo)</p>	(Samy <i>et al.</i> , 2014)
	Folhas	 <p>(miricetina 3-O-β-D-glucopiranosídeo)</p>	
	Folhas	 <p>(centelloside C)</p>	

	Folhas	 <p>(actinidioionoside)</p>	
	Folhas	 <p>((6S,9R)-roseoside)</p>	
<i>Eugenia pyriformis</i>	Frutos	 <p>(quercetina)</p>	(Haminiuk <i>et al.</i> , 2014)
<i>Eugenia jambolana</i>	Folhas	 <p>(mearnsentina 3-O-(4''-O-acetil)-<math>\alpha</math>-L-<sup>1</sup>C<sub>4</sub>-ramnopiranosídeo)</p>	(Mahmoud <i>et al.</i> , 2001)

<p><i>Eugenia jambolana</i></p>	<p>Folhas</p>	 <p>(miricetina 3-O-(4''-O-acetil-2''-O-galoil)-α-L-1C4-ramnopiranosídeo)</p>	
<p><i>Eugenia jambolana</i></p>	<p>Folhas</p>	 <p>(miricetina 3-O-(4''-O-acetil)-α-L-1C4-ramnopiranosídeo)</p>	
<p><i>Eugenia jambolana</i></p>	<p>Frutos</p>	 <p>(5-(5-carboximetil-2-oxociclopentil)-3Z-2S-pentenil-β-(6-O-galloil)glucopiranosídeo-amutanino A)</p>	<p>(Omar et al., 2012)</p>

<i>Eugenia polyantha</i>	Casca	 <p>(catequina)</p>	
<i>Eugenia polyantha</i>	Casca	 <p>(rutina)</p>	(Lelono e Tachibana, 2013)
<i>Eugenia polyantha</i>	Casca	 <p>(ácido gálico)</p>	
<i>Eugenia umbellif lora</i>	Frutos	 <p>(Eugenial A)</p>	(Faqueti et al., 2015)
		 <p>(Eugenial B)</p>	

		 <p>(Eugenial C)</p>	
		 <p>(Eugenial D)</p>	
<i>Eugenia catharinae</i>	Folhas	 <p>5-(2-oxopentyl)resorcinol 4-O-β-D-glucopyranoside</p>	(Wubshet <i>et al.</i> , 2015)
		 <p>5-pentylresorcinol 4-O-[α-Dapiofuranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranoside</p>	



### 3.2. Atividade antioxidante

Substâncias oxidantes e radicais livres são apontadas como os causadores do envelhecimento precoce e de doenças degenerativas relacionadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais. Estudos sobre substâncias antioxidantes que apresentam como principal função a capacidade de eliminação ou neutralização de moléculas de radicais livres presentes em sistemas biológicos têm atraído a atenção de pesquisadores de áreas como bioquímica, química de materiais e química de produtos naturais (Huang *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2007; Magina, 2008).

Com base nas reações químicas envolvidas, os ensaios de capacidade antioxidante podem ser divididos em duas categorias de reações: ensaio baseado nas reações de Transferência de Átomo de Hidrogênio (HAT) e ensaio baseado na reação de Transferência de Elétrons (ET) (Huang *et al.*, 2005). Os ensaios baseados em ET medem a capacidade de um antioxidante em reduzir um oxidante, que ao ser reduzido adquire uma coloração diferente. A maioria dos ensaios baseados em HAT aplica um esquema de reações competitivas, nas quais antioxidante e substratos competem por radicais gerados termicamente através da decomposição de compostos azos. De acordo com o método

proposto para analisar a atividade antioxidante, os ensaios ET e HAT podem ser utilizados para determinar a atividade antioxidante de diferente classe de compostos, com base nisso esses ensaios são realizados de diferentes maneiras com basicamente a mesma finalidade. No Quadro 4 estão classificados os principais tipos de ensaios antioxidantes de acordo com seus mecanismo químico (Re *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2005).

Quadro 4 Principais tipos de ensaios antioxidante baseados em HAT e ET.

Ensaio baseado em HAT	Ensaio baseado em ET
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inibição induzida de auto oxidação de lipoproteínas de baixa densidade</li> <li>• Capacidade de absorção de radical oxigênio (ORAC)</li> <li>• Parâmetro antioxidante total de aprisionamento radical (TRAP)</li> <li>• Ensaio de branqueamento da crocina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinação dos fenóis totais por reagente de Folin-Ciocalteu (RFC)</li> <li>• Poder antioxidante de redução do Ferro (FRAP)</li> <li>• Potencial antioxidante total utilizando o íon Cu (II) como oxidante</li> <li>• Captura do radical DPPH<sup>•</sup></li> <li>• Monitoramento do decaimento do cátion radical ABTS<sup>•+</sup></li> </ul>

Dos ensaios listados no Quadro 4 destacam-se os que tem sido mais utilizado para determinar a capacidade antioxidante dos extrato e substâncias das espécies de plantas, aos quais incluem-se o método com DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1picril-hidrazil) e com ABTS<sup>•+</sup> [2,2´azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] (Magalhaes *et al.*, 2008; Dudonne *et al.*, 2009; Tresina *et al.*, 2012).

Como base nos aspectos químicos, o método DPPH<sup>•</sup> se baseia na captura do radical DPPH<sup>•</sup> por antioxidantes (Figura 5), produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm (Rufino *et al.*, 2007b; Magalhaes *et al.*, 2008).

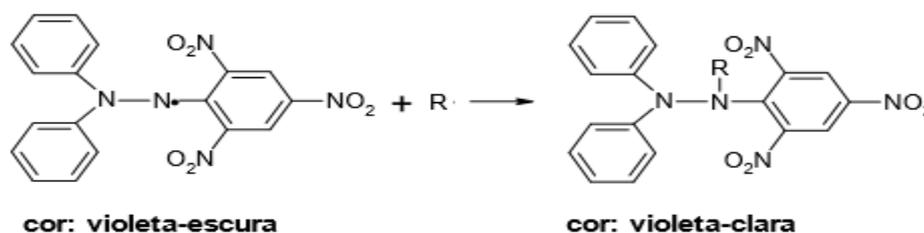


Figura 5 Estabilização do radical DPPH<sup>•</sup> por um antioxidante (Rufino *et al.*, 2007b).

O ensaio de descoloração do cátion radical  $ABTS^+$ , baseia-se na redução do cátion radical  $ABTS^+$  por antioxidantes dos extratos de plantas testados (Figura 6) (Huang *et al.*, 2005; Rufino *et al.*, 2007a; Magalhaes *et al.*, 2008).

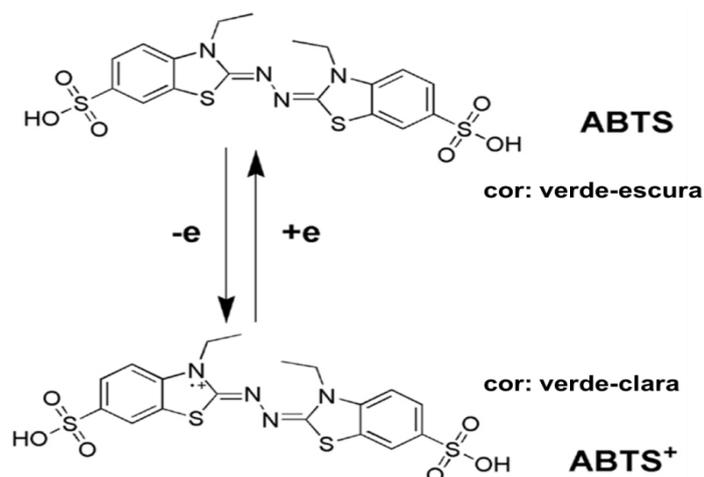


Figura 6 Estabilização do radical  $ABTS^+$  por um antioxidante (Rufino *et al.*, 2007a).

Devido sua praticidade e baixo custo, ensaios antioxidante como a captura do radical  $DPPH^{\cdot}$  e monitoramento do decaimento do cátion radical  $ABTS^+$  tornaram-se ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos (Sousa *et al.*, 2007). Além disso, estes ensaios podem auxiliar na escolha das espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos e comprovar a presença de substâncias antioxidantes em alimentos como frutas, legumes e bebidas. Na área dos produtos naturais esses ensaios são muito utilizados para se determinar a atividade antioxidante de extrato e substâncias isoladas como: compostos fenólicos em geral, fenilpropanoides, flavonoides, cumarinas, quitosana com diferentes pesos moleculares, antocianinas, carotenoides, rutinas e kaempferol (Re *et al.*, 1999; Borges *et al.*, 2011).

### 3.3. A importância das técnicas cromatográficas e espectrométricas no estudo dos Produtos Naturais

Os avanços relacionados à química dos produtos naturais sempre estiveram ligados ao desenvolvimento tecnológico de técnicas cromatográficas e espectrométricas. Com o passar dos anos houvesse a necessidade de caracterizar substâncias de interesses em misturas complexas, uma vez que, métodos clássicos baseados no isolamento dos constituintes químicos são

dispendiosos de tempo e matérias cromatográficas. Com a finalidade de diminuir o tempo de análise e o custo relacionado às mesmas, investiu-se em metodologias que fazem uso de técnicas cromatográficas hífenadas ou não a técnicas espectrométricas modernas, as quais poderão aumentar de forma considerável a sensibilidade e a seletividade da análise estrutural dos compostos de interesse (Queiroz e Hostettmann, 2006).

Dentre as técnicas cromatográficas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas mais utilizadas para análise e isolamento de produtos naturais. A CLAE tem sido utilizada de maneira rotineira como “piloto” para o isolamento em escala preparativa de produtos naturais pela otimização das condições experimentais, pelo controle de diferentes frações obtidas durante o isolamento e pelo controle da pureza final dos compostos isolados (Queiroz e Hostettmann, 2006; Thammana, 2016).

A utilização da CLAE hífenada (Figura 7) com detectores de ultravioleta (CLAE-UV) e/ou espectrometria de massa (CL-UV-EM), proporcionou um grande avanço na química dos produtos naturais, uma vez que a união dessas técnicas possibilitou o estudo de matrizes complexas, ao mesmo tempo em que se é realizada a medida dos comprimentos de absorção e o monitoria dos íons presentes nas matrizes de estudo (Lindon *et al.*, 1997).

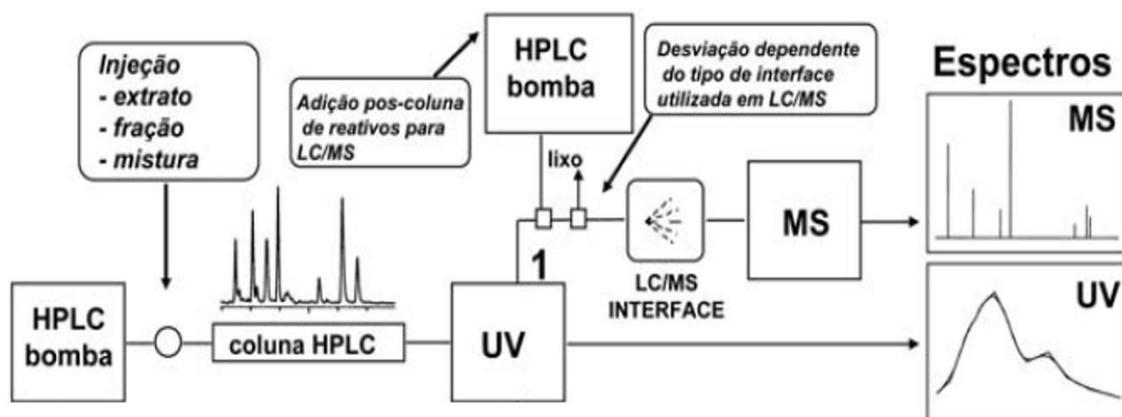


Figura 7 Sistema utilizado para o acoplamento de CLAE-UV e CLAE-EM (Adaptado de Queiroz e Hostettmann, 2006).

Dentre as técnicas espectrométricas, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massas (EM) destacam-se, revolucionando a elucidação de estrutura de substâncias oriundas de produtos naturais ao ponto

de que algumas estruturas agora podem ser determinadas em pouco tempo com 1 mg ou menos de amostra. A união dessas duas técnicas espectrométricas e espectroscópicas tornou-se um meio extremamente poderosa e muito utilizada para elucidação estrutural de compostos orgânicos nos últimos anos (Júnior, 2007; Breton e Reynolds, 2013).

A crescente complexidade dos compostos oriundo de matrizes naturais e seus derivados tem resultado na utilização da RMN e EM não unicamente para elucidação estrutural de moléculas orgânicas, mas sim para o seu uso juntamente com quimiometria auxiliando na desrepliação de matrizes. A aplicação da quimiometria aos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e EM permite utilizar a covariância e métodos de Análise da Componente Principal (PCA) da matriz de correlação para investigar e discriminar os padrões química presente nas amostras analisadas. Assim como o PCA, outro método formal de explorar os padrões de dados envolvem a Análise dos Componentes Hierárquicos (HCA), onde o objetivo do método é detectar o grau de semelhanças entre as amostras analisadas (Kim *et al.*, 2005; Mahrous e Farag, 2015).

Portanto, a quimiometria pode ser aplicada para resolver diferentes problemas sendo eles químicos ou biológicos, dentre eles pode-se destacar estudos que são realizados com a finalidade de determinar a autenticidade da origem dos alimentar, bem como os que visam identificar se a composição química afeta ou não na similaridade morfológicas entre espécies botânicas (Belton *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005; Daolio *et al.*, 2008; Souza e Poppi, 2012; Yan *et al.*, 2016). Portanto, o uso da RMN e a EM como ferramenta quimiométrica tem contribuído significativamente para o estudo da metabolômica de maneira a permitir que um complexo volume de dados possa ser comprimido sem que haja perda da relevância das informações originais, porém facilitando a compreensão e interpretação da correlação dos mesmos.

## 4. Metodologia

### 4.1. Reagentes e solventes

Os solventes hexano, acetato de etila e etanol da marca Tedia® (High Purity Solventes) foram utilizados nos procedimentos de extração para obtenção dos extratos. O sistema de filtração dos extratos foi composto por suportes universais, funis simples e papel de filtro.

Metanol Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA) grau CLAE e água Milli-Q (Millipore®) foram utilizados como fase móvel em experimentos de CLAE.

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

No preparo das amostras para os experimentos de RMN foram utilizados solventes de deutério (CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub> e DMSO-*d*6) (≥99.9% D), adquiridos da Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL, Andover, Massachusetts, EUA).

### 4.2. Coleta e identificação do material Vegetal

A primeira coleta das folhas e caules de *Eugenia adenocalyx* (exsicata 4597) e *E. lisboae* (exsicatas 3471) ocorreu no dia 02 de abril de 2015 na Reserva Florestal Adolpho Ducke localizada na cidade de Manaus/AM. A localização das espécies foi feita seguindo os mapas de trilhas do Projeto Flora da Reserva Ducke (INPA). A identificação foi revisada pela botânica Dra. Maria Anália Duarte de Souza mediante comparação com as exsicatas depositadas no herbário do INPA. A segunda e a terceira coleta das folhas e dos caules dos mesmos indivíduos ocorreram no dia 29 de agosto de 2016 e no dia 15 de dezembro de 2016, respectivamente.

### 4.3. Preparo dos extratos de *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae*

As folhas e os caules de *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae* foram primeiramente secas separadamente durante uma semana a temperatura ambiente e em seguidas secas em estufa com circulação de ar forçada (marca De Leo Equipamentos Laboratoriais) com temperatura e 40°C pelo período de 14 horas. Posteriormente as folhas foram trituradas em liquidificador (marca BLACK & DECKER®) e os caules moídos em moinho de duas facas (marca

Fortinox<sup>®</sup> do tipo Willye e modelo STAR FT-50). As folhas e caules após triturados foram devidamente pesados em balança semi-analítica (marca Shimadzu modelo BL3200H com precisão de 0,01 g), em seguida 600,0 g das folhas e dos caules da *Eugenia adenocalyx* e 500 g das folhas e dos caules da *Eugenia lisboae* foram submetidas à extração por maceração exaustiva sucessiva a frio, utilizando como solventes extratores na seguinte ordem de polaridade, hexano (H), acetato de etila (A) e etanol (E). O processo de extração foi repetido três vezes. Os extratos assim obtidos foram concentrados em evaporador rotatório (FISATOM<sup>®</sup>, 801) com banho-maria (FISATOM<sup>®</sup>, 550), equipado com bomba de vácuo (TECNAL<sup>®</sup>, Te-058) e um sistema resfriador de líquidos de circuito fechado (marca FISATOM e modelo 850), secados em capela de exaustão, pesados em balança analítica (ORBITAL, AY220) com precisão de 0,001 g e armazenado sob refrigeração (8°C), totalizando um total de 36 extratos brutos, sendo 12 extratos por coleta. O procedimento geral da obtenção dos extratos está representado no Figura 8 e o código dos extratos obtidos estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1 Código dos extratos obtidos por coleta.

<b>Espécie</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Solvente extrator</b>	<b>Códigos 1º coleta (Abril/15)</b>	<b>Códigos 2º coleta (Agosto/16)</b>	<b>Códigos 3º coleta (Dezembro/15)</b>
<i>E. adenocalyx</i>	Folhas	hexano	HF4-1	HF4-2	HF4-3
<i>E. adenocalyx</i>	Folhas	acetato de etila	AF4-1	AF4-2	AF4-3
<i>E. adenocalyx</i>	Folhas	etanol	EF4-1	EF4-2	EF4-3
<i>E. adenocalyx</i>	Caules	hexano	HC4-1	HC4-2	HC4-3
<i>E. adenocalyx</i>	Caules	acetato de etila	AC4-1	AC4-2	AC4-3
<i>E. adenocalyx</i>	Caules	etanol	EC4-1	EC4-2	EC4-3
<i>E. lisboae</i>	Folhas	hexano	HF3-1	HF3-2	HF3-3
<i>E. lisboae</i>	Folhas	acetato de etila	AF3-1	AF3-2	AF3-3
<i>E. lisboae</i>	Folhas	etanol	EF3-1	EF3-2	EF3-3
<i>E. lisboae</i>	Caules	hexano	HC3-1	HC3-2	HC3-3
<i>E. lisboae</i>	Caules	acetato de etila	AC3-1	AC3-2	AC3-3
<i>E. lisboae</i>	Caules	etanol	EC3-1	EC3-2	EC3-3



#### 4.4. Determinação das atividades antioxidantes

##### 4.4.1. Determinação da capacidade sequestradora do radical DPPH<sup>•</sup>

A determinação da atividade antioxidante dos extratos de *Eugenia* foi realizada utilizando o radical livre de DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Uma solução metanólica de DPPH<sup>•</sup> a 60 mM foi previamente preparada. As soluções das amostras foram preparadas nas concentrações de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> e do padrão quercetina a 0,05 mg/mL. Adicionou-se à microplaca de 96 poços 20 µL da amostra ou padrão e realizada a diluição em série para obter 5 concentrações. Após foi adicionada 180 µL da solução de DPPH<sup>•</sup>. A microplaca foi incubada por 30 min a 25°C em ambiente escuro e posteriormente realizada a leitura da amostra em leitora de microplaca (Biotek®, Elx800) no comprimento de onda de 515 nm. Os valores de absorvância foram calculados conforme a Equação 1: Equação 1. Cálculo do valor da concentração Inibitória a 50%.

$$\text{Inibição (\%)} = \left[ \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100$$

Onde  $A_{\text{controle}}$  representa a absorvância da reação do controle e  $A_{\text{amostra}}$  representa a absorvância da reação da amostra.

Os valores da Concentração Inibitória a 50% -  $CI_{50}$  das amostras e do padrão foram calculados com base na interpelação da curva de calibração a 50% de inibição do radical DPPH<sup>•</sup>. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

##### 4.4.2. Determinação da capacidade sequestradora do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>

O ensaio da capacidade sequestrante do ABTS<sup>•+</sup> consistiu em medir a descoloração da solução de ABTS pela presença de extratos antioxidantes, de acordo com o método descrito por Re et al. (1999). Foram adicionados 30 µL da amostra em 300 µL da solução de ABTS (absorvância de 0,70 a 750 nm). Após o tempo reacional de 6 minutos as absorvâncias foram mensuradas em Leitor de Microplacas (Elx800, Biotek) a 750 nm. O ensaio foi realizado em triplicata, o padrão foi o Trolox e os resultados expressos em mmol de equivalentes de Trolox por grama de amostra (TEAC).

#### 4.4.3. Análise estatística

A distribuição de dados de antioxidante para radical DPPH<sup>•</sup> e o cátion radical ABTS<sup>•+</sup> foi avaliada utilizando o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para os dados cuja distribuição não é normal. A comparação de dados múltiplos, cuja distribuição é normal, foi realizada utilizando ANOVA paramétrica (análise de variância) com o teste de Tukey com um nível de significância de 5%. Os coeficientes de correlação de Pearson foram obtidos com o  $p < 0,05$ . O software Minitab™ 13.0 foi empregado para realizar essas análises.

#### 4.5. Análise espectroscópica e espectrométrica

##### 4.5.1. Análise por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMR Lab) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os espectros de RMN unidimensionais (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT135 - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) foram obtidos em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (Bruker Avance IIIHD, 500,13 MHz, sonda BBFO Plus SmartProbe™). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm ( $\delta$ ) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram registradas em (Hz). Foi utilizado o programa TopSpin 3.5 para a manipulação dos espectros de RMN.

Para a determinação do perfil químico dos extratos hexânicos da 1<sup>o</sup> coleta foi utilizado uma alíquota (20,0 mg) solubilizada em 500  $\mu$ L de CDCl<sub>3</sub> e padrão TMS. O preparo de amostra dos extratos de acetato de etila e etanol foi realizado com a finalidade de obter-se o perfil químico para análise quimiométrica, portanto o preparo foi padronizando, sendo uma alíquota (15,0 mg) de cada extrato dissolvida com o auxílio de uma pipeta automática em 600  $\mu$ L de CD<sub>3</sub>OD já com padrão de Tetrametilsilano (TMS), mais a adição de 2,5-dimetilfurano (DMFu) na concentração de 0,16 molar.

#### 4.5.2. Análise por Espectrometria de Massas

As análises por espectrometria de massas de baixa resolução foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas da Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em um Espectrômetro de Massas da marca 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 por eletrospray (ESI) realizado em um analisador 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 (MS<sup>n</sup>), sob as seguintes condições: voltagem do capilar 35 V, voltagem do spray 3,14 kV, temperatura do capilar 240 °C, gás de arraste (N<sub>2</sub>) fluxo 12 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 100-1000. As fragmentações foram feitas utilizando energia de colisão entre 1 a 30 eV. O software Xcalibur® versão 1.0 (Thermo scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento desses dados espectrométricos.

As análises no espectrômetro de massas de alta resolução foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do departamento de ciências biológicas da Universidade Federal de Curitiba.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um Espectrômetro de Massas da marca Bruker™, modelo micrOTOF-Q II equipado com dispositivo de inserção direta das amostras. As amostras foram analisadas no modo de ionização por eletrospray (ESI) realizado em um analisador do tipo Quadropole Time of Flight (Q-TOF). Os modos negativo e positivo foram escolhidos para a geração e análise dos espectros de massas em primeira ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MS<sup>n</sup>). Os espectros foram adquiridos de acordo com as seguintes condições: voltagem do capilar 4,5kV, gás nebulizador: nitrogênio (4L.min<sup>-1</sup>), temperatura do gás nebulizador 170°C (4L.min<sup>-1</sup>) e faixa de aquisição de 100 a 1000 m/z. O software dataanalysis versão 4.1 (Bruker) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos de massas de alta resolução.

#### 4.5.3. Análise quimiométrica dos dados de RMN de $^1\text{H}$ e EM

Para análise quimiométrica dos dados por RMN de  $^1\text{H}$  a sequência pulso utilizada foi NOESYGGPPR1D com sinal de supressão de água, pontos de dados do domínio de tempo de 64k, largura espectral de 10 kHz, atraso de relaxamento de 42,3 segundos (D1), tempo de aquisição de 13,38 segundos (AQ), 16 números de varreduras com DS de 2, resolução de decomposição de 0,31 Hz, um ganho do receptor constante a 32 com frequência de deslocamento ajustado 2425,23 Hz. O pulso de calibração (P1 9,945  $\mu\text{s}$ ) com PLW9 de  $7,183 \cdot 10^{-5} \text{ W}$ . O valor de D1 (42.13 s) foi estimado em sete vezes o valor de T1 para o sinal do DMFu (5,80 ppm). As linhas de base e as fases dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras foram corrigidas automaticamente empregando TOPSPIN 3.5. Para confirmar as atribuições, os experimentos do tipo COSY, HSQC e HMBC foram realizados utilizando a biblioteca de programas de pulso padrão de Bruker™.

Os dados espectrais entre  $\delta$  3,50 a 8,00 foram exportados para o software RStudio 1.0.44, cujos dados foram tabulados usando o algoritmo OBA, após alinhamento seguido da exclusão das regiões espectrais do DMFu e sinais de água. O algoritmo OBA foi usado com buckets de 0,03 (grau de liberdade de 50%). Depois disso, o método paretto foi empregado. Os dados foram analisados por dois métodos multivariados não supervisionados no programa quimiométrico the Unscrabler 10.3: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Hierárquica de 4 Cluster (HCA). A PCA foi realizada empregando-se o algoritmo NIPALS devido aos pequenos 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.

Os dados espectrométricos de alta resolução obtidos dos extratos da primeira coleta 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 Unscrabler 10.3. 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 4 Clusters (HCA). A PCA foi realizada empregando-se o algoritmo NIPALS devido aos pequenos 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.

#### 4.6. Identificação dos constituintes químicos da *Eugenia lisboae*.

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<sup>®</sup>) hifenados em linha aos detectores de Arranjo de Diodos (Thermo Scientific, Acella<sup>®</sup>) e Espectrômetro de massas (Thermo scientific, LCQ FLEET). Foi usada uma coluna de fase reversa modelo C18 (2) 100 A Phenomenex<sup>®</sup> (150 x 4,6 mm, 5 µm) com uma coluna de guarda de mesma fase.

Alíquota de 10 g do extrato bruto de acetato de etila da *E. lisboae* (AF3-1) foi fracionado em coluna cromatográfica aberta, utilizando-se gel de sílica 60A (70-200 µm) e sílica flash (40-60 µm), e como eluentes uma mistura de hexano e acetato de etila e acetato de etila e metanol com gradiente crescente de polaridade. Desta coluna foram obtidas 26 frações, das quais as frações de 17 a 20 foram reunidas devido suas similaridades através da análise de suas cromatoplasmas. Alíquota de 760 mg da fração F17X proveniente da união das frações F17 a F20, bem como 800 mg da fração F23 foram fracionadas em coluna aberta utilizando como fase estacionário sílica Flash (40-60µm) em sistema de eluição com mistura de clorofórmio/metanol, com gradiente crescente de polaridade.

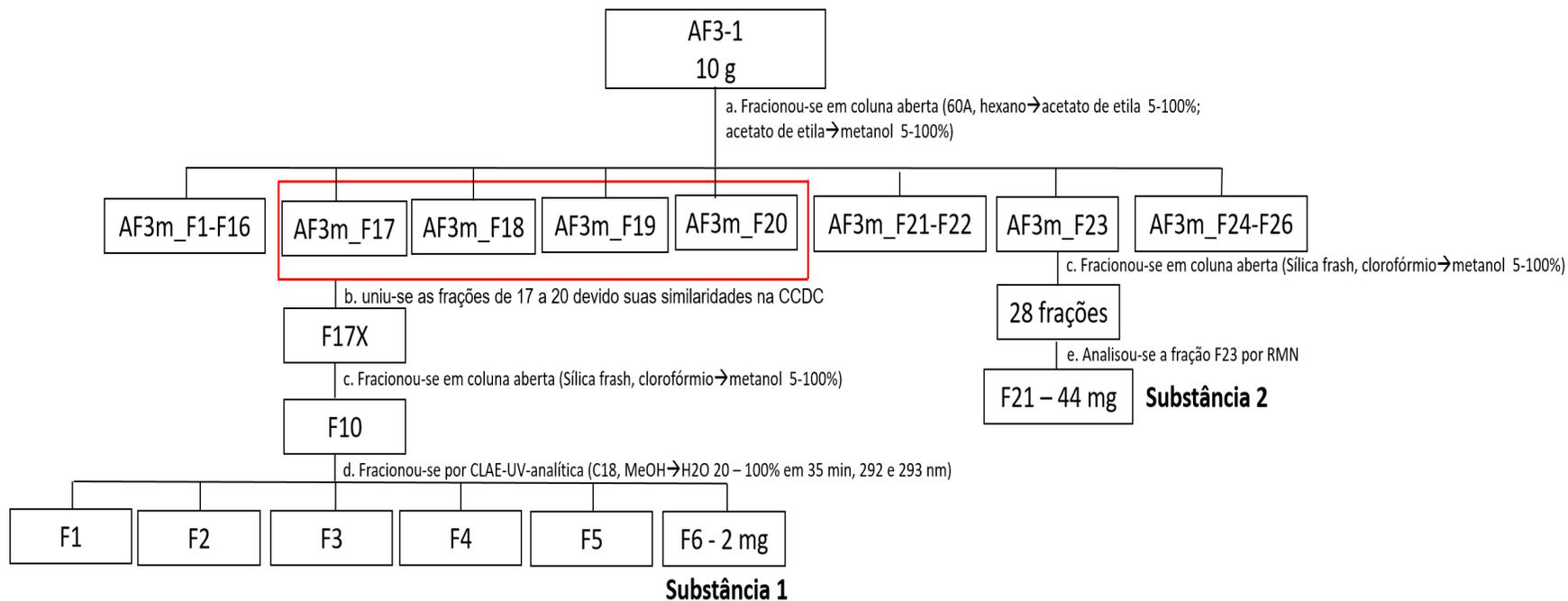
O fracionamento das frações F17X gerou 32 subfrações, enquanto, que a F23 originou 28 subfrações. Das 32 frações obtidas do fracionamento da fração F17X, a fração F10 teve seu perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD-EM em escala analítica (C18, MeOH→H<sub>2</sub>O, 5-95% em 30 min, 200-600 nm e 100-1000 m/z) empregando uma alíquota de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>, volume de injeção da amostra foi de 10 µL e a taxa de fluxo foi mantida a 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.

Obtido o perfil cromatográfico da fração F10 por CLAE-DAD-EM, 10 mg da amostra foi diluída em metanol e fracionada por CLAE. Utilizou-se o mesmo método cromatográfico de separação empregado na escala analítica (C18, MeOH→H<sub>2</sub>O 5-95% em 35 min, 208 e 271 nm) com um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 10 µL. Os picos individuais eluídos da coluna foram

coletados por múltiplas injeções O pico majoritário eluído da coluna resultou na substância **1** com um total de massa de 2 mg.

Do fracionamento da fração F23 pode-se identificar em mistura a substância **2**, presente na subfração 21. A mesma foi identificada por RMN em mistura a partir da análise do espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT135 e dos mapas de correlações COSY, HMBC e HSQC. Para obter-se os dados de RMN, 30 mg da subfração 21 foi devidamente pesado, solubilizado em  $\text{DMSO-}d_6$ , filtrada e transferida para um tubo de RMN de 5 mm de diâmetro. A Figura 9 descreve a sistemática para isolamento e identificação dos constituintes a partir do extrato de acetato de etila da *Eugenia lisboae*.

Figura 9 Fluxograma do isolamento dos constituintes do extrato de acetato de etila da *Eugenia lisboae* (AF3-1).



O extrato EF3-1 (5 g) foi submetido ao processo de fracionamento em sistema de filtração acoplado a bomba de vácuo. A fase estacionária utilizada foi sílica 60A, e o sistema de eluição consistiu em três fases, 100% hexano, 100% acetato de etila e 100% metanol, na respectiva ordem. O fracionamento deu origem a três frações, hexânica (EF3h), acetato de etila (EF3a) e metanólica (EF3m), donde a fração metanólica foi fracionada em coluna aberta, utilizando como fase estacionária sílica de fase reversa (C18), sistema de eluição gradiente de metanol→água (35-100%), em ordem crescente de polaridade, coletando-se então um total de 14 frações, que posteriormente foram concentradas em evaporador rotatório sob vácuo, e em seguida liofilizadas.

A fração F8 proveniente do extrato EF3m teve seu perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD-EM em escala analítica (C18, MeOH→H<sub>2</sub>O, 20-100% em 20 min, 200-600 nm e 100-1000 m/z) empregando uma alíquota de 2,0 mg/mL, volume de injeção da amostra foi de 5 µL e a taxa de fluxo foi mantida a 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.

Obtido o perfil cromatográfico da fração EF3m\_F8 por CLAE-DAD-EM, 40 mg da mesma foi solubilizado em 100 µL de DMSO e posteriormente foi fracionada por CLAE-UV-semi-preparativa (C18, MeOH→H<sub>2</sub>O, 35-100% em 35 min, 292 e 293 nm) com um fluxo de 4,7 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 200 µL (Figura 10).

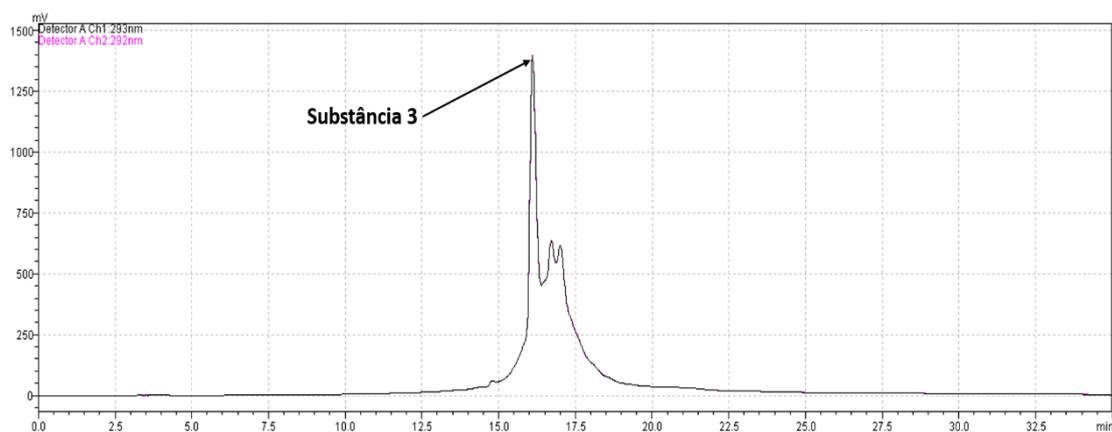


Figura 10 Cromatograma da amostra EF3m\_F8. Substância 3 isolada com tempo de retenção de 15.80.

O pico majoritário eluído da coluna foi devidamente coletado, resultando na substância **3** com um total de massa de 8 mg. A Figura 11 descreve a sistemática para isolamento e identificação do constituinte a partir do extrato etanólico da *Eugenia lisboae*.

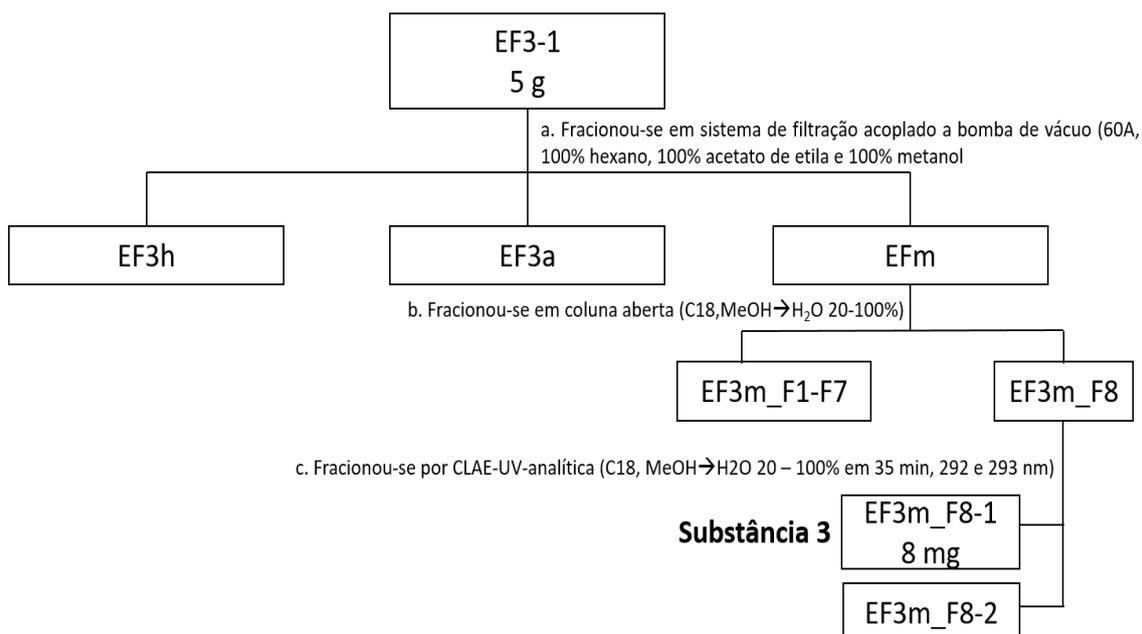


Figura 11 Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico da *Eugenia lisboae* (EF3-1).

#### 4.7. Identificação dos constituintes químicos da *Eugenia adenocalyx*.

O fracionamento do extrato EF4-1 (5 g) deu origem a três frações, hexânica (EF4h), acetato de etila (EF4a) e metanólica (EF4m), donde a fração metanólica foi fracionada em coluna aberta, utilizando como fase estacionária sílica de fase reversa (C18), sistema de eluição gradiente de metanol → água, em ordem crescente de polaridade (20 → 100%), coletando-se então um total de seis frações.

A fração EF4m\_F5 proveniente do extrato EF4m teve seu perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD-EM em escala analítica (C18, MeOH → H<sub>2</sub>O, 35-70% em 35 min, 200-600 nm e 100-1000 m/z) empregando uma alíquota de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>, volume de injeção da amostra foi de 10 µL e a taxa de fluxo foi mantida a 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.

Obtido o perfil cromatográfico da fração EF4m\_F5 por CLAE-DAD-EM, 90 µg da mesma foi solubilizado em 200 µL de DMSO e posteriormente foi

fracionada por CLAE-UV-semi-preparativa (C18, MeOH:H<sub>2</sub>O, isocrático, 35:65 em 35 min, 234 e 304 nm) com um fluxo de 4,7 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 200 µL (Figura 12). Os picos eluídos da coluna foram devidamente coletados, resultando na substância **4** e **5** com um total de massa de 6,7 mg e 1,3 mg.

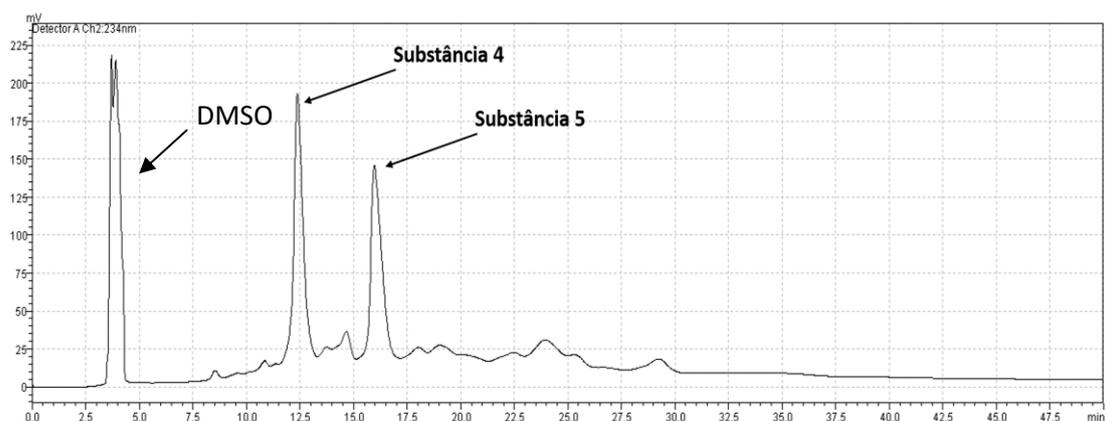


Figura 12 Cromatograma da amostra EF4m\_F5. Substância 4 isolada com tempo de retenção de 12,31, e substância 5 isolada com tempo de retenção de 16,03.

A fração EF4m\_F6 também proveniente do extrato EF4m teve seu perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD-EM em escala analítica (C18, MeOH:H<sub>2</sub>O, isocrático, 48:52 em 35 min, 200-600 nm e 100-1000 m/z) empregando uma alíquota de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>, volume de injeção da amostra foi de 10 µL e a taxa de fluxo foi mantida a 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.

Obtido o perfil cromatográfico da fração EF4m\_F6 por CLAE-DAD-EM, 100 mg da mesma foi solubilizado em 200 µL de DMSO e posteriormente foi fracionada por CLAE-UV-semi-preparativa (C18, MeOH:H<sub>2</sub>O, isocrático, 46:54 em 35 min, 228 e 282 nm) com um fluxo de 4,7 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 200 µL (Figura 13).

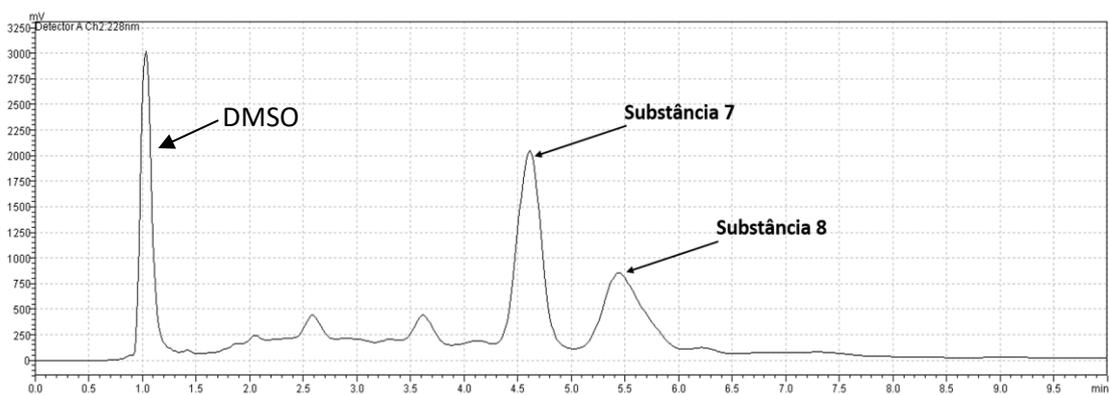
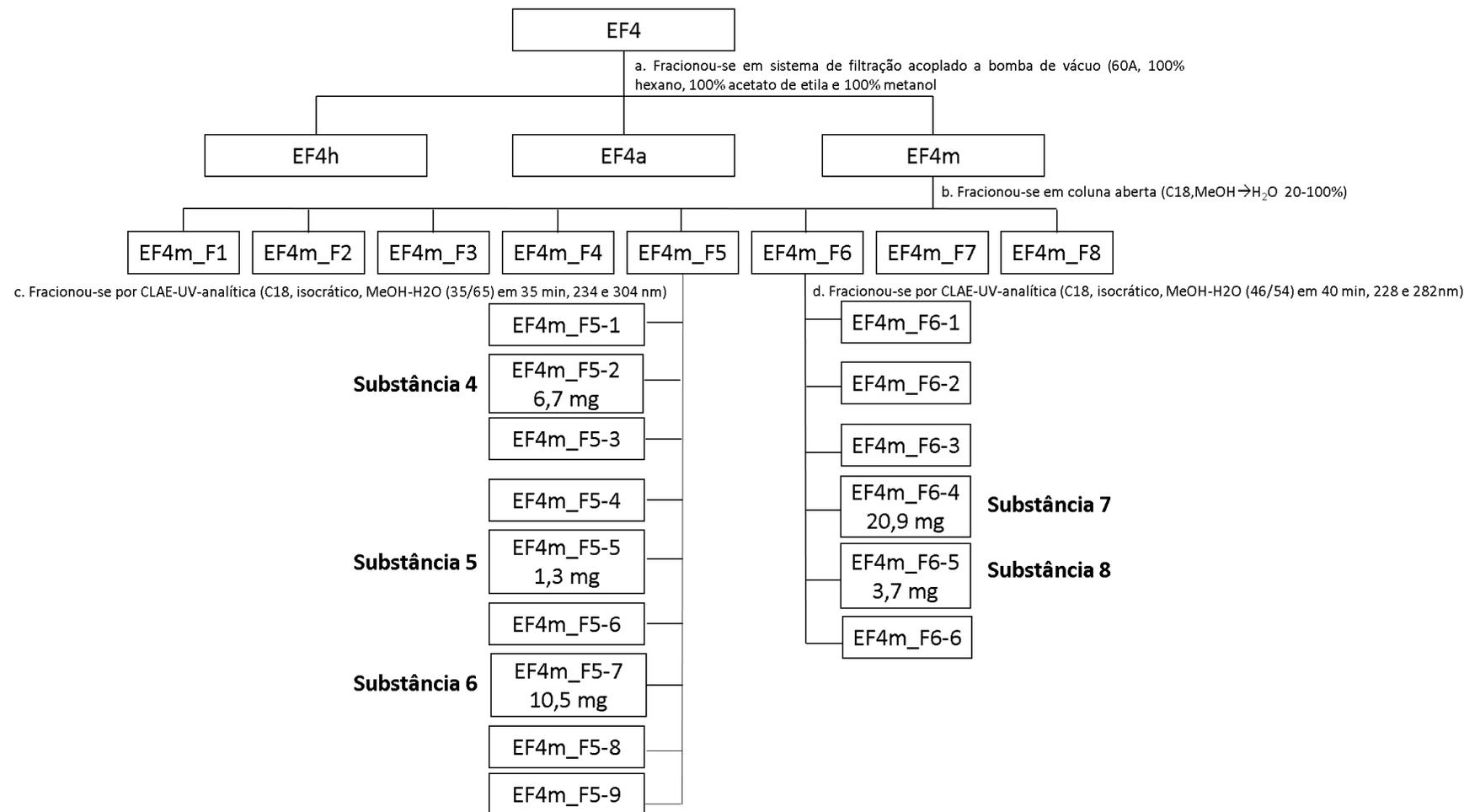


Figura 13 Cromatograma da amostra EF4m\_F5. Substância 7 isolada com tempo de retenção de 4,61, e substância 8 isolada com tempo de retenção de 5,32.

Os picos eluídos da coluna foram devidamente coletados, resultando na substância **7 e 8** com um total de massa de 20,9 mg e 3,7 mg. A Figura 14 descreve a sistemática para isolamento do constituinte a partir do extrato etanólico da *Eugenia adenocalyx*.

Todas as frações obtidas da fração EF4m foram analisadas no espectrômetro de massas no modo negativo afim de localizar os íons responsáveis pela distinção química entre as espécies.

Figura 14 Fluxograma do isolamento dos constituintes a partir do extrato etanólico da *Eugenia adenocalyx* (EF4-1).



## 5. Resultados e discussão

As figuras referentes aos espectros de RMN dos extratos e das substâncias isoladas encontram-se em anexo a partir da página 101 até a 150. Na página 151 estão as estruturas de todas as substâncias identificadas nessa dissertação.

### 5.1. Rendimento dos extratos vegetais

As massas dos extratos foram determinadas, e seu rendimento percentual foi calculado em relação a massa do material seco utilizado para obtenção dos extratos (Tabela 2). Com base nos valores de rendimentos dos extratos, conclui-se que independente da época do ano em que o material botânico foi coletado, uma vez mantido a proporção do solvente durante o processo de extração o rendimento percentual permanecerá na faixa de 0,05 até 5,00 %.

Tabela 2 Rendimento dos extratos por coleta.

<b>1º coleta</b>	<b>(g)</b>	<b>(%)</b>	<b>2º coleta</b>	<b>(g)</b>	<b>(%)</b>	<b>3º coleta</b>	<b>(g)</b>	<b>(%)</b>
<b>HF4-1</b>	6,09	1,21	<b>HF4-2</b>	0,06	0,45	<b>HF4-3</b>	0,32	2,17
<b>AF4-1</b>	5,46	1,08	<b>AF4-2</b>	0,14	0,95	<b>AF4-3</b>	0,22	1,51
<b>EF4-1</b>	20,46	4,08	<b>EF4-2</b>	0,44	2,97	<b>EF4-3</b>	0,63	4,20
<b>HC4-1</b>	0,36	0,07	<b>HC4-2</b>	0,05	0,37	<b>HC4-3</b>	0,03	0,23
<b>AC4-1</b>	3,49	0,68	<b>AC4-2</b>	0,06	0,40	<b>AC4-3</b>	0,03	0,21
<b>EC4-1</b>	2,67	0,52	<b>EC4-2</b>	0,09	0,62	<b>EC4-3</b>	0,04	0,32
<b>HF3-1</b>	6,89	1,01	<b>HF3-2</b>	0,15	1,05	<b>HF3-3</b>	0,29	1,95
<b>AF3-1</b>	13,98	2,33	<b>AF3-2</b>	0,19	1,30	<b>AF3-3</b>	0,21	1,40
<b>EF3-1</b>	15,64	2,60	<b>EF3-2</b>	0,52	3,50	<b>EF3-3</b>	0,48	3,21
<b>HC3-1</b>	2,81	0,45	<b>HC3-2</b>	0,05	0,39	<b>HC3-3</b>	0,06	0,39
<b>AC3-1</b>	3,41	0,54	<b>AC3-2</b>	0,06	0,44	<b>AC3-3</b>	0,08	0,56
<b>EC3-1</b>	3,19	0,51	<b>EC3-2</b>	0,08	0,55	<b>EC3-3</b>	0,09	0,63

### 5.2. Análise preliminar do perfil químico dos extratos

A análise do perfil químico foi realizada com a finalidade de discriminar de forma preliminar as prováveis classes de compostos químicos presentes nos extratos obtidos das duas espécies, com base nos compostos químicos já descritos para o gênero *Eugenia*, bem como, avaliar se o processo de

maceração exaustiva a frio foi eficaz na separação dos extratos com base na polaridade química de seus constituintes.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos hexânicos (Figura S 1 – 2, pág. 101) e de acetato de etila (Figura S 3 – 4, pág. 102) das folhas e dos caules da *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae* apresentaram uma quantidade elevada de sinais como singletos e dubletos na região entre 0 a  $\delta$  2, referentes a presença de metilas e metilenos de compostos alifáticos. No entanto, os extratos de acetato de etila das folhas mostrou um perfil espectral diferente do extrato hexânico na região de  $\delta$  3-5, sinais intensos nessa região evidenciam a grande quantidade de compostos metoxilados, carbinólicos e vinílicos. Na região de  $\delta$  3-8 apenas os extratos de acetato de etila apresentam sinais intensos, no entanto com uma intensidade relativa muito inferior aos sinais na região de  $\delta$  0-3 o que evidenciam que os compostos alifáticos nos extratos de acetato de etila são superiores à quantidade de compostos apolares. Portanto, com base nos constituintes químicos já descritos para o gênero e no processo de extrato utilizado, conclui-se que a presença de ácidos graxos prevalece sobre os ácidos orgânicos e dos flavonoides e seus derivados (Manoharan *et al.*, 2007; Samy *et al.*, 2014).

Os extratos etanólicos (Figura S 5 – 6, pág. 103) de ambas as espécies apresentaram uma quantidade de sinais menor na região de 0 a  $\delta$  5, comprovando que o processo de maceração exaustiva a frio auxiliou na remoção dos ácidos graxos. Contudo, a presença de sinais nessa região se dá devido a alguns dos compostos presentes serem de terpenos característicos ao gênero. No entanto, observa-se sinais um pouco mais desblindados, o que evidencia a presença de compostos alifáticos mais polares do que os presentes nos extratos de acetato de etila. Quanto a região de  $\delta$  5 a  $\delta$  8, observa-se dubletos com constantes de acoplamento de 2 Hz referente a sistemas aromáticos com acoplamento do tipo *meta*, tetrassubstituídos. Apresentou também dubletos na região entre  $\delta$  4 e  $\delta$  5 com constante de acoplamento de 7 Hz caracteriza a presença de composto como carboidratos (Wubshet *et al.*, 2015). Portanto, os extratos etanólicos apresentam a menor quantidade de compostos alifáticos, logo o processo de maceração foi eficiente, o que ajudou a aumentar a

intensidade relativa dos sinais característicos dos compostos aromáticos e carbinólicos.

### 5.3. Análise quimiométrica por RMN de $^1\text{H}$

Com a finalidade de discriminar quais as substâncias responsáveis pelas semelhanças e diferenças entre as espécies *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae*, obteve-se os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos das três coletas, com exceção dos hexânicos, e analisou os dados por PCA e HCA. Através da análise de PCA (Figura 15) dos dados pode-se observar a presença de três grupos distintos de *loadings*, podendo então por PC1 separar os extratos etanólicos dos extratos de acetato de etila (gru, e por PC2 separar os extratos etanólicos de folhas (grupo II) e dos caules (grupo III).

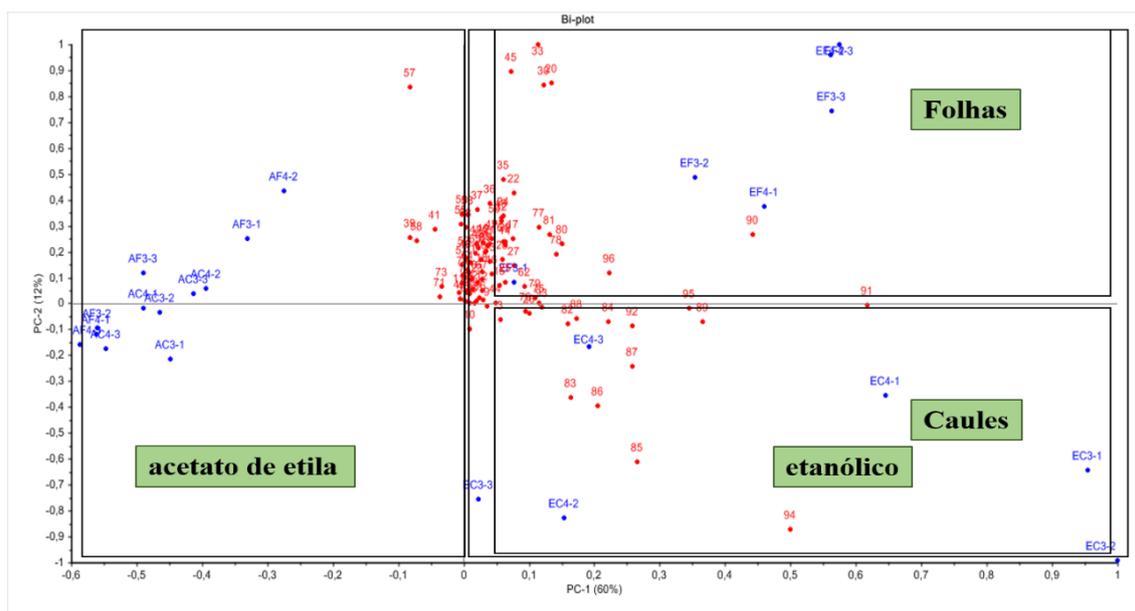


Figura 15 Gráfico Bi-plot da análise dos extratos de acetato de etila e etanol por PCA (PC1 = 60%; PC2 = 21%) dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

Quanto à análise de HCA (Figura 16), os resultados estão de acordo com aqueles anteriormente descritos no PCA. O maior grupo foi formado pelo extrato de acetato de etila, e as outras amostras foram agrupadas no dendrograma de acordo com a parte da planta com exceção da EF3-1 que apresentou uma composição mais semelhante com dos extratos etanólicos dos caules. O agrupamento dos extratos de acetato de etila se deu devido a exclusão dos sinais na região entre 0 e  $\delta$  3.5, região esta característica das substâncias mais alifáticas, como os terpenos e ácidos graxos.

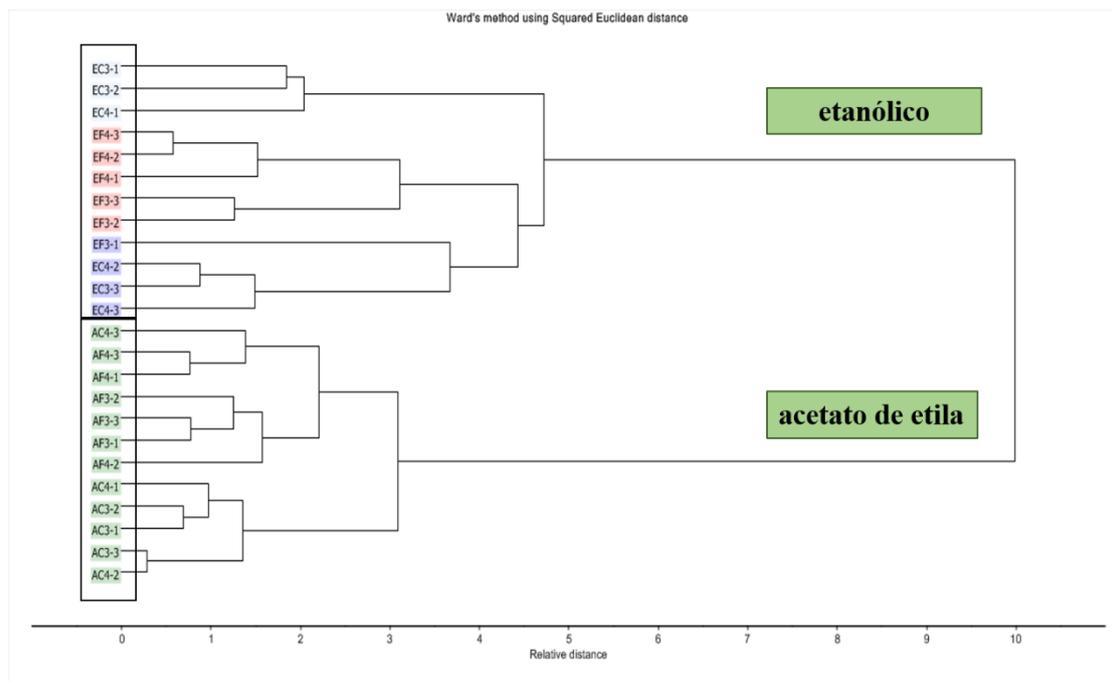


Figura 16 Dendrograma dos extratos de acetato de etila e etanol por HCA dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

Uma vez excluído os extratos de acetato de etila pode-se observar que por PC2 há a separação das folhas dos caules, já por PC3 a separação das espécies (Figura 17). Com base na separação das espécies por PCA pode-se identificar os *loadings* responsáveis pelas substâncias que diferenciam quimicamente os extratos etanólicos, podendo então diferenciar a composição química da *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae*. Os *loadings* 20 ( $\Delta \delta$  7,06 -  $\delta$  7,01), 22 ( $\Delta \delta$  6,97-  $\delta$  7,04), 24 ( $\Delta \delta$  6,89-  $\delta$  6,96), 37 ( $\Delta \delta$  6,29-  $\delta$  6,34), 64 ( $\Delta \delta$  4,98-  $\delta$  5,06), 77 ( $\Delta \delta$  4,40-  $\delta$  4,45), 90 ( $\Delta \delta$  3,80-  $\delta$  3,84), 95 ( $\Delta \delta$  3,53-  $\delta$  3,60) foram os principais responsáveis pela diferenciação química da *E. adenocalyx*. Enquanto, os *loadings* 14 ( $\Delta \delta$  7,35 -  $\delta$  7,41), 27 ( $\Delta \delta$  6,74-  $\delta$  6,82), 30 ( $\Delta \delta$  6,60-  $\delta$  6,68), 33 ( $\Delta \delta$  6,46-  $\delta$  6,55), 35 ( $\Delta \delta$  6,37-  $\delta$  6,45), 44 ( $\Delta \delta$  5,96-  $\delta$  6,04), 45 ( $\Delta \delta$  5,91-  $\delta$  5,96), 57 ( $\Delta \delta$  5,29-  $\delta$  5,37), 91 ( $\Delta \delta$  3,89-  $\delta$  3,97) foram os responsáveis pela da *E. lisboae*. Esses deslocamentos químicos podem ser atribuídos à presença de substâncias aromáticas, tais como, os flavonoides, resorcinois e seus derivados metoxilados ligados a sistemas aromáticos e/ou carboidratos (Omar *et al.*, 2012; Ghai *et al.*, 2014; Haminiuk *et al.*, 2014; Wubshet *et al.*, 2015).

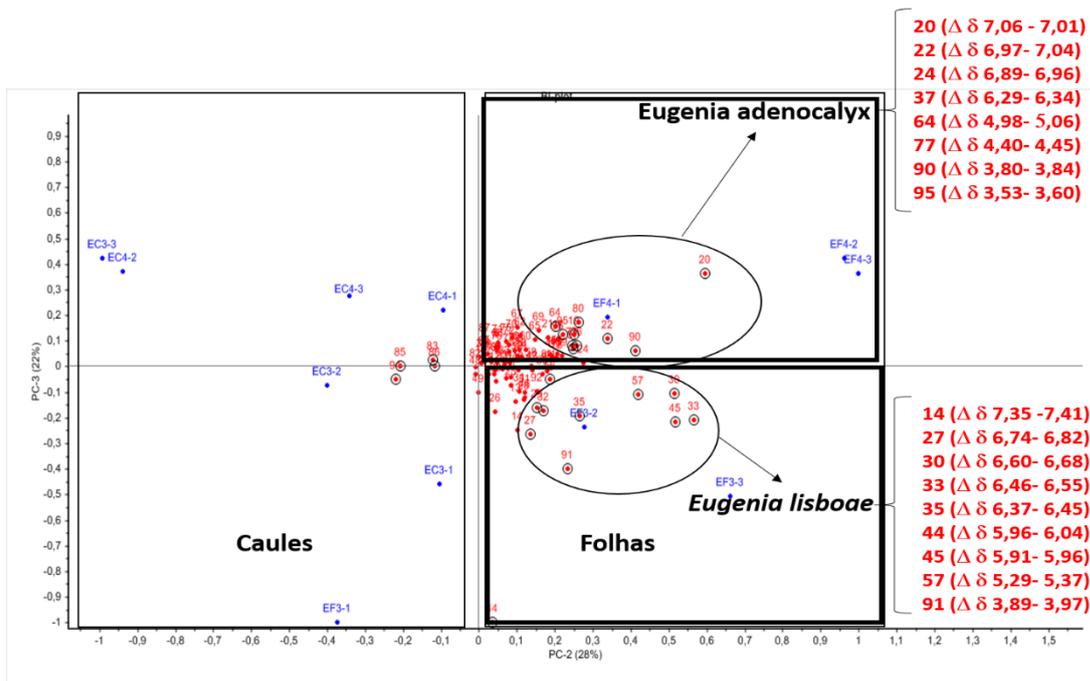


Figura 17 Gráfico Bi-plot da análise dos extratos etanólicos por PCA (PC-2 = 28%; PC-3 = 22%) dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

No dendrograma (Figura 18) pode-se identificar a formação de dois grupos como já se era esperado, o primeiro formado pelas folhas e o segundo pelos caules. No entanto, dentro do grupo folhas se observa a formação de dois subgrupos, um referente à *Eugenia adenocalyx* e outro a *E. lisboae*. Portanto, em tal momento do seu processo de maturação, a produção dos metabólicos secundários da *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae* influenciou em suas características morfológicas.

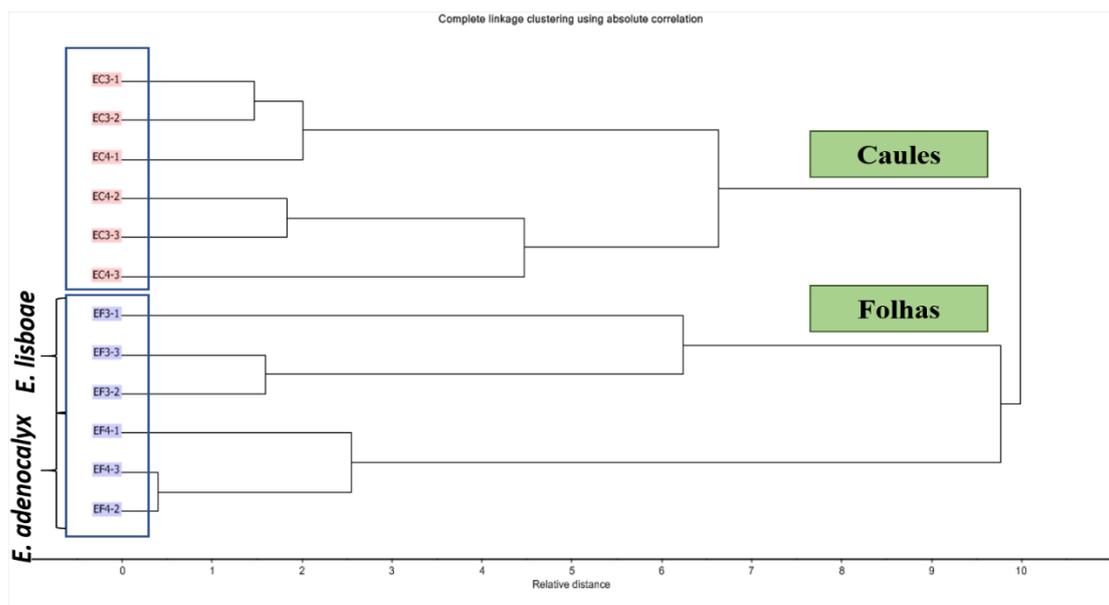


Figura 18 Dendrograma dos extratos etanólicos por HCA dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .



necessário identificar as substâncias responsáveis pelos *loadings* na EM e RMN que foram capazes de proporcionar semelhanças e diferenças entre as duas *Eugenia*.

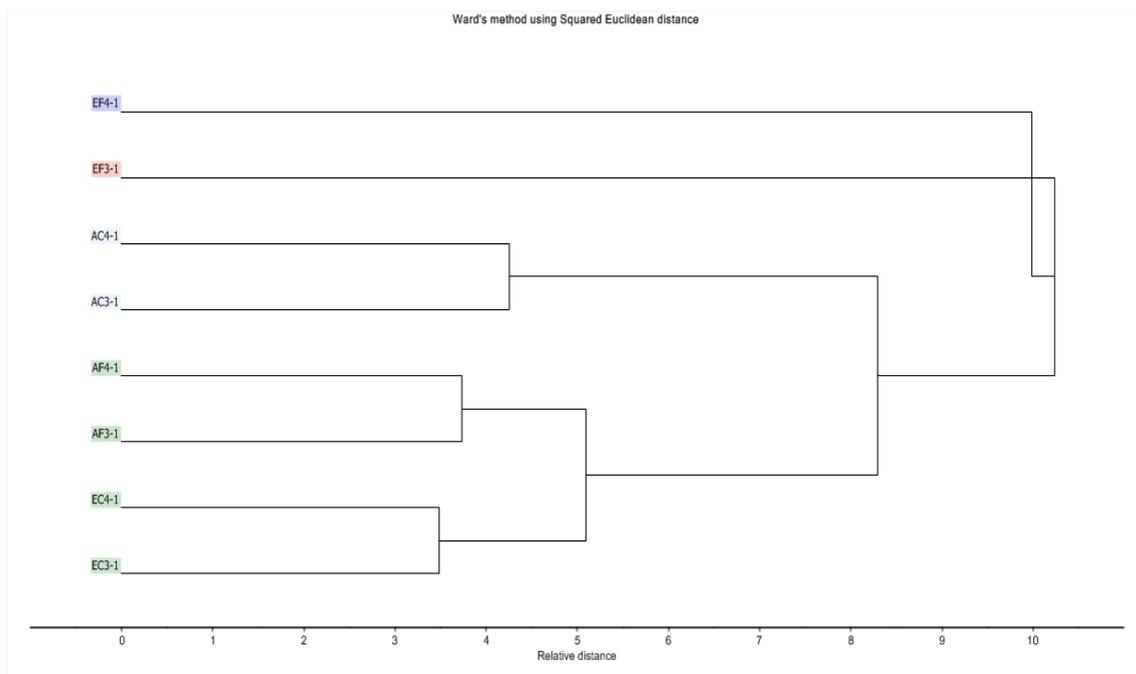


Figura 20 Dendrograma dos extratos de acetato de etila e etanol por HCA dos espectros de massas no modo negativo.

## 5.5. Identificação dos constituintes químicos de *Eugenia*

### 5.5.1. Determinação estrutural da substância 1.

A subfração SF10 obtida do fracionamento da fração F17X foi analisada no espectrômetro de massas de baixa resolução com analisador íon-trap e fonte de ionização ESI no modo negativo (Figura 21). A partir do espectro de massas observa-se os íons de  $m/z$  193 e 501. O íon de  $m/z$  501 *loading* do grupo I foi fragmentado gerando os fragmentos  $m/z$  483, 439 e 421 (Figura 22). O padrão de fragmentação do íon  $m/z$  501 também foi observado no espectro de massas de alta resolução (Q-TOF no modo negativo) do extrato AC4 (Figura 23) e se mostrou condizente com o já observado no espectro de massas de baixa resolução da fração SF10. Com base na análise da massa exata, cujo erro de massa foi de 4,3 ppm, e no padrão de fragmentação [água (18u), monóxido de carbono e água (56u) e dióxido de carbono e água (62u)], pode-se propor a estrutura de um triterpeno insaturado pentacíclico.

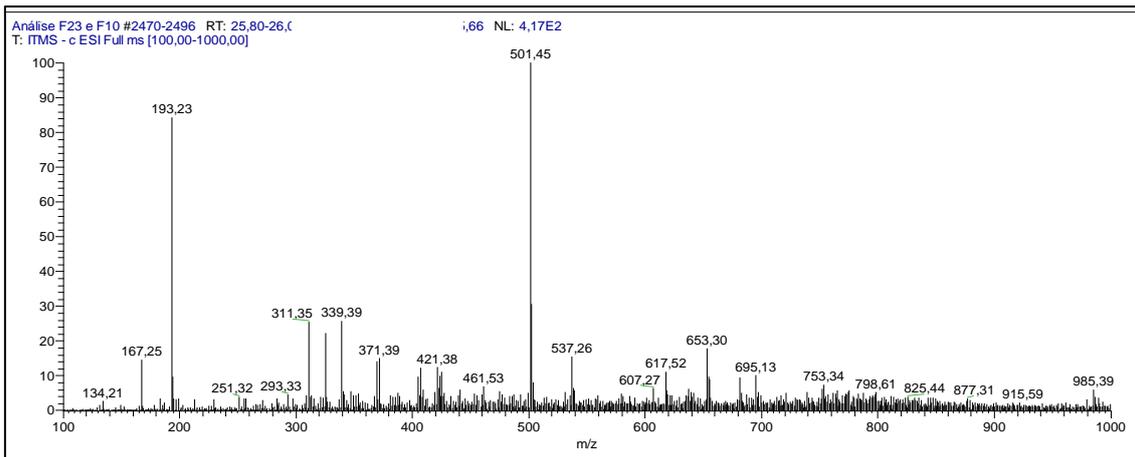


Figura 21 Espectro de massas da subfração SF10.

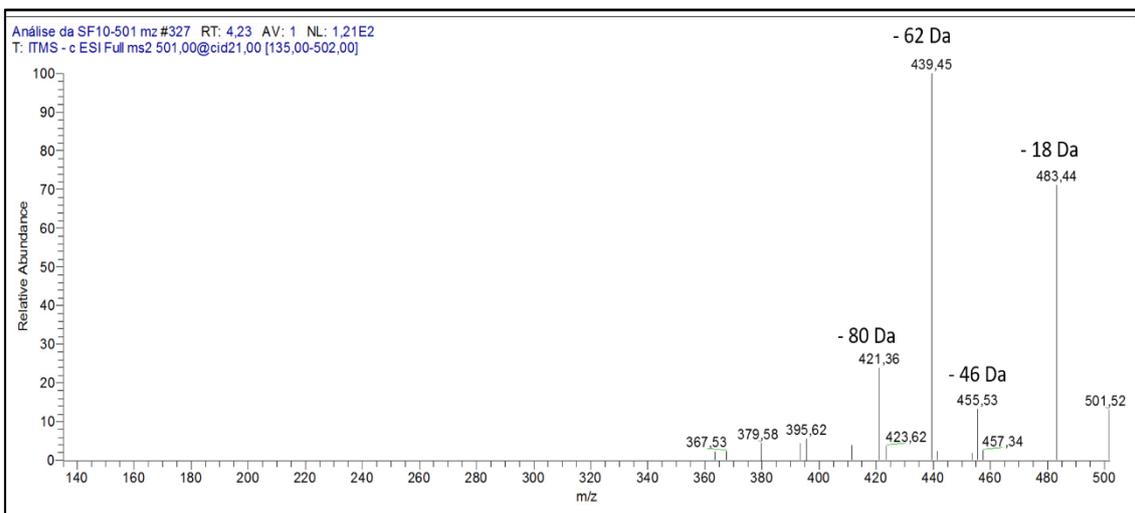


Figura 22 Espectro de fragmentação do íon de m/z 501 no espectrômetro de baixa resolução.

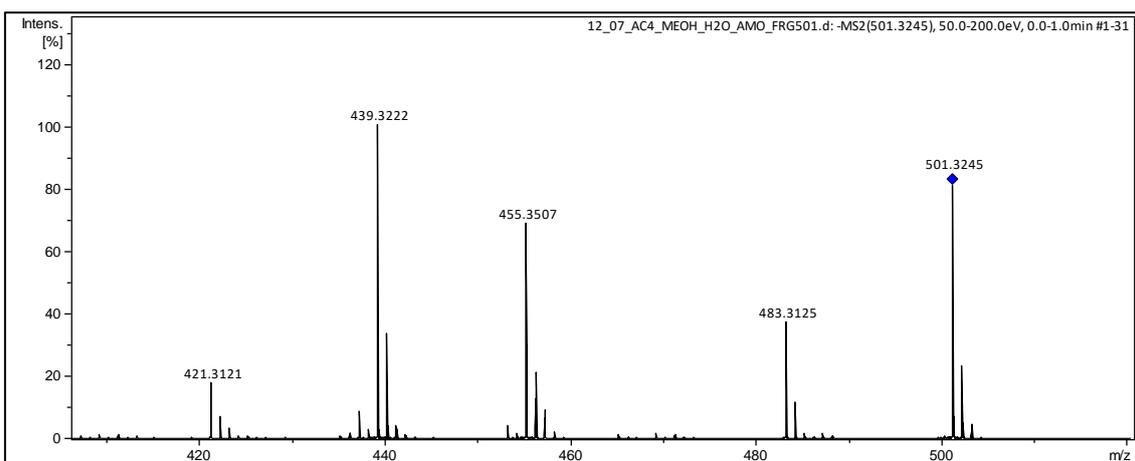


Figura 23 Fragmentação do íon de m/z 501 no espectrômetro de massas de alta resolução.

O tipo de triterpeno, bem como a posição das metilas e dos substituintes foi atribuída com base nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos pelos experimentos, COSY, HSQC e HMBC (Figura S 7-24, pág. 104 – 111).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , observou-se um tripleto em  $\delta$  5,33, seis sinais metílicos ( $\delta$  0,74,  $\delta$  0,80,  $\delta$  0,95,  $\delta$  1,20,  $\delta$  1,28,  $\delta$  1,34) e um sinal em  $\delta$  3,96 referente a um hidrogênio carbinólico. O gráfico de correlações HMBC mostrou uma correlação do singleto em  $\delta$  1,34 (H-24) com o carbono carboxílico e  $\delta$  184,6 (C-23), e o singleto em  $\delta$  2,54 (H-18) correlacionando com os carbonos  $\delta$  185,7 (C-28),  $\delta$  72,84 (C-19),  $\delta$  129,5 (C-12) e  $\delta$  138,0 (C-13). O tripleto em  $\delta$  5,33 (H-12) correlacionando com os carbonos em  $\delta$  46,1 (C-9) e  $\delta$  53,4 (C-18). Com base na análise desses dados pode-se concluir que o triterpeno apresenta um sistema dicarboxilado, além de uma insaturação características das posições C-12 e C-13 de sistema ursólico.

Portanto, a partir dos valores de deslocamento químico de RMN (Tabela 3) e do padrão de fragmentação do íon de  $m/z$  501 pode-se propor que a substância **1** apresenta a estrutura do ácido rotundioico (Figura 24), cujos dados espectroscópicos estão semelhantes com os já descritos na literatura (Nakatani *et al.*, 1989). O ácido rotundióico ainda não apresenta estudo que descreva a sua presença em espécies de Myrtaceae.

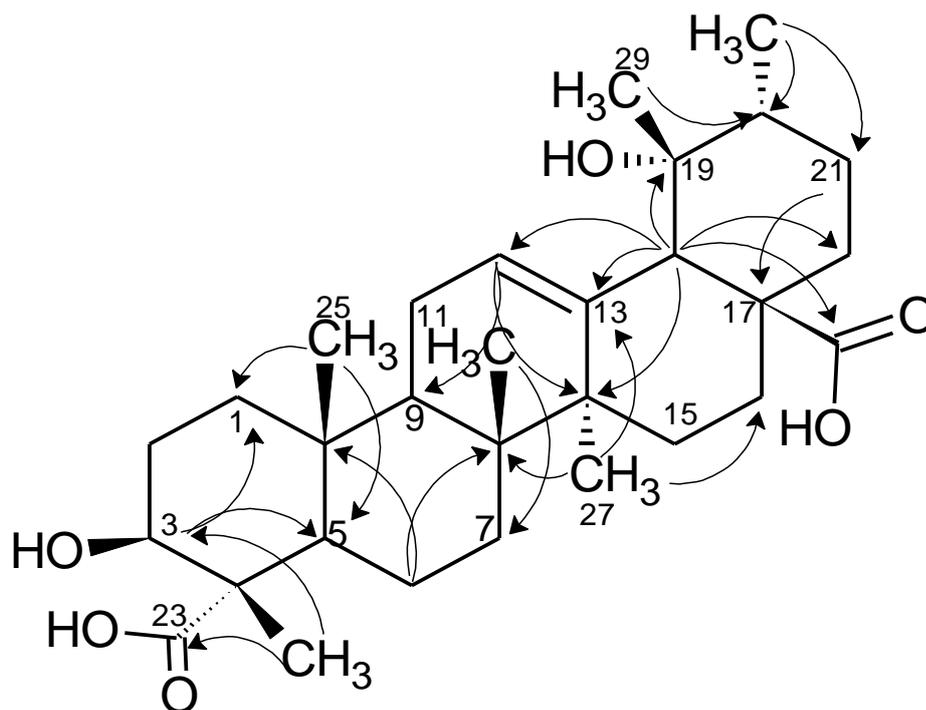


Figura 24 Estrutura da Substância 1 (ácido rotundioico).

Tabela 3. Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da substância 1 (11,7 T,  $\text{CDCl}_3$ ). Posições não definidas (\*).

Posição	Substância 1			
	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$ (literatura) (Nakatani <i>et al.</i> , 1989) – $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	$^1\text{H}$ (mult, $J$ em Hz)	HMBC ( $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ )
1	33,1	38,5	1,31 ( <i>m</i> ) 2,35 ( <i>m</i> )	H-3, H-25
2	26,1	26,9	1,58 ( <i>m</i> ) 2,40 ( <i>m</i> )	
3	70,6	73,3	3,95 ( <i>t</i> , 5,4)	H-3, H-24
4	47,5	52,2		
5	49,6	49,6	1,48 ( <i>m</i> )	H-3, H-25
6	19,2	19,5	1,66 ( <i>m</i> )	
7	32,2	34,5	*	
8	40,9	39,8		H-6
9	46,1	45,9	1,66 ( <i>m</i> )	H-12
10	37,5	36,8		H-6

11	23,6	24,3	1,85 ( <i>m</i> ) 2,02 ( <i>d</i> , 6,7)	
12	129,5	125,6	5,33 ( <i>t</i> , 6,7)	H-18
13	138,0	137,6		H-18, H-27
14	40,9	40,0		H-12, H-18
15	30,9	31,1	*	
16	27,6	25,4	*	H-27
17	47,6	45,7		H-21
18	53,4	52,3	2,54 ( <i>s</i> )	
19	72,8	70,4		H-18
20	41,2	39,8	1,45 ( <i>m</i> )	H-29, H-30
21	25,8	24,8	1,76 ( <i>m</i> ) 2,10 ( <i>m</i> )	H-18
22	37,2	36,1	1,25 ( <i>m</i> ) *	H-21
23	184,7	178,2	1,34 ( <i>s</i> )	H-24
24	23,6	9,8		
25	12,5	13,8	0,80 ( <i>s</i> )	
26	16,7	14,4	0,74 ( <i>s</i> )	
27	24,7	24,6	1,28 ( <i>s</i> )	
28	185,7	178,3		
29	27,2	26,9	1,20 ( <i>s</i> )	H-18
30	16,0	14,8	0,95 ( <i>d</i> , 6,6)	

### 5.5.2. Determinação estrutural da substância 2.

A análise do espectro de  $^1\text{H}$  juntamente com os mapas de correlações HMBC e HSQC da subfração SF21 sugere a presença do esqueleto dihidroflavonoidico (Figura S 25 – 30, pág. 112 – 114), caracterizado pelo dubleto em  $\delta$  5,22 (H-2, *d*, 11 Hz) correlacionando com o carbono carbinólico em  $\delta$  77,1 e o dubleto em  $\delta$  4,76 (H-3) correlacionando com o carbono carbinólico em  $\delta$  81,7, atribuídos ao anel C nas posições C-3 e C-2, respectivamente. O anel A apresenta um sistema tetrassubstituído, caracterizado pelos dubletos em  $\delta$  5,82

e  $\delta$  5,92 com constante de acoplamento meta de 2,1 Hz, respectivamente nas posições C-6 ( $\delta$  96,0) e C-8 ( $\delta$  95,0). Os dubletos aromáticos pertencentes ao anel B em  $\delta$  7,34,  $\delta$  6,80 correlacionam por HSQC com os carbonos em  $\delta$  127,8 (C-2'),  $\delta$  115,5 (C-3'),  $\delta$  115,5 (C-5') e  $\delta$  127,8 (C-6'). A correlação por HMBC do hidrogênio em  $\delta$  7,34 (H-2') com o carbono em  $\delta$  157,8 (C-4') comprova que o anel B apresenta uma hidroxila na posição C-4'. Observar-se também a correlação dos sinais H-2 e H-3 com o carbono em  $\delta$  195,1 (C-4), característico da carbonila do dihidroflavonois. Com bases nos valores de RMN (Tabela 4) descrito na literatura pode-se confirmar que a posição C-2 apresenta sua configuração absoluta como sendo *S*, logo a configuração de C-3 é *R*, uma vez que H-2 está em *trans* em relação a H-3 (Kwak *et al.*, 2009). Portanto, sugeri que a substância **2** tem a estrutura do dihidro-kempferol (Figura 25).

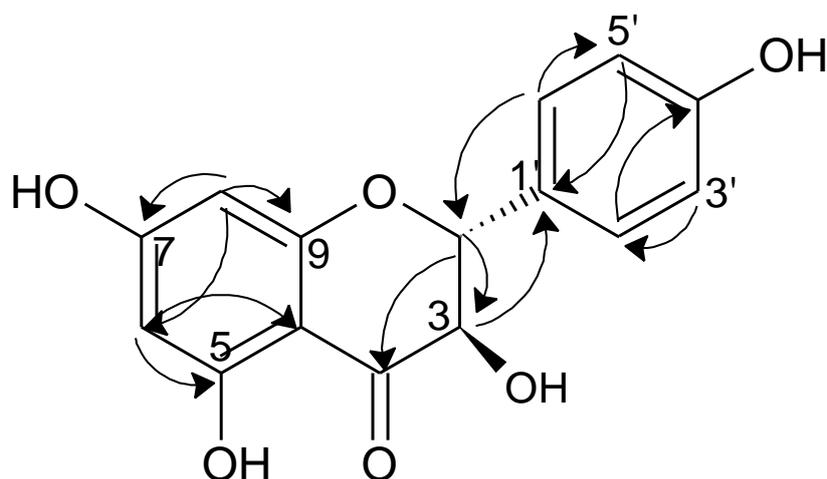


Figura 25. Principais correlações observadas no HMBC para substância **2**.

Tabela 4. Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da substância **2** (11,7 T,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Posição	Substância <b>2</b>			
	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$ (literatura) (Kwak <i>et al.</i> , 2009) $\text{DMSO-}d_6$	$^1\text{H}$ (mult., <i>J</i> em Hz)	HMBC ( $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ )
<b>2</b>	81,7	82,9	5,22 ( <i>d</i> , 11,0)	H-2', H-6'
<b>3</b>	77,1	71,5	4,76 ( <i>d</i> , 11,0)	H-2
<b>4</b>	195,1	197,9		H-2, H-3
<b>5</b>	163,2	166,9		H-6

<b>6</b>	96,0	96,0	5,92 ( <i>d</i> , 2,1)	H-8
<b>7</b>	166,8	163,3		H-6, H-8
<b>8</b>	95,0	95,0	5,88 ( <i>d</i> , 2,1)	H-6
<b>9</b>	162,5	162,6		H-8
<b>10</b>	100,7	100,4		H-6, H-8
<b>1'</b>	126,4	127,6		H-2', H-6'
<b>2'</b>	128,8	129,5	7,34 ( <i>d</i> , 8,4)	H-3', H-6'
<b>3'</b>	114,5	114,9	6,80 ( <i>d</i> , 8,4)	H-2', H-5'
<b>4'</b>	157,8	157,8		H-2', H-6'
<b>5'</b>	114,9	114,9	6,80 ( <i>d</i> , 8,4)	H-3', H-6'
<b>6'</b>	128,8	129,5	7,34 ( <i>d</i> , 8,4)	H-2', H-5'

### 5.5.3. Determinação estrutural da substância **3**.

O espectro de  $^1\text{H}$  da substância **3** evidenciou sinais característico de um sistema flavonoídico, dois dubletos referentes ao anel C em  $\delta$  4,57 (H-2) e  $\delta$  5,09 (H-1) com constante de 11,4 Hz ligados com os carbonos em  $\delta$  79,9 (C-2) e  $\delta$  84,0 (C-1), respectivamente. A presença de quatro sinais aromáticos, sendo dois referentes ao anel A [ $\delta$  5,89 (H-6) e  $\delta$  5,92 (H-8) com constante de magnitude de 2,2 Hz], e dois referentes ao anel B [ $\delta$  6,86 (H-2', H-6') e  $\delta$  7,57 (H-3', H-5')] com constante de magnitude de 8,5 Hz] (Figura S 31- 32, pág. 115). Com base nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  pode-se identificar o mesmo dihidroflavonol referente a substância **2** (Tabela 5).

A partir do espectro de  $^{13}\text{C}$  dessa substância pode-se identificar um total de 26 átomos que juntamente com o espectro de DEPT 135 auxiliou a identificar a presença de único carbono metílico em  $\delta$  17,8, um metilênico em  $\delta$  67,2 e cinco carbinólicos em  $\delta$  70,9, 71,9, 74,2, 75,9 e 77,6, além de apresentar dois átomos de carbonos anomérico em  $\delta$  101,7 e  $\delta$  107,4. A análise dos dados de  $^{13}\text{C}$ , juntamente com o de DEPT 135, possibilitou constatar que o flavonoide poderia estar ligado a pelo menos dois glicosídeos (Figura S 33 – 34, pág. 116).

O tipo de glicosídeo, bem como a posição que os mesmos se encontram ligados ao flavonoide foi atribuída com base nas correlações observadas nos experimentos de COSY, HSQC e HMBC (Figura S 35 – 48, pág. 117 -122). No mapa de correlações HMBC observa-se a correlação do C-1'' ( $\delta$  101,7) com o H-2 ( $\delta$  4,57, *d*, 11,4 Hz) do anel C do dihidroflavonol. O mapa de correlação HSQC mostrou a ligação do carbono em  $\delta$  101,71 (C-1'') com o hidrogênio em  $\delta$  4,24 (H-1'', *d*, 1,6 Hz). Com base no valor da constante de acoplamento do hidrogênio pode-se constatar que o mesmo se refere há um hidrogênio anomérico que está presente na posição equatorial, logo o substituinte flavonoídico encontra-se em axial.

Pelo HMBC também pode-se observar a correlação dos carbonos C-3'' ( $\delta$  70,9) e C-5'' ( $\delta$  67,5) com o H-1'' ( $\delta$  4,24, *d*, 1,6 Hz), além da correlação por COSY do H-1'' com H-2'' ( $\delta$  3,41, *q*, 1,6 Hz). O carbono C-5'' estava ligado a dois hidrogênios, em  $\delta$  3,69 (H<sub>b</sub>, *m*) e  $\delta$  3,02 (H<sub>a</sub>, *dd*, 10,5 Hz, 11,6 Hz), sendo que o H<sub>b</sub> correlaciona por HMBC com C-3'' ( $\delta$  70,9) e C-4'' ( $\delta$  77,6), apresentando também correlações por COSY com H<sub>a</sub> e H-4'' ( $\delta$  3,35, *dd*, 1,6 Hz, 10,5 Hz). A posição H-2'' ( $\delta$  3,41, *q*, 1,6 Hz), foi identificada através da correlação presente no COSY entre o mesmo e o H-1''. Pelo HSQC o H-2'' encontra-se ligado ao carbono em 82,6 (C-2''). A partir desses deslocamentos químicos pode-se definir que o glicosídeo ligado ao dihidroflavonol apresenta sua estrutura idêntica à da xilose.

A presença, bem como a posição pela qual o segundo glicosídeo encontrava-se ligado foi confirmada através da correlação por HMBC do H-2'' com o carbono em  $\delta$  107,4 (C-1'''). Pelo HMBC também se observou a correlação de C-2'' com H-1''' ( $\delta$  3,85, *d*, 7,5 Hz). Por COSY definiu-se o deslocamento químico de H-2''' ( $\delta$  3,09, *dd*, 7,5 Hz, 9,1 Hz), H-3''' ( $\delta$  3,71, *m*), H-4''' ( $\delta$  3,28, *t*, 9,6), H-5''' ( $\delta$  4,36, *dd*, 6,1 Hz, 9,6 Hz) e H-6''' ( $\delta$  1,19, *d*, 6,1 Hz). A partir das coleções presentes no HSQC determinou-se que os hidrogênios H-2''', H-3''', H-4''', H-5''' e H-6''' estão ligados com os carbonos em  $\delta$  75,3 (C-2'''), 71,9 (C-3'''), 74,2 (C-4'''), 70,6 (C-5''') e 17,8 (C-6'''), respectivamente. Portanto, o segundo glicosídeo foi identificado como sendo uma ramnose ligada pela posição C-1''' com a C-2'' da xilose.

A substância **3** foi identificada como sendo o dihidro-kampferol-3-O-[[ $\beta$ -xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -raminopiranosídeo (Figura 26). Na literatura ainda não há estudo referente a essa substância. Logo, é necessário realizar experimentos de rotação específica e/ou de dicroísmo circular para definir a configuração absoluta das posições C-2 e/ou C-3.

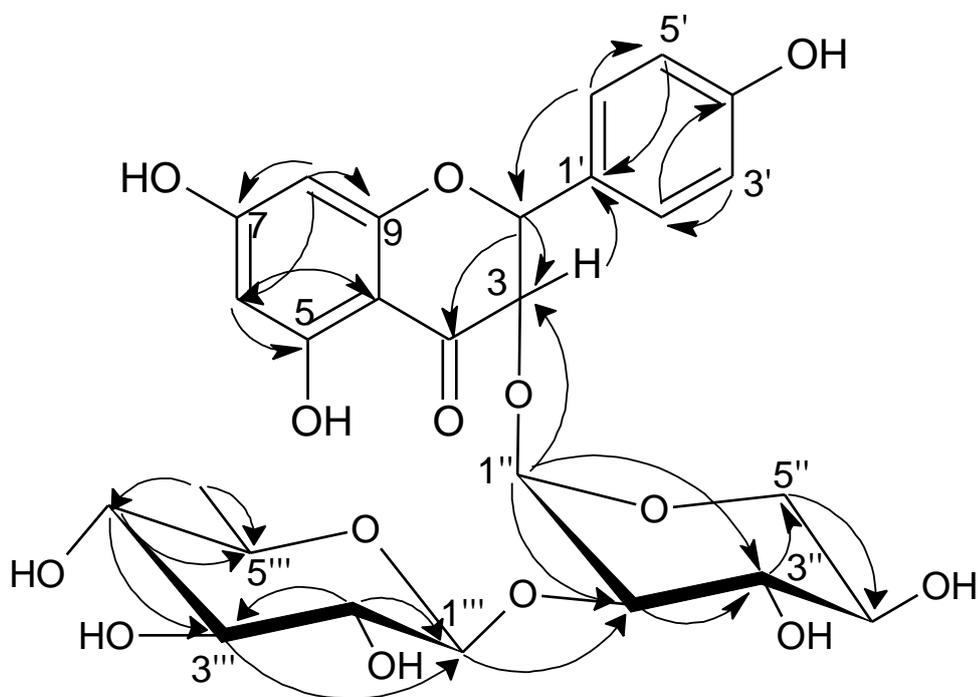


Figura 26. Principais correlações observadas no HMBC para substância **3**.

Tabela 5 Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da substância **3** (11,7 T, MeOD).

Posição	substância <b>3</b>		
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (mult., $J$ em Hz)	HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
<b>2</b>	84,0	5,09 ( <i>d</i> , 11,4)	H-2, H-2', H-6'
<b>3</b>	79,9	4,57 ( <i>d</i> , 11,4)	H-1, H-1'
<b>4</b>	196,2		H-1, H-2
<b>5</b>	165,5		H-5
<b>6</b>	97,5	5,92 ( <i>d</i> , 2,1)	H-7
<b>7</b>	168,6		H-5, H-7
<b>8</b>	96,3	5,89 ( <i>d</i> , 2,1)	H-5
<b>9</b>	164,3		H-7

<b>10</b>	102,4		H-5, H-7
<b>1'</b>	128,6		H-1, H-2, H-2', H-3', H-5', H-6'
<b>2'</b>	130,2	7,37 ( <i>d</i> , 8,6)	H-3', H-6'
<b>3'</b>	116,5	6,86 ( <i>d</i> , 8,6)	H-2', H-5'
<b>4'</b>	159,5		H-2', H-3', H-5', H-6'
<b>5'</b>	116,5	6,86 ( <i>d</i> , 8,6)	H-3', H-6'
<b>6'</b>	130,2	7,37 ( <i>d</i> , 8,6)	H-2', H-5'
<b>1''</b>	101,7	4,24 ( <i>d</i> , 1,6)	H-2
<b>2''</b>	82,6	3,41 ( <i>q</i> , 1,6)	H-1''
<b>3''</b>	70,9	3,37 ( <i>dd</i> , 1,6, 10,5)	H-1'', H-2'', Ha, Hb
<b>4''</b>	77,6	3,35 ( <i>dd</i> , 1,6, 10,5)	H-3'', Ha, Hb
<b>5''</b>	67,2	3,02 Ha ( <i>dd</i> , 10,5, 11,6) 3,69 Hb ( <i>m</i> )	H-1'', H-3'', H-4''
<b>1'''</b>	107,4	3,85 ( <i>d</i> , 7,5)	H-2'', H-2''', H-3'''
<b>2'''</b>	75,3	3,09 ( <i>dd</i> , 7,5, 9,1)	H-1'''
<b>3'''</b>	71,9	3,71 ( <i>m</i> )	H-4'''
<b>4'''</b>	74,2	3,28 ( <i>t</i> , 9,6)	H-5''', H-6'''
<b>5'''</b>	70,6	4,36 ( <i>dd</i> , 6,1, 9,6)	H-3''', H-6'''
<b>6'''</b>	17,8	1,19 ( <i>d</i> , 6,1)	H-4''', H-5'''

#### 5.5.4. Determinação estrutural da substância 4.

Através da análise do espectro de  $^{13}\text{C}$  juntamente com o DEPT 135 (Figura S 51 – 52, pág. 124) pode-se determinar que a substância cujo íon é o  $m/z$  387 apresentou um total de 18 átomos de carbonos, sendo pelo menos seis referentes a um sistema aromático, cinco a carbonos carbinólicos e um anomérico. A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura S 49 – 50, pág. 123) permitiu identificar dois átomos de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,24 (H-6, *d*, 2,8 Hz) e  $\delta$  6,35 (H-2, *d*, 2,8 Hz). Portanto, pode-se determinar a presença de um sistema aromático *meta*-substituído trioxigenado. A posição dos substituintes foi atribuída com base nos mapas de correlação HMBC, cujo mesmo apresentou

correlações do H-2 com os carbonos em  $\delta$  110,3 (C-6), 138,5 (C-4), 153,8 (C-3) e 155,1 (C-1), o do H-6 com os carbonos em  $\delta$  99,9 (C-2), 138,5 (C-4), 155,1 (C-1) e 40,4 (C-2') sendo que este último revelou a presença de um grupo ligado ao anel aromático. Pelo HMBC (Figura S 63 – 68, pág. 128 – 129) também foi possível identificar a correlação de metoxílica em  $\delta$  3,78 com a posição C-3 (Figura 27).

A análise por HSCQ (Figura S 58 – 62, pág. 126 – 128) possibilitou determinar que o C-2' estava ligado a dois átomos de hidrogênios, [ $\delta$  2,57 (Ha-2', dd, 6,5 Hz, 13,4 Hz) e  $\delta$  3,06 (Hb-2', dd, 6,5 Hz, 13,4 Hz)], sendo que Ha-2' correlaciona com C-1' ( $\delta$  72,1), C-5, C-3', e o H-2' com o C-1', C-3' ( $\delta$  40,1), C-5' e C-4. Com bases nesses dados pode-se propor um sistema aromático do tipo alquilresorcionol, apresentando uma unidade alquil formada por cinco átomos de carbono, uma vez que o HMBC apresentou correlações do Ha-3' ( $\delta$  1,38, *m*) e Hb-3' ( $\delta$  1,49, *m*) com C-4' ( $\delta$  20,0) e C-5' ( $\delta$  14,5), definindo as posições de cada átomo da cadeia lateral. No entanto, a posição C-1' da cadeia lateral apresenta uma hidroxila, uma vez que, apresenta um único hidrogênio carbinólico (H-1',  $\delta$  3,97, *m*).

A posição do glicosídeo referente ao sistema alquilresorcinol foi atribuída através da correlação do H-1'' ( $\delta$  4,79, *d*, 7,5Hz) com a posição C-4 do anel aromático. O hidrogênio anomérico também apresentou correlações com os carbonos C-2'' ( $\delta$  75,9) e C-5'' ( $\delta$  78,2) do glicosídeo, este ligados aos hidrogênios em  $\delta$  3,43 (H-2'', *m*) e  $\delta$  3,19 (H-5'', *m*) respectivamente. O H-2'' apresenta correlações com o  $\delta$  77,9 (C-3'') e  $\delta$  105,5 (C-1''), e o H-5'' com o 62,6. O carbono em  $\delta$  62,6 é referente a posição C-6'' do glicosídeo, esse estava ligado aos hidrogênios em  $\delta$  3,79 (Hb-6'') e  $\delta$  3,66 (Ha-6''), que por sua vez correlacionam com a posição C-4'' ( $\delta$  71,5) ligado ao  $\delta$  3,37 (H-4'') e C-5'' ( $\delta$  78,2) fechando então todas as posições do glicosídeo do tipo glucose.

A partir dos valores de RMN das substâncias do grupo dos alquilresorcinois já descritas para espécies de *Eugenia* (Bokesch *et al.*, 1997; Wubshet *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016) foi possível identificar a substância **4** (Tabela 6) como sendo o 3-O-metil-5-(1'-hidroxipentil)-resorcinol-4-O- $\beta$ -glucopiranosídeo (Figura

27). Na literatura ainda não há estudo referente a essa substância. Portanto, ainda se faz necessário realizar experimentos de rotação específica e/ou de dicroísmo circular para definir a configuração absoluta da posição C-1'.

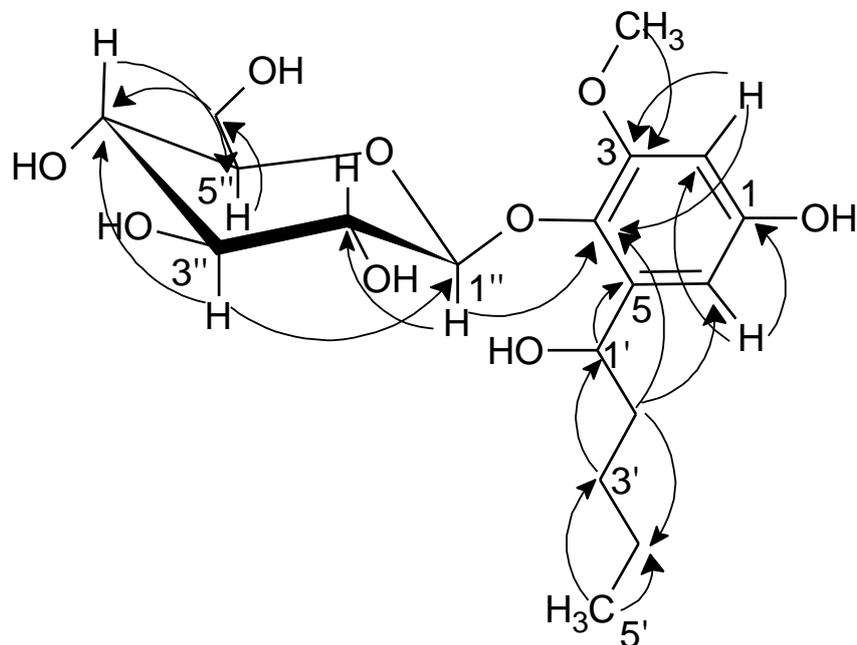


Figura 27. Principais correlações observadas no HMBC para substância 4.

Tabela 6 Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da substância 4 (11,7 T, MeOD).

Posição	substância 4		
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (mult., $J$ em Hz)	gHMBC ( $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ )
1	155,1		H-2, H-6
2	99,9	6,35 ( <i>d</i> , 2,8)	H-6
3	153,8		H-2, O-CH <sub>3</sub>
4	138,5		H-2, H-6, Hb-2', H-1''
5	135,6		H-1', Ha-2', Hb-2'
6	110,3	6,24 ( <i>d</i> , 2,8)	H-2, H-2'
1'	72,1	3,97 ( <i>m</i> )	Hb-2', Hb-3', Ha-4'
2'	40,4	2,57 Ha-2' ( <i>dd</i> , 6,5, 13,4) 3,06 Hb-2' ( <i>dd</i> , 6,8, 13,4)	H-6, Ha-4', Hb-4'
3'	40,1	1,38 Ha-3' ( <i>m</i> ) 1,49 Hb-3' ( <i>m</i> )	H-5', Ha-2', Hb-2'
4'	20,0	1,34 Ha-4' ( <i>m</i> ) 1,50 Hb-4' ( <i>m</i> )	Ha-3', H-5'

<b>5'</b>	14,5	0,88 ( <i>t</i> , 7,2)	Ha-4', Hb-4'
<b>O-CH<sub>3</sub></b>	56,3	3,79 ( <i>s</i> )	
<b>1''</b>	105,5	4,79 ( <i>d</i> , 7,5)	H-2'', H-5''
<b>2''</b>	75,9	3,43 ( <i>m</i> )	H-1'', H-3''
<b>3''</b>	77,9	3,42 ( <i>m</i> )	H-2'', H-4''
<b>4''</b>	71,5	3,37 ( <i>m</i> )	Hb-6''
<b>5''</b>	78,2	3,19 ( <i>m</i> )	H-1'', Ha-6'', Hb-6''
<b>6''</b>	62,6	3,67 Ha-6'' ( <i>dd</i> , 2,4, 12,0) 3,79 Hb-6'' ( <i>dd</i> , 2,4, 12,0)	H-4'', H-5''

A fragmentação da substância 4 ( $m/z$  387) gerou o fragmento  $m/z$  225 (Figura 28). Com base na estrutura da substância 4 pode-se determinar que o íon  $m/z$  255 é referente a perda da glucose (-162 Da) e formação do alquilresorcinol em sua forma iônica (Figura 29) estabilizada pela deslocalização da carga negativa com o sistema aromático.

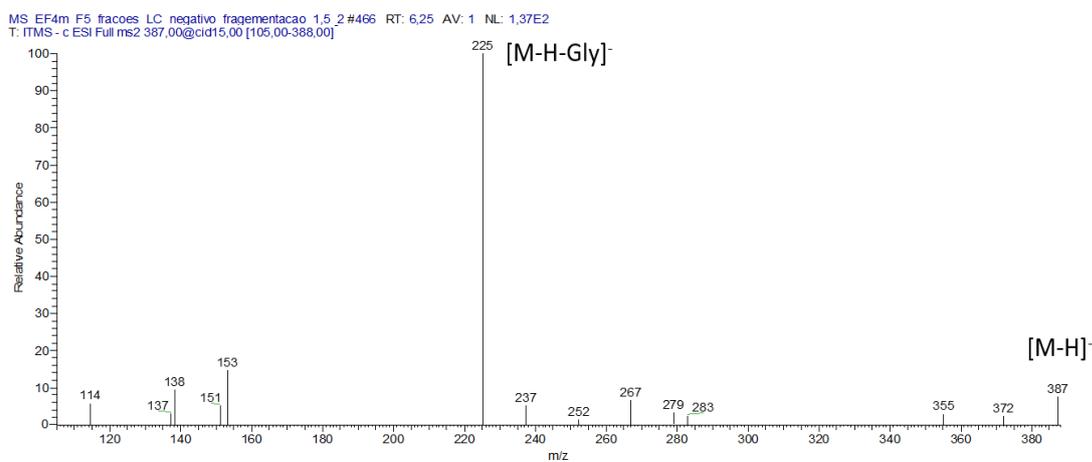


Figura 28 ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  387.

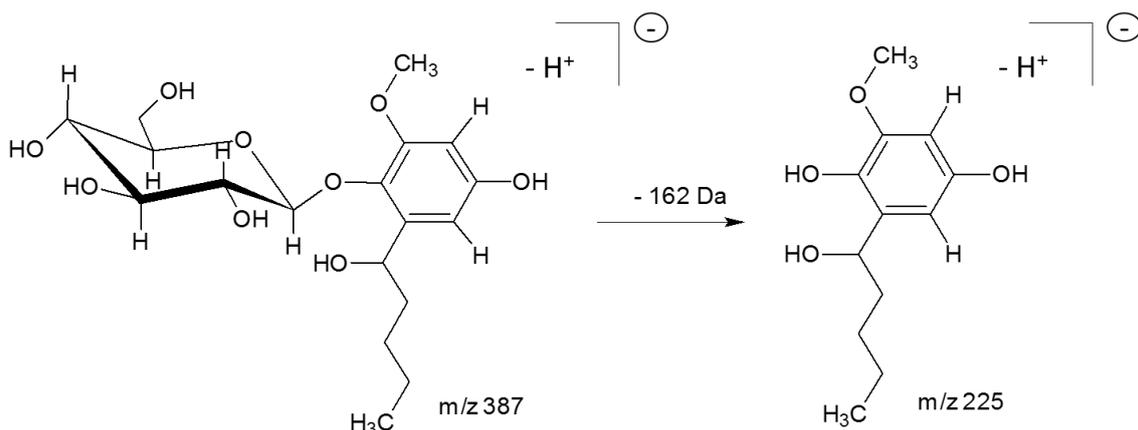


Figura 29 Estrutura do fragmento de  $m/z$  225 observado no ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  387.

#### 5.5.5. Determinação estrutural da substância **5**.

A análise do espectro de  $^1\text{H}$  da substância **5** permitiu identificar dois sinais aromáticos referente ao H-2 ( $\delta$  6,59, *d*, 2,5 Hz) e H-6 ( $\delta$  6,47, *d*, 2,5 Hz), indicando a presença de um sistema aromático tetrassubstituído característicos da estrutura do alquilresorcinol identificado na substância **4**. A posição dos substituintes do alquilresorcinol foi atribuída com base no mapa de correlação HMBC, o mesmo apresentou uma correlação do H-2 com os carbonos em  $\delta$  112,7 (C-6),  $\delta$  151,9 (C-4),  $\delta$  149,0 (C-3) e  $\delta$  141,3 (C-4), já o hidrogênio em  $\delta$  6,24 (H-6) apresentou correlação com os carbonos em  $\delta$  101,9 (C-2),  $\delta$  151,9 (C-1),  $\delta$  141,3 (C-4) e  $\delta$  39,5 (C-2'), sendo que este último indicou a presença de um grupo alquil ligado ao anel aromático. Pelo HMBC também foi possível identificar a correlação de do hidrogênio metoxílico em  $\delta$  3,69 (s) com o carbono em  $\delta$  149,9 (C-3) do sistema aromático.

Com base nos mapas de correlações HMBC, HSQC e COSY (Figura S 69 – 84, pág. 130 – 134) pode-se determinar a posição de todos os átomos de hidrogênio e carbonos pertencentes ao grupo alquil. A posição H-5' ( $\delta$  0,87, m) ligada ao carbono em  $\delta$  14,5 (C-5') apresentava correlação com os carbonos em  $\delta$  20,1 (C-4') e  $\delta$  40,1 (C-3') estando estes ligados com os hidrogênios em  $\delta$  1,32 (Ha-4' e Ha-3') e  $\delta$  1,41 (Hb-4' e Hb-3'), a correlação deste com o carbono em 39,5 (C-2') ligado aos hidrogênios em  $\delta$  2,49 (Ha-2', m) e  $\delta$  2,62 (Hb-2') pode auxiliou na definição da posição da hidroxila alfa benzílica, uma vez que, Ha-2'

e Hb-2' por HMBC correlacionavam com C-1' ( $\delta$  72,5). Por HSQC definiu-se que o carbono alfa benzílico está ligado ao hidrogênio H-5' ( $\delta$  3,82, *m*).

O HMBC evidenciou que havia um glicosídeo ligado pela posição C-1 do alquilresorcinol. Por COSY observou-se a correlação de H-1'' ( $\delta$  4,47, *d*, 7,3 Hz) com H-2'' ( $\delta$  3,45, *m*), além da correlação dos hidrogênios metilênicos [Há-6'' ( $\delta$  4,41, *m*) e Hb-6'' ( $\delta$  4,61, *m*)] com o H-5'' ( $\delta$  3,71, *m*), além da correlação por HMBC com o carbono carboxílico em  $\delta$ 168,6 (C=O). A demais posição do glicosídeo foi definida com base nas correlações por HMBC e HSQC. O sinal em  $\delta$  168,6 apresentava correlação por HMBC com o singlete em  $\delta$  7,08 (C-2''' e C-6'''), caracterizando assim a presença de uma unidade de ácido gálico ligado a posição C-6'' do glicosídeo. A posição dos átomos de carbono do ácido gálico foi definida através das correlações por HMBC com o sinal em  $\delta$  7,08. Com esses dados pode-se determinar a estrutura da substância **5** (Tabela 7) como sendo o 3-O-metil-5-(1'-hidroxipentil)-resorcinol-4-O- $\beta$ -(6''-galoil)-glucopiranosídeo (Figura 30).

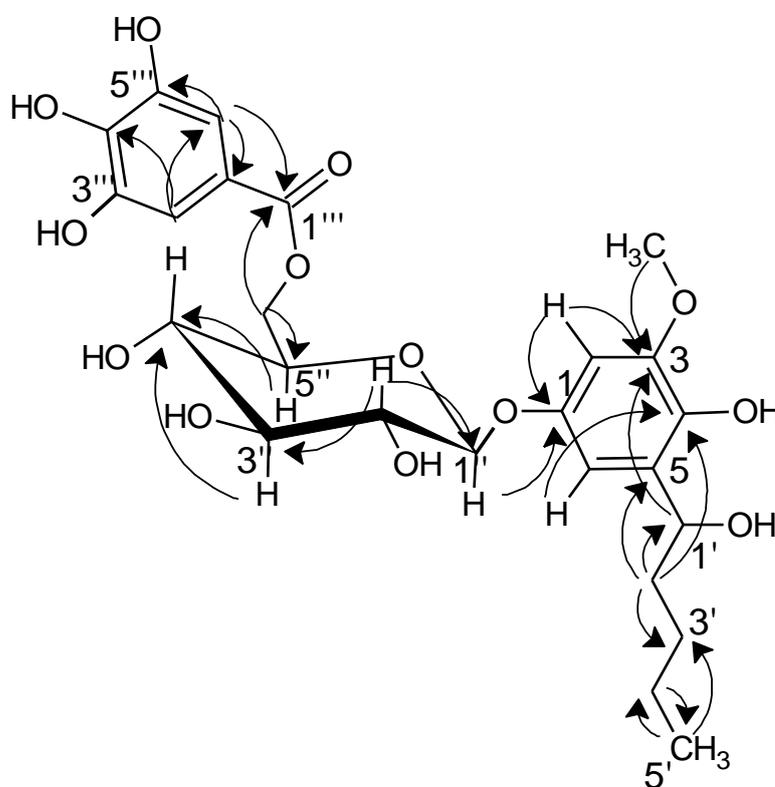


Figura 30 Principais correlações observadas no HMBC para substância **5**.

Tabela 7 Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da substância **5** (11,7 T, MeOD).

Posição	substância <b>5</b>		
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (mult., $J$ em Hz)	HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
<b>1</b>	151,9		H-2, H-6, H-1''
<b>2</b>	101,9	6,59 ( <i>d</i> , 2,5)	H-6
<b>3</b>	149,0		H-2, O-CH <sub>3</sub>
<b>4</b>	141,3		H-2, H-6
<b>5</b>	127,2		Ha-2', Hb-2'
<b>6</b>	112,7	6,47 ( <i>d</i> , 2,5)	H-2, Hb-2'
<b>1'</b>	72,5	3,82 ( <i>m</i> )	Ha-2', Hb-2'
<b>2'</b>	39,5	2,49 Ha-2' ( <i>m</i> ) 2,62 Hb-2' ( <i>m</i> )	H-6, Hb-3', Hb-4'
<b>3'</b>	40,1	1,32 Ha-3' ( <i>m</i> ) 1,41 Hb-3' ( <i>m</i> )	Ha-2', Hb-2', H-5'
<b>4'</b>	20,1	1,32 Ha-4' ( <i>m</i> ) 1,41 Hb-4' ( <i>m</i> )	H-5'
<b>5'</b>	14,5	0,87 ( <i>m</i> )	Ha-4'
<b>O-CH<sub>3</sub></b>	56,4	3,69 ( <i>s</i> )	
<b>1''</b>	104,1	4,74 ( <i>d</i> , 7,3)	H-2''
<b>2''</b>	75,1	3,45 ( <i>m</i> )	H-3''
<b>3''</b>	77,7	3,42 ( <i>m</i> )	H-2''
<b>4''</b>	71,8	3,42 ( <i>m</i> )	
<b>5''</b>	75,7	3,71 ( <i>m</i> )	Ha-6''
<b>6''</b>	65,0	4,41 Ha-6'' ( <i>m</i> ) 4,61 Hb-6'' ( <i>m</i> )	
<b>1'''</b>	121,3		H-2''', H-6'''
<b>2'''</b>	110,2	7,08 ( <i>s</i> )	H-6'''
<b>3'''</b>	146,8		H-2'''
<b>4'''</b>	140,1		H-2''', H-6'''
<b>5'''</b>	146,8		H-6'''
<b>6'''</b>	110,2	7,08 ( <i>s</i> )	H-2'''
<b>C=O</b>	168,6		Ha-6'', Hb-6'', H-2'''

A fragmentação da substância **5** ( $m/z$  539) gerou os íons de  $m/z$  313 ( $-226$  Da),  $m/z$  285 ( $-255$  Da) e  $m/z$  225 ( $-314$  Da) (Figura 31). Com base na estrutura da substância **5** conclui-se que esses fragmentos característicos da perda do grupo alquilresorcinol (Figura 33) são gerados devido a estabilidade do mesmo, uma vez que, o mesmo se apresenta de forma estável tanto na sua forma neutra quando na forma iônica.

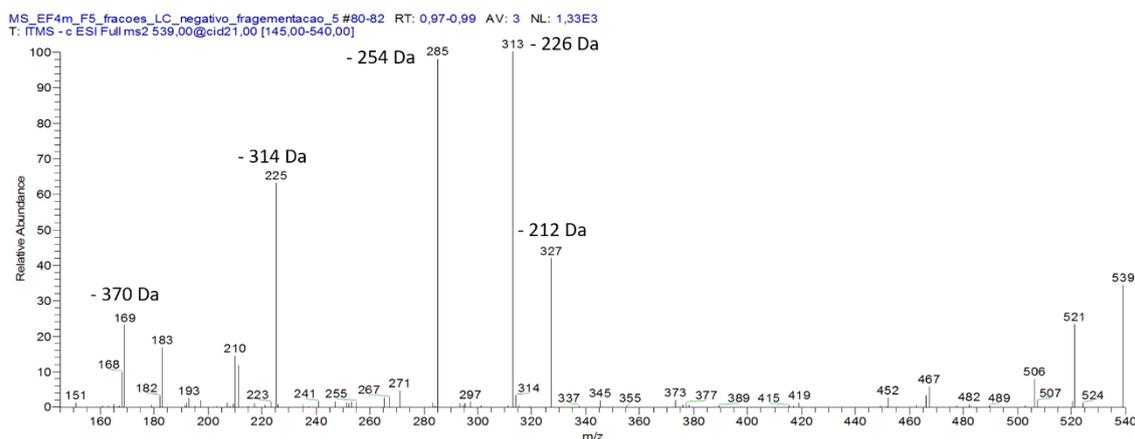


Figura 31 ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  539, CID = 21 eV.

Com base na estabilidade do grupo alquilresorcinol pode se propor as estruturas descrita na Figura 33 para os fragmentos observados em MS<sup>1</sup>. No entanto, o MS<sup>2</sup> mostrou que o íon de  $m/z$  313 apresenta a perda de 144 Da (Figura 32) referente a uma unidade de glicose, formando então o íon 169 que é característico do ácido gálico (Figura 34). De acordo com os dados de EM e RMN concluiu-se que a substância **5** é um derivado da substância **4**, apresentando em sua estrutura uma unidade a mais de ácido gálico na posição C-6''.

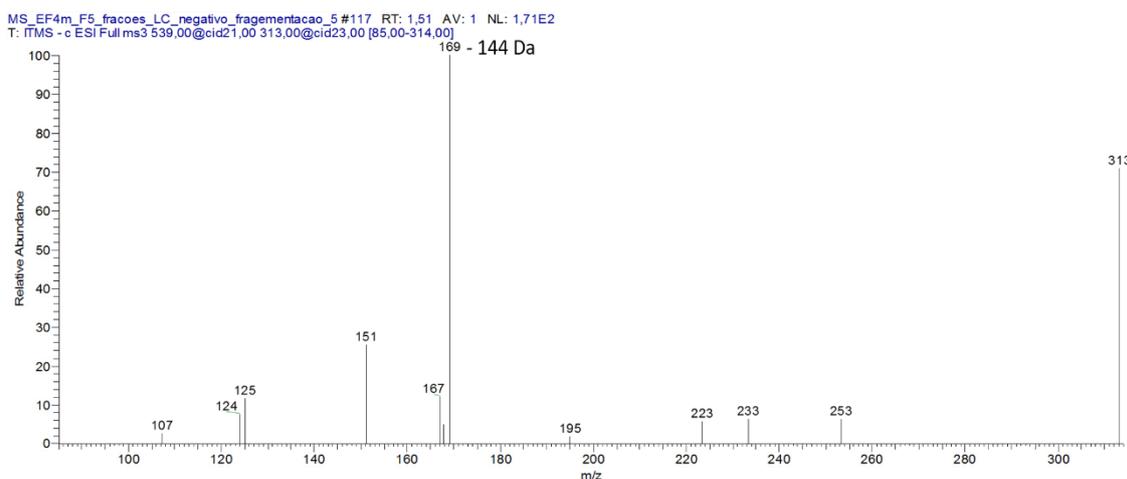


Figura 32 ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  313, CID = 23 eV.

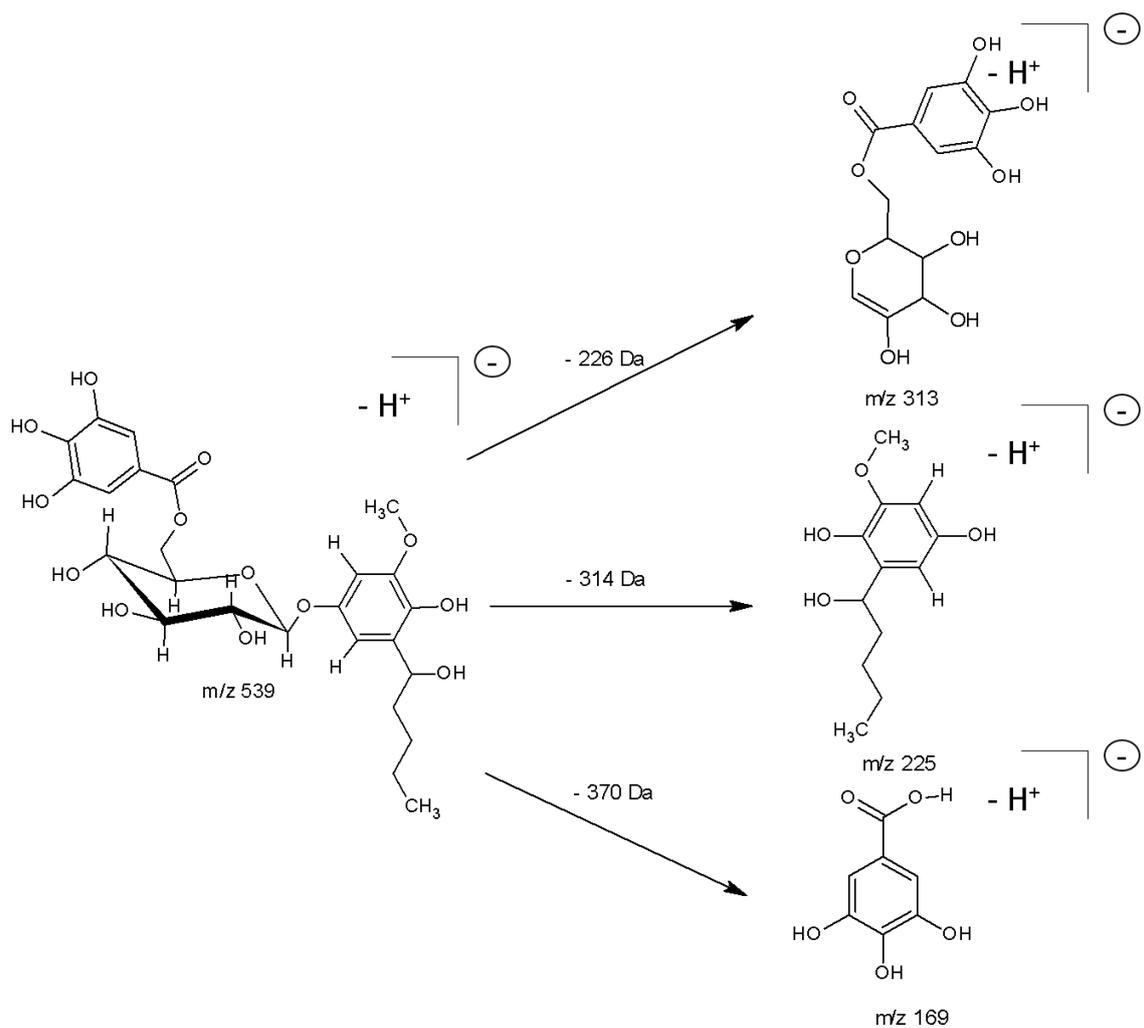


Figura 33 Estrutura do fragmento de  $m/z$  225 observado no ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  539.

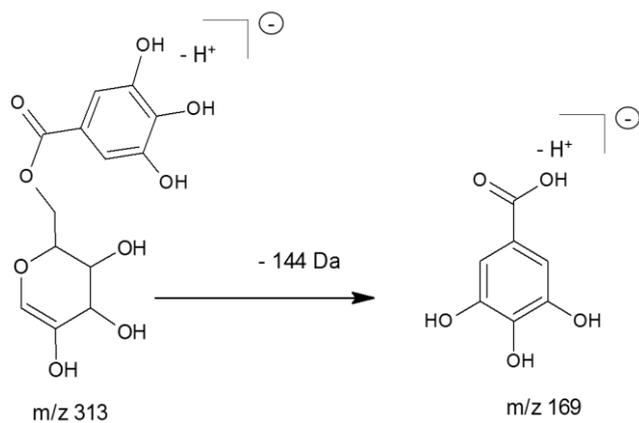


Figura 34 Estrutura do fragmento de  $m/z$  225 observado no ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  313.

### 5.5.6. Determinação estrutural da substância **6**.

A análise do padrão de fragmentação por espectrometria de massas dos alquilresorcinois além de auxiliar na confirmação das estruturas analisadas por RMN, também possibilitou a identificação do íon de  $m/z$  691. A análise do padrão de fragmentação dos íons  $m/z$  387,  $m/z$  539 e  $m/z$  691 possibilitou determinar que a substância **6** apresenta uma unidade de ácido gálico ( $m/z$  169) a mais que a substância **5**. A Figura 35 mostra o padrão de fragmentação do íon 691, tendo o mesmo como perda principal o fragmento  $m/z$  539 (Figura 38). A fragmentação desse íon (Figura 36) apresentou o padrão de fragmentação semelhante ao da substância **5** (Figura 37). Portanto, a substância **6** foi identificada como sendo o 3-O-metil-5-(1'-hidroxipentil)-resorcinol-4-O- $\beta$ -(4'', 6''-digaloil)-glucopiranosídeo. Assim como a substância 4 e 5, a 6 ainda não possui relatos na literatura.

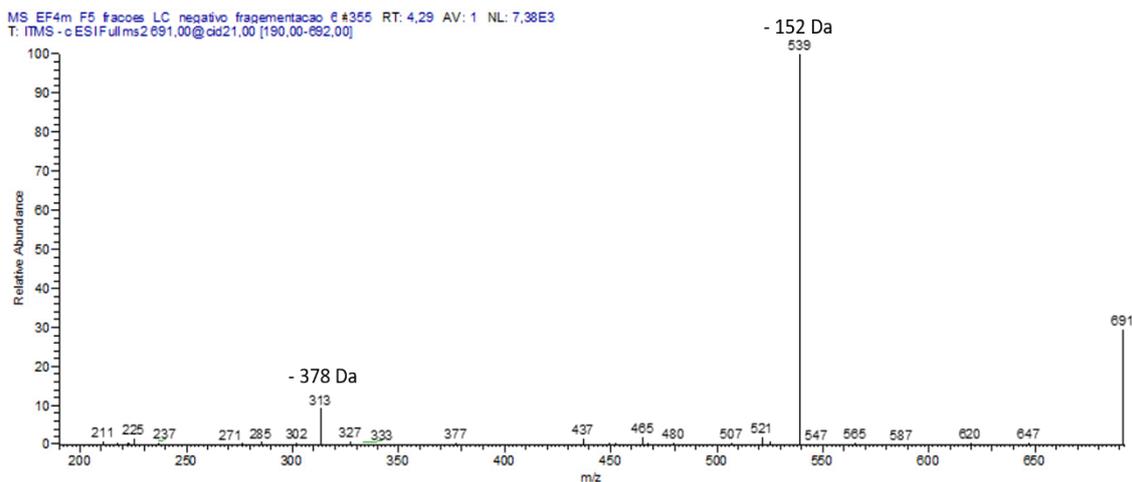


Figura 35 ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  691, CID = 21 eV.

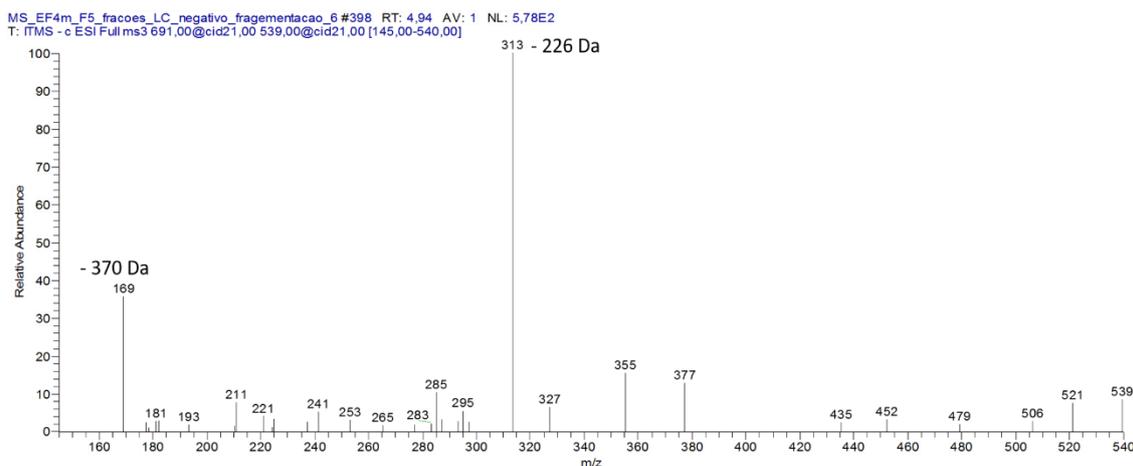


Figura 36 ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  539 referente a substância **6**, CID = 21 eV..

MS\_EF4m\_F5\_fracoes\_LC\_negativo\_fragementacao\_5#80-82 RT: 0,97-0,99 AV: 3 NL: 1,33E3  
 T: ITMS - c ESI Full ms2 539,00@cid21,00 [145,00-540,00]

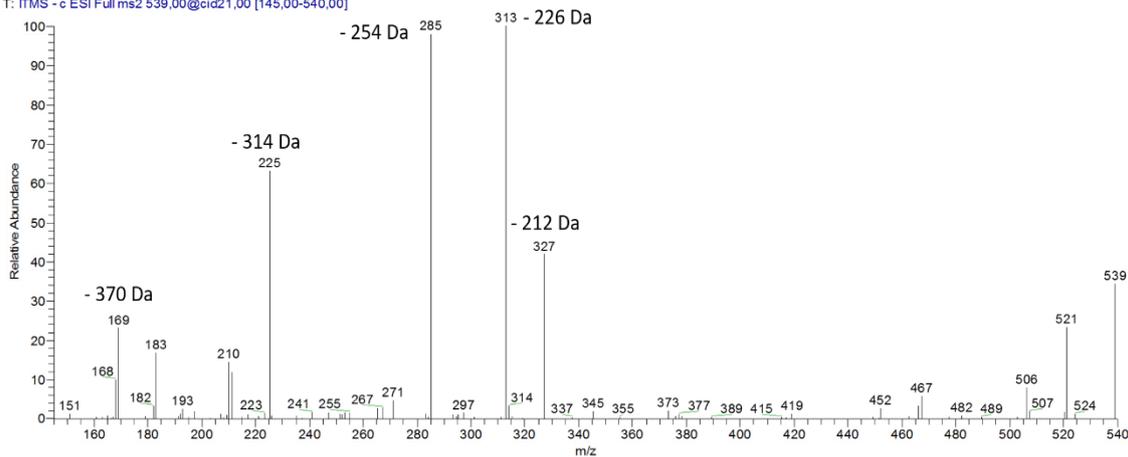


Figura 37 ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 539 referente a substância 5, CID = 21 eV.

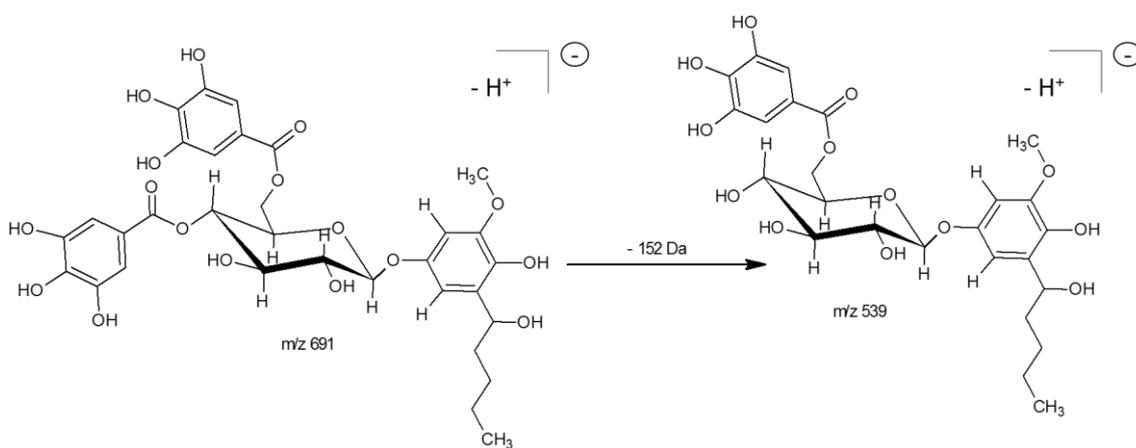


Figura 38 Estrutura do fragmento de m/z 539 observado no ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 691.

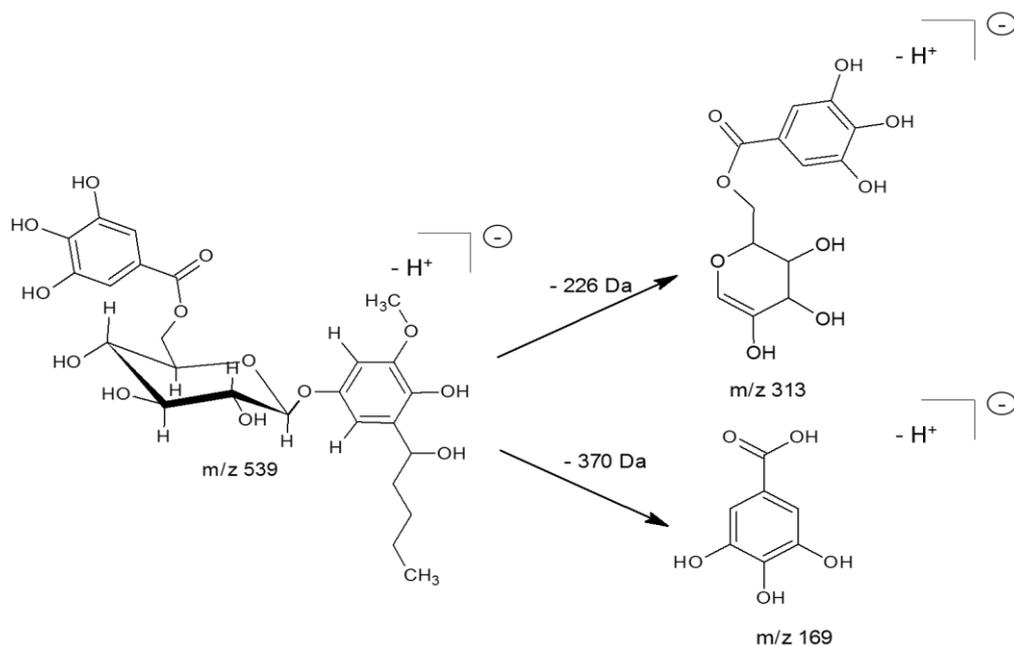


Figura 39 Estrutura do fragmento de m/z 313 e m/z 169 observado no ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 691.

### 5.5.7. Determinação estrutural da substância 7.

A substância **7** foi analisada por massas de baixa resolução no modo negativo, podendo-se constatar a presença do íon  $m/z$  503. O íon  $m/z$  503 foi então fragmentado, e seu padrão de fragmentação comparado com o padrão obtido no massas de alta resolução. Uma vez que o padrão de fragmentação observado em ambas as técnicas foi semelhante pode-se aferir que a massa exata da substância **6** é  $m/z$  503,2157, e que em conjunto com os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (Figura S 87 – 88, pág. 137) correspondeu a fórmula molecular de  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_{12}$  (Erro = 4,5 ppm).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura S 85 – 86, pág. 136) mostrou um sistema aromático com dois dubletos, um em  $\delta$  6,48 e outro em  $\delta$  6,64, ambos com constante de acoplamento da magnitude de 2,6 Hz caracterizando então um sistema aromático do tipo resorcinol tetrassubstituído. Com base nos dados de  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135 e nas correlações de HMBC pode-se identificar a presença de um grupo alquil formado por cinco átomos de carbono ligado na posição C-5 do sistema aromático, tendo estes como deslocamento químico  $\delta$  14,4 (C-5'),  $\delta$  23,6 (C-4'),  $\delta$  32,8 (C-3'),  $\delta$  30,6 (C-2') e  $\delta$  31,0 (C-1'). Os deslocamentos de seus hidrogênios foram atribuídos através das correlações de HSQC sendo  $\delta$  0,89 (H-5', *t*, 6,9 Hz),  $\delta$  1,34 (H-4', *m*),  $\delta$  1,32 (H-3', *m*),  $\delta$  1,57 (H-2', *m*) e  $\delta$  2,56 (H-1', *dd*, 6,6 Hz, 8,4 Hz), respectivamente. Além dos sinais característicos do grupo alquil, através do HMBC observou-se que a metóxila em  $\delta$  3,84 apresenta uma correlação com C-3 ( $\delta$  148,8) do sistema aromático,

No espectro de  $^1\text{H}$  ainda é possível identificar dois dubletos referentes a hidrogênios anoméricos com deslocamento químico em  $\delta$  4,24 (H-1''', *d*, 6,8 Hz) e  $\delta$  4,78 (H-1'', *d*, 7,3 Hz). O espectro de carbono junto com o de DEPT135 evidenciou a presença de seis metilenos, sendo 4 ( $\delta$  23,64,  $\delta$  32,80,  $\delta$  30,68 e  $\delta$  31,01) pertencentes a cadeia lateral do alquilresorcinol. Os outros dois metilenos absorvendo a  $\delta$  69,38 (C-6'') característico da glicose, e outro em  $\delta$  66,75 (C-5''') característico da ramnose (Wubshet *et al.*, 2015).

O mapa de correlações HMBC comprovou através da correlação entre o hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,78 (H-1'') com o carbono em  $\delta$  151,78 (C-1) a

presença de um glicosídeo ligado diretamente ao alquilresorcinol. O mapa de correlação HSQC mostrou a ligação do carbono em  $\delta$  103,7 (C-1'') com o H-1''. O hidrogênio anomérico H-1'' além da correlação com o alquilresorcinol também correlacionava com os carbonos em  $\delta$  77,77 (H-3'') e o  $\delta$  76,95 (H-5''), bem como por COSY com o H-2'' ( $\delta$  3,42, *m*) que estava ligado ao  $\delta$  74,97 (C-2''). Já o carbono metilênico estava ligado aos hidrogênios em  $\delta$  3,79 (Ha-6'', *dd*, 5,6 Hz, 11,4 Hz) e  $\delta$  4,10 (Hb-6'', *dd*, 2,0 Hz, 11,4 Hz), sendo que Ha-6'' correlaciona com C-5'' e C-1''' e o Hb-6'' com C-4'' e C-5'', além de acoplarem entre si pelo COSY. A correlação do Ha-6'' com o carbono em  $\delta$  104,9 evidenciou que a xilose encontrava-se ligada através da posição C-1''' com a C-6'' da glucose (Figura S 89 – 102, pág. 138 – 143).

Através da análise dos mapas de correlações HMBC e HSQC pode-se determinar as posições dos hidrogênios e carbonos pertencentes a xilose, sendo os hidrogênios  $\delta$  3,57 (H-2'''),  $\delta$  3,49 (H-3'''),  $\delta$  3,78 (H-4''') os carbinólicos e o  $\delta$  3,46 (H-5''') e  $\delta$  3,83 (H-5''') os metilênico. O  $\delta$  4,27 (H-1''') correlacionava com o  $\delta$  74,2 (C-3''') e o  $\delta$  66,7 (C-5'''), e o  $\delta$  3,57 (H-2''') com o  $\delta$  74,2 (C-3'''), portanto foi atribuída a ramnose os carbonos  $\delta$  104,4 (C-1'''),  $\delta$  72,3 (C-2'''),  $\delta$  74,2 (C-3'''),  $\delta$  69,48 (C-4''') e  $\delta$  66,75 (C-5'''). Portanto, a partir da análise do dados de RMN (Tabela 8) pode-se identificar a substância **7** (4-hidroxi-3-O-metil-5-pentilresorcinol-1-O-[ $\alpha$ -xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -glucopiranosídeo) (Figura 40), substância essa já descrita na literatura para a *Eugenia lambertiana* (Bokesch *et al.*, 1997).

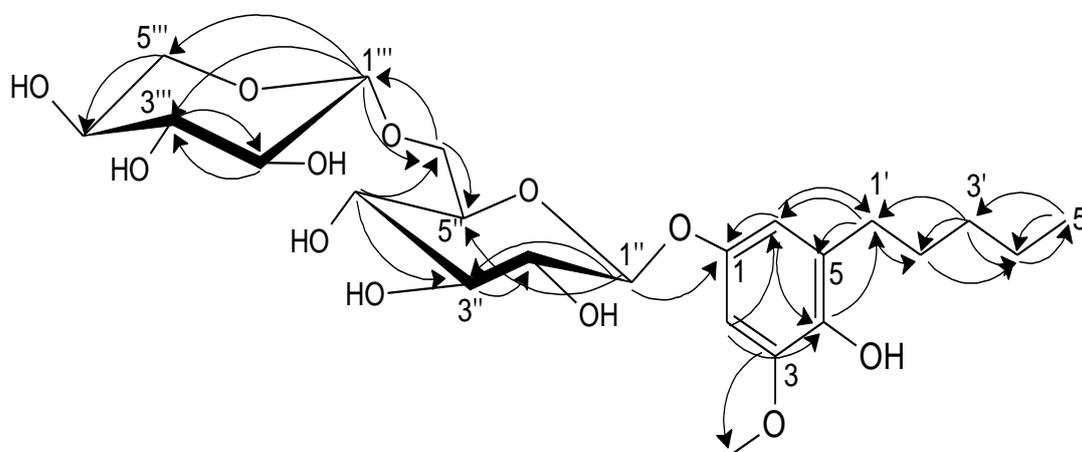


Figura 40. Principais correlações observadas no COSY e HMBC para substancia 7.

Tabela 8 Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da substância **7** (11,7 T, MeOD).

Posição	substância <b>7</b>			
	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$ (literatura) (Bokesch <i>et al.</i> , 1997) DMSO- $d_6$	$^1\text{H}$ (mult., $J$ em Hz)	HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
<b>1</b>	151,7	150,2		H-6, H-1"
<b>2</b>	101,0	99,6	6,64 ( <i>d</i> , 2,6)	H-6,
<b>3</b>	148,9	147,7		H-2, H-6""
<b>4</b>	140,7	138,9		H-2, H-6, H-1'
<b>5</b>	130,6	129,3		H-1', H-2'
<b>6</b>	111,5	109,2	6,48 ( <i>d</i> , 2,6)	H-2, H-1"
<b>1'</b>	31,0	29,8	2,56 ( <i>dd</i> , 6,6, 8,4)	H-6, H-2'
<b>2'</b>	30,6	29,3	1,57 ( <i>m</i> )	H-1'
<b>3'</b>	32,8	31,3	1,32 ( <i>m</i> )	H-4', H-5'
<b>4'</b>	23,6	22,2	1,34 ( <i>m</i> )	H-2', H-3', H-5'
<b>5'</b>	14,4	14,2	0,89 ( <i>t</i> , 6,9)	H-3', H-4'
<b>O-CH<sub>3</sub></b>	56,4	56,0	3,84 ( <i>s</i> )	
<b>1''</b>	103,6	101,7	4,78 ( <i>d</i> , 7,3)	H-2"
<b>2''</b>	74,9	73,4	3,42 ( <i>m</i> )	H-3"
<b>3''</b>	77,7	76,7	3,45 ( <i>m</i> )	H-1'', H-4"
<b>4''</b>	71,3	70,1	3,44 ( <i>m</i> )	H-5'', Ha-6"
<b>5''</b>	76,9	75,7	3,58 ( <i>m</i> )	H-1"
<b>6''</b>	69,3	68,3	3,79 Ha-6'' ( <i>dd</i> , 5,6, 11,4) 4,10 Hb-6'' ( <i>dd</i> , 2,0, 11,4)	H-4'', H-1'''
<b>1'''</b>	104,9	103,5	4,27 ( <i>d</i> , 6,8)	Hb-6'', H-2'''
<b>2'''</b>	72,3	70,7	3,57 ( <i>m</i> )	H-3'''
<b>3'''</b>	74,2	72,8	3,49 ( <i>dd</i> , 3,4, 9,0)	H-1''', H-2'''
<b>4'''</b>	69,4	67,4	3,78 ( <i>m</i> )	Hb-5'''
<b>5'''</b>	66,7	64,9	3,46 Ha-5''' ( <i>m</i> ) 3,83 Hb-5''' ( <i>m</i> )	H-1'''

A fragmentação da substância **7** ( $m/z$  503) (Figura 41) gerou os íons de  $m/z$  371 ( $-132$  Da) referente a perda de uma unidade de ramnose,  $m/z$  293 ( $-210$  Da) referente a perda do grupo alquilresorcinol,  $m/z$  209 ( $-294$  Da) que ocorreu devido à quebra da ligação da glucose com o alquilresorcinol, bem com a formação do íon  $m/z$  195 ( $-308$  Da) que é proveniente da perda dos dois glicosídeos seguido da perda de uma metila (Figura 37). As estruturas dos fragmentos observados para o íon 503 estão presentes na Figura 42.

fracoes\_teste\_lc\_fb\_10\_03\_17\_frag\_503#266-270 RT: 4,07-4,11 AV: 5 NL: 2,33E2  
T: ITMS - c APCI corona Full ms2 503,00@cid18,00 [135,00-505,00]

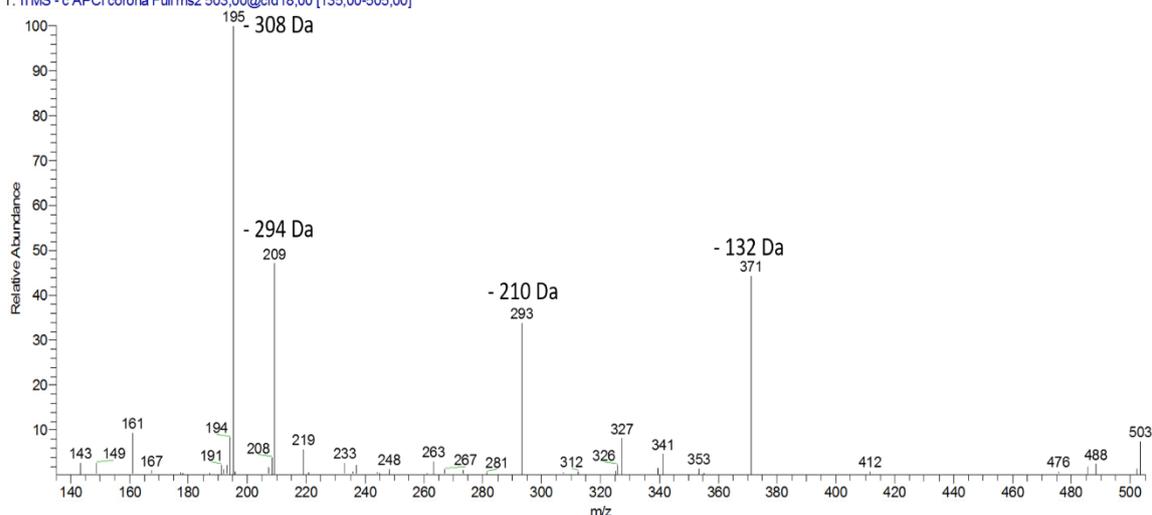


Figura 41 ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  503 referente a substância **7**, CID = 18 eV.

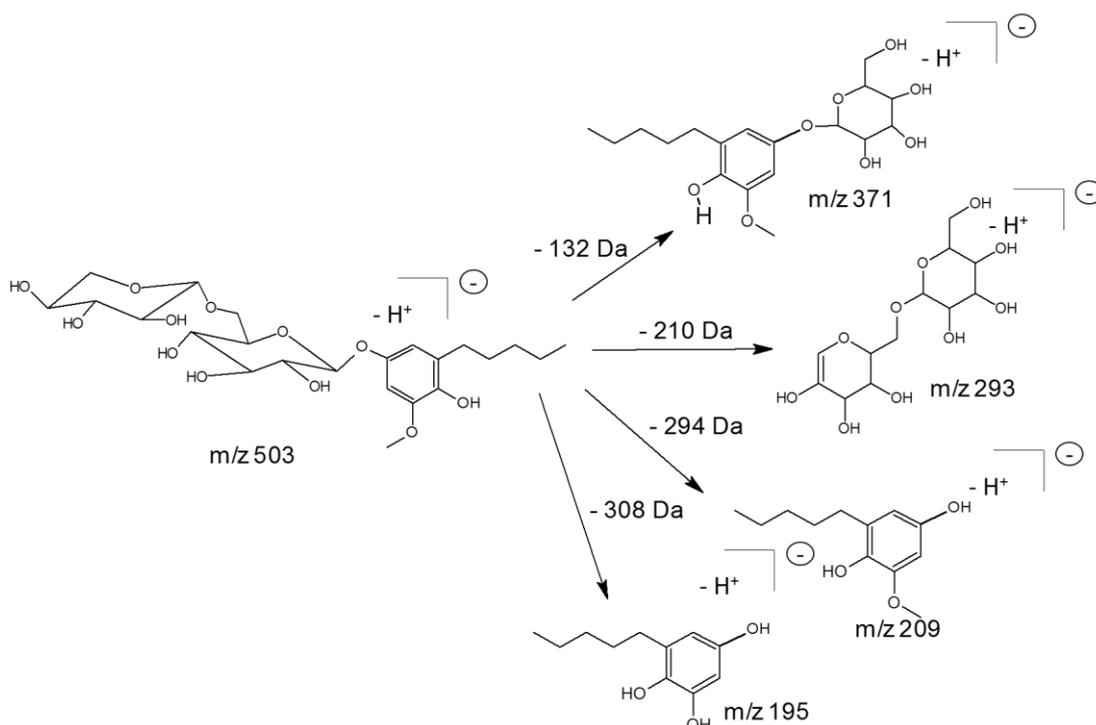


Figura 42 Estruturas dos fragmentos observados para íon de  $m/z$  503.

#### 5.5.8. Determinação estrutural da substância **8**.

A substância **8** ( $m/z$  655) teve seu padrão de fragmentação de baixa resolução comparado com o padrão obtido no massas de alta resolução. Uma vez que o espectro observado em ambas os espectrômetros foram semelhantes pode-se aferir que a massa exata da substância **8** é  $m/z$  655,2272, e que em conjunto com os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  correspondeu a fórmula molecular de  $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_{16}$  (Erro = 13,7 ppm).

O espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura S 105, pág. 145) da substância **8** apresentou um perfil semelhante ao da **7**, uma vez que, o mesmo apresentou seis sinais na região dos aromáticos oxigenado e não oxigenado, sendo estes os sinais referentes ao esqueleto do resorcinol, com sinais em  $\delta$  101,1 (C-2),  $\delta$  111,6 (C-6),  $\delta$  130,5 (C-5),  $\delta$  140,9 (C-4),  $\delta$  148,9 (C-3) e  $\delta$  151,7 (C-1), cinco sinais referentes a cadeia lateral ligada ao resorcinol,  $\delta$  14,43 (C-5'),  $\delta$  23,65 (C-4'),  $\delta$  32,82 (C-3'),  $\delta$  30,68 (C-2'), 31,05 (C-1'), bem como os sinais  $\delta$  103,5 (C-1''),  $\delta$  75,3 (C-2''),  $\delta$  75,7 (C-3''),  $\delta$  72,3 (C-4''),  $\delta$  75,2 (C-5''),  $\delta$  69,2 (C-6'') referentes a glucose e os sinais  $\delta$  104,8 (C-1'''),  $\delta$  72,3 (C-2'''),  $\delta$  74,2 (C-3'''),  $\delta$  69,4 (C-4'''),  $\delta$  66,7 (C-5''') referentes a xilose. Através do HSQC e do COSY (Figura S 106 – 115, pág. 145 – 148) pode-se atribuir os hidrogênios referente a cada carbono do alquilresorcinol e de ambos os glicosídeos.

A posição do grupo alquil foi atribuída com base na correlação do H-1' com as posições C-4, C-5 e C-6 do resorcinol, já a posição da glucose e da xilose foi atribuída com base no hidrogênio anomérico, sendo que o anomérico da glucose H-1'' ( $\delta$  4,87) correlacionado com a posição C-1 do resorcinol, e o anomérico da ramnose H-1''' ( $\delta$  4,15,  $d$ , 6,7 Hz) correlacionando com a posição C-6'' da glucose. No HMBC (Figura S 116 – 121, pág. 148 -150) também se observou a correlação do H-4'' ( $\delta$  5,05,  $m$ ) com o carbono carboxílico em  $\delta$  167,5, que faz parte da estrutura do ácido gálico, estrutura esta que foi comprovada pela presença H-2'''' (7,09,  $s$ ) e H-6'''' (7,09,  $s$ ) correlacionando com as posições C-1'''' (121,1), C-2'''' (110,4), C-3'''' (146,5), C-4'''' (140,2), C-5'''' (146,5), C-6'''' (110,4) e com a própria carboxila em  $\delta$  167,5. Portanto, definiu-se que a estrutura do ácido gálico se encontra ligado na posição C-4'' da glucose, determinando-se

a estrutura da substância **8** (Tabela 9) como sendo o 4-hidroxi-3-O-metil-5-pentilresorcinol-1-O-[ $\alpha$ -xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -(4''-galoil)-glucopiranosídeo (Figura 43). A substância **8** ainda não apresenta relatos na literatura.

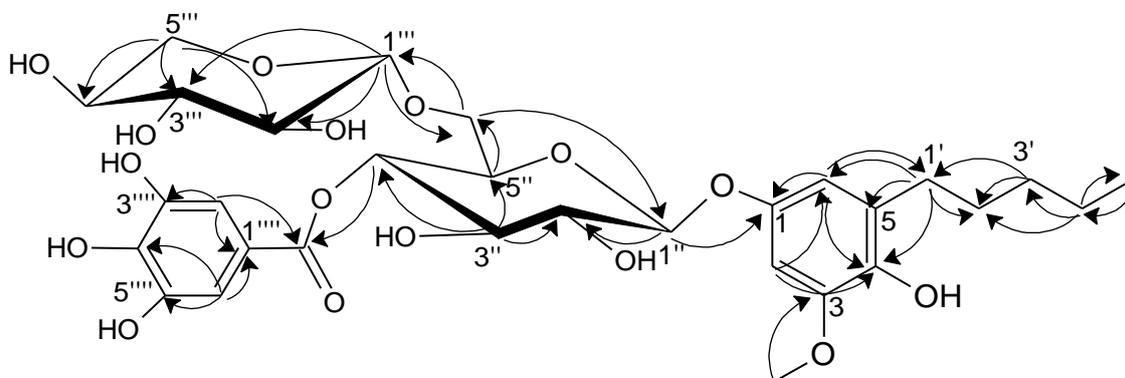


Figura 43. Principais correlações observadas no HMBC para substância **8**.

Tabela 9 Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da substância **8** (11,7 T, MeOD).

Posição	substância <b>8</b>		
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (mult., $J$ em Hz)	HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
<b>1</b>	151,7		H-2, H-6, H-1''
<b>2</b>	101,1	6,66 ( <i>d</i> , 2,6)	H-6
<b>3</b>	148,9		H-2, O-CH <sub>3</sub>
<b>4</b>	140,9		H-2, H-6, H-1'
<b>5</b>	130,5		H-1'
<b>6</b>	111,6	6,50 ( <i>d</i> , 2,6)	H-2, H-1''
<b>1'</b>	31,0	2,57 ( <i>m</i> )	H-6, H-2'
<b>2'</b>	30,6	1,57 ( <i>m</i> )	H-1'
<b>3'</b>	32,8	1,32 ( <i>m</i> )	H-1', H-2' H-4', H-5'
<b>4'</b>	23,6	1,33 ( <i>m</i> )	H-2', H-3', H-5'
<b>5'</b>	14,4	0,90 ( <i>t</i> , 6,9)	H-4'
<b>O-CH<sub>3</sub></b>	56,8	3,86 ( <i>s</i> )	
<b>1''</b>	103,5	4,87 ( <i>d</i> , 7,6)	H-2'', H-5''
<b>2''</b>	75,3	3,53 ( <i>m</i> )	H-1'', H-3'', H-4''
<b>3''</b>	75,7	3,76 ( <i>m</i> )	H-2'', H-5''

4''	72,3	5,05 (m)	H-3'', H-5''
5''	75,2	3,93 (m)	H-1'', H-3''
6''	69,2	3,65 Há-6'' (m) 3,87 Hb-6'' (m)	H-5'', H-1'''
1'''	104,8	4,15 (d, 6,7)	Ha-6'', Hb-6'', H-3'''
2'''	72,3	3,54 (m)	H-1''', Hb-5'''
3'''	74,2	3,44 (dd, 3,6, 8,7)	H-2''', Hb-5'''
4'''	69,4	3,73 (m)	Ha-5'''
5'''	66,7	3,37 Ha-5''' (m) 3,77 Hb-5''' (m)	H-1'''
1''''	121,1		H-2''''', H-6''''
2''''	110,4	7,09 (s)	H-6''''
3''''	146,5		H-2''''
4''''	140,2		H-2''''', H-6''''
5''''	146,5		H-6''''
6''''	110,4	7,09 (s)	H-2''''
C=O	167,7		H-4'', H-2''''', H-6''''

No espectro de EM da substância **8** (Figura 44), se observa o íon  $m/z$  655 como sendo o majoritário, a fragmentação desse íon gerou dois íons o íon de  $m/z$  445 e o  $m/z$  293. A fragmentação do íon  $m/z$  445 gerou os fragmentos  $m/z$  342,  $m/z$  283,  $m/z$  293 e  $m/z$  169 (Figura 45). Com base na estrutura da substância **8** pode-se propor as estruturas de seus fragmentos (Figura 46 e Figura 47).

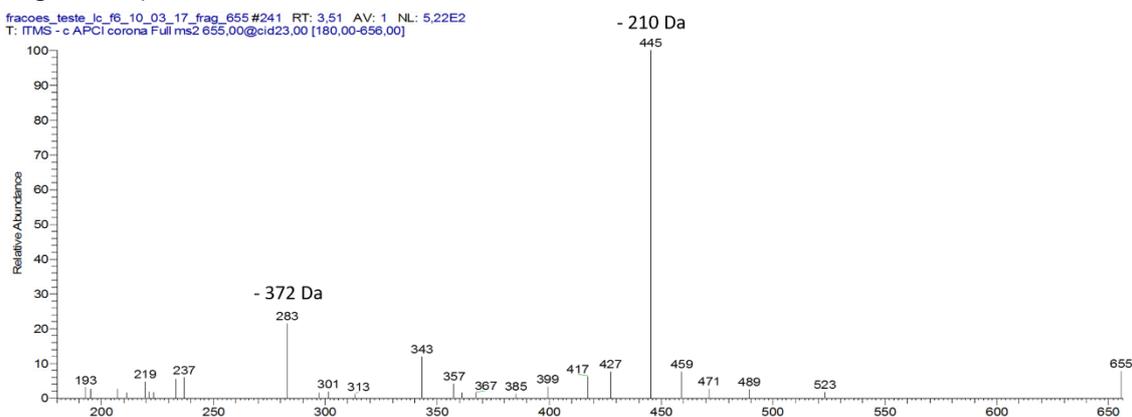


Figura 44 ESI(-)-MS/MS do íon de  $m/z$  655 referente a substância **8**, CID = 23 eV.

fracoes\_teste\_k\_16\_10\_03\_17\_frag\_655 #349 RT: 5,20 AV: 1 NL: 1,06E3  
 T: ITMS - c APCI corona Full ms3 655,00@cid23,00 445,00@cid20,00 [120,00-447,00]

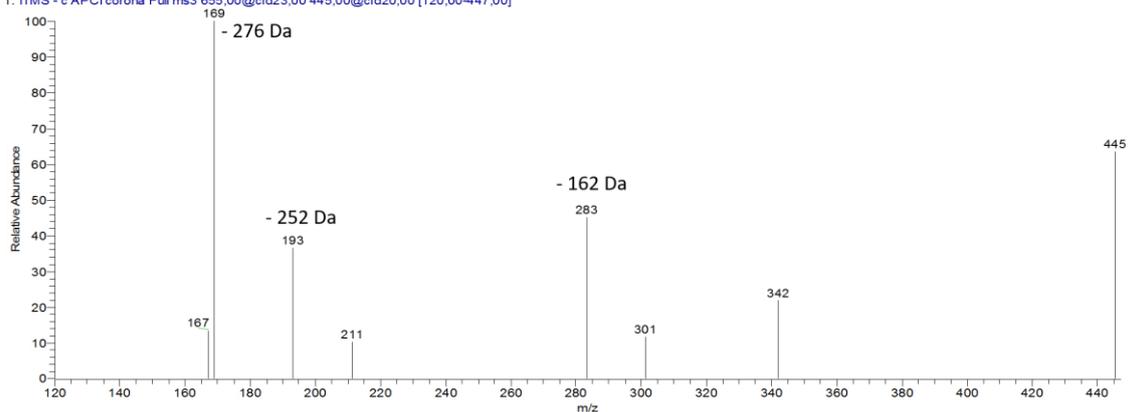


Figura 45 ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 445, CID = 20 eV.

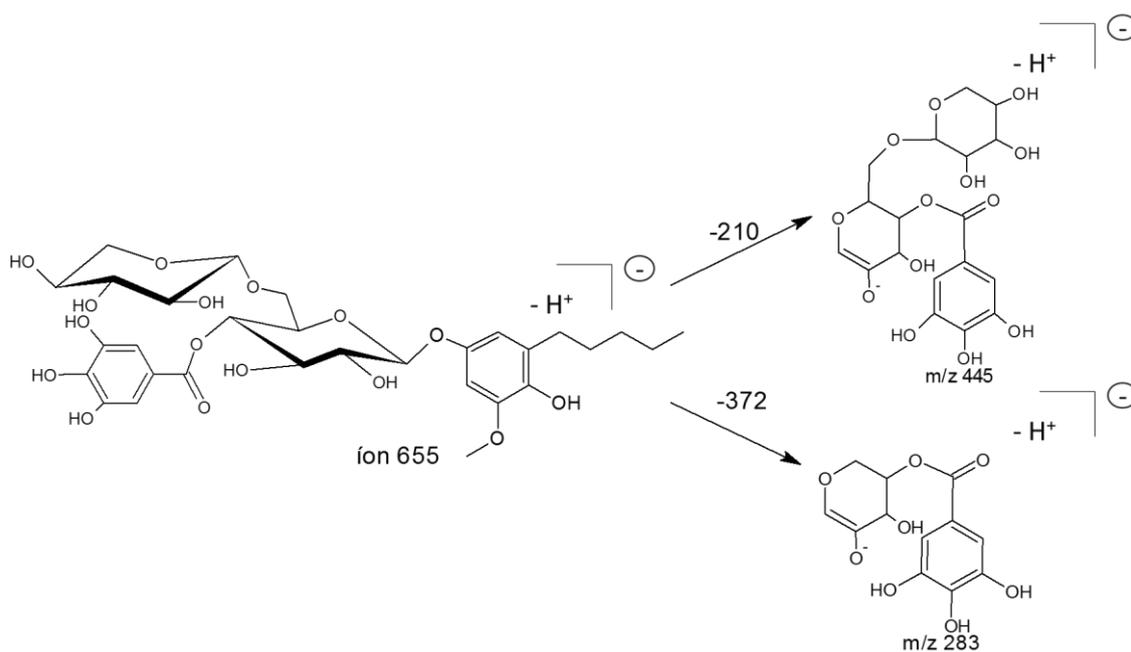


Figura 46 Estruturas dos fragmentos observados no ESI(-)-MS/MS para íon de m/z 655.

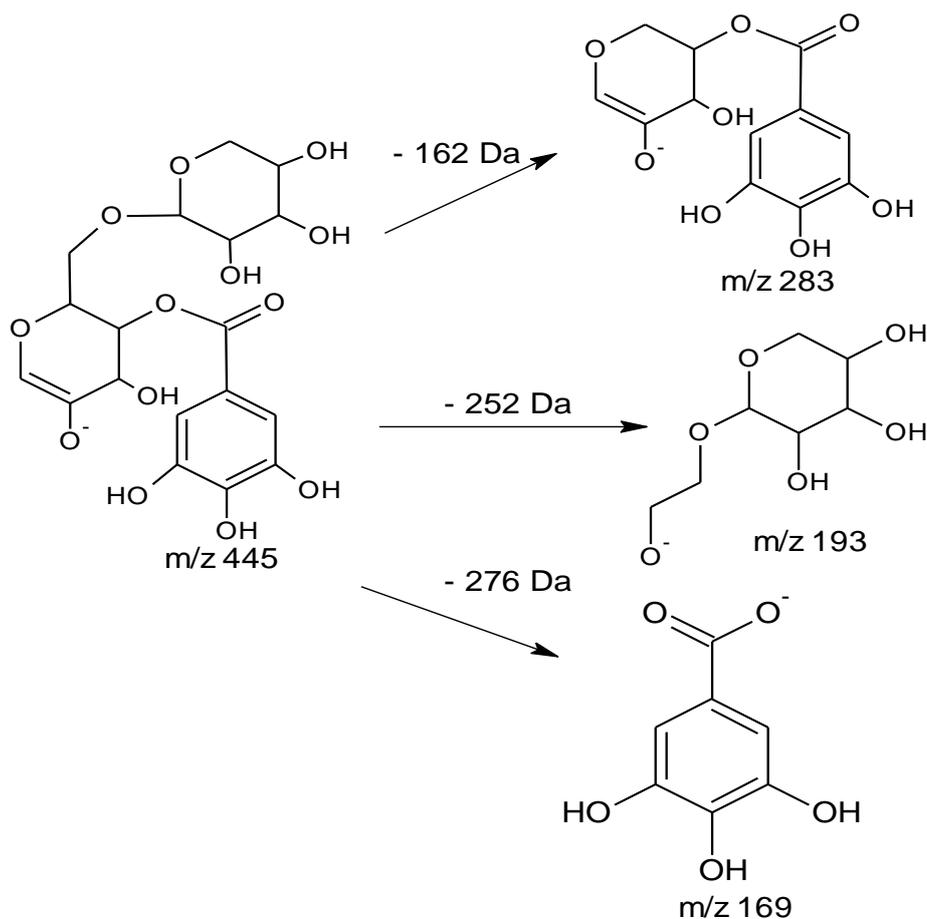


Figura 47 Estruturas dos fragmentos observados no ESI(-)-MS/MS para íon de  $m/z$  445.

### 5.6. Análise dos potenciais antioxidantes dos extratos e substâncias isoladas de *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae*.

Os valores dos potenciais antioxidantes (Tabela 10) juntamente com a análise dos gráficos boxplots dos mesmos (Figura 48, Figura 49) revelou que os extratos etanólicos das folhas da *Eugenia adenocalyx* das três coletas apresentaram os melhores resultados frente ao método de capacidade sequestrante do radical livre DPPH $\cdot$  e do cátion radical ABTS $^{+\cdot}$ .

Tabela 10 Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e  $mEqT$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para os extratos.

Amostras	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	$mEqT$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
AC3-1	$625,10 \pm 3,82$	$1.56,9 \pm 22,2$
AC3-2	$629,70 \pm 6,56$	$252,5 \pm 54,0$
AC3-3	$352,93 \pm 0,40$	$191,3 \pm 0,0$
AC4-1	$613,63 \pm 17,26$	$212,4 \pm 10,2$

<b>AC4-2</b>	619,03 ± 15,58	209,1 ± 19,0
<b>AF4-3</b>	352,80 ± 1,87	1.095,8 ± 21,7
<b>EC3-1</b>	371,53 ± 10,37	228,0 ± 10,0
<b>EC3-2</b>	371,70 ± 7,78	282,4 ± 11,7
<b>EC4-1</b>	214,37 ± 6,16	401,3 ± 10,0
<b>EC4-2</b>	215,43 ± 5,90	228,0 ± 52,4
<b>EC4-3</b>	202,83 ± 0,67	1.914,7 ± 14,5
<b>EF3-1</b>	367,03 ± 7,72	752,5 ± 6,9
<b>EF3-2</b>	363,83 ± 11,27	812,4 ± 17,1
<b>EF3-3</b>	196,03 ± 1,60	1083,6 ± 21,4
<b>EF4-1</b>	111,87 ± 4,06	952,4 ± 8,4
<b>EF4-2</b>	112,03 ± 4,23	1.128,0 ± 12,0
<b>EF4-3</b>	90,47 ± 2,04	708,0 ± 23,3

A elevada atividade antioxidante desses extratos está relacionada com as distinções encontradas nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , uma vez que a partir dos dados de RMN do extrato EF4-1 foi possível identificar quatro substâncias do grupo dos alquilresorcinois. Os valores de  $\text{CI}_{50}$  e  $\text{mEqT}$  obtidos para os alquilresorcinois (Tabela 11) isolados estão de acordo com os valores obtidos para os extratos etanólicos das folhas das três coletas da *E. adenocalyx*. A elevada atividade das substâncias **5** e **8** pode ser atribuída a presença uma unidade de ácido gálico em suas estruturas. Substâncias do grupo dos alquilresorcinois e o ácido gálico são descritos na literatura com média a elevada atividade antioxidante (Soares *et al.*, 2007; Landberg *et al.*, 2014).

Tabela 11 Valores de  $\text{CI}_{50}$  ( $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) e  $\text{mEqT}$  ( $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) para as substâncias isoladas.

<b>Amostras</b>	<b><math>\text{CI}_{50}</math> (<math>\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}</math>) ± DP</b>	<b><math>\text{mEqT}</math> (<math>\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}</math>) ± DP</b>
<b>Substância 4</b>	318,05 ± 1,02	722,3 ± 3,8
<b>Substância 5</b>	59,34 ± 0,57	1.879,0 ± 3,3
<b>Substância 7</b>	114,25 ± 0,56	552,3 ± 3,8
<b>Substância 8</b>	59,33 ± 1,16	1.802,3 ± 1,9

Os extratos etanólicos das folhas da *Eugenia lisboae* apresentam uma baixa atividade antioxidante. Contudo, a magnitude dessa atividade deve-se a presença de substâncias do tipo flavonoídicas (Rio *et al.*, 2010), dentre estas,

pode-se destacar as substâncias **2** e **3** as quais foram identificadas por RMN e EM.

A análise da atividade antioxidante também evidenciou que há uma melhor resposta para os extratos obtidos da terceira coleta, sendo que o extrato EC4-3 apresentou a melhor resposta frente o cátion radical ABTS<sup>+</sup>. Portanto, conclui-se que a época da terceira coleta favoreceu a produção alquilresorcinois. Esse período também influenciou nos valores de IC<sub>50</sub>, cujo os extratos de folhas da *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae* proveniente da terceira coleta também apresenta um potencial antioxidante mais elevado que os demais.

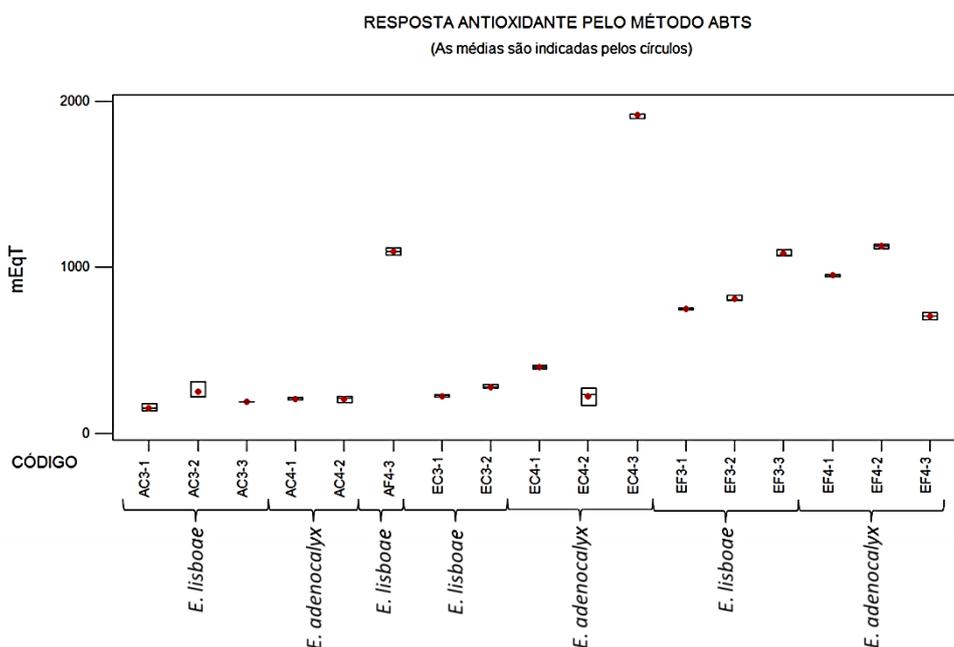


Figura 48 Boxplot da Análise de Variância dos valores de CI<sub>50</sub> obtidos a partir dos extratos etanólicos e de acetato de etila de *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae*.

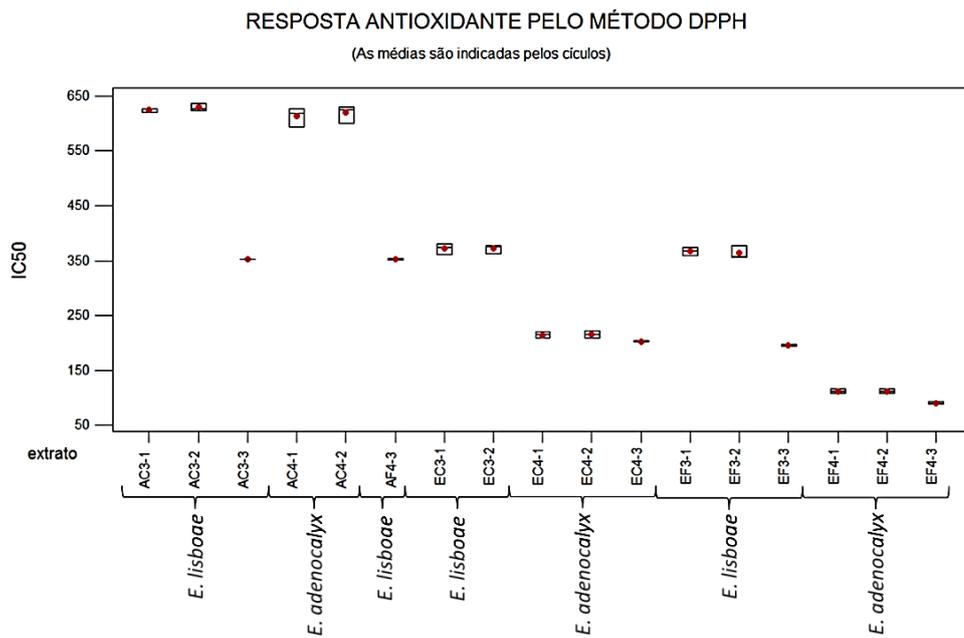


Figura 49 Boxplot da Análise de Variância dos valores de mTeq obtidos a partir dos extratos etanólicos e de acetato de etila de *Eugenia adenocalyx* e *E. lisboae*.

## 6. Conclusão

O estudo do perfil químico dos extratos das folhas e dos caules de *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae* empregando-se técnicas espectrométricas auxiliadas por ferramentas quimiométricas mostrou-se eficiente na diferenciação da composição química entre tais espécies. A metodologia empregada direcionou o isolamento das substâncias responsáveis pela diferença química observada nos espectros de RMN e de Massas.

A utilização de técnicas cromatográficas e espectrométricas hifenadas ou não, possibilitou o isolamento e identificação de três substâncias a partir da *Eugenia lisboae*: ácido rotundióico (1), dihidro-kaempferol (2), dihidro-kampferol-3-O-[ $\beta$ -xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -raminopiranosídeo (3) e cinco substâncias a partir da *Eugenia adenocalyx*: 3-O-metil-5-(1'-hidroxipentil)-resorcinol-4-O- $\beta$ -glucopiranosídeo (4), 3-O-metil-5-(1'-hidroxipentil)-resorcinol-4-O- $\beta$ -(6''-galoil)-glucopiranosídeo (5), 3-O-metil-5-(1'-hidroxipentil)-resorcinol-4-O- $\beta$ -(4'',6''-digaloil)-glucopiranosídeo (6), 4-hidroxi-3-O-metil-5-pentilresorcinol-1-O-[ $\alpha$ -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -glucopiranosídeo (7) e 4-hidroxi-3-O-metil-5-pentilresorcinol-1-O-[ $\alpha$ -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -(4''-galoil)-glucopiranosídeo (8). A identificação dessas substâncias possibilitou observar diferenciação química entre essas espécies, corroborando com as diferenças morfológicas observadas para *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae*.

A análise estatística dos resultados da capacidade sequestrante frente ao radical livre DPPH<sup>\*</sup> e o cátion radical ABTS<sup>\*\*</sup> evidenciou que os extratos etanólicos da *Eugenia adenocalyx* apresentaram a melhor atividade antioxidante. A elevada atividade antioxidante desses extratos foi atribuída a presença dos alquilresorcinois em sua composição, destacando-se as estruturas esterificadas com ácido gálico 5 e 8, cujos valores de  $Cl_{50} = 59,37 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $mEqT = 1.879,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e  $Cl_{50} = 59,33 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $mEqT = 1.802,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, evidenciam as melhores respostas.

Portanto, este estudo mostra-se relevante para o conhecimento científico acerca do gênero *Eugenia*, pois descreve o isolamento e a determinação estrutural de oito substâncias, das quais cinco substâncias são inéditas (3, 4, 5,

**6, 8**), além da substância **1**, descrita pela primeira vez em Myrtaceae. Assim sendo, esse estudo contribui com outros estudos que visa diferenciar espécies botânicas semelhantes a partir de sua composição química. É importante ressaltar que as espécies em destaque ainda não apresentam estudos químicos envolvendo seus constituintes fixos. Finalmente, este trabalho contribui com o conhecimento da química de produtos naturais de matrizes vegetais da Amazônia.

## 7. Referências

AZEVEDO, S. G. **Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas de Eugenia spp. (Myrtaceae) ocorrentes na Amazônia de terra firme**. 2014. 121 p Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

BELTON, P. S. et al. Application of chemometrics to the <sup>1</sup>H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. **Food Chemistry**, v. 61, p. 207-213, 1998.

BOKESCH, H. R. et al. Lambertianoside, a novel phenylglycoside from *Eugenia lambertiana*. **Natural Products Letters**, v. 11, p. 211-216, 1997.

BORGES, L. L. et al. **Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais**: Enciclopédia Biosfera. 7: 20 p. 2011.

BREMER, B. et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009. Disponível em: < <http://reflora.jbrj.gov.br/downloads/APG1.pdf> >.

BRETTON, R. C.; REYNOLDS, W. F. Using NMR to identify and characterize natural products. **Natural Products Reports**, v. 30, p. 501–524, 2013.

CARIM, M. D. J. V.; JARDIM, M. A. G.; MEDEIROS, T. D. S. Floristic composition and structure of a floodplain forest in the municipality of Mazagão, State of Amapá, Brazil. **Scientia Forestalis**. 36: 191-201 p. 2008.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. Columbia University Press: Brittonia, 1981. 1262p.

CRUZ, A. V. D. M.; KAPLAN, M. A. C. MEDICINAL USES OF SPECIES FROM MYRTACEAE AND MELASTOMATACEAE FAMILIES IN BRAZIL. **Brazilian Journal of Forestry and Environment**, v. 1, n. 11, p. 47-52, 2004. ISSN 2179-8087. Disponível em: < <http://www.floram.org/files/v11n1/v11n1a7.pdf> >.

DAN, C. et al. A New Phenolic Glucoside Gallate from the Flower Buds of *Eugenia caryophyllate*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 8, n. 3, p. 180-182, May 2010. ISSN 1672-3651.

DAOLIO, C. et al. Classification of Commercial Catuaba Samples by NMR, HPLC and Chemometrics. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 218–228, 2008.

DEVALARAJA, S.; JAIN, S.; YADAV, H. Exotic Fruits as Therapeutic Complements for Diabetes, Obesity and Metabolic Syndrome. **Food Research International**, v. 44, p. 1856–1865, 2011.

DUDONNE, S. et al. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1768-1774, Mar 11 2009. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263974500013 >.

ESTANISLAU, A. A. et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de eucalyptus cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001. Disponível em: < [www.scielo.br/pdf/rbfar/v11n2/a05v11n2.pdf](http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v11n2/a05v11n2.pdf) >.

FAQUETI, L. G. et al. Macrocarpal-like compounds from *Eugenia umbelliflora* fruits and their antibacterial activity. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, v. 63, p. 8151–8155, 2015.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 61-68, 1997. ISSN 1806-9282.

FERREIRA, F. P. S. et al. *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 99, p. 89–96, 2014. ISSN 0731-7085.

GHAI, R.; NAGARAJAN, K.; GUPTA, N. Isolation and characterization of a novel chemical compound from *Eugenia caryophyllus* flower bud extract. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 7, p. 531-536, 2014. ISSN 0975-1491. Disponível em: < <http://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/viewFile/1755/9872> >.

GU, J.-Q. P., EUN JUNG LUYENGI, LUMONADIO HAWTHORNE, MICHAEL E.; MEHTA, R. G. F., NORMAN R. PEZZUTO, JOHN M.; KINGHORN, A. D. Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancerchemopreventive activity. **Phytochemistry**, v. 58, p. 121-127, 2001. ISSN 0031-9422.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, v. 51, n. 10, p. 2862-2866, Oct 2014. ISSN 0022-1155. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000343660800071 >.

HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, Mar 23 2005. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227736100001 >.

JUNIOR, A. R. D. C. et al. Chemical constituents and antioxidant activity of leaves and branches of *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae). **Química Nova**. v. 37, n. 3, p. 477-482, 2014.

JÚNIOR, F. C. D. M. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C no estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais. **Química Nova**. 30: 116-124 p. 2007.

KIM, H. K. et al. Metabolic Fingerprinting of Ephedra Species Using <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 105-109, 2005.

KWAK, J. H. et al. Cytotoxic Phenolic Compounds from *Chionanthus retusus* **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 12, p. 1681-1687, 2009.

LANDBERG, R. et al. An update on alkylresorcinols – Occurrence, bioavailability, bioactivity and utility as biomarkers **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 77-89, 2014.

LEGAULT, J. P., ANDRÉ. Potentiating effect of  $\beta$ -caryophyllene on anticancer activity of  $\alpha$ -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 59, n. 12, p. 1643–1647, 2007. ISSN 0022-3573. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18053325>>.

LELONO, R. A. A.; TACHIBANA, S. Biossay-guided isolation and identification of antioxidative compounds from de bark of *Eugenia polyantha*. **pakistan journal of biological sciences**, v. 16, n. 16, p. 812-818, 2013. ISSN 1028-8880.

LINDON, J. C. et al. Directly coupled HPLC-NMR and its application to drug metabolism **Drug Metabolic Review**, v. 29, n. 3, p. 705- 746 1997.

LOPES, A. C. D. S. **Estudo químico e isolamento de flavonoides *Myrcia* spp. ocorrentes em Amazônia de Terra Firme**. 2015. 125 (Dissertação (Mestrado em Química)). Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas

LORENZI, H. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006, 672p.

MAGALHAES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, Apr 14 2008. ISSN 0003-2670. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000255486900001 >.

MAGINA, M. D. A. **ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO EUGENIA**. 2008. 178 TESE (DOUTORADO). DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

MAHMOUD, II et al. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1239-1244, Dec 2001. ISSN 0031-9422. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000172949900018 >.

MAHROUS, E. A.; FARAG, M. A. Two dimensional NMR spectroscopic approaches for exploring plant metabolome: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 3–15, 2015.

MANOHARAN, K. P. et al. Triterpenoids from *Eugenia grandis*: structure elucidation by NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 279-281, Mar 2007. ISSN 0749-1581. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245048000015 >.

MCVAUGH, R. Tropical American Myrtaceae: Notes on generic concepts and descriptions of previously unrecognized species. **Fieldiana, Botany**. 29: 149–228 p. 1956.

MORAIS, L. M. F.; CONCEIÇÃO, G. M. D.; NASCIMENTO, J. D. M. Família Myrtaceae: análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. **Agrarian Academy**, v. 1, n. 1, p. 319, 2014.

MORESCO, H. H. et al. Myricitrin as the main constituent of two species of *Myrcia*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 2, p. 1-7, 2014. ISSN 2231-3354. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/260979154\\_Myricitrin\\_as\\_the\\_main\\_constituent\\_of\\_two\\_species\\_of\\_Myrcia](http://www.researchgate.net/publication/260979154_Myricitrin_as_the_main_constituent_of_two_species_of_Myrcia)>.

NAKATANI, M. et al. Triterpenes from *Zlex rotunda* fruits. **Phytochemistry**, v. 28, n. 5, p. 1479-1482,, 1989.

OMAR, R. et al.  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Hydrolyzable Tannins from *Eugenia jambolana* Seeds. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 8, p. 1505–1509, 2012. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np300417q>>.

PISHA, E. et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Nature Medicine**, v. 1, n. 10, p. 1046-1051, 10//print 1995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm1095-1046> >.

POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 246-251, 2006-06 2006. ISSN 0102-695X. Disponível em: < <Go to ISI>://SCIELO:S0102-695X2006000200019 >.

QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K. **A Importância das Técnicas Acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para Procura de Princípios Ativos** *Revista Fitos*. 2: 39-53 p. 2006.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. **Flora da Reserva Ducke** INPA-DFID, Manaus, Amazonas, 1999, 799p.

RIO, D. D.; BORGES, G.; CROZIER, A. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. 67–90, 2010.

RIQUE, A. B. R.; SOARES, E. A.; MEIRELLES, C. D. M. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. 8: 11 p. 2002.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. D. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 20, n. 3, p. 529-548, 2006. ISSN 1677-9410.

RUFINO, M. D. S. M. et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS.**+ 4 p. 2007a.

RUFINO, M. D. S. M. et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH.** 4 p. 2007b.

SAMY, M. N. et al. Bioactive compounds from the leaves of *Eugenia uniflora*. **Journal of Natural Products**, v. 7, p. 37-47, 2014. ISSN 0974 – 5211.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Proximate composition and free radical scavenging activity of edible fruits from the Argentinian Yungas **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 1357–1364, 2005.

SOARES, M. et al. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 727-732, 2007.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, Mar-Apr 2007. ISSN 0100-4042. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000244752500021 >.

SOUZA, A. M. D.; POPPI, R. J. Experimento Didático de Quimiometria para Análise Exploratória de Óleos Vegetais Comestíveis por Espectroscopia no Infravermelho Médio e Análise de Componentes Principais: Um Tutorial, Parte I. **Química Nova**. 35: 223-229 p. 2012.

SOUZA, M. et al. Vascular flora of the Upper Paraná River floodplain. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 735-745, 2009. ISSN 1678-4375. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842009000300027>>.

SOUZA, M. A. D.; SCUDELLER, V. V.; MENDONÇA, M. S. D. Two new species of *Eugenia* (Myrtaceae) from Central Amazonia, Brazil. **Phytotaxa**, v. 289, n. 2, p. 167–174, 2016.

SOUZA, M. A. D. D. **Estudos em Eugenia L. (MYRTACEAE) na amazônia central: Taxonomia com o uso de ferramentas morforanatômicas**. 2015. 207p (Doutorado). Departamento de Ciências Biológicas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **BOTÂNICA SISTEMÁTICA: Guia ilustrativo para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. Instituto Plantarum, 2008, 704p. ISBN 85-86714-29-0.

SUN, L. et al. Identification of a type III polyketide synthase involved in the biosynthesis of spirolaxine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 7103–7113, 2016.

THAMMANA, M. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 2, p. 22-28, 2016.

TRESINA, P. S.; KALA, S. M. J.; MOHAN, V. R. HPTLC finger print analysis of phytocompounds and in vitro antioxidant activity of *Eugenia singampattiana* Bedd. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 12, p. 112-124, 2012. ISSN 2231-3354. Disponível em: < [http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/736\\_pdf.pdf](http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/736_pdf.pdf) >.

VILAR, J. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 141-147, 2008.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do Metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Revista Biotecnologia, Ciência e desenvolvimento**, 2006.

WUBSHET, S. G. et al. Magnetic ligand fishing as a targeting tool for HPLC-HRMS-SPE-NMR: a - glucosidade inhibitory ligands and alkylresorcinol glycosides from *Eugenia catharinae* **Jornal of Natural Products**, v. 78, p. 2657-2665, 2015.

YAN, K.-J. et al. Qualitative and quantitative analyses of Compound Danshen extract based on 1H NMR method and its application for quality control **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 131, p. 183–187, 2016.

YI, J. et al. Ameliorative effect of betulinic acid on oxidative damage and apoptosis in the splenocytes of dexamethasone treated mice. **International Immunopharmacology**, v. 27, n. 1, p. 85–94, 2015. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576915002143> >.

ZHU, Y. et al. 5-Alk(en)ylresorcinols as the major active components in wheat bran inhibit human colon cancer cell growth. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 3973–3982, 2011.

## 8. Anexo

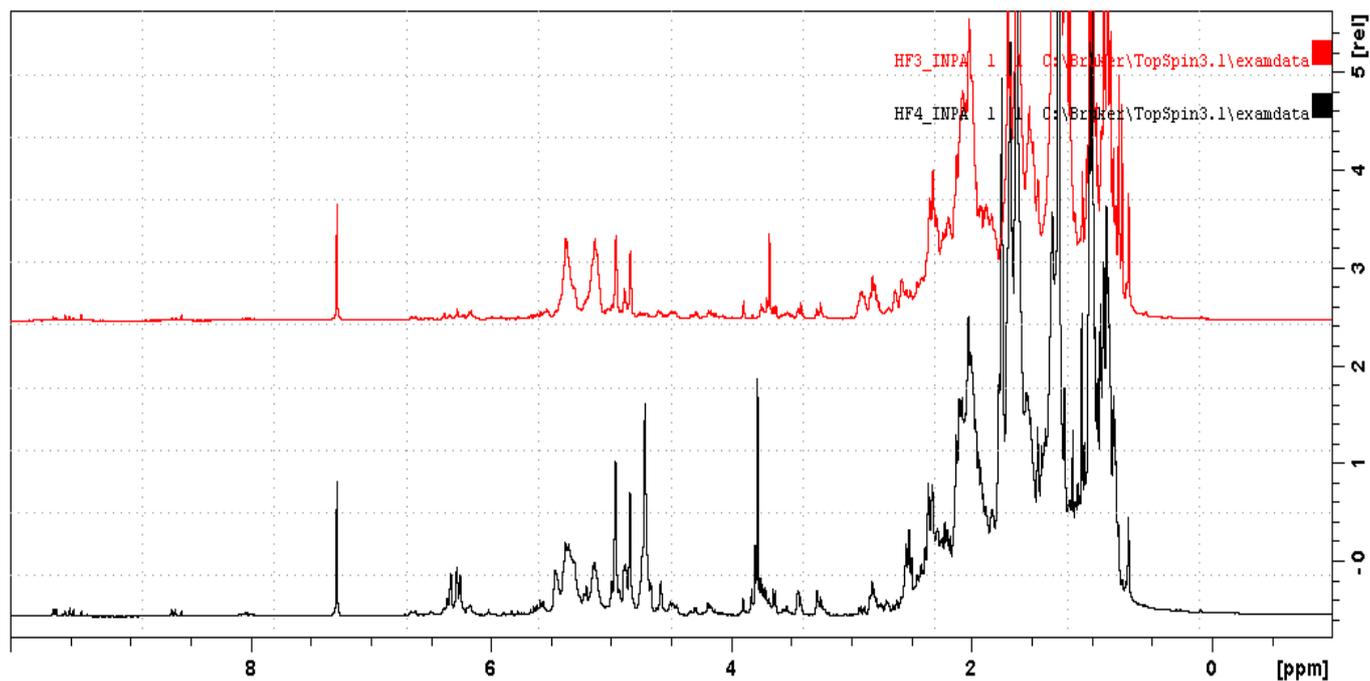


Figura S 1 Espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos extratos HF3-1 e HF4-1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

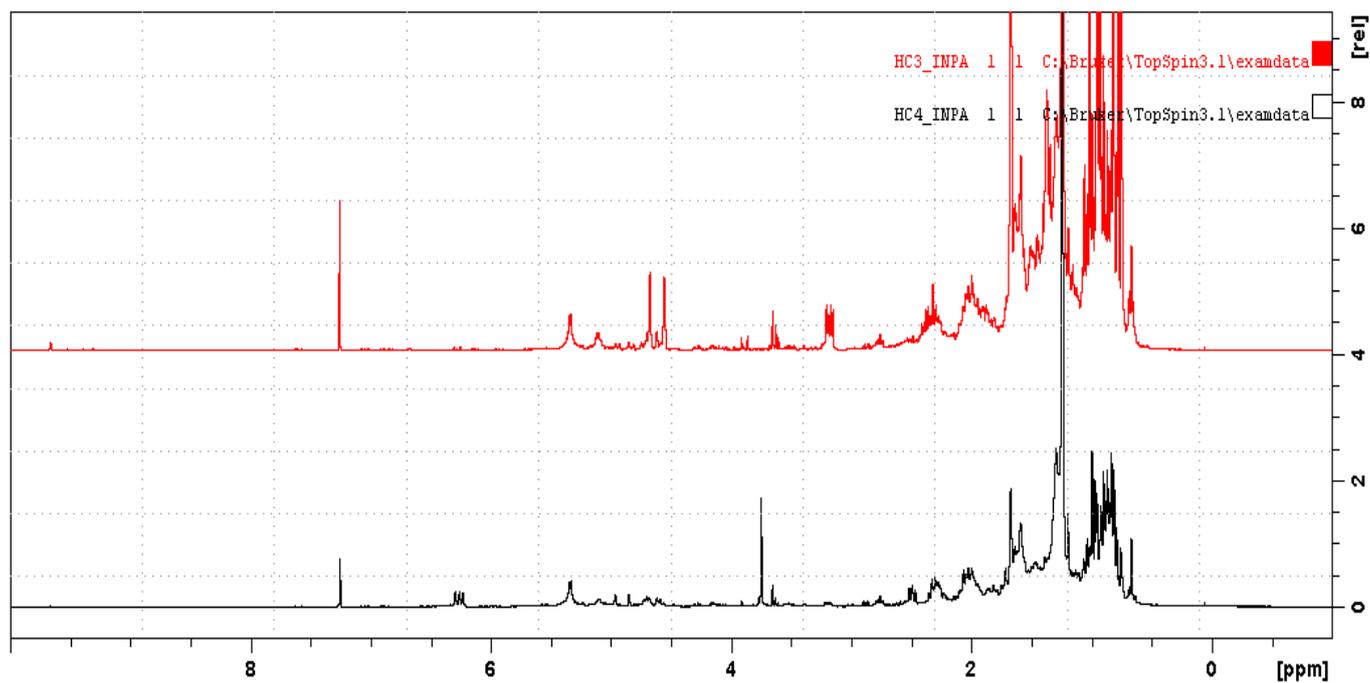


Figura S 2 Espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos extratos HC3-1 e HC4-1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

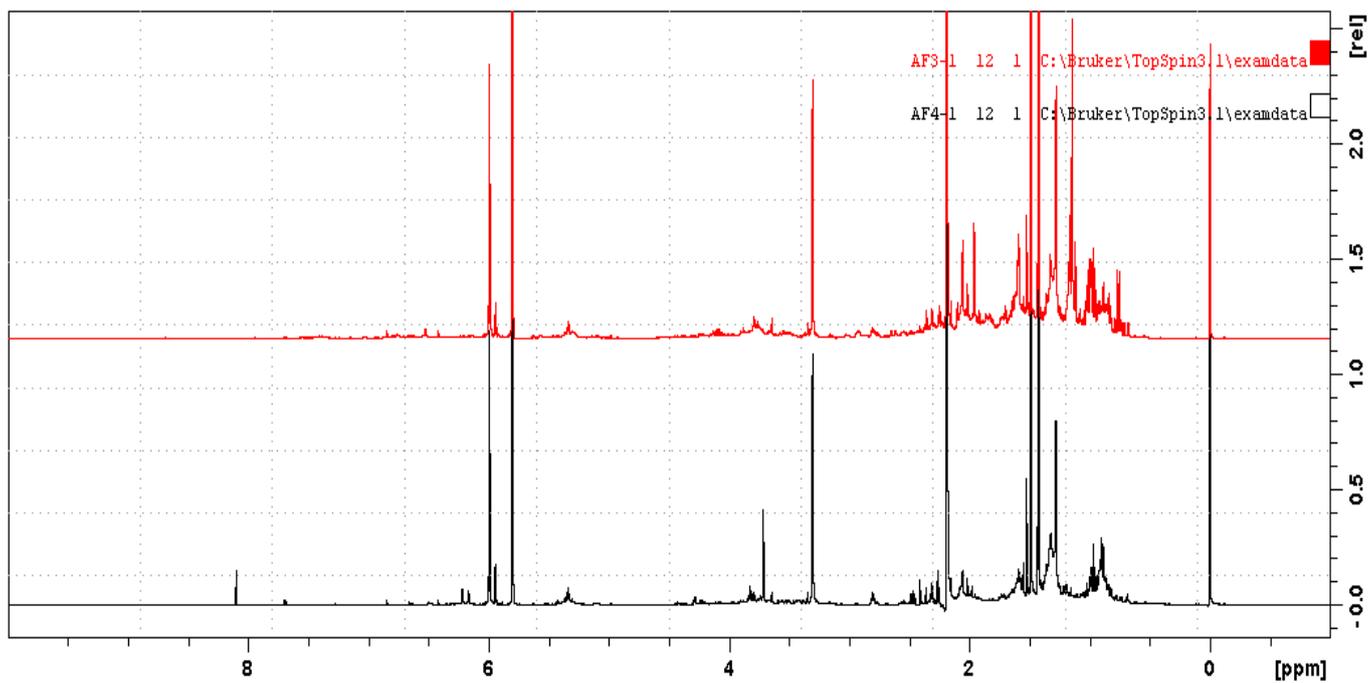


Figura S 3 Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos AF3-1 e AF4-1 (11,7 T,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, DMFu).

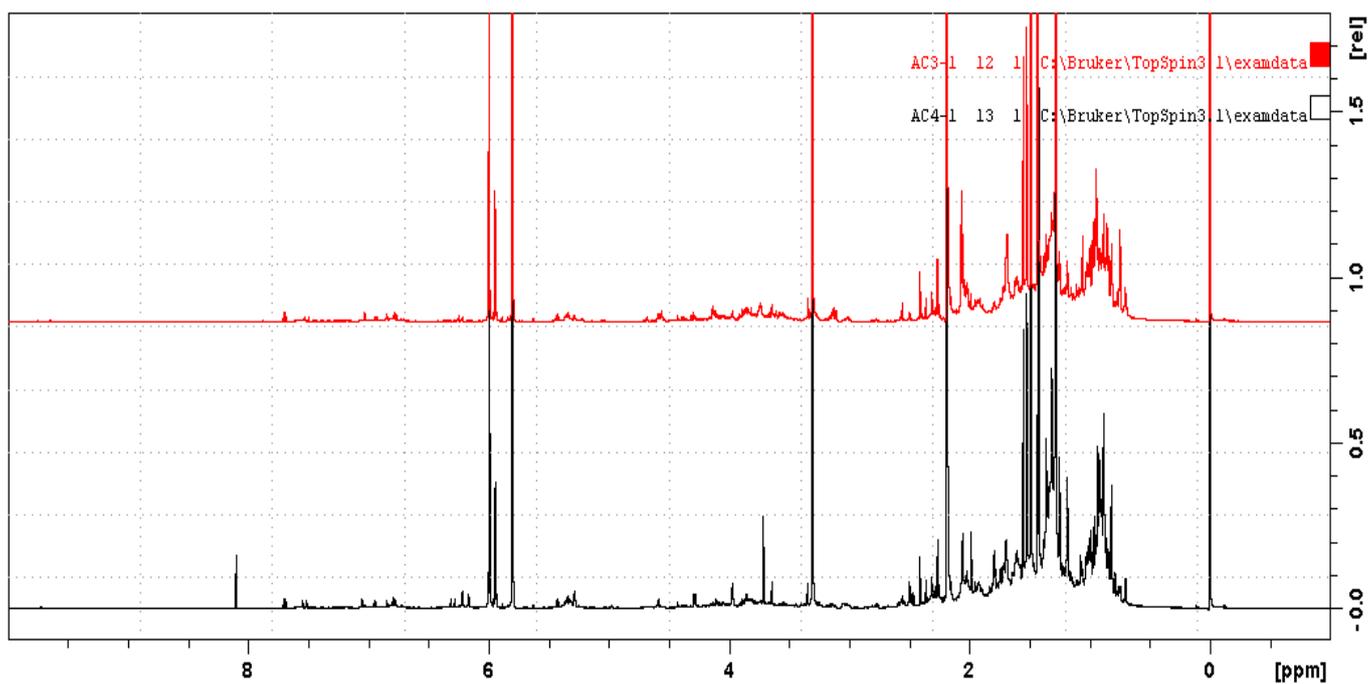


Figura S 4 Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos AC3-1 e AC4-1 (11,7 T,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, DMFu).

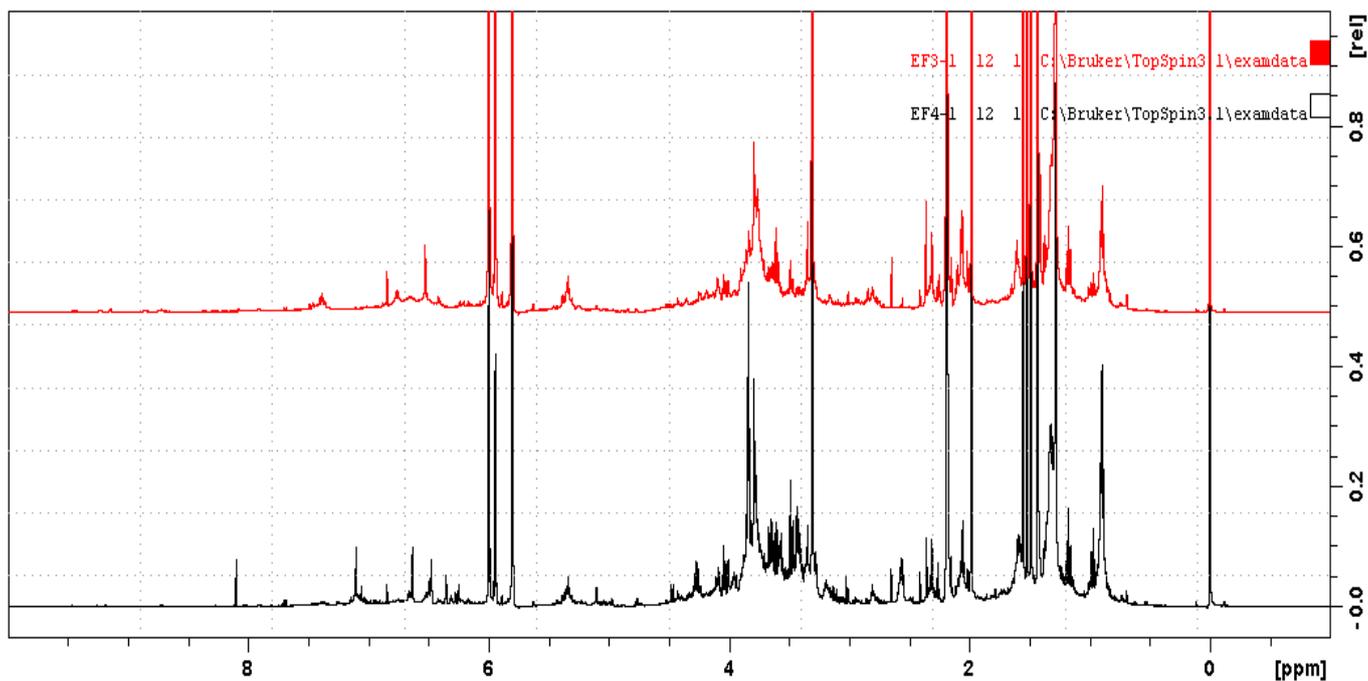


Figura S 5 Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos EF3-1 e EF4-1 (11,7 T,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, DMFu).

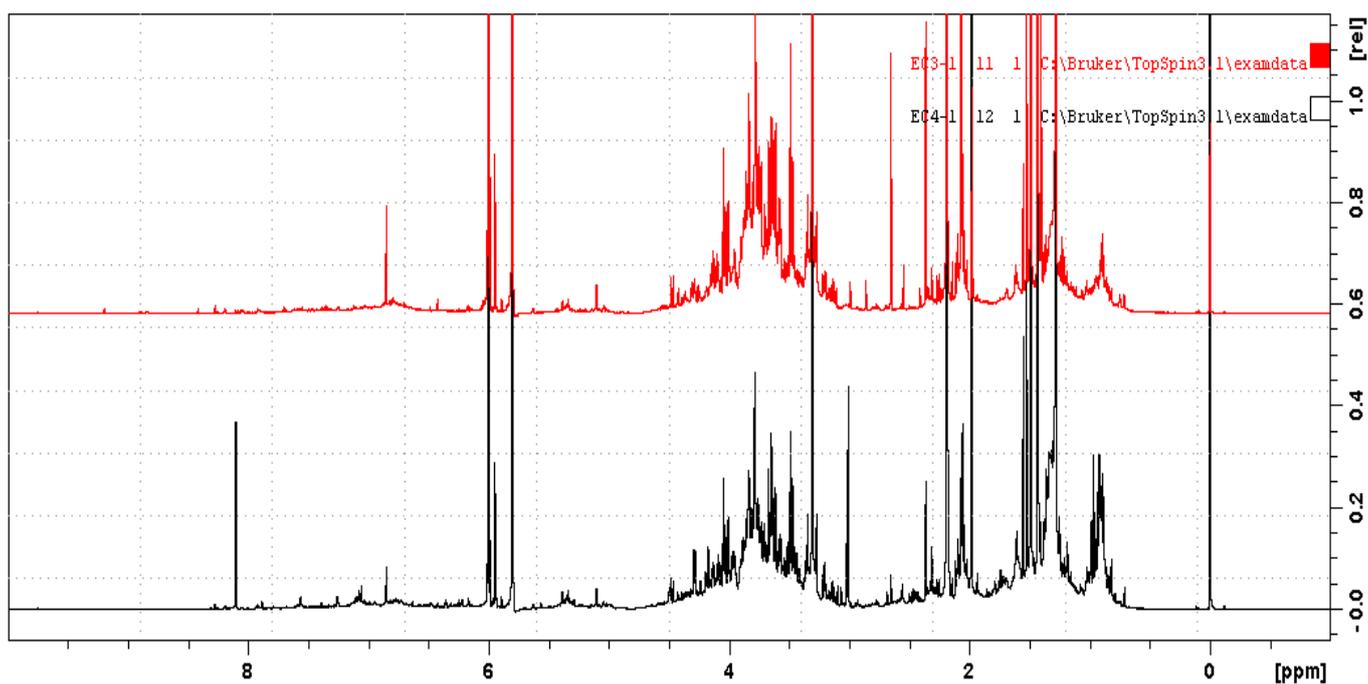


Figura S 6 Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos EC3-1 e EC4-1 (11,7 T,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, DMFu).

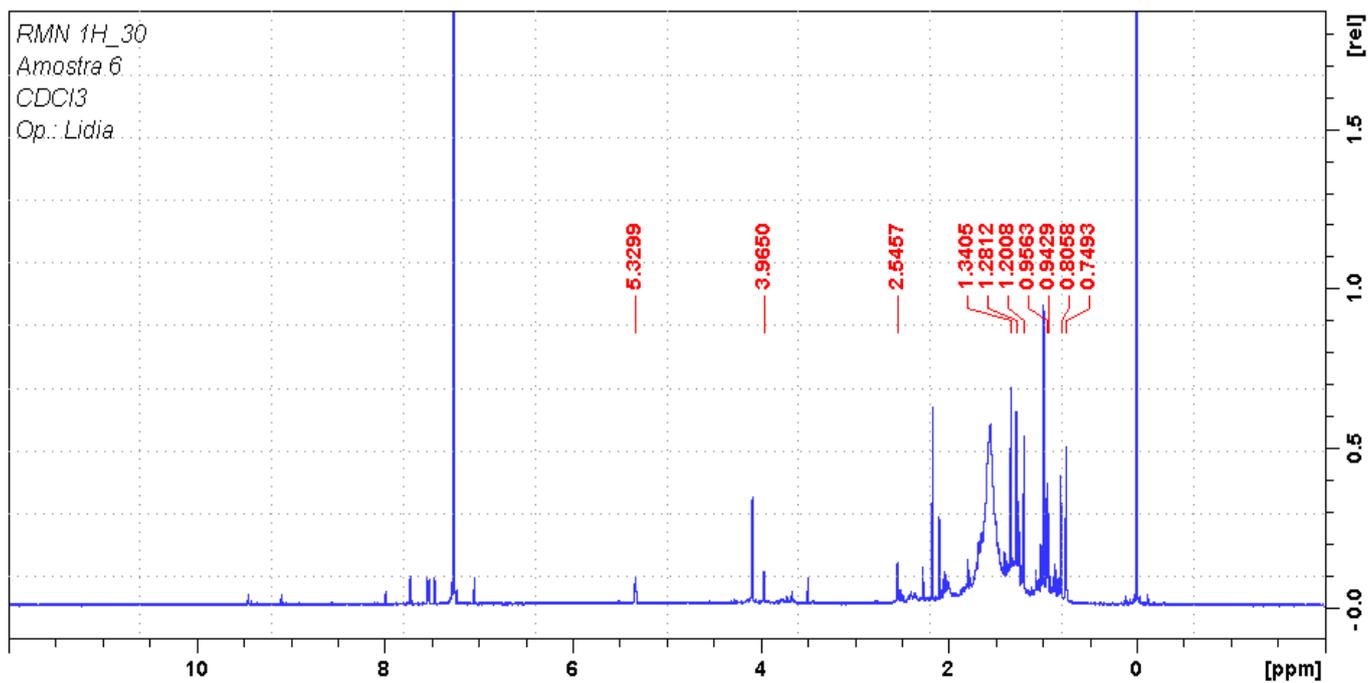


Figura S 7 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 1 (11,7 T,  $\text{CDCl}_3$ , TMS).

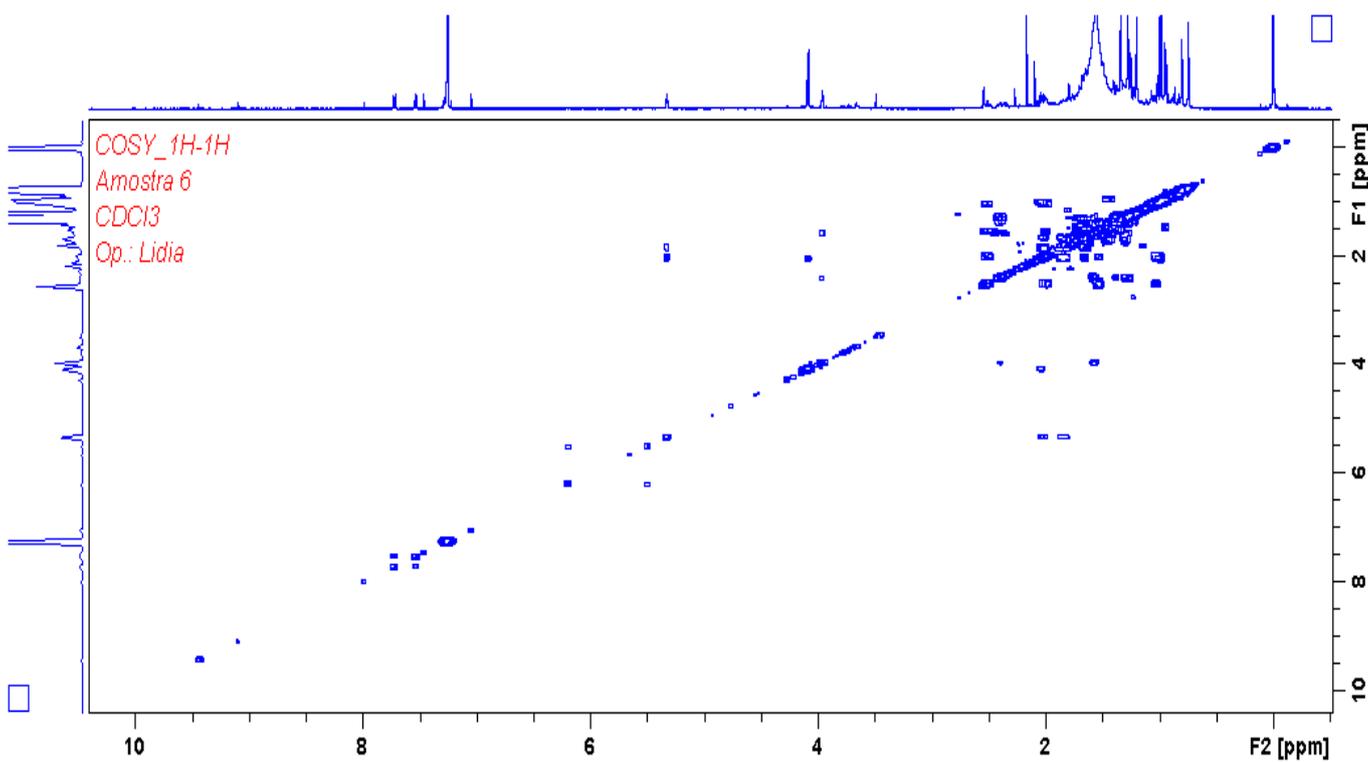


Figura S 8 Espectro de COSY da substância 1 (11,7 T,  $\text{CDCl}_3$ , TMS).

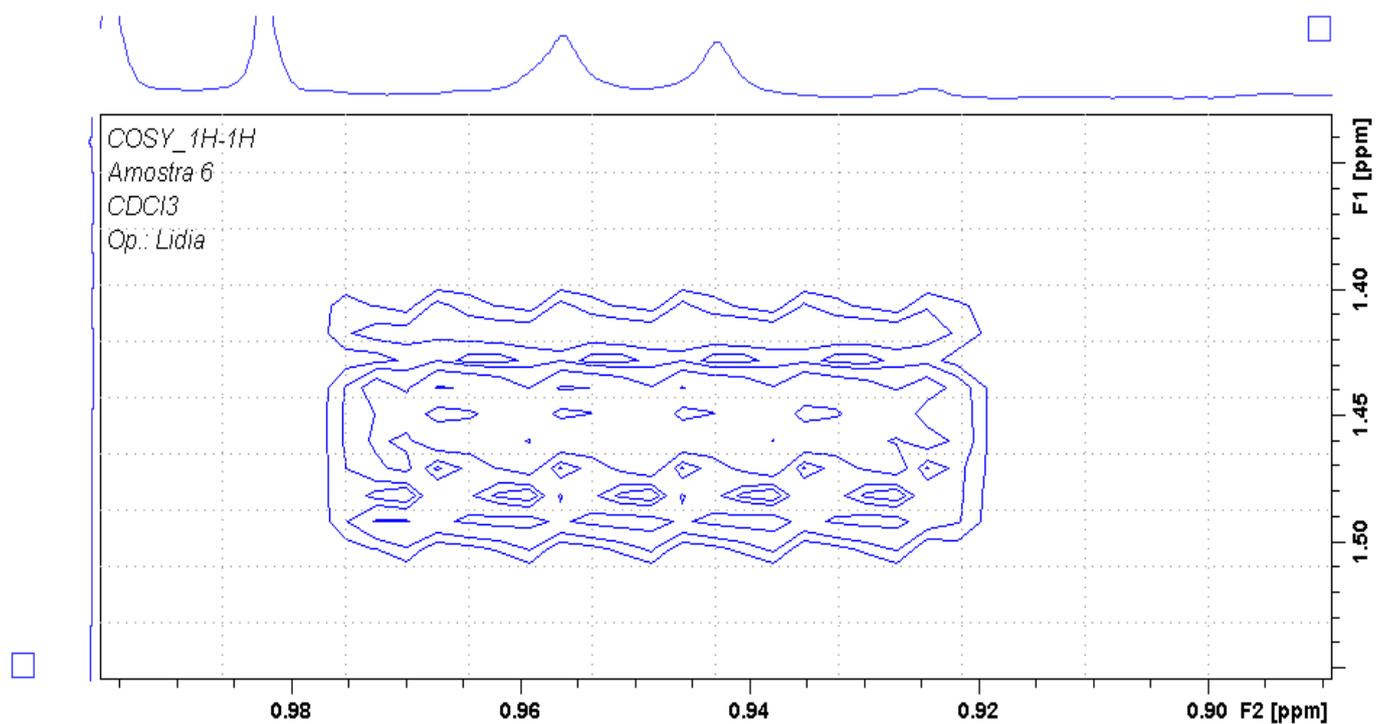


Figura S 9 Ampliação do espectro de COSY da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

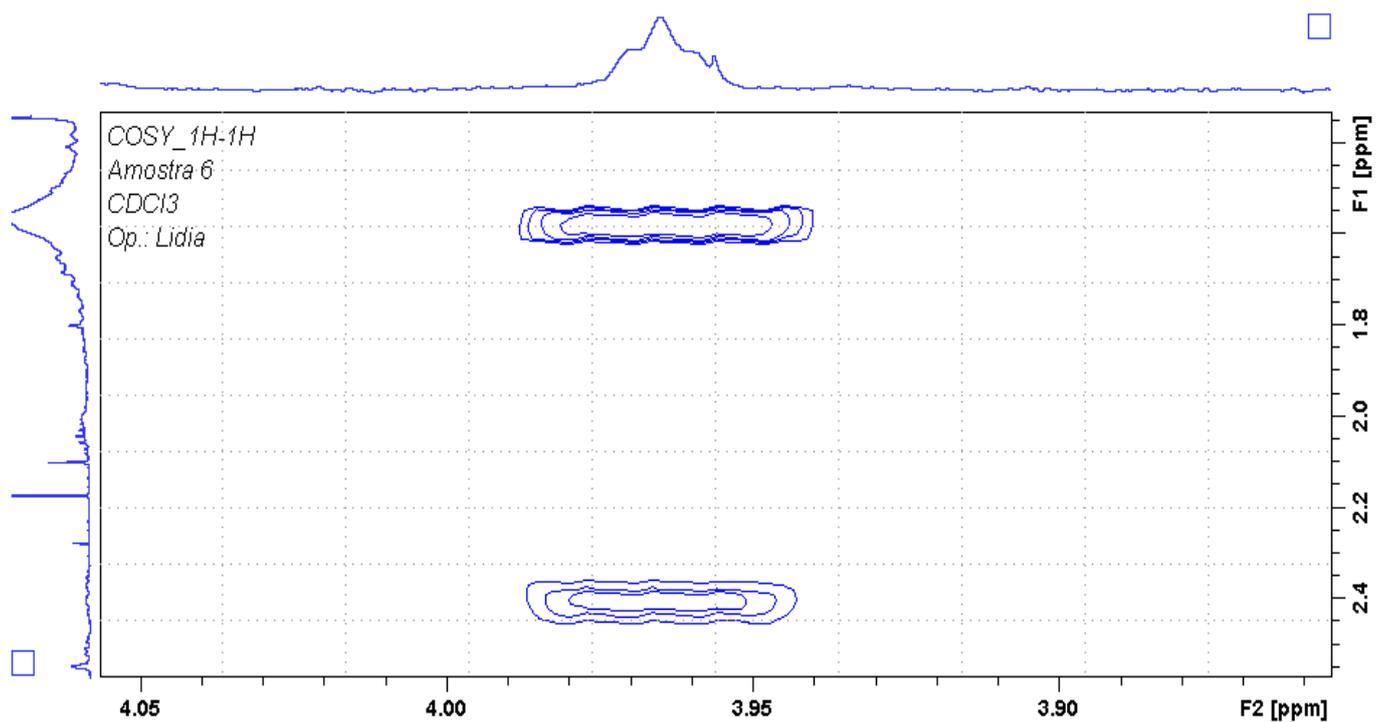


Figura S 10 Ampliação do espectro de COSY da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

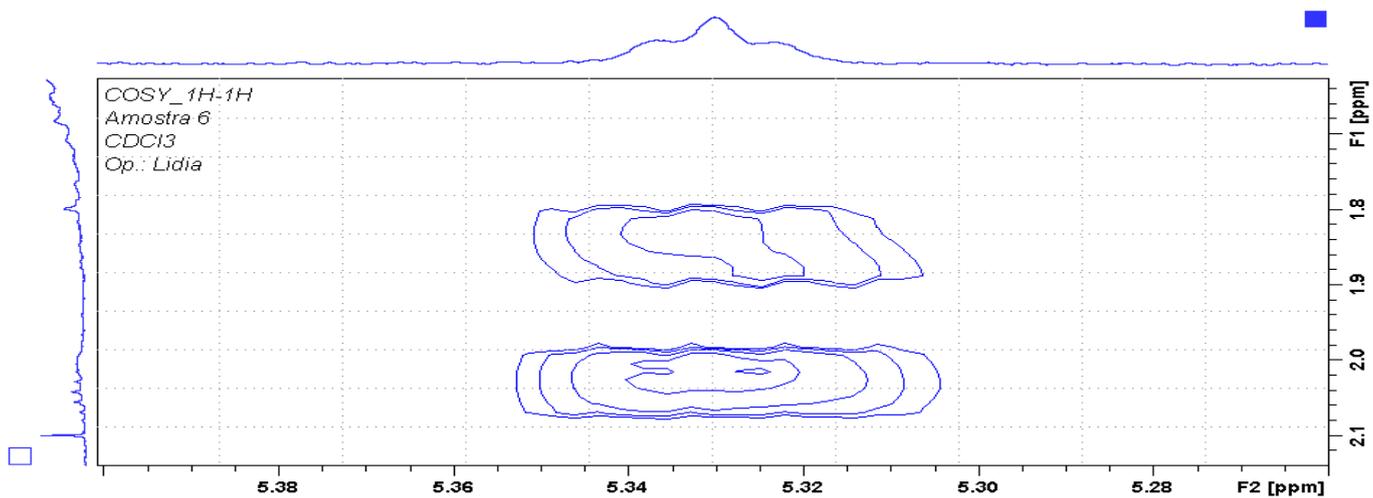


Figura S 11 Ampliação do espectro de COSY da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

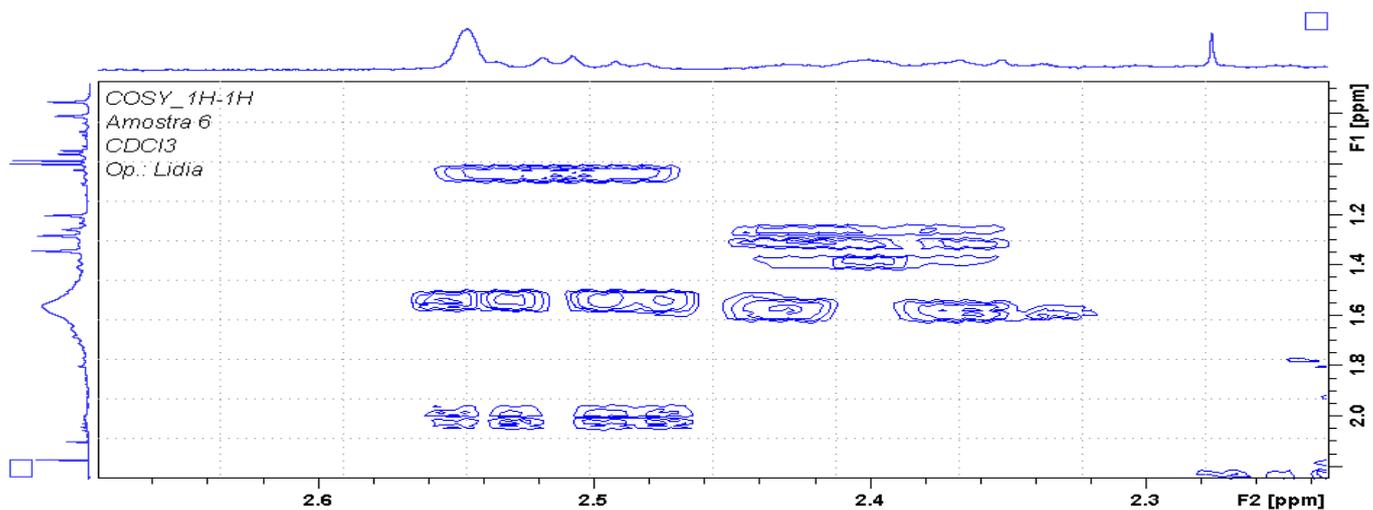


Figura S 12 Ampliação do espectro de COSY da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

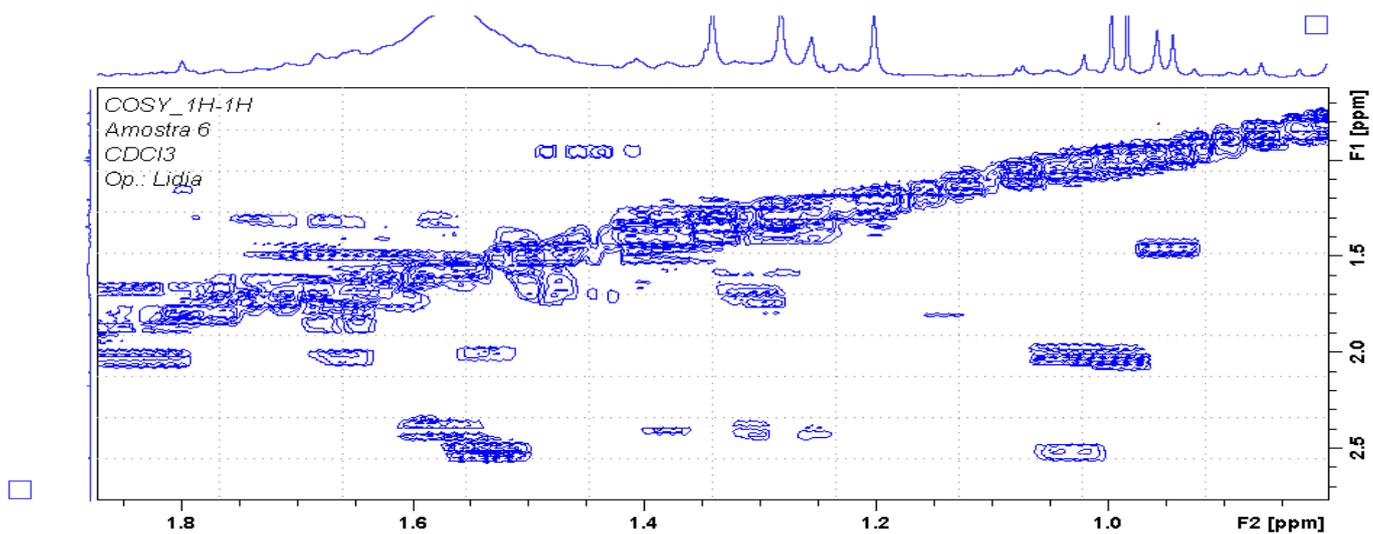


Figura S 13 Ampliação do espectro de COSY da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

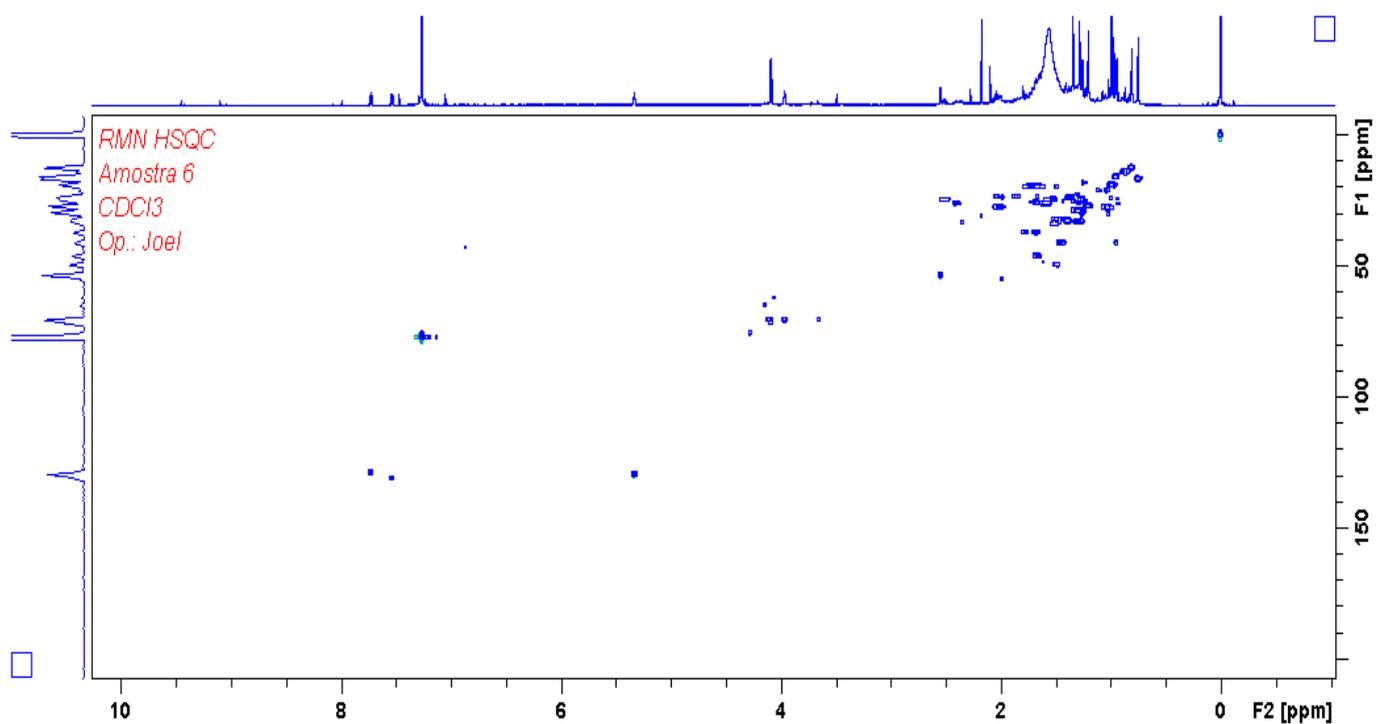


Figura S 14 Espectro de HSQC da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

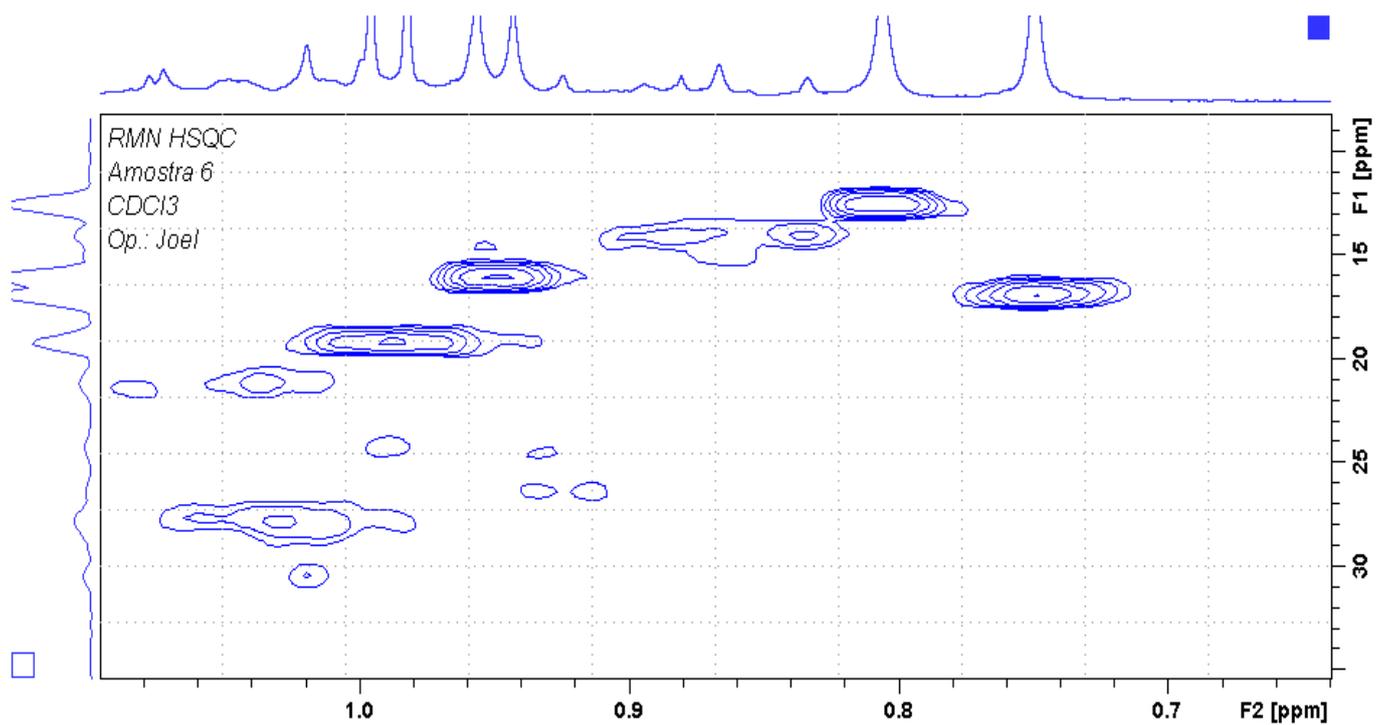


Figura S 15 Ampliação do espectro de HSQC da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

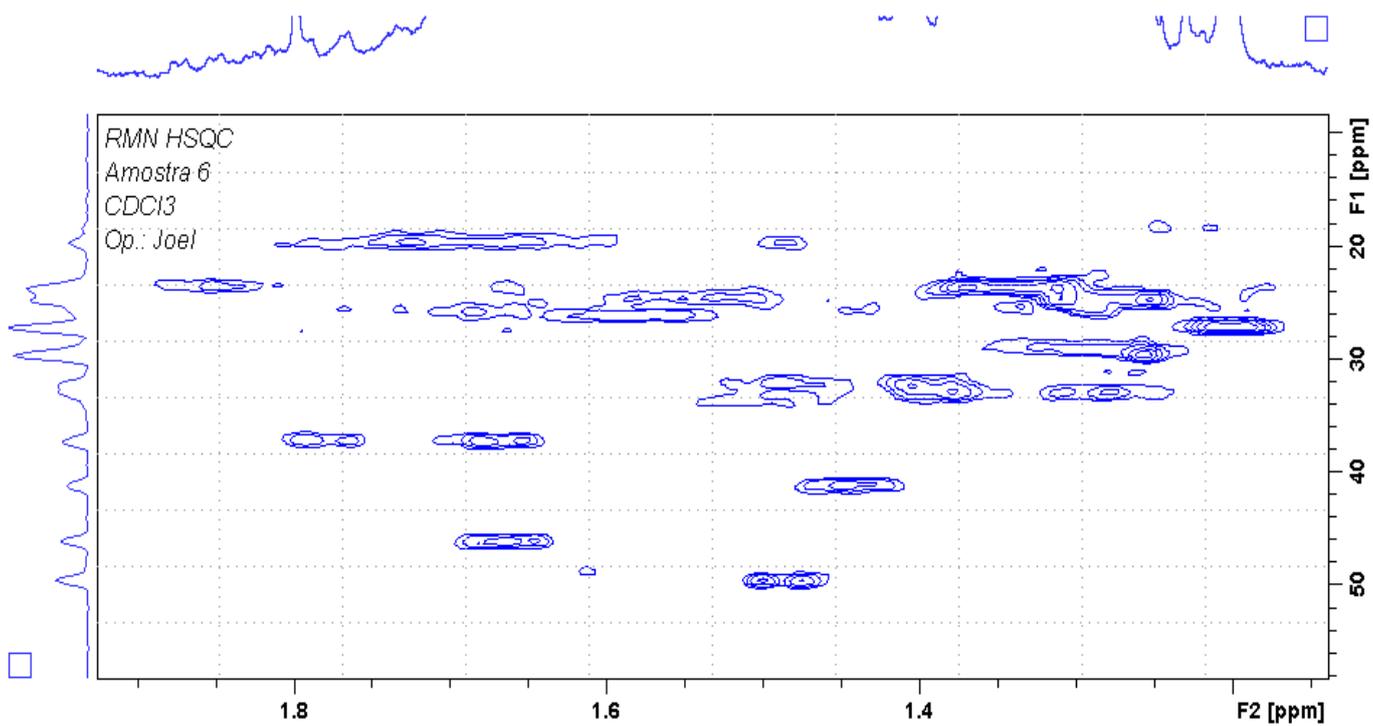


Figura S 16 Ampliação do espectro de HSQC da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

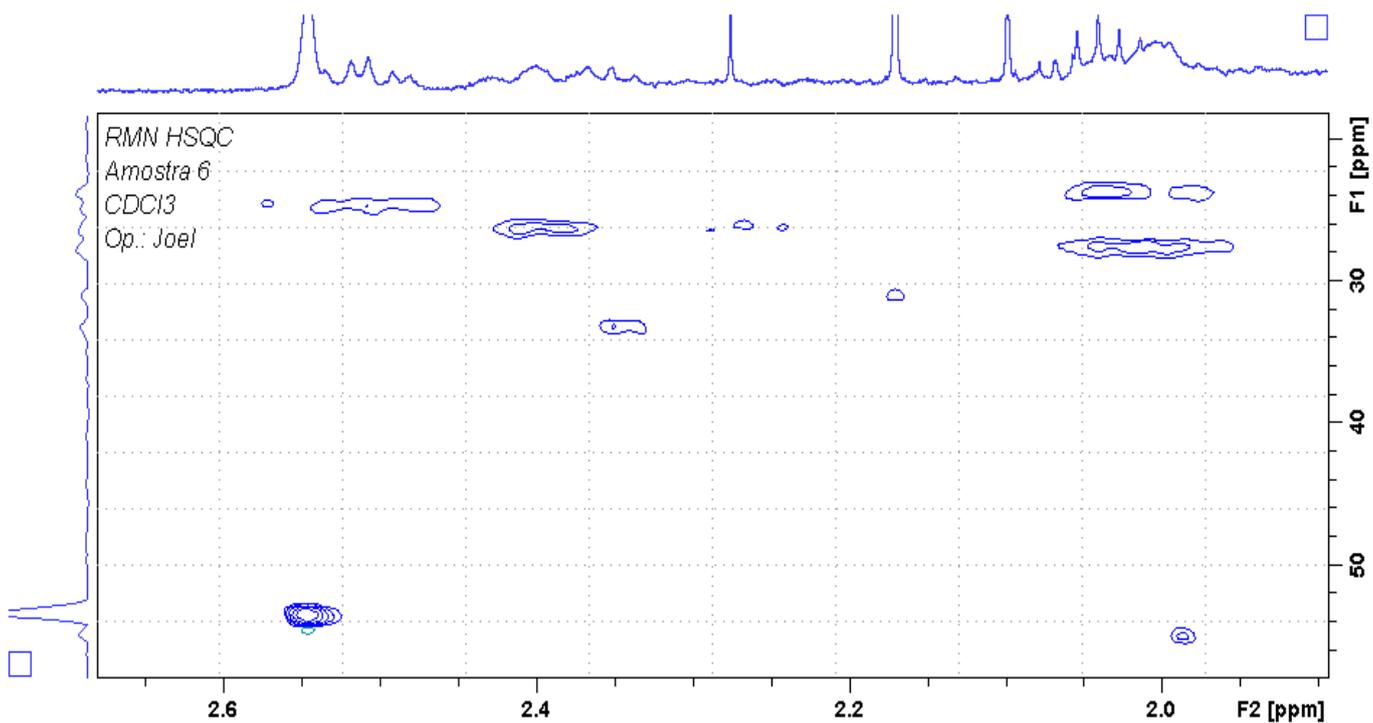


Figura S 17 Ampliação do espectro de HSQC da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

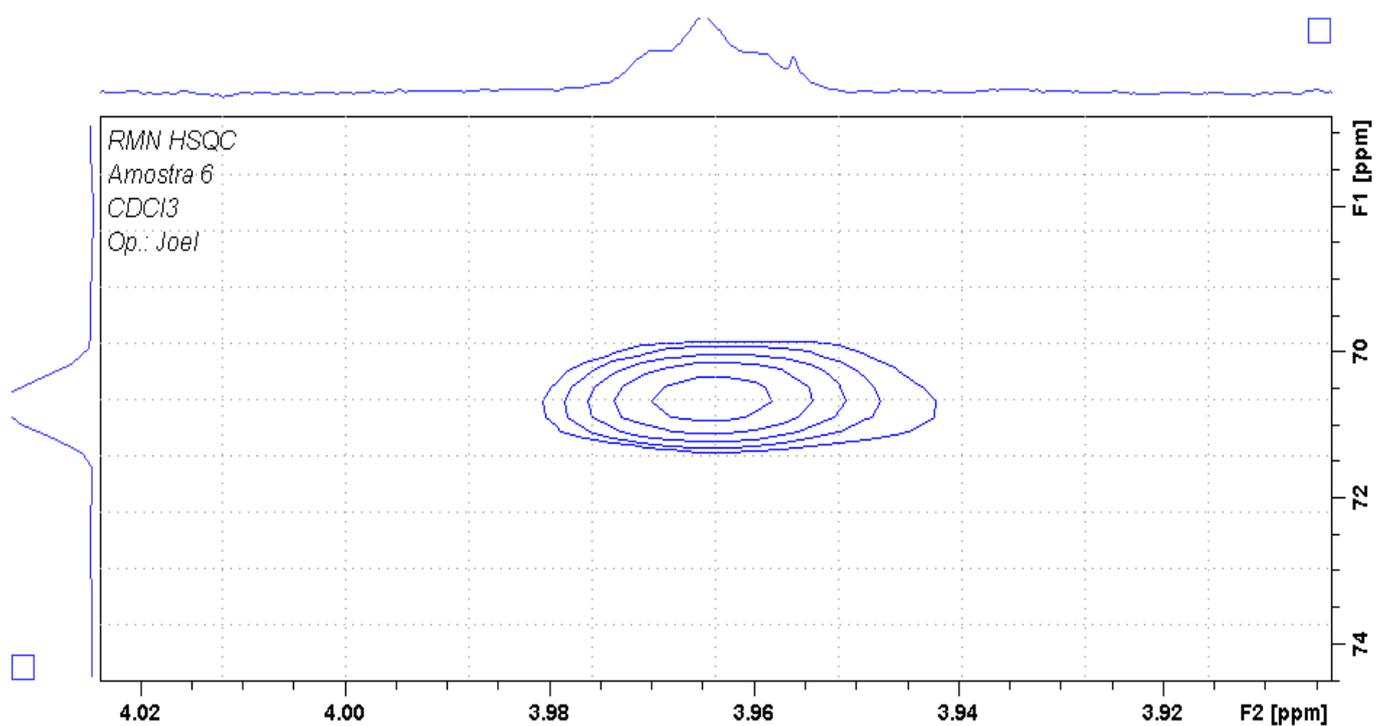


Figura S 18 Ampliação do espectro de HSQC da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

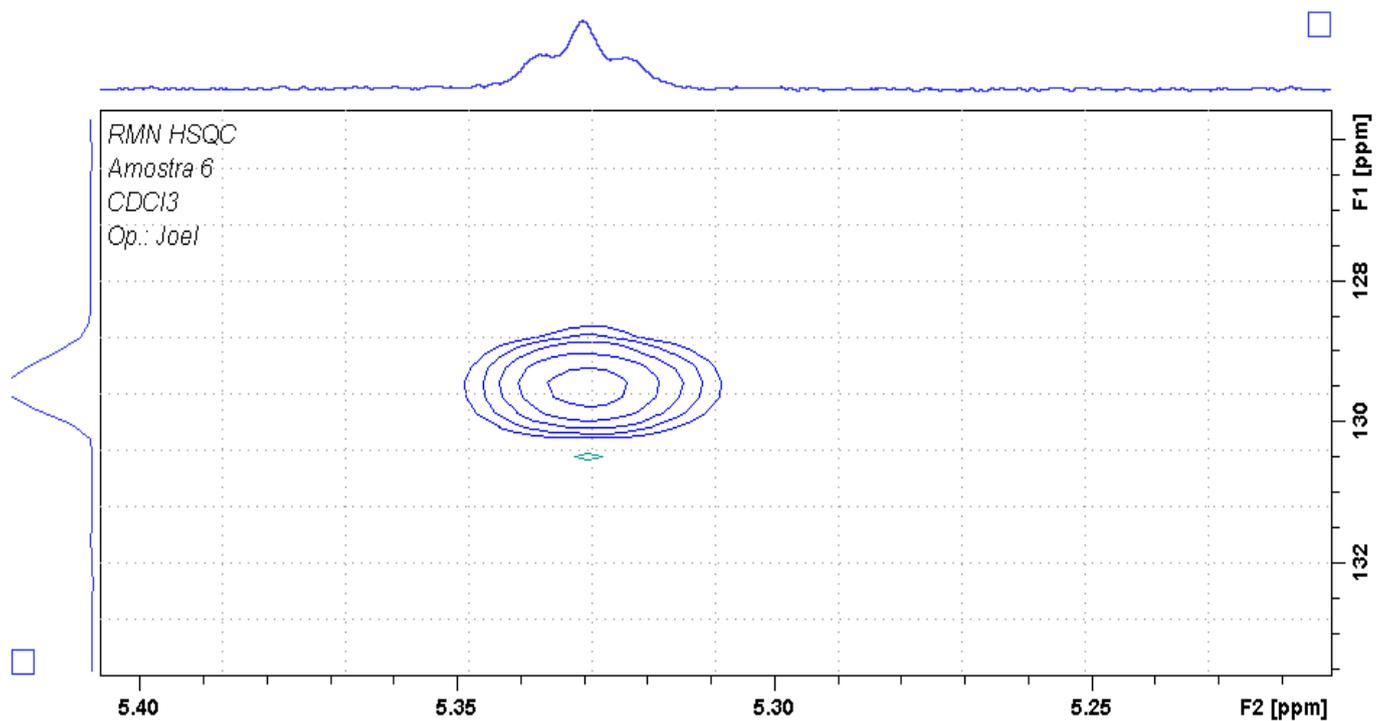


Figura S 19 Ampliação do espectro de HSQC da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

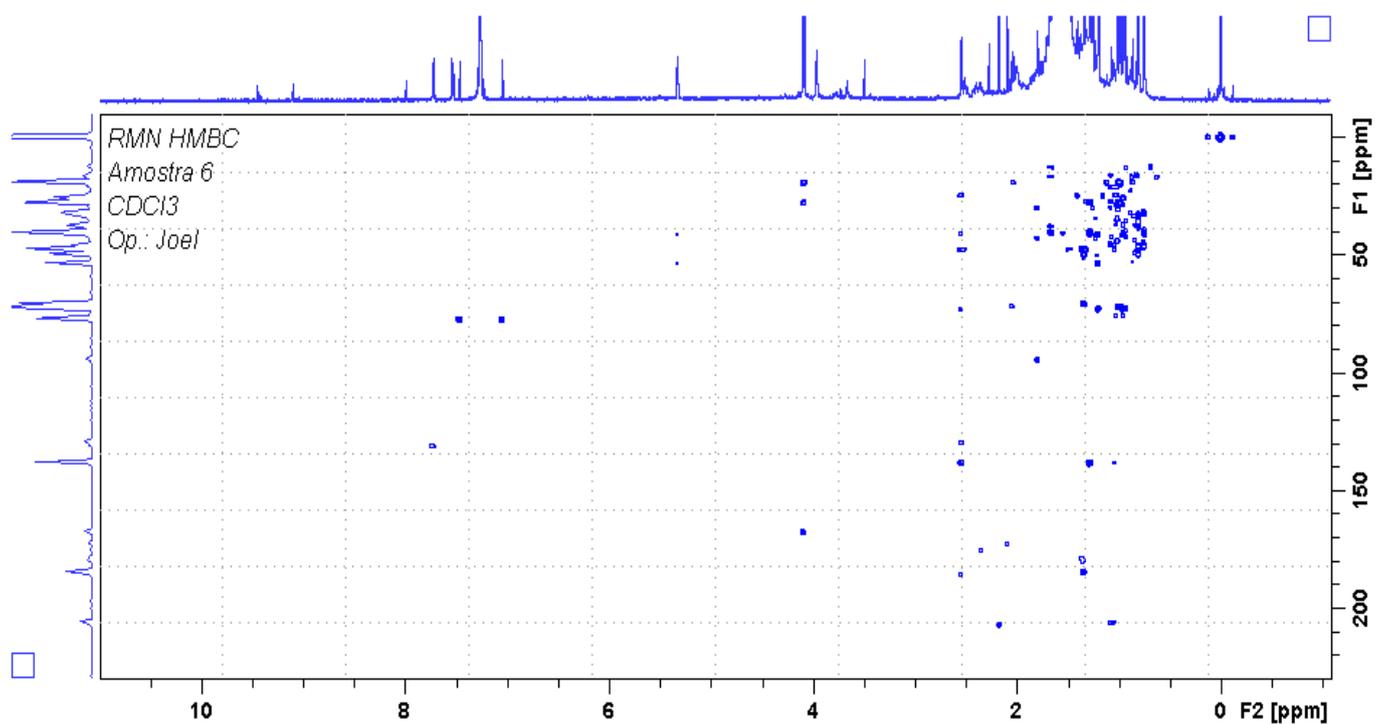


Figura S 20 Espectro de HMBC da substância 1 (11,7 T,  $\text{CDCl}_3$ , TMS).

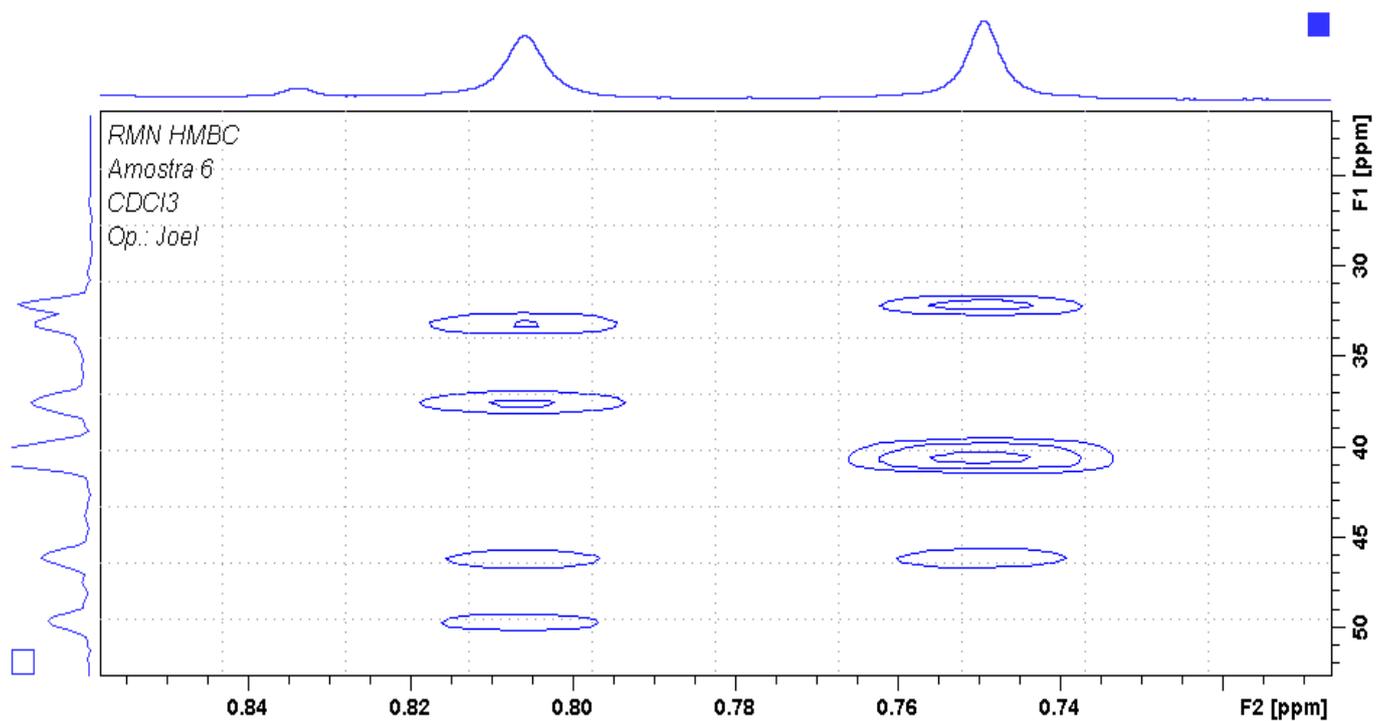


Figura S 21 Ampliação do espectro de HMBC da substância 1 (11,7 T,  $\text{CDCl}_3$ , TMS).

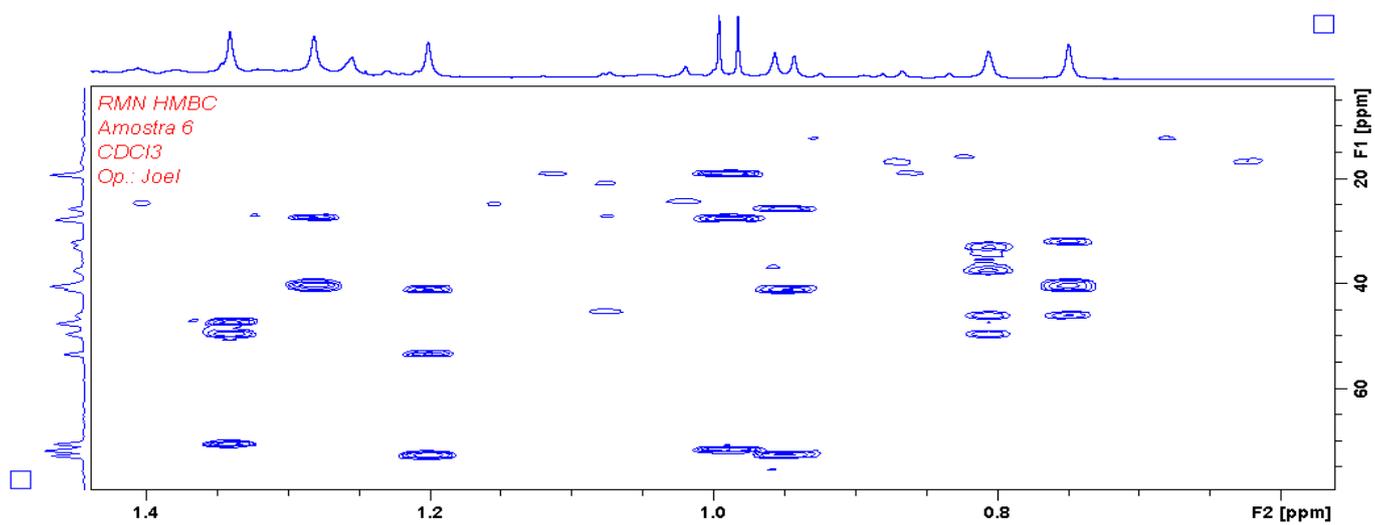


Figura S 22 Ampliação do espectro de HMBC da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

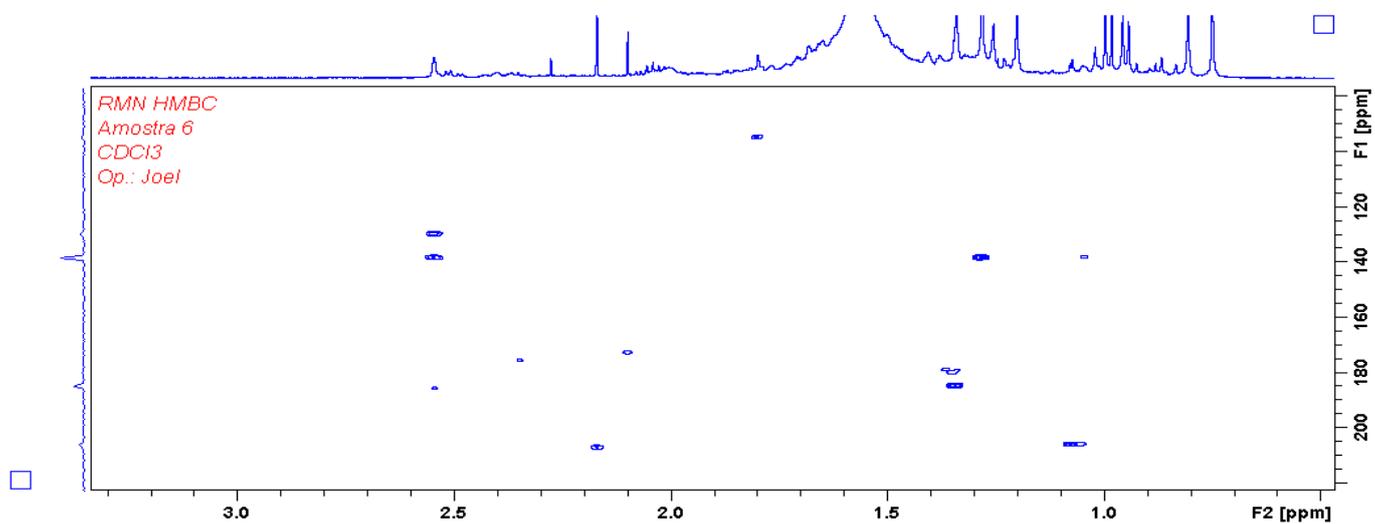


Figura S 23 Ampliação do espectro de HMBC da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

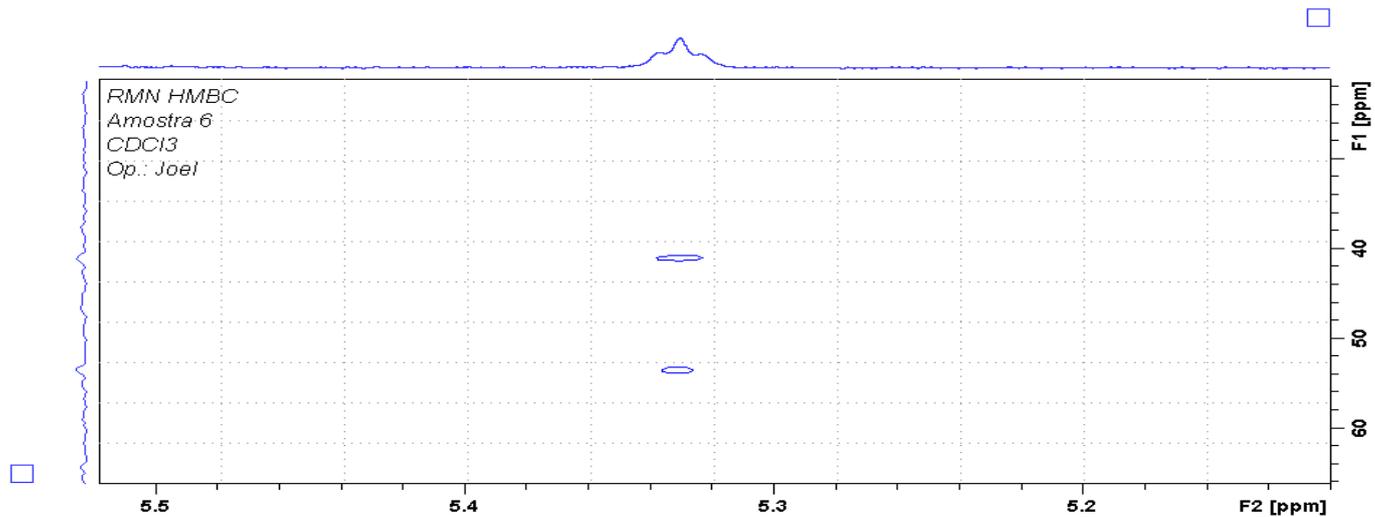


Figura S 24 Ampliação do espectro de HMBC da substância 1 (11,7 T, CDCl<sub>3</sub>, TMS).

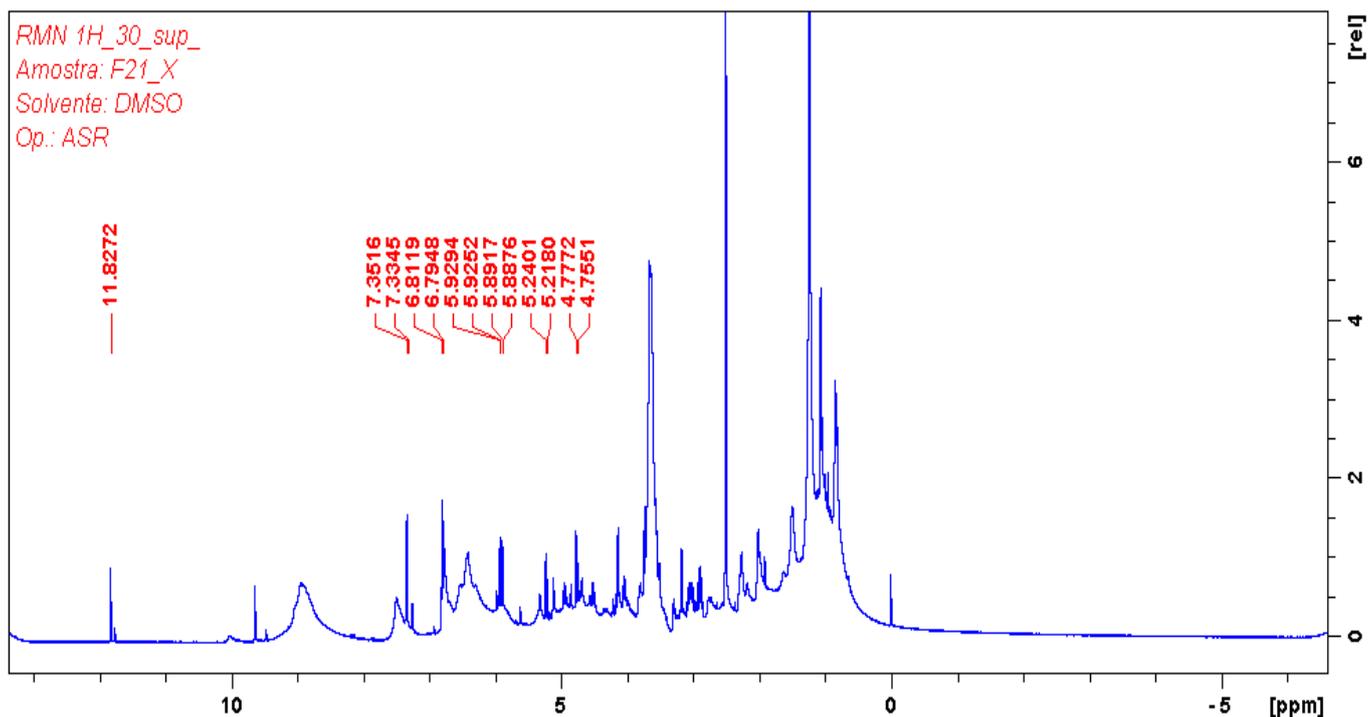


Figura S 25 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 2 (11,7 T, DMSO- $d_6$ , TMS).

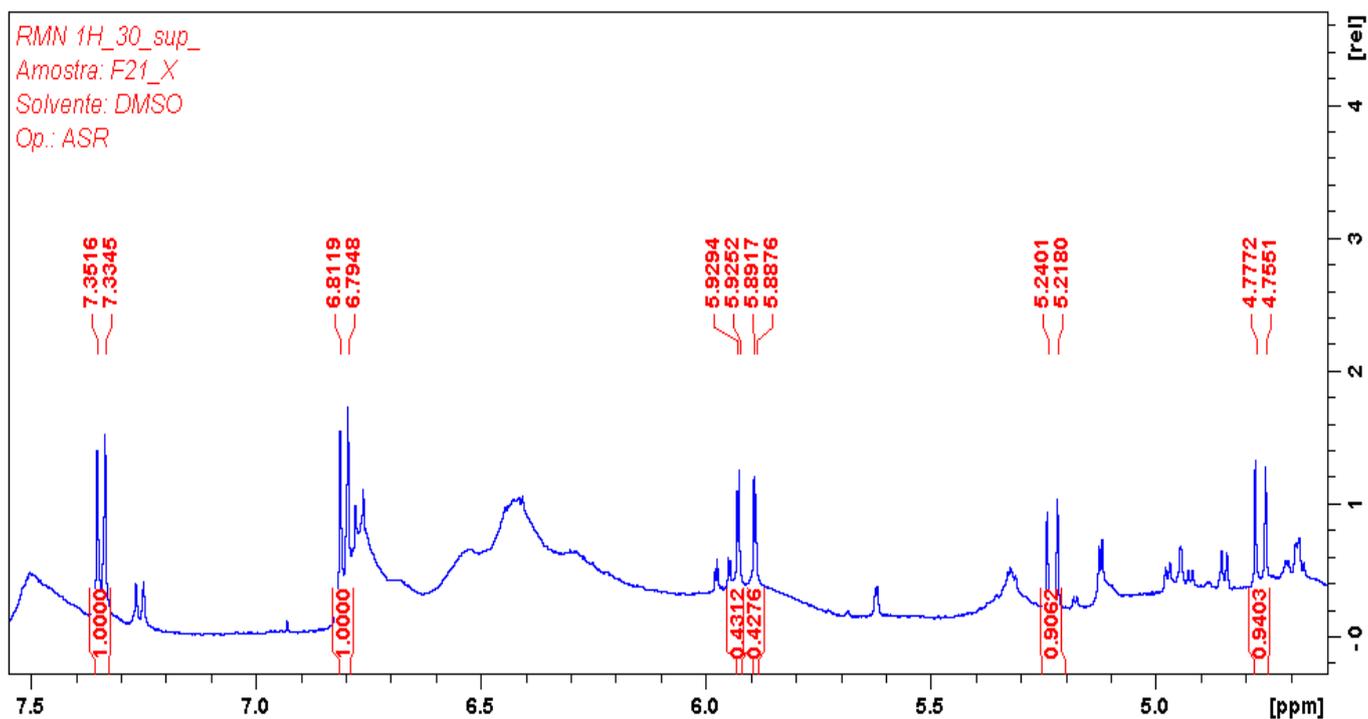


Figura S 26 Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 2 (11,7 T, DMSO- $d_6$ , TMS).

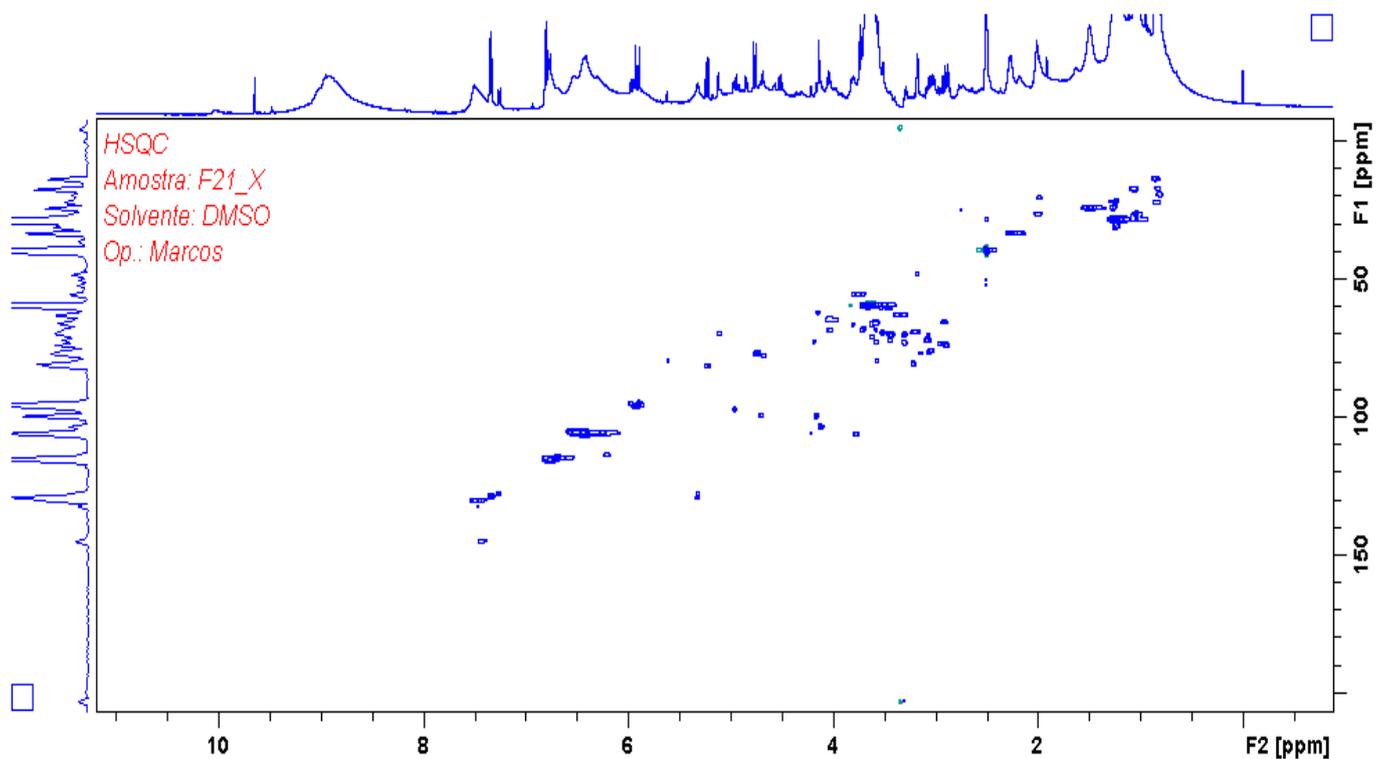


Figura S 27 Espectro de HSQC da substância 2 (11,7 T, DMSO-d6, TMS).

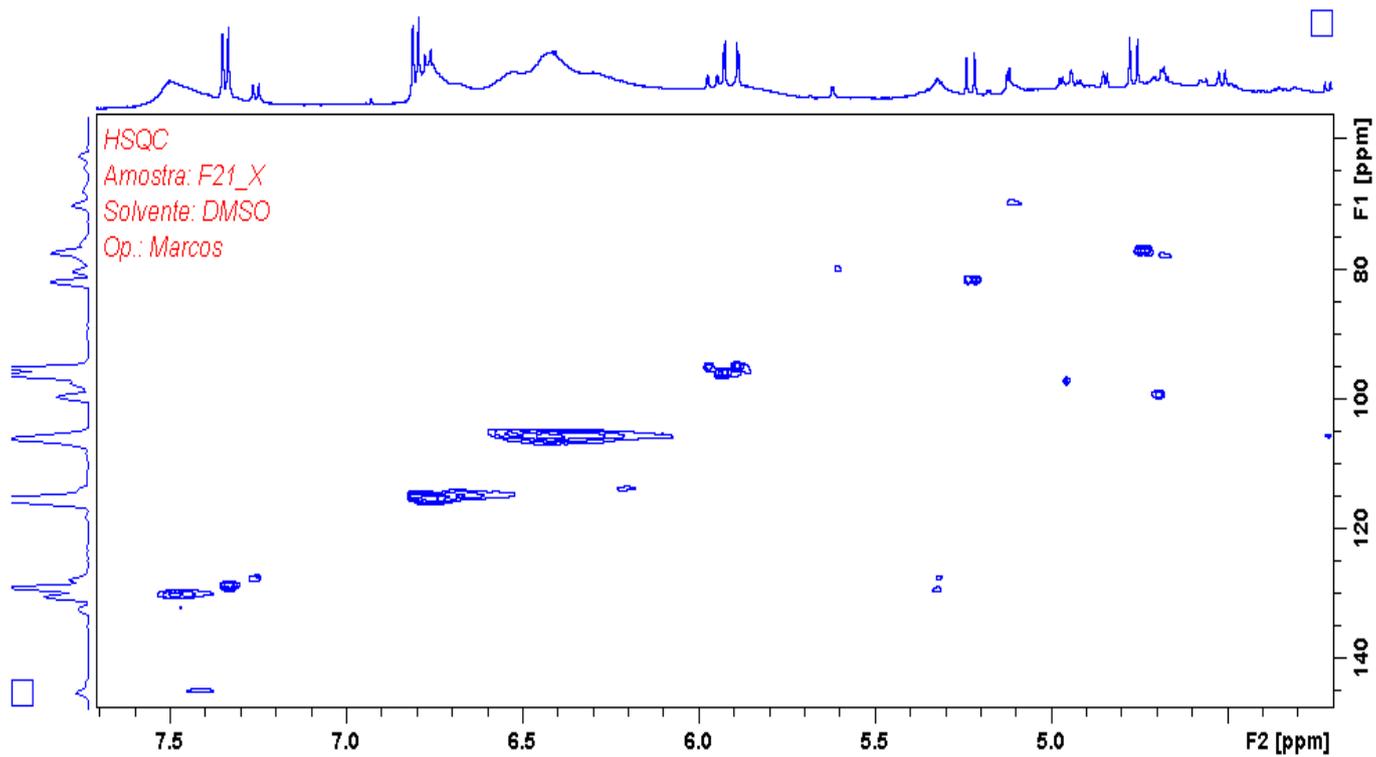


Figura S 28 Ampliação do espectro de HSQC da substância 2 (11,7 T, DMSO-d6, TMS).

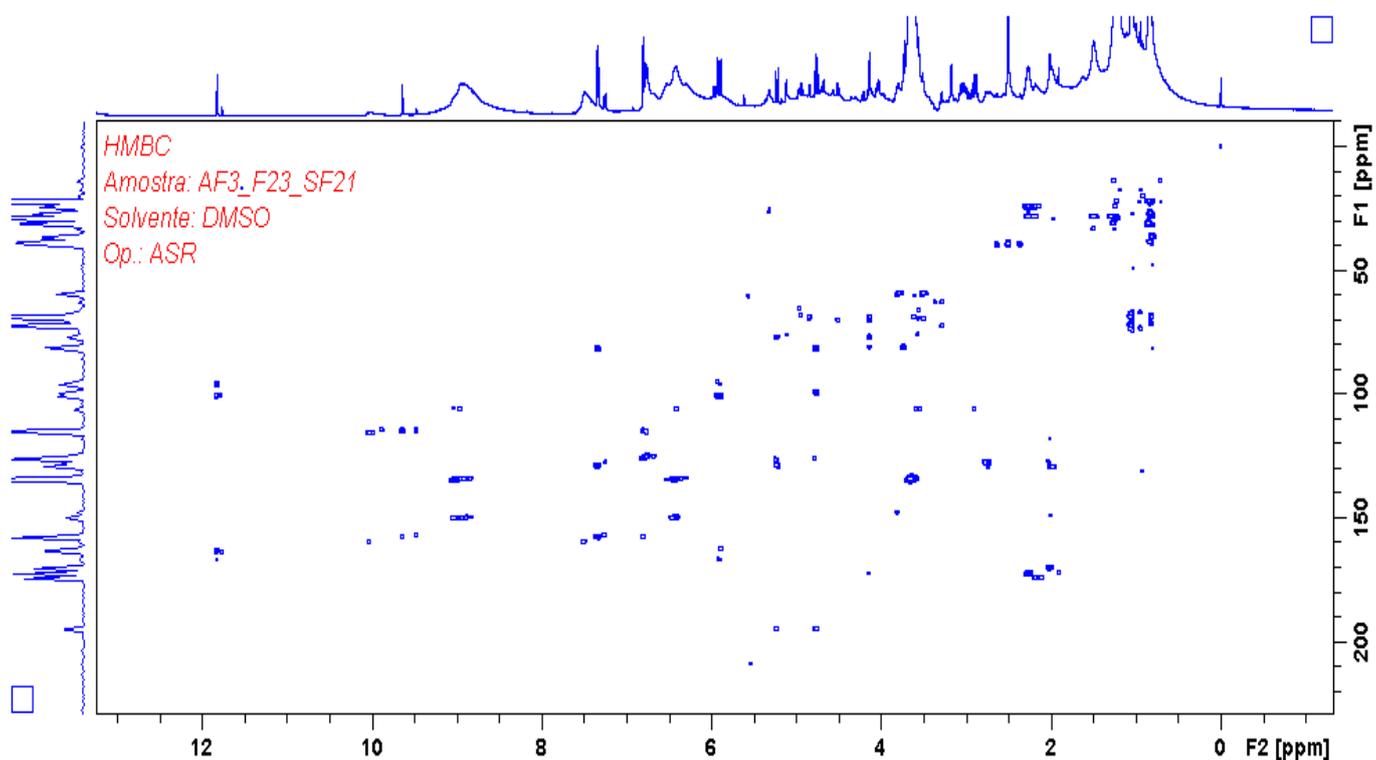


Figura S 29 Espectro de HMBC da substância 2 (11,7 T, DMSO-*d*6, TMS).

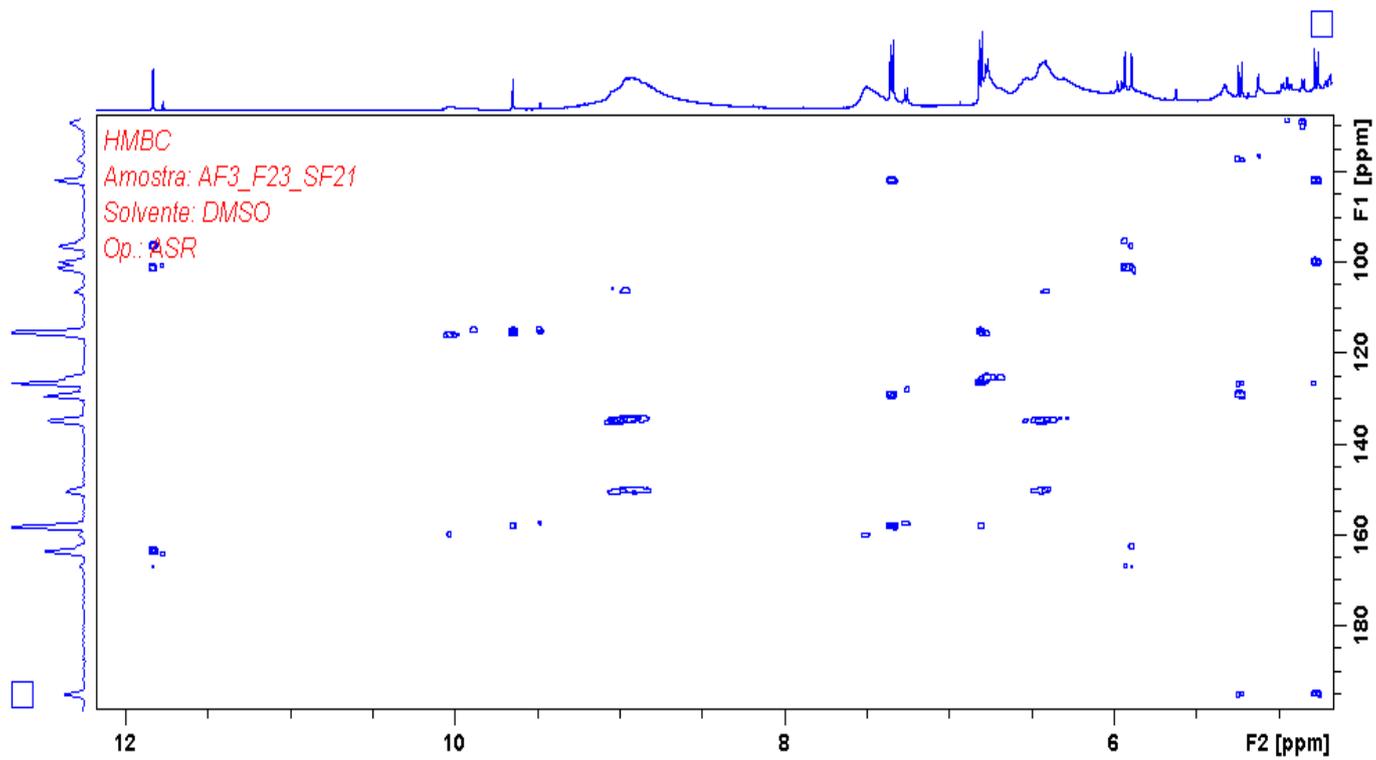


Figura S 30 Ampliação do espectro de HMBC da substância 2 (11,7 T, DMSO-*d*6, TMS).

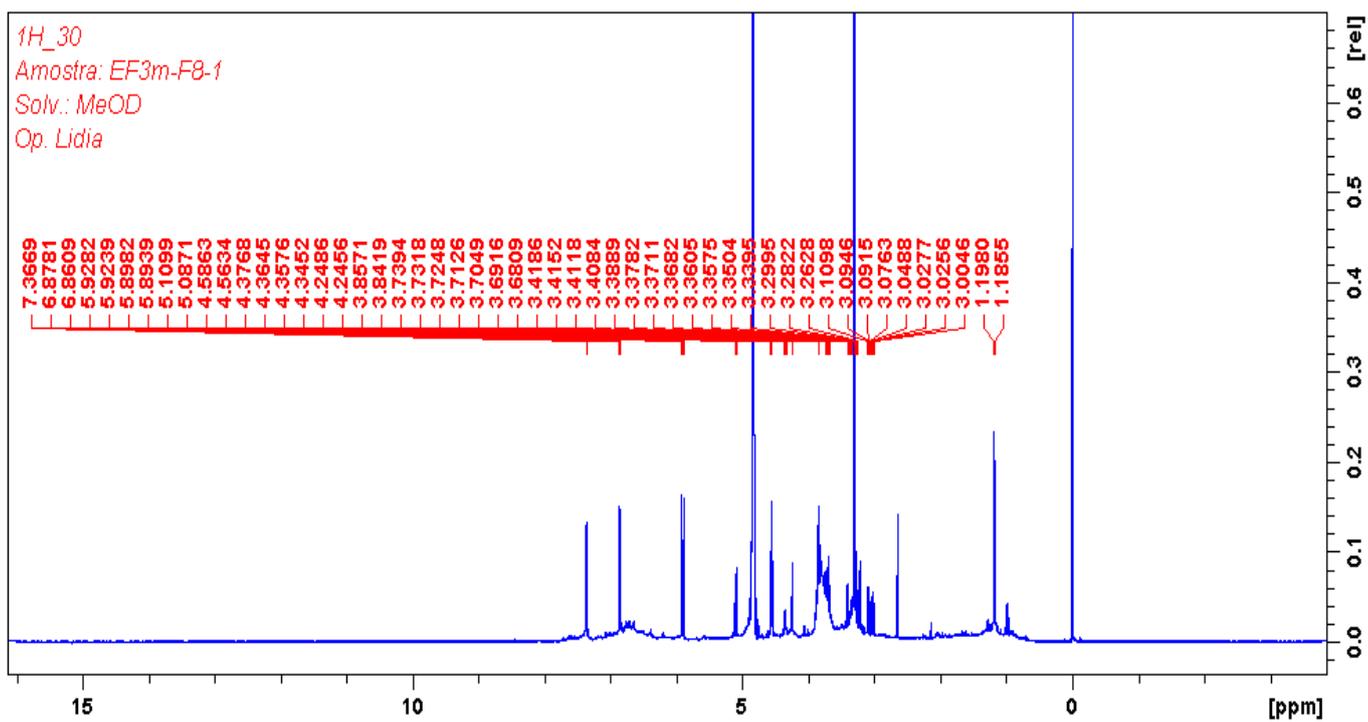


Figura S 31 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **3** (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

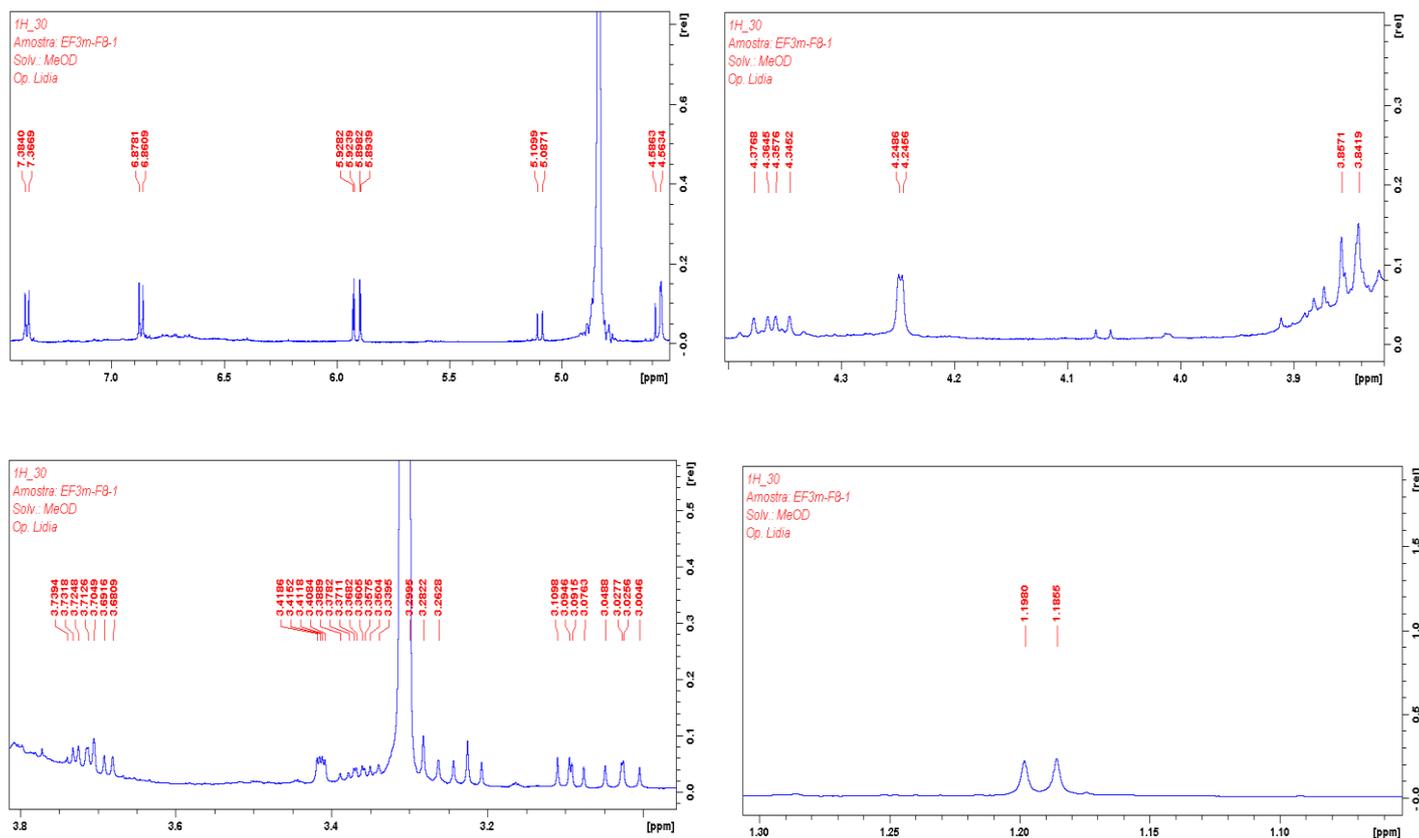


Figura S 32 Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **3** (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

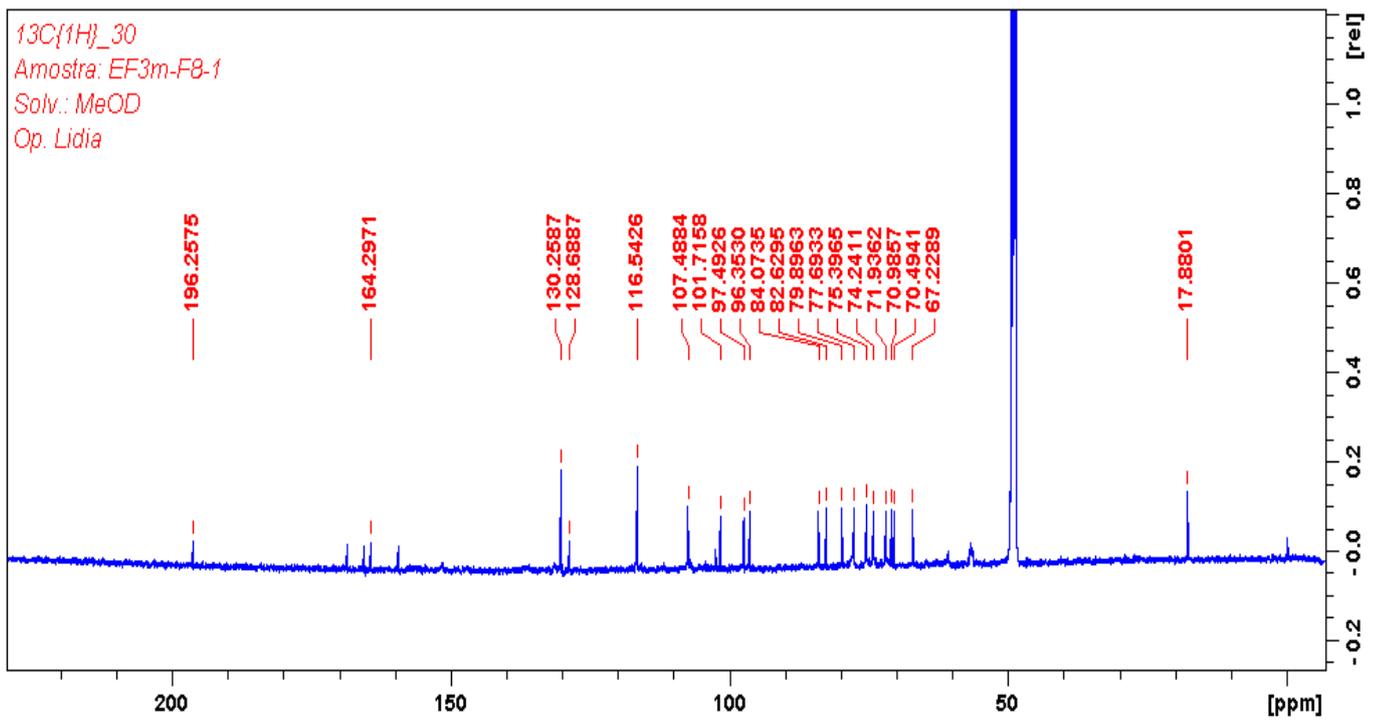


Figura S 33 Espectro de  $^{13}\text{C}$  da substância **3** (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

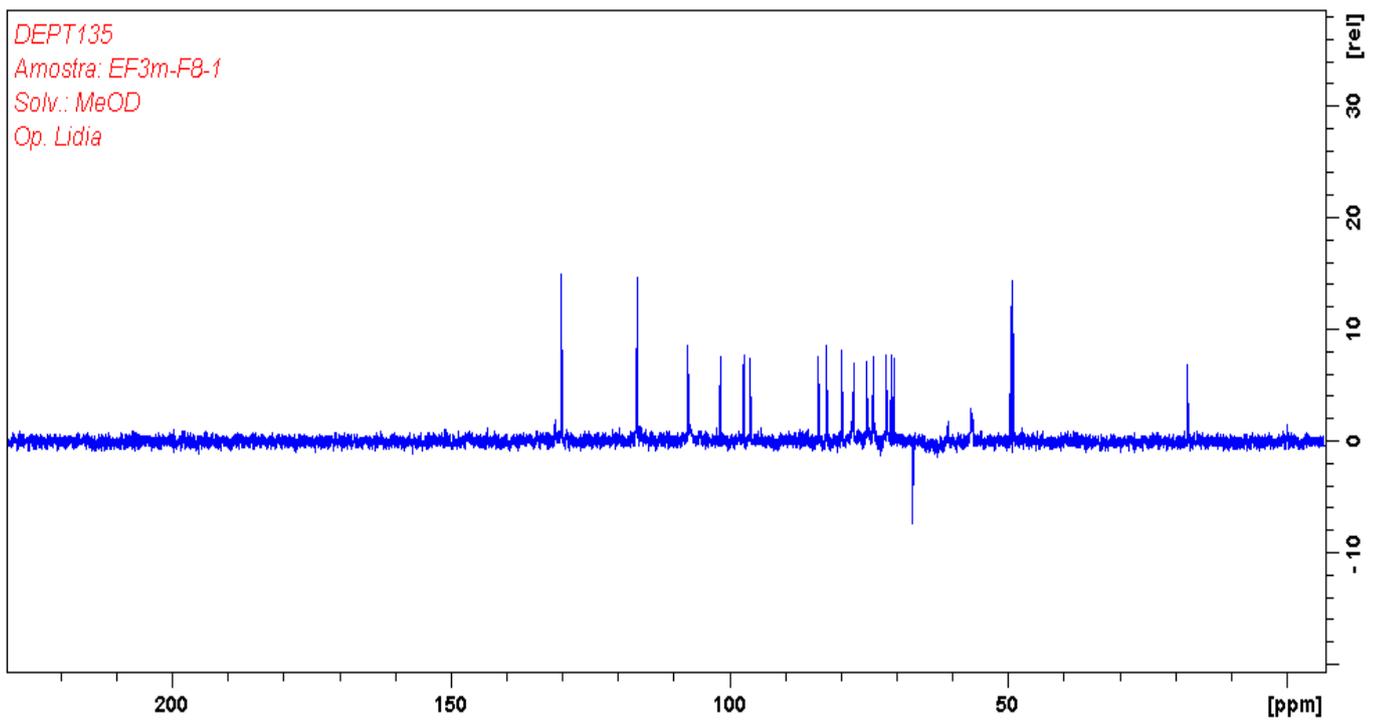


Figura S 34 Espectro de DETP 135 da substância **3** (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

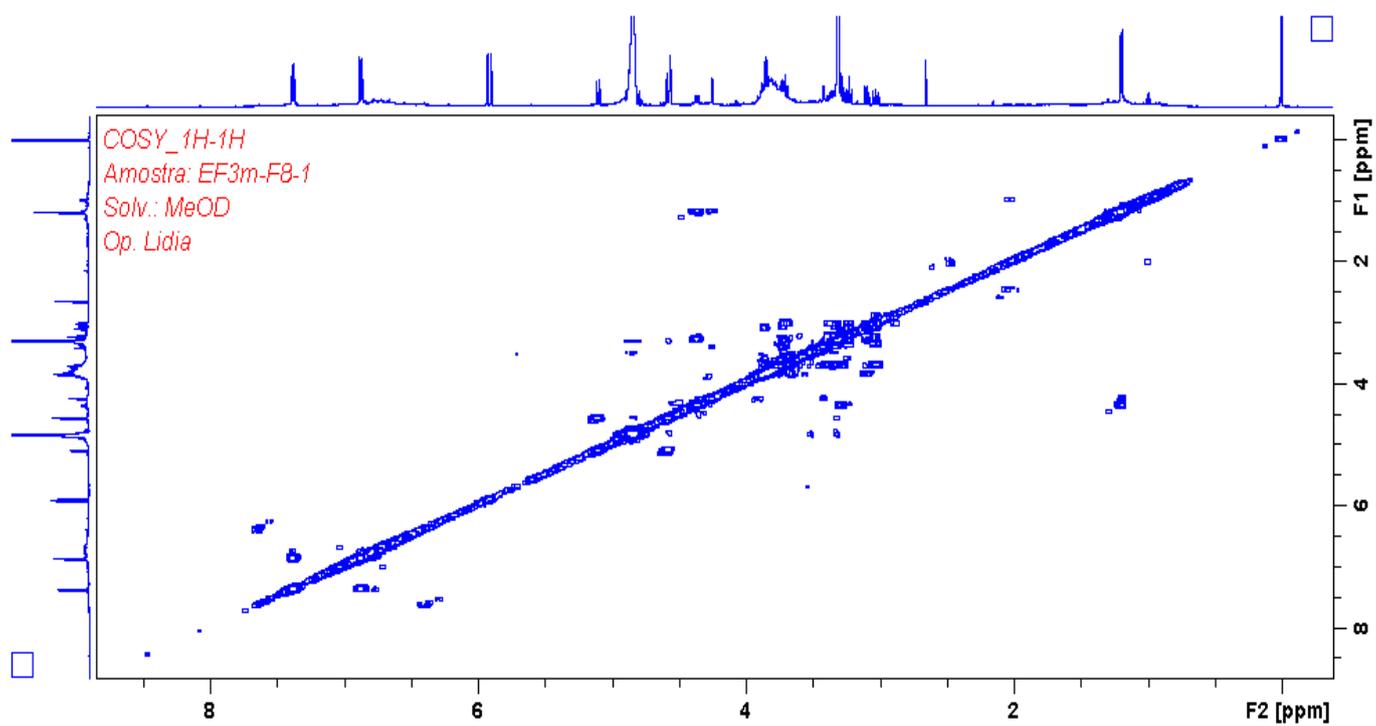


Figura S 35 Espectro de COSY da substância 3 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

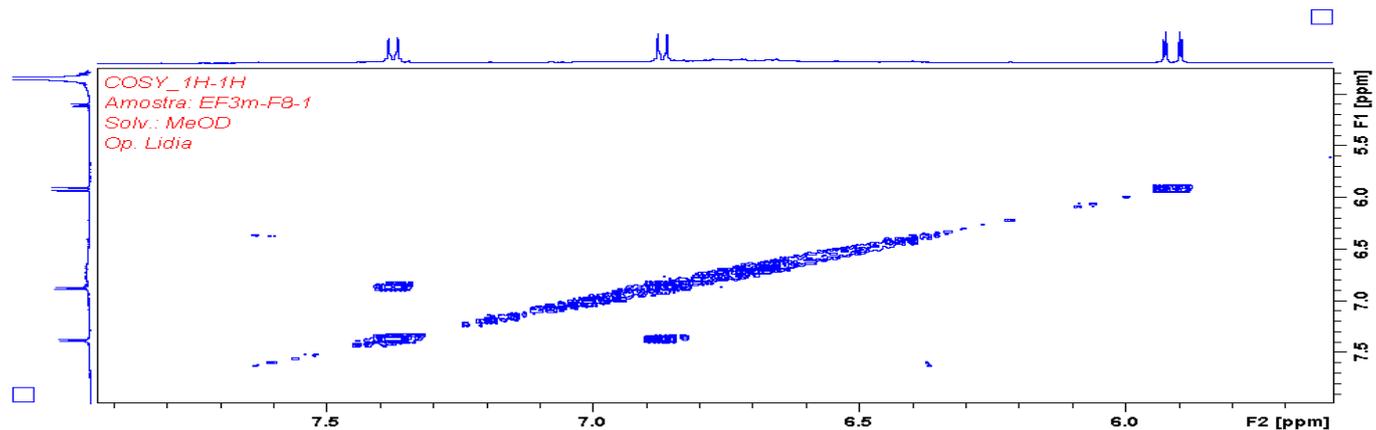


Figura S 36 Ampliação do espectro de COSY da substância 3 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

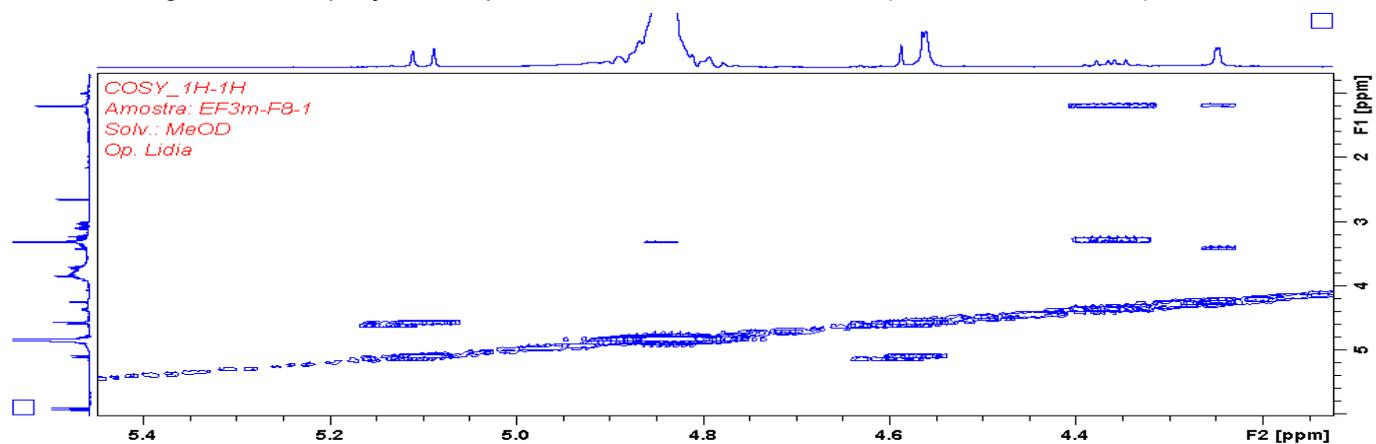


Figura S 37 Ampliação do espectro de COSY da substância 3 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

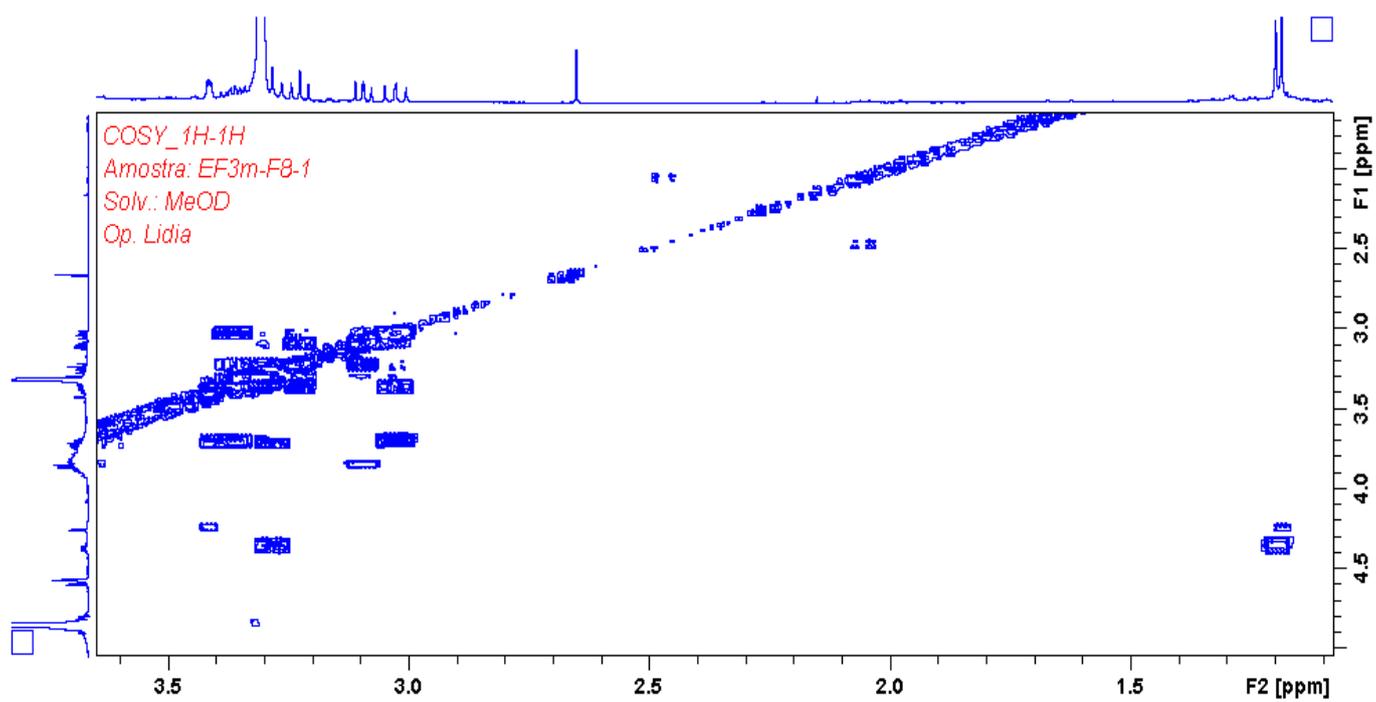


Figura S 38 Ampliação do espectro de COSY da substância **3** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

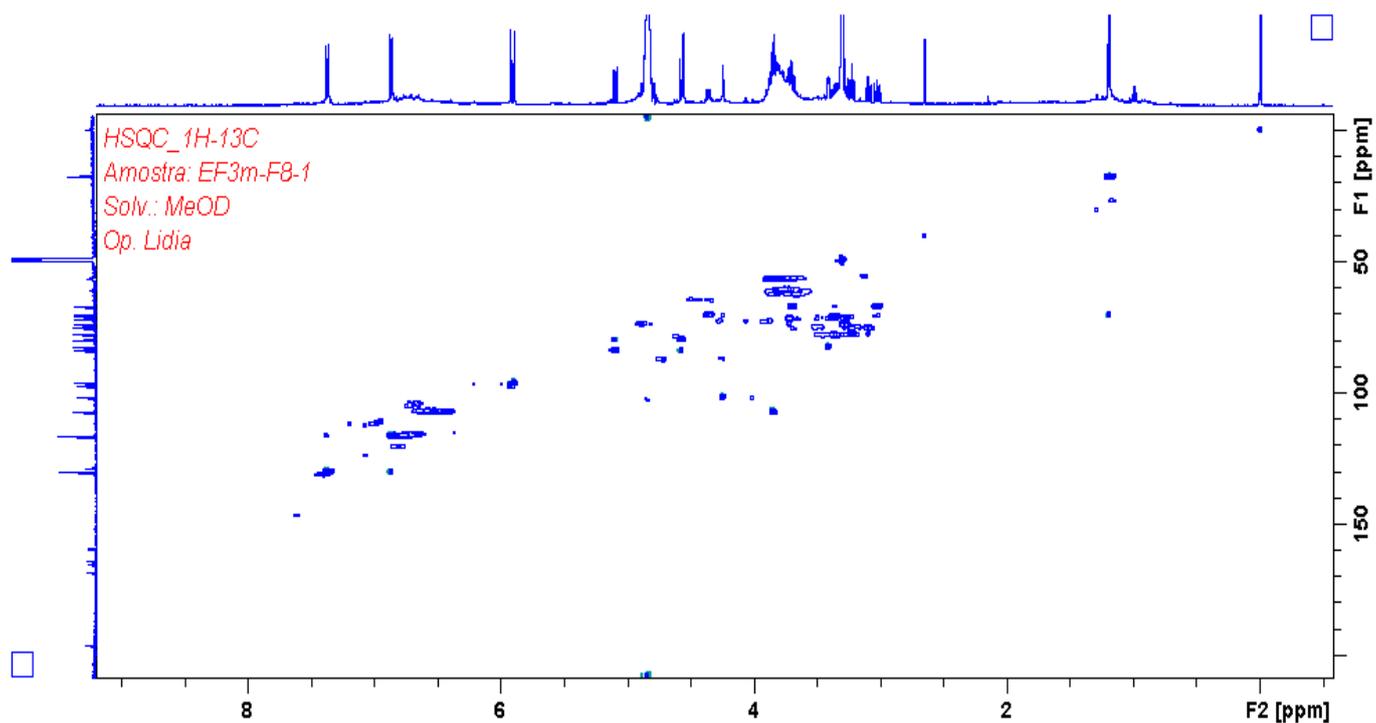


Figura S 39 Espectro de HSQC da substância **3** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS) .

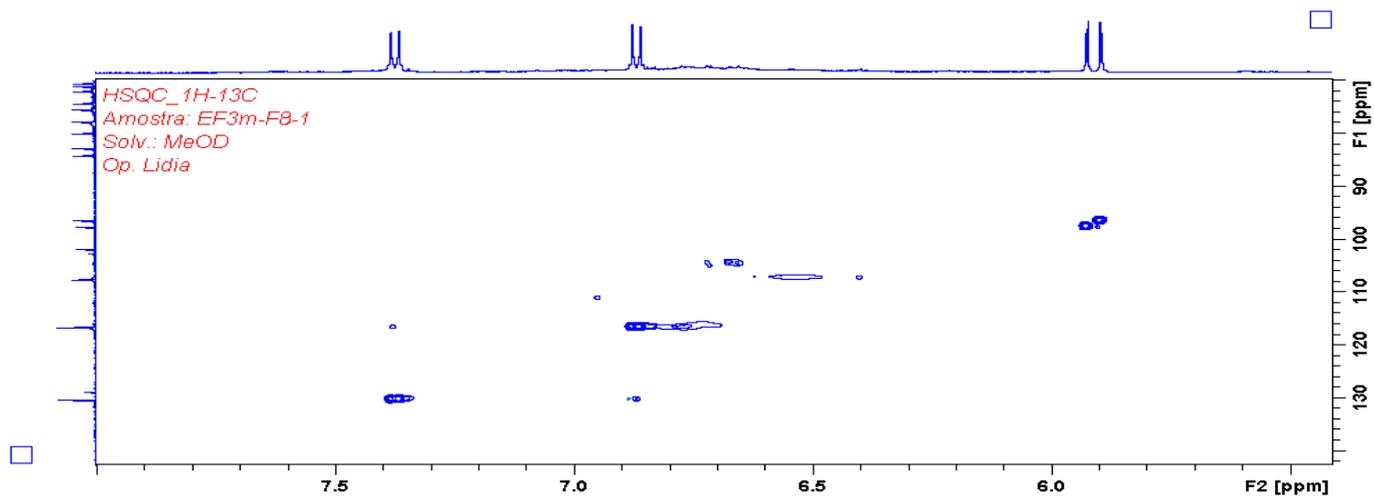


Figura S 40 Ampliação do espectro de HSQC da substância **3** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

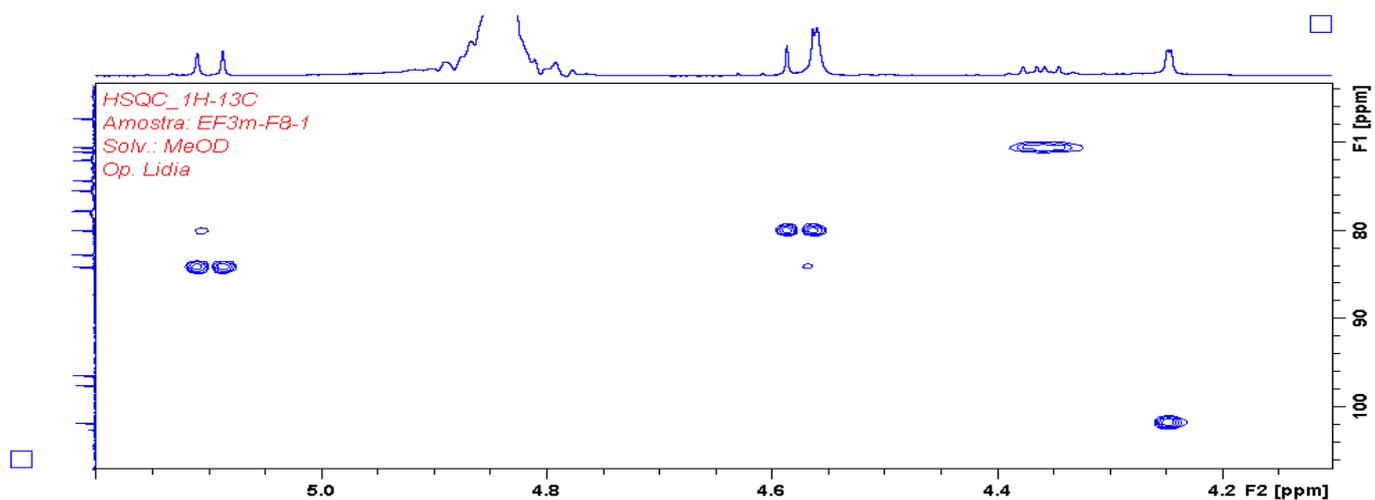


Figura S 41 Ampliação do espectro de HSQC da substância **3** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

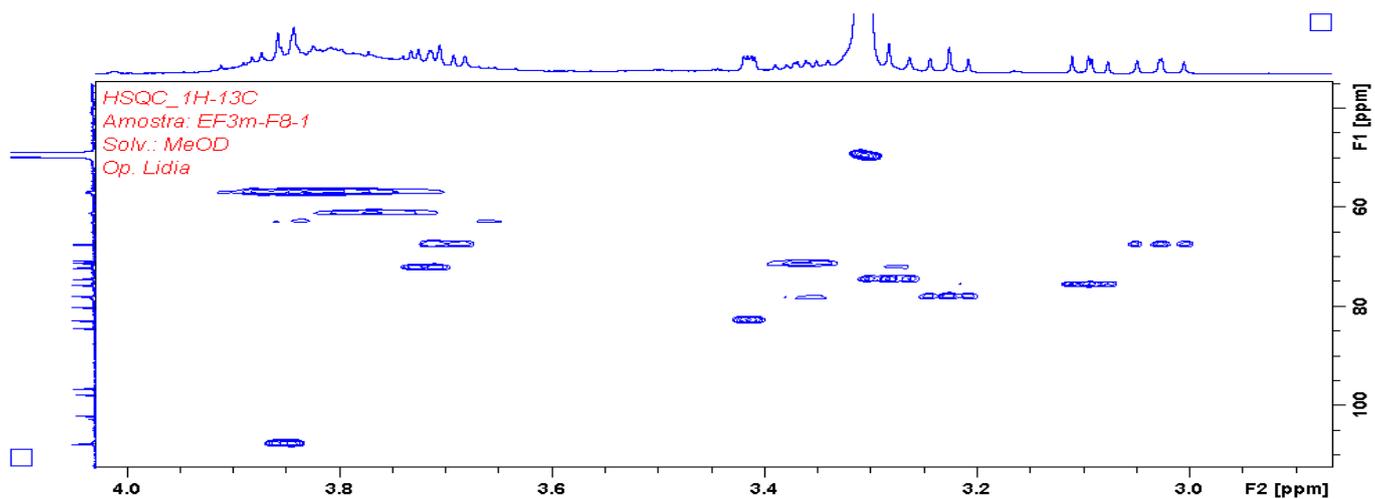


Figura S 42 Ampliação do espectro de HSQC da substância **3** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

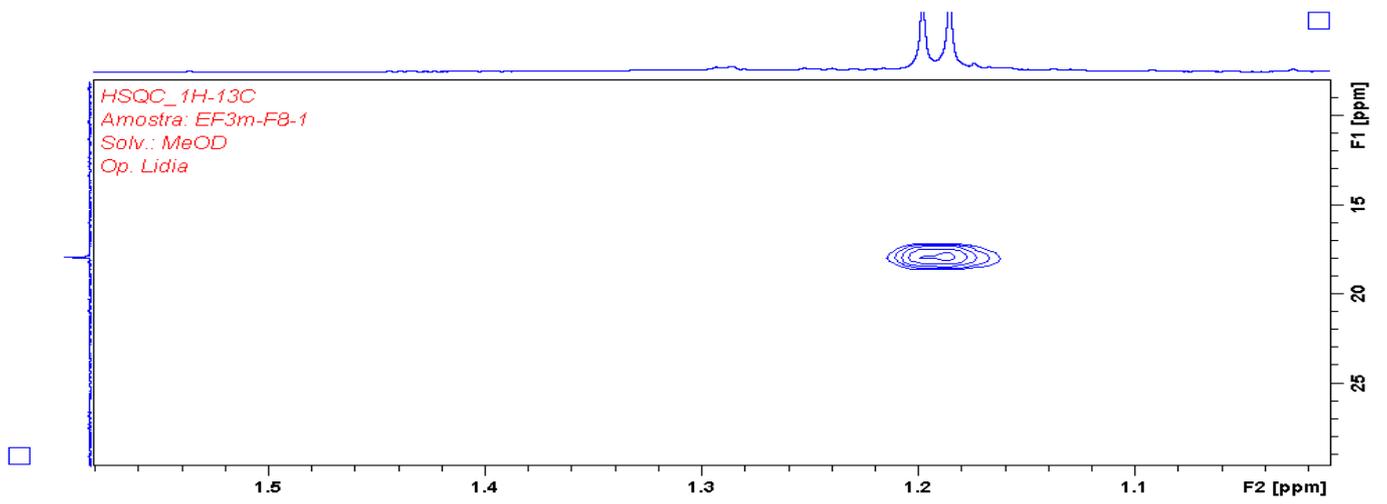


Figura S 43 Ampliação do espectro de HSQC da substância **3** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

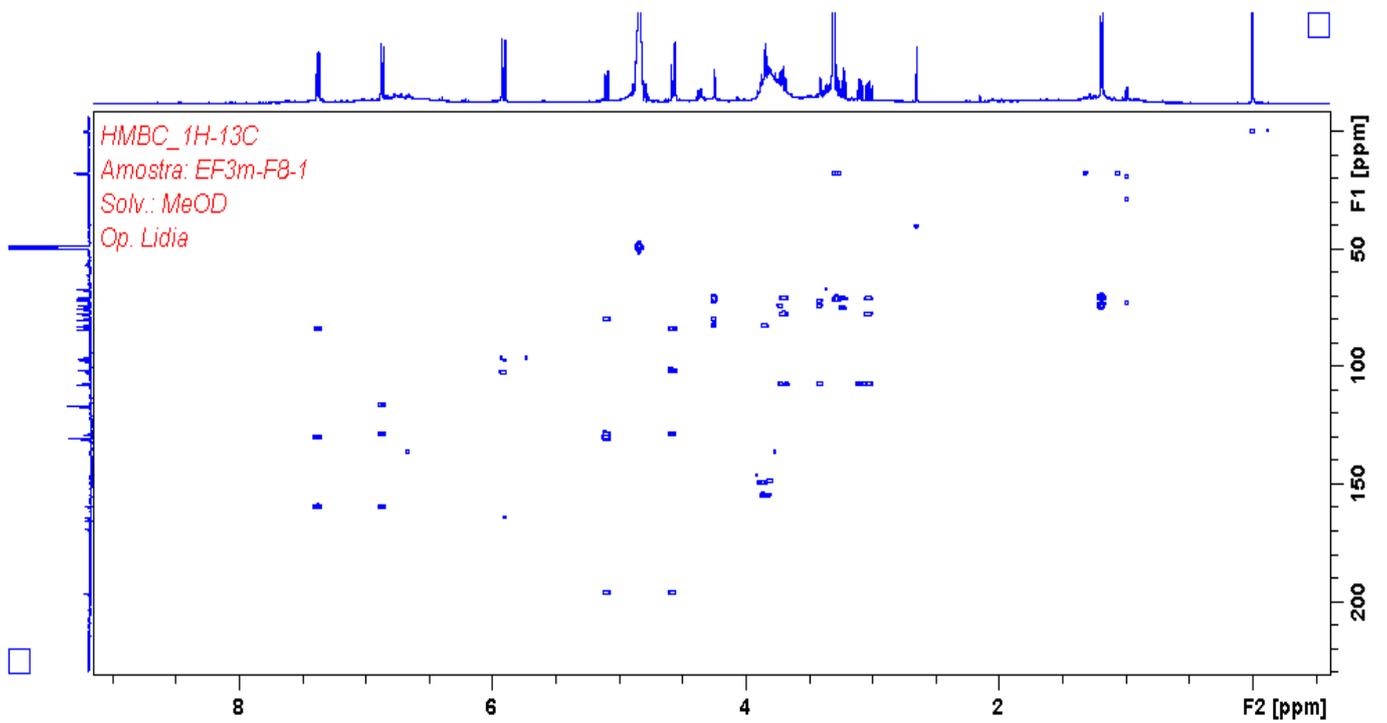


Figura S 44 Espectro de HMBC da substância **3** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

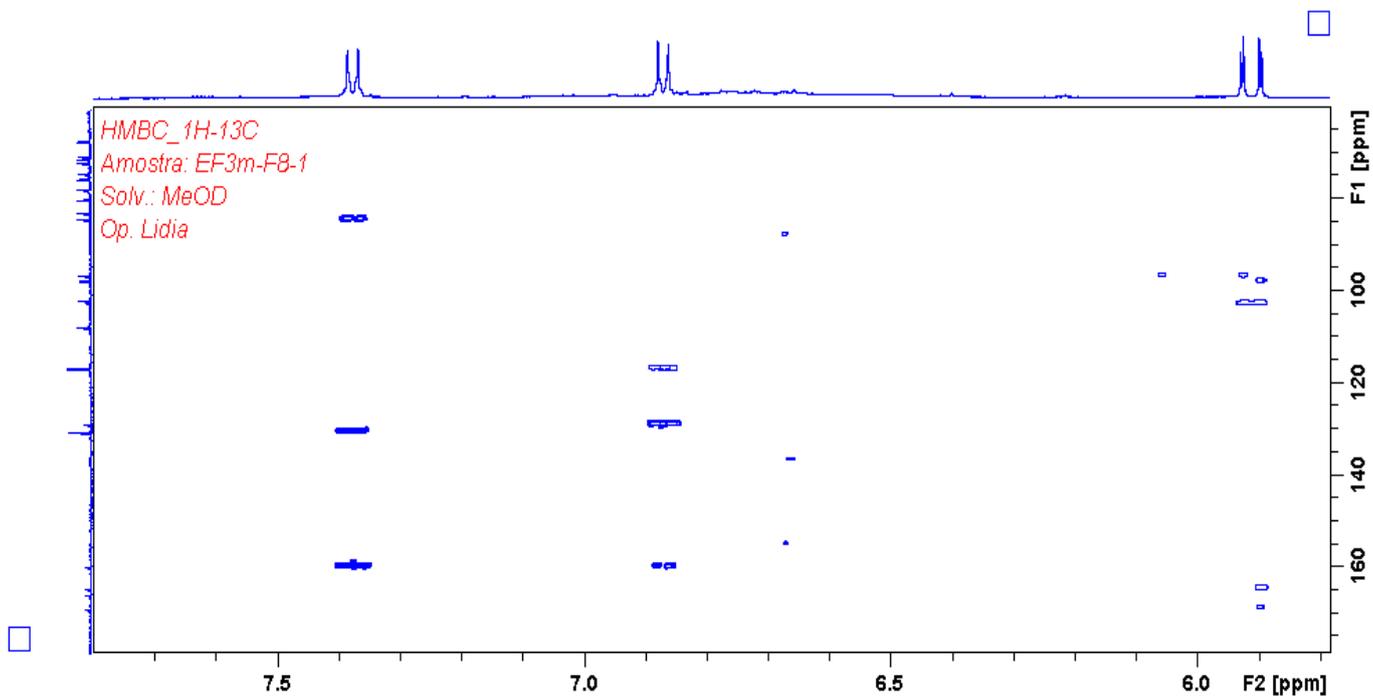


Figura S 45 Ampliação do espectro de HMBC da substância 3 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

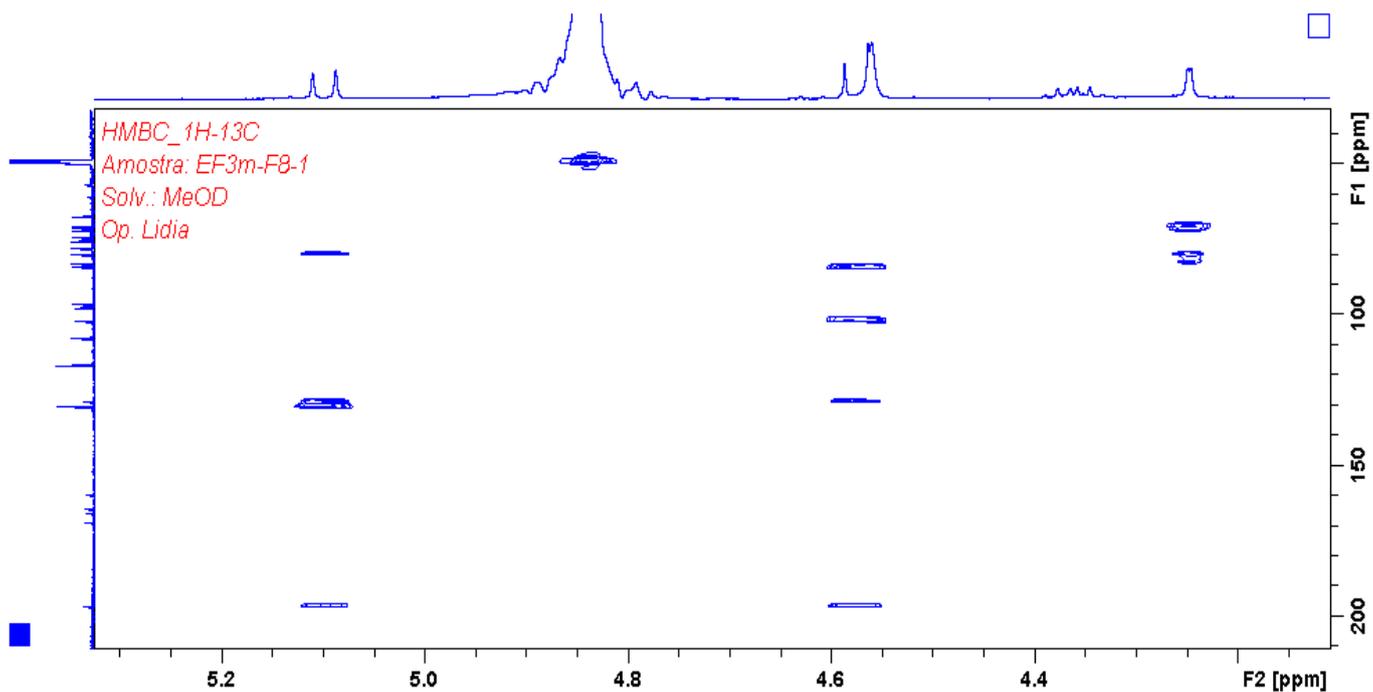


Figura S 46 Ampliação do espectro de HMBC da substância 3 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

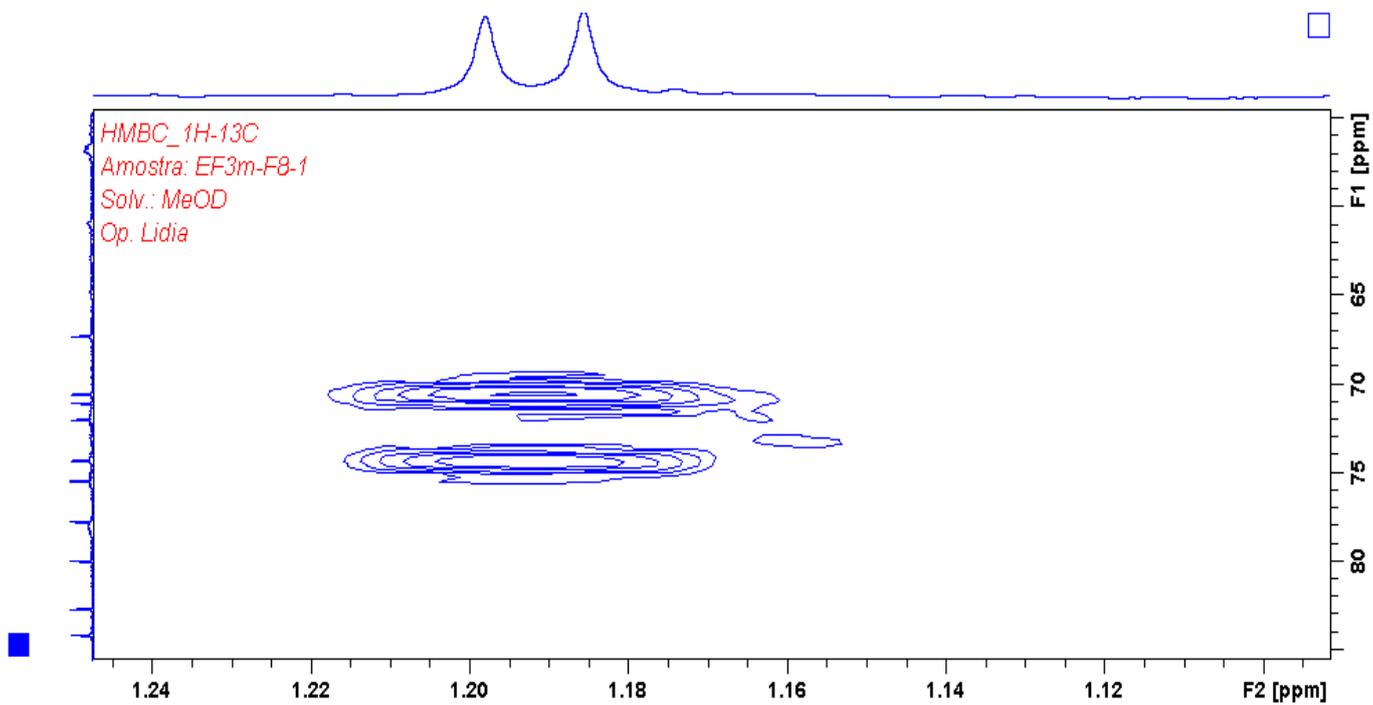


Figura S 47 Ampliação do espectro de HMBC da substância **3** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

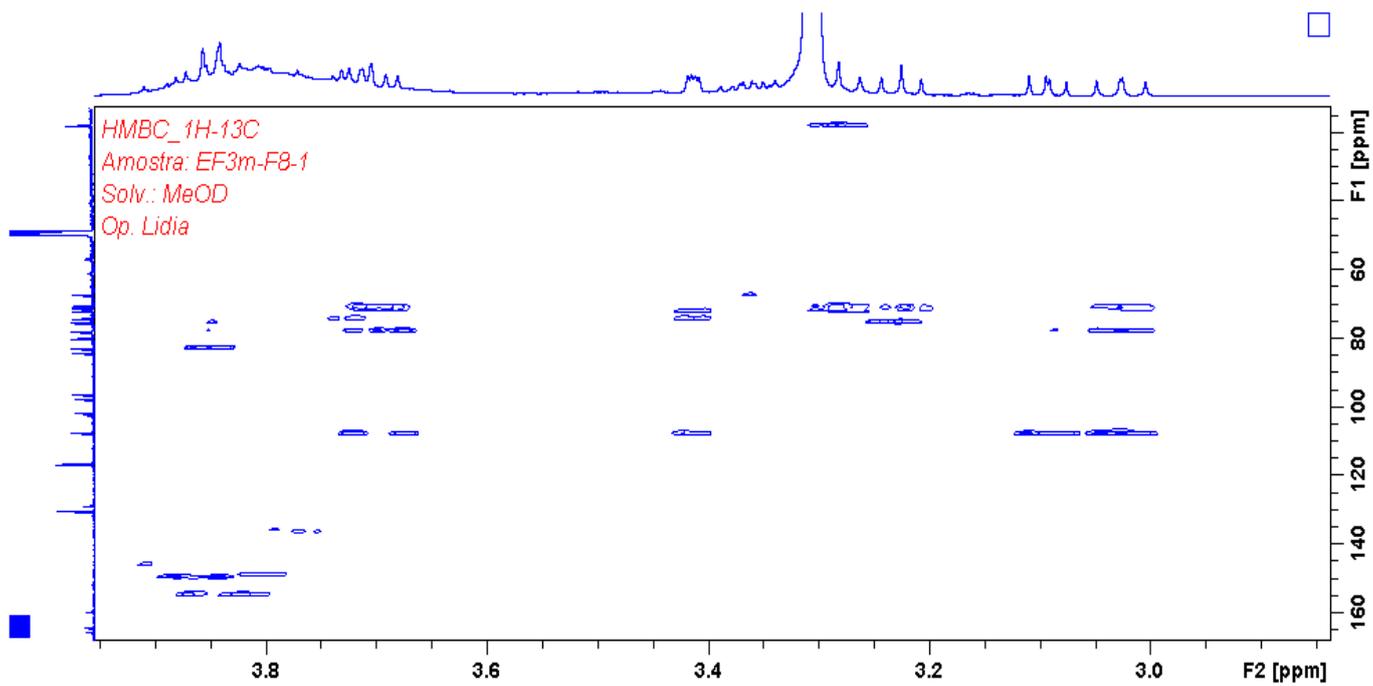


Figura S 48 Ampliação do espectro de HMBC da substância **3** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

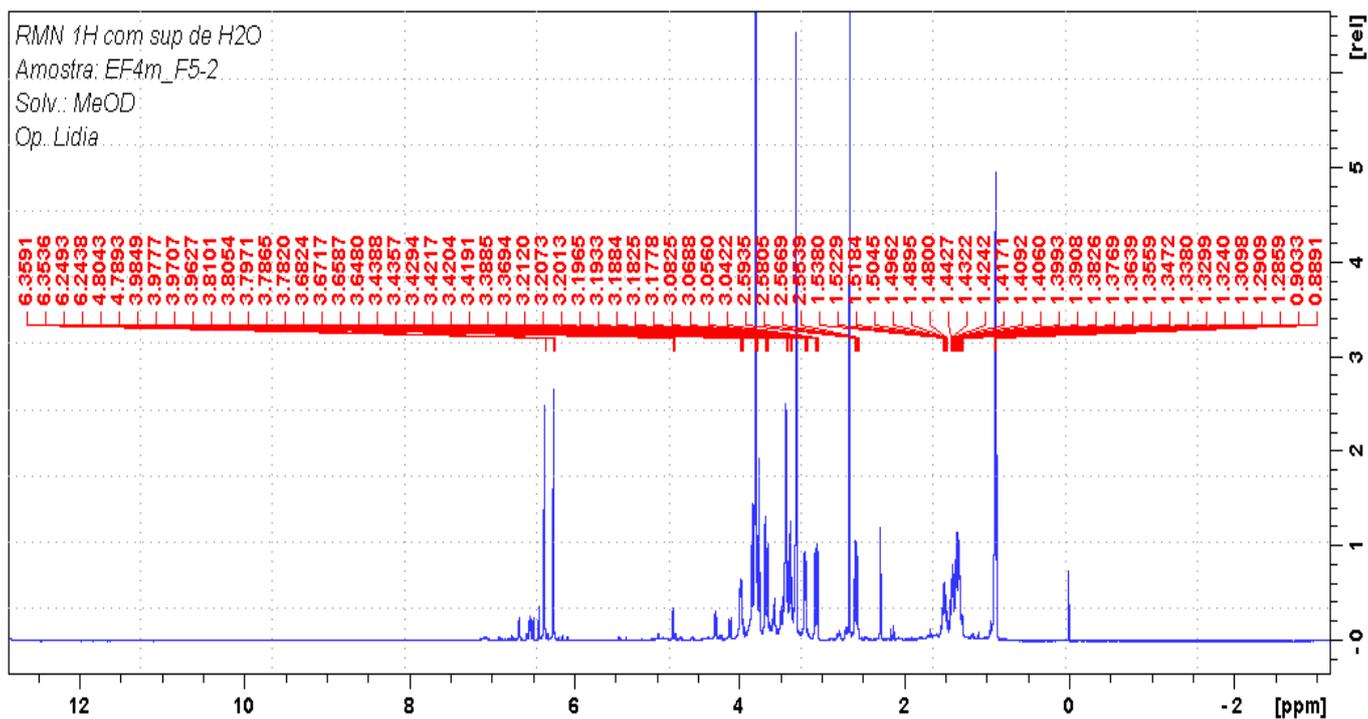


Figura S 49 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 4 (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

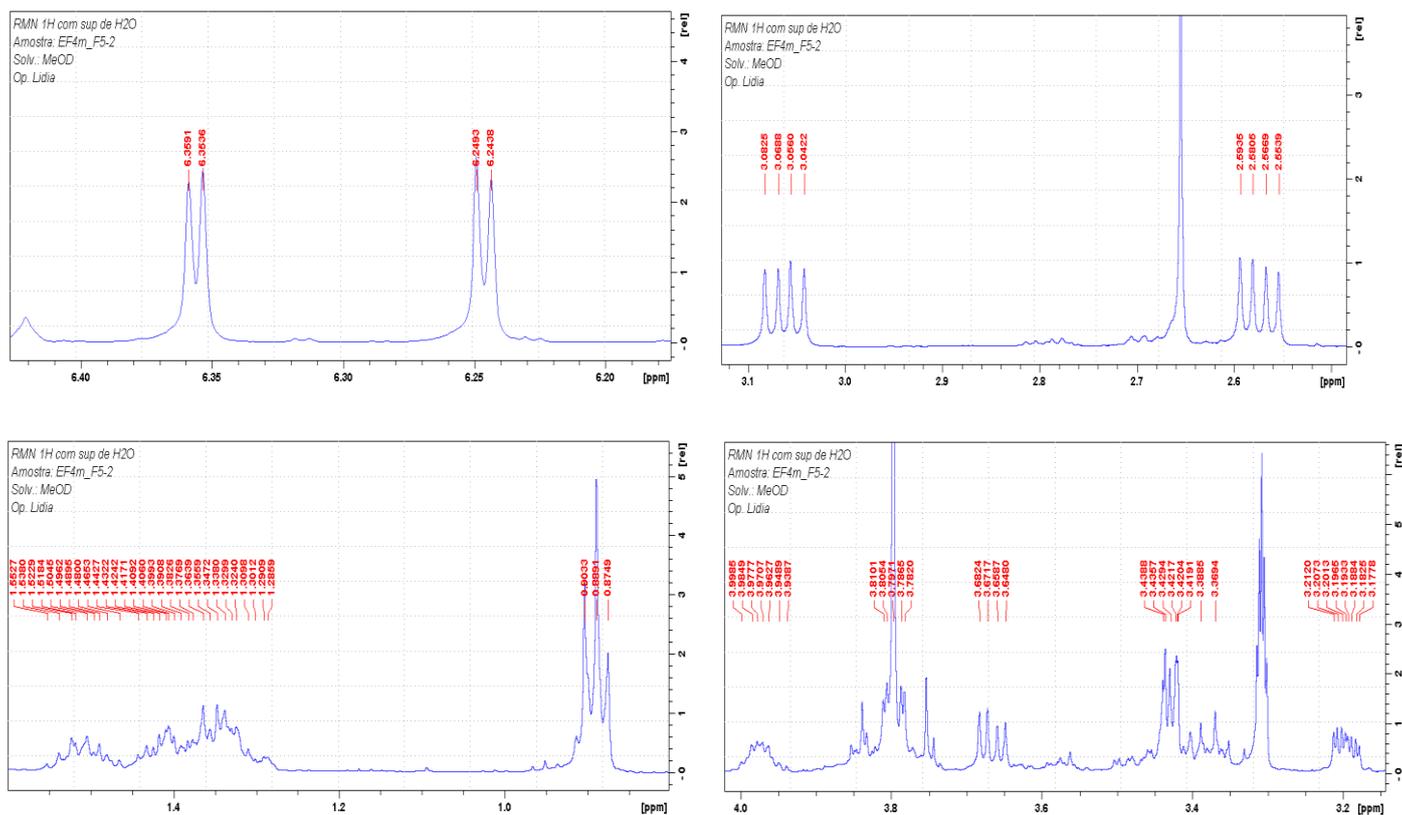


Figura S 50 Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 4 (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

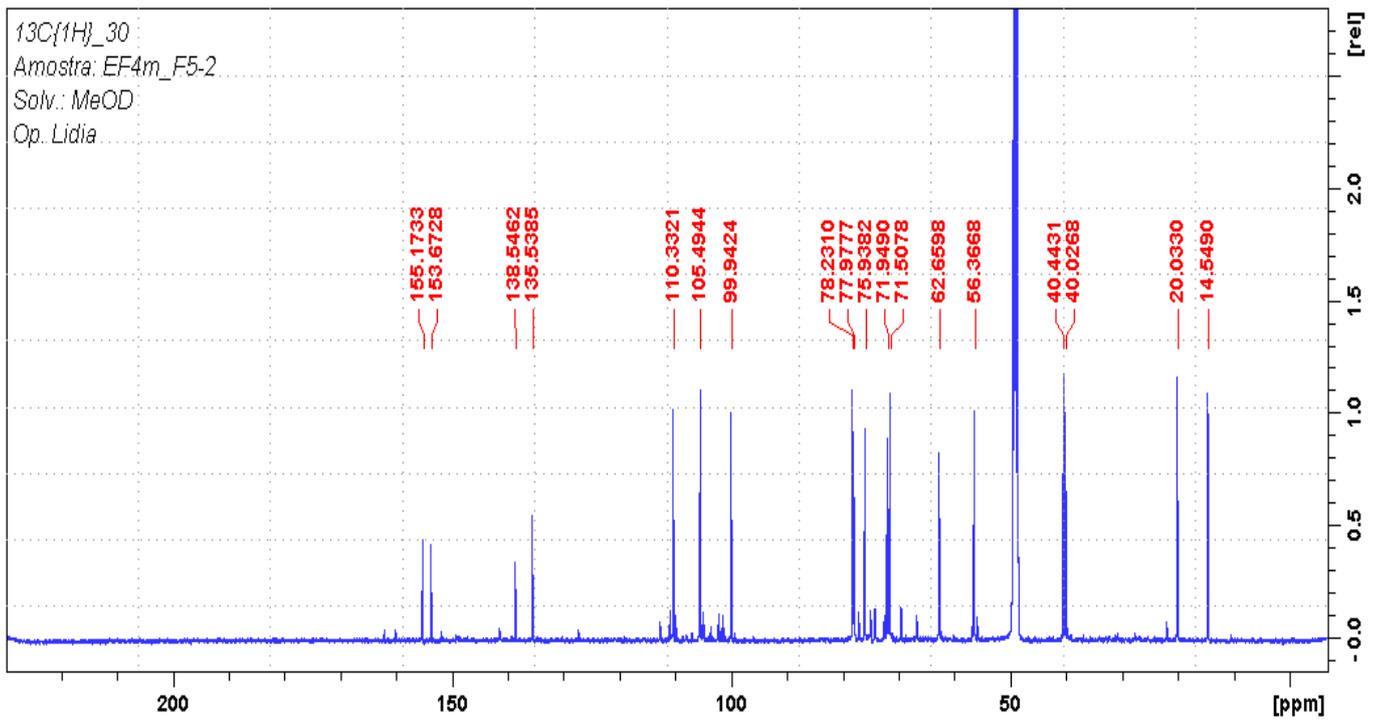


Figura S 51 Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância 4 (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

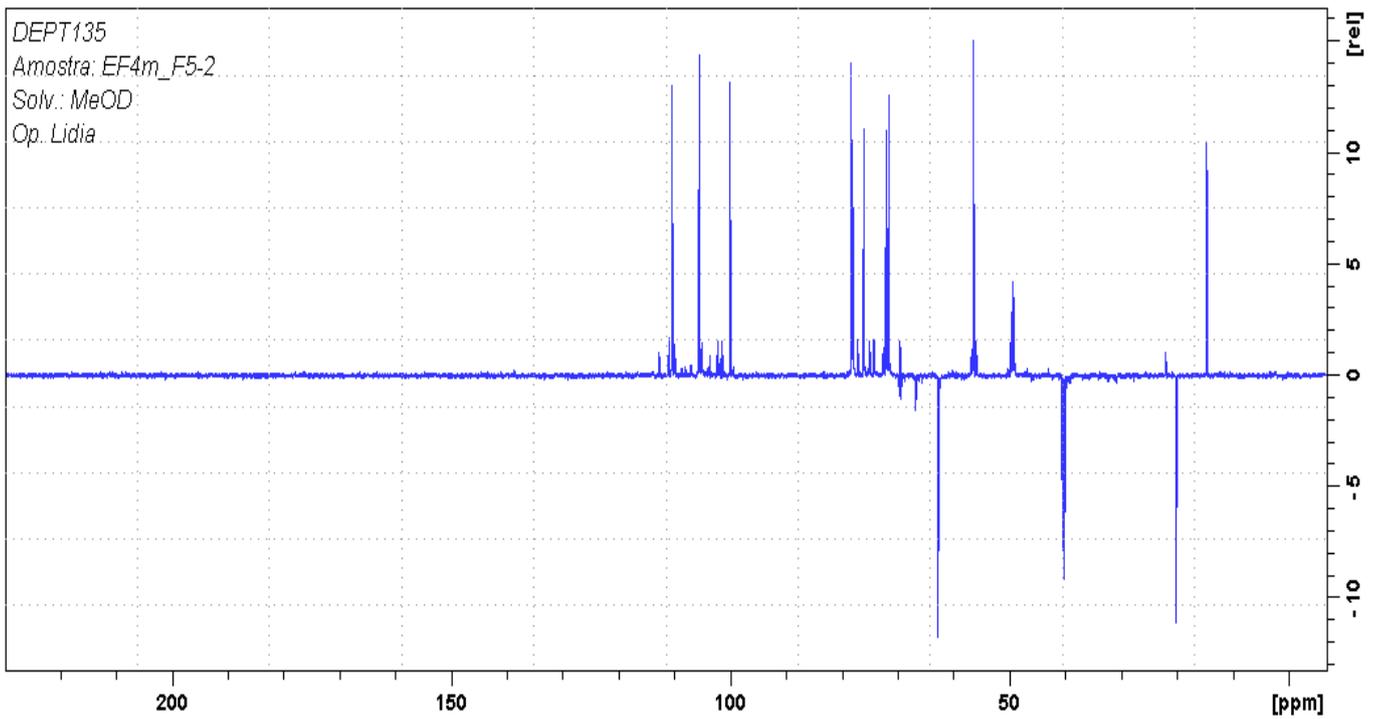


Figura S 52 Espectro de DEPT 135 da substância 4 (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

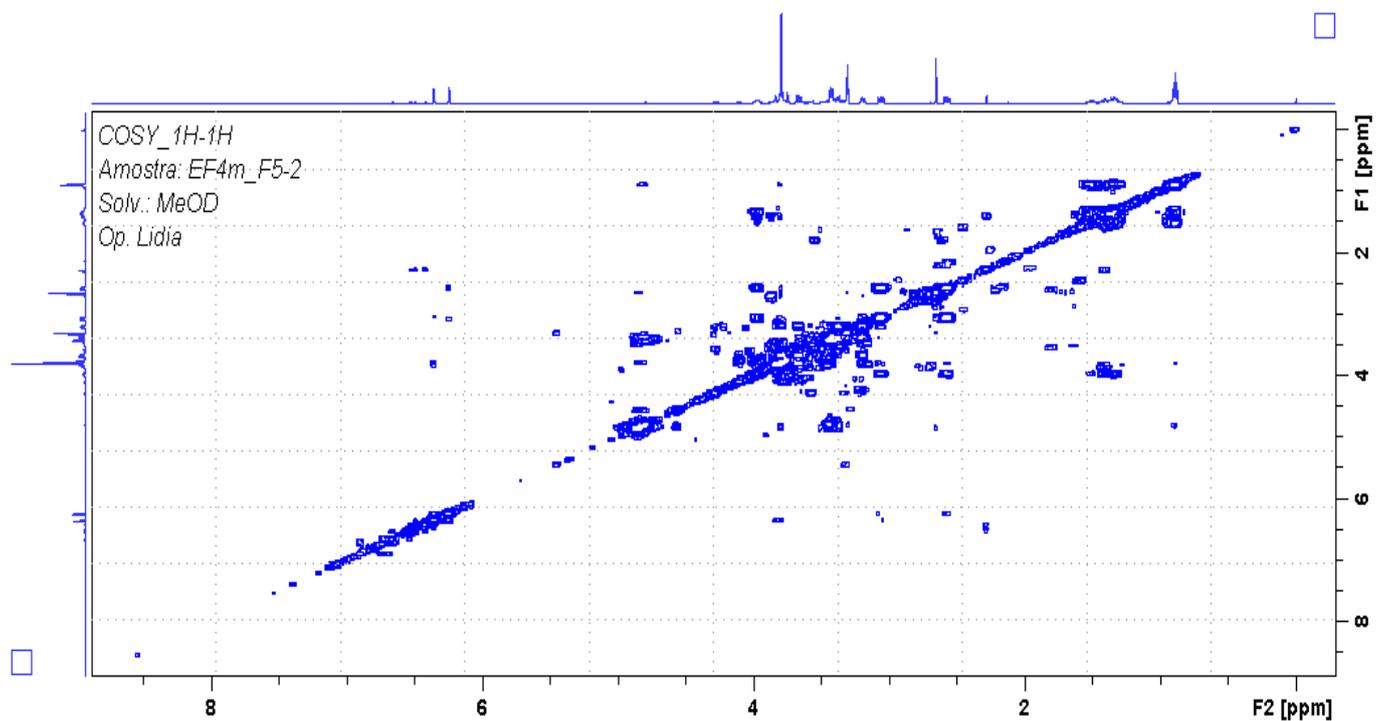


Figura S 53 Espectro de COSY da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

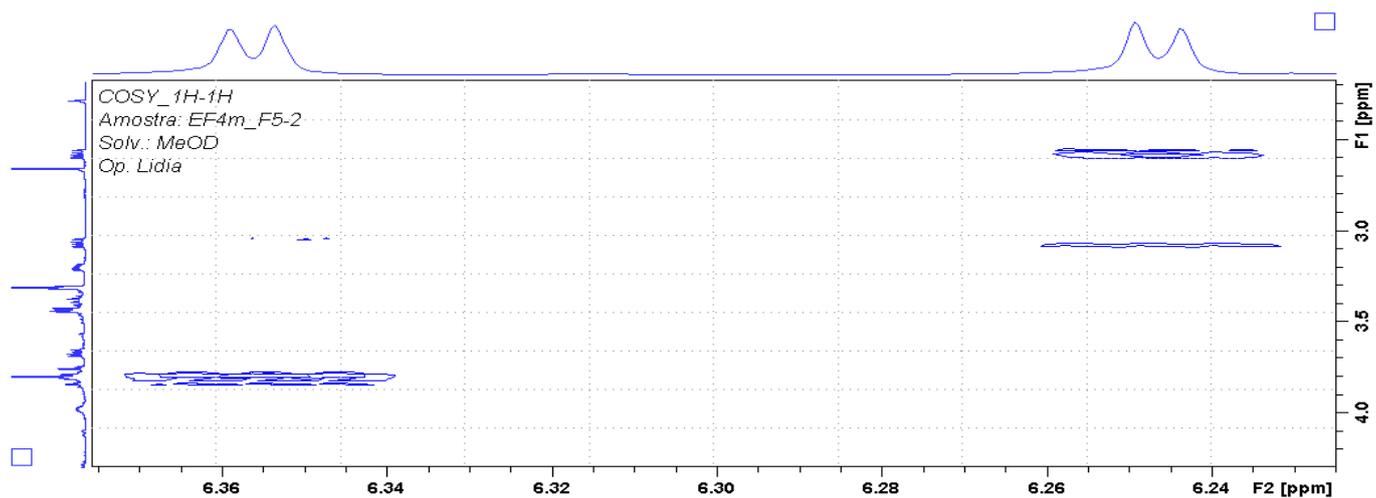


Figura S 54 Ampliação do espectro de COSY da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

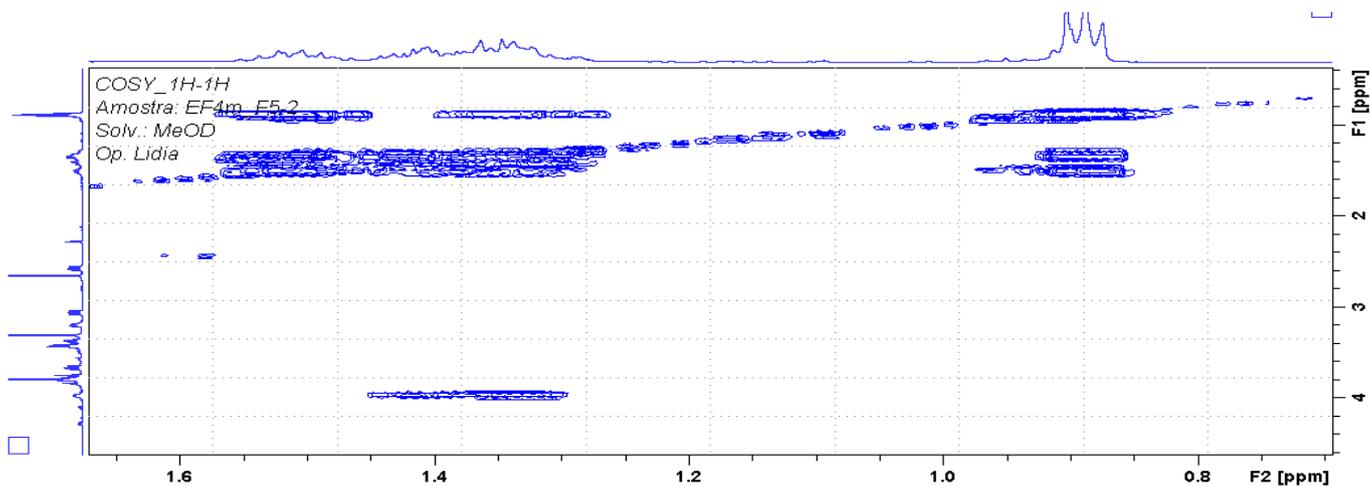


Figura S 55 Ampliação do espectro de COSY da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

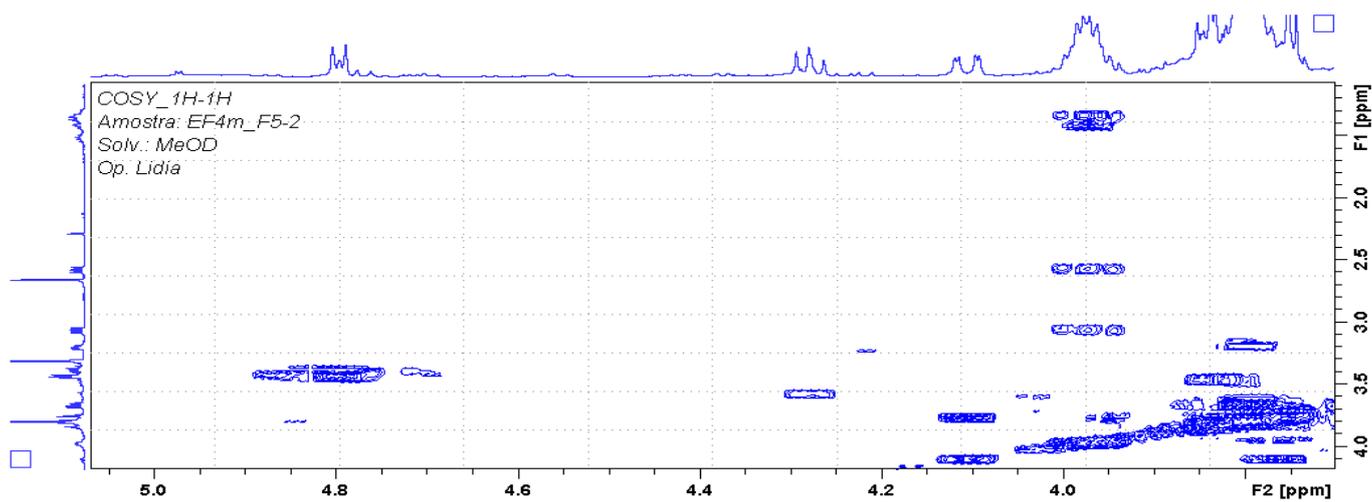


Figura S 56 Ampliação do espectro de COSY da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

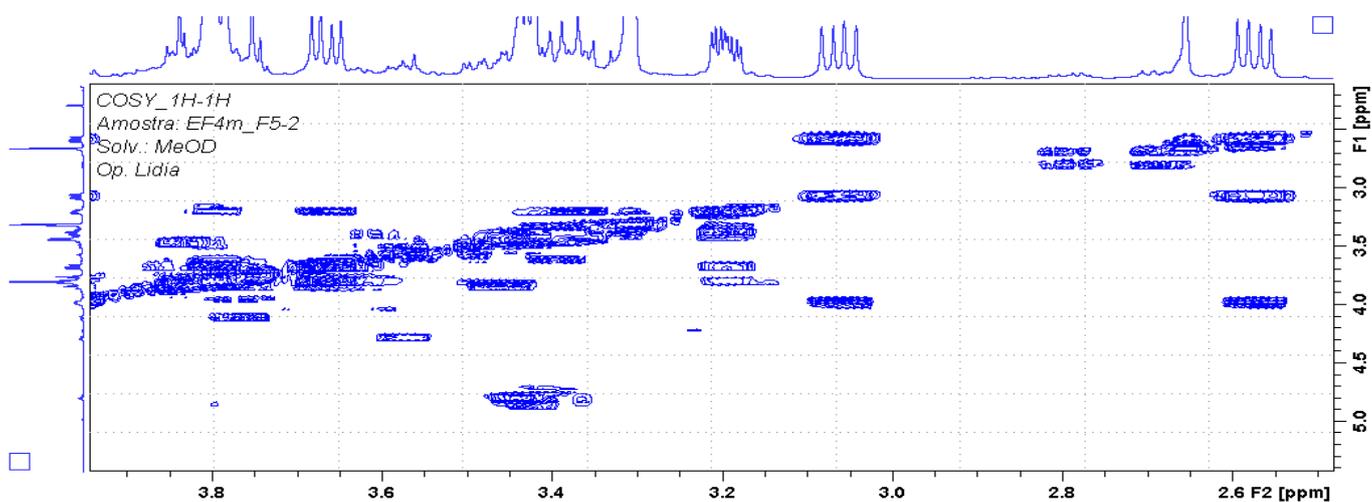


Figura S 57 Ampliação do espectro de COSY da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

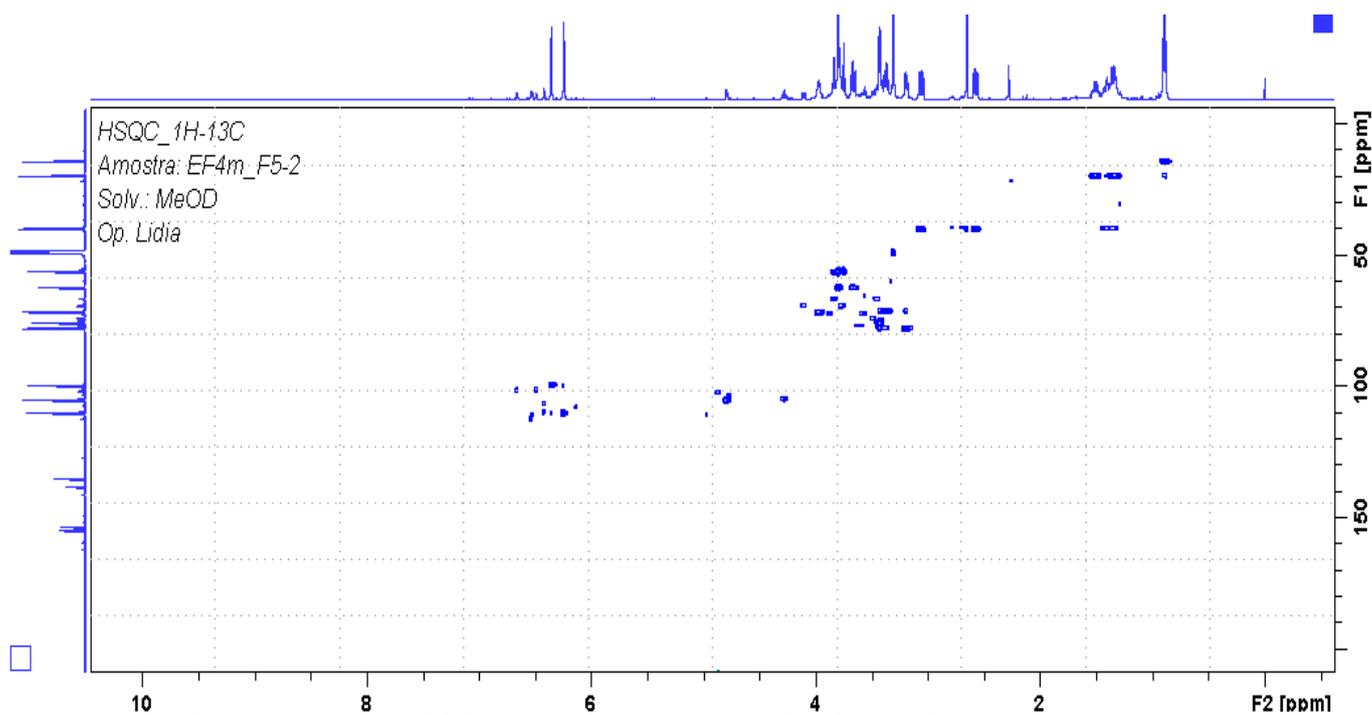


Figura S 58 Espectro de HSQC da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

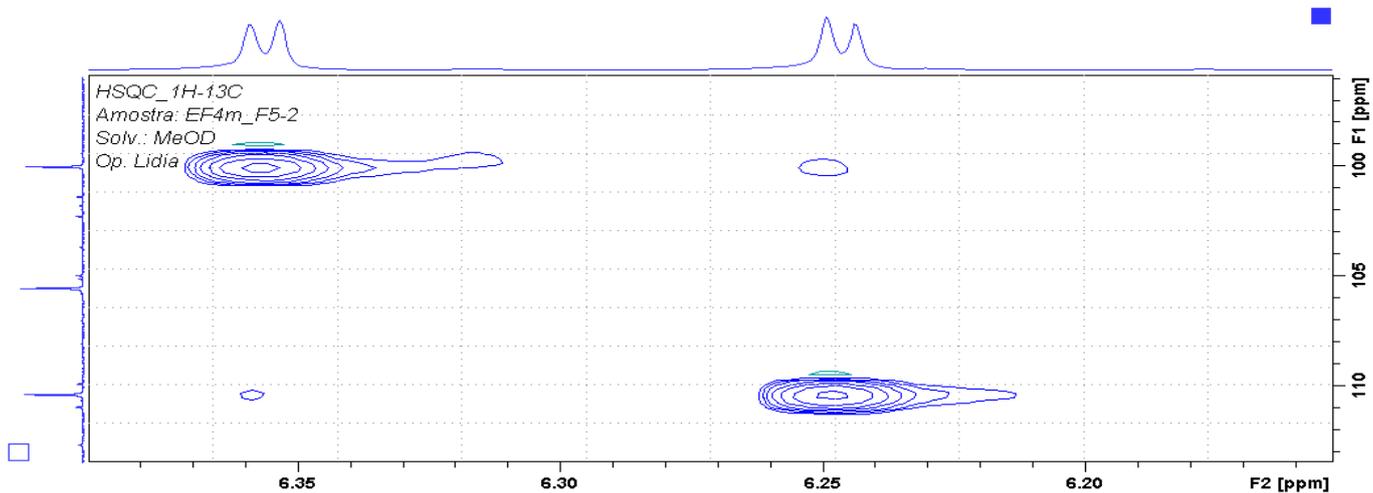


Figura S 59 Ampliação do espectro de HSQC da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

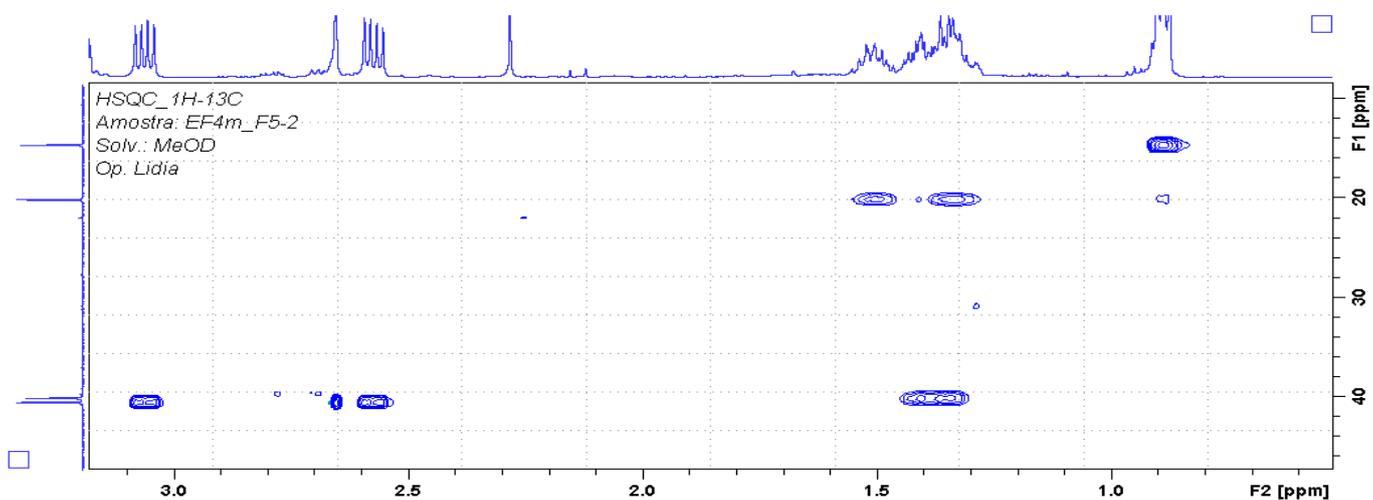


Figura S 60 Ampliação do espectro de HSQC da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

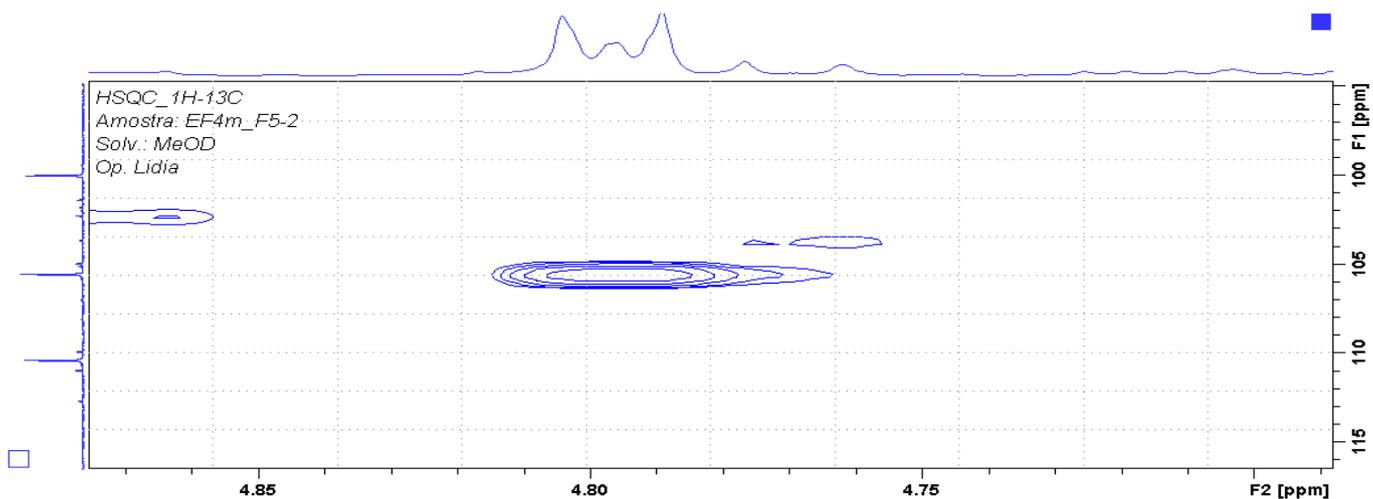


Figura S 61 Ampliação do espectro de HSQC da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

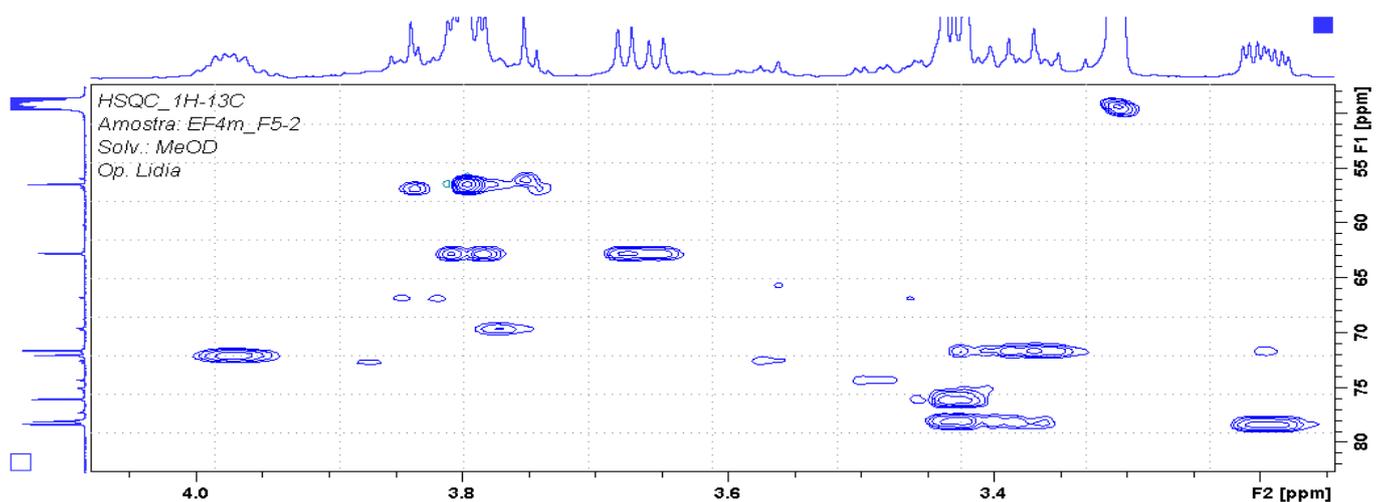


Figura S 62 Ampliação do espectro de HSQC da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

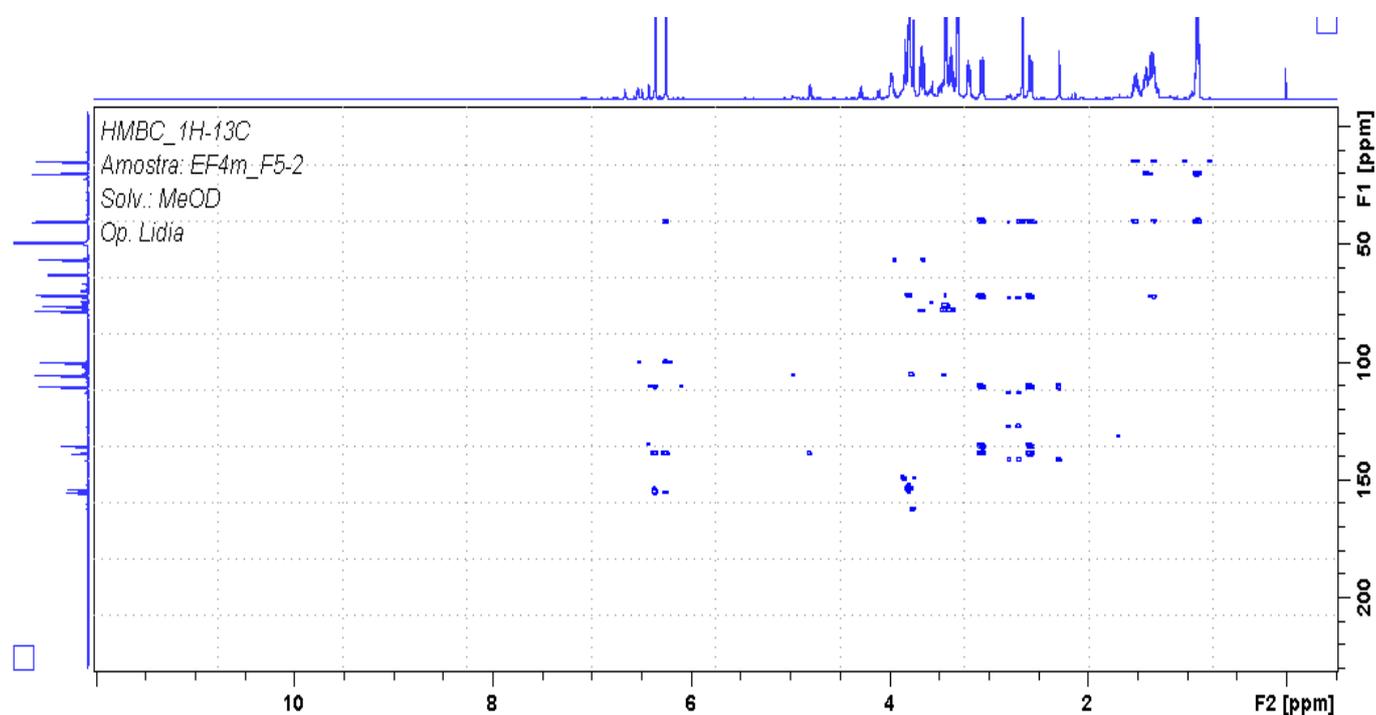


Figura S 63 Espectro de HMBC da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

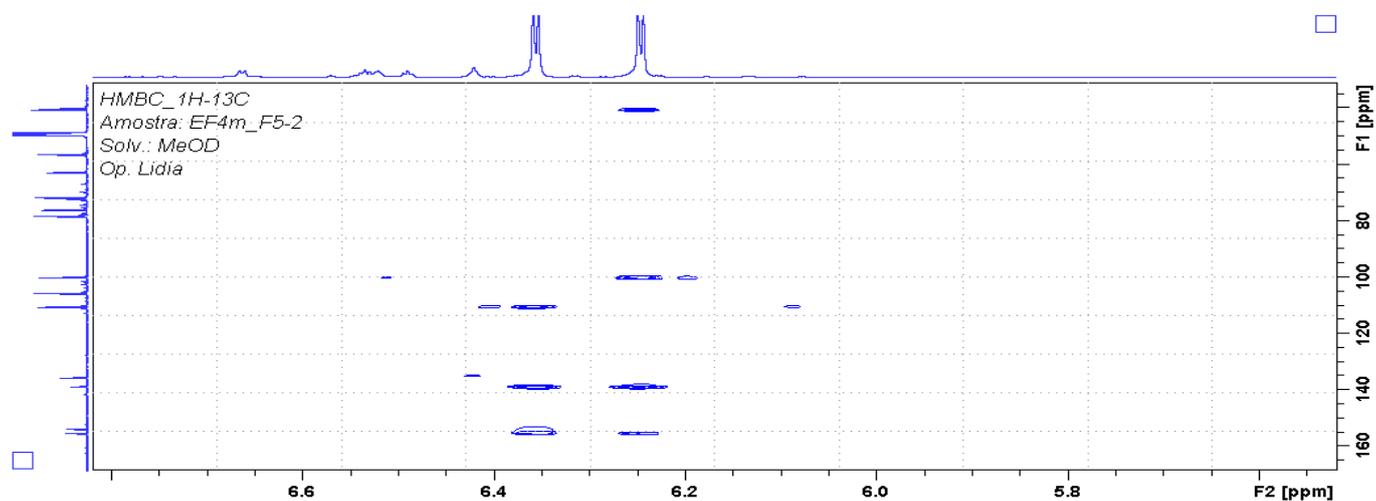


Figura S 64 Ampliação do espectro de HMBC da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

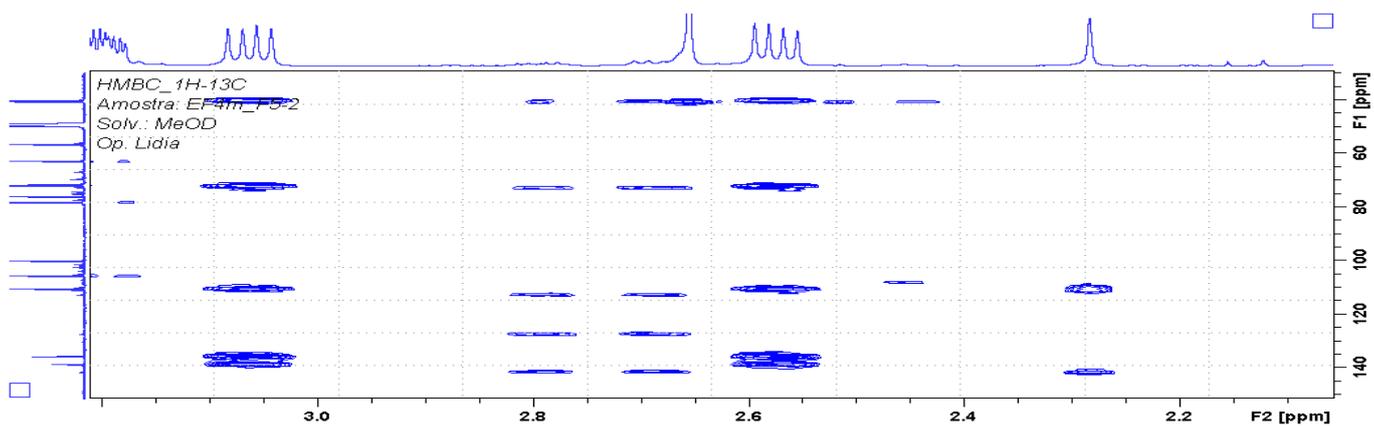


Figura S 65 Ampliação do espectro de HMBC da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

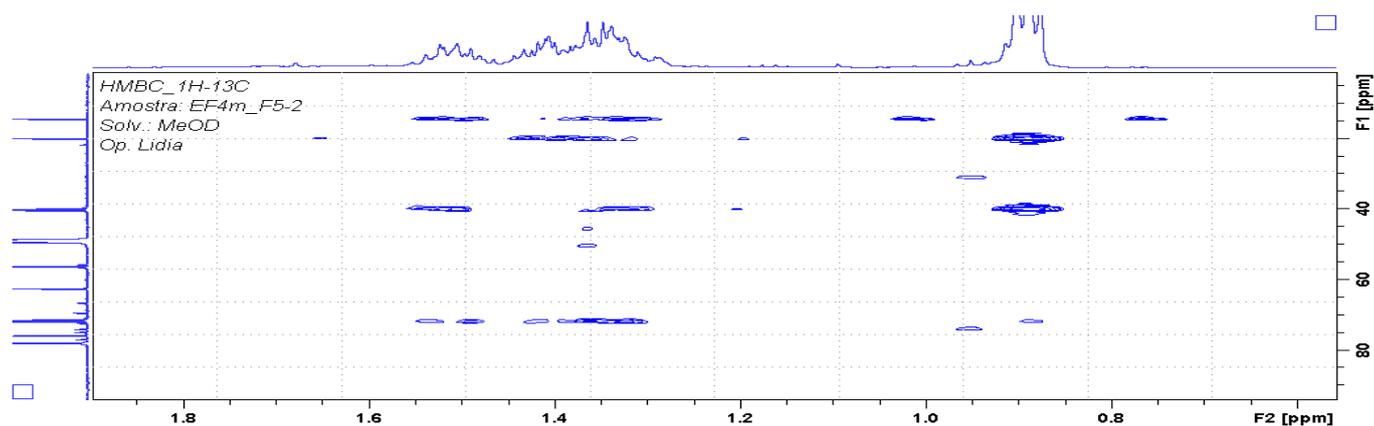


Figura S 66 Ampliação do espectro de HMBC da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

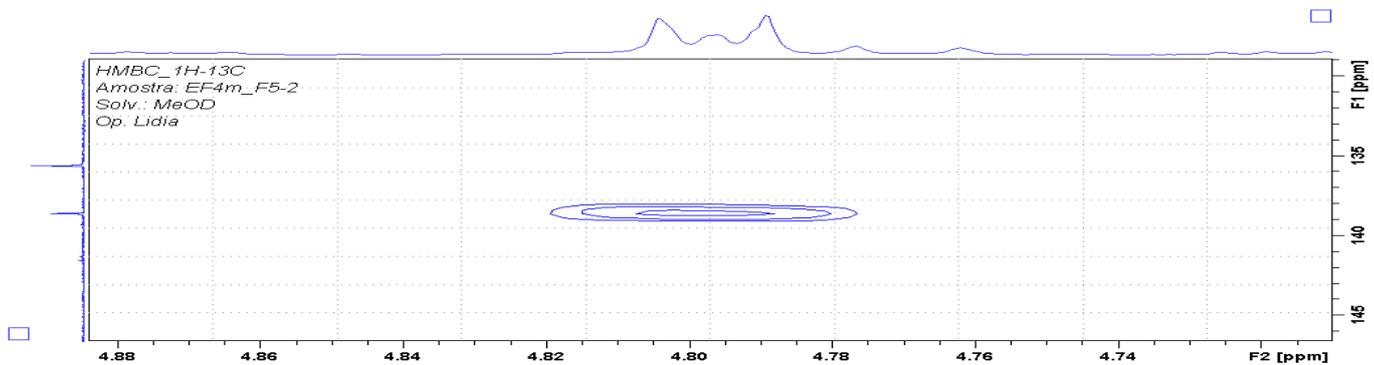


Figura S 67 Ampliação do espectro de HMBC da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

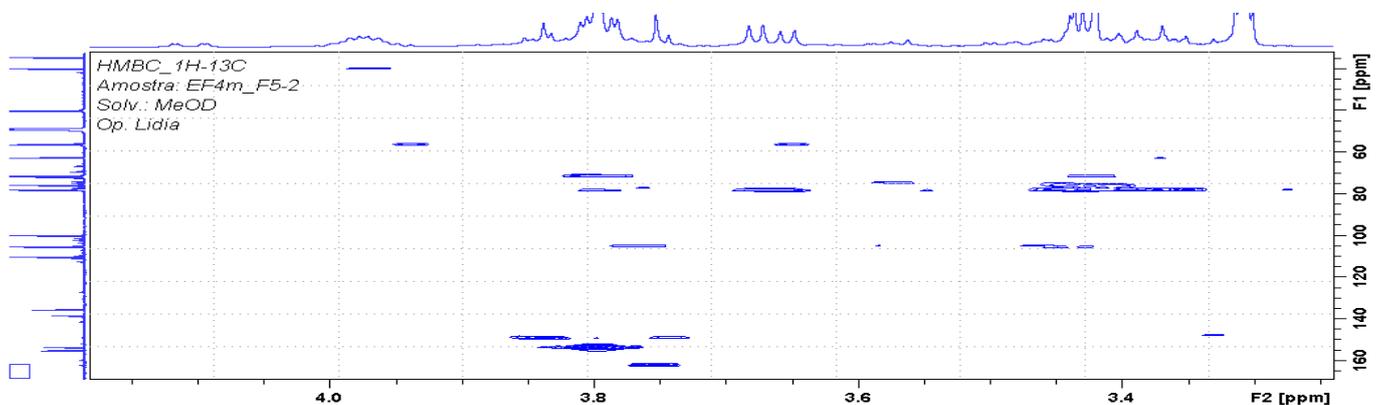


Figura S 68 Ampliação do espectro de HMBC da substância 4 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

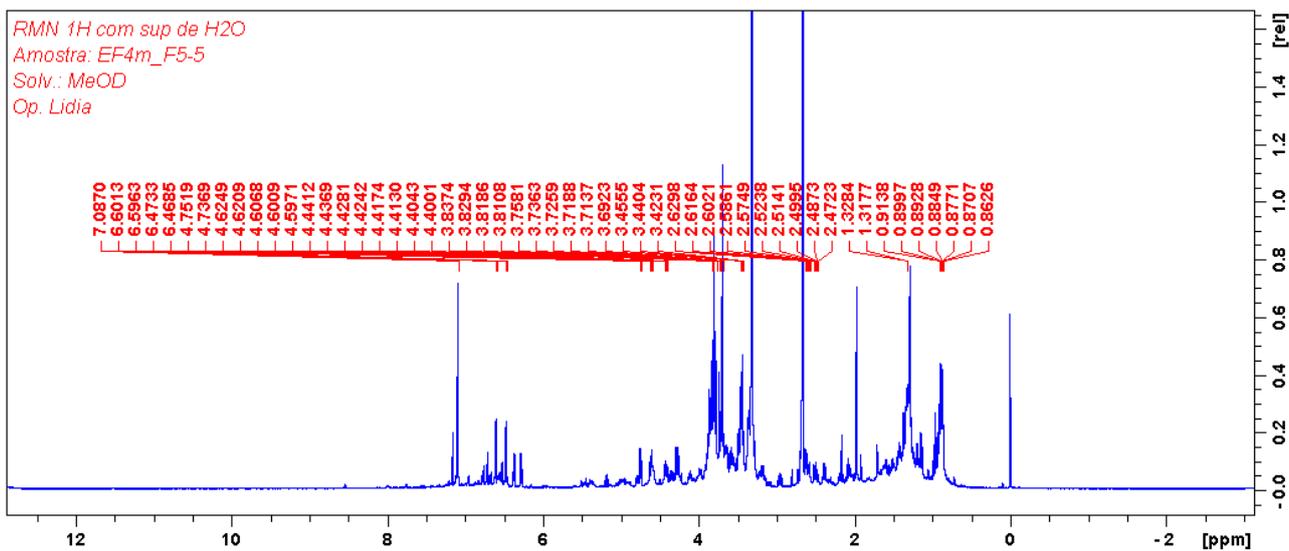


Figura S 69 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 5 (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

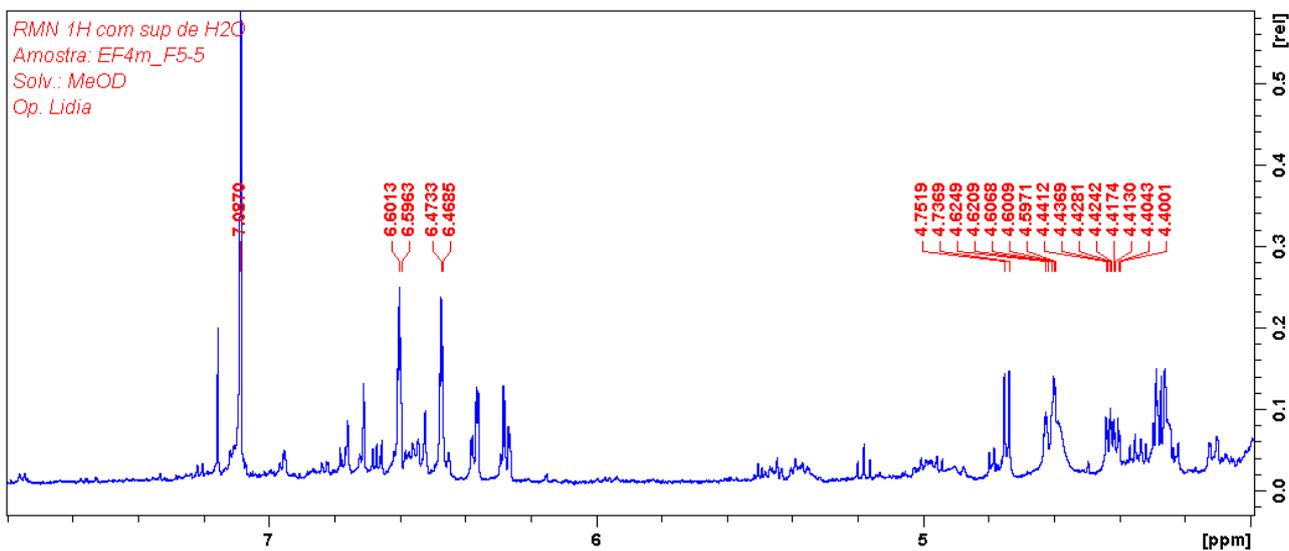


Figura S 70 Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 5 (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

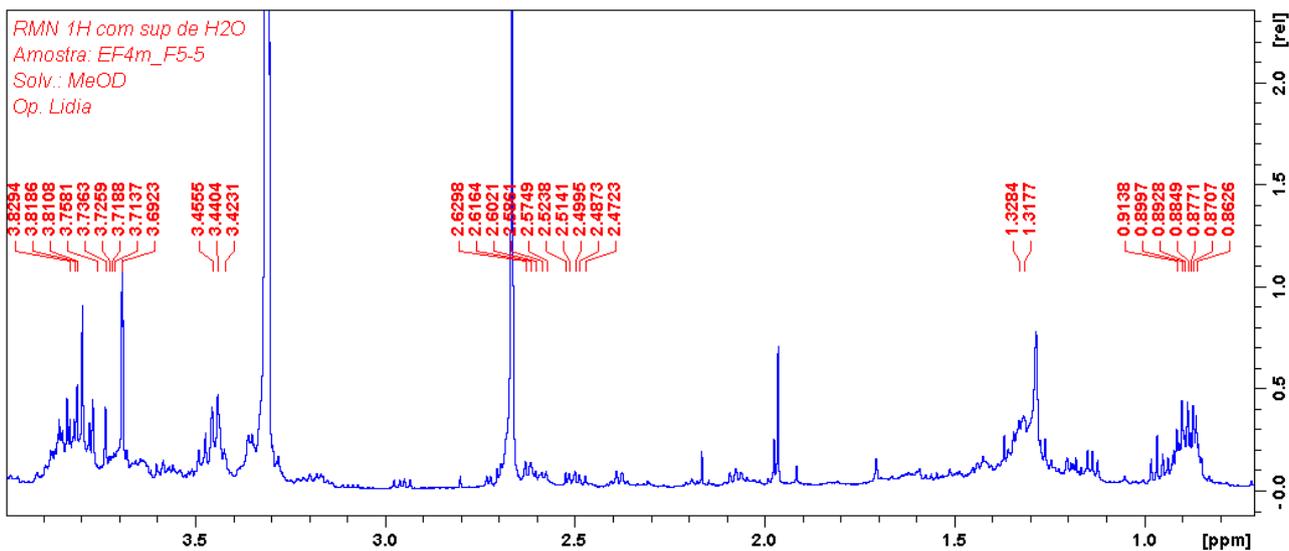


Figura S 71 Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 5 (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

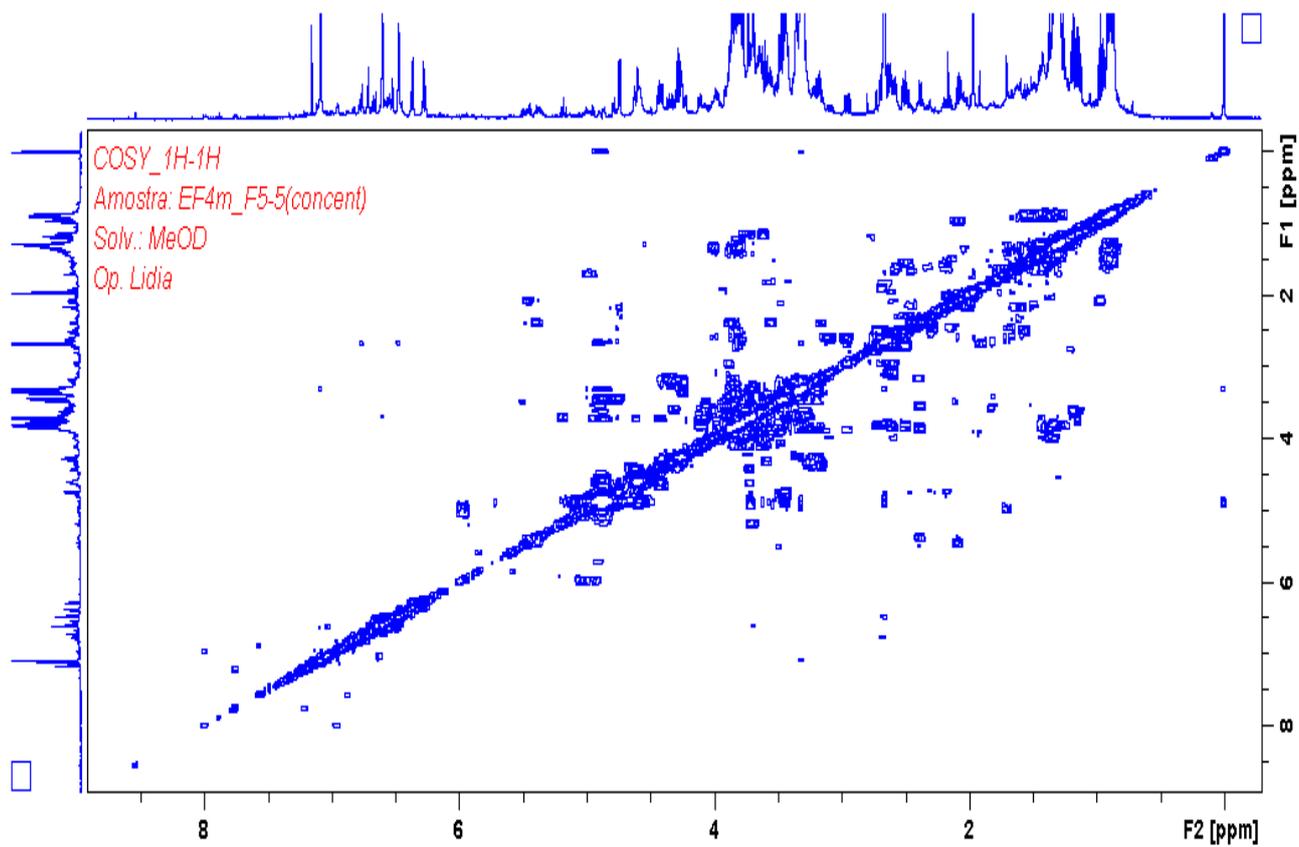


Figura S 72 Espectro de COSY da substância 5 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

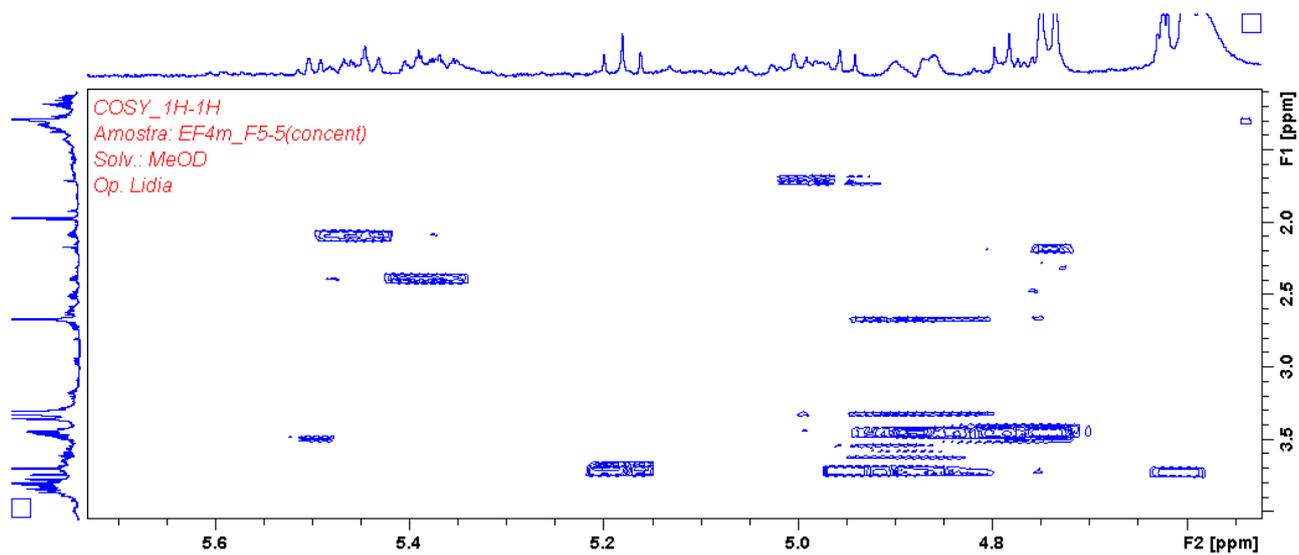


Figura S 73 Ampliação do espectro de COSY da substância 5 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

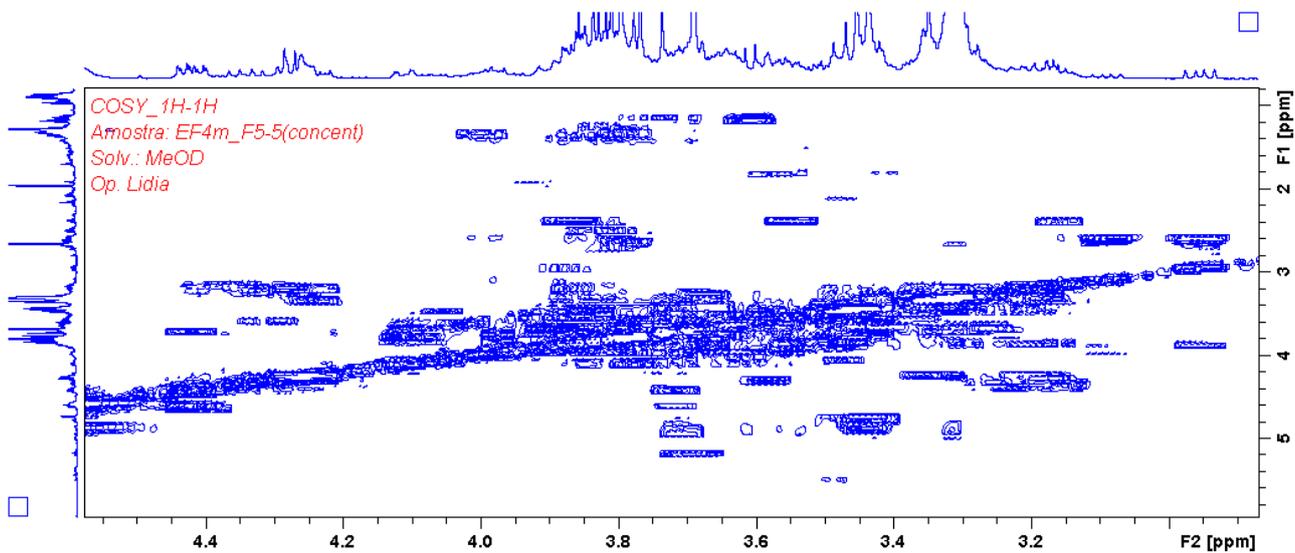


Figura S 74 Ampliação do espectro de COSY da substância 5 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

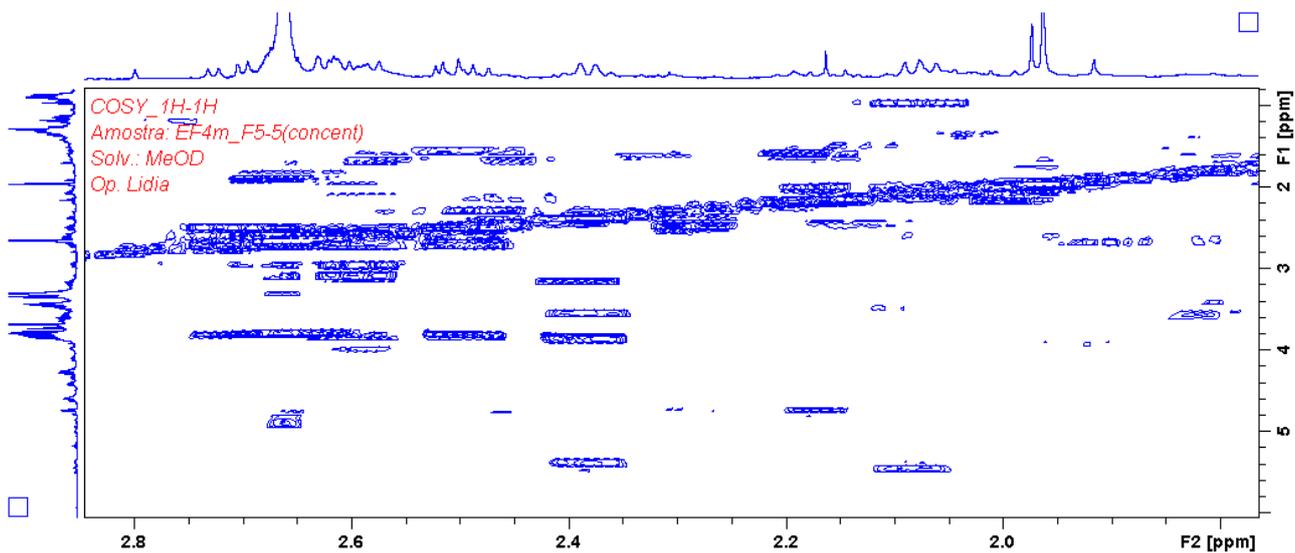


Figura S 75 Ampliação do espectro de COSY da substância 5 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

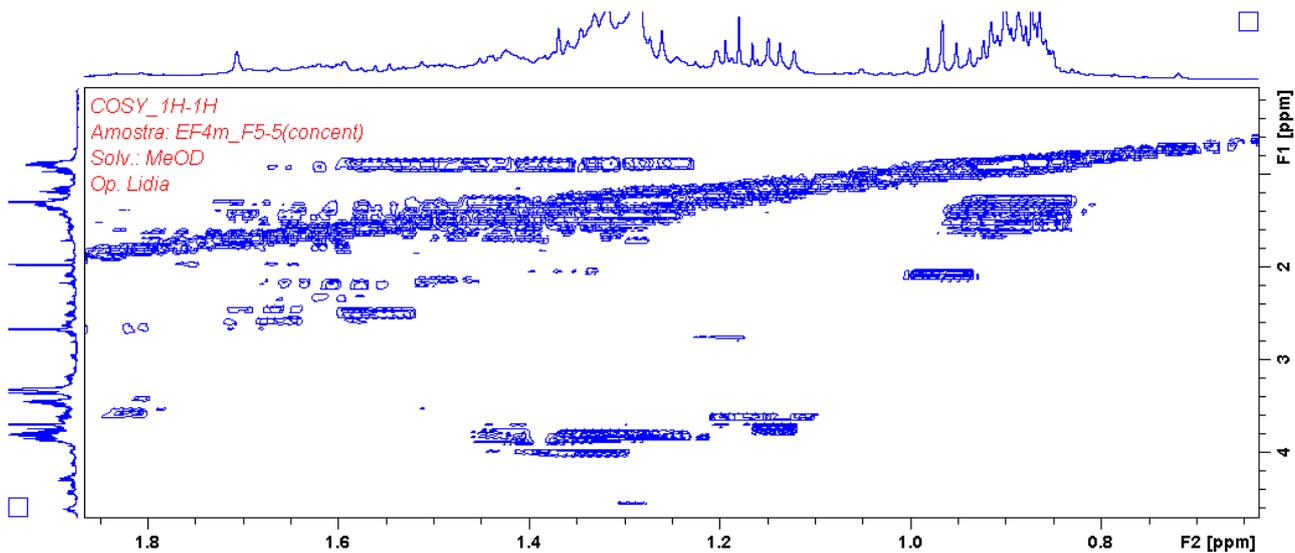


Figura S 76 Ampliação do espectro de COSY da substância 5 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

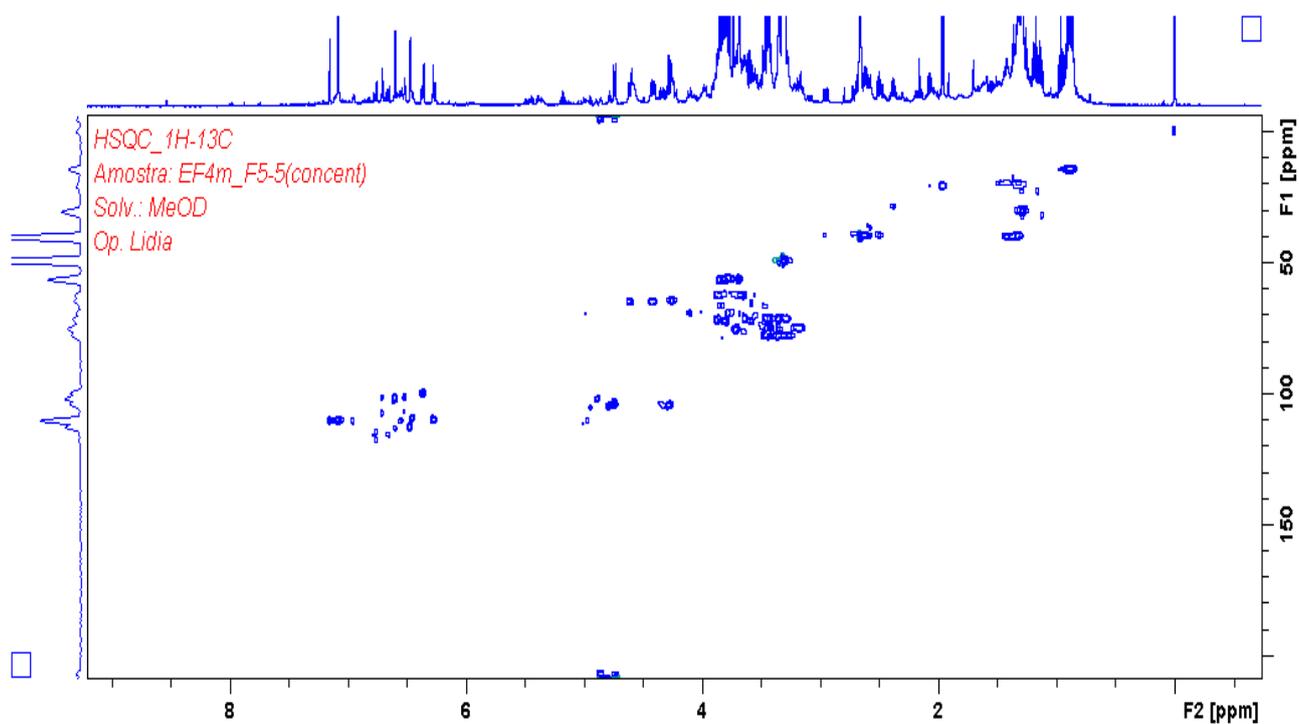


Figura S 77 Espectro de HSQC da substância 5. (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS)

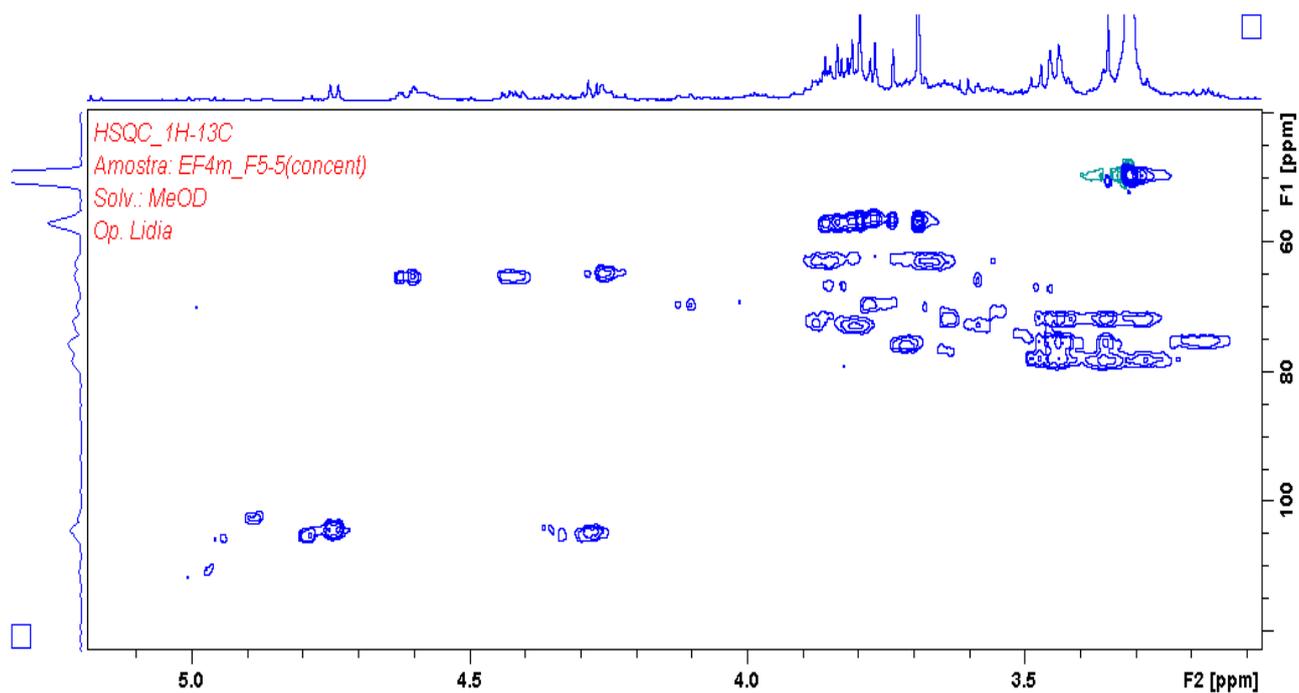


Figura S 78 Ampliação do espectro de HSQC da substância 5 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

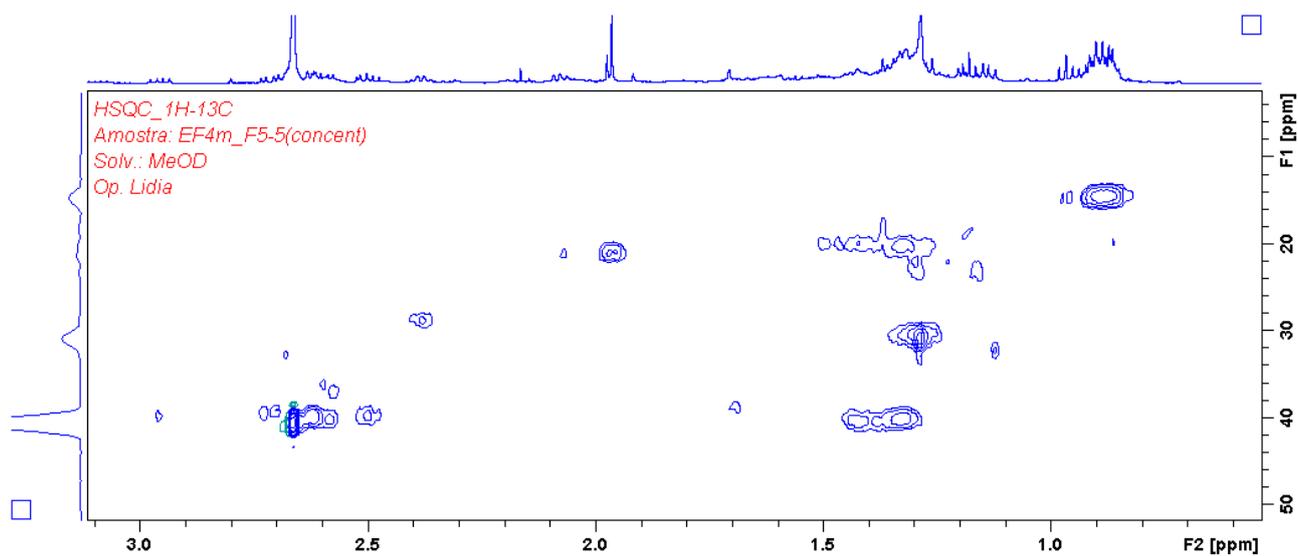


Figura S 79 Ampliação do espectro de HSQC da substância **5** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

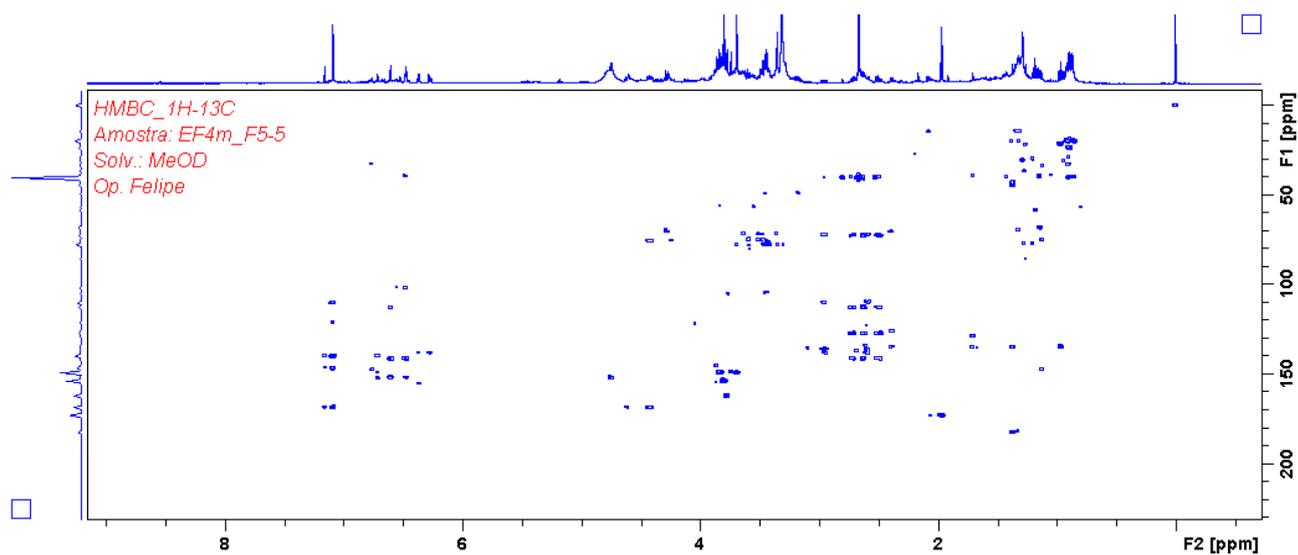


Figura S 80 Espectro de HMBC da substância **5** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

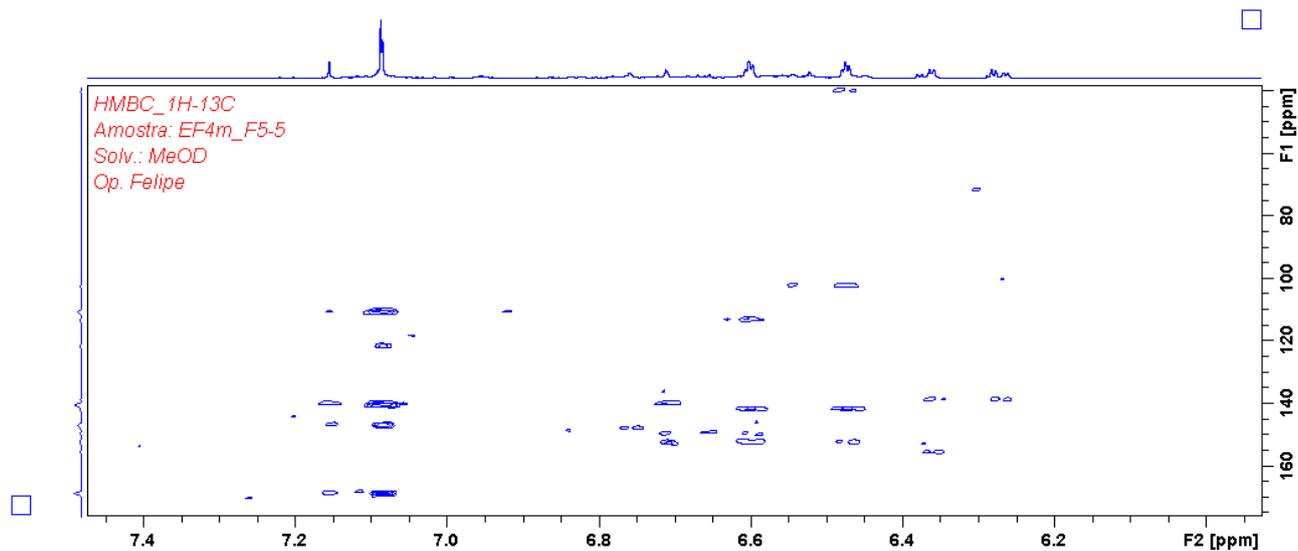


Figura S 81 Ampliação do espectro de HMBC da substância **5** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

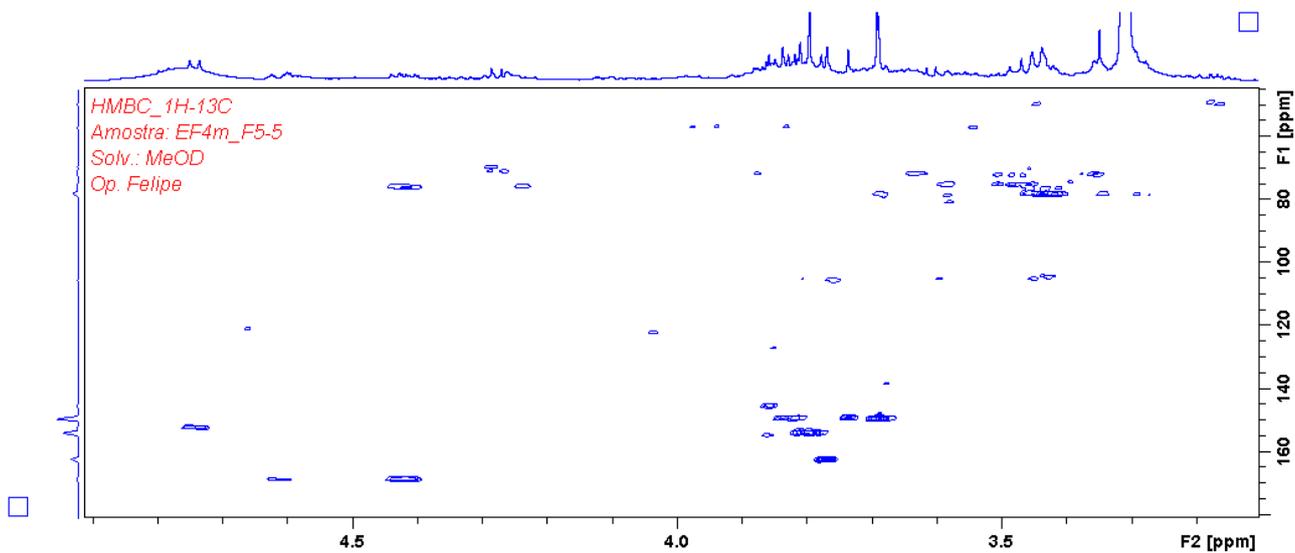


Figura S 82 Ampliação do espectro de HMBC da substância **5** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

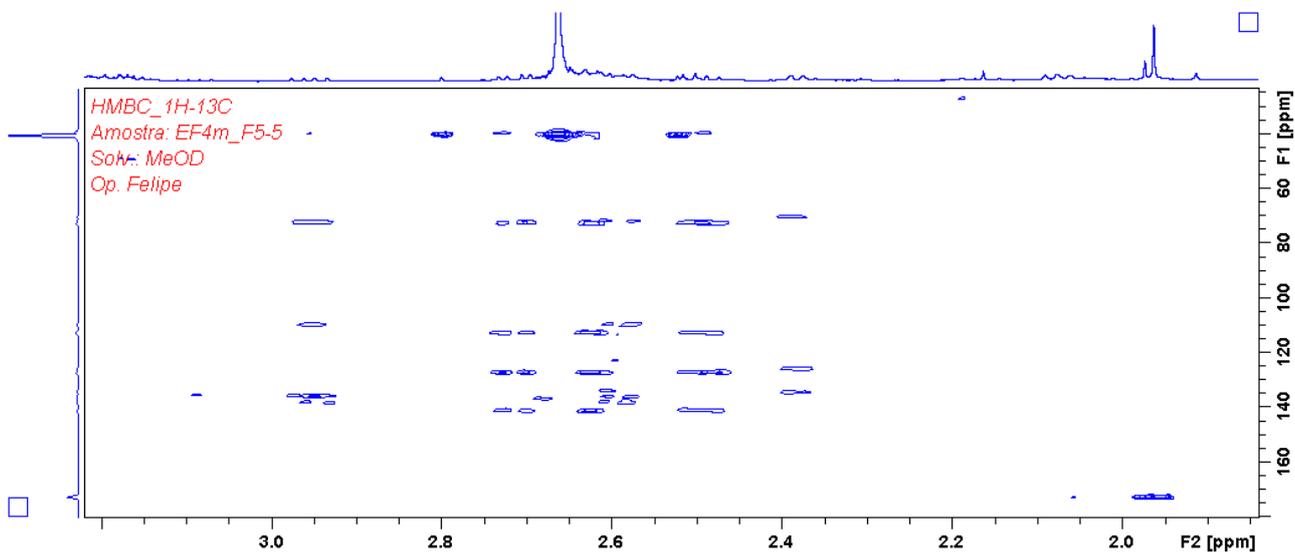


Figura S 83 Ampliação do espectro de HMBC da substância **5** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

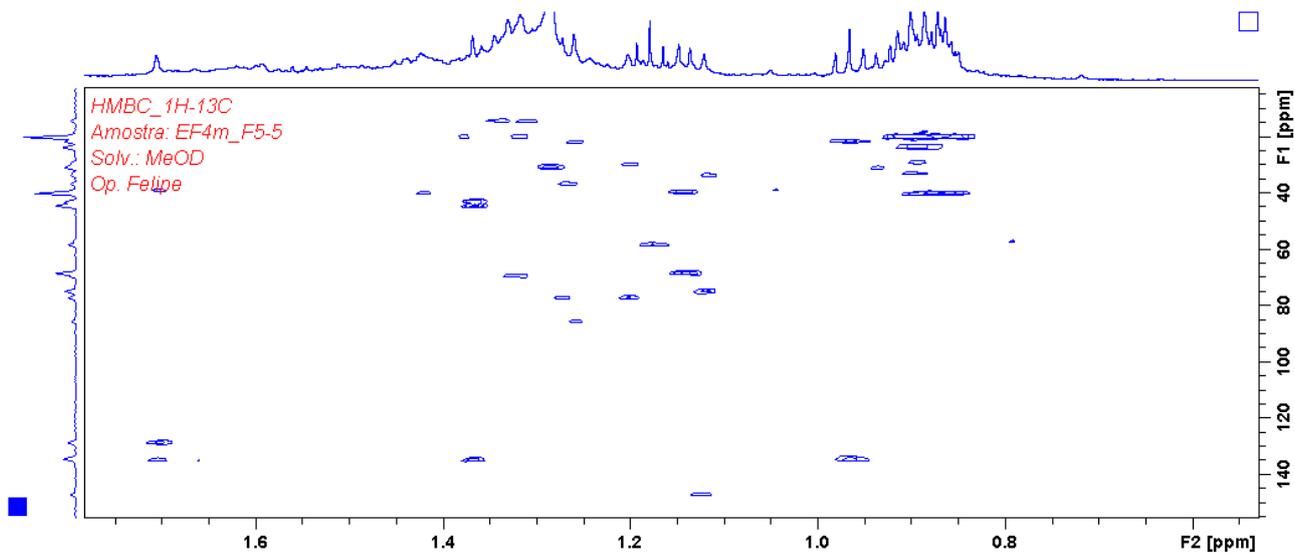


Figura S 84 Ampliação do espectro de HMBC da substância **5** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

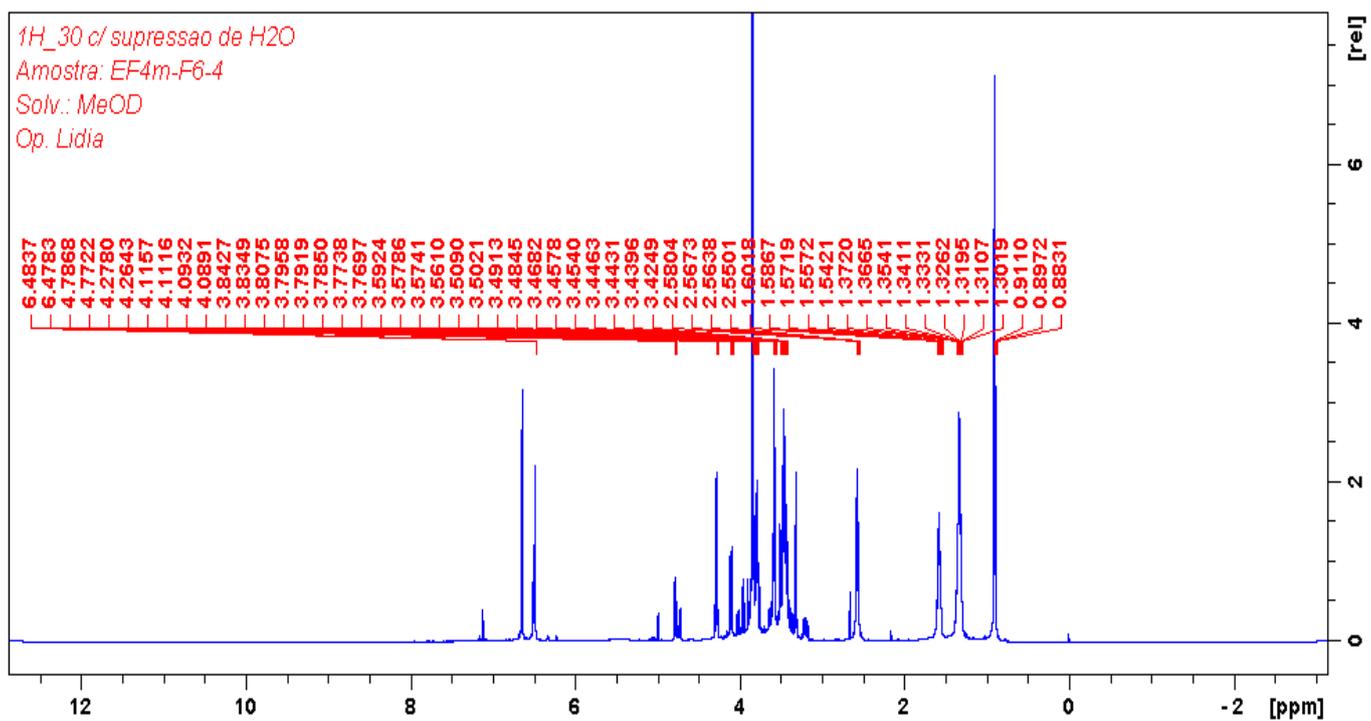


Figura S 85 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 7 (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

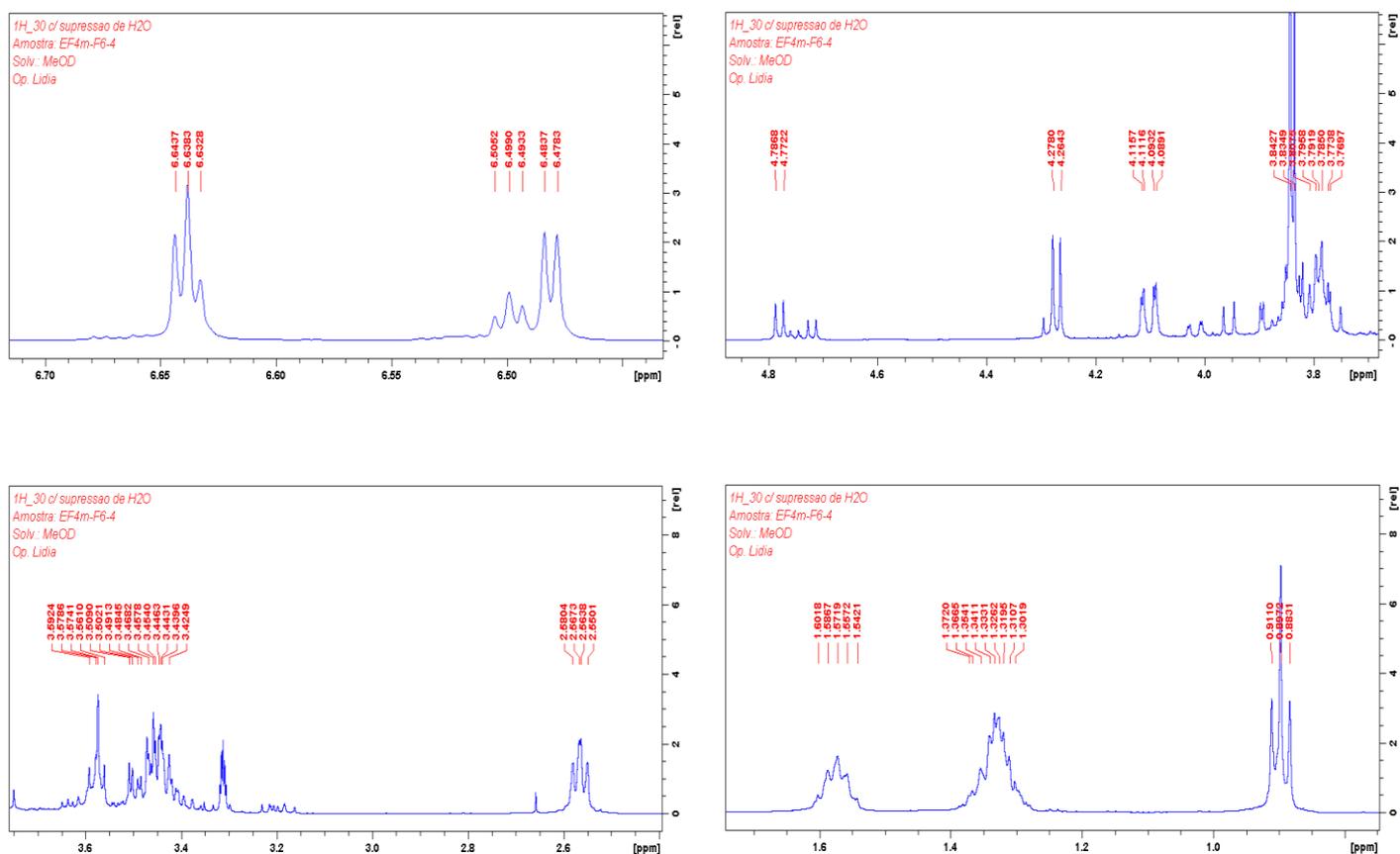


Figura S 86 Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 7 (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

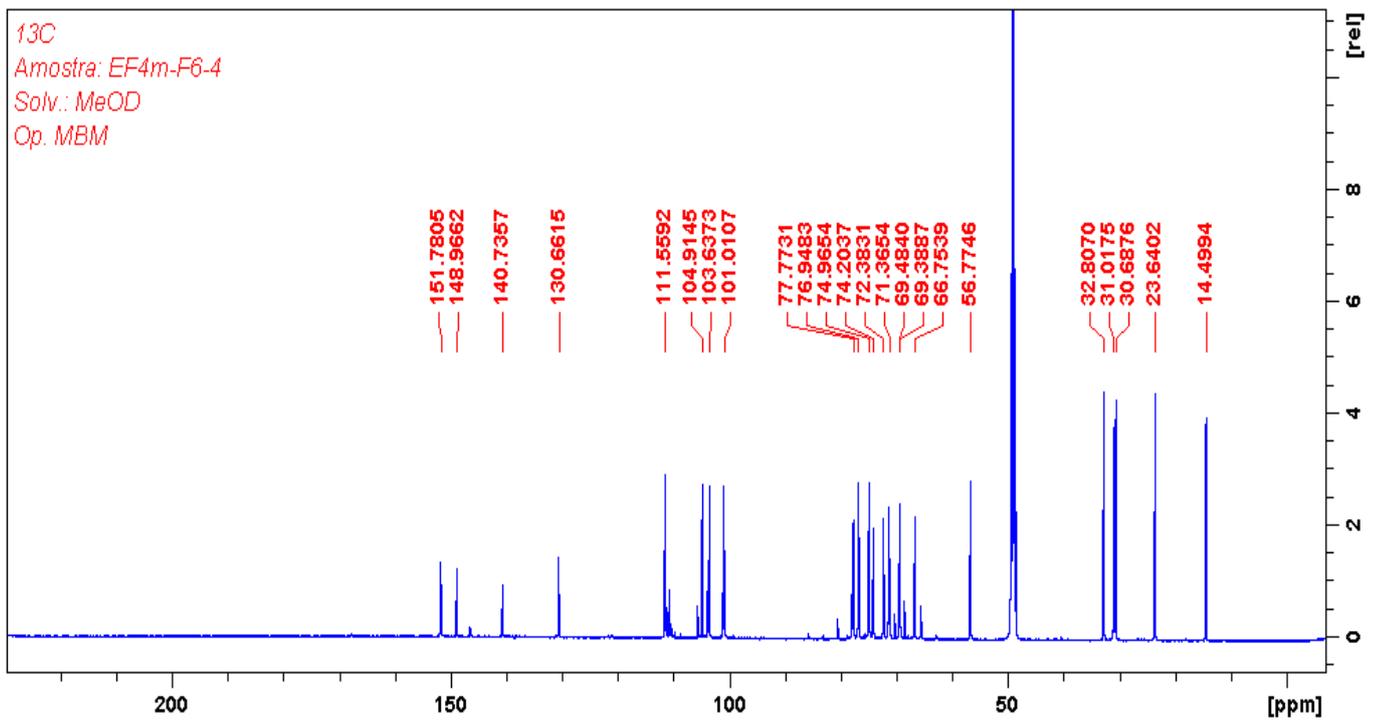


Figura S 87 Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

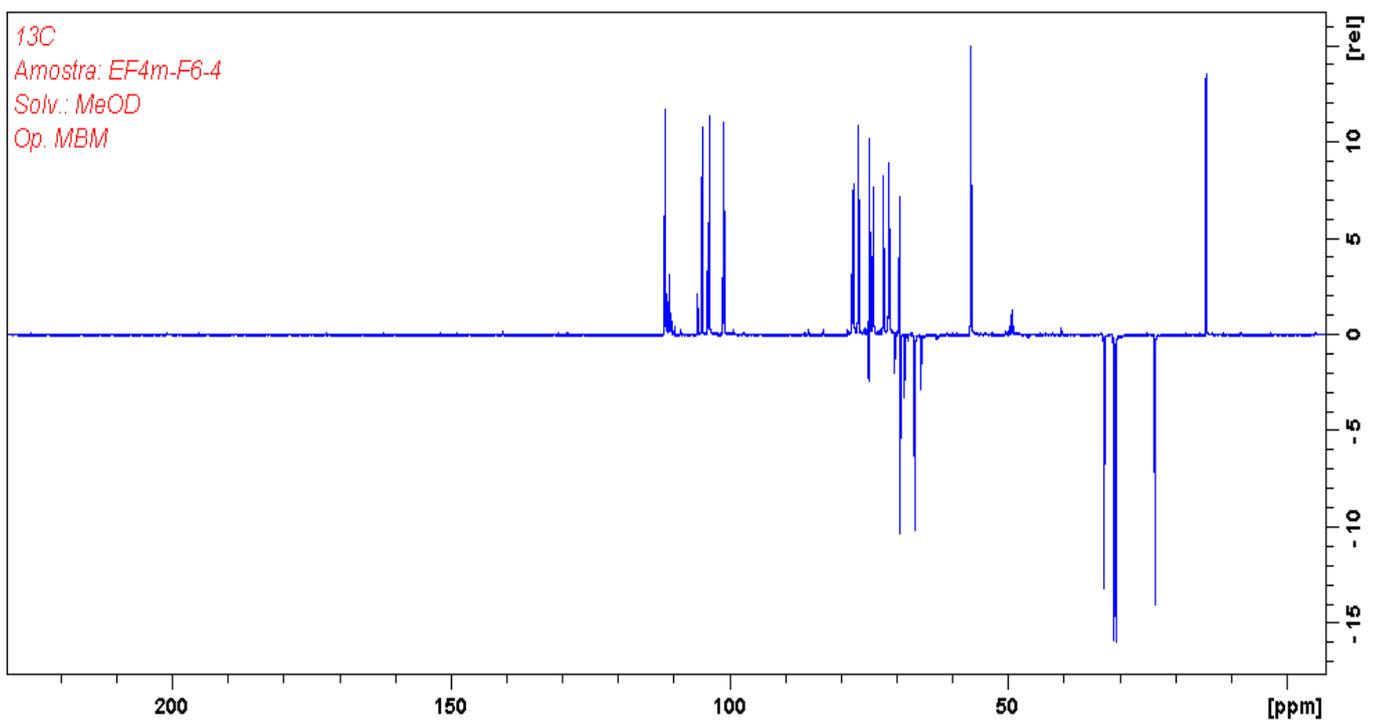


Figura S 88 Espectro de DEPT 135 da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

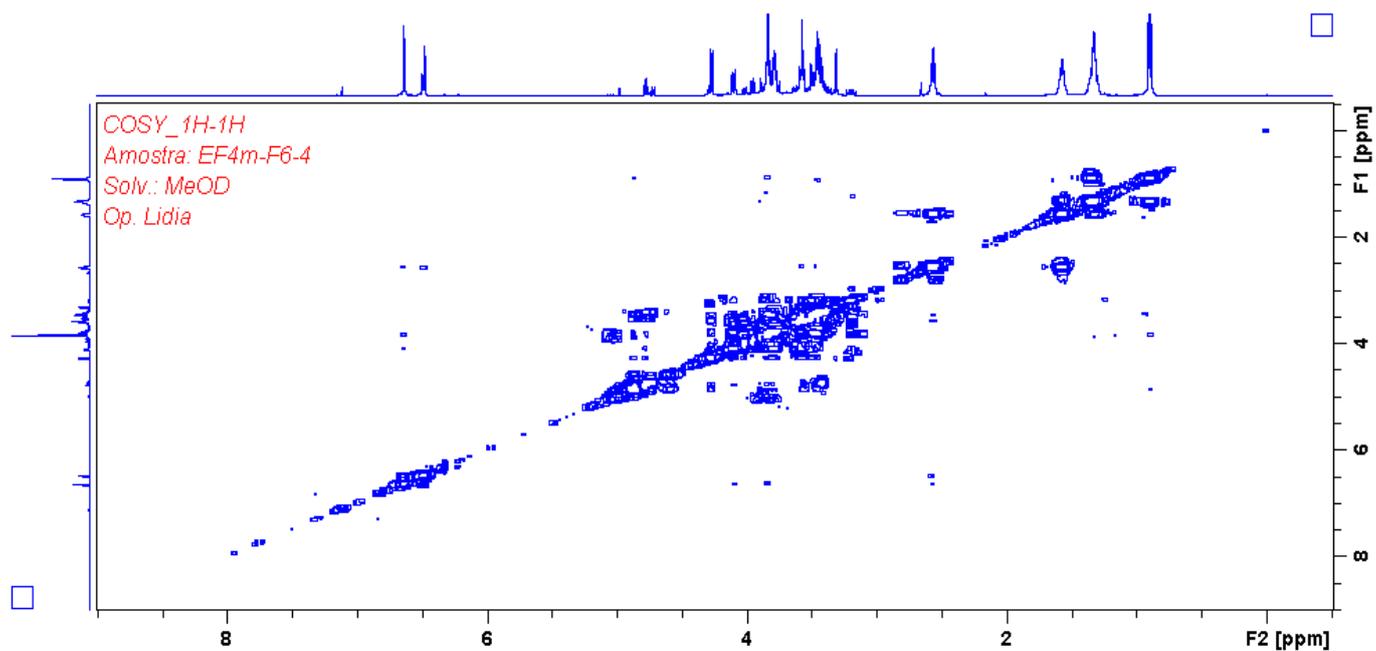


Figura S 89 Espectro de COSY da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

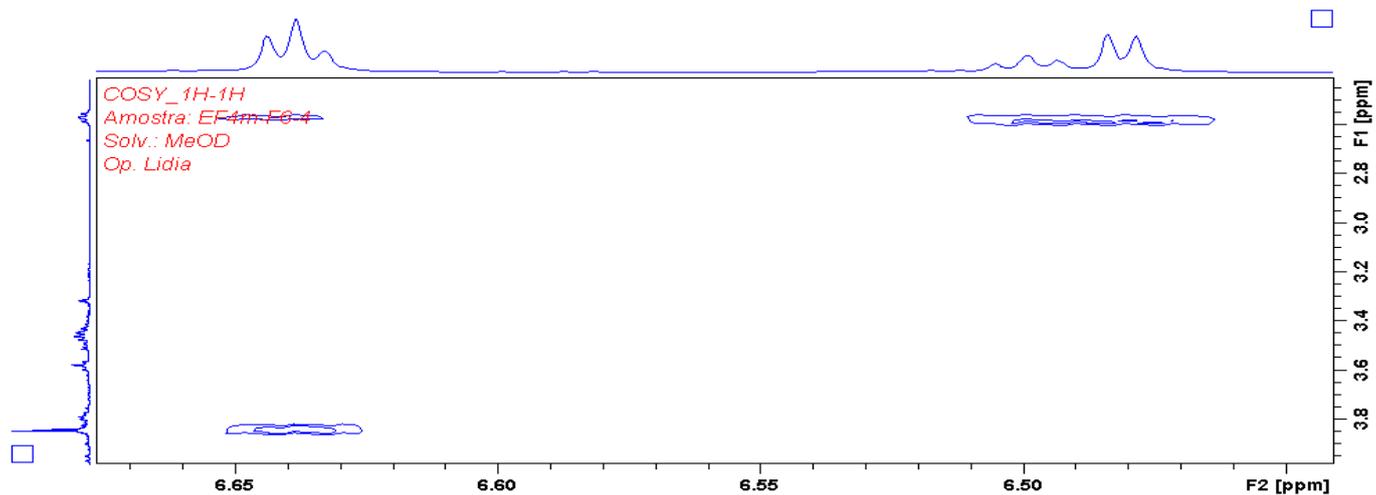


Figura S 90 Ampliação do espectro de COSY da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

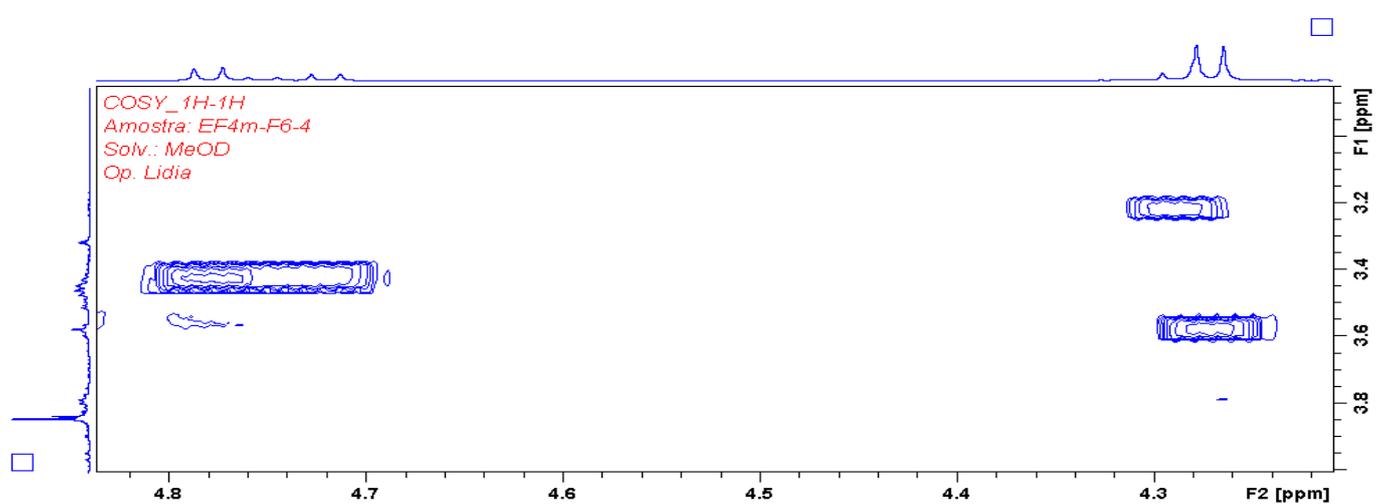


Figura S 91 Ampliação do espectro de COSY da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

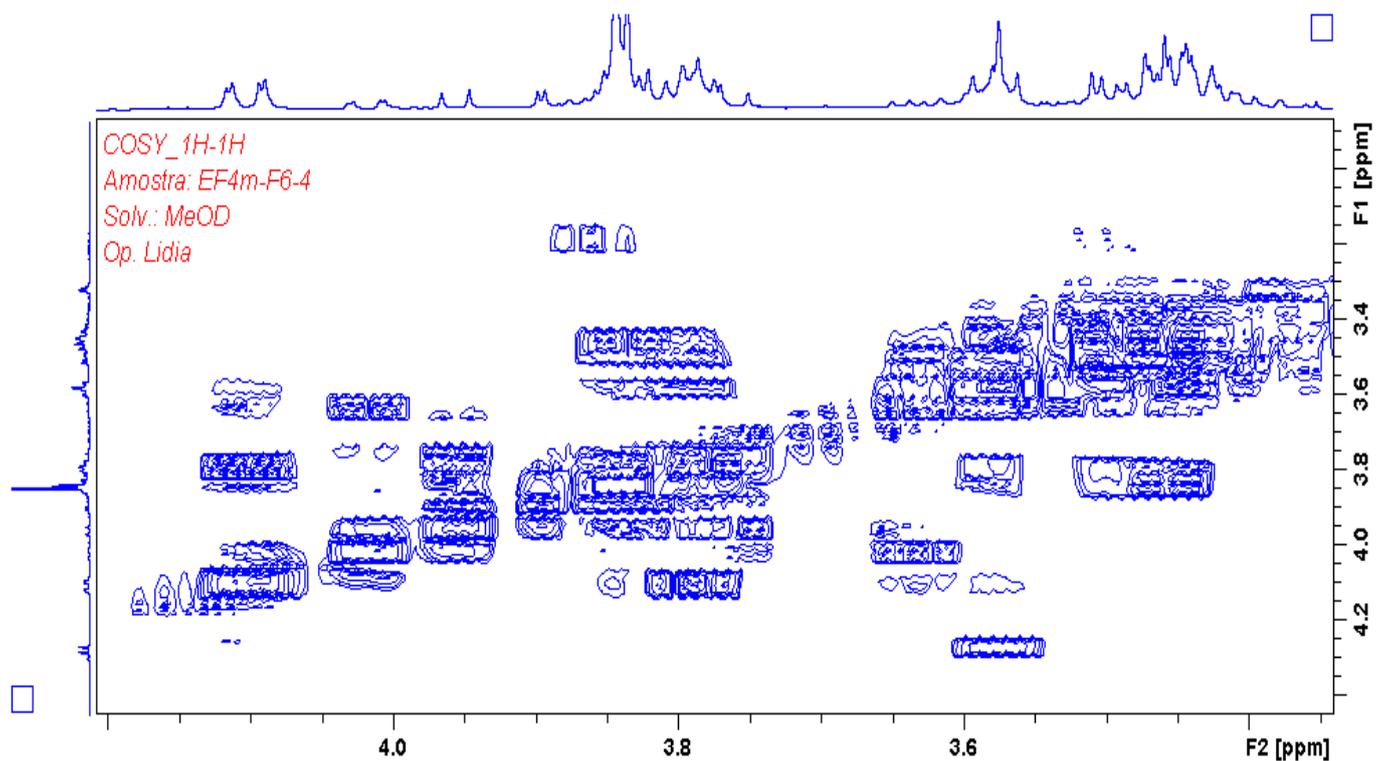


Figura S 92 Ampliação do espectro de COSY da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

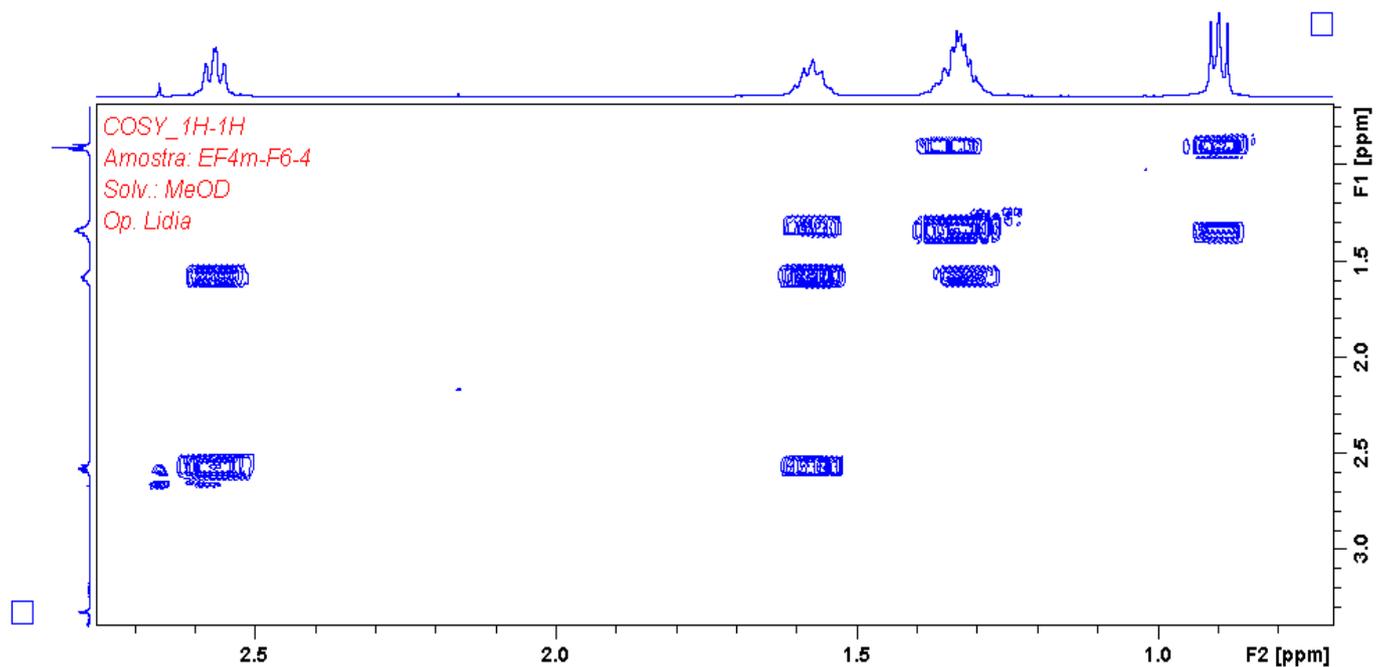


Figura S 93 Ampliação do espectro de COSY da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

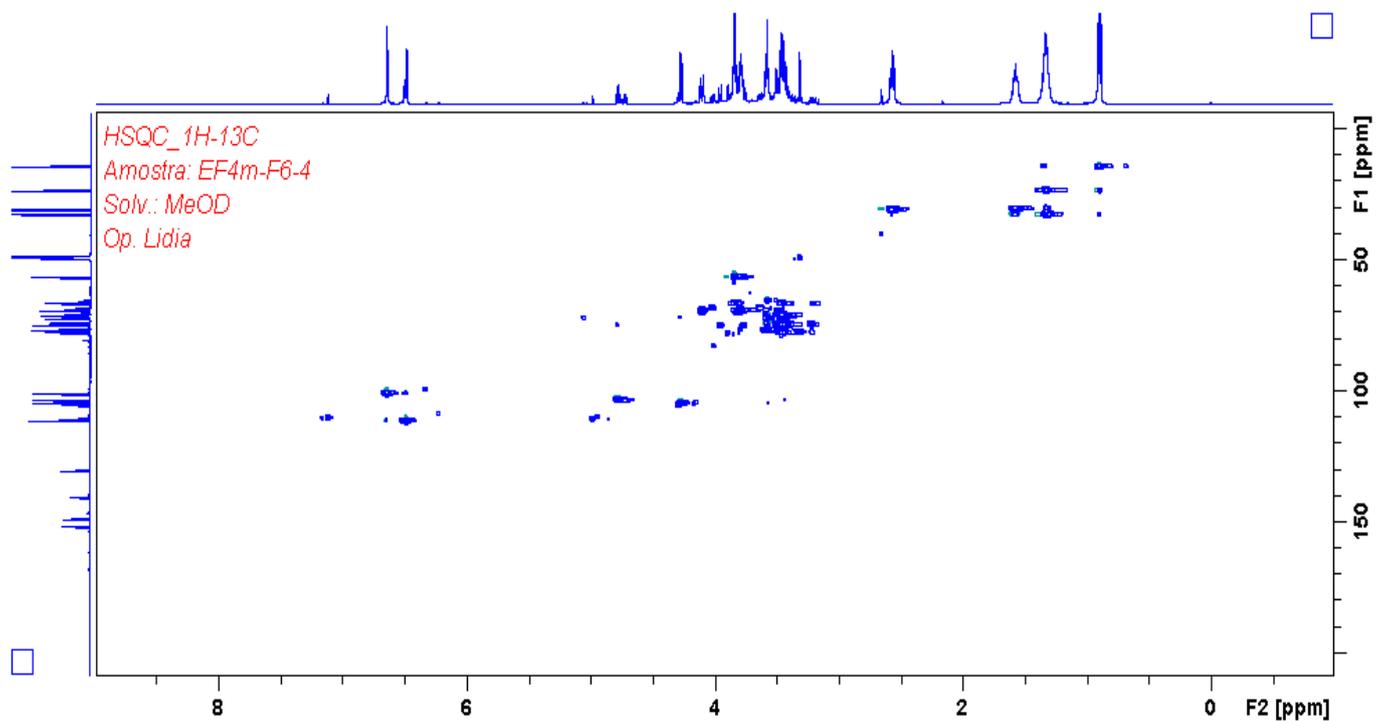


Figura S 94 Espectro de HSQC substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

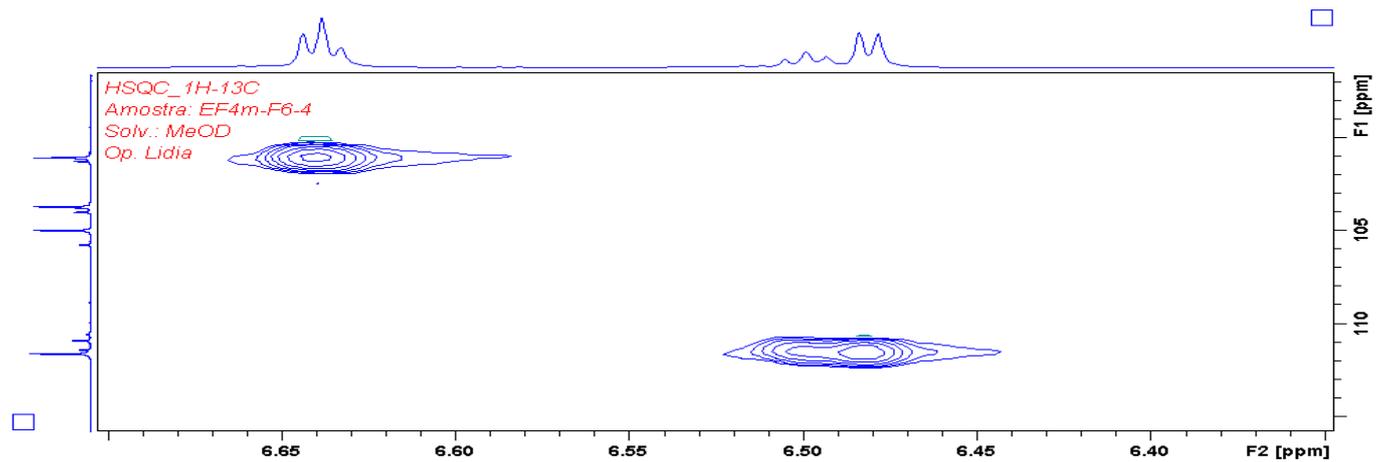


Figura S 95 Ampliação do espectro de HSQC da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

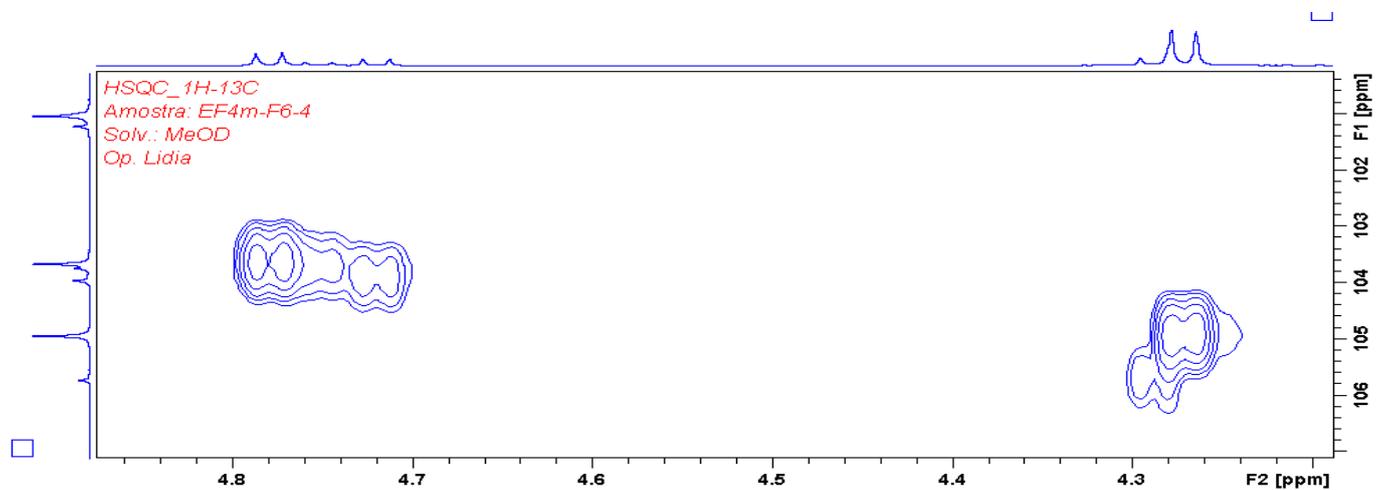


Figura S 96 Ampliação do espectro de HSQC da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

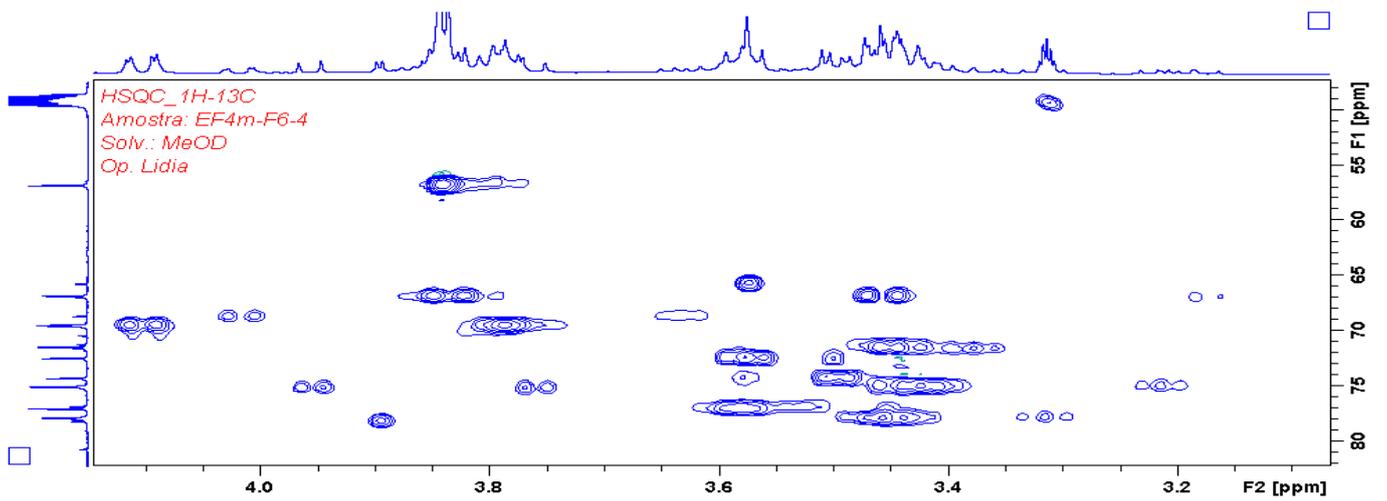


Figura S 97 Ampliação do espectro de HSQC da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

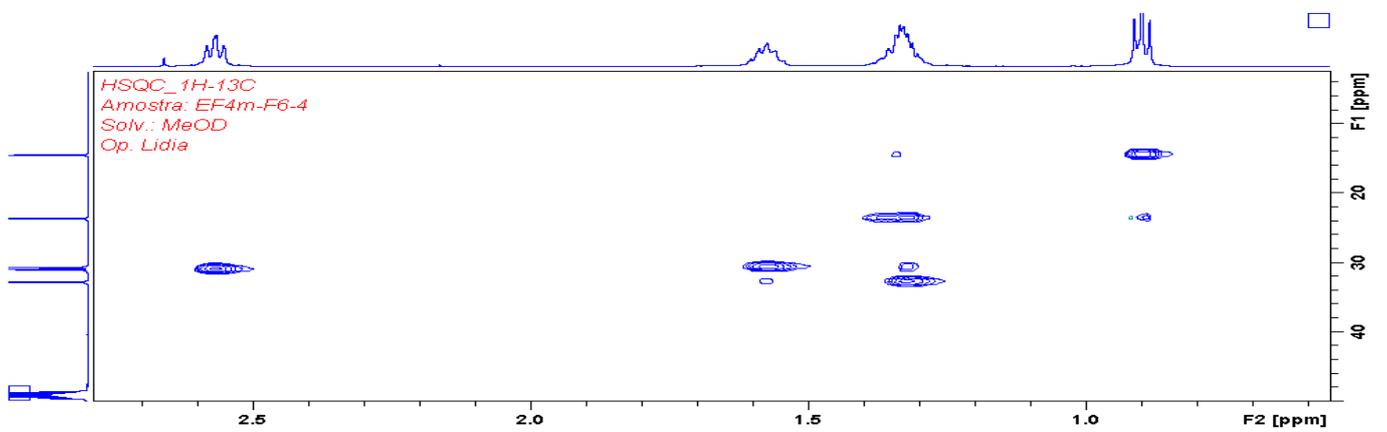


Figura S 98 Ampliação do espectro de HSQC da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

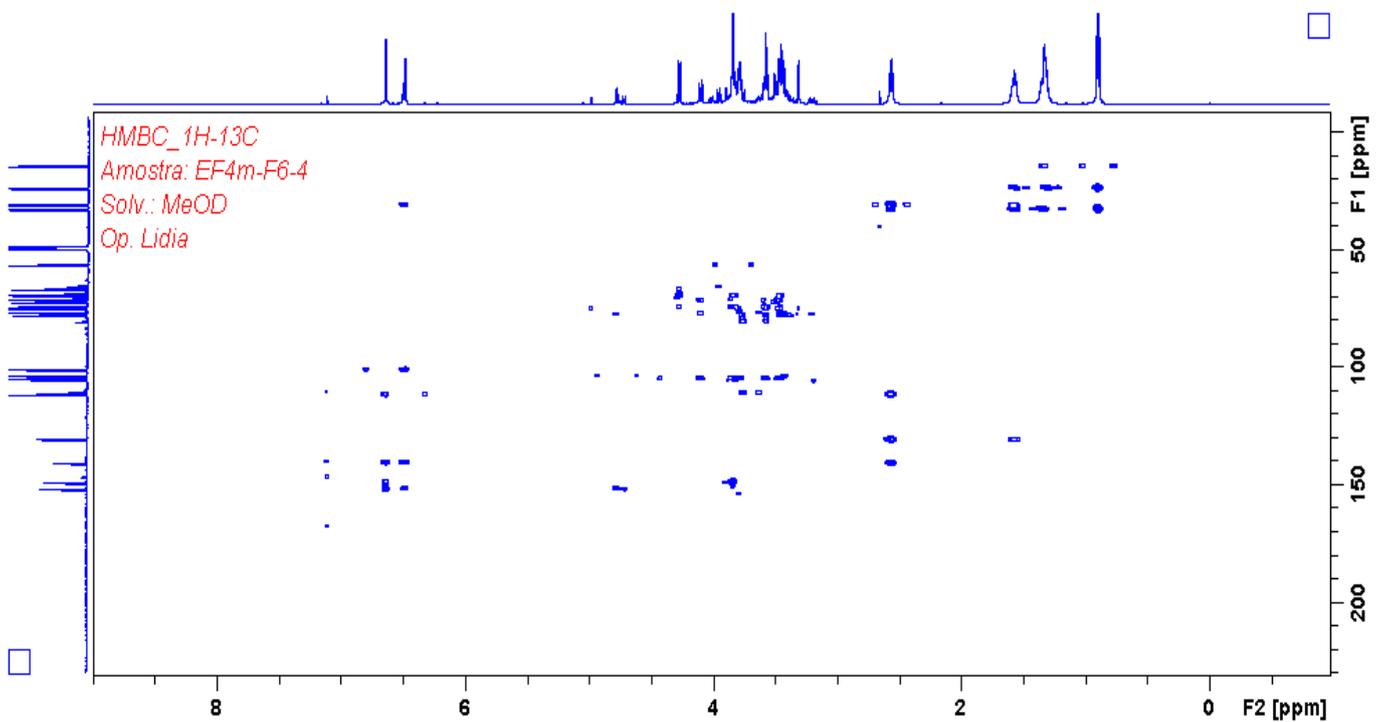


Figura S 99 Espectro de HMBC da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

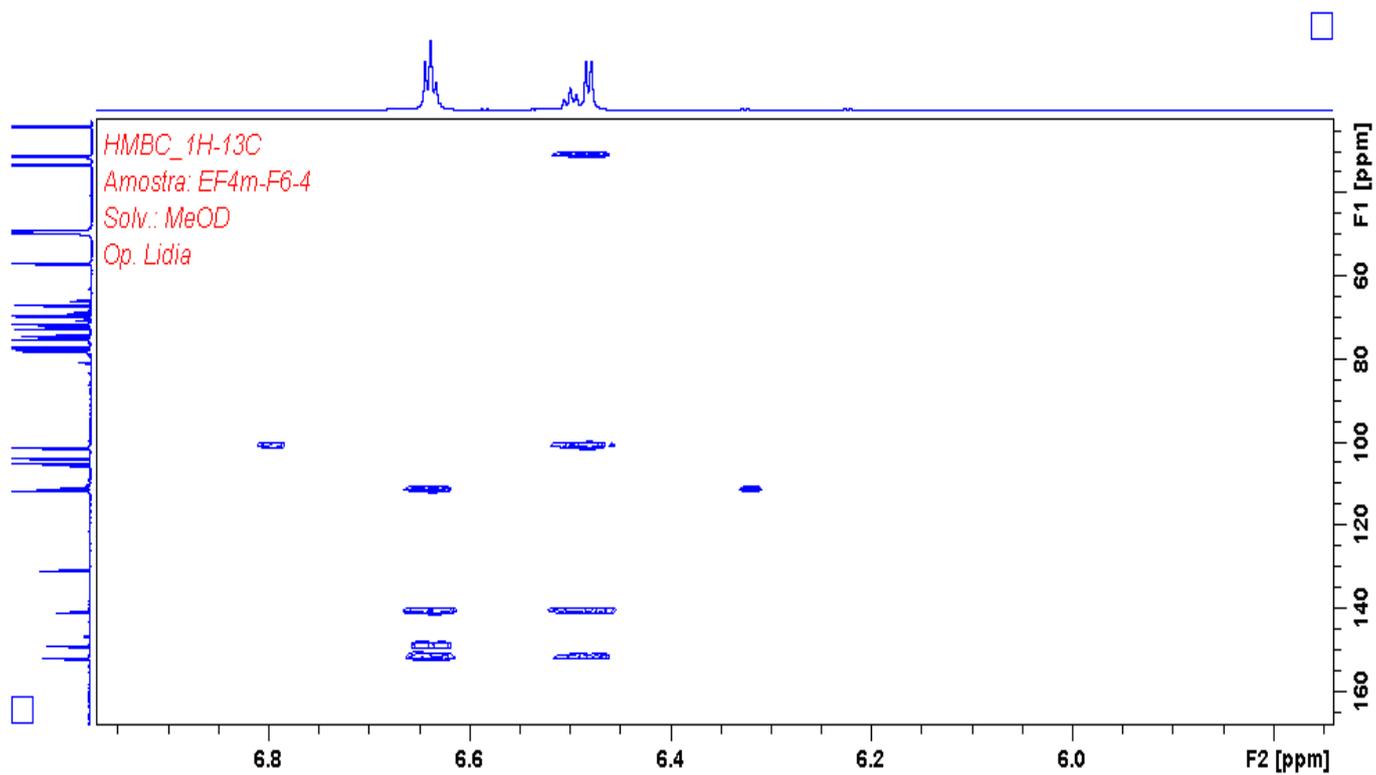


Figura S 100 Ampliação do espectro de HMBC da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

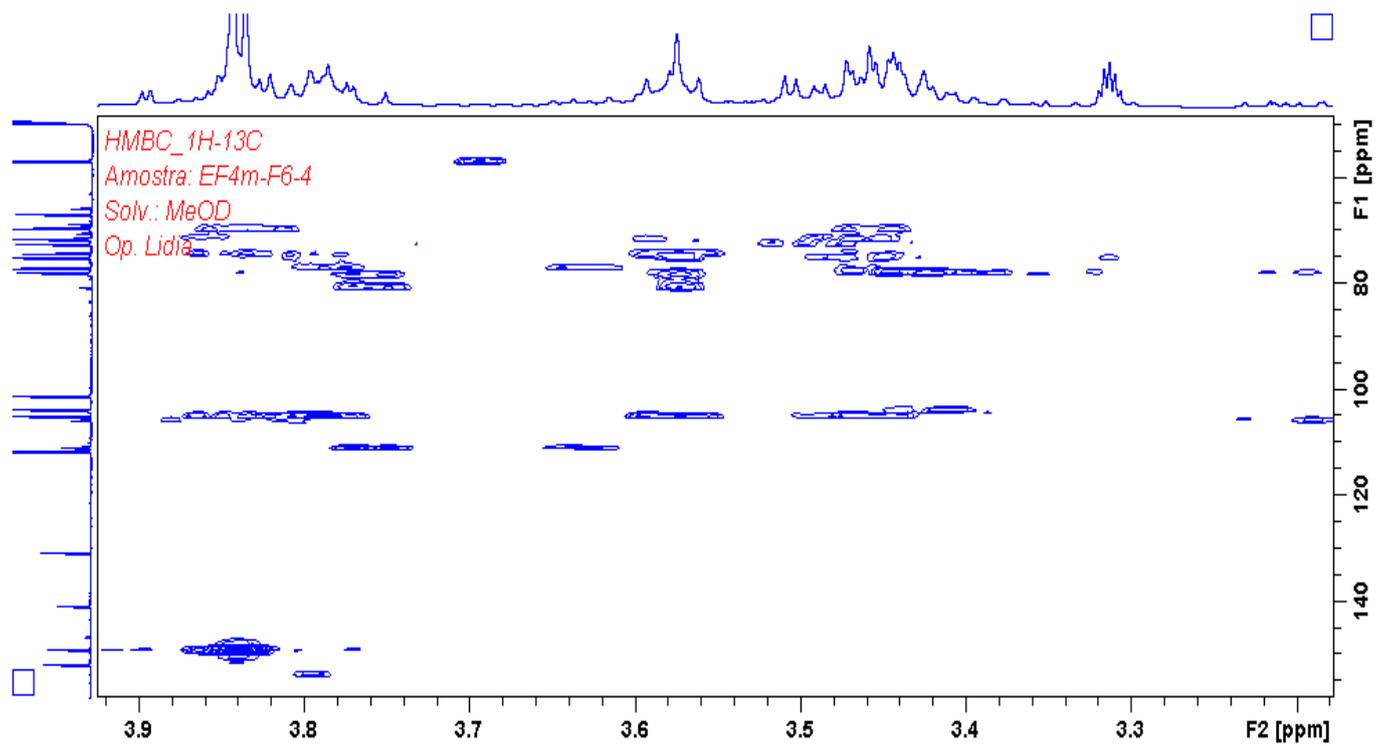


Figura S 101 Ampliação do espectro de HMBC da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

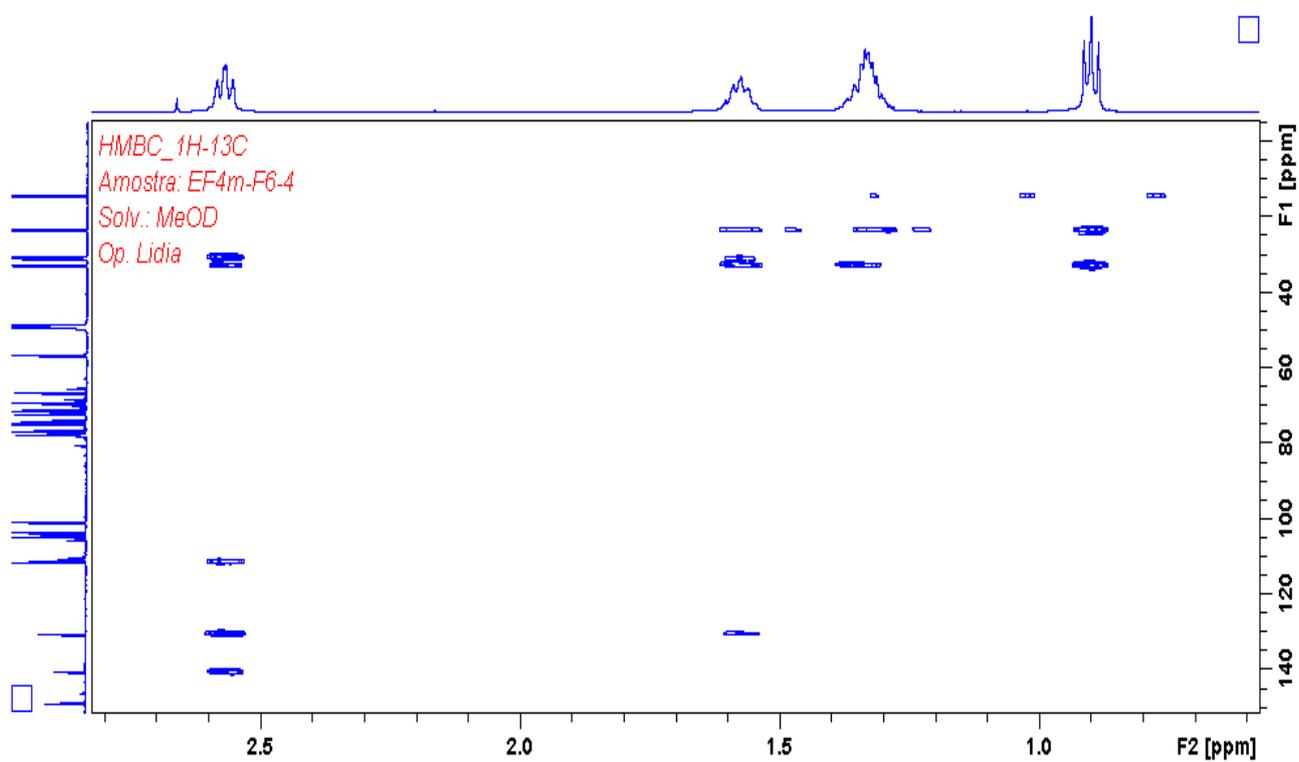


Figura S 102 Ampliação do espectro de HMBC da substância 7 (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

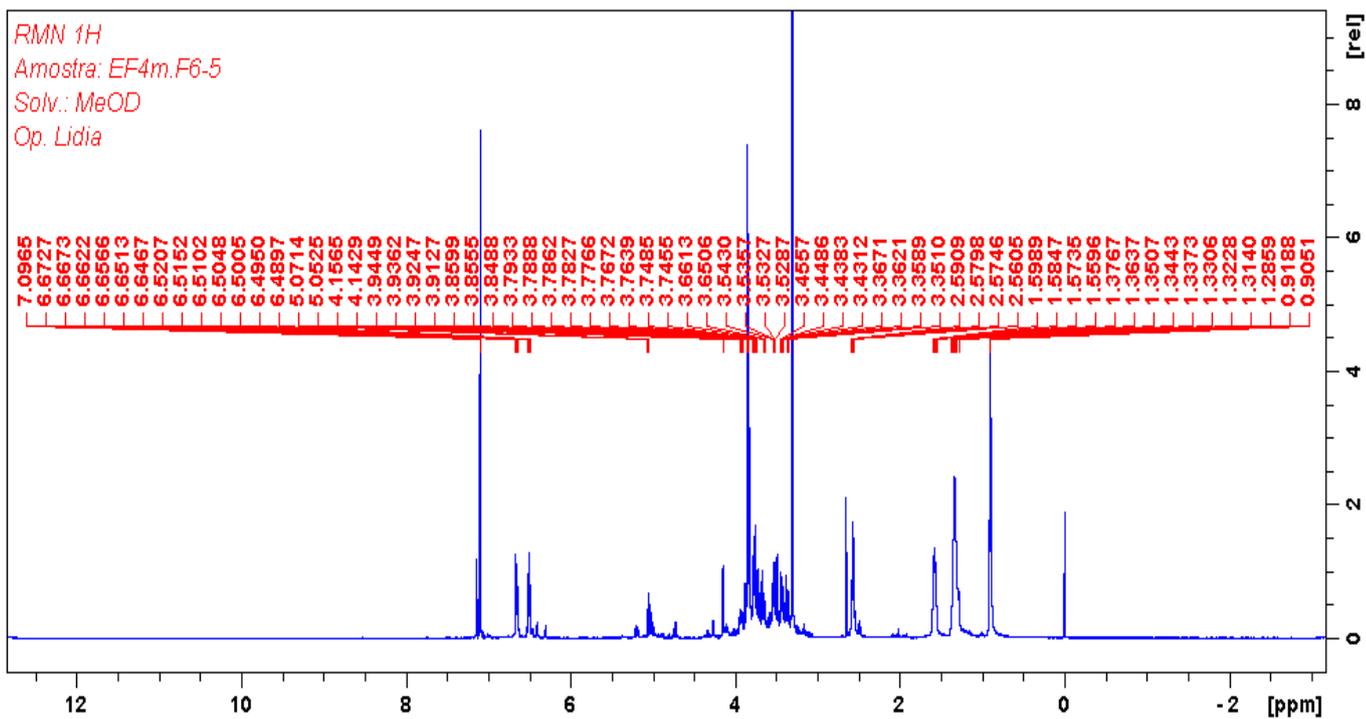


Figura S 103 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **8** (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

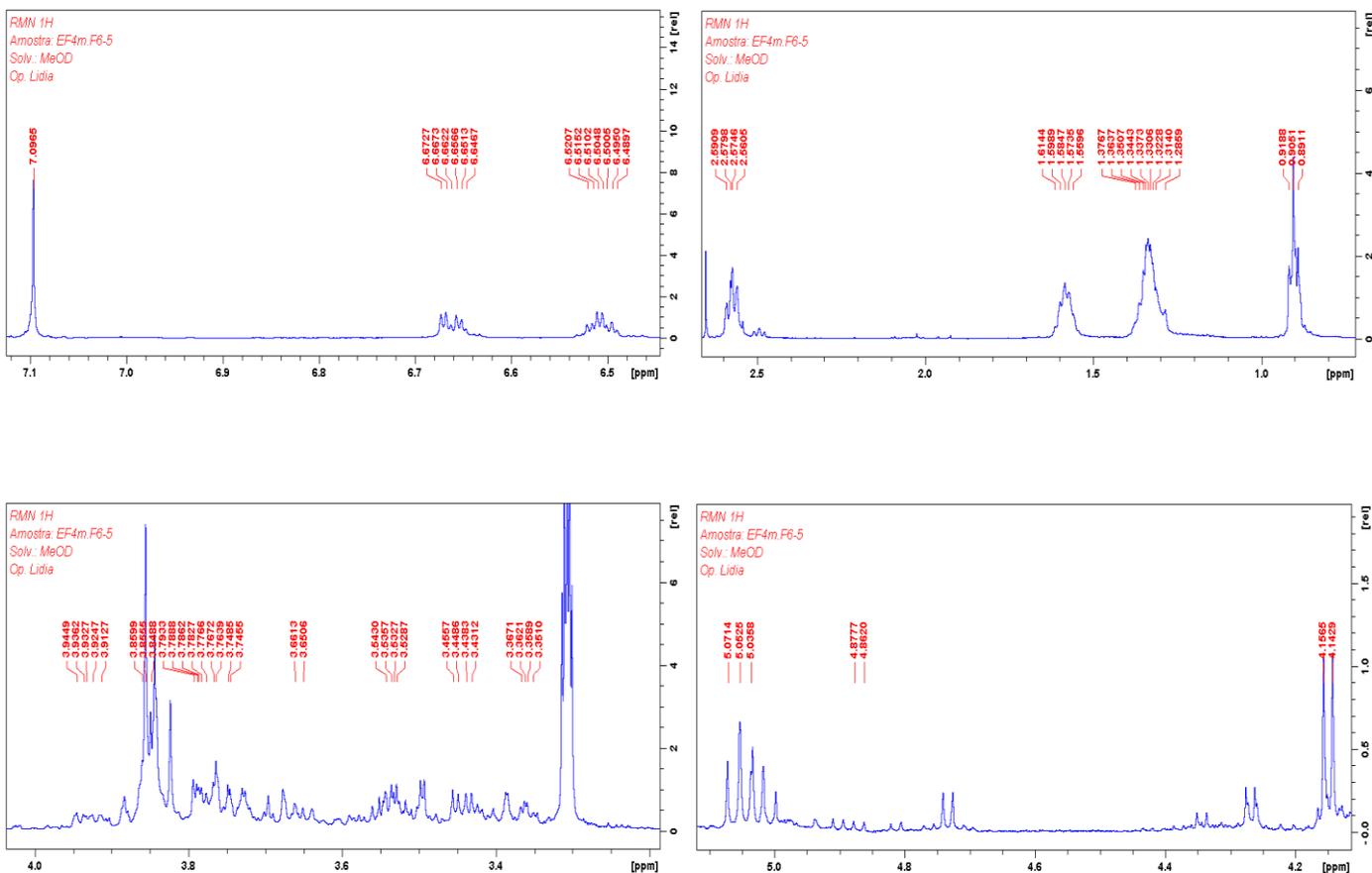


Figura S 104 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **8** (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS).

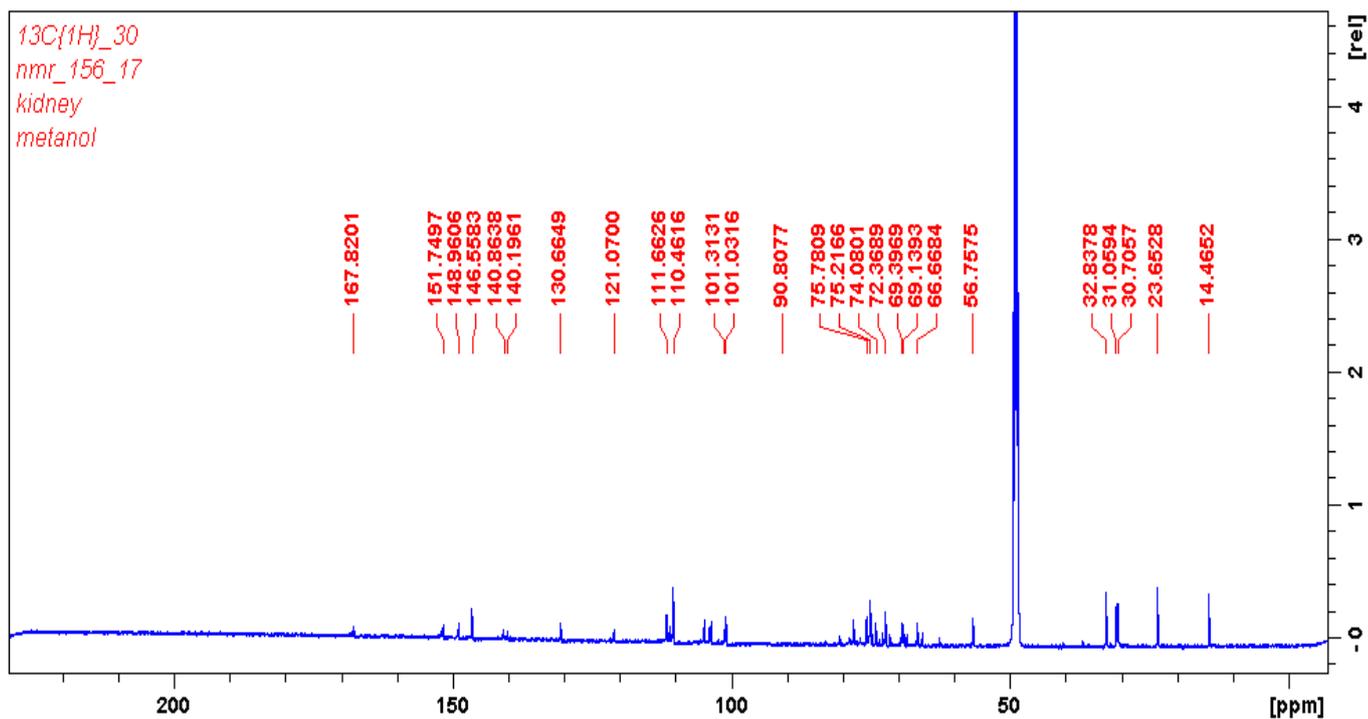


Figura S 105 Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

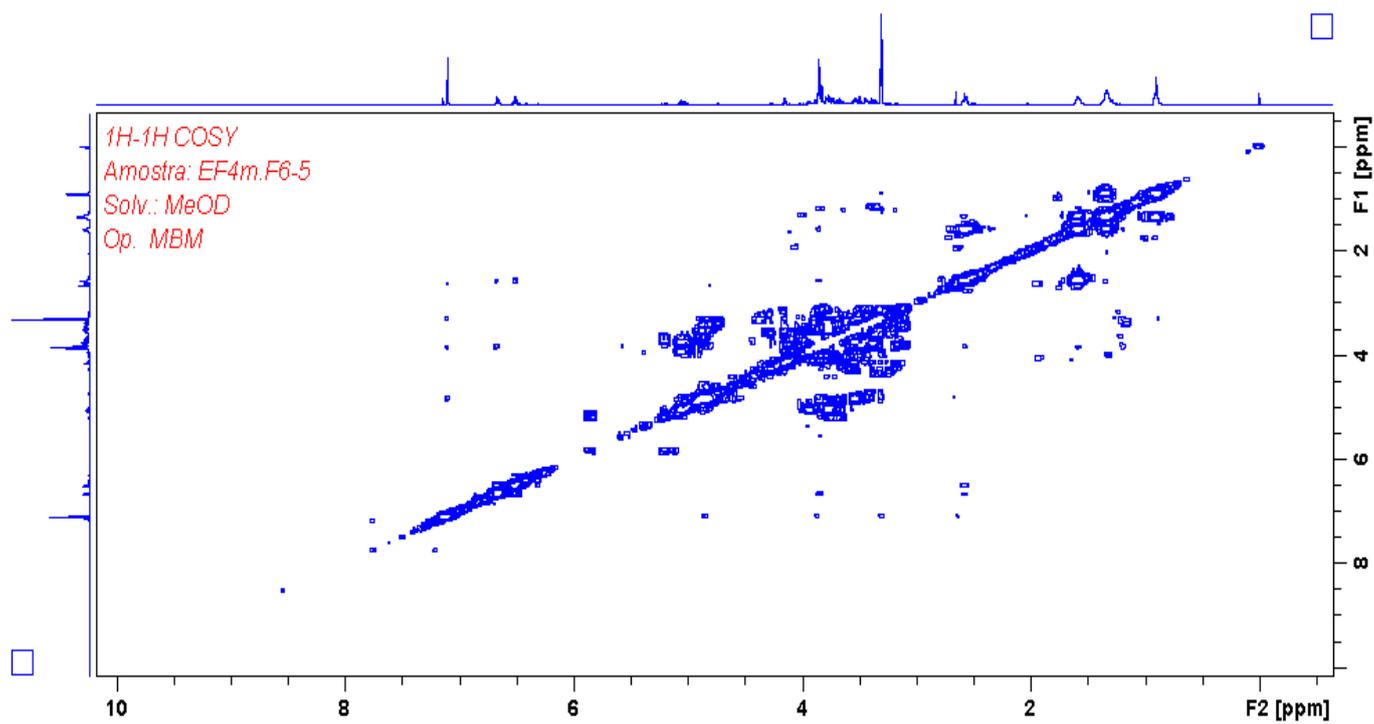


Figura S 106 Espectro de COSY da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

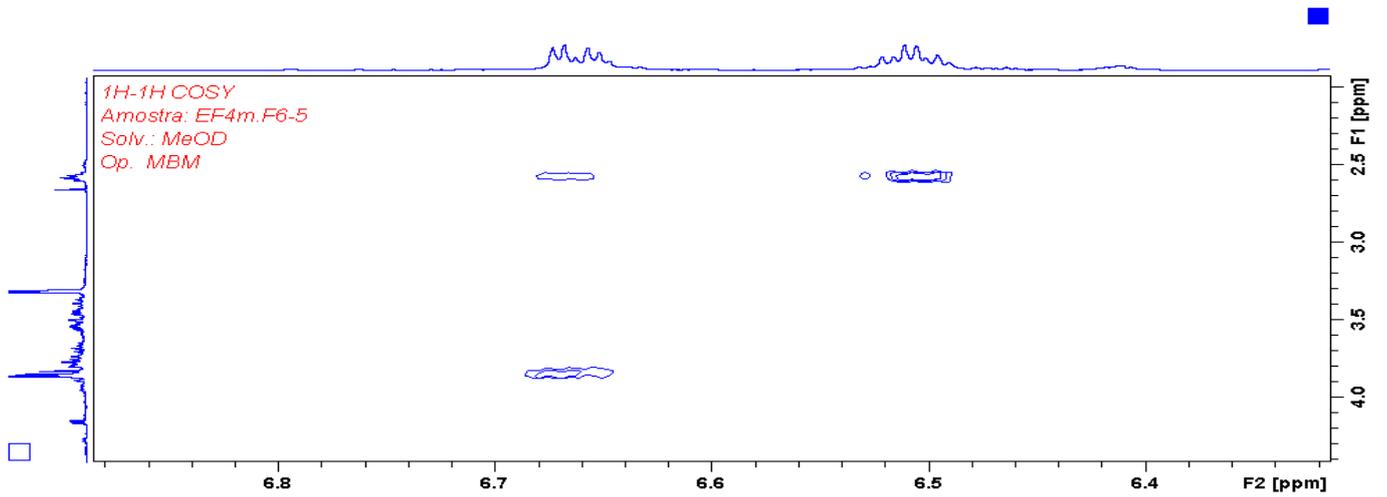


Figura S 107 Ampliação do espectro de COSY da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

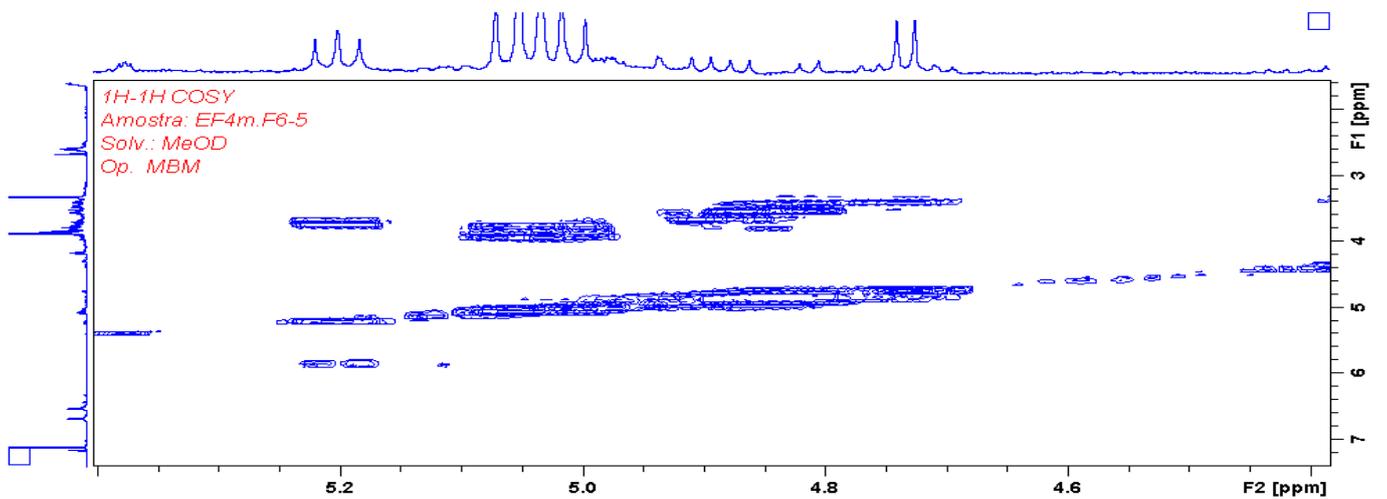


Figura S 108 Ampliação do espectro de COSY da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

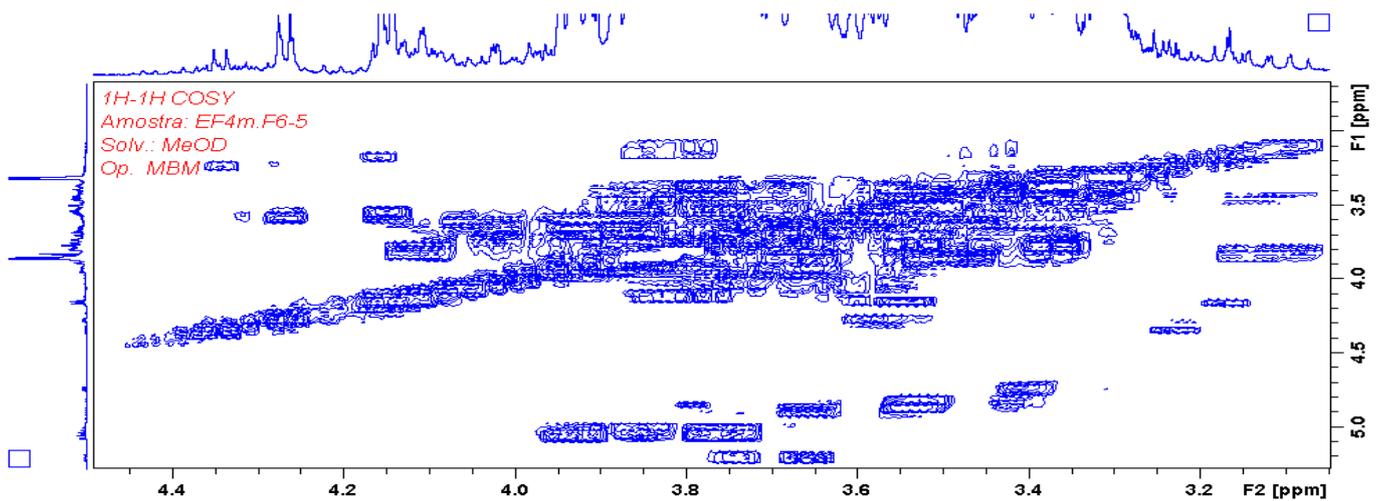


Figura S 109 Ampliação do espectro de COSY da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

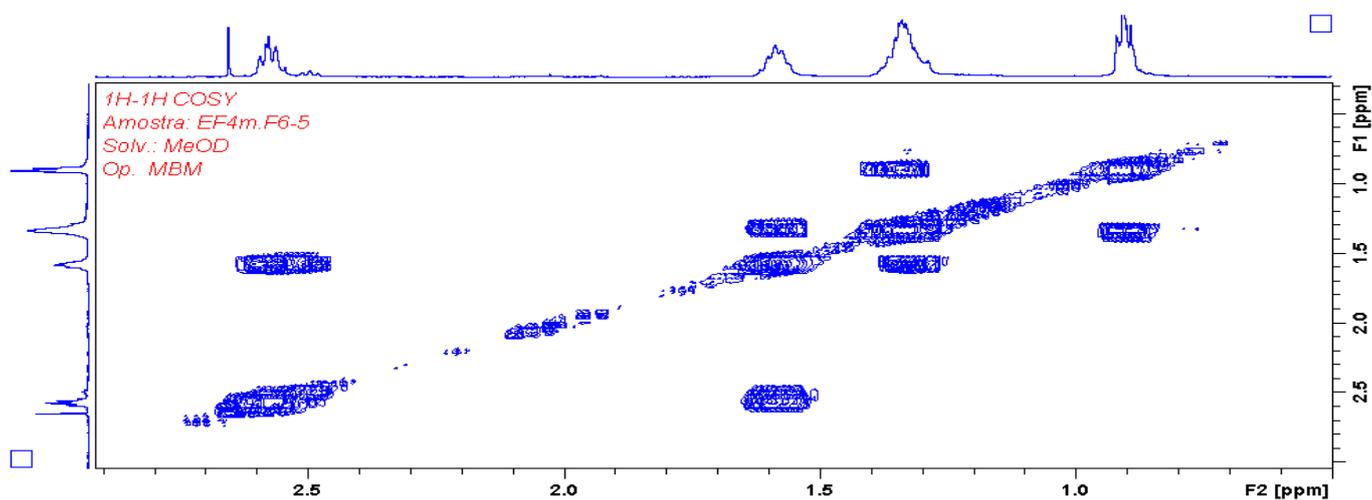


Figura S 110 Ampliação do espectro de COSY da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

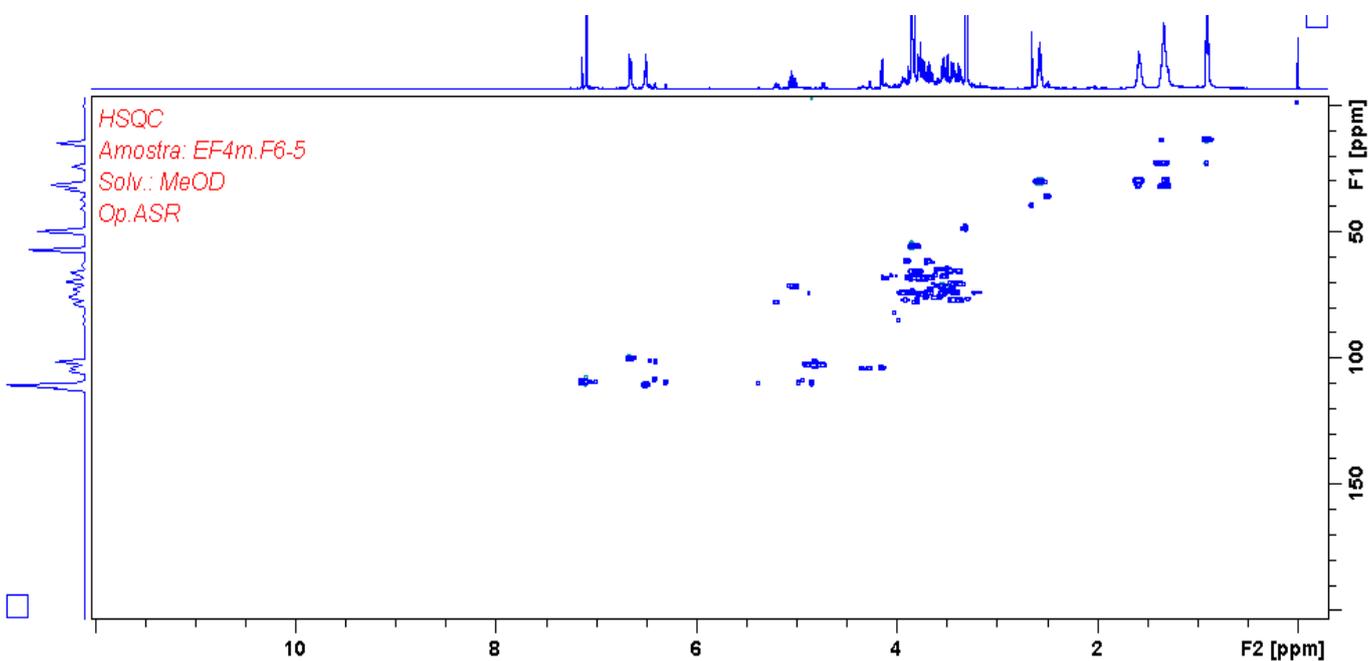


Figura S 111 Espectro de HSQC da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

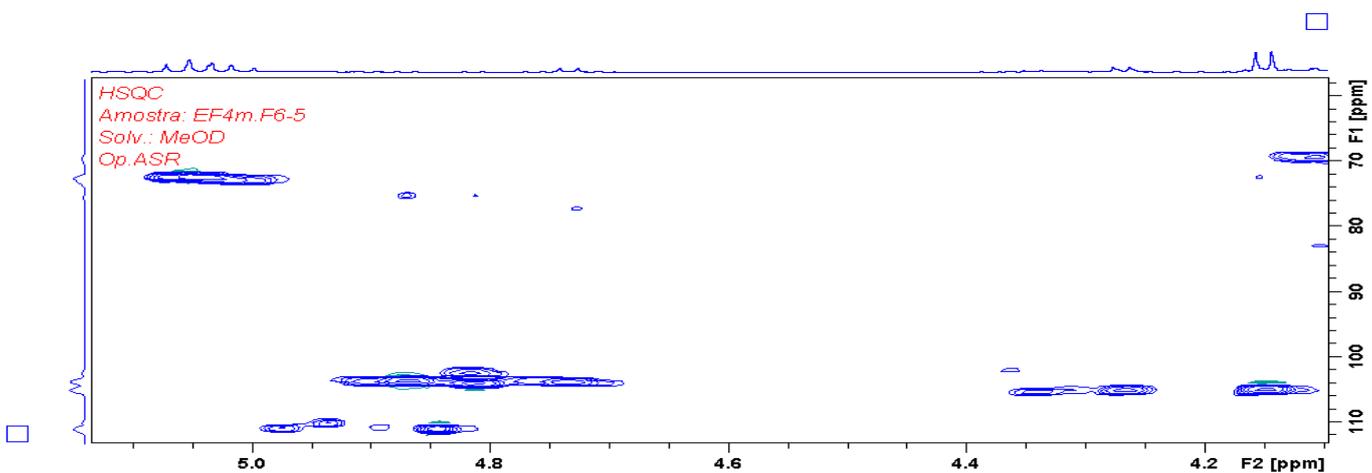


Figura S 112 Ampliação do espectro de HSQC da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

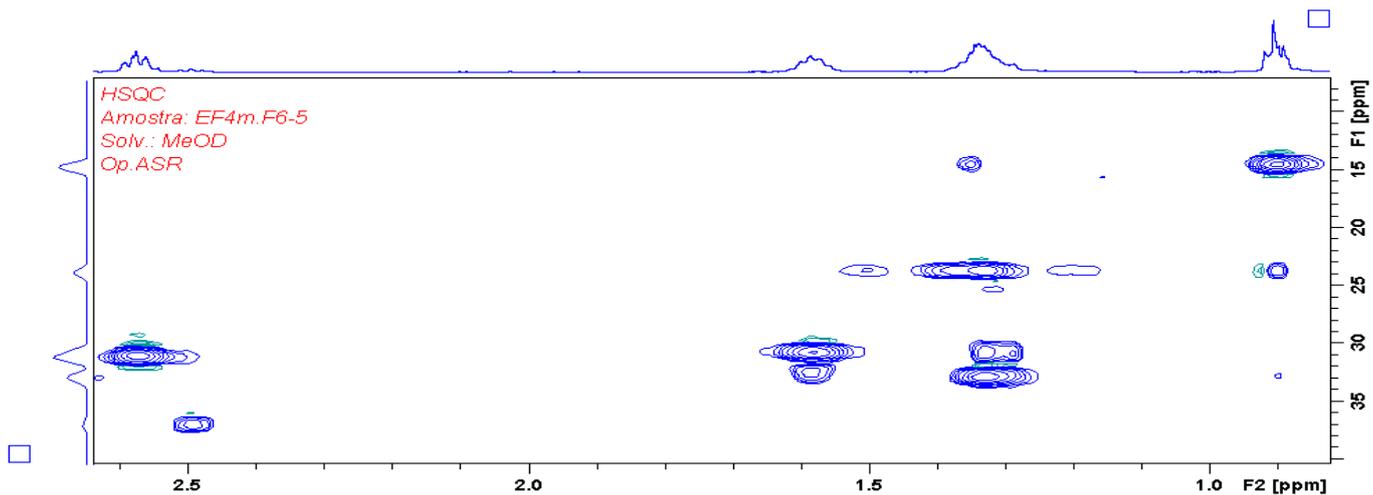


Figura S 113 Ampliação do espectro de HSQC da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

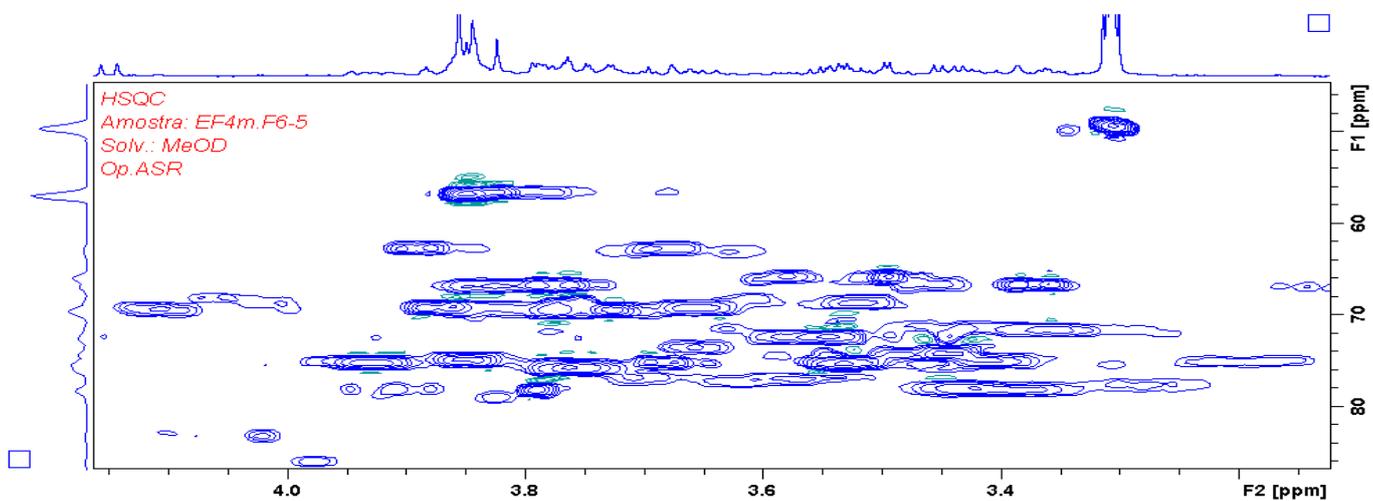


Figura S 114 Ampliação do espectro de HSQC da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

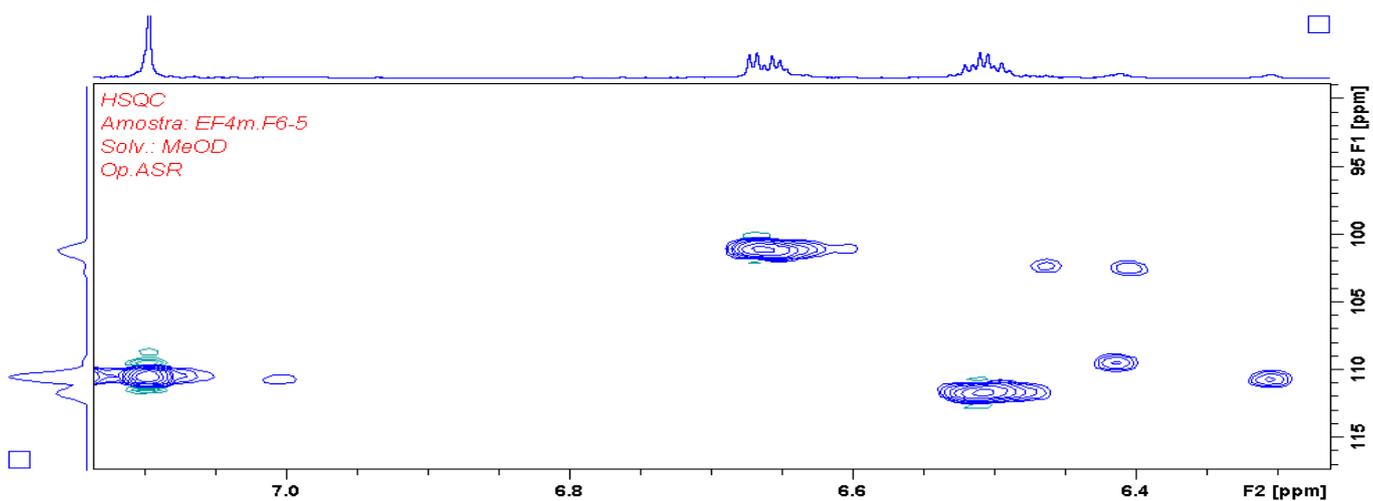


Figura S 115 Ampliação do espectro de HSQC da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

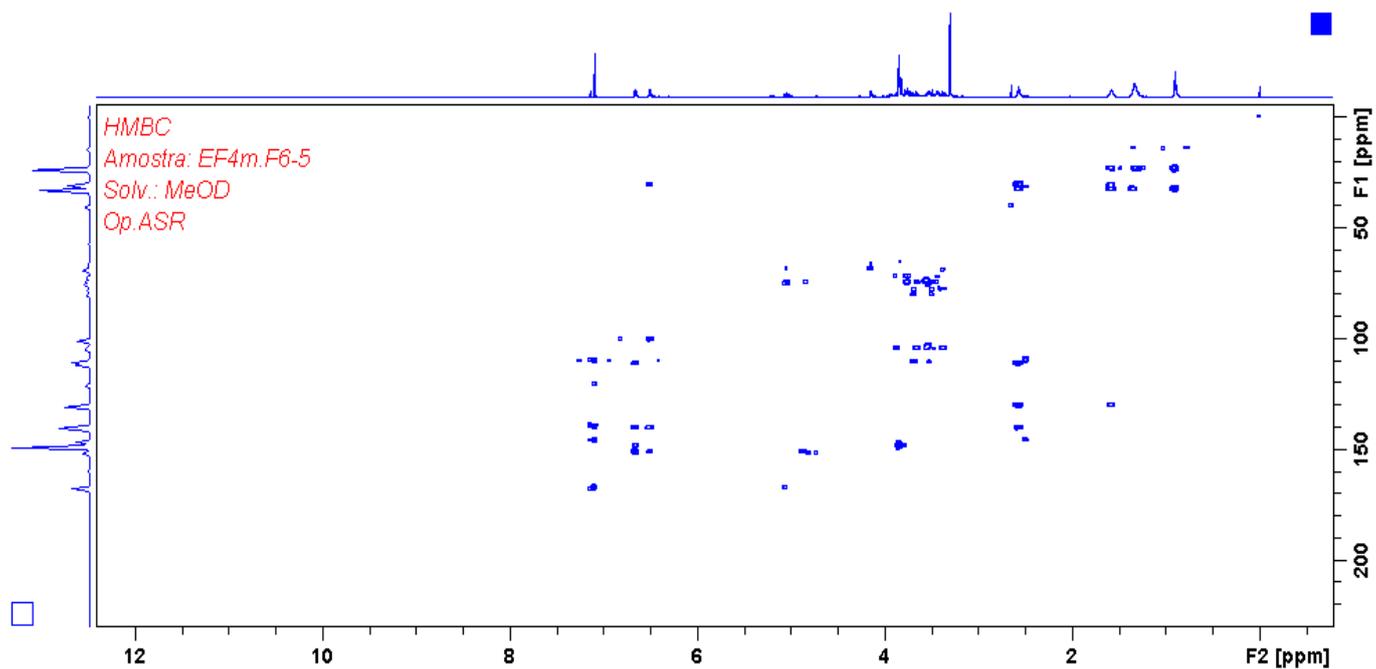


Figura S 116 Espectro de HMBC da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

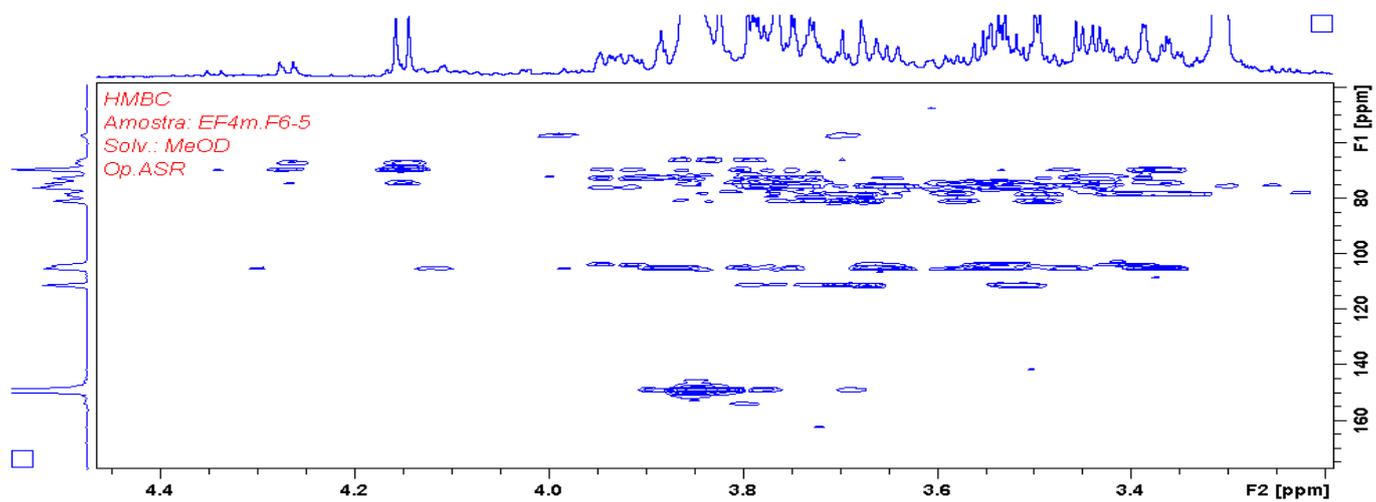


Figura S 117 Ampliação do espectro de HMBC da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

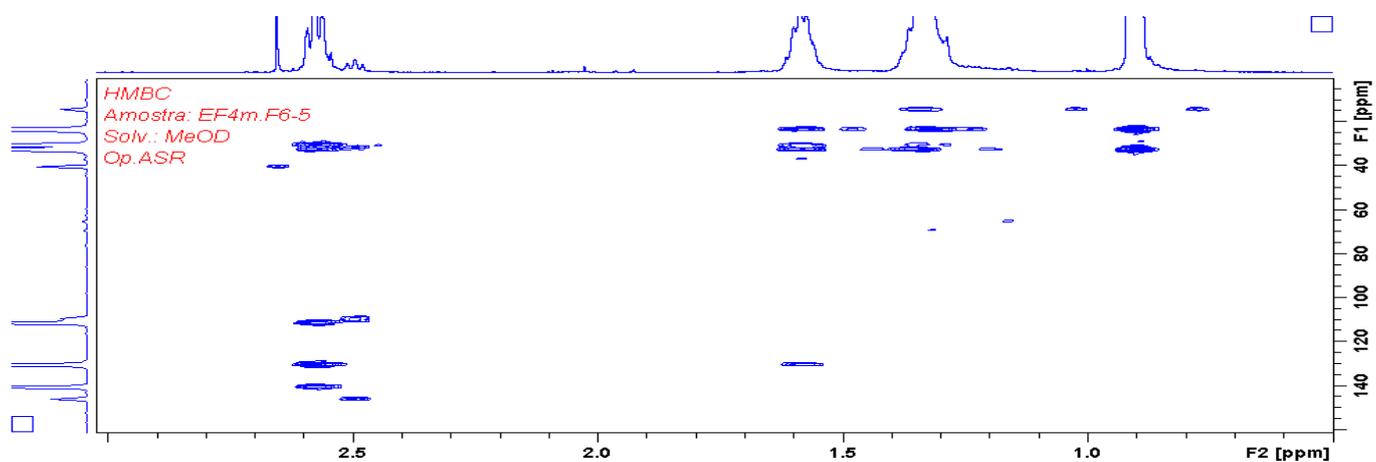


Figura S 118 Ampliação do espectro de HMBC da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

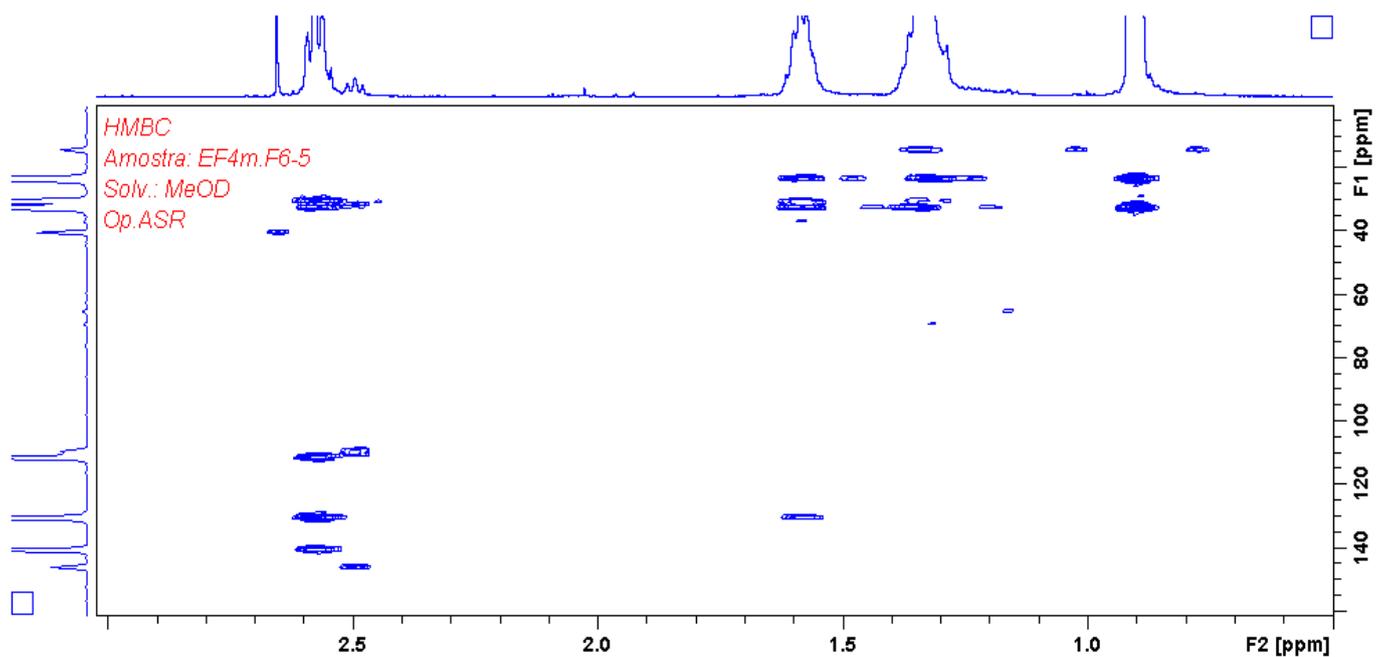


Figura S 119 Ampliação do espectro de HMBC da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

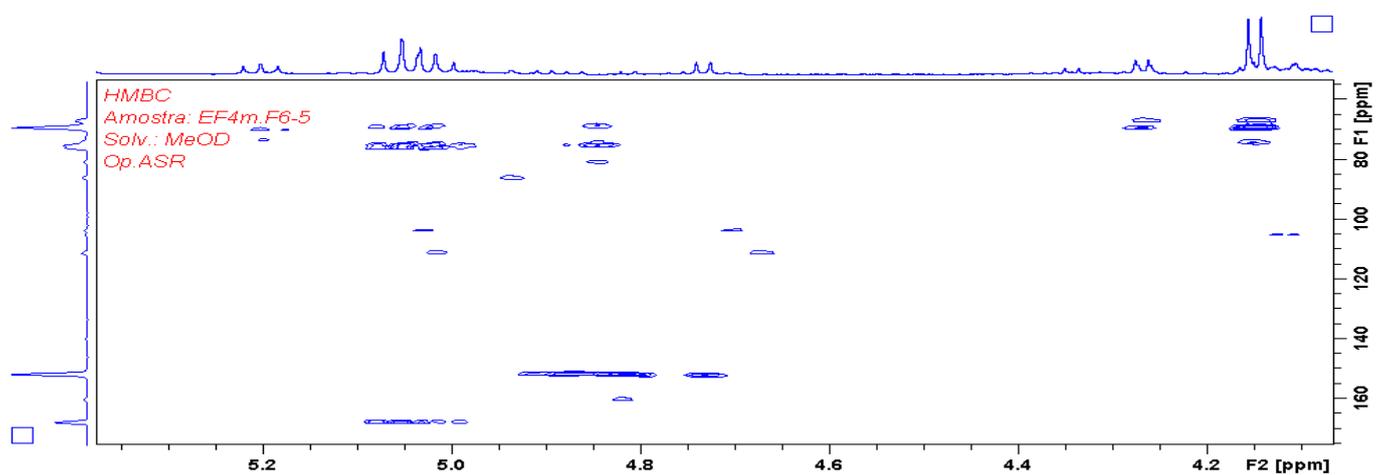


Figura S 120 Ampliação do espectro de HMBC da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

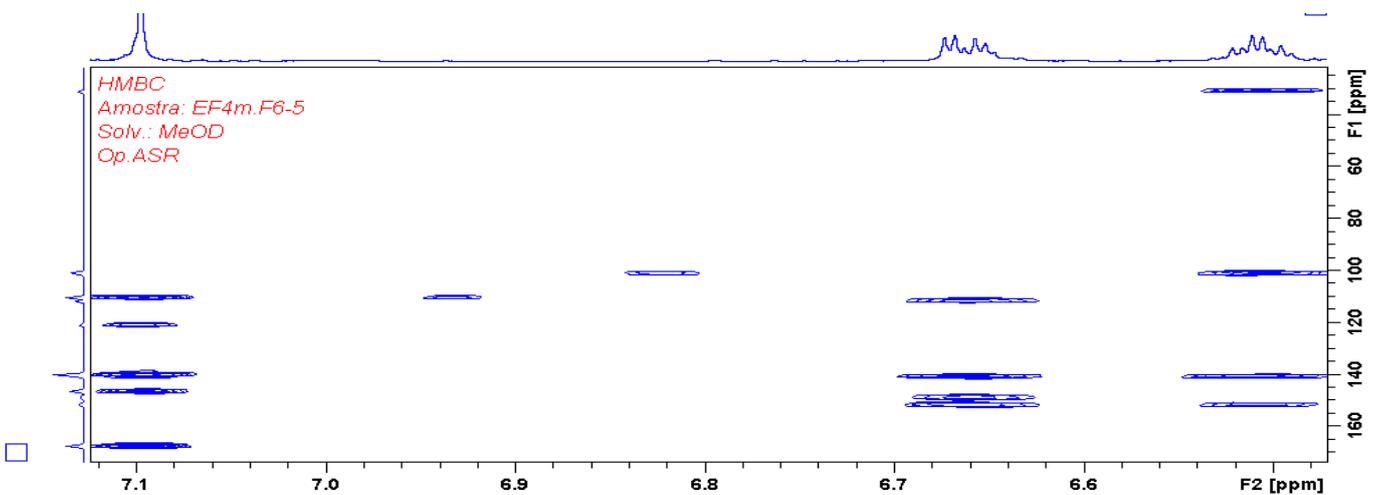


Figura S 121 Ampliação do espectro de HMBC da substância **8** (11,7 T, CD<sub>3</sub>OD, TMS).

Substâncias isoladas da *Eugenia adenocalyx* e *Eugenia lisboae*

