



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TAYANE FARDIM CORREA

**ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO DE QUATRO ESPÉCIES DA
FAMÍLIA MYRTACEAE**

VITÓRIA

2021

Tayane Fardim Correa

**ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO DE QUATRO ESPÉCIES DA
FAMÍLIA MYRTACEAE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do
Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Masrouah Jamal

VITÓRIA

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

C824e Correa, Tayane Fardim, 1996-
Estudo químico biomonitorado de quatro espécies da família
Myrtaceae / Tayane Fardim Correa. - 2021.
110 f. : il.

Orientadora: Cláudia Masrouah Jamal.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Myrtaceae. 2. Plantas - Composição. 3. Química. I. Jamal,
Cláudia Masrouah. II. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 615.1

Tayane Fardim Correa

ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO DE QUATRO ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado(a) em 30 de julho de 2021.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Claudia Masrouah Jamal (orientadora) - UFES

Prof^a. Dr^a. Damaris Silveira - UNB

João Victor
Dutra Gomes

Assinado de forma digital por
João Victor Dutra Gomes
Dados: 2021.07.30 12:15:00
-03'00'

Dr. João Victor Dutra Gomes

VITÓRIA
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO
SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
CLAUDIA MASROUAH JAMAL - SIAPE 1479177
Departamento de Ciências Farmacêuticas - DCFA/CCS
Em 30/07/2021 às 15:47

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o
link:<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/239910?tipoArquivo=O>

Com muito amor, carinho e saudade,
dedico este trabalho ao meu pai.
É por você e para você!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai Celzo (*in memoriam*) por ter me mostrado o que é coragem e persistência, por ter lutado pela vida, por ter apoiado todos os meus sonhos e por estar, para sempre, presente na minha vida. À minha mãe Nicéa que foi o meu maior apoio e incentivo, obrigada por ter ficado de pé quando tudo estava desmoronando e ter me oferecido exatamente o que eu precisava para continuar. À minha irmã Keytiane que dividiu todos os momentos bons e ruins dos últimos anos, obrigada por não ter desistido e por estar presente. Obrigada por todo amor, compreensão, incentivo e paciência. Vocês são a razão de eu ter tido forças para conseguir concluir mais um desafio!

À professora Dra. Claudia Masrouah Jamal pela orientação, confiança, por todo conhecimento compartilhado e pelo acolhimento. Obrigada por aceitar todas as minhas ideias, por ter entendido minhas faltas e me incentivar sempre a continuar.

A todos os amigos que acompanharam essa experiência de perto e foram fonte de inspiração.

À minha família pelo apoio, em especial ao meu “vô” Mauro (*in memoriam*) que segue me protegendo.

À Fernanda Leite Pereira, minha parceira de laboratório, por toda ajuda com os ensaios biológicos, por todas as conversas e ensinamentos. Sem você metade desse projeto não existiria.

Ao professor Dr. Luis Fernando Tavares de Menezes pela coleta e identificação botânica das espécies vegetais objetos de estudo deste trabalho.

Aos professores Dr. Ricardo Kurster, Dr. Wanderson Romão e Dr. Álvaro Cunha Neto por todo aprendizado e suporte disponibilizado nos laboratórios de Cromatografia, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear do LabPetro - UFES. Agradeço também a Cristina Luz pela atenção e colaboração à essa pesquisa.

À professora Dra. Damaris Silveira por ter viabilizado condições para a realização dos ensaios enzimáticos. Ao João Victor Dutra Gomes pela parceria e por toda contribuição dada a este trabalho.

Aos professores Dr. Rodrigo Kitagawa e Dra. Rita Gonçalves por todo conhecimento compartilhado e por terem aberto as portas do Laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais para a realização dos ensaios antioxidantes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo – FAPES, que me concedeu uma bolsa para a realização deste mestrado, fato este que contribuiu diretamente para a viabilização desta dissertação. Portanto, deixo aqui expresso meu agradecimento.

Aos professores, alunos e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCFar.

E a todos que contribuíram para a realização desse trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

A Mata Atlântica é um dos biomas brasileiros mais biodiversos e possui domínios importantes, como os manguezais e restingas. Dentro das restingas, uma das famílias mais expressivas em número de espécies é a família Myrtaceae. Contudo, algumas das espécies nunca foram estudadas do ponto de vista fitoquímico. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar o perfil químico das partes aéreas das espécies *Myrciaria tenella* (DC.) O.Berg, *Myrcia splendens* (Sw.) DC, *Myrcia neuwiedeanae* (O.Berg) E.Lucas & C.E.Wilson. e *Myrcia neobrasiliensis* A.R.Lourenço & E.Lucas e avaliar a capacidade antioxidante e de inibição de enzimas envolvidas na metabolização dos carboidratos,. O perfil químico foi determinado por meio de análises cromatográficas e espectrométricas, como GC/MS e ESI(-)FT-ICR MS. As atividades biológicas foram determinadas por meio de métodos espectrofotométricos, frente aos radicais sintéticos ABTS e DPPH e a atividade de inibição das enzimas foi determinada frente duas enzimas, a α -amilase e a α -glicosidase. Foram analisados os extratos brutos metanólicos das partes aéreas de cada espécie, bem como suas respectivas frações hexânicas, diclorometanólica, acetato de etila e aquosas. Por GC/MS foi possível identificar a presença de compostos sesquiterpênicos e triterpênicos nas frações hexânicas. Da fração acetato de etila da espécie *M. neuwiedeanae* foi possível isolar e identificar dois triterpenos pentacíclicos, α -amirina e β -amirina. Pela técnica de ESI(-)FT-ICR MS foi possível identificar diversos ácidos fenólicos e flavonoides nos extratos metanólicos e frações acetato de etila. Foram identificadas a presença de galato de metila e ácido quínico em todas as espécies e compostos como quercetina, miricetina, quercitrina, miricitrina e ácidos triterpênicos nas espécies do gênero *Myrcia*. Todas espécies apresentaram expressivas capacidades antioxidantes, principalmente por parte dos extratos brutos e das frações mais polares. As frações acetato de etila da *M. splendens* ($IC_{50} = 0,43 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$) e da *M. neobrasiliensis* ($IC_{50} = 0,42 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$) foram as mais ativas no ensaio com o radical ABTS, apresentando atividade antioxidante estatisticamente semelhante ao padrão de ácido gálico ($IC_{50} = 0,31 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$). Na análise de inibição das enzimas, todos os extratos brutos foram capazes de inibir a α -glicosidase, sendo o extrato de *M. splendens* o mais ativo ($IC_{50} = 2,96 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$), e as frações mais polares foram as mais ativas frente a α -amilase, sendo que as frações aquosas da *M. splendens* ($IC_{50} = 1,61 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$) e da *M. neuwiedeanae* ($IC_{50} = 5,74 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$) apresentaram os melhores resultados dentre elas, com atividades próximas ao do padrão de acarbose ($IC_{50} = 1,41 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$). O presente trabalho relatou pela primeira vez aspectos químicos e atividades biológicas apresentados por essas espécies, com resultados que demonstraram uma grande diversidade química e promissores resultados biológicos, o que reafirma a grande importância das espécies da família Myrtaceae e contribui diretamente para o conhecimento da flora brasileira.

Palavras-chaves: Myrtaceae; fitoquímica; atividades biológicas.

ABSTRACT

The Atlantic Forest is one of the most biodiverse Brazilian biomes and has important domains, such as mangroves and restingas. Within the restingas, one of the most expressive families in terms of number of species is the Myrtaceae family. Some of the species have never been studied. Therefore, the objective of this work was to determine the chemical profile of the species *Myrciaria tenella* (DC.) O.Berg, *Myrcia splendens* (Sw.) DC, *Myrcia neuwiedeanana* (O.Berg) E.Lucas & C.E.Wilson. and *Myrcia neobrasiliensis* A.R.Lourenço & E.Lucas and to evaluate the antioxidant capacity and inhibition of enzymes involved in the metabolism of carbohydrates. The chemical profile was determined by chromatographic and spectrometric analyses, such as GC/MS and ESI(-)FT-ICR MS. Biological activities were determined by spectrophotometric methods, where the antioxidant activity was measured against ABTS and DPPH synthetic radicals and the enzyme inhibition activity was determined against two enzymes, α -amylase and α -glucosidase. The crude methanolic extracts of the aerial parts of each species were analyzed, as well as their respective hexane, dichloromethanolic, ethyl acetate and aqueous fractions. By GC/MS it was possible to identify the presence of sesquiterpenic and triterpenic compounds in the hexane fractions. In the ethyl acetate fraction of the species *M. neuwiedeanana* it was possible to isolate and identify two pentacyclic triterpenes, α -amyirin and β -amyirin. In the ESI(-)FT-ICR MS technique it was possible to identify several phenolic acids and flavonoids in methanol extracts and ethyl acetate fractions. The presence of methyl gallate and quinic acid was identified in all species and compounds such as quercetin, myricetin, quercitrin, myricitrin and triterpenic acids in the species of the genus *Myrcia*. All species showed excellent antioxidant capacities, mainly from the crude extracts and the more polar fractions. The ethyl acetate fractions of *M. splendens* ($IC_{50} = 0.43 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$) and *M. neobrasiliensis* ($IC_{50} = 0.42 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$) were the most active in the assay with the ABTS radical, showing antioxidant activity statistically similar to the standard for gallic acid ($IC_{50} = 0.31 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$). In the enzyme inhibition analysis, all crude extracts were able to inhibit α -glucosidase, with the *M. splendens* extract being the most active ($IC_{50} = 2.96 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$), and the polar fractions were the most active against α -amylase, where the aqueous fractions of *M. splendens* ($IC_{50} = 1.61 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$) and *M. neuwiedeanana* ($IC_{50} = 5.74 \pm 0.79 \mu\text{g/mL}$) showed the best results among them with activities close to the acarbose pattern ($IC_{50} = 1.41 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$). The present work reported for the first time chemical aspects and biological activities presented by these species, with results that demonstrated a great chemical diversity and promising biological results, which reaffirms the great importance of the species of the Myrtaceae family and directly contributes to the knowledge of the Brazilian flora

.

Keywords: Myrtaceae; phytochemistry; biological activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estruturas químicas da quinina e seus derivados, cloroquina e mefloquina.....	19
Figura 02 – Estruturas químicas de compostos identificados em espécies da família Myrtaceae.....	23
Figura 03 – Compostos comumente encontrados em espécies do gênero <i>Myrciaria</i>	24
Figura 04 – Folhas e frutos de <i>Myrciaria tenella</i> (DC.) O.Berg.....	25
Figura 05 – Monoterpenos encontrados nos óleos essenciais de espécies de <i>Myrcia</i>	27
Figura 06 – Estrutura química dos compostos bioativos isolados em <i>Myrcia multiflora</i> DC.....	28
Figura 07 – Folhas e frutos de <i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.....	29
Figura 08 – Folhas e frutos de <i>Myrcia neuwiedeanae</i> (O.Berg) E.Lucas & C.E.Wilson.....	30
Figura 09 – Partes aéreas de <i>Myrcia neobrasiliensis</i> (Sin.: <i>C. brasiliensis</i>).....	31
Figura 10 – Estruturas químicas das substâncias utilizadas no tratamento da Diabetes <i>mellitus</i>	35
Figura 11 – Esquema representando os procedimentos de maceração e partição líquido-líquido realizados para a obtenção dos extratos brutos e frações enriquecidas das partes aéreas de <i>M. tenella</i> , <i>M. splendens</i> , <i>M. neuwiedeanae</i> e <i>M. neobrasiliensis</i>	38
Figura 12 – Amostras obtidas no fracionamento de MNAc que foram submetidas aos processos de purificação e identificação	44
Figura 13 – Princípio do ensaio de captura de radicais livres utilizando o radical ABTS ^{•+}	46
Figura 14 – Princípio do ensaio de captura de radicais livres utilizando o radical DPPH.....	47
Figura 15 – Fundamento do ensaio de inibição da enzima α -amilase.....	49
Figura 16 – Atuação da enzima α -glicosidase sobre o reagente <i>p</i> -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (<i>p</i> NPG).....	50

Figura 17 – Curva de calibração com ácido gálico, equação da reta e coeficiente de determinação da regressão linear (R^2).....	53
Figura 18 – Curva de calibração com quercetina, equação da reta e coeficiente de determinação da regressão linear (R^2).....	53
Figura 19 – Características estruturais importantes para desempenho da atividade antioxidante de flavonoides.....	55
Figura 20 – Ácido fenólicos e flavonoides que possuem atividade antioxidante.....	57
Figura 21 – Espectro ESI(-)FT-ICR MS do (a) extrato bruto e da (b) fração acetato de etila de <i>M. tenella</i>	61
Figura 22 – Estrutura química dos ácidos ursólico e oleanólico.....	62
Figura 23 – Espectro ESI(-)FT-ICR MS do (a) extrato bruto e da (b) fração acetato de etila de <i>M. splendens</i>	64
Figura 24 – Espectro ESI(-)FT-ICR MS do (a) extrato bruto e da (b) fração acetato de etila de <i>M. neuwiedeana</i>	66
Figura 25 – Espectro ESI(-)FT-ICR MS do (a) extrato bruto e da (b) fração acetato de etila de <i>M. neobrasiliensis</i>	68
Figura 26 – Estruturas moleculares dos principais esqueletos triterpênicos.....	71
Figura 27 – Principais fragmentações propostas para o γ -sitosterol.....	72
Figura 28 – Padrão de fragmentação do γ -sitosterol obtido na análise da fração MNH.....	73
Figura 29 – Principais fragmentações dos triterpenos lupeol e lupenona.....	73
Figura 30 – Padrão de fragmentação do (1) lupeol e da (2) lupenona obtido na análise da fração MNH.....	74
Figura 31 – Principais fragmentações propostas para a betulina.....	75
Figura 32 – Padrão de fragmentação da betulina obtido na análise da fração MNH.....	75
Figura 33 – Representação da fragmentação tipo retro-Diels-Alder dos triterpenos β -amirina e a α -amirina.....	76
Figura 34 – Padrão de fragmentação da (1) β -amirina e da (2) α -amirina obtido na análise da fração MNH.....	77
Figura 35 – Espectro RMN ^1H da substância MNAc-01 (CDCl_3 , 400 MHz).....	83
Figura 36 – Espectro RMN DEPT 135 da substância MNAc-01 (CDCl_3 , 100 MHz)...	83
Figura 37 – Espectro RMN ^{13}C da substância MNAc-01 (CDCl_3 , 100 MHz).....	84
Figura 38 – Espectro de RMN HSQC ^{13}C - ^1H da substância MNAc-01.....	84

Figura 39– Estrutura química da substância MNAc-01 (α -amirina).....	85
Figura 40 – Espectro RMN ^1H da substância MNAc-02 (CDCl_3 , 400 MHz).....	87
Figura 41 – Espectro RMN DEPT 135 da substância MNAc-02 (CDCl_3 , 100 MHz)...	88
Figura 42 – Espectro RMN ^{13}C da substância MNAc-02 (CDCl_3 , 100 MHz).....	88
Figura 43 – Estrutura química da substância MNAc-02 (β -amirina).....	89
Figura 44 – Inibição da α -glicosidase pelos extratos brutos e padrão.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Eluentes utilizados no fracionamento cromatográfico da fração MNAc..	43
Tabela 02 – Rendimento dos extratos brutos metanólicos obtidos por maceração.....	51
Tabela 03 – Rendimento das frações obtidas por partição líquido-líquido.....	51
Tabela 04 – Classes químicas detectadas nos extratos metanólicos brutos	52
Tabela 05 – Quantificação de fenóis totais e flavonoides dos extratos brutos e suas frações.....	54
Tabela 06 – Composição química proposta para as frações polares de <i>M. tenella</i> ...	63
Tabela 07 – Composição química proposta para as frações polares de <i>M. splendens</i>	65
Tabela 08 – Composição química proposta para as frações polares de <i>M. neuwiedeana</i>	67
Tabela 09 – Composição química proposta para as frações polares de <i>M. neobrasiliensis</i>	69
Tabela 10 – Composição química da fração hexânica da <i>M. tenella</i>	78
Tabela 11 – Composição química da fração hexânica da <i>M. splendens</i>	80
Tabela 12 – Composição química da fração hexânica da <i>M. neuwiedeana</i>	81
Tabela 13 – Comparação entre os deslocamentos químicos (δ) de MNAc-01, em RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), e da α -amirina.....	85
Tabela 14 – Comparação entre os deslocamentos químicos (δ) de MNAc-02, em RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), e da β -amirina.....	89
Tabela 15 – Composição química da fração hexânica da <i>M. neobrasiliensis</i>	91
Tabela 16 – Triagem antioxidante dos extratos brutos e suas frações utilizando os radicais ABTS e DPPH.....	93
Tabela 17 – Inibição da α -amilase promovida pelas quatro espécies estudadas	97

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ABTS^{•+} – 2-2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

ANOVA – Análise de Variância

CCC – Cromatografia em Coluna Clássica

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

GC/MS - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometrometria de Massas

DBE – Double Bound Equivalent

DPPH[•] – 1,1-difenil-2-picril-hidrazila

DM – Diabetes *mellitus*

DM1 – Diabetes *mellitus* tipo 1

DM2 – Diabetes *mellitus* tipo 2

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNS – Ácido 3,5-dinitrossalicílico

ERNS - Espécies reativas de nitrogênio

EROs - Espécies reativas de oxigênio

ESI – Fonte eletrospray

FT-ICR MS – Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier

IC₅₀ – Concentração inibitória 50%

GSH - Glutathiona

MT – Extrato metanólico de *Myrciaria tenella*

MTAc – Fração acetato de etila da *Myrciaria tenella*

MTAq – Fração aquosa da *Myrciaria tenella*

MTD – Fração diclorometanólica da *Myrciaria tenella*

MTH – Fração hexânica da *Myrciaria tenella*

MS – Extrato metanólico de *Myrcia splendens*

MSAc – Fração acetato de etila da *Myrcia splendens*

MSAq – Fração aquosa da *Myrcia splendens*

MSD – Fração diclorometanólica de *Myrcia splendens*

MSH – Fração hexânica de *Myrcia splendens*

MN – Extrato metanólico de *Myrcia neuwiedean*

MNAc – Fração acetato de etila da *Myrcia neuwiedean*

MNAq – Fração aquosa da *Myrcia neuwiedean*

MND – Fração diclorometanólica *Myrcia neuwiedean*

MNH – Fração hexânica da *Myrcia neuwiedean*

MNB – Extrato metanólico de *Myrcia neobrasiliensis*

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SOD – Superóxido desmutase

UV/Vis – Ultravioleta/Visível

pNP – p-nitrofenol

pNPG – p-nitrofenil- α -Dglicopiranosídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	FAMÍLIA MYRTACEAE	21
1.1.1	Gênero Myrciaria	23
1.1.1.1	Espécie <i>Myrciaria tenella</i> (DC.) O.Berg.....	24
1.1.2	Gênero Myrcia	26
1.1.2.1	Espécie <i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC	28
1.1.2.2	Espécie <i>Myrcia neuwiedean</i> a (O.Berg) E.Lucas & C.E.Wilson	29
1.1.2.3	Espécie <i>Myrcia neobrasiliensis</i> A.R.Lourenço & E.Lucas	30
1.2	DIABETES MELLITUS: ESTRESSE OXIDATIVO E ABORDAGENS TERAPÊUTICAS.....	32
2	OBJETIVO	36
2.1	OBJETIVO GERAL	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	37
3.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	37
3.3	DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO.....	39
3.3.1	Triagem fitoquímica preliminar dos extratos brutos metanólicos	39
3.3.2	Quantificação de compostos fenólicos totais.....	40
3.3.3	Quantificação de flavonoides.....	41
3.3.4	Análise por Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de Massas (GC/MS).....	41
3.3.5	Análise por Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclôtrônica de Íons por Transformada de Fourier com Eletrospray no modo negativo (ESI(-)FT-ICR MS).....	42
3.3.6	Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila de <i>M. neuwiedean</i> a (MNAc)	43
3.3.6.1	Substâncias isoladas, purificadas e identificadas.....	44
3.3.6.1.1	Frações 68 – 71	44
3.3.6.1.2	Frações 72 – 76	44
3.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	45
3.4.1	Avaliação da atividade antioxidante.....	45
3.4.1.1	Atividade sequestradora do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS ^{•+}).....	46

3.4.1.2	Determinação da atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH*)	47
3.4.2	Avaliação da atividade enzimática	48
3.4.2.1	Determinação da atividade de inibição frente a enzima α -amilase.....	48
3.4.2.2	Determinação da atividade de inibição frente a enzima α -glicosidase.....	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
4.1	RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS E SUAS FRAÇÕES.....	51
4.2	TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR DOS EXTRATOS METANÓLICOS BRUTOS	52
4.3	QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	53
4.4	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	55
4.4.1	Caracterização dos compostos fenólicos e flavonoides por ESI(-)FT-ICR MS	55
4.4.1.1	Caracterização química do extrato bruto e da fração acetato de etila de <i>M. tenella</i>	61
4.4.1.2	Caracterização química do extrato bruto e da fração acetato de etila de <i>M. splendens</i>	63
4.4.1.3	Caracterização química do extrato bruto e da fração acetato de etila de <i>M. neuwiedea</i>	66
4.4.1.4	Caracterização química do extrato bruto e da fração acetato de etila de <i>M. neobrasiliensis</i>	68
4.4.2	Caracterização dos triterpenos e esteroides por GC/MS.....	70
4.4.2.1	Caracterização química da fração hexânica da espécie <i>M. tenella</i>	77
4.4.2.2	Caracterização química da fração hexânica da espécie <i>M. splendens</i>	79
4.4.2.3	Caracterização química da fração hexânica da espécie <i>M. neuwiedea</i>	81
4.4.2.3.1	MNAc-01: α -amirina	82
4.4.2.3.2	MNAc-02: mistura de α - e β -amirina.....	86
4.4.2.4	Caracterização química da fração hexânica da espécie <i>M. neobrasiliensis</i>	90
4.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	92
4.5.1	Triagem de atividade antioxidante	92
4.5.2	Triagem de inibição da α -amilase	96
4.5.3	Triagem de inibição da α -glicosidase	98
5	CONCLUSÃO	101
6	REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

Produtos obtidos de fontes naturais são utilizados pela população para o tratamento e cura de enfermidades desde o início das civilizações, formando a base dos sistemas medicinais tradicionais e modernos (RISHTON, 2008). Os sistemas tradicionais baseados na utilização de plantas continuam a desempenhar um papel essencial no cuidado a saúde e seu uso por diferentes culturas já está amplamente documentado e influenciam, até os dias atuais, a medicina moderna como conhecemos (WALKER, 2013).

A Medicina Tradicional Indiana e a Medicina Tradicional Chinesa são as tradições mais antigas ainda vivas e ativas. Ambos os sistemas visam promover a melhora da qualidade de vida e da saúde da população por meio de estratégias terapêuticas com abordagem holística. Além disso, tratam-se de sistemas medicinais voltados para a cura por meio da natureza, onde o principal foco está no paciente e não na doença, ao contrário do que é observado hoje na medicina ocidental moderna (PATWARDHAN et al., 2005).

Outro sistema medicinal de extrema importância e com implicações diretas na medicina moderna é a medicina tradicional indígena. Por meio da colonização portuguesa, os conhecimentos medicinais dessas populações foram disseminados pela Europa, onde cirurgiões, farmacêuticos e físicos empregaram e adotaram métodos curativos e plantas medicinais utilizadas por essa população, contribuindo assim para a expansão e disseminação do conhecimento médico indígena. A partir da utilização de plantas curativas por essas populações, foram descobertos e/ou originados diversos medicamentos que, ainda hoje, são utilizados na terapêutica. Dentre as diversas plantas medicinais indígenas que foram adotadas e exportadas pelos colonizadores portugueses estão os derivados do cacau, como a manteiga de cacau utilizada para tratar doenças de pele, a ipecacuanha, que possui propriedades eméticas, a copaíba, um excelente anti-inflamatório, dentre diversos outros produtos medicinais (WALKER, 2013).

Uma das maiores contribuições para a humanidade foi a descoberta da quinina, um fármaco antimalárico inicialmente isolado da casca de espécies de *Cinchona* (ex.: *Cinchona officinalis*). A casca dessa espécie é utilizada por grupos indígenas da

região amazônica para o tratamento de febre e da própria malária. Foi, então, a partir dessa utilização que estudos foram sendo realizados possibilitando o isolamento da quinina em 1820, o que viabilizou a síntese desta e de outras moléculas para a mesma finalidade, como a cloroquina e mefloquina, que foram introduzidas como tratamento da malária em meados do século 20 (Figura 01) (CRAGG; NEWMAN, 2013).

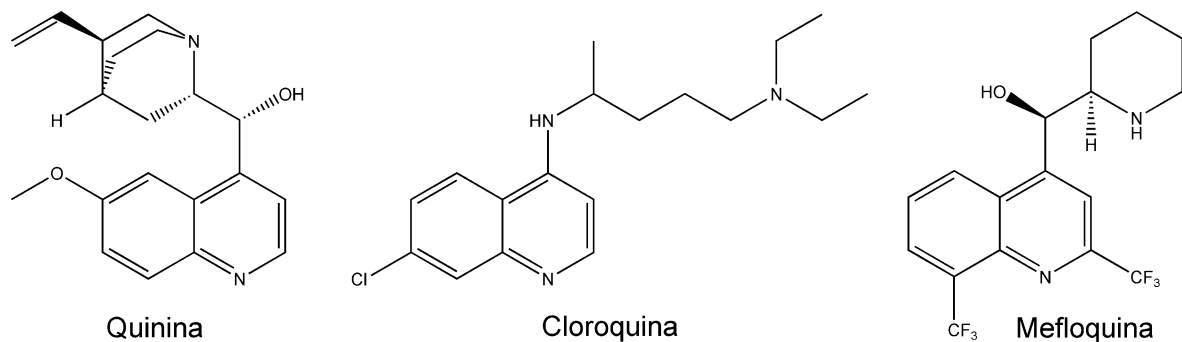


Figura 01 – Estruturas químicas da quinina e seus derivados, cloroquina e mefloquina.

O Brasil é o país de maior biodiversidade do mundo que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural, que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tem o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2006).

O país conta com seis diferentes biomas terrestres com características distintas. Dentre eles está a Mata Atlântica, principal bioma do Espírito Santo.

A Mata Atlântica é composta por formações florestais nativas e ecossistemas associados, como manguezais e vegetações de restinga. É o bioma predominante do litoral brasileiro e, segundo o Ministério do Meio Ambiente, originalmente ocupava mais de 1,3 milhões de km² em 17 estados brasileiros, porém atualmente só resta cerca de 29% de sua cobertura original. Estima-se que existam cerca de 20 mil espécies vegetais neste território (cerca de 35% das espécies brasileiras), incluindo espécies em extinção e espécies endêmicas (BRASIL, 2020). Com isso, a conservação desse bioma e a recuperação da vegetação nativa tornam-se fundamentais para a sociedade brasileira para isso, existem leis de proteção como as Áreas de Preservação Permanente e Reserva Legal (Código Florestal – Lei nº 12.651/2012) e Unidades de Conservação (SNUC – Lei nº 9,9985/2000), além da Lei

da Mata Atlântica (Lei nº 11.428/2006) regulamentada pelo decreto nº 6.660/2008 (BRASIL, 2020).

Associadas ao domínio da Mata Atlântica estão as restingas, ecossistema reconhecido como um dos *hotspots* de biodiversidade mais ameaçados do mundo. Estas compreendem um conjunto geomorfológico formado por sedimentos arenosos de origem marinha e fluviomarina, com diversas formações como barras, esporões e planícies ao longo do litoral do Brasil. Abrigam um mosaico de comunidades vegetais distintas com grande diversidade ecológica, que apresentam formações vegetais herbáceas, arbustivas e arbóreas (MELO JÚNIOR; BOEGER, 2015; THOMAZI et al., 2013).

Apesar de sua grandeza, os ecossistemas litorâneos são os que mais sofrem com ações humanas. Grande parte de sua destruição se dá devido aos avanços da urbanização, especulação imobiliária, ocupação indevida, deposição irregular de lixo e do turismo predatório que diminuem a cobertura vegetal desses locais (SILVA, 2012; THOMAZI et al., 2013). Os esforços dos cientistas em busca do conhecimento da diversidade, do funcionamento e da capacidade de recuperação desses ecossistemas vem sendo superados, até o momento, pela velocidade de destruição da costa brasileira (SÁ, 2002).

Devido a intervenção humana e destruição desenfreada, supõe-se que muitas espécies vegetais que nunca foram descritas ou estudadas já não existam mais. Sendo assim, com a extinção de diversas espécies houve grandes perdas em termos de variedade molecular e no entendimento da interação dos seres vivos com o meio (SILVA, 2012). Hoje, legalmente, as restingas são consideradas Áreas de Proteção Permanente - APPs (Lei 4.771/65 do Código Florestal, art. 2º), resistindo, até o momento, aos constantes ataques por parte do Governo Federal e descaso por parte da população.

Apesar de toda a destruição e perda, ainda é possível encontrar áreas remanescentes da Mata Atlântica no território do Espírito Santo, como por exemplo, as restingas do litoral e as área de preservação (THOMAZI et al., 2013) Com isso, surge a necessidade de estudos descritivos da flora capixaba, bem como avaliação fitoquímica das espécies presentes nesta, para que seja possível conhecer cada vez mais suas peculiaridades e assim preservar o que ainda resta.

1.1 FAMÍLIA MYRTACEAE

A Família Myrtaceae encontra-se distribuída em todo território brasileiro, entretanto é na Mata Atlântica que as espécies desta família se destacam devido sua grande diversidade (LOURENÇO; BARBOSA, 2012). É uma família nativa não endêmica do Brasil, que compreende cerca de 150 gêneros e aproximadamente 6 mil espécies aceitas a nível mundial, distribuídas principalmente na América tropical, sul da Austrália e sudeste asiático (MORESCO et al., 2014).

No Brasil, são citados 24 gêneros e cerca de 1000 espécies pertencentes a essa família, das quais 50% são endêmicas da Mata Atlântica, englobando uma grande variedade de plantas cultivadas para fins econômicos, ornamentais e alimentícios (MORESCO et al., 2014). Na família destacam-se espécies com produção de frutos comestíveis muito apreciados pela população como a goiaba (*Psidium guajava*), a jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) e a pitanga (*Eugenia uniflora*), outros exemplos de espécies com elevado poder econômico são os eucaliptos (principalmente o *Eucalyptus globulus*) utilizados na extração madeireira e produção de papel e derivados, o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) utilizado como especiaria. Essas espécies traduzem uma pequena fração do grande potencial dessa família, que possui uma das biodiversidades mais importantes da Mata Atlântica (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006; MORAIS; CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014).

Apesar do grande número de espécies, da grande importância para a economia do país e constituição da Mata Atlântica, poucas são as espécies empregadas para fins medicinais (CRUZ; KAPLAN, 2012). Entretanto, algumas espécies dessa família são utilizadas para tratamento da diabetes, de distúrbios gastrointestinais (principalmente como antidiarreico), estados hemorrágicos, como redutoras de colesterol, anti-inflamatórias, antirreumáticas e empregadas em doenças infecciosas devido a atividade antimicrobiana promovida principalmente por seus óleos essenciais (CRUZ; KAPLAN, 2012; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). Estas atividades vêm sendo relacionadas com a presença, principalmente, de fenóis, carotenoides, taninos e terpenos nas espécies desta família (APEL et al., 2010).

Poucos estudos etnomedicinais, fitoquímicos e farmacológicos existem sobre essa importante família, porém, é possível encontrar relatos na literatura apontando que a família Myrtaceae se trata de um grupo quimicamente diverso (CRUZ; KAPLAN, 2012; SCALVENZI et al., 2017). Algumas espécies já se mostraram capazes de acumular compostos fenólicos e terpenos oxigenados. Em geral, os óleos essenciais apresentam uma predominância de sesquiterpenos cíclicos e monoterpenos, em menor quantidade. Os resultados obtidos até o momento demonstraram que esses óleos exibem importantes atividades biológicas, como antimicrobiana, larvicida, anti-inflamatória e antioxidante (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

Além disso, compostos como miricitrina, rutina, kaempferol, quercetina, ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido quínico já foram identificadas em algumas espécies da família Myrtaceae. Essas substâncias são geralmente associadas à atividades antioxidantes promovidas por extratos de plantas medicinais, principalmente devido a capacidade destas em capturar radicais livres, proteger contra a peroxidação lipídica e remover espécies reativas de oxigênio (Figura 02) (MORESCO et al., 2014; SALVADOR et al., 2011).

Mesmo com a escassez de estudos, é possível observar o grande potencial químico e biológico dessa família, que por si só já justificam a preservação das florestas tropicais, principalmente por se tratar de uma promissora fonte de compostos bioativos.

No Espírito Santo, Myrtaceae está entre as famílias mais ricas em números de espécies nas restingas. Ao norte do estado, nas regiões de Conceição da Barra e São Mateus, foram registradas 52 espécies distribuídas em 10 gêneros. Assim como no resto do país, os gêneros mais representados são o *Eugenia* e *Myrcia*, mas as espécies não se limitam a estes (GIARETTA; PEIXOTO, 2015).

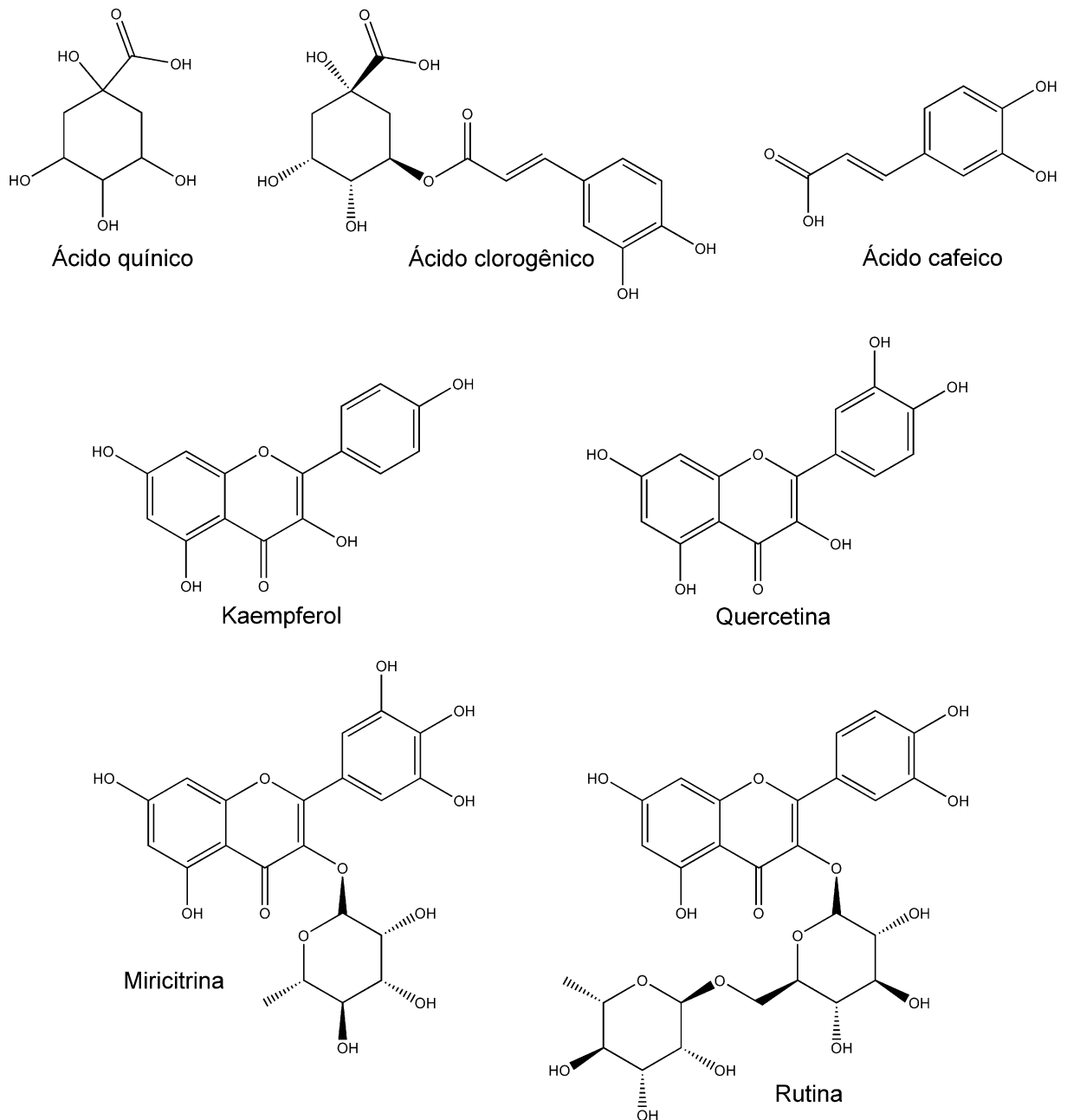


Figura 02 – Estruturas químicas de compostos identificados em espécies da família Myrtaceae.

1.1.1 Gênero *Myrciaria*

As espécies do gênero *Myrciaria* podem ser encontradas em diferentes biomas brasileiros, como Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, por exemplo. Esse gênero contém cerca de 99 espécies conhecidas, sendo 21 nativas do Brasil (BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014). Algumas espécies produzem frutos carnosos que são consumidos na forma de sucos, geleias, licores e sorvetes, como as “jaboticabeiras” (*Myrciaria cauliflora* e *Myrciaria jaboticaba*), que além de nutritivos

apresentam propriedades medicinais, como atividade antioxidante, e são utilizados na medicina tradicional para tratamento de hemoptise, asma, diarreia e tonsilite crônica (ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012; PLAGEMANNA et al., 2012).

Na literatura é possível encontrar estudos descrevendo a atividade antioxidante, antibacteriana e hipoglicêmica de *Myrciaria dubia* (camu-camu) (AKTER et al., 2011), atividade anticolinesterase de *M. floribunda* (camboim) (TIETBOHL et al., 2012) e atividade antioxidante e antiproliferativa de *M. cauliflora* e *M. jacobiniana* (jaboticaba) (LEITE-LEGATTI et al., 2012).

Sabe-se que, quimicamente, espécies desse gênero são capazes de apresentar altos teores de compostos fenólicos, como rutina, ácido gálico, ácido elágico e quercetina (Figura 02, pág. 20; Figura 20, pág. 54), além de terpenos. Óleos essenciais de *Myrciaria* spp. já foram analisados e os compostos majoritariamente encontrados foram sesquiterpenos, como β -cariofileno e óxido cariofileno (Figura 03) (BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014).

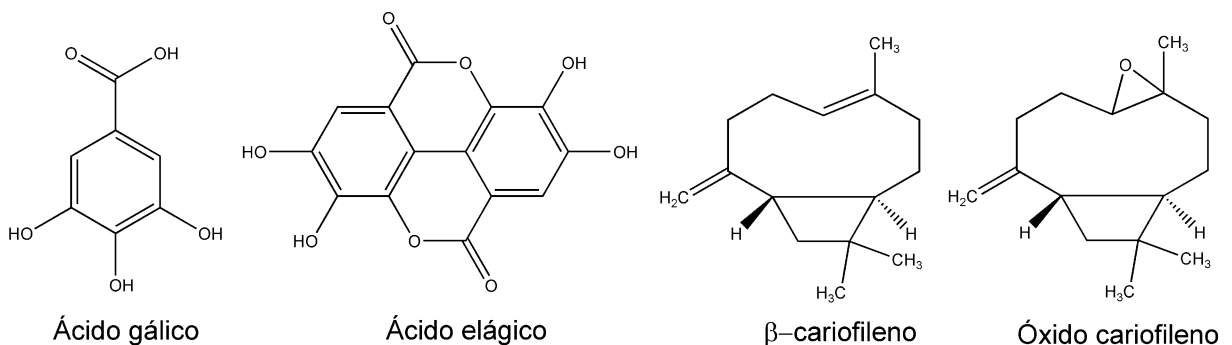


Figura 03 – Compostos comumente encontrados em espécies do gênero *Myrciaria*.

1.1.1.1 Espécie *Myrciaria tenella* (DC.) O.Berg

Sinonímia botânica: *Eugenia tenella* DC. ou *Myrciaria undulata* O.Berg.

Myrciaria tenella (DC.) O.Berg (Figura 04) é popularmente conhecida como “cambuí” ou “camboim” e comumente encontrada em zonas ribeirinhas e várzeas da região sudeste do país (MONTEIRO et al., 2016). É uma espécie nativa, não endêmica do Brasil, que possui a menor dimensão foliar dentre as Myrtaceae de áreas de restinga do Espírito Santo, geralmente de porte arbustivo e bastante ramificada, com produção de frutos comestíveis (MONTEIRO et al., 2014). É utilizada como anti-inflamatório e consumida pela população devido a produção de frutos adocicados (GAMA et al., 2017). Apresenta as seguintes características morfológicas:

Arbustos ou árvores 1-5m. Casca lisa com depressões, ritidoma se desprendendo em lâminas irregulares de borda arredondada. Indumento pubérulo-esbranquiçado nos ramos jovens e pecíolo, glabrescente nas folhas, hipanto glabro ou pubérulo. Lâminas foliares 1-2,5 x 0,4-0,8 cm, ovadas, às vezes elípticas, discolors in vivo, cartáceas; ápice agudo ou atenuado; base aguda ou cuneada; nervura principal sulcada na face adaxial; nervuras secundárias 10-18 pares, pouco visíveis na face abaxial, inconspícuas na adaxial; nervura marginal 0,2-0,5 mm do bordo, frequentemente inconspícua, margem plana ou discretamente revoluta; glândulas translúcidas visíveis na face abaxial, menos na adaxial; pecíolos 0,8-1,5 mm compr. Fascículo com eixo principal 0,5 mm compr., 1-4 flores; brácteas 0,5 x 0,5 mm, orbiculares; antopódios 1-1,5 x 0,5 mm; bractéolas 1 x 1-1,2 mm, ovadas ou suborbiculares, conadas na base, persistentes; botão 1,5 x 1-1,2 mm; cálice com lobos desiguais, livres no botão, 2 maiores 1 x 1,4-1,5 mm, 2 menores 1 x 1-1,2 mm, suborbiculares, pubérulos na face externa, glabro na interna; pétalas 1-1,5 x 1,3-1,6 mm, suborbiculadas, glabras; estames até 5 mm compr.; estilete 5-5,5 mm compr., glabro; ovário 4-5 óvulos por lóculo. Frutos 6-8 mm diâm., globosos, atropurpúreos quando maduros, sementes com testa coriácea, embrião conferruminado (MONTEIRO et al., 2014).



Figura 04 – Folhas e frutos de *Myrciaria tenella* (DC.) O.Berg.
Fonte: Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (fotógrafo João Paulo de Maçaneiro). Disponível em: <http://floradigital.ufsc.br>

Estudos com a *M. tenella* já demonstraram que esta espécie possui atividades anti-inflamatória (APEL et al., 2010), antimicrobiana (SCHNEIDER et al., 2008), antimutagênica (FERREIRA; VARGAS, 1999), antioxidante e antiproliferativa (RIBEIRO et al., 2019), devido, principalmente a presença de flavonoides, terpenos e saponinas.

1.1.2 Gênero *Myrcia*

Myrcia sensu lato ou *Myrcia s.l.* é considerado o maior gênero da família Myrtaceae e engloba quatro subgêneros tradicionais, *Myrcia* DC., *Marlierea* Cambess, *Calyptanthes* Sw. e *Gomidesia* O.Berg, compreendendo cerca de 750 espécies que agora estão em processo de sinonimização com base em descobertas moleculares recentes (CASCAES et al., 2015). No Brasil são encontradas aproximadamente 300 espécies de *Myrcia*, distribuídas em diferentes regiões do país (MORESCO et al., 2014).

Myrcia spp. são popularmente conhecidas como “plantas insulínicas” ou “insulina vegetal”. Esses termos são geralmente utilizados para se referir as espécies *M. multiflora*, *M. salicifolia*, *M. uniflora*, *M. sylvatica*, *M. guianenses*, *M. amazônica*, dentre outras, que também são conhecidas como “pedra-ume-caá” (CASCAES et al., 2015). Algumas são comercializadas devido a ação hipoglicemiante apresentada, como a *Myrcia uniflora*, que é vendida como tintura ou em cápsulas para o tratamento da diabetes (BATISTA et al., 2011). “Pedra-ume-caá” também são utilizadas para tratamento de diarreias, enterites, hemorragias e aftas. Outras espécies de *Myrcia* também são utilizadas popularmente para o tratamento de outras condições, como: *M. bracteata* para dispepsia (CASCAES et al., 2015), *M. ovata* para tratamento de doenças gastrointestinais e gastrites (CÂNDIDO et al., 2010) e *M. guaianensis* para neutralizar o veneno de cobras (SOUSA; SILVA, 2013).

Folhas, flores, galhos e frutos de *Myrcia* são capazes de produzir óleos essenciais. Geralmente, sesquiterpenos são os compostos majoritariamente encontrados, com variadas concentrações de monoterpenos e compostos alifáticos (MORESCO et al., 2014). Os compostos terpinen-4-ol, linalol, α -terpineol e β -cariofileno são comumente associados as atividades antimicrobiana e anti-inflamatória apresentadas por esses óleos essenciais (Figura 05) (CASCAES et al., 2015).

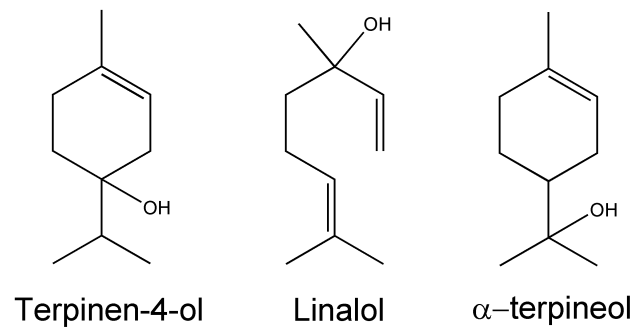


Figura 05 – Monoterpenos encontrados nos óleos essenciais de espécies de *Myrcia*.

Plantas do gênero *Myrcia* contém triterpenos e esteroides (GOTTLIEB; DA SILVA; MAIA, 1972), além de acetofenonas, taninos e flavonoides glicosilados (YOSHIKAWA et al., 1998), que podem atuar como inibidores da α -glicosidase e da aldose redutase. Estudos prévios demonstraram que o extrato de *M. sphaerocarpa* foi capaz de inibir a enzima α -amilase e extratos de *M. rubella*, *M. variabilis*, *M. palustris* e *M. multiflora* foram capazes de inibir a enzima α -glicosidase (LIMA et al., 2018; MORESCO et al., 2014; YOSHIKAWA et al., 1998).

Os compostos frequentemente identificados no gênero *Myrcia* englobam flavonoides e flavonoides-O-glicosídeo, como mirciacitrinas, miricitrina, quercitrina, quercetina e miricetina, ácidos orgânicos, como ácido gálico, ácido quínico e derivados, e acetofenonas-O-glicosídeo, como mirciafenonas A e B (Figura 02, pág. 20; Figura 03, pág. 21; Figura 20, pág. 54). Os compostos mirciacitrina I e mirciafenona B foram isoladas na espécie *Myrcia multiflora* DC. (Figura 06) e apresentaram potente atividade de inibição das enzimas α -glicosidase e aldose redutase (MATSUDA; NISHIDA; YOSHIKAWA, 2002; YOSHIKAWA et al., 1998). Ou seja, a presença de flavonoides glicosilados e acetofenonas em espécies do gênero *Myrcia* pode ajudar a explicar a utilização tradicional de espécies desse gênero para o tratamento da diabetes (CASCAES et al., 2015; YOSHIKAWA et al., 1998).

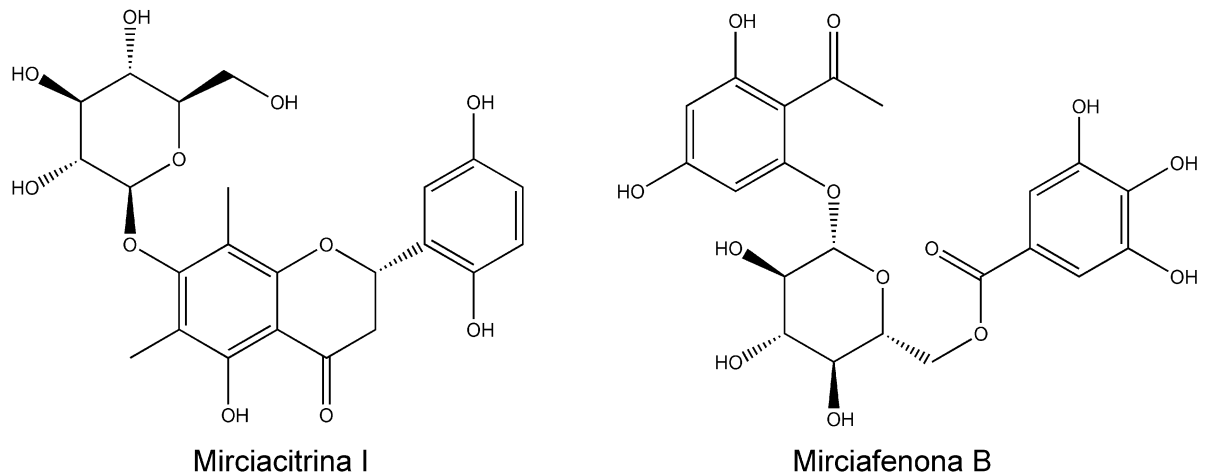


Figura 06 – Estrutura química dos compostos bioativos isolados em *Myrcia multiflora* DC.

1.1.2.1 Espécie *Myrcia splendens* (Sw.) DC

Sinonímia botânica: *Myrtus splendens* Sw.

Myrcia splendens (Sw.) DC (Figura 07) é uma espécie nativa, não endêmica do país, popularmente conhecida como “guamirim” ou “folha-miúda”. Pode ser encontrada do México ao Sul do Brasil, distribuindo-se amplamente pela vegetação de restinga do Espírito Santo (PONTES et al., 2019).

Sua descrição botânica encontra-se a seguir:

Arbustos ou árvores 3-10 m. Casca áspera, estriada, ritidoma se despreendendo em placas, casca interna vermelha. Indumento pubérulo a pubescente, esbranquiçado, nos ramos jovens, pecíolo, inflorescência, antopódio e mais denso no hipanto, glabrescente no fruto e na face abaxial da folha. Lâminas foliares 5-11 × 2-4 cm, elípticas, às vezes oblongas, levemente discoloradas, cartáceas, nítidas na face adaxial; ápice acuminado a longo-acuminado; base aguda ou obtusa; nervura principal sulcada na face adaxial; nervuras secundárias 18-26 pares evidentes em ambas as faces; intersecundárias reticuladas, tênues; nervura marginal 1-2 mm do bordo, intramarginal 0,2-0,4 mm do bordo, frequentemente inconspícua, margem levemente revoluta; glândulas translúcidas pouco visíveis em ambas as faces; pecíolos 3-6 mm compr. Panícula com eixo principal 3-9 cm compr., 2-6 pares de ramificações opostas; brácteas 1,5 × 0,5, lanceoladas; antopódios 0,4-1 × 0,4 mm; bractéolas 0,8-2 × 0,3-0,5 mm, lanceoladas; botão 2-3 × 1,8-2 mm, globoso; cálice com lobos desiguais, 3 menores 0,5 × 1 mm, ovados, 2 maiores 1 × 1 mm, suborbiculares, pubescentes ou pubérulos na face externa, glabros na interna; pétalas 2 × 1,8-2 mm, suborbiculadas, pubérulas na face externa, glabras na interna; estames até 4 mm compr., tecas posicionadas na mesma altura, disco estaminal pubérulo; estilete 5-6 mm compr., região basal pubérula. Frutos 5-6 × 4-5,5 mm, elípticos, purpúreos quando maduros, sementes com testa coriácea (MONTEIRO et al., 2014).



Figura 07 – Folhas e frutos de *Myrcia splendens* (Sw.) DC.

Fonte: Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (fotógrafo João Paulo de Maçaneiro). Disponível em: <http://floradigital.ufsc.br>

Na literatura é possível encontrar estudos que apontam as seguintes atividades biológicas promovidas pelas folhas desta espécie: atividade antifúngica (PONTES et al., 2019), atividade antimicrobiana (SCIO et al., 2012) e atividade antioxidante (PONTES et al., 2019; SCIO et al., 2012).

Em estudos das folhas de *M. splendens* foram identificados miricitrina e rutina (MORESCO et al., 2014), ácido gálico e quercitrina (GULDBRANDSEN et al., 2015) e miricetina (CASCAES et al., 2015) (Figura 03, pág. 18; Figura 04, pág. 20). Contudo, apesar da composição química e desempenho de algumas atividades biológicas, não foram encontrados relatos da utilização de *M. splendens* na medicina tradicional.

1.1.2.2 Espécie *Myrcia neuwiedeanae* (O.Berg) E.Lucas & C.E.Wilson

Sinonímia botânica: *Marlierea neuwiedeanae* (O.Berg) Nied. ou *Rubachia neuwiedeanae* O.Berg

Myrcia neuwiedeanae (O.Berg) E.Lucas & C.E.Wilson (Figura 08) é um arbusto frutífero nativo e endêmico do Brasil, que pode ser encontrado nos estados da Bahia, Sergipe e Espírito Santo. É uma espécie da Mata Atlântica que ocorre na faixa litorânea, mais especificamente nas formações de restinga baixa (SANTOS et al., 2020).

Suas descrições morfológicas estão descritas abaixo:

Arbustos ou árvores 1-6 m. Casca áspera, sem ritidoma se desprendendo. Indumento pubescente castanho-claro na inflorescência, denso no hipanto e esparso nos frutos. Terminação dos ramos crescendo em organização dicotômica. Lâminas foliares 5,5-12,5 x 2,5-6 cm, elípticas, raro obovadas, discolores, cartáceas ou coriáceas; ápice curto-acuminado, às vezes acuminado; base obtusa ou aguda; nervura principal plana ou saliente na face adaxial; nervuras secundárias 10-16 pares, evidentes na face abaxial, menos na adaxial; nervura marginal 1-3 mm do bordo, intramarginal 0,5-1 mm do bordo, frequentemente inconspícua, margem moderadamente revoluta; glândulas translúcidas visíveis na face adaxial, menos na abaxial; pecíolos 5-10 mm compr. Tirsoide com eixo principal 1-12 cm compr., 2-10 ramificações alternas, ocasionalmente opostas, terminadas por 3-4 flores sésseis aglomeradas; brácteas 3-6 x 2,5-3,5 mm, ovada, geralmente envolvendo todo o botão; bractéolas 2-3 x 1,5-2 mm, ovadas, não conadas, persistentes; botão 3-4 x 2,5-3 mm, obovado; cálice deiscente por 4-6 lobos irregulares, 1,5-3 x 1,2 mm, pubérulo na face externa, glabro na interna; corola ausente; estames até 6,5 mm compr., disco estaminal glabro; estilete 6-7 mm compr., glabro. Frutos 4-10 mm diâm., globosos, purpúreos quando maduros, sementes com testa cartácea (MONTEIRO et al., 2014).



Figura 08 – Folhas e frutos de *Myrcia neuwiedeanana* (O.Berg) E.Lucas & C.E.Wilson. Fonte: Reflora – Flora do Brasil 2020 (fotógrafa Vanessa Grazielle Staggemeier). Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB603021>

Durante a revisão de literatura não foi possível encontrar nenhum estudo químico ou de avaliação das atividades biológicas da espécie *M. neuwiedeanana*.

1.1.2.3 Espécie *Myrcia neobrasiliensis* A.R.Lourenço & E.Lucas

Sinonímia botânica: *Calyptranthes brasiliensis* Spreng.

Myrcia neobrasiliensis A.R.Lourenço & E.Lucas (Figura 09) possui uma ampla distribuição no Brasil, podendo ser encontrada em grande parte do nordeste, todo o sudeste, Goiás, Paraná e Santa Catarina. Se trata de outra espécie também encontrada na restinga do litoral do Espírito Santo (SANTOS et al., 2020b).

Apresenta as seguintes características morfológicas:

Arbustos ou árvores 3-12 m. Casca áspera, sem desprendimento do ritidoma. Indumento pubescente-ferrugíneo nos ramos novos, face abaxial da folha, inflorescência, flores e frutos. Lâminas foliares 3-9,5 × 1,3-5 cm, elípticas, às vezes ovadas ou arredondadas, cartáceas a coriáceas; ápice curto-acuminado, agudo ou obtuso; base obtusa, às vezes aguda; nervuras secundárias 13-20 pares, visíveis na face adaxial, pouco aparente na abaxial, às vezes inconspícuas; nervura marginal 1,2-3 mm do bordo, intramarginal 0,3-1 mm do bordo; pecíolos 2-7 mm compr. Tirsoide com eixo principal 3-8 cm compr., 2-3 ramificações opostas terminadas por 3-7 flores sésseis, aglomeradas; brácteas 2-3,5 × 1,6-2 mm, ovadas; bractéolas 1-2 × 0,5-1,2 mm, ovadas, caducas antes ou depois da antese; botão 2,5-3 × 2 mm, obovado; pétalas 4, 1,2-1,5 × 0,4-0,6 mm, estreito- obovadas, glabras; estames até 5 mm compr.; estilete 5,5-7 mm compr. Frutos 3-4 × 3-5,5 mm, globosos discretamente achatados nos pólos (MONTEIRO et al., 2014).



Figura 09 – Partes aéreas de *Myrcia neobrasiliensis* (Sin.: *C. brasiliensis*)

Fonte: Neotropical Plants image database - Specimen Zappi, D.C. 2473

Disponível em:

http://www.kew.org/science/tropamerica/imagedatabase/large1/cat_single1-659.htm

Assim como a espécie *M. neuwiedeana*, durante o levantamento bibliográfico, não foi possível encontrar nenhum estudo químico ou biológico da espécie *M. neobrasiliensis*.

1.2 DIABETES MELLITUS: ESTRESSE OXIDATIVO E ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

O Diabetes *mellitus* (DM) é classificada como uma síndrome metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia pós-prandial persistente resultante de uma deficiência ou resistência insulínica. A condição hiperglicêmica persistente no diabetes desempenha um papel predisponente para disfunção e falência de vários órgãos, como rins, coração, vasos sanguíneos e olhos. Assim, o controle sustentado da hiperglicemia é considerado importante para o tratamento eficaz do diabetes (WANG et al., 2013).

Hoje, o DM se trata de um crescente problema de saúde mundial. Em 2017, a Federação Internacional de Diabetes estimou que 8,8% da população mundial com idades entre 20 e 79 anos, aproximadamente 425 milhões de pessoas, vivia com diabetes e que até 2045 o número poderia atingir 628,6 milhões. O aumento dessa prevalência do está associado a diversos fatores, como sedentarismo, obesidade, envelhecimento da população, dietas pobres em nutrientes e à maior sobrevivência de pessoas com diabetes (SBD, 2020).

O DM pode ser classificado como diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), diabetes *mellitus* gestacional e outros tipos de DM. Os tipos mais conhecidos e de maior prevalência na população mundial são o DM1 e o DM2, sendo o DM2 o tipo mais comum, que corresponde a cerca de 90% de todos os casos de DM. É uma doença poligênica, com forte herança familiar e que ainda não é completamente esclarecida. A principal característica fisiológica apresentada por pacientes com DM2 é a hiperglicemia persistente associada a redução da secreção de insulina pelo pâncreas e resistência à ação da insulina circulante com posterior comprometimento da captação de glicose em tecidos como o do fígado, por exemplo. Sua ocorrência está fortemente ligada a fatores ambientais, como hábitos dietéticos e ausência de atividade física, que geralmente estão associados à obesidade, que é um dos maiores fatores de risco para desenvolvimento do DM, e ao aumento da idade, pois geralmente acomete pacientes idosos (ADA, 2005).

Além destes, o estresse oxidativo causado pelo desbalanço entre a produção de espécies reativas e o sistema antioxidante endógeno também vem sendo associados ao desenvolvimento e progressão do DM. Estudos demonstram que o estresse

oxidativo atua na patogenia do diabetes por meio da alteração de sistemas enzimático, na peroxidação lipídica, redução dos níveis de compostos antioxidantes e no comprometimento da metabolização de algumas enzimas. Além disso, a hiperglicemia descontrolada associada ao estresse oxidativo induz o surgimento de complicações microvasculares, como neuropatias, retinopatias e nefropatias, ou macrovasculares, como alterações cardíacas e coronarianas, doença vascular periférica, hipercolesterolemia, aterosclerose e derrame (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016).

Os radicais livres ou espécies reativas, responsáveis pelo estresse oxidativo, são entidades químicas instáveis e altamente reativas, que possuem vida curta e contêm um ou mais elétrons desemparelhados. São de dois principais tipos, as espécies reativas de oxigênio (EROs), como os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxila (OH^-) e oxigênio singlete (1O_2), e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), derivadas do óxido nítrico (NO). Estes radicais são considerados como um mal necessário para a sinalização envolvida no processo natural de diferenciação e migração celular, pois são fisiologicamente formadas pelo metabolismo humano. Entretanto, os radicais livres também são capazes de promover danos às células, transferindo o elétron desemparelhado e resultando na oxidação de componentes e moléculas celulares importantes. Em condições normais, existe um equilíbrio entre esses agentes e os sistemas de defesa antioxidante, como as enzimas superóxido desmutase (SOD) e a glutatona (GSH) que são originadas pelo próprio organismo, e as micromoléculas, como os carotenoides e tocoferóis, obtidos pela dieta (SIES; BERNDT; JONES, 2017).

Entretanto, condições como obesidade e estresse podem levar ao desbalanço desse equilíbrio e favorecer o surgimento de diversas doenças. Na aterosclerose, por exemplo, ocorre um quadro peroxidação lipídica descontrolada que agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo desses lipídeos, podendo evoluir para um quadro de infarto do miocárdio, trombose ou acidente vascular encefálico. Na própria DM2, o estresse oxidativo funciona como um elo de ligação entre as características fisiopatológicas típicas e a progressão das complicações tardias da doença, como mencionado anteriormente (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O tratamento atual do DM2 ocorre por meio de mudanças de hábitos, entretanto, quando apenas a inserção de atividade física e a adoção de uma alimentação adequada não são suficientes para o controle glicêmico, o tratamento farmacológico

é iniciado. Existem diversas abordagens terapêuticas que podem ser utilizados para essa finalidade, como por exemplo: utilização de sensibilizadores da ação da insulina, como a metformina, anti-hiperglicemiantes, como inibidores das enzimas α -amilase e da α -glicosidase, secretagogos, como as sulfonilureias, ou até mesmo a própria insulina (CHENG; FANTUS, 2005).

Independente da abordagem farmacológica, seja ela utilizada para aumento da secreção de insulina ou estímulo a perda de peso, o intuito final destas terapias atualmente é o mesmo: a redução dos níveis glicêmicos. Como dito anteriormente, uma dessas abordagens é a promoção da inibição das enzimas envolvidas na metabolização dos carboidratos, dentre elas a α -amilase e a α -glicosidase.

As enzimas α -amilases são enzimas monoméricas que formam a família das endoamilases e podem ser encontradas em animais, plantas e microrganismos que utilizam carboidratos como fonte de energia, como o amido e o glicogênio. No processo de digestão, essas enzimas são secretadas pelas glândulas salivares e pancreáticas e responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 desses polissacarídeos, originando moléculas de maltoses e oligossacarídeos (TAKAHAMA; HIROTA, 2018).

Dando continuidade ao processo de degradação, há a atuação das enzimas α -glicosidases presentes nas microvilosidades do intestino. Essas enzimas são essenciais na metabolização dos carboidratos pois atuam na clivagem das ligações α -1,4 dos oligossacarídeos e maltoses, originando as moléculas de monossacarídeos que são absorvidas pelo organismo para geração de energia, como no caso, a glicose (TAKAHAMA; HIROTA, 2018; YIN et al., 2014). Portanto, a inibição dessas enzimas retarda o metabolismo dos carboidratos com consequente redução da glicemia pós-prandial, o que é desejável em pacientes com a DM2.

Os hipoglicemiantes disponíveis, como a acarbose, miglitol e voglibose, são potentes inibidores da enzima α -glicosidase e também são capazes de atuar sobre a enzima α -amilase (Figura 10). Contudo, alguns efeitos colaterais apresentados por essa terapia ocasionam a não adesão dos pacientes, como os efeitos gastrointestinais que frequentemente se apresentam na forma de flatulência, diarreia e dor abdominal (SAHA; VERMA, 2012).

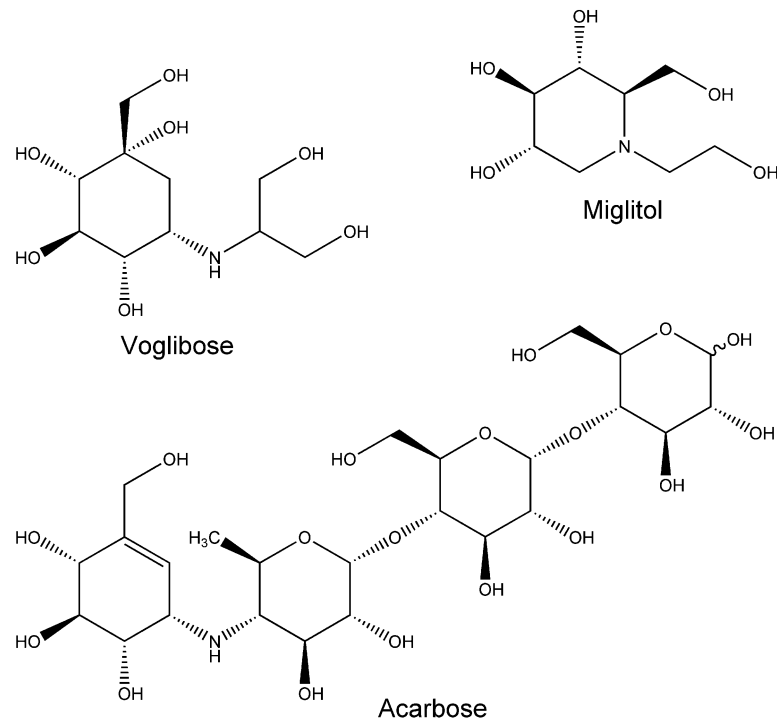


Figura 10 – Estruturas químicas das substâncias utilizadas no tratamento da Diabetes *mellitus*.

Dessa forma, a busca por compostos que apresentem a capacidade de inibir essas enzimas e consigam atuar com menos efeitos colaterais é imprescindível. Estudos recentes mostram que polifenóis de origem vegetal têm se mostrado benéficos para a saúde humana, tanto por reduzirem o estresse oxidativo quanto pela capacidade de inibir essas enzimas. Ao contrário da ação antioxidante desses compostos, os mecanismos pelos quais são capazes de atuar como inibidores ainda são incertos. Entretanto, essa capacidade apresentada impulsiona a continuidade dos estudos de espécies vegetais em busca de inibidores mais específicos para o tratamento do DM, uma vez que, dentro da própria cultura brasileira existem diversas espécies popularmente utilizadas para essa finalidade.

Com isso, diante do potencial químico e farmacológico dos gêneros *Myrciaria* e *Myrcia*, da necessidade de identificar espécies e moléculas bioativas e da importância de se conhecer a flora brasileira, em especial a flora das restingas do Espírito Santo, as espécies *Myrciaria tenella* (DC.) O.Berg, *Myrcia splendens* (Sw.) DC, *Myrcia neuwiediana* (O.Berg) E.Lucas & C.E.Wilson. e *Myrcia neobrasiliensis* A.R.Lourenço & E.Lucas foram selecionadas para a realização um estudo fitoquímico biomonitorado.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os perfis químicos das partes aéreas de *Myrciaria tenella* (DC.) O.Berg, *Myrcia splendens* (Sw.) DC, *Myrcia neuwiedeanana* (O.Berg) E.Lucas & C.E.Wilson. e *Myrcia neobrasiliensis* A.R.Lourenço & E.Lucas e determinar as capacidades antioxidante e de inibição das atividades das enzimas α -amilase e α -glicosidase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar e/ou identificar compostos químicos presentes nas espécies estudadas;

Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro*;

Avaliar a capacidade de inibir a atividade da enzima α -amilase *in vitro*;

Avaliar a capacidade de inibir a atividade da enzima α -glicosidase *in vitro*;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas, incluindo folhas e galhos, de *Myrciaria tenella* (DC.) O. Berg, *Myrcia splendens* (Sw.) DC, *Myrcia neuwiedeana* (O. Berg) E. Lucas & C. E. Wilson e *Myrcia neobrasiliensis* A. R. Lourenço & E. Lucas foram coletadas no dia 15 de maio de 2019 no município de São Mateus – ES. O material vegetal foi identificado pelo Prof. Dr. Luis Fernando Tavares de Menezes e as exsiccatas 4152 (*M. tenella*), 4082 (*M. splendens*), 7527 (*M. neobrasiliensis*) e 8534 (*M. neuwiedeana*) foram depositadas no Herbário SAMES da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus de São Mateus (CEUNES). Além disso, todo o material vegetal foi devidamente cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Após a coleta, os materiais vegetais das quatro espécies foram submetidos à dessecação em estufa à 40 °C, por cerca de dois dias, e posteriormente pulverizadas em moinho de facas. O pó obtido foi submetido à maceração utilizando metanol como solvente extrator até o esgotamento. Após o processo de extração, o material foi filtrado e o solvente eliminado sob pressão reduzida. Assim, foram obtidos os extratos metanólicos brutos de *M. tenella* (MT), *M. splendens* (MS), *M. neuwiedeana* (MN) e *M. neobrasiliensis* (MNB), que foram conservados em refrigerador para posterior realização dos ensaios biológicos.

Os extratos metanólicos foram submetidos à partição líquido-líquido, separadamente, a fim de se obter frações enriquecidas de diferentes polaridades (Figura 11). Cerca de 2 g de extrato bruto foram solubilizados em uma solução de metanol e água (7:3) e particionados utilizando diclorometano. A partir desse processo foi observado a formação de duas fases: a fase diclorometânica e a fração hidrometanólica. À fração diclorometânica, previamente concentrada em rotaevaporador foi novamente dissolvida em solução de metanol, e posteriormente foi particionada com hexano e, assim, após a concentração em rotaevaporador, foram obtidas as frações hexânica e diclorometanólica. A fase hidrometanólica foi submetida a evaporação sob pressão reduzida a fim de eliminar o metanol ali presente, originando assim a fase aquosa. À

esta fase foi adicionado acetato de etila e por partição foram obtidas as frações acetato de etila e aquosa.

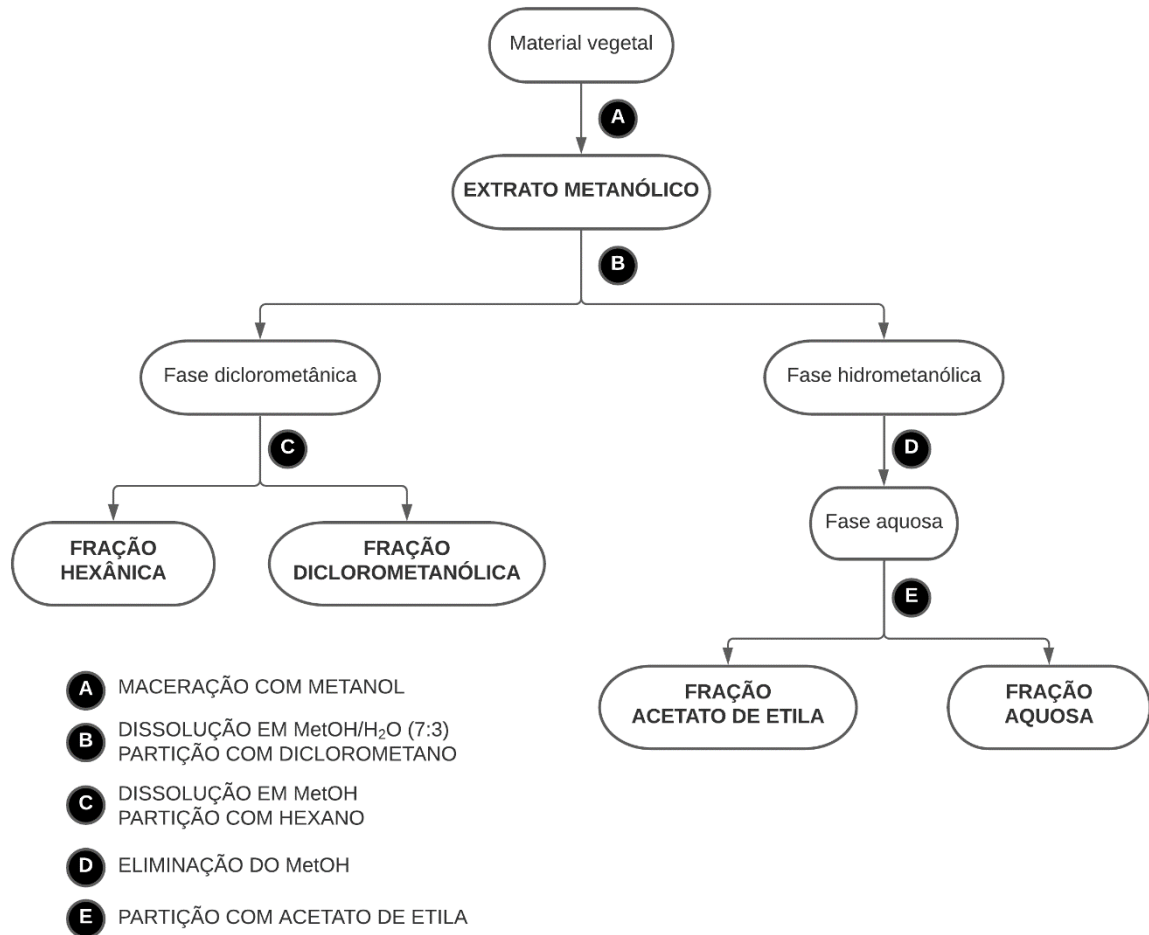


Figura 11 – Esquema representando os procedimentos de maceração e partição líquido-líquido realizados para a obtenção dos extratos brutos e frações enriquecidas das partes aéreas de *M. tenella*, *M. splendens*, *M. neuwiedeana* e *M. neobrasiliensis*.

Dessa forma foram obtidas as frações hexânicas de *M. tenella* (MTH), *M. splendens* (MSH), *M. neuwiedeana* (MNH) e *M. neobrasiliensis* (MNBH); as frações diclorometanólicas de *M. tenella* (MTD), *M. splendens* (MSD), *M. neuwiedeana* (MND) e *M. neobrasiliensis* (MNBD); as fases acetato de etila de *M. tenella* (MTAc), *M. splendens* (MSAc), *M. neuwiedeana* (MNAc) e *M. neobrasiliensis* (MNBAC); e as frações aquosas de *M. tenella* (MTAq), *M. splendens* (MSAq), *M. neuwiedeana* (MNAq) e *M. neobrasiliensis* (MNBAq).

3.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO

3.3.1 Triagem fitoquímica preliminar dos extratos brutos metanólicos

Os extratos metanólicos das quatro espécies, MT, MS, MN e MNB, foram submetidos à triagem fitoquímica preliminar para a detecção dos principais metabólitos secundários. Por meio de reações qualitativas específicas de precipitação, formação de espuma, alteração de coloração ou desenvolvimento de fluorescência, foi avaliada a presença de flavonoides, saponinas, cumarinas, taninos, alcaloides, triterpenos e esteroides (CUNHA, 2010).

Para a detecção de flavonoides foram realizadas duas reações específicas: reação de Shinoda (cianidina) e a reação com cloreto de alumínio (AlCl_3). Na reação de Shinoda, 2 mL da amostra diluída em etanol foram colocados em um tubo de ensaio e, em seguida, foram acrescentados fragmentos de magnésio metálico e 1 mL de ácido clorídrico concentrado. O desenvolvimento de coloração vermelha indica reação positiva. Na reação com cloreto de alumínio, foram adicionados 1 mL da amostra diluída em etanol e gotas de AlCl_3 à 2% p/v em etanol, em uma cápsula de porcelana. A cápsula foi aquecida em banho maria até a completa evaporação do solvente. Posteriormente, a cápsula foi observada sob luz ultravioleta para observação da fluorescência.

Para a detecção de saponinas, uma alíquota da amostra foi diluída em etanol formando uma solução final de 10 mL. À essa solução foram adicionados 10 mL de água destilada. Para neutralizar essa solução, carbonato de sódio foi adicionado gota a gota até que a solução atingisse a neutralidade. A solução foi, então, aquecida até a ebulição e, após o resfriamento, 2 mL da solução foram transferidos para uma proveta de 100 mL, que teve seu volume completado com água destilada. Em seguida, a proveta foi submetida a forte agitação vertical durante 40 segundos. Após repouso de 10 minutos, foi observado se houve o aparecimento de espuma persistente com mais de 1 cm de altura.

Para a identificação de cumarinas, duas gotas da amostra diluída em etanol foram aplicadas em um papel de filtro, em locais distintos. Após secagem, uma gota de hidróxido de potássio foi adicionada em cima de uma das gotas do extrato. O papel, seco, foi exposto a luz ultravioleta para observação de manchas fluorescentes.

Para a identificação de taninos, duas reações foram realizadas. Para isso, uma alíquota da amostra foi diluída em etanol, formando aproximadamente 5 mL de solução no total. Em dois tubos de ensaio foram colocados 3 mL da amostra diluída. Para a primeira reação, adicionou-se ao primeiro tubo de ensaio 5 mL de cloreto de sódio a 2% e 5 mL de solução de gelatina 1%. Para a segunda reação, foram adicionados ao segundo tubo de ensaio, 2 gotas de ácido clorídrico a 10 % e 2 gotas de sal de alcaloide (solução de cafeína). Foi observado se houve formação de precipitado branco, que indica a presença de taninos.

A caracterização de alcaloides foi realizada a partir da adição de 1 mL da amostra diluída em etanol e 1 mL de ácido clorídrico concentrado, em um tubo de ensaio, onde foram acrescentadas gotas do reagente de Dragendorff, a fim de observar a formação de precipitado laranja.

As reações de Liebermann-Burchard e Salkowski foram realizadas a fim de detectar esteroides e triterpenos nas amostras. Para a realização da reação de Liebermann-Burchard, uma alíquota da amostra foi diluída com etanol. Dessa alíquota, 1 mL foi transferido para um tubo de ensaio onde 3 gotas de clorofórmio, 2 mL de anidrido acético e 3 gotas de ácido sulfúrico foram adicionados. O desenvolvimento de uma coloração castanho-avermelhado indica a presença de triterpenos e a coloração azul-esverdeado indica a presença de esteroides. Na reação de Salkowski, 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado foram adicionadas a 1 mL da amostra diluída em clorofórmio. O desenvolvimento de coloração castanho-avermelhada indica a presença de esteroides.

3.3.2 Quantificação de compostos fenólicos totais

Para a quantificação de fenóis totais foi utilizada a metodologia descrita por Singleton & Rossi (1965), modificada. Em microplaca de 96 poços foram adicionados: 50 µL de água destilada, 12 µL de amostra (concentração final no ensaio igual a 100 µg/mL) e 13 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich). Após 5 minutos de reação, 125 µL de carbonato de sódio 4% e 100 µL de água destilada, foram adicionados. A leitura foi realizada em 750 nm após 1 hora e 30 minutos a partir da adição do carbonato de sódio utilizando leitor de microplacas (iMark®, BioRad Laboratories). Uma solução com todos os reagentes, exceto a amostra, foi utilizada como o branco da reação. A curva de calibração foi montada utilizando ácido gálico (Sigma-Aldrich).

A quantificação foi realizada para todos os extratos e frações, em triplicata, e os dados obtidos foram avaliados no software Excel[®], onde o cálculo para determinar a concentração de compostos fenólicos foi realizado a partir da regressão linear dos dados. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/ g de extrato.

3.3.3 Quantificação de flavonoides

A quantificação de flavonoides foi realizada utilizando o procedimento descrito por Marques et al. (2012), com adaptações. Em microplaca de 96 poços foram adicionados: 99 µL de água destilada, 20 µL de amostra (concentração final igual a 100 µg/mL), 6 µL de ácido acético glacial, 100 µL de piridina a 20% e 25 µL de cloreto de alumínio 6,5% em metanol. Após 30 minutos, a leitura espectrofotométrica foi realizada em 450 nm. A curva de calibração foi confeccionada utilizando o padrão quercetina (Sigma-Aldrich).

As análises foram realizadas para todos os extratos e frações, em triplicata, e os dados obtidos foram tabulados no software Excel[®]. A quantificação também foi determinada a partir da regressão linear dos dados. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de quercetina (EQ)/ g de extrato.

3.3.4 Análise por Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de Massas (GC/MS)

As frações hexânicas foram analisadas por meio de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS). As análises foram realizadas no laboratório de Cromatografia do LabPetro-UFES. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso 7890B acoplado a um espectrômetro de massas MSD 5977A (Agilent Technologies), equipado com uma coluna não polar HP-5MS (30 m x 320 µm x 0,25 µm). O gás de arraste utilizado foi o hélio com vazão de 1 mL por minuto a uma pressão constante de 12,435 psi. O sistema foi utilizado no modo split (1:10 split). As amostras foram diluídas em diclorometano à uma concentração de 5.000 ppm. O volume injetado foi 1 µL sendo a temperatura do injetor de 290°C. A temperatura inicial foi de 80°C aumentando 5°C/min até atingir 280°C e posteriormente aumentada 1°C/min até atingir 300°C, permanecendo por 10 minutos. O tempo total de análise foi de 70 minutos.

Os componentes das amostras foram identificados a partir do índice de Kovats (IK) e com base no banco de dados NIST (National Institute of Standards and Technology). O IK foi calculado na plataforma Pherobase utilizando os tempos de retenção dos compostos presentes na amostra e os tempos de retenção de uma série homóloga de n-alcenos (C12-C43), que foi analisada nas mesmas condições das amostras. A identificação das substâncias foi realizada pela comparação dos padrões de fragmentação dos compostos presentes nas amostras com os dados disponíveis no NIST, quando os compostos apresentaram um padrão de similaridade maior que 80%. Na literatura não há descrição dos Índices de Kovats para os triterpenos e esteroides para as condições de análise empregadas. Portanto, estes foram caracterizados por meio de seus padrões de fragmentação e comparação com padrões e dados da literatura.

3.3.5 Análise por Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier com Eletrospray no modo negativo (ESI(-)FT-ICR MS)

Os extratos brutos e as frações acetato de etila foram analisadas por Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier (FT-ICR MS) para determinação do perfil fenólico dessas frações. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas do LabPetro-UFES. As amostras foram solubilizadas a uma concentração de 1 mg/mL em uma solução de acetonitrila: água (1:1) e foram injetadas a um fluxo de 5 µL/mL na fonte eletrospray (ESI) operada em modo negativo. O Espectrômetro de Massas 9.4 T Solaris (Bruker Daltonics) foi programado para operar em um intervalo de m/z 150-1500. As condições da fonte ESI utilizadas para a análise foram as seguintes: pressão do gás nebulizador de 1,0 bar, voltagem do capilar de 3.8 kV e temperatura de transferência do capilar de 200 °C. Além disso, o tempo de acumulação dos íons foi de 0,010 s e cada espectro foi adquirido acumulando 32 varreduras de sinais transitórios no domínio-tempo em conjuntos de dados de 16 mega-pontos no domínio-tempo.

O espectro de massas foi obtido e processado utilizando o software Data Analysis 2.6 (Bruker Daltonics). A identificação foi realizada utilizando a fórmula molecular sugerida pelo programa, com posterior comparação com os dados da literatura (GOMES et al., 2020; MONTEIRO et al., 2019; OLIVEIRA; ROMÃO; KUSTER, 2018; SALVADOR et al., 2011).

3.3.6 Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila de *M. neuwiedeana* (MNAc)

A fração MNAc foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna clássica. Para isso, 72,9420 g do extrato bruto de *M. neuwiedeana* foi particionado pelo mesmo procedimento descrito nas páginas 34 e 35, a fim de se obter uma quantidade adicional dessa fração.

Parte da fração MNAc (15,728 g) foi submetida à cromatografia líquida em coluna de sílica gel 60 (4,0 x 37,0 cm). Foram coletadas 288 frações de aproximadamente 200 mL cada. Os eluentes utilizados para o desenvolvimento da cromatografia encontram-se listados na Tabela 01.

Tabela 01 – Eluentes utilizados no fracionamento cromatográfico da fração MNAc.

Solventes	Frações
Hexano	1 – 77
90% hexano : 10% acetato de etila	78 – 125
80% hexano : 20% acetato de etila	126 – 147
50% hexano : 50% acetato de etila	148 – 174
Acetato de etila	175 – 216
99% acetato de etila : 1% metanol	217 – 229
95% acetato de etila : 8% metanol	230 – 243
90% acetato de etila : 10% metanol	244 – 258
80% acetato de etila : 20% metanol	259 – 269
50% acetato de etila : 50% metanol	270 – 285
Metanol	286 – 288

MNAc: Fração acetato de etila de *M. neuwiedeana*.

As frações obtidas neste fracionamento foram concentradas por meio da evaporação do solvente sob pressão reduzida. Os resíduos concentrados obtidos foram analisados por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel 60 ALUGRAM® SIL G/UV (Macherey – Nagel), reveladas por exposição à radiação ultravioleta a 254 nm e 365 nm, vapor de iodo, solução de anisaldeído sulfúrico e/ ou solução de cloreto de alumínio 6,5% em metanol. Aquelas frações que apresentaram um perfil cromatográfico semelhante foram reunidas e armazenadas em frascos de vidro, sendo que as que apresentaram quantidades suficientes foram

submetidas a processos usuais de purificação e/ou identificação. As amostras que foram submetidas a esses processos estão dispostas na Figura 12.

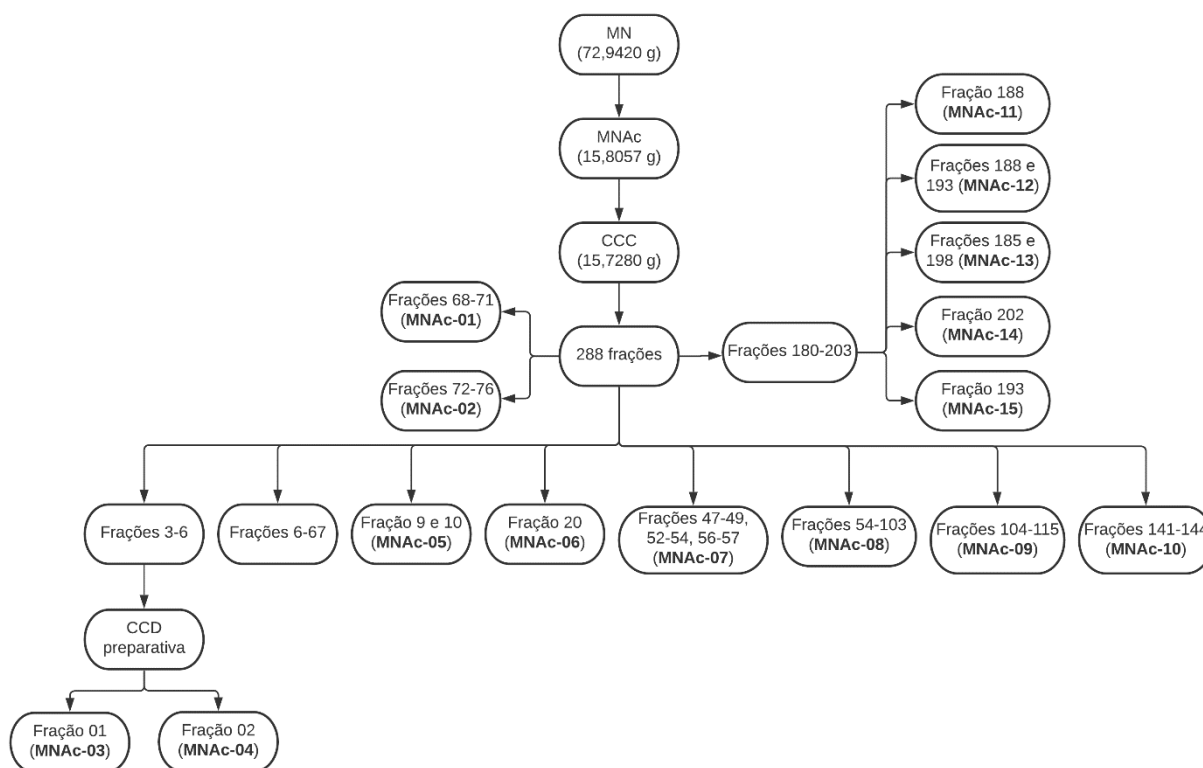


Figura 12 – Amostras obtidas no fracionamento de MNAc que foram submetidas aos processos de purificação e identificação.

As frações denominadas de MNAc-01 a MNAc-15 apresentaram diferentes perfis cromatográficos quando analisados por CCD. Além disso, apresentaram diferentes características físico-químicas, tais como solubilidade e características organolépticas. Dentre estas frações, as denominadas de MNAc-01 e MNAc-02 foram identificadas estruturalmente.

3.3.6.1 Substâncias isoladas, purificadas e identificadas

3.3.6.1.1 Frações 68 – 71

O material dessas frações (226,43 mg) foi lavado sucessivamente com acetona, fornecendo um sólido branco denominado MNAc-01 (20,80 mg).

3.3.6.1.2 Frações 72 – 76

O material dessas frações (537,96 mg) foi lavado sucessivamente com acetona, fornecendo um sólido branco denominado MNAc-02 (34,50 mg).

As substâncias isoladas MNAc-01 e MNAc-02 foram submetidas à análise espectrométrica por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para determinação estrutural. Foram utilizados o TMS como referência para as análises e o solvente CDCl_3 para solubilização das amostras. Os espectros de RMN hidrogênio (^1H), carbono-13 (^{13}C) e DEPT 135 foram obtidos em espectrômetro Varian 400 MHz, sonda 5 mm Broadband. As análises foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do LabPetro-UFES.

3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.4.1 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos brutos e de suas frações foram determinadas por meio de dois testes espectrofotométricos *in vitro* utilizando os radicais livres sintéticos 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DDPH *) e 2-2'-anizobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS $^{*+}$).

Os testes foram realizados para todos os extratos brutos e suas frações. A equação utilizada para o cálculo da porcentagem de inibição dos radicais (% Δ) nos testes foi a seguinte:

$$\% \Delta = \left[\frac{(A_0 - A)}{A_0} \right] \times 100$$

Nesta equação, A_0 é a absorvância da solução teste sem amostra (controle) e A corresponde a absorvância verificada com a adição da amostra.

A atividade antioxidante foi expressa em Concentração Inibitória 50% (IC_{50}), ou seja, a concentração da amostra capaz de inibir em 50% as espécies reativas, que foi determinada com base no % Δ calculado.

Trolox (Sigma-Aldrich), um análogo da vitamina E, Quercetina (Sigma-Aldrich), Rutina (Sigma-Aldrich) e Ácido gálico (Sigma-Aldrich) foram utilizados como substâncias antioxidantes padrões.

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5.01 $^{\text{®}}$. Os resultados foram expressos como média de três triplicatas \pm desvio padrão. As IC_{50} das amostras e dos padrões foram determinadas por meio de regressão não linear

dos dados e os resultados foram analisados por ANOVA de uma-via com *post test* Tukey ($p < 0,05$).

3.4.1.1 Atividade sequestradora do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+})

A atividade antioxidante sobre o radical ABTS^{•+} foi determinada utilizando o método de Re et al. (1999), com modificações. O radical ABTS^{•+} é gerado antes da realização do teste por meio da oxidação do ABTS comercial utilizando persulfato de potássio. A redução do ABTS^{•+} por compostos antioxidantes (Figura 13) promove a modificação da coloração do meio reacional com concomitante diminuição da intensidade de absorção em determinado comprimento de onda (RE et al., 1999).

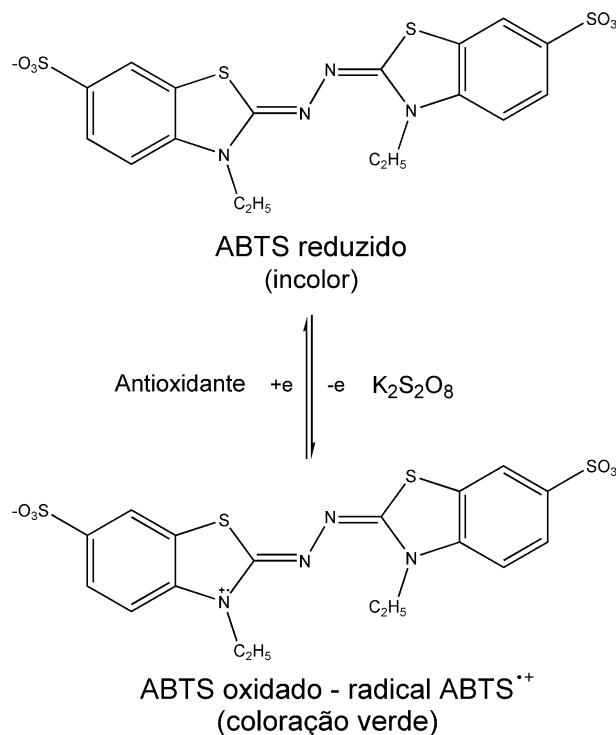


Figura 13 – Princípio do ensaio de captura de radicais livres utilizando o radical ABTS^{•+}.

Fonte: adaptado de Rayess et al., 2014.

Portanto, para a realização do ensaio, inicialmente, uma mistura aquosa de ABTS a 7 mM (Sigma-Aldrich) e persulfato de potássio a 2,45 mM (Sigma-Aldrich) foi incubada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 16 horas. A solução formada de ABTS^{•+} foi diluída em etanol até obtenção de uma absorvância de 0,700 em 734 nm. Em microplaca de 96 poços, 300 μL da solução de ABTS^{•+} e 3 μL de diferentes concentrações da amostra (100 – 0,04 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados e, após 10 minutos,

realizada leitura espectrofotométrica da placa a 734 nm. Como referência de máxima absorção foi utilizada a leitura obtida da reação de 300 µL da solução de ABTS^{•+} adicionados de 3 µL de etanol. O branco consistiu em 300 µL de etanol.

3.4.1.2 Determinação da atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•])

O DPPH é um radical oxidante sintético de vida longa que apresenta coloração violeta absorvida em 515 nm. Ao receber um átomo de hidrogênio, proveniente da molécula antioxidante, a molécula de DPPH é reduzida, ocorrendo uma mudança de coloração da solução, que pode ser acompanhada pela análise em espectrofotômetro (Figura 14) (TEIXEIRA et al., 2013).

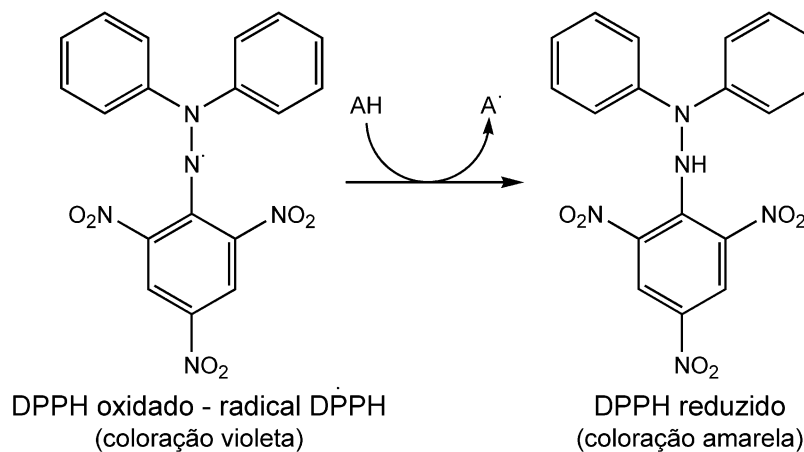


Figura 14 – Princípio do ensaio de captura de radicais livres utilizando o radical DPPH[•]. AH: antioxidante.

Fonte: adaptado de TEIXEIRA et al., 2013.

Sendo assim, para a avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH[•], foi preparada uma solução de DPPH[•] (Sigma-Aldrich) a 0,004% (p/v) em etanol. Em microplaca de 96 poços, a cada 100 µL da amostra, em diversas concentrações (100 – 0,04 µg/mL), foram adicionados 200 µL da solução de DPPH[•]. Após 30 minutos à temperatura ambiente, as absorbâncias foram determinadas com auxílio de um espectrofotômetro a 517 nm. Como referência de máxima absorção foi utilizada a leitura obtida com 200 µL da solução de DPPH[•] adicionados de 100 µL de etanol. O branco consistiu em 300 µL de etanol. (GÜLÇİN; BERASHVILI; GEPIREMEN, 2005).

3.4.2 Avaliação da atividade enzimática

A atividade inibitória dos extratos brutos e de suas frações frente as enzimas α -amilase e α -glicosidase foram determinadas por meio de testes espectrofotométricos *in vitro*.

As porcentagens de inibição (% Δ) sobre as enzimas foram calculadas comparando-se a absorbância das amostras com a do controle da enzima. Os valores correspondentes à absorbância do controle da enzima referem-se à capacidade máxima da enzima para a formação dos produtos a partir dos seus substratos, tendo sido considerada a atividade da enzima igual a 100%. Dessa forma as porcentagens de inibição das amostras foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\% \Delta = \left[\frac{(C-A)}{C} \right] \times 100$$

onde C é a absorbância do controle da enzima subtraída do branco do substrato, e A corresponde à absorbância da amostra subtraída do branco do extrato. O percentual de inibição foi calculado no software Excel.

As IC₅₀ foram determinadas por regressão não linear e os resultados obtidos foram analisados por ANOVA de uma via seguida de *post test* de Tukey com o auxílio do software GraphPad Prism 5.01[®].

Os ensaios foram realizados com todos os extratos brutos e suas frações. Além disso, Quercetina (Sigma-Aldrich) e Acarbose (Sigma-Aldrich) foram utilizadas como padrões nos ensaios com α -amilase, e a Acarbose (Sigma-Aldrich) nos ensaios com α -glicosidase.

3.4.2.1 Determinação da atividade de inibição frente a enzima α -amilase

A capacidade de inibição da α -amilase foi determinada a partir do método descrito por Bernfeld (1995), com adaptações. A enzima α -amilase é responsável por metabolizar o amido gerando moléculas de maltose. Em meio alcalino, esse açúcar é capaz de reduzir o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que possui uma coloração laranja (Figura 15). Portanto, quando a enzima encontra-se inibida não há a quebra do carboidrato e nem liberação de moléculas de açúcar, fazendo com que a coloração do meio fique inalterada.

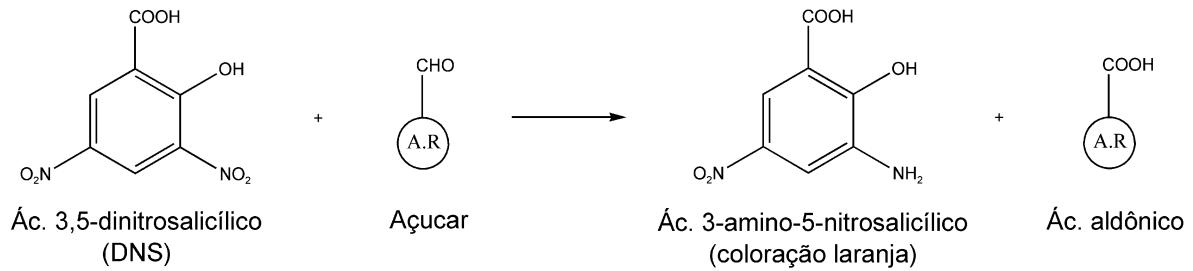


Figura 15 – Fundamento do ensaio de inibição da enzima α -amilase.

Com base no fundamento descrito acima, o ensaio foi realizado como descrito a seguir. A amostra foi inicialmente solubilizada em solução de dimetilsufóxido (DMSO) 5% em etanol, de modo a se obter uma concentração do extrato no meio reacional de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A α -amilase pancreática suína (Sigma-Aldrich), foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9) contendo cloreto de sódio 6,7 mM afim obter uma solução com concentração de 40 U/mL. Um total de 40 μL de solução da amostra e 100 μL da solução da enzima foram incubados em banho-maria por 30 minutos a 25° C, formando o pré-incubado. Após a pré-incubação, 500 μL do pré incubado foram misturados com 1 mL de amido 1% em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9). A mistura foi então incubada por 20 minutos a 40° C em banho-maria. A reação foi interrompida com adição de 1 mL de solução de DNS (Sigma-Aldrich). As amostras foram aquecidas em ebulição por 5 minutos e resfriadas a temperatura ambiente. Logo após, a mistura foi diluída com 9 mL de água destilada. A atividade da α -amilase foi determinada a partir da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm (DTX 800 Multimode Detector Beckman Coulter). Uma solução contendo DNS foi utilizada para zerar o aparelho antes da leitura das amostras e o branco era constituído de solução de amido, amostra vegetal e DNS. Como controle positivo foi utilizado a Acarbose (Sigma-Aldrich) na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no meio reacional, sendo que, como branco foi utilizado tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9) com cloreto de sódio 6,7 mM.

As amostras que apresentaram um % Δ maior que 70% na concentração inicialmente testada (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram novamente submetidas ao teste e avaliadas em diferentes concentrações (1000 - 0,97 $\mu\text{g}/\text{mL}$) afim de se determinar as IC₅₀ destas amostras.

3.4.2.2 Determinação da atividade de inibição frente a enzima α -glicosidase

A atividade de inibição das amostras sobre a atividade enzimática de α -glicosidase foi determinada segundo Shinde et al. (2008). A capacidade do extrato em inibir a enzima é avaliada por meio da adição de *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*NPG) à solução contendo a enzima e a amostra. O *p*NPG possui em sua estrutura uma molécula de glicose que é passível da atuação da enzima α -glicosidase. Portanto, se a amostra não for capaz de inibir a enzima presente no meio, esta fica livre para atuar sobre as moléculas de *p*NPG, liberando glicose e *p*-nitrofenol, que possui uma coloração amarela (Figura 16).

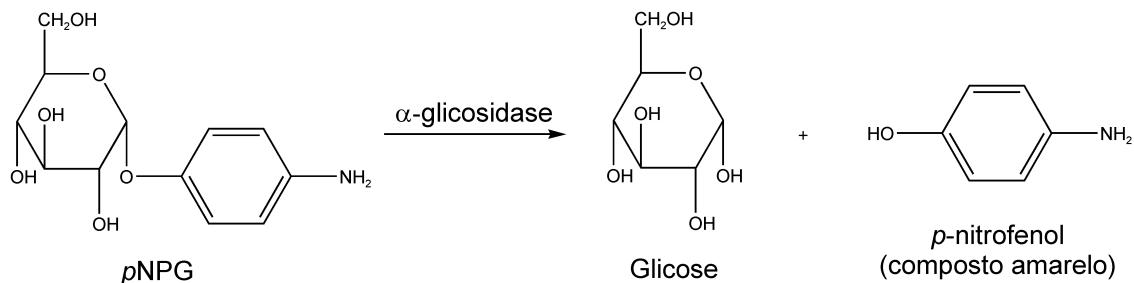


Figura 16 – Atuação da enzima α -glicosidase sobre o reagente *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*NPG).

Sendo assim, a amostra foi inicialmente solubilizada em DMSO 5% em etanol, de modo a se obter uma concentração no meio reacional de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Em microplaca de 96 poços, 20 μL da solução de α -glicosidase (Sigma-Aldrich) 1 U/mL foi pré-incubada com 20 μL da solução amostra durante 5 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$. Foram adicionados 40 μL de *p*NPG (Sigma-Aldrich) 1 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8). A reação foi incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos em banho-maria. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de solução de bicarbonato de sódio 10% e a absorbância lida a 405 nm (DTX 800 Multimode Detector Beckman Coulter). Para o branco do extrato, foram utilizadas as amostras e *p*NPG. Como controle positivo de inibição da α -glicosidase foi utilizado a acarbose (Sigma-Aldrich). A solução denominada branco do controle foi preparada substituindo a enzima por tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8).

As amostras que apresentaram percentuais de inibição maiores que 70% foram testadas em diferentes concentrações que variaram de 1000 a 0,97 $\mu\text{g/mL}$ para confecção da curva dose x resposta e determinação da concentração eficaz 50% (IC_{50}).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS E SUAS FRAÇÕES

As partes aéreas das espécies *M. tenella*, *M. splendens*, *M. neuwiedeana* e *M. neobrasiliensis* foram maceradas com metanol e os rendimentos obtidos estão descritos na Tabela 02.

Tabela 02 – Rendimento dos extratos brutos metanólicos obtidos por maceração.

Material vegetal	Peso do material pulverizado (g)	Rendimento (g)	Rendimento (%) p/p
<i>M. tenella</i> (MT)	185,57	46,10	24,58
<i>M. splendens</i> (MS)	657,96	220,00	33,44
<i>M. neuwiedeana</i> (MN)	757,42	123,55	16,31
<i>M. neobrasiliensis</i> (MNB)	742,53	160,37	21,60

Após a maceração, parte do extrato bruto foi particionado utilizando hexano, diclorometano, acetato de etila e água. Os rendimentos obtidos no fracionamento de cada um dos extratos se encontram na Tabela 03.

Tabela 03 – Rendimento das frações obtidas por partição líquido-líquido.

Extrato bruto	Frações	Pi (g)	(continua)	
			Rendimento (g)	Rendimento (%)
<i>M. tenella</i>	Hexânica (MTH)	2,14	0,415	19,39
	Diclorometanólica (MTD)		0,516	24,10
	Acetato de etila (MTAc)		0,457	21,39
	Aquosa (MTAq)		0,321	15,01
<i>M. splendens</i>	Hexânica (MSH)	2,26	0,203	8,96
	Diclorometanólica (MSD)		0,305	13,50
	Acetato de etila (MSAc)		0,484	21,39
	Aquosa (MSAq)		1,168	51,23
<i>M. neuwiedeana</i>	Hexânica (MNH)	2,24	0,423	18,89
	Diclorometanólica (MND)		0,182	8,13
	Acetato de etila (MNAc)		0,234	10,46
	Aquosa (MNAq)		1,015	45,34

Tabela 03 – Rendimento das frações obtidas por partição líquido-líquido.

Extrato bruto	Extratos e frações	Pi (g)	(continuação)	
			Rendimento (g)	Rendimento (%)
<i>M. neobrasiliensis</i>	Hexânica (MNBH)	2,20	0,137	6,21
	Diclorometanólica (MNBD)		0,291	13,23
	Acetato de etila (MNBAc)		0,546	24,81
	Aquosa (MNBAq)		0,930	42,29

Pi: peso inicial do extrato bruto.

Para o fracionamento da fração acetato de etila da espécie *M. neuwiedeana* (MNAc) por cromatografia clássica em coluna, foram particionados 73,9420 g do extrato bruto (MN), onde obteve-se 15,8053 g da fração MNAc (11% de rendimento).

4.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR DOS EXTRATOS METANÓLICOS BRUTOS

Os extratos metanólicos brutos MT, MS, MN e MNB foram submetidos a testes clássicos de caracterização fitoquímica para determinação geral do perfil químico de cada uma delas (Tabela 04).

Tabela 04 – Classes químicas detectadas nos extratos metanólicos brutos.

Classes químicas	Resultados			
	<i>M. tenella</i>	<i>M. splendens</i>	<i>M. neuwiedeana</i>	<i>M. neobrasiliensis</i>
Compostos fenólicos	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+
Saponinas	+	-	-	-
Cumarinas	-	+	+	-
Taninos	+	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-
Esteroides	+	-	+	-
Triterpenos	+	+	+	+

(+) presença; (-) ausência.

Sabidamente, compostos fenólicos e terpenos podem desempenhar atividade antioxidante (SANTIAGO; MAYOR, 2014). Além disso, ácidos fenólicos como ácido quínico e ácido elágico, já indicaram potencial de inibição sobre as enzimas α -amilase

e α -glicosidase (AYUSMAN et al., 2020). Portanto, devido a detecção da presença de compostos fenólicos, flavonoides e triterpenos em todas as amostras triadas, foram realizados testes in vitro para a detecção de atividades antioxidante e de inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase e quantificação de fenóis totais e flavonoides em todas as amostras.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Por meio de ensaios colorimétricos e com base nas curvas de calibração do ácido gálico (Figura 17) e da quercetina (Figura 18), foram calculadas as concentrações de fenóis totais e flavonoides, respectivamente, em todas as amostras das quatro espécies estudadas.

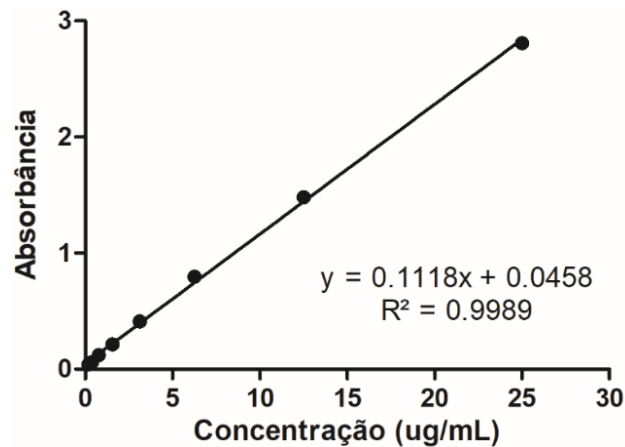


Figura 17 – Curva de calibração com ácido gálico, equação da reta e coeficiente de determinação da regressão linear (R^2).

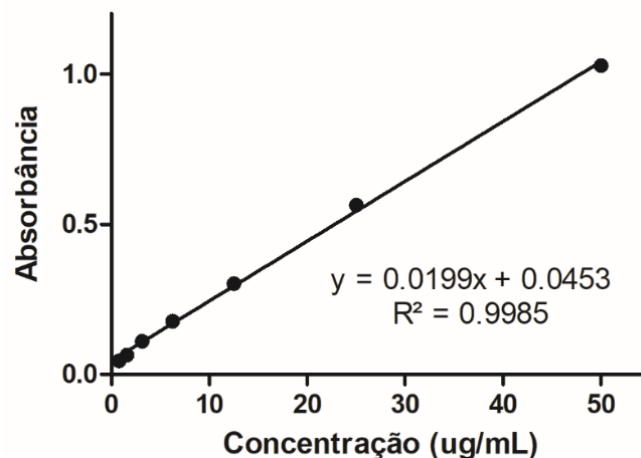


Figura 18 – Curva de calibração com quercetina, equação da reta e coeficiente de determinação da regressão linear (R^2).

Como podemos observar na Tabela 05, todas as espécies apresentaram expressivos teores de compostos fenólicos, principalmente por parte dos extratos brutos, frações aquosas e frações acetato de etila. Isso se dá, principalmente, pela característica polar que esses compostos possuem, apresentando, portanto, maior afinidade pelos solventes mais polares utilizados durante a extração, à exemplo o metanol, acetato de etila e água. Foi possível observar também que, houve uma grande semelhança entre as concentrações de fenóis totais e flavonoides expressam pelas quatro espécies.

Tabela 05 – Quantificação de fenóis totais e flavonoides dos extratos brutos e suas frações.

Espécie	Frações	Fenóis totais (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)
<i>M. tenella</i>	Extrato bruto (MT)	142,02 ± 4,20	45,82 ± 3,80
	Hexânica (MTH)	14,38 ± 2,08	0,00
	Diclorometanólica (MTD)	23,12 ± 6,17	5,71 ± 5,86
	Acetato de etila (MTAc)	117,36 ± 5,61	17,94 ± 6,11
	Aquosa (MTAq)	250,05 ± 5,63	-
<i>M. splendens</i>	Extrato bruto (MS)	154,58 ± 5,30	128,66 ± 3,19
	Hexânica (MSH)	46,34 ± 2,82	23,80 ± 9,88
	Diclorometanólica (MSD)	111,52 ± 3,67	76,57 ± 5,05
	Acetato de etila (MSAc)	318,94 ± 3,72	111,57 ± 2,03
	Aquosa (MSAq)	251,67 ± 10,38	22,99 ± 5,61
<i>M. neuwiedeana</i>	Extrato bruto (MN)	156,73 ± 8,13	105,71 ± 10,35
	Hexânica (MNH)	67,09 ± 3,46	27,82 ± 3,03
	Diclorometanólica (MND)	38,02 ± 1,97	44,74 ± 9,02
	Acetato de etila (MNAc)	228,84 ± 4,75	94,32 ± 4,98
	Aquosa (MNAq)	246,08 ± 11,74	15,62 ± 5,34
<i>M. neobrasiliensis</i>	Extrato bruto (MNB)	172,51 ± 2,99	173,22 ± 3,19
	Hexânica (MNBH)	46,34 ± 2,82	7,72 ± 3,60
	Diclorometanólica (MNBD)	109,55 ± 2,55	35,19 ± 2,37
	Acetato de etila (MNBAc)	271,65 ± 3,52	128,66 ± 7,98
	Aquosa (MNBAq)	272,11 ± 10,38	19,02 ± 3,61

EAG: equivalentes de ácido gálico; EQ: equivalentes de quercetina; Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3).

Não foi possível realizar a quantificação de flavonoides na fração MTAq. A mesma, apesar de ter indicado a presença desta classe na triagem fitoquímica inicial, não apresentou resultado para a metodologia de quantificação empregada.

4.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

4.4.1 Caracterização dos compostos fenólicos e flavonoides por ESI(-)FT-ICR MS

Plantas com propriedades antioxidantes estão comumente atreladas à sua composição química, especialmente pela presença de compostos hidroxilados, como por exemplo os ácidos fenólicos. A capacidade antioxidante desses compostos é primariamente atribuída ao poder de oxirredução dessas substâncias, que são capazes de atuar como doadores de hidrogênio, agentes redutores ou como quelantes (GÜLÇİN; BERASHVILI; GEPIREMEN, 2005).

Uma maior atividade antioxidante pode ser atribuída a compostos com maior número de hidroxilas, que podem atuar como doadores diretos de hidrogênio e, conseqüentemente, estabilizantes dos radicais oxidantes (PONTES et al., 2019). Entretanto, no caso dos flavonoides, por exemplo, o número de hidroxilas não é o único fator atrelado a essa capacidade. Muitos estudos discutem as relações estrutura-atividade dos flavonoides e algumas características estruturais são importantes para o desempenho dessa atividade, como pode ser observado na Figura 19.

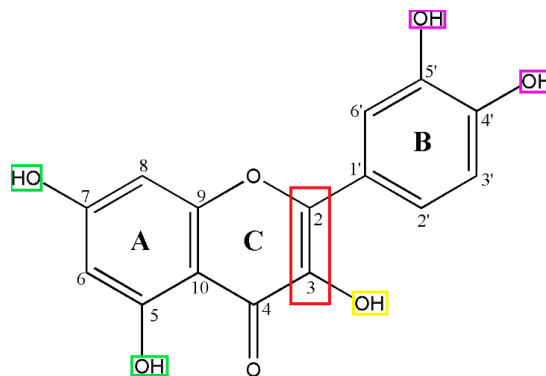


Figura 19 – Características estruturais importantes para desempenho da atividade antioxidante de flavonoides.

A presença de hidroxila na posição C3, juntamente com a carbonila em C4 são características estruturais essenciais para o desempenho deste tipo de atividade. Dentre outras características que também influenciam em um maior potencial antioxidante estão: presença de hidroxilas na posição orto (grupo catecol), principalmente no anel B; a insaturação entre os carbonos 2 e 3, conjugada com o grupo carbonila no carbono 4 do anel C; hidroxilas nos carbonos 5 e 7 ou em 4' e 5' (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; COOK; SAMMAN, 1996; PIETTA, 2000).

Além das características estruturais, o desempenho da atividade antioxidante depende de cinco fatores: (i) reatividade como doador de elétrons e hidrogênios; (ii) estabilidade do radical flavonoil formado; (iii) reatividade frente a outros antioxidantes; (iv) capacidade de quelar metais de transição e (v) solubilidade e interação com as membranas celulares (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Diferentes ensaios biológicos, que utilizam diferentes mecanismos, são utilizados para identificar a atividade antioxidantes. Na avaliação realizada no presente estudo, essa capacidade foi determinada utilizando os radicais sintéticos ABTS e DPPH, onde foram avaliadas a capacidade dos extratos em doar hidrogênios e estabilizarem o meio reacional (PYRZYNSKA; PEKAL, 2013)

Compostos como ácido elágico, ácido quínico, ácido gálico, quercetina, quercitrina, miricetina e miricitrina, bem como seus derivados, são substâncias já associadas e utilizadas devido as propriedades antioxidantes apresentadas (CASCAES et al., 2015; HAN; LEE; KIM, 2006; YEN; DUH; TSAI, 2002). Além disso, apresentam hidroxilas livres em suas estruturas, bem como algumas características essenciais para desempenho de tal atividade, como pode ser observado na Figura 20.

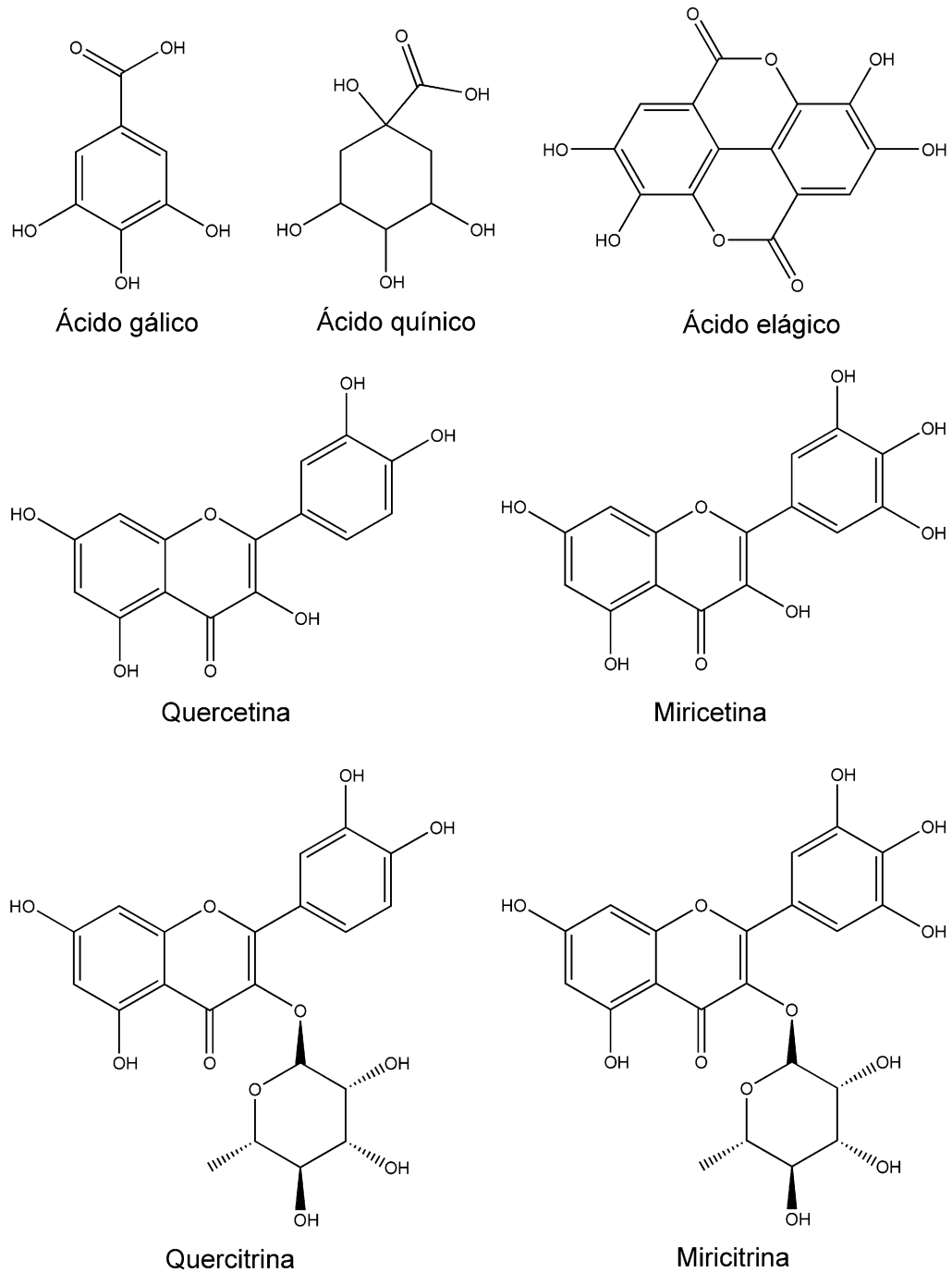


Figura 20 – Ácido fenólicos e flavonoides que possuem atividade antioxidante.

Alguns estudos, como o de Zhang e colaboradores (2015), afirmam que, além de atuarem contra radicais livres, compostos fenólicos, taninos e flavonoides também são capazes de inativar as enzimas α -amilase, α -glicosidase e lipase por um mecanismo não específico de ligação a essas enzimas.

Existe uma hipótese que afirma que a quantidade de hidroxilas no anel B dos flavonoides está diretamente ligada à atividade inibitória exibida por esses compostos

(LIU et al., 2017). Além disso, características como a presença de dupla ligação entre C2 e C3, associado com a carbonila em C4, e hidroxila em C5 contribuem para o aumento da atividade inibitória desses compostos (TAKAHAMA; HIROTA, 2018)

Segundo Takahama e Hirota (2018), os flavonoides podem atuar como inibidores da enzima α -amilase por meio da supressão da digestão do carboidrato por meio da formação de um complexo flavonoide-carboidrato, ligados por ligações hidrofóbicas ou covalentes. Independentemente do tipo de ligação, o complexo formado não é facilmente digerido, ocorrendo, portanto, a redução da velocidade de digestão do carboidrato e da liberação de glicose para o organismo. Além disso, alguns flavonoides podem atuar por meio de um mecanismo de ação específico, que não seja a formação de complexo e sim atuação direta sobre a enzima. À exemplo, os flavonoides vitexina e isovitexina podem inibir a atividade da enzima α -amilase por meio da formação de um complexo com o amido ou atuando competitivamente com ele pelo sítio de ligação enzimático.

A revisão realizada por Sales e colaboradores (2012) trouxe uma listagem de compostos que são capazes de inibir a enzima α -amilase. Dentre eles estão os flavonoides quercetina, quercitrina, rutina, kaempferol, miricetina, 3-O-galocatequina e 3-O-epigalocatequina, os taninos galotanino, pedunculagina e ácido clorogênico, os derivados do ácido cinâmico, ácido elágico e ácido caféico, e os terpenos, esqualeno, lupeol, ácido betulínio, ácido ursólico e ácido oleanólico. Entretanto, os mecanismos envolvidos com a expressão dessa atividade ainda não foram plenamente elucidados até o momento.

Dentre os ácidos fenólicos, o ácido gálico é o composto mais conhecido e trata-se de uma substância amplamente distribuída no reino vegetal. Esse composto apresenta diversas características benéficas para a saúde, que vão muito além da nutrição básica. Dados epidemiológicos sugerem que a adoção de uma dieta rica em ácido gálico pode ser benéfica para a saúde humana, principalmente devido as atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena apresentadas por esse composto (LU et al., 2016).

Além disso, já foi observado que essa substância pode ser usada como adjuvante no tratamento do diabetes humano. O ácido gálico foi capaz de atuar competitivamente

com a sacarose em meio ácido e inibir a ação das enzimas α -amilase e α -glicosidase, com maior afinidade pela segunda, e quando foi administrado associado a acarbose, foi capaz de atuar sinergicamente e aumentar a atividade de inibição (LU et al., 2016; OBOH et al., 2016). Esse composto pode ser encontrado na forma livre ou conjugado, podendo formar grandes moléculas poliméricas, conhecidas como taninos. Alguns galotaninos já demonstraram atividade sobre a enzima α -amilase, como a digaloiil-glicose, por exemplo (KANDRA et al., 2004).

Outros compostos também já demonstraram potencial hipoglicemiante. O levantamento bibliográfico realizado por Yin e colaboradores (2014) apresentou os compostos galato de metila, ácido gálico, isoquercitrina, quercetina, hipomanin A, gemin D, e algumas cumarinas e catequinas como inibidores da enzima α -glicosidase.

Em estudos realizados com a α -glicosidase pancreática, o ácido quínico (AYUSMAN et al., 2020) e o ácido 3,4-di-O-cafeoilquinico foram capazes de inibir a enzima (OOI et al., 2011), e ácido elágico e a quercetina se destacaram dentre os padrões fenólicos utilizados (YOU et al., 2012).

Além disso, os flavonoides quercitrina e miricitrina também já foram apontadas como inibidoras dessa enzima. A miricitrina, que é considerada o marcador químico da família Myrtaceae, já apresentou, além da capacidade antioxidante, atividade como hipoglicemiante, atuando sobre a aldose redutase e α -glicosidase (YOSHIKAWA et al., 1998).

Alguns triterpenos e fitoesteroides também já se apresentaram como potenciais agentes hipoglicemiantes. Uma mistura triterpênica de α e β -amirina extraído do *Protium heptaphyllum* foi capaz de inibir a α -amilase sérica de camundongos (FROTA, 2011). O ácido ursólico e o ácido oleanólico foram capazes de atuar sobre as enzimas α -amilase e α -glicosidase (POONGUNRAN et al., 2017; WANG et al., 2013). O lupeol, β -sitosterol e estigmasterol apresentam ação hipoglicemiante, sendo que os esteroides só foram capazes de atuar em conjunto e não isoladamente como o lupeol. O lupeol é um fitoconstituente que se mostrou capaz de retardar a progressão da diabetes e agir como um constituinte antidiabético (ALAM et al., 2012).

A hiperglicemia persistente pode induzir a produção de radicais livres por meio da glicação ou auto-oxidação. Portanto, a adoção de uma dieta rica em compostos

antioxidantes, ou utilização de suplementação ou nutracêuticos com essas propriedades, pode ajudar a proteger o organismo dos danos oxidativos e prevenir o surgimento da diabetes (OBOH et al., 2016). Além disso, a utilização de plantas medicinais ou fitoterápicos ricos em compostos que apresentem a capacidade de inibir as enzimas envolvidas na metabolização do carboidrato podem se tornar uma estratégia terapêutica para o controle glicêmico de pacientes com a DM 2, uma vez que este é um alvo terapêutico comumente utilizado.

A análise de amostras de fontes vegetais pela metodologia de ESI FT-ICR MS fornece um *fingerprint* dos compostos presentes na amostra. Quando realizado por meio do modo negativo, é possível obter um método sensível e seletivo para a identificação de compostos orgânicos polares com sítios ácidos, como por exemplo os ácidos fenólicos. A análise por espectrometria de massas com ionização por eletrospray, com inserção direta da amostra, fornece informações importantes relacionadas a composição bioativa de extratos vegetais, principalmente de espécies da família Myrtaceae que são amplamente relatadas como antioxidantes potentes e possuem essa atividade relacionada à composição fenólica (SALVADOR et al., 2011).

Deste modo, com a finalidade de identificar, principalmente, os fenóis e flavonoides presentes nas espécies estudadas, as frações mais polares foram submetidas a análise por ESI(-)FT-ICR MS. Os sinais foram identificados como íons pseudomoleculares $[M-H]^-$, sendo que a maioria dos sinais foram obtidos em sua forma desprotonada $[M-H]^-$ ou em forma de adutos de cloro $[M+Cl]^-$. Os compostos fenólicos sofrem ionização mais facilmente e, caso sejam abundantes e estáveis na amostra analisada, produzirão sinais mais intensos. Os erros foram inferiores a 2 ppm e a variação de DBE (Double Bond Equivalent) entre 5 e 17.

Além disso, os dados obtidos foram comparados com os estudos realizados por: Gomes e colaboradores (2020), Monteiro e colaboradores (2019), Oliveira e colaboradores (2018) e Salvador e colaboradores (2011), para a proposição das substâncias presentes em cada amostra.

4.4.1.1 Caracterização química do extrato bruto e da fração acetato de etila de *M. tenella*

A Figura 21 apresenta os íons obtidos na análise do extrato bruto e da fração acetato de etila da espécie *M. tenella*. O extrato bruto apresentou inúmeros sinais, sendo que os que foram passíveis de identificação se apresentaram em baixas intensidades. Dentre os íons identificados, os sinais mais abundantes foram o m/z 463.08820 da miricitrina $[C_{21}H_{19}O_{12}]^-$ e o m/z 499.06534 do cluster cloreto de miricitrina $[C_{21}H_{19}O_{12}+Cl]^-$.

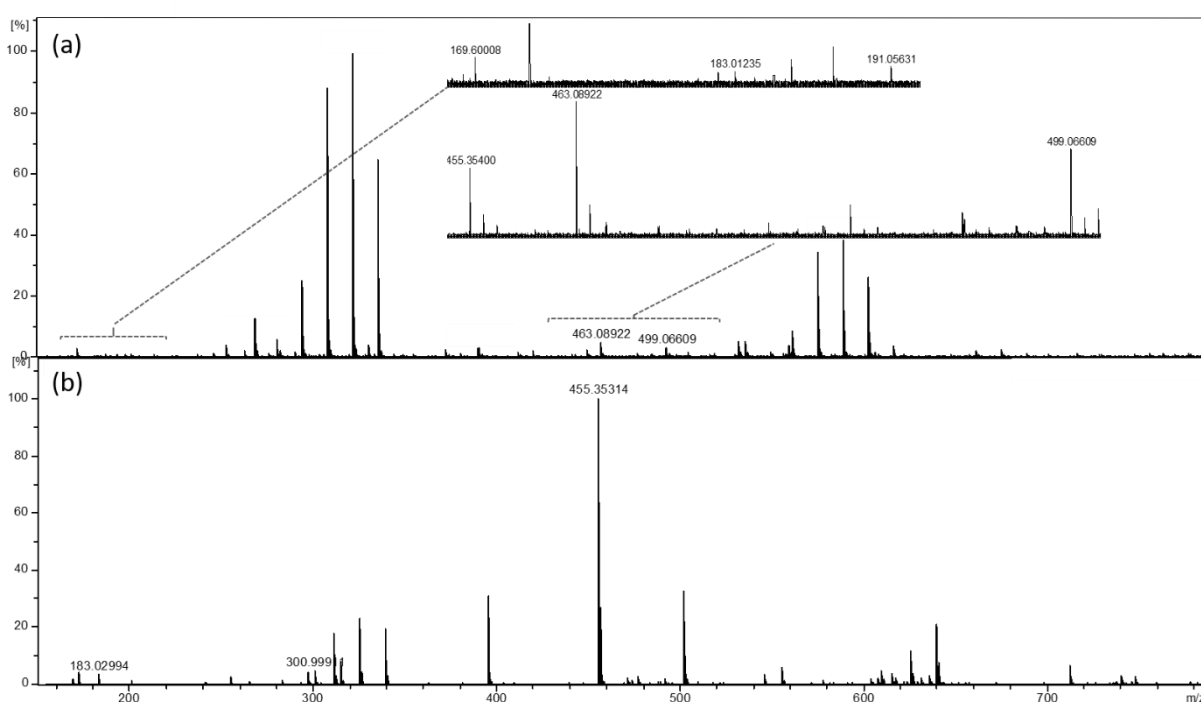


Figura 21 – Espectro ESI(-)FT-ICR MS do (a) extrato bruto e da (b) fração acetato de etila de *M. tenella*.

Na fração acetato de etila foi observada uma prevalência de compostos triterpênicos, onde o sinal mais intenso foi o m/z 455.35307 $[C_{30}H_{47}O_3]^-$. Não foi possível identificar o composto referente a esse íon, entretanto, podemos inferir que se trate do ácido ursólico ou do ácido oleanólico. Ambos possuem a mesma fórmula molecular e estruturas muito semelhantes, diferenciando-se somente no esqueleto básico, sendo o ácido ursólico do tipo ursano (possui dois grupamentos metílicos ligados a carbonos terciários, no anel E) e o ácido oleanólico do tipo oleanano (possui dois grupamentos metílicos ligados a um carbono quaternário, no anel E) (Figura 22; Figura 26, pág. 68). Estes já foram descritos para espécies do gênero *Myrciaria* (AZEVEDO et al., 2017).

Para realizar a identificação exata desse íon é necessário a realização de experimentos MS/MS para diferenciação e confirmação estrutural da molécula.

Além disso, também foram identificados os sinais m/z 471.34836, m/z 487.34276, m/z 627.35424 e m/z 635.41646 que se referem a ácidos triterpênicos.

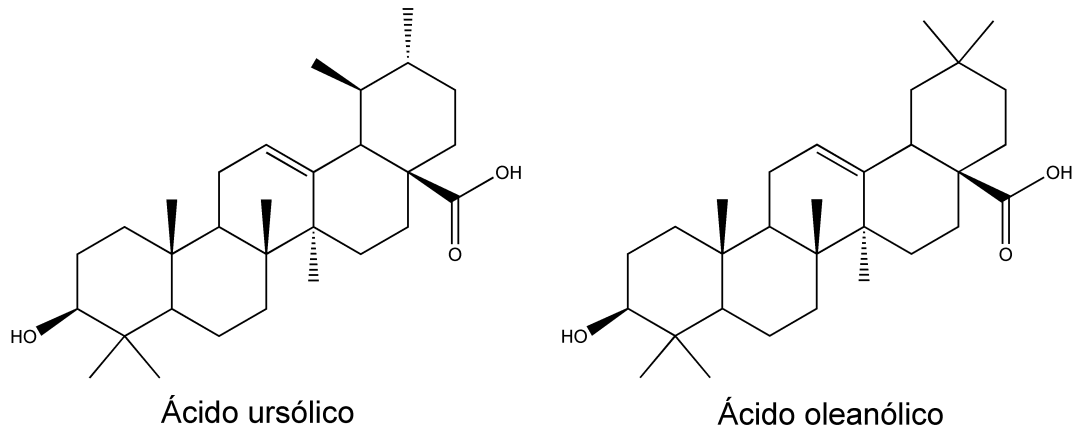


Figura 22 – Estrutura química dos ácidos ursólico e oleanólico.

A Tabela 06 traz o compilado de todos os compostos identificados nas amostras da espécie *M. tenella*. Podemos observar que o extrato bruto apresentou uma prevalência de compostos fenólicos e flavonoides quando comparado a fração acetato de etila, que apresentou uma predominância de compostos triterpênicos.

Estudos anteriores realizados com espécies do gênero *Myrciaria* identificaram a presença de ácido gálico, ácido elágico, ácido quínico, miricitrina e derivados em extratos de *M. cauliflora* e *M. vexator* (REYNERTSON et al., 2008; WU et al., 2012). Segundo Reynertson e colaboradores (2008), compostos como quercetina e seus glicosídeos, ácido elágico e miricitrina, que foram identificados em *Myrciaria* spp., estavam diretamente ligados às atividades antioxidantes desempenhadas em ensaios utilizando o radical DPPH. Ou seja, a composição química identificada no extrato bruto e na fração acetato de etila de *M. tenella* está em concordância com resultados anteriormente obtidos com espécies do mesmo gênero.

Tabela 06 – Composição química proposta para as frações polares de *M. tenella*.

[M-H] ⁻ m/z	Fórmula molecular [M-H]	Erro (ppm)	DBE	Substância proposta	MT	MTAc
169.01428	C ₇ H ₅ O ₅	-0.22	5.5	Ácido gálico	+	+
183.02995	C ₈ H ₇ O ₅	-0.267	5.5	Galato de metila	+	+
191.05616	C ₇ H ₁₁ O ₆	-0.26	2.5	Ácido quínico	+	-
215.03291	C ₆ H ₁₂ O ₆ Cl	-0.58	0.5	Cluster cloreto de monossacarídeo	+	-
289.07176	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	-1.44	9.5	p-coumaroiltriacetato	+	-
300.99912	C ₁₄ H ₅ O ₈	-0.41	12.5	Ácido elágico	-	+
455.35307	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	-1.88	7.5	Triterpeno	+	+
463.08820	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	-2.20	12.5	Miricitrina	+	-
471.34836	C ₃₀ H ₄₇ O ₄	-0.79	7.5	Ácido triterpênico	-	+
477.06784	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	-0.37	13.5	Ácido digaloil-chiquímico	+	+
487.34276	C ₃₀ H ₄₇ O ₅	0.28	7.5	Ácido triterpênico	-	+
499.06534	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ Cl	-0.94	11.5	Cluster cloreto de miricitrina	+	-
503.33817	C ₃₀ H ₄₇ O ₆	-0.71	7.5	Ácido triterpênico	-	+
523.31958	C ₃₀ H ₄₈ O ₅ Cl	-0.44	6.5	Cluster cloreto de ácido triterpênico	+	-
615.09966	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₆	-0.82	17.5	Miricitrina-O-galato	-	+
627.35424	C ₃₆ H ₅₁ O ₉	-0.38	11.5	Ácido triterpênico	-	+
635.41646	C ₃₆ H ₅₉ O ₉	-2.75	7.5	Glicosídeo triterpênico	-	+

(+) Presença da substância; (-) Ausência da substância; DBE: Double bound equivalent; MT: Extrato bruto metanólico de *M. tenella*; MTAc: Fração acetato de etila de *M. tenella*.

4.4.1.2 Caracterização química do extrato bruto e da fração acetato de etila de *M. splendens*

Os espectros de massas obtidos na análise do extrato bruto e da fração acetato de etila da espécie *M. splendens* se encontram na Figura 23. Ambos os espectros apresentaram diversos sinais de diferentes intensidades, sendo possível identificar 27 compostos. Dentre os íons identificados na amostra do extrato bruto, o sinal *m/z* 353.10909 do ácido quínico hexosídeo [C₁₃H₂₁O₁₁]⁻ foi o mais intenso, seguido dos sinais *m/z* 173.04558 do ácido chiquímico [C₇H₉O₅]⁻, *m/z* 169.01428 do ácido gálico

$[C_7H_5O_5]^-$, m/z 339.03595 do cluster de ácido gálico $[C_{14}H_{11}O_{10}]^-$, m/z 615.09966 da miricitrina-O-galato $[C_{28}H_{23}O_{16}]^-$ e m/z 447.09354 da quercitrina $[C_{21}H_{19}O_{11}]^-$.

Na fração acetato de etila foi possível identificar a mesma quantidade de compostos que no extrato bruto. Dentre os íons identificados, o sinal mais intenso foi o m/z 169.01428 do ácido gálico $[C_7H_5O_5]^-$, seguido do sinal m/z 339.03595 do cluster de ácido gálico $[C_{14}H_{11}O_{10}]^-$, m/z 300.99912 de ácido elágico $[C_{14}H_5O_8]^-$, m/z 483.02083 do metil-flavogalonato $[C_{22}H_{11}O_{13}]^-$ e m/z 183.02995 do galato de metila $[C_8H_7O_5]^-$.

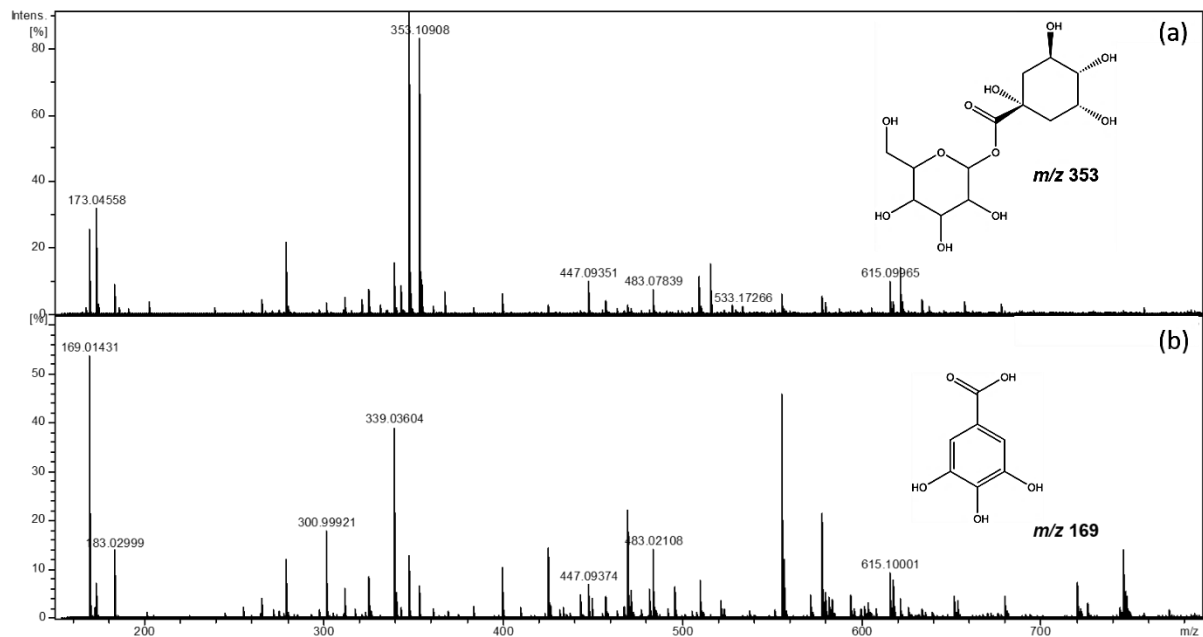


Figura 23 – Espectro ESI(-)FT-ICR MS do (a) extrato bruto e da (b) fração acetato de etila de *M. splendens*. Com destaque para os fragmentos m/z 353 e m/z 169 correspondentes ao hexosídeo de ácido quínico e ao ácido gálico, respectivamente.

Na Tabela 07 encontram-se listados todos os compostos identificados nas amostras. Houve uma prevalência de substâncias hidroxiladas na composição química dessa espécie, principalmente de ácidos fenólicos, flavonoides e taninos gálicos e elágicos.

A espécie apresentou expressivos teores de fenóis totais e flavonoides e a presença de compostos dessa classe foi confirmada pela identificação de compostos como miricitrina, quercetina, quercitrina e ácido gálico na composição do extrato bruto e da fração acetato de etila. Em estudos anteriores realizados com as folhas de *M. splendens* foi possível identificar compostos como miricitrina e rutina (MORESCO et al., 2014), ácido gálico e quercitrina (GULDBRANDSEN et al., 2015) e miricetina (CASCAES et al., 2015).

Tabela 07 – Composição química proposta para as frações polares de *M. splendens*.
(continua)

[M-H] ⁻ m/z	Fórmula molecular [M-H]	Erro (ppm)	DBE	Substância proposta	MS	MSAc
169.01428	C ₇ H ₅ O ₅	-0.22	5.5	Ácido gálico	+	+
173.04558	C ₇ H ₉ O ₅	-0.19	3.5	Ácido chiquímico	+	+
179.05614	C ₆ H ₁₁ O ₆	-0.171	1.5	Monossacarídeo	+	-
183.02995	C ₈ H ₇ O ₅	-0.267	5.5	Galato de metila	+	+
191.05616	C ₇ H ₁₁ O ₆	-0.26	2.5	Ácido quínico	+	+
300.99912	C ₁₄ H ₅ O ₈	-0.41	12.5	Ácido elágico	+	+
301.03555	C ₁₅ H ₉ O ₇	-0.588	11.5	Quercetina	+	+
317.03077	C ₁₅ H ₉ O ₈	-1.52	11.5	Miricetina	-	+
325.05678	C ₁₄ H ₁₃ O ₉	-0.27	8.5	Ácido galoil-chiquimico	+	+
331.06737	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀	-0.91	6.5	Galoil-glicose	+	+
339.03595	C ₁₄ H ₁₁ O ₁₀	-0.54	9.5	Cluster de ácido gálico	+	+
341.10950	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	-1.66	2.5	Dissacarídeo	-	+
343.06726	C ₁₄ H ₁₅ O ₁₀	-0.539	7.5	Ácido galoil-quínico	+	+
345.06221	C ₁₇ H ₁₃ O ₈	-1.8	11.5	Flavonoide	+	-
353.10909	C ₁₃ H ₂₁ O ₁₁	-0.43	3.5	Ácido quínico hexosídeo	+	+
361.07786	C ₁₄ H ₁₇ O ₁₁	-0.61	6.5	Galoil-heptose	+	+
383.11960	C ₁₄ H ₂₃ O ₁₂	-0.25	3.5	Dissacarídeo	+	+
433.07793	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	-1.03	12.5	Flavonoide	-	+
447.09354	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	-0.57	12.5	Quercitrina	+	+
449.07341	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₂	-1.92	12.5	Miricetina pentosídeo	-	+
455.35307	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	-1.88	7.5	Triterpeno	+	+
457.04153	C ₂₁ H ₁₃ O ₁₂	-0.62	15.5	Isocumarina	+	+
463.08851	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	-0.68	12.5	Miricitrina	+	+
467.08339	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₃	-0.6	11.5	Digaloil-hexose	+	+
471.34836	C ₃₀ H ₄₇ O ₄	-0.79	7.5	Ácido triterpênico	+	+
477.10417	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	-0.66	12.5	Flavonoide	+	+
483.02083	C ₂₂ H ₁₁ O ₁₃	-0.66	17.5	Flavogalonato de metila	+	+
533.17268	C ₁₉ H ₃₃ O ₁₇	-0.67	3.5	Trissacarídeo	+	-
599.10481	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₅	-0.95	17.5	Quecitrina-O-galato	+	+
615.09966	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₆	-0.82	17.5	Miricitrina-O-galato	+	+

Tabela 07 – Composição química proposta para as frações polares de *M. splendens*.
(continuação)

[M-H] ⁻ m/z	Fórmula molecular [M-H]	Erro (ppm)	DBE	Substância proposta	MS	MSAc
633.07395	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₈	-0.97	17.5	Gemin/Hipomanin	+	-
783.06957	C ₃₄ H ₂₃ O ₂₂	-1.18	23.5	Pedunculagina	+	-

(+) Presença da substância; (-) Ausência da substância; DBE: Double bound equivalent; MS: Extrato bruto metanólico de *M. splendens*; MSAc: Fração acetato de etila de *M. splendens*.

4.4.1.3 Caracterização química do extrato bruto e da fração acetato de etila de *M. neuwiedeana*

O extrato bruto e a fração acetato de etila da espécie *M. neuwiedeana* também foram analisadas por ESI(-)FT-ICR MS, onde foi possível propor a presença de diversos compostos (Tabela 08). Na Figura 24 encontra-se o espectro obtido na análise dessas amostras.

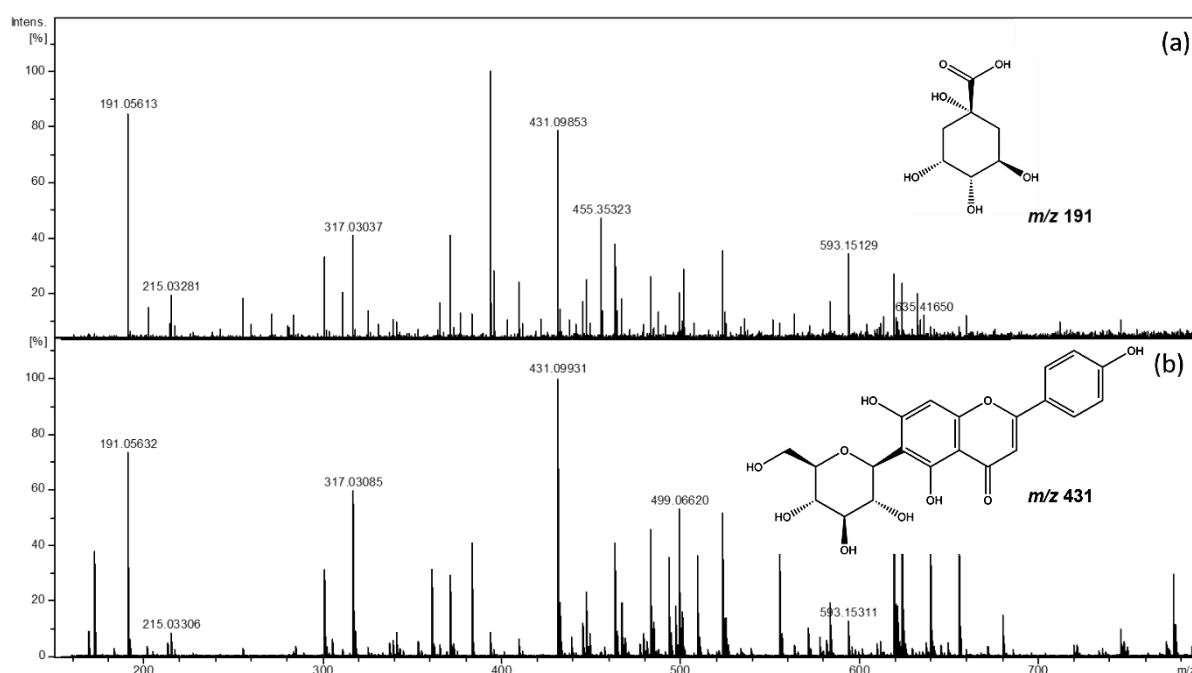


Figura 24 – Espectro ESI(-)FT-ICR MS do (a) extrato bruto e da (b) fração acetato de etila de *M. neuwiedeana*. Com destaque para os fragmentos *m/z* 191 e *m/z* 431 correspondentes ao ácido quínico e a isovitexina, respectivamente.

Dentre as substâncias propostas, os íons de maior intensidade foram o *m/z* 191.05616 do ácido quínico [C₇H₁₁O₆]⁻ e o *m/z* 431.09851 da isovitexina [C₂₁H₁₉O₁₀]⁻, em ambas amostras. Além disso, também foram identificados os íons *m/z* 301.03555 da

quercetina [C₁₅H₉O₇]⁻, *m/z* 317.03077 da miricetina [C₁₅H₉O₈]⁻, *m/z* 463.08851 da miricitrina [C₂₁H₁₉O₁₂]⁻ e *m/z* 499.06499 do cluster cloreto de miricitrina [C₂₁H₂₀O₁₂+Cl]⁻

Tabela 08 – Composição química proposta para as frações polares de *M. neuwiedeana*.

[M-H] ⁻ <i>m/z</i>	Fórmula molecular [M-H]	Erro (ppm)	DBE	Substância proposta	MN	MNAc
169.01428	C ₇ H ₅ O ₅	-0.22	5.5	Ácido gálico	-	+
183.02995	C ₈ H ₇ O ₅	-0.267	5.5	Galato de metila	+	+
191.05616	C ₇ H ₁₁ O ₆	-0.26	2.5	Ácido quínico	+	+
204.99097	C ₇ H ₆ O ₅ Cl	-1.16	4.5	Cluster cloreto de ácido gálico	-	+
215.03281	C ₆ H ₁₂ O ₆ Cl	-0.10	0.5	Cluster cloreto de monossacarídeo	+	+
289.07176	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	-1.44	9.5	p-cumarilacetato	-	+
289.07218	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	-1.44	9.5	Epicatequina	-	+
301.03555	C ₁₅ H ₉ O ₇	-0.58	11.5	Quercetina	+	+
317.03077	C ₁₅ H ₉ O ₈	-1.52	11.5	Miricetina	+	+
331.06737	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀	-0.91	6.5	Galoil-glicose	-	+
353.10894	C ₁₃ H ₂₁ O ₁₁	-0.01	3.5	Ácido quínico hexosídeo	+	-
431.09851	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	-0.33	12.5	Isovitexina	+	+
433.07779	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	-0.36	12.5	Flavonoide	+	-
447.09354	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	-0.57	12.5	Quercitrina	+	-
455.35307	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	-1.88	7.5	Triterpeno	+	-
463.08851	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	-0.68	12.5	Miricitrina	+	+
471.34836	C ₃₀ H ₄₇ O ₄	-0.79	7.5	Ácido triterpênico	+	-
479.08333	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃	-0.45	12.5	Flavonoide	+	-
487.34276	C ₃₀ H ₄₇ O ₅	0.28	7.5	Ácido triterpênico	+	-
499.06499	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ Cl	-0.23	11.5	Cluster cloreto de miricitrina	+	+
593.15146	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	-0.44	13.5	Glicosídeo de vitexina	+	-
635.41650	C ₃₆ H ₅₉ O ₉	-0.07	7.5	Glicosídeo triterpênico	+	-

(+) Presença da substância; (-) Ausência da substância; DBE: Double bound equivalente; MN: Extrato bruto metanólico de *M. neuwiedeana*; MNAc: Fração acetato de etila de *M. neuwiedeana*.

Não existem relatos na literatura de estudos da composição química da espécie *M. neuwiedeana*. Entretanto, em um estudo com uma espécie do mesmo gênero, a *Myrcia rufipila*, foi possível isolar miricetina, miricitrina, miricetina-O-galato e ácido gálico. Além disso, o autor associou as atividades antioxidante e antimicrobiana apresentadas pela espécie com essa composição química identificada (CASCAES et al., 2019). Além disso, pode-se observar perfis químicos semelhantes entre as espécies estudadas.

4.4.1.4 Caracterização química do extrato bruto e da fração acetato de etila de *M. neobrasiliensis*

Nas análises do extrato bruto e da fração acetato de etila da espécie *M. neobrasiliensis* por ESI(-)FT-ICR, foi possível detectar diversos compostos químicos (Figura 25). As duas amostras apresentaram em comum o íon de maior intensidade m/z 463.08851 da miricitrina $[C_{21}H_{19}O_{12}]^-$ e os íons m/z 499.06496 do cluster cloreto de miricitrina $[C_{21}H_{19}O_{12}+Cl]^-$, m/z 317.03077 da miricetina $[C_{15}H_9O_8]$ e m/z 615.09966 miricetina-O-galato $[C_{28}H_{23}O_{16}]^-$.

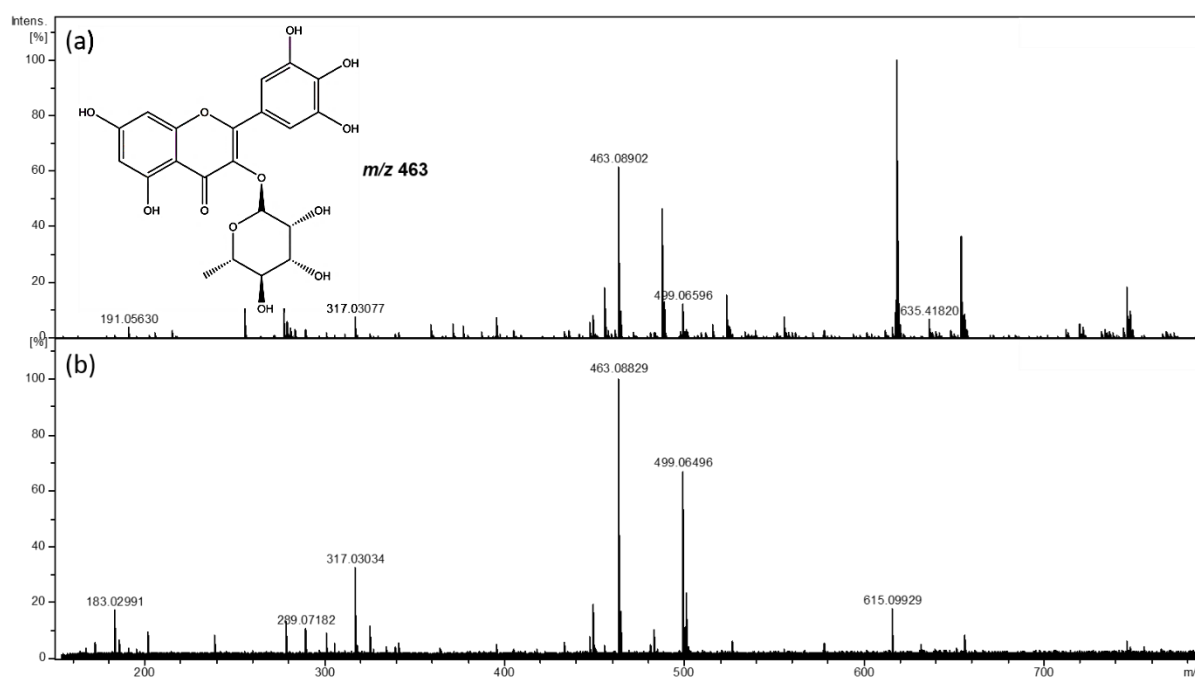


Figura 25 – Espectro ESI(-)FT-ICR MS do (a) extrato bruto e da (b) fração acetato de etila de *M. neobrasiliensis*. Com destaque para o fragmento m/z 463 correspondente a miricitrina.

Todos os compostos identificados nas amostras estão dispostos na Tabela 09.

Tabela 09 – Composição química proposta para as frações polares de *M. neobrasiliensis*.

[M-H] ⁻ m/z	Fórmula molecular [M-H]	Erro (ppm)	DBE	Substância proposta	MNB	MNBAC
179.05614	C ₆ H ₁₁ O ₆	-0.171	1.5	Monossacarídeo	+	-
183.02995	C ₈ H ₇ O ₅	-0.267	5.5	Galato de metila	+	+
191.05616	C ₇ H ₁₁ O ₆	-0.26	2.5	Ácido quínico	+	+
289.07176	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	-1.44	9.5	p-cumarilacetato	+	-
289.07218	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	-1.44	9.5	Epicatequina	+	-
300.99912	C ₁₄ H ₅ O ₈	-0.41	12.5	Ácido elágico	-	+
301.03555	C ₁₅ H ₉ O ₇	-0.588	11.5	Quercetina	+	+
317.03077	C ₁₅ H ₉ O ₈	-1.52	11.5	Miricetina	+	+
341.10950	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	-1.66	2.5	Dissacarídeo	+	+
345.06221	C ₁₇ H ₁₃ O ₈	-1.8	11.5	Flavonoide	+	-
353.10963	C ₁₃ H ₂₁ O ₁₁	-1.97	3.5	Ácido quínico hexosídeo	+	-
383.11960	C ₁₄ H ₂₃ O ₁₂	-0.25	3.5	Dissacarídeo	+	-
433.07793	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	-1.03	12.5	Flavonoide	-	+
447.09354	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	-0.57	12.5	Quercitrina	+	+
449.07341	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₂	-1.92	12.5	Miricetina pentosídeo	+	+
455.35307	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	-1.88	7.5	Triterpeno	+	-
463.08851	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	-0.68	12.5	Miricitrina	+	+
471.34836	C ₃₀ H ₄₇ O ₄	-0.79	7.5	Ácido triterpênico	+	-
499.06496	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ Cl	-0.18	11.5	Cluster cloreto de miricitrina	-	+
533.17268	C ₁₉ H ₃₃ O ₁₇	-0.67	3.5	Trissacarídeo	+	-
599.10481	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₅	-0.95	17.5	Quecitrina-O-galato	+	-
615.09966	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₆	-0.82	17.5	Miricitrina-O-galato	+	+
635.41646	C ₃₆ H ₅₉ O ₉	-2.75	7.5	Glicosídeo triterpênico	+	-
649.43211	C ₃₆ H ₅₇ O ₁₀	-2.96	7.5	Glicosídeo triterpênico	+	-

(+) Presença da substância; (-) Ausência da substância; DBE: Double bound equivalent (DBE); MNB: Extrato bruto metanólico de *M. neobrasiliensis*; MNBAC: Fração acetato de etila de *M. neobrasiliensis*.

Assim como para espécie *M. neuwiedeana*, não há na literatura estudos relatando a composição química ou as atividades biológicas desempenhadas pela *M. neobrasiliensis*. Portanto, os resultados obtidos com essa espécie se tornam uma importante contribuição para o conhecimento da espécie.

Com a avaliação destas espécies por meio da metodologia de ESI(-)FT-ICR foi possível verificar que as espécies da família Myrtaceae apresentaram perfis químicos muito semelhantes. Todas as espécies apresentaram uma grande variedade de compostos hidroxilados em suas composições, principalmente ácidos fenólicos, flavonoides e ácidos triterpênicos. Além disso, as espécies do gênero *Myrcia* apresentaram compostos bioativos que justificam a atividade hipoglicemiante pela qual esse gênero é conhecido. Foram identificados compostos como a isovitexina, vitexina, miricitrina, quercetina, quercitrina, ácido quínico, catequinas, ácido elágico e ácido gálico, que, como dito anteriormente, têm a capacidade de atuar como inibidoras das enzimas estudadas.

A determinação do perfil químico destas espécies se trata de um avanço para o entendimento das propriedades apresentadas por espécies do gênero *Myrcia*, bem como contribui diretamente para o conhecimento das espécies estudadas neste trabalho que apresentam grande diversidade de compostos e potencial farmacológico.

4.4.2 Caracterização dos triterpenos e esteroides por GC/MS

A presença de terpenos em espécies da família Myrtaceae é uma característica marcante e bem definida (PADOVAN et al., 2014). Os terpenos englobam uma grande variedade de compostos biologicamente ativos formados por subunidades de isopreno (C_5H_8). Em relação ao número de subunidades, os terpenos podem ser divididos em monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}) e triterpenos (C_{30}), com cadeias cíclicas ou acíclicas.

Os monoterpenos e sesquiterpenos são geralmente encontrados em óleos essenciais, mas não se limitam a estes, podendo ser encontrados na forma volátil ou fixa.

Os triterpenos, por sua vez, possuem uma grande variedade de atividades e apresentam-se em formas estruturais complexas. Os núcleos triterpênicos mais importantes são o esqueleto oleanano, ursano e lupano, que são núcleos

pentacíclicos formados por cinco anéis (A, B, C, D e E, respectivamente) de 5 ou 6 membros (Figura 26), encontrados livres ou glicosilados, podendo apresentar diferentes atividades biológicas, como atividades imunomoduladora, antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-carcinogênica, por exemplo (MUFFLER et al., 2011).

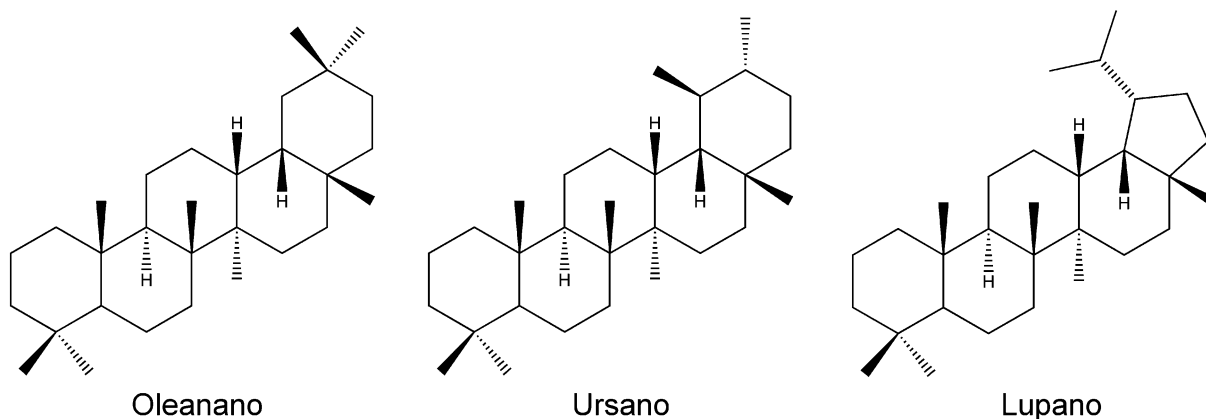


Figura 26 – Estruturas moleculares dos principais esqueletos triterpênicos.

Outra importante classe de compostos, também formados pela mesma via metabólica dos terpenos, é a dos fitoesteroides. Ambos são provenientes da via da acetil-coenzima A e formados pela ciclização do esqualeno, diferenciando-se pelo número de anéis formados e pelas atividades biológicas apresentadas. Os fitoesteroides possuem estruturas químicas muito semelhantes aos dos triterpenos, contendo quatro anéis (A, B, C e D) em sua estrutura básica. Além disso, são eficazes contra doenças cardiovasculares, principalmente por meio da promoção da redução dos níveis de colesterol sanguíneos (DEWICK, 2009).

Os terpenos, triterpenos e esteroides consistem em classes de compostos analisados por GC/MS, uma poderosa e eficiente técnica de análise para identificação e caracterização de misturas complexas de compostos (ASSIMOPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2005). Se trata, portanto, de uma ferramenta muito importante que auxilia na determinação do perfil terpênico de diferentes espécies e na identificação e determinação de biomarcadores para estas.

Não foi possível encontrar na literatura os valores de Índice de Kovats para os triterpenos e esteroides para as condições de análise empregadas. Portanto, não foi possível afirmar a presença desses compostos por meio da comparação direta desses índices. A identificação dos triterpenos lupeol, lupenona, betulina, α -amirina, β -amirina e γ -sitosterol nas quatro espécies foi realizada por meio da análise dos padrões de

fragmentação apresentados, em comparação com dados encontrados na literatura e com dados obtidos na análise de padrões. Dessa forma, esses compostos foram identificados e seus índices de Kovats determinados.

Na Figura 27 encontram-se as principais fragmentações propostas para o γ -sitosterol e na Figura 28 podemos observar que os íons m/z 414, m/z 396 e m/z 145 são os que apresentaram maior intensidade (Figura 35).

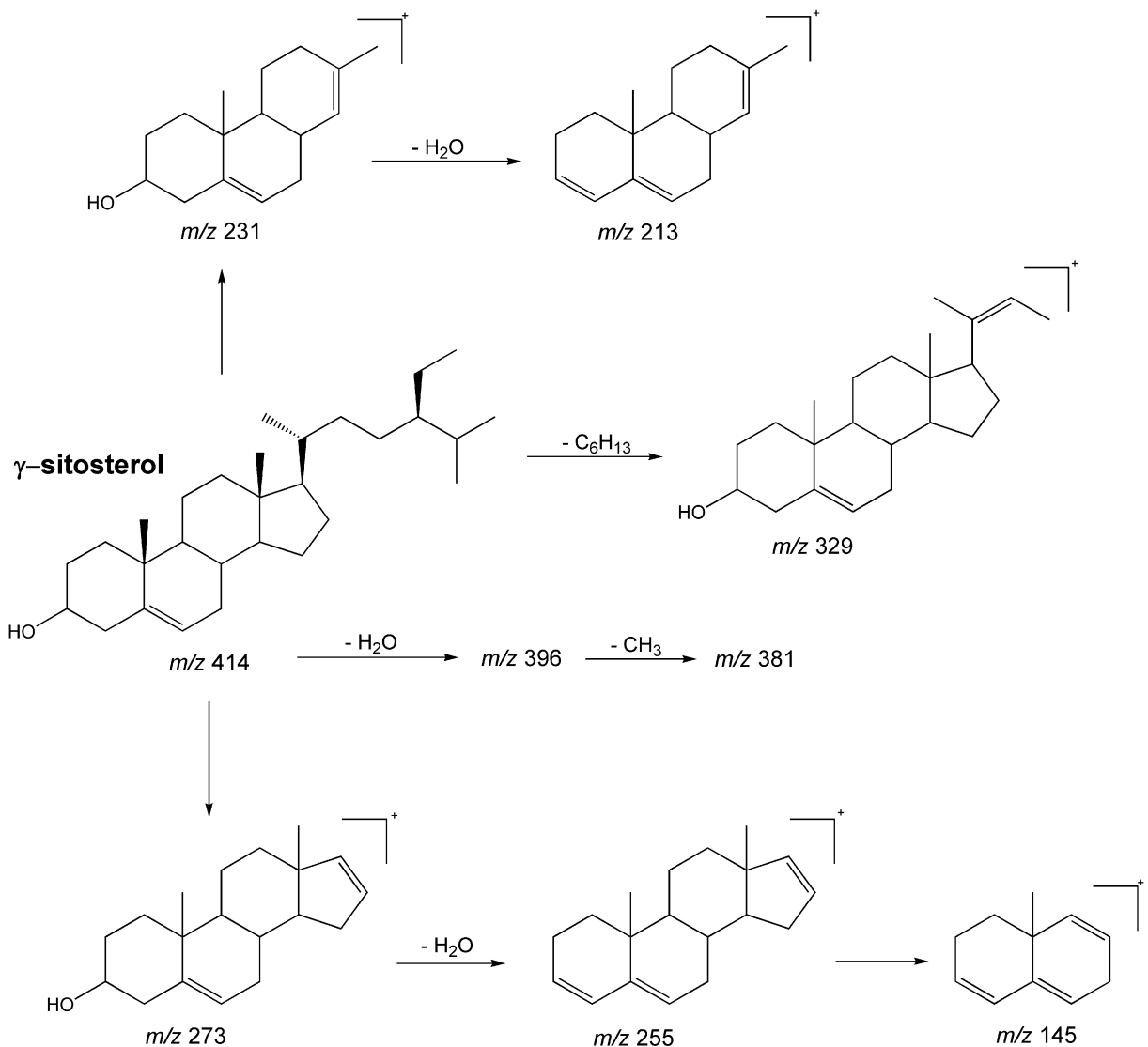


Figura 27 – Principais fragmentações propostas para o γ -sitosterol.
Fonte: adaptado de Silva (2016).

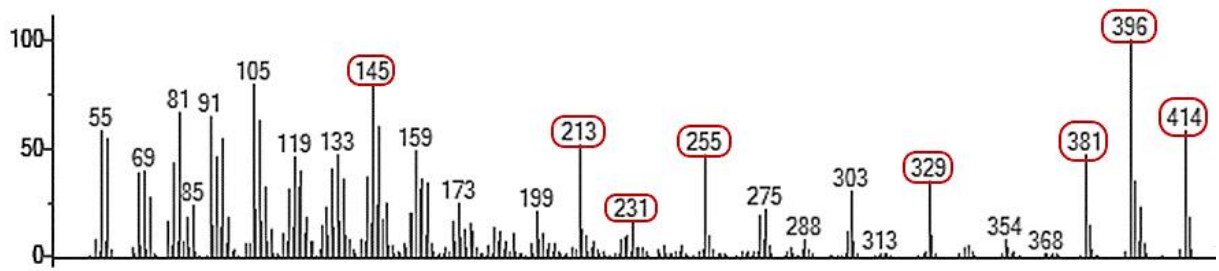


Figura 28 – Padrão de fragmentação do γ -sitosterol obtido na análise da fração MNH. MNH: Fração hexânica de *M. neuwiedeana*.

Na Figura 29 é observar as principais quebras de ligações dos triterpenos lupeol e lupenona. Esses triterpenos seguem praticamente o mesmo padrão de fragmentação. Devido a pequena diferença estrutural entre os dois compostos, onde o lupeol apresenta uma hidroxila ligada ao C3 e a lupenona uma carboxila em C3, os tempos de retenção apresentados são diferentes e a diferenciação/caracterização se dá pelos diferentes valores de massa/carga apresentados por dois fragmentos demonstrados na imagem (lupeol: m/z 207 e m/z 426; lupenona: m/z 205 e m/z 424) (Figura 30).

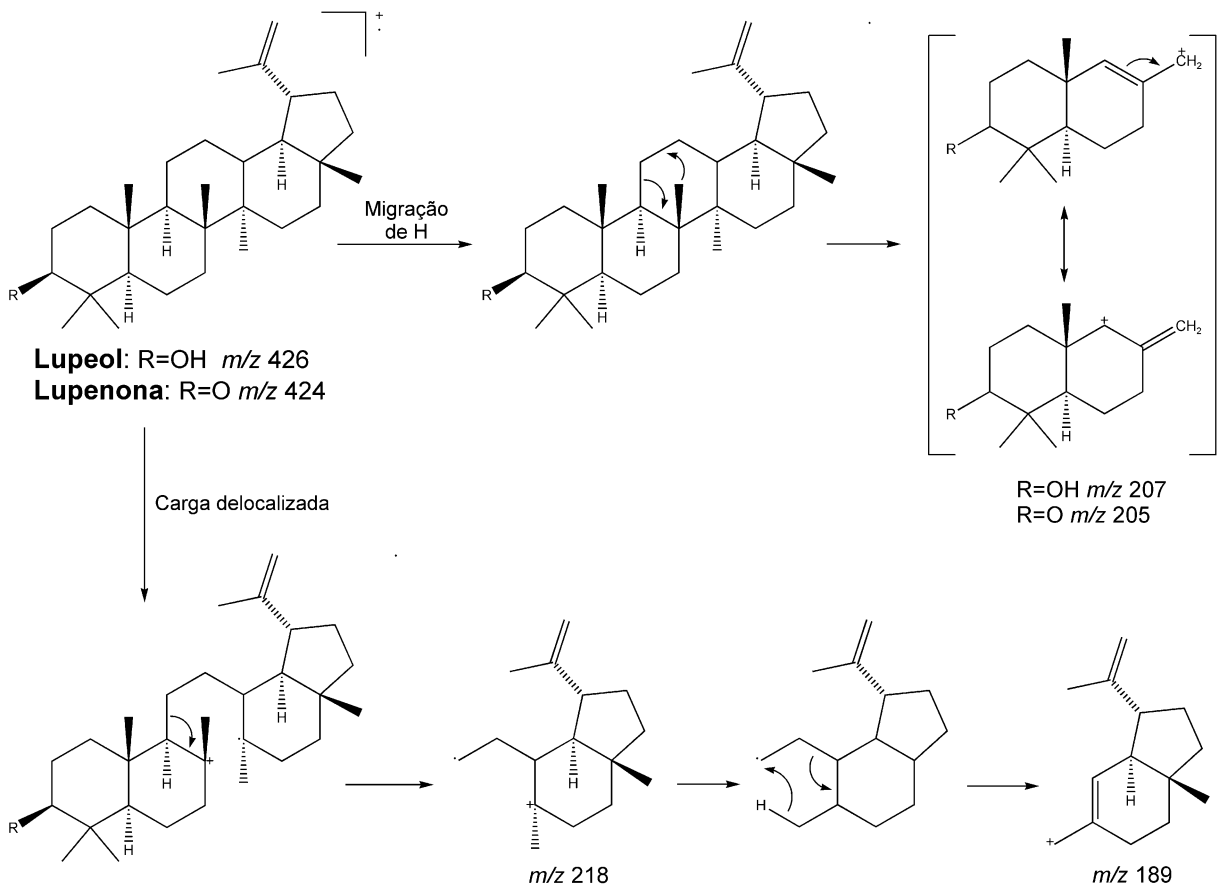


Figura 29 – Principais fragmentações dos triterpenos lupeol e lupenona. Fonte: adaptado de Silva (2014).

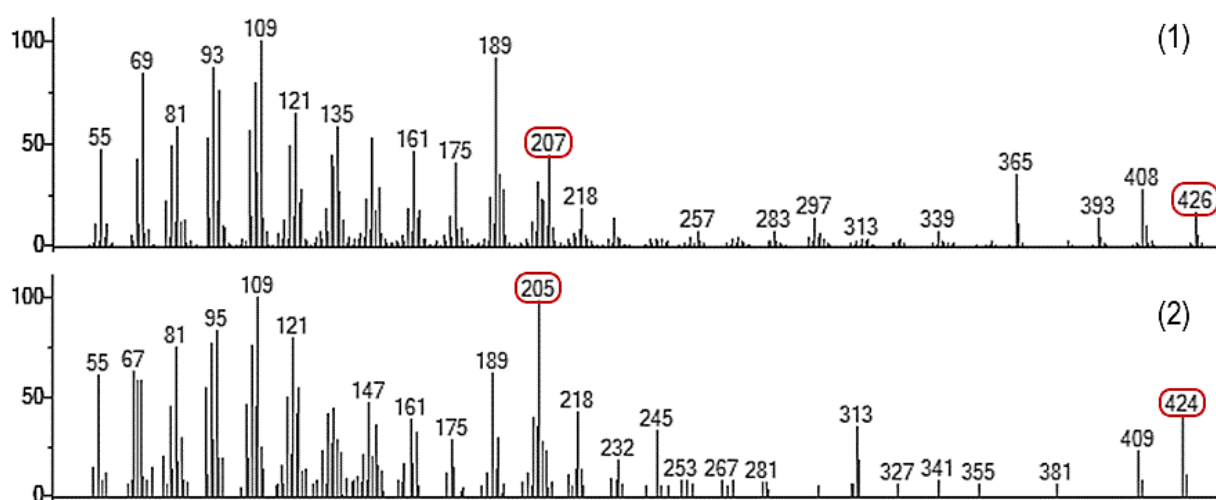


Figura 30 – Padrão de fragmentação do (1) lupeol e da (2) lupenona obtido na análise da fração MNH. MNH: Fração hexânica de *M. neuwiedeana*.

A estrutura química do triterpeno betulina é muito semelhante à do lupeol. Ambos se tratam de triterpenos pentacíclicos de esqueleto lupano, com hidroxilas na posição 3, e diferença estrutural na posição 17, onde há um grupamento metílico no lupeol e um grupamento CH_2OH na betulina. Como podemos observar na fragmentação proposta na Figura 31, o fragmento intermediário de m/z 207 é o mesmo apresentado na fragmentação do triterpeno lupeol. A diferenciação, portanto, é feita por meio dos demais fragmentos formados, como os íons de m/z 442 e m/z 234 (Figura 32).

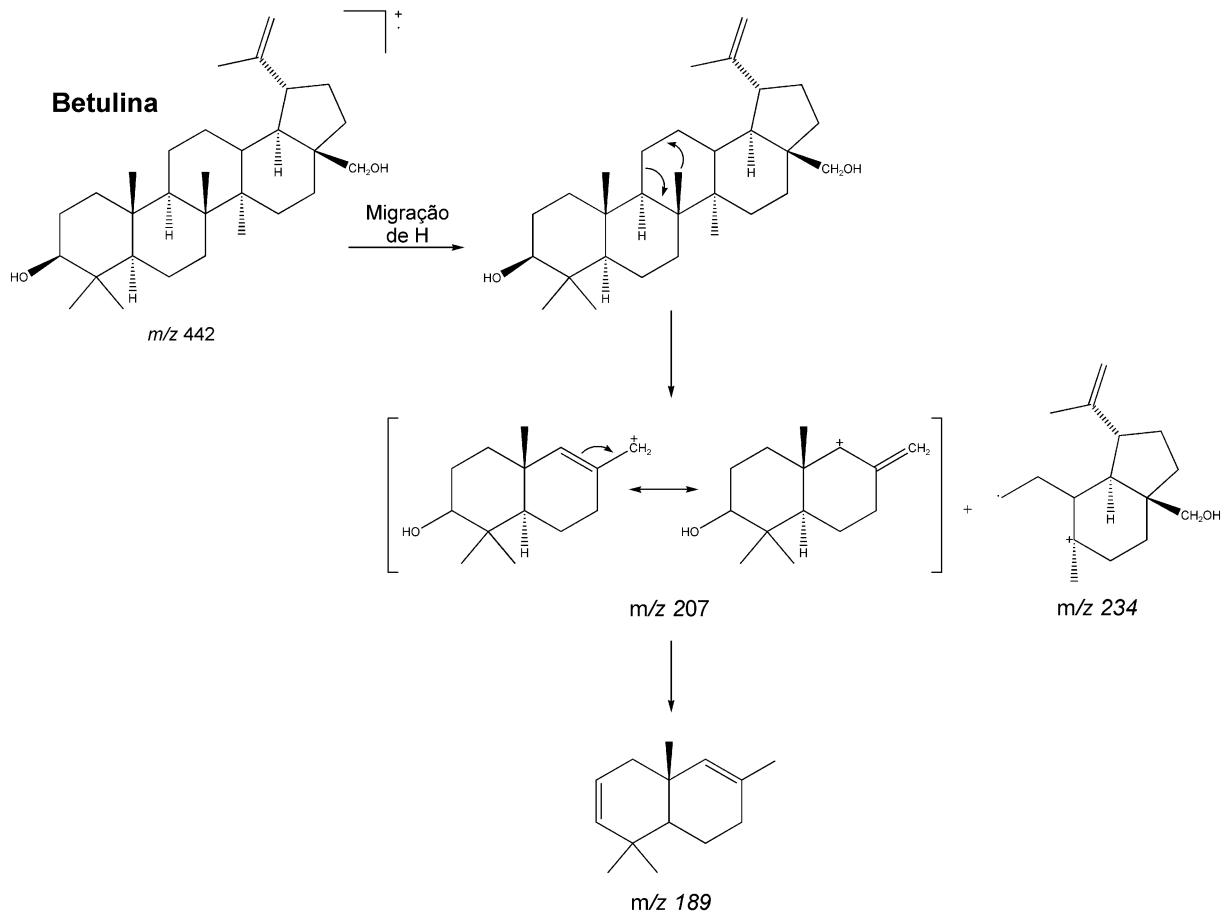


Figura 31 – Principais fragmentações propostas para a betulina.

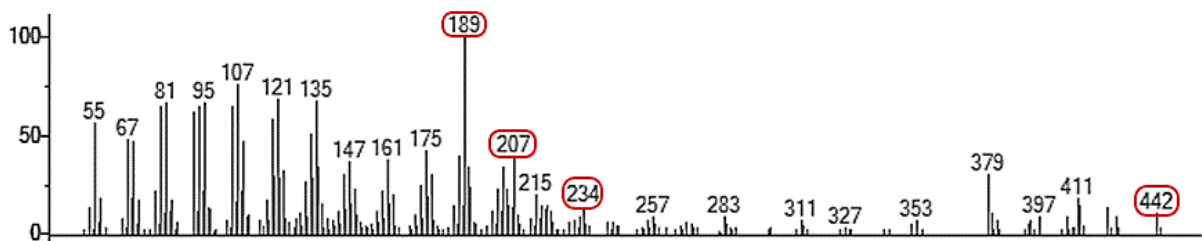


Figura 32 – Padrão de fragmentação da betulina obtido na análise da fração MNH. MNH: Fração hexânica de *M. neuwiedeana*.

Uma característica diferencial entre triterpenos de esqueleto lupano, como lupeol e lupenona, de triterpenos de esqueleto oleanano e ursano, como a β -amirina e a α -amirina, respectivamente, é a presença do fragmento de m/z 203 apresentado pelas amirinas. Os triterpenos β -amirina e a α -amirina sofrem fragmentação tipo retro-Diels-Alder no anel C, típica de triterpenos pentacíclicos, o que origina os íons de maior intensidade observados para essas substâncias: m/z 218, m/z 203 e m/z 189 (fragmento que acompanha o íon m/z 203, em menor intensidade) (Figura 33). A

principal diferença observada entre os esqueletos dessas moléculas é a posição dos grupamentos metílicos no anel E. Esta diferença fica evidente quando se observa a intensidade do íon m/z 203 que é mais abundante no espectro da β -amirina, em função da maior estabilidade do intermediário formado na fragmentação desse composto (Figura 34) (ASSIMOPOULOU; PAPAGEORGIU, 2005).

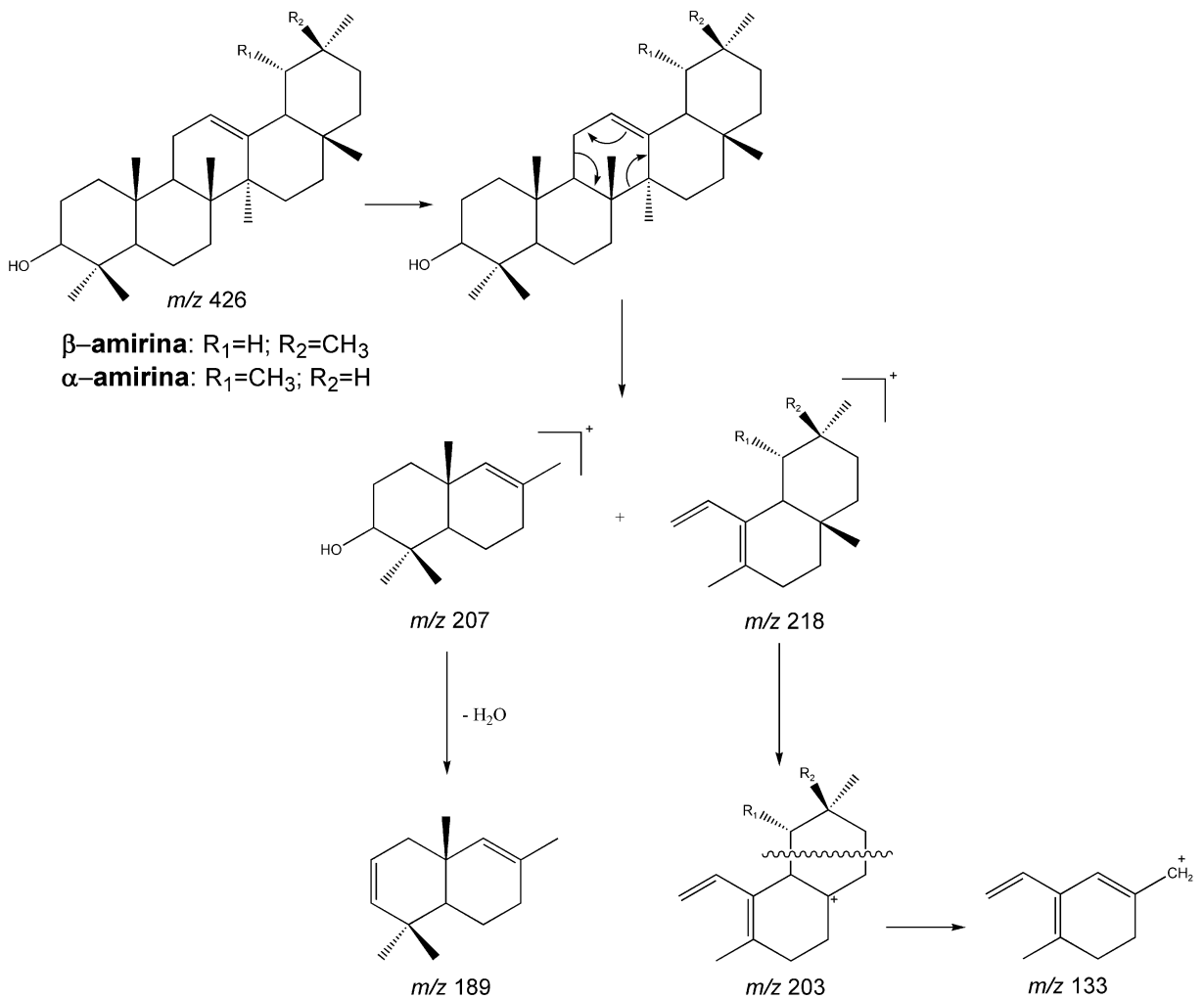


Figura 33 – Representação da fragmentação tipo retro-Diels-Alder dos triterpenos β -amirina e a α -amirina.

Fonte: adaptado de Assimopoulou e Papagerogiou (2005).

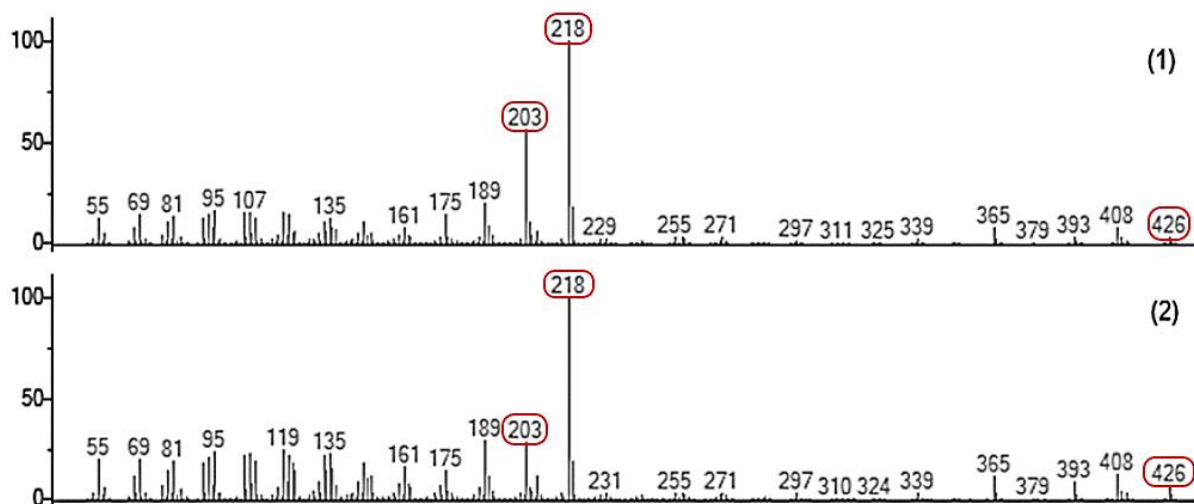


Figura 34 – Padrão de fragmentação da (1) β -amirina e da (2) α -amirina obtido na análise da fração MNH. MNH: Fração hexânica de *M. neuwiedeana*.

A análise de extratos por GC/MS apresenta-se como uma importante ferramenta para identificação e diferenciação de compostos triterpênicos, pois, como observado acima, os triterpenos se tratam de compostos com estruturas químicas muito semelhantes, com pequenas diferenças passíveis de serem observadas pelo espectro de massas. Portanto, a análise cromatográfica realizada por este trabalho confirma e reafirma a importância da utilização da cromatografia gasosa para análise de extratos que possuem triterpenos e esteroides em suas composições.

4.4.2.1 Caracterização química da fração hexânica da espécie *M. tenella*

Na análise da fração hexânica da espécie *M. tenella* por GC/MS foi possível identificar a presença de 23 compostos (Tabela 10). Dentre eles, o esteroide γ -sitosterol e os triterpenos lupeol e betulina foram os compostos majoritários encontrados, representando 47,81% da composição química da fração. Além disso, esta fração apresentou cerca 19,30% de sua composição de sesquiterpenos e cerca de 42,95% de triterpenos.

Tabela 10 – Composição química da fração hexânica da *M. tenella*.

	Composto	TR	Match	IKe	IKI	Área (%)
1	α -copaeno	9.442	876	1376	1376	0.39
2	β -elemeno	9.811	892	1393	1393	0.46
3	β -cariofileno	10.443	946	1420	1420	2.04
4	α -cariofileno	11.218	896	1453	1453	0.60
5	Alo-aromadendreno	11.393	902	1461	1461	0.89
6	Biciclosesquifelandreno	11.443	895	1463	1462	0.79
7	γ -muuroleno	11.756	925	1476	1476	0.97
8	Ciclosativeno	11.838	839	1480	-	0.37
9	α -selineno	11.975	929	1486	1486	1.23
10	Eremofileno	12.075	919	1490	1486	1.70
11	α -muuroleno	12.313	925	1500	1500	1.51
12	γ -cadineno	12.626	915	1514	1515	1.68
13	α -calacoreno	13.745	845	1563	-	0.39
14	Álcool cariofilenil	13.883	800	1569	1568	0.93
15	Óxido cariofileno	14.177	898	1582	1582	3.26
16	Viridiflorol	14.383	881	1591	1591	1.35
17	τ -Cadinol	15.491	861	1640	1640	0.38
18	τ -Muurolol	15.785	851	1654	1654	0.36
19	Fitol	28.01	900	2112	2111	1.07
20	γ -sitosterol	42.933	881	3307	-	6.57
21	β -amirina	43.358	848	3332	-	1.71
22	Lupeol	44.165	884	3379	-	33.23
23	Betulina	48.000	805	3666	-	8.01

TR: Tempo de Retenção; IKe: Índice de Kovats experimental; IKI: índice de Kovats literatura; (-) ausência de valores.

Estudos com óleos essenciais obtidos de *M. tenella* mostraram a predominância de sesquiterpenos na composição, principalmente de β -cariofileno, γ -cadineno e óxido cariofileno (ANDRADE; ZOGHBI; SILVA, 2006; APEL et al., 2010). Pela análise por GC/MS da fração hexânica de *M. tenella* foi possível identificar a presença dos

mesmos sesquiterpenos anteriormente identificados no óleo essencial da espécie, bem como a detecção de triterpenos ainda não descritos para a espécie.

Apesar de não ter sido encontrado nenhum estudo indicando a presença de triterpenos na *M. tenella*, alguns triterpenos, de esqueleto lupano e oleanano, já foram descritos para espécies do gênero *Myrciaria* como: β -amirina, ácido oleanólico, ácido ursólico e ácido maslínico em *M. plicatocostata* (AZEVEDO et al., 2017); ácido betulínico nas espécies *M. dubia* (YAZAWA et al., 2011) e *M. floribunda* (AZEVEDO et al., 2017); lupeol e ácido betulínico isolados de *M. ferruginea* (LIMA et al., 2017) e friedelina, glutinol, 28-hidroxifriedelina, ácido ursólico e o esteroide β -sitosterol em *M. strigipes* (FAITANIN et al., 2018). Portanto, é possível afirmar que a composição química de *M. tenella* vem ao encontro dos relatos encontrados na literatura acerca de espécies do gênero *Myrciaria*, bem como demonstram que espécies deste gênero são importantes fontes de triterpenos pentacíclicos.

4.4.2.2 Caracterização química da fração hexânica da espécie *M. splendens*

Os compostos encontrados em maiores concentrações na fração hexânica de *M. splendens* foram o α -tocoferol (isoforma mais ativa da vitamina E) e o esteroide γ -sitosterol, representando 47,84% da composição química da fração.

Ao contrário do observado na análise da espécie *M. tenella*, não foi possível identificar a presença de compostos triterpênicos. A composição de sesquiterpenos foi menos expressiva, representando 13,63%, e a presença de ácidos graxos foi detectada nessa espécie, representando 17,50% da composição total da fração. Todos os compostos identificados estão listados na Tabela 11.

Assim como diversos outros óleos essenciais de espécies do gênero *Myrcia*, o óleo essencial de *M. splendens* se apresentou majoritariamente composto de sesquiterpenos (COLE; HABER; SETZER, 2008; NAKAMURA et al., 2010; SCALVENZI et al., 2017). Na análise realizada, foi possível constatar a presença de sesquiterpenos e ácidos graxos na fração hexânica dessa espécie.

Além disso, ao contrário do que foi observado na análise com a espécie *M. tenella*, onde foram encontrados triterpenos como compostos majoritários, a fração hexânica de *M. splendens* apresentou o γ -sitosterol e o α -tocoferol em maiores concentrações.

Durante o levantamento bibliográfico não foram encontrados estudos que indicassem a presença desses compostos na espécie em questão. Contudo, o isômero β -sitosterol já foi isolado na espécie *Myrcia tomentosa* (SA et al., 2017) e o α -tocoferol já foi identificado em uma espécie da mesma família, a *P. cauliflora* (GASPAROTTO JUNIOR; DE SOUZA; LÍVERO, 2019).

Tabela 11 – Composição química da fração hexânica da *M. splendens*.

	Composto	TR	Match	IKe	IKI	Área (%)
1	Alo-aromadendreno	11,39	803	1461	1461	0.39
2	β -gurjuneno	11.75	886	1476	1475	0.49
3	β -selineno	11.981	905	1486	1486	0.44
4	Eremofileno	12.081	937	1490	1490	2.36
5	α -muuroleno	12.307	930	1500	1500	0.57
6	γ -cadineno	12.626	904	1514	1514	0.28
7	δ -cadineno	12.838	909	1523	1523	1.51
8	Viridiflorol	14.646	848	1602	1591	1.23
9	α -gurjuneno	15,434	854	1638	-	2.61
10	τ -Cadinol	15.478	831	1640	1640	1.25
11	γ -Muuroleno	16.06	827	1666	-	2.5
12	Hexadecanoato de metila	21.508	939	1927	1927	3.33
13	Linoleato de metila	24.686	917	2094	2094	1.45
14	Linolenato de metila	24.805	895	2101	2100	5.76
15	Fitol	25.018	907	2113	2114	5.64
16	Estearato de metila	25.305	908	2129	2128	0.86
17	Tetracosano	34.545	860	2700	-	0.46
18	Esqualeno	36.371	916	2829	2829	13.27
19	α -tocoferol	40.412	950	3134	3130	28.03
20	γ -sitosterol	42.952	887	3308	-	19.81

TR: Tempo de Retenção; IKe: Índice de Kovats experimental; IKI: índice de Kovats literatura; (-) ausência de valores.

4.4.2.3 Caracterização química da fração hexânica da espécie *M. neuwiedeana*

Na análise da fração hexânica da espécie *M. neuwiedeana* por GC/MS foram identificados 12 compostos (Tabela 12). Dentre eles, 5 triterpenos foram identificados como constituintes majoritários: lupeol, β -amirina, 9,19-ciclolanost-7-en-3-ol, α -amirina e lanosterol, representando 93,87% da composição dessa fração.

Tabela 12 – Composição química da fração hexânica da *M. neuwiedeana*.

	Composto	TR	Match	IKe	IKI	Área (%)
1	β -elemeno	9,823	897	1393	1393	-
2	β -cariofileno	10.449	957	1420	1420	0.94
3	α -cariofileno	11,231	905	1454	1454	-
4	Hexadecanoato de metila	21,515	911	1928	1927	-
5	Estearato de metila	25,312	908	2129	2128	-
6	α -tocoferol	40.387	876	3132	3130	0.48
7	γ -sitosterol	42.971	778	3308	-	2.26
8	β -amirina	43.427	890	3336	-	21.01
9	Lupeol	44.170	804	3375	-	12.11
10	9,19-ciclolanost-7-en-3-ol	44.590	820	3345	-	13.41
11	α -amirina	44.197	853	3381	-	33.22
12	Lanosterol	44.384	819	3392	-	14.12

TR: Tempo de Retenção; IKe: Índice de Kovats experimental; IKI: índice de Kovats literatura; (-) ausência de valores.

Os triterpenos pentacíclicos α -amirina e β -amirina, detectados na fração hexânica de *M. neuwiedeana*, foram isolados na fração acetato de etila desta espécie. O procedimento descrito nas páginas 39 a 42 levou ao isolamento e identificação desses compostos e a caracterização encontra-se descrita a seguir.

4.4.2.3.1 MNAc-01: α -amirina

A substância MNAc-01 foi submetida ao teste de Liebermann-Burchard, que exibiu coloração rósea-violácea sugerindo natureza triterpênica do composto.

Os espectros RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância MNAc-01 apresentaram sinais característicos de um triterpeno.

O espectro RMN ^1H (Figura 35) revelou a presença de uma série de sinais entre δ 0,74 – 1,98 ppm (s) atribuídos à sobreposição de prótons metílicos típicos de triterpenos. O multiplete observado entre δ 1,94 – 1,89 ppm (m) corresponde aos hidrogênios do carbono C11; o tripleto observado em δ 5,13 ppm (t, $J_{\text{H}12} = 3,6$ Hz) se refere aos hidrogênios ligados ao carbono olefínico C12 e o duplo-duplete em δ 3,22 ppm (dd, $J_{\text{H}3} = 10,9$ e $5,1$ Hz) se refere ao próton oximetina do carbono C3.

O espectro RMN DEPT 135 (Figura 36) revelou a presença de 14 carbonos metílicos e metínicos e 9 metilênicos.

O espectro RMN ^{13}C (Figura 37) confirmou a natureza triterpênica da substância MN-01, onde foram observados 30 sinais de deslocamento bem definidos. Dentre eles, foi observado um sinal em δ 79,0 ppm referente ao carbono oximetínico C3 e sinais em δ 124,4 ppm e δ 139,5 ppm referentes aos carbonos olefínicos C12 e C13, respectivamente.

A correlação entre os deslocamentos dos prótons ^1H e os deslocamentos químicos ^{13}C , via acoplamento J_{CH} , podem ser observados no espectro HSQC ^{13}C - ^1H (Figura 38).

A comparação dos deslocamentos químicos obtidos no RMN ^1H e RMN ^{13}C com os dados da literatura (Tabela 13) permitiu identificar a substância MNAc-01 como sendo o triterpeno pentacíclico α -amirina (Figura 39).

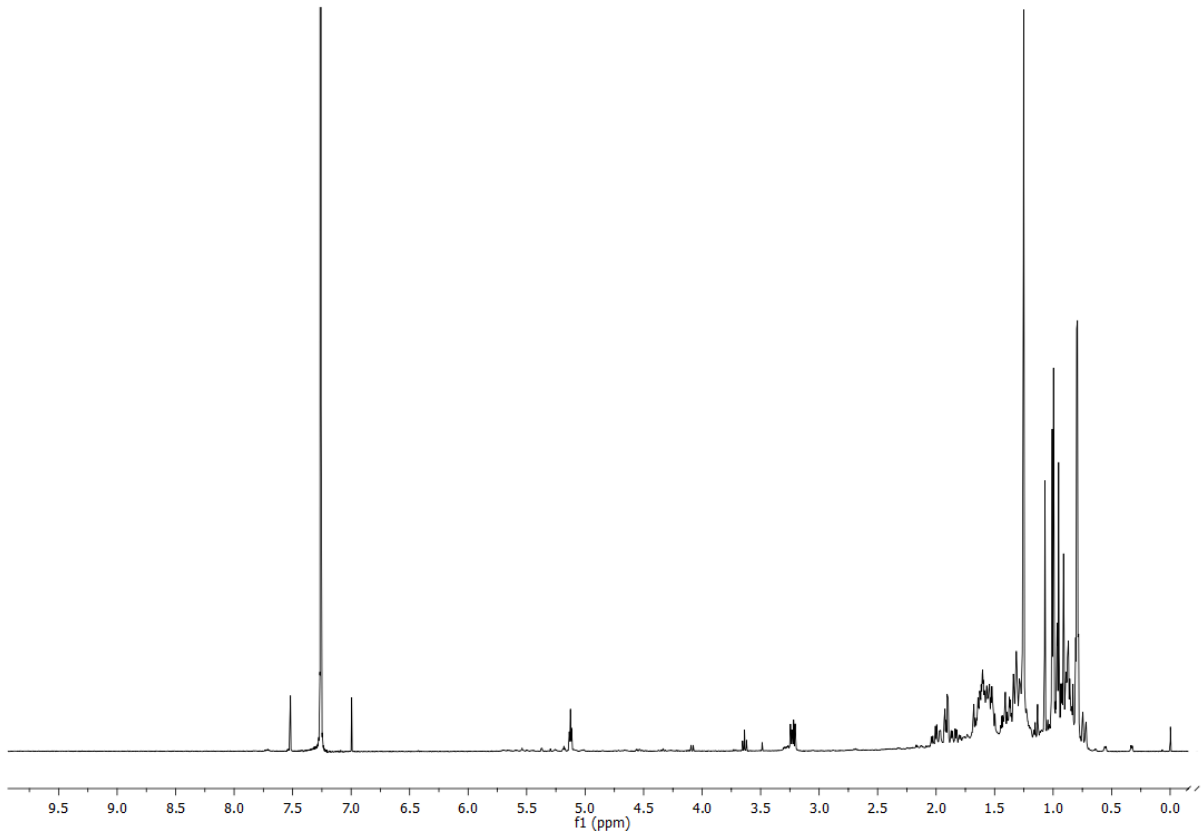


Figura 35 – Espectro RMN ^1H da substância MNAc-01 (CDCl_3 , 400 MHz).

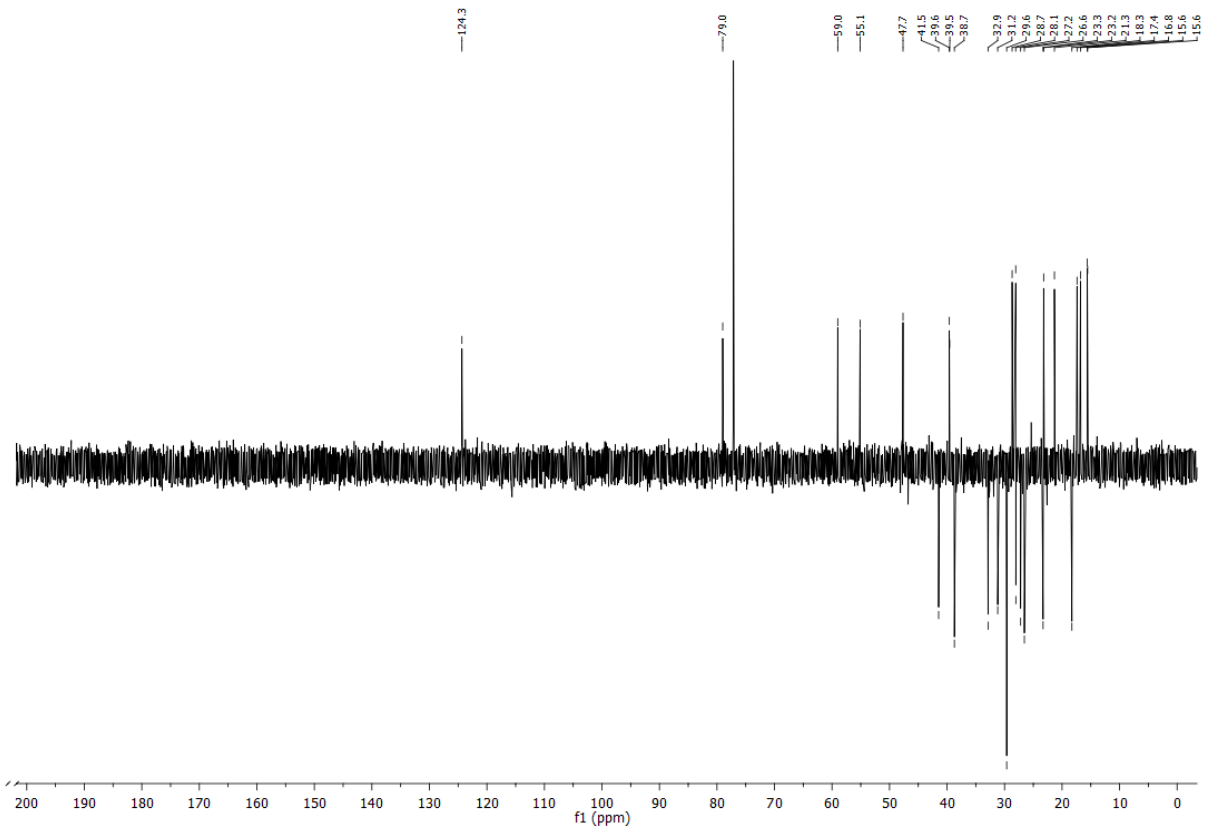


Figura 36 – Espectro RMN DEPT 135 da substância MNAc-01 (CDCl_3 , 100 MHz).

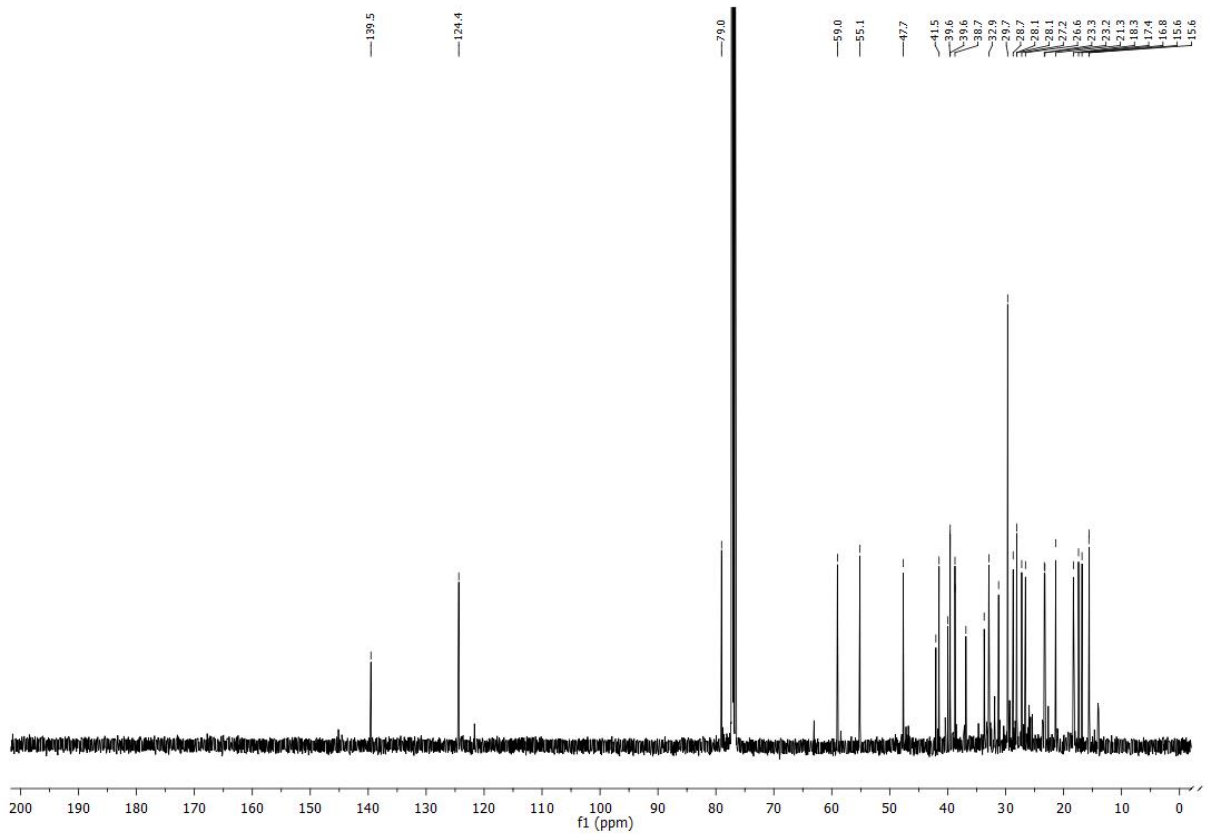


Figura 37 – Espectro RMN ^{13}C da substância MNAc-01 (CDCl_3 , 100 MHz).

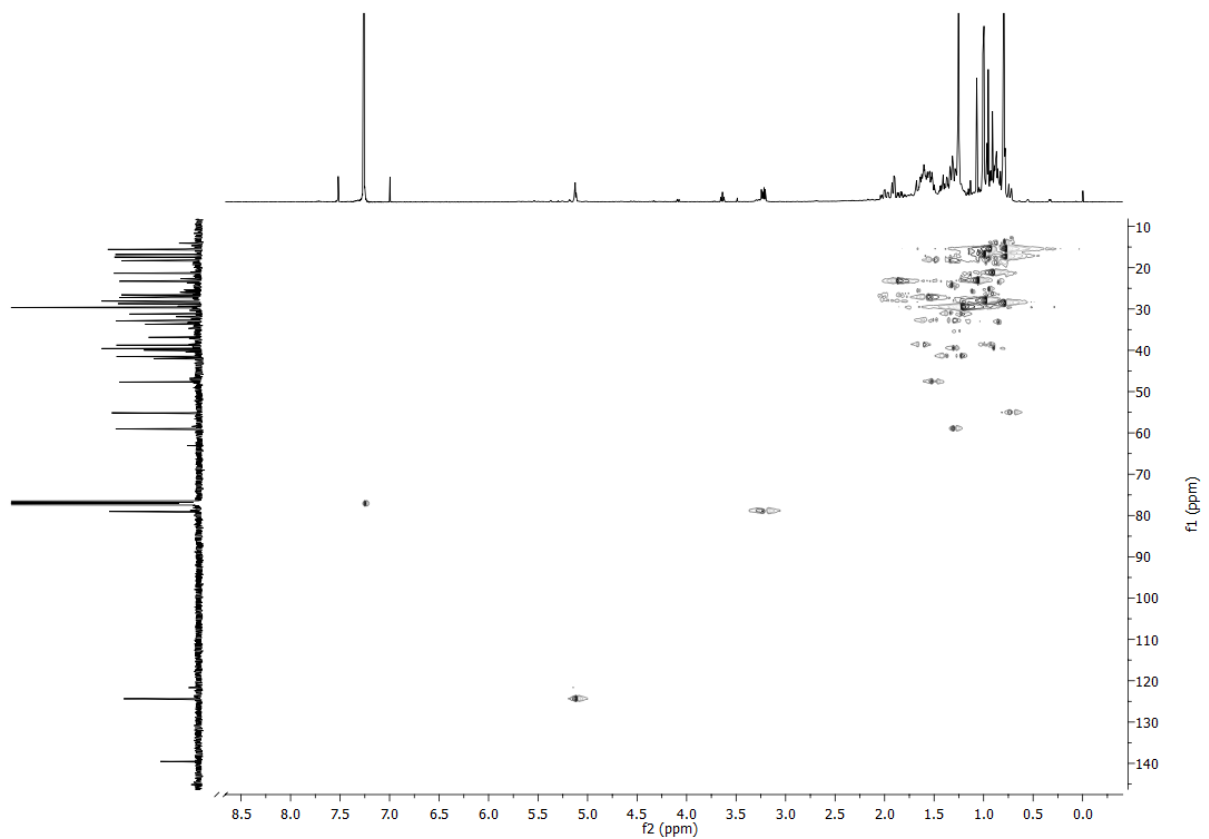


Figura 38– Espectro de RMN HSQC ^{13}C - ^1H da substância MNAc-01.

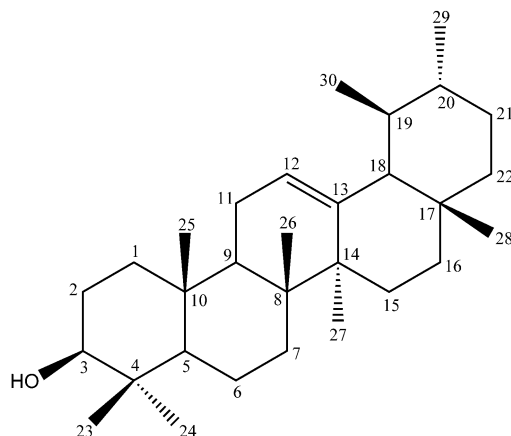


Figura 39 – Estrutura química da substância MNAc-01 (α -amirina).

Tabela 13 – Comparação entre os deslocamentos químicos de MNAc-01, em RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), e da α -amirina (CDCl_3).

(continua)		
C	δC (ppm) MNAc-01	δC (ppm) literatura **
1	38,8	38,7
2	27,2	27,2
3	79,0	78,3
4	38,7	38,7
5	55,1	55,2
6	18,3	18,3
7	32,9	32,9
8	40,0	40,0
9	47,7	47,7
10	36,9	36,9
11	23,2	23,3
12	124,4	124,3
13	139,5	139,3
14	42,0	42,0
15	28,7	28,7
16	26,6	26,6
17	33,7	33,7
18	59,0	58,9
19	39,6	39,6
20	39,6	39,6

Tabela 13 – Comparação entre os deslocamentos químicos de MNAc-01, em RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), e da α -amirina (CDCl_3).

(continuação)		
C	δC (ppm) MNAc-01	δC (ppm) literatura **
21	31,2	31,2
22	41,5	41,5
23	28,1	28,1
24	15,6	15,6
25	15,6	15,6
26	16,8	16,8
27	23,3	23,3
28	28,1	28,1
29	17,4	17,4
30	21,4	21,3

* Simpletos na região entre 1,92 – 0,74 ppm; ** Dados de MAHATO; KUNDU, 1994; δ = deslocamento químico.

4.4.2.3.2 MNAc-02: mistura de α - e β -amirina

A substância MNAc-02 foi submetida ao teste de Liebermann-Burchard, que exibiu coloração rósea-violácea sugerindo natureza triterpênica do composto.

Os espectros RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância MNAc-02 demonstraram sinais característicos de uma mistura de triterpenos.

Foram observados no espectro RMN ^1H (Figura 40) uma série de sinais entre δ 0,80 – 2,00 ppm (s) atribuídos à sobreposição de prótons metílicos típicos de triterpenos; o tripleto em δ 5,18 ppm (t, $J_{\text{H}12} = 3,6$ Hz) referente aos hidrogênios ligados ao carbono olefínico C12 e o duplo-duplete em δ 3,24 ppm (dd, $J_{\text{H}3} = 10,9$ e 5,1 Hz) referente ao próton oximetina do carbono C3.

O espectro RMN DEPT 135 (Figura 41) revelou a presença de 26 carbonos metílicos e metínicos e 18 metilênicos,

O espectro RMN ^{13}C (Figura 42) apresentou 60 sinais bem definidos. Dentre eles, foram observados 30 sinais com os deslocamentos químicos compatíveis ao da α -amirina, com os sinais clássicos em δ 78,9 ppm referente ao carbono oximetínico C3 e sinais em δ 124,3 ppm e δ 139,4 ppm referentes aos carbonos olefínicos C12 e C13,

respectivamente. Além disso, apresentou 30 sinais compatíveis com a β -amirina, com picos de absorção em δ 78,9 ppm referente ao carbono oximetínico C3 e sinais em δ 121,6 ppm e δ 145,0 ppm referentes aos carbonos olefínicos C12 e C13, respectivamente. Algumas características auxiliam na diferenciação dos dois triterpenos: na α -amirina, os carbonos metílicos característicos da série urseno com C30 (δ 21,4 ppm) e C29 (δ 14,4) ligados ao C19 (δ 39,6 ppm) e C20 (δ 39,6 ppm) respectivamente, se diferenciam da β -amirina nos carbonos característicos da série oleaneno com C30 (δ 23,2 ppm) e C29 (δ 33,2 ppm) ligados ao C20 (δ 30,9 ppm) (ZANON et al., 2008). Os diferentes deslocamentos químicos descritos acima são classicamente utilizados para diferenciação dos triterpenos α -amirina e β -amirina quando em misturas.

A comparação dos deslocamentos químicos obtidos no RMN ^1H e RMN ^{13}C com os dados da literatura (Tabela 14) permitiu identificar a substância MNAc-02 como sendo uma mistura dos triterpenos pentacíclicos α -amirina e β -amirina (Figura 43).

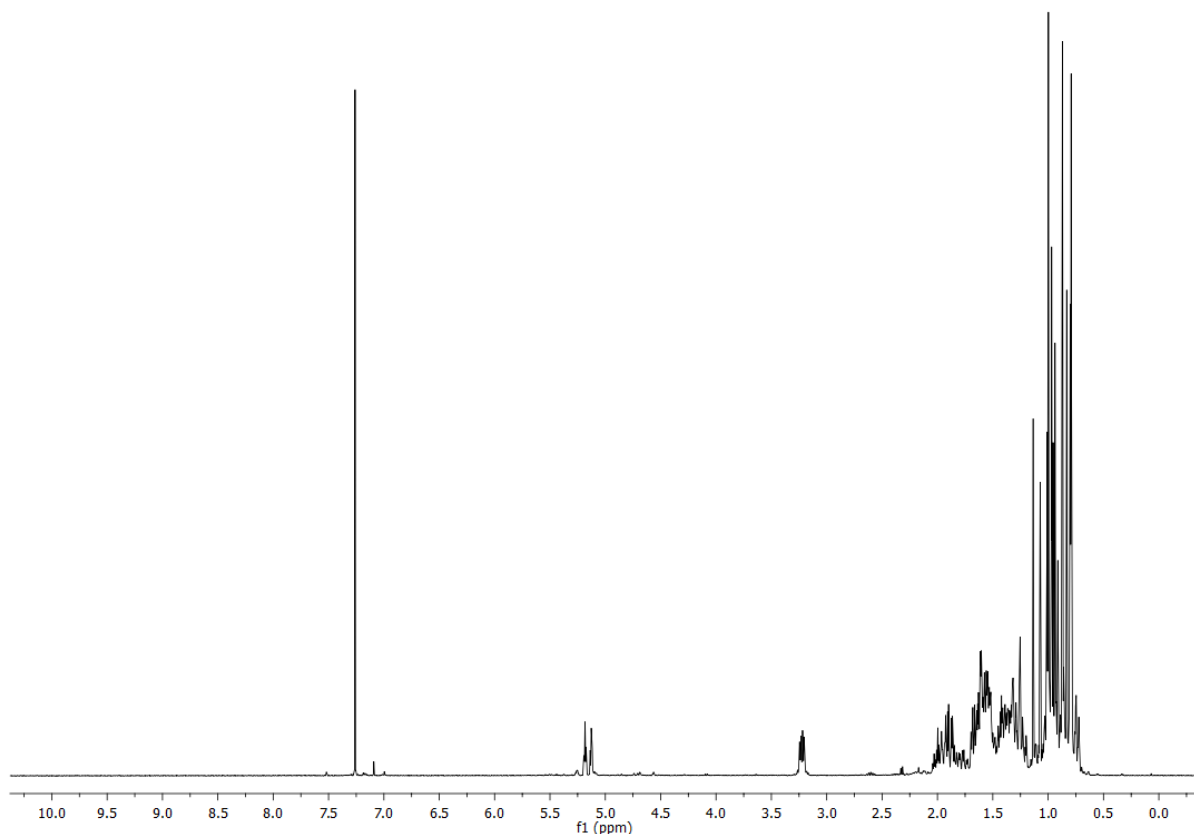


Figura 40 – Espectro RMN ^1H da substância MNAc-02 (CDCl_3 , 400 MHz).

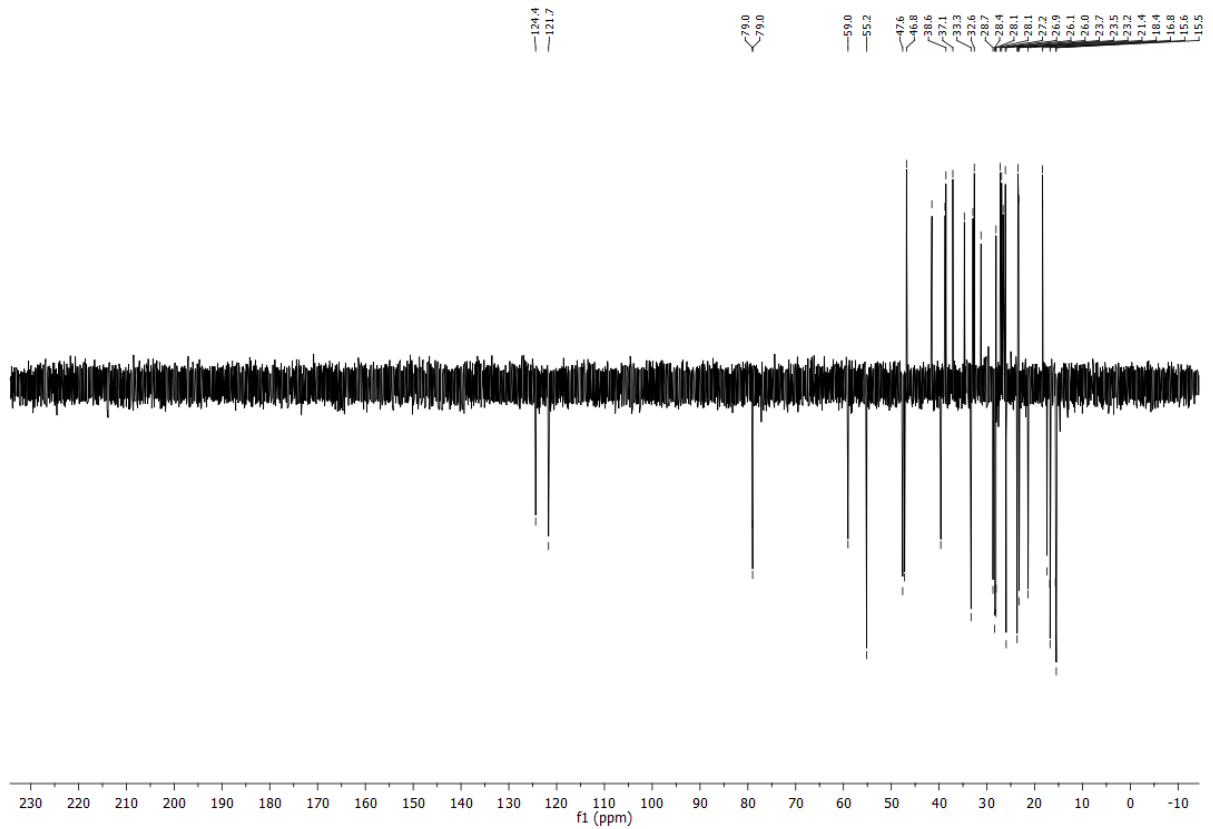


Figura 41 – Espectro RMN DEPT 135 da substância MNAc-02 (CDCl₃, 100 MHz).

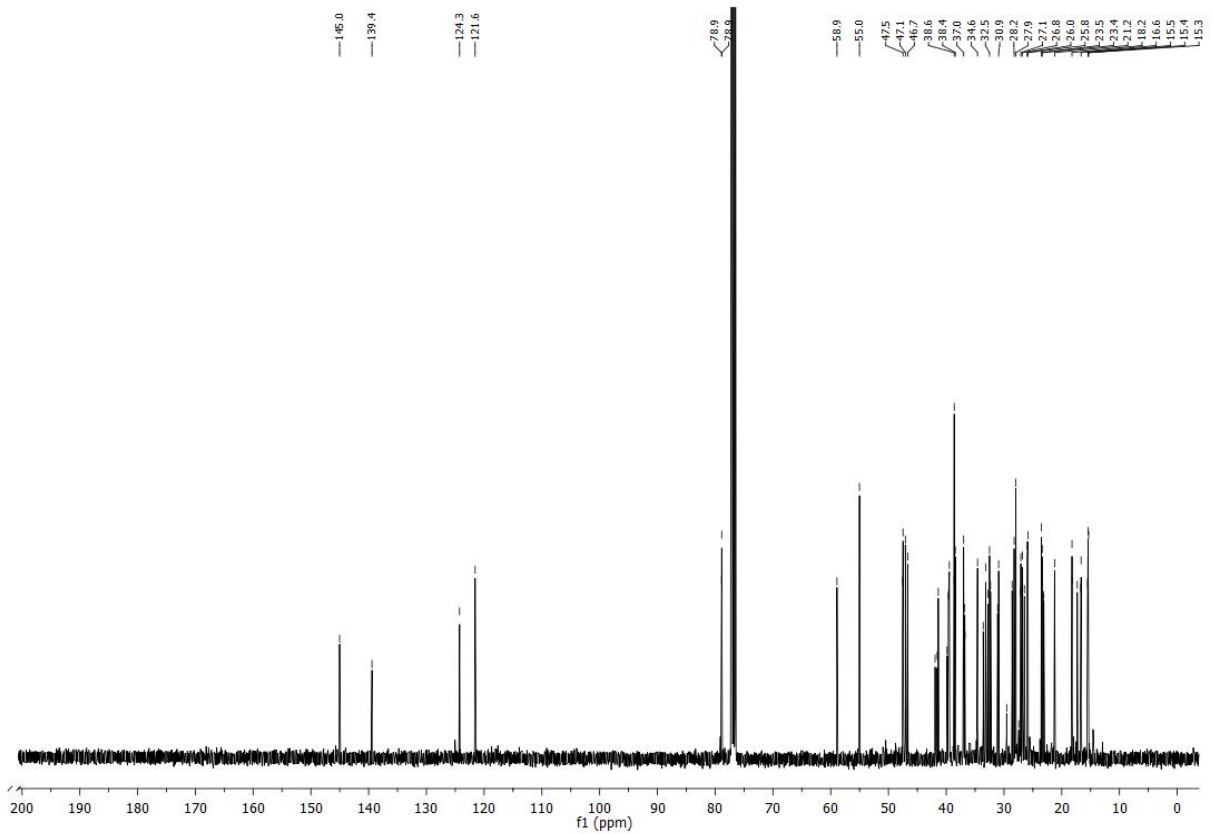


Figura 42 – Espectro RMN ¹³C da substância MNAc-02 (CDCl₃, 100 MHz).

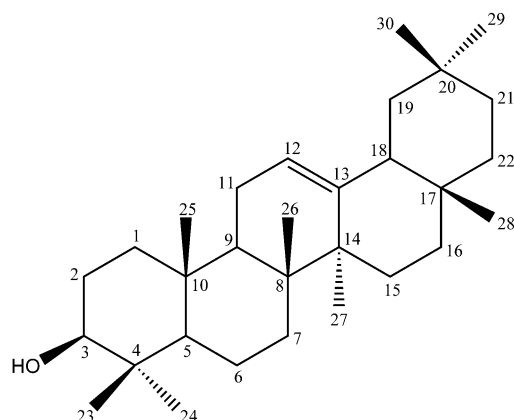


Figura 43 – Estrutura química da substância MNAc-02 (β -amirina).

Tabela 14 – Comparação entre os deslocamentos químicos de MNAc-02, em RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), e da β -amirina (CDCl_3).

(continua)

C	δC (ppm) MNAc-02	δC (ppm) literatura**
1	38,4	38,7
2	27,4	27,3
3	78,9	79,0
4	39,6	38,8
5	55,0	55,3
6	18,2	18,5
7	32,5	32,8
8	39,6	38,8
9	47,7	47,7
10	36,8	37,6
11	23,1	23,6
12	121,6	121,8
13	145,0	145,1
14	41,6	41,8
15	25,8	26,2
16	26,8	27,0
17	32,3	32,5
18	47,1	47,4
19	46,7	46,9
20	30,9	31,1

Tabela 14 – Comparação entre os deslocamentos químicos de MNAc-02, em RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), e da β -amirina (CDCl_3).

(continuação)		
C	δC (ppm) MNAc-02	δC (ppm) literatura**
21	34,6	34,8
22	36,7	37,2
23	27,1	28,2
24	15,3	15,5
25	15,4	15,6
26	16,7	16,9
27	26,0	26,0
28	27,9	28,4
29	33,2	33,3
30	23,2	23,7

* Simpletos na região de 0,8 – 2,0 ppm; ** Dados de MAHATO; KUNDU, 1994; δ = deslocamento químico.

Triterpenos pentacíclicos podem ser encontrados em diferentes espécies do gênero *Myrcia*. Entretanto, este é o primeiro relato de identificação e isolamento desses compostos na espécie *M. neuwiedeana*.

4.4.2.4 Caracterização química da fração hexânica da espécie *M. neobrasiliensis*

Na análise da fração hexânicas de *M. neobrasiliensis*, foram identificadas 19 substâncias (Tabela 15).

Pôde-se constatar que 39,95% da composição foi de triterpenos, cerca de 1,77% de sesquitepenos, aproximadamente 6,74% de ácidos graxos e quase 10% de α -tocoferol. A variedade de triterpenos apresentada foi semelhante à das outras espécies estudadas, com o lupeol como composto majoritário, como observado nas espécies *M. tenella* e *M. neuwiedeana*, e presença expressiva de α -tocoferol, como observado na análise da espécie *M. splendens*.

Tabela 15 – Composição química da fração hexânica da *M. neobrasiliensis*.

	Composto	TR	Match	IKe	IKI	Área (%)
1	β -cariofileno	10.436	951	1420	1420	0.58
2	α -cariofileno	11.218	925	1453	1453	-
3	β -selineno	11.975	923	1486	1486	0.61
4	γ -cadineno	12.181	900	1495	1495	0.58
5	Óxido cariofileno	14.177	817	1582	1582	
6	Hexadecanoato de metila	21.502	928	1927	1927	1.38
7	1-eicosanol	24.48	872	2083	-	-
8	Linoleato de metila	24.68	910	2094	2094	0.68
9	Linolenato de metila	24.799	830	2100	2100	1.77
10	Fitol	25.011	902	2112	2111	2.91
11	Estearato de metila	25.299	866	2128	2128	-
12	Esqualeno	36.359	920	2828	2829	4.85
13	γ -tocoferol	39.317	896	3050	3076	0.93
14	α -tocoferol	40.387	943	3132	3130	9.68
15	Epieudesmina	42.145	812	3256	-	18.85
16	γ -sitosterol	42.946	886	3308	-	14.48
17	β -amirina	43.358	862	3332	-	3.5
18	Lup-20(29)-en-3-one	43.771	802	3356	-	1.34
19	Lupeol	44.178	880	3380	-	35.08

TR: Tempo de Retenção; IKe: Índice de Kovats experimental; IKI: índice de Kovats literatura; (-) ausência de valores.

Não foi possível encontrar estudos relatando a composição triterpênica de *M. neobrasiliensis*. Contudo, os triterpenos β -amirina, lupeol, lupenona e ácido betulínico, e o esteroide sitosterol foram isolados anteriormente na espécie *Myrcia rotundifolia* (CERQUEIRA, 2002).

4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.5.1 Triagem de atividade antioxidante

Inicialmente foi realizada a triagem antioxidante dos extratos brutos MT, MS, MN e MNB. Nesta testagem foi possível observar que os extratos brutos das quatro espécies foram ativos nos ensaios realizados. Portanto, devido a atividade biológica detectada, as frações hexânicas, diclorometanólica, acetato de etila e aquosas também foram submetidas aos ensaios utilizando os radicais sintéticos ABTS e DPPH.

Como pode ser observado na Tabela 16, as frações mais polares, com destaque para as frações acetato de etila e aquosas, de todas as espécies apresentaram expressivas atividades antioxidantes, frente a ambos os radicais testados, quando comparados com os resultados expressos pelos padrões.

As frações acetato de etila das espécies *M. splendens* e *M. neobrasiliensis* foram mais ativas que os padrões Trolox, Quercetina e Rutina, além de expressarem atividade antioxidante equivalente ao Ácido gálico. Entretanto, foi possível observar atividade em todas as amostras analisadas, como descritos na Tabela 16.

Ao analisar os resultados obtidos na quantificação de metabólitos secundários, é possível concluir que as frações que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides foram justamente as que se apresentaram mais ativas nos ensaios antioxidantes. Portanto, estes resultados estão em concordância com resultados obtidos em estudos realizados anteriormente com espécies do gênero *Myrcia*, onde já foram descritos um grande número de flavonoides glicosilados e taninos que possuem este tipo de atividade biológica (MORESCO et al., 2014).

Tabela 16 – Triagem antioxidante dos extratos brutos e suas frações utilizando os radicais ABTS e DPPH.

Espécie	Extratos e frações	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
		ABTS	DPPH
<i>M. tenella</i>	Extrato bruto (MT)	6,26 ± 0,53 ^{a,b,d}	12,55 ± 0,84 ^{a,b,c,d}
	Hexânica (MTH)	ND	ND
	Diclorometanólica (MTD)	ND	ND
	Acetato de etila (MTAc)	1,98 ± 0,35 ^{c,d}	8,43 ± 1,51 ^{a,c,d}
	Aquosa (MTAq)	1,82 ± 0,11 ^{c,d}	7,26 ± 0,32 ^{a,c,d}
<i>M. splendens</i>	Extrato bruto (MS)	1,52 ± 0,21 ^d	6,48 ± 0,14 ^{a,b,c,d}
	Hexânica (MSH)	14,56 ± 0,72 ^{a,b,c,d}	49,66 ± 2,27 ^{a,b,c,d}
	Diclorometanólica (MSD)	11,59 ± 0,57 ^{a,b,c,d}	42,85 ± 1,01 ^{a,b,c,d}
	Acetato de etila (MSAc)	0,43 ± 0,06 ^{a,b,c}	1,59 ± 0,04 ^{a,b}
	Aquosa (MSAq)	1,64 ± 0,11 ^{c,d}	1,62 ± 1,08 ^{a,b}
<i>M. neuwiedeana</i>	Extrato bruto (MN)	5,45 ± 0,86 ^{a,b,d}	11,63 ± 0,74 ^{a,b,c,d}
	Hexânica (MNH)	ND	ND
	Diclorometanólica (MND)	37,60 ± 1,41 ^{a,b,c,d}	57,14 ± 4,14 ^{a,b,c,d}
	Acetato de etila (MNAc)	1,65 ± 0,49 ^{c,d}	2,74 ± 0,32 ^{a,b,d}
	Aquosa (MNAq)	1,27 ± 0,15 ^{c,d}	4,00 ± 0,11 ^{b,c,d}
<i>M. neobrasiliensis</i>	Extrato bruto (MNB)	7,09 ± 0,76 ^{a,b,c,d}	6,33 ± 0,17 ^{a,b,c,d}
	Hexânica (MNBH)	32,09 ± 1,65 ^{a,b,c,d}	72,69 ± 0,99 ^{a,b,c,d}
	Diclorometanólica (MNBD)	1,63 ± 0,29 ^{c,d}	39,12 ± 0,64 ^{a,b,c,d}
	Acetato de etila (MNBAC)	0,42 ± 0,09 ^{a,b,c}	3,71 ± 0,19 ^{b,d}
	Aquosa (MNBAq)	1,02 ± 0,06 ^{c,d}	5,50 ± 0,07 ^{b,c,d}
Padrões	Trolox	1,63 ± 0,55	4,60 ± 1,30
	Rutina	1,84 ± 0,55	8,64 ± 0,40
	Quercetina	5,17 ± 0,23	2,62 ± 0,09
	Ácido gálico	0,31 ± 0,02	1,34 ± 0,05

(-) ausência de atividade. ND: não determinado; ^a p < 0,05 comparado ao Trolox, ^b p < 0,05 comparado a Rutina, ^c p < 0,05 comparado a Quercetina e ^d p < 0,05 comparado ao Ácido gálico (ANOVA de uma via com *post test* de Tukey). Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3).

Por meio da análise das amostras por ESI(-)FT-ICR MS, foi possível identificar a presença de ácido gálico, galato de metila, quercetina, quercitrina e quercitrina-O-glicosídeo, além de outros flavonoides e compostos fenólicos, em quase todos os extratos brutos e frações acetato de etila. Como pode ser observado na Tabela 16, algumas dessas substâncias foram utilizadas como padrões e apresentaram resultados muito semelhantes ao das amostras. Com base nesses dados, podemos justificar parte da atividade antioxidante expressa por esses extratos e frações.

Além disso, frações menos polares como as frações hexânicas de *M. splendens* e *M. neobrasiliensis* também expressaram atividade frente aos radicais. Ao serem analisadas por GC/MS foi possível identificar a presença do α -tocoferol em ambas amostras, estando em maior concentração na *M. splendens*. Por se tratar de uma substância com poder antioxidante já bem documentado na literatura, podemos inferir que a atividade observada pode ter tido contribuição direta deste composto.

Outra substância que pode ter contribuído com o resultado obtido com a fração hexânica de *M. neobrasiliensis* foi o triterpeno pentacíclico lupeol, que pode ter atuado sinergicamente com o α -tocoferol promovendo a atividade antioxidante observada. Em um estudo utilizando o lupeol isolado de folhas de *Andrographis echinoides* foi observado que a atividade antioxidante expressa por este triterpeno foi semelhante ao do padrão utilizado no ensaio utilizando o radical DPPH. O padrão de ácido ascórbico apresentou IC₅₀ igual a 47,4 μ g/mL e o lupeol 44,3 μ g/mL. Além de atuar como antioxidante, o composto foi capaz de inibir as enzimas α -amilase e α -glicosidase (GURUPRIYA et al., 2018).

Com base nesses resultados podemos afirmar que todas as espécies estudadas apresentaram grande diversidade química e expressivos resultados referentes a atividade antioxidante *in vitro* frente a radicais sintéticos, tornando-se, portanto, promissoras fontes de compostos capazes de atuar sobre radicais livres.

Em estudos anteriores, o extrato etanólico das folhas de *M. tenella* já demonstrou atividade antioxidante *in vitro* frente ao radical DPPH e esta atividade foi associada a presença de rutina como composto majoritário (RIBEIRO et al., 2019). Além disso, um estudo realizado com os frutos dessa espécie mostrou que a geleia, suco e bebida fermentada obtidos desses frutos também foram capazes de atuar frente a este radical

(RYBKA et al., 2018). Outras espécies, do mesmo gênero, que também apresentaram atividade antioxidante foram a *M cauliflora* (WANG et al., 2014), e a *M. dubia* (fruto camu-camu), que se mostrou mais ativa do que as chamadas “superfrutas”, como as blueberries, no ensaio com o ABTS. A atividade apresentada foi associada, pelos autores, à presença de carotenoides, vitamina C e compostos fenólicos, como ácido elágico, quercetina, rutina e catequinas, nos frutos dessa espécie (AKTER et al., 2011). Um estudo realizado por Myoda e colaboradores (2010) explorou a atividade antioxidante das sementes do fruto camu-camu sobre o radical DPPH, onde foi observado que os extratos metanólicos 25% - 75% ($IC_{50} = 12,8 \pm 0,7$ a $20,7 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$) apresentaram atividades superiores à do ácido ascórbico ($IC_{50} = 21,4 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$). Além disso, no mesmo estudo foi observado que o conteúdo fenólico das sementes estava altamente correlacionado com a atividade apresentada ($r = 0,97$). Chirinos e colaboradores (2010) demonstraram que a vitamina C contribui com cerca de 70% para a capacidade antioxidante total das frutas camu-camu nas condições empregadas pelo estudo.

O ácido elágico e a quercetina foram compostos detectados nas amostras de *M. tenella* pela análise por ESI(-)FT-ICR MS, justificando assim os resultados biológicos observados.

A espécie *M. splendens* mostrou-se a mais ativa nos ensaios antioxidantes. Os resultados obtidos foram consistentes com outros estudos que já avaliaram o potencial antioxidante das folhas dessa espécie. O extrato metanólico, aquoso, butanólico e acetado de etila das folhas de *M. splendens* exibiram excelente propriedade antioxidante, com resultados próximos aos dos padrões utilizados. Os resultados obtidos também foram associados, pelos autores, à presença de compostos fenólicos e flavonoides glicosilados (MORESCO et al., 2014; PONTES et al., 2019). Em um estudo onde foi avaliada a atividade antioxidante de 23 espécies, o extrato de *M. splendens* estava entre as quatro espécies que demonstraram as melhores atividades frente ao radical DPPH, com o resultado muito próximo ao expresso pelo padrão (SCIO et al., 2012). Ou seja, a atividade antioxidante observada no estudo da espécie *M. splendens* vem ao encontro dos dados obtidos na literatura.

Por se tratar de um estudo com extratos de plantas, e não compostos isolados, os resultados podem variar entre as espécies mesmo que estas apresentem compostos

em comum. Os compostos presentes nos extratos podem atuar sinergicamente ou não para com as atividades apresentadas. Portanto, podemos inferir que a diferença entre as atividades biológicas apresentadas pelas quatro espécies, e entre suas frações, se dá pela diferença na variedade de compostos com essas propriedades que cada uma apresenta, bem como a concentração destes em cada fração analisada.

4.5.2 Triagem de inibição da α -amilase

Os extratos brutos e suas frações foram avaliados quanto a capacidade de inibir a atividade da enzima α -amilase e os resultados encontram-se dispostos na Tabela 17.

Os extratos brutos mais ativos foram o de *M. neuwiedeana* e *M. neobrasiliensis*. Na maior concentração testada, o extrato de *M. neuwiedeana* apresentou capacidade de inibir a enzima muito semelhante a apresentada pelo padrão de Acarbose e o extrato de *M. neobrasiliensis* atuou de forma semelhante ao padrão Quercetina. Em ambos foi possível detectar a presença de compostos com esse potencial, como a própria quercetina, a quercitrina, a miricitrina, a miricetina, alguns derivados destes compostos, como a miricitrina-O-galato e quercitrina-O-galato, o glicosídeo de vitexina, além de alguns ácidos fenólicos.

Em relação a frações hexânicas e diclorometanólicas, não foi possível detectar atividade inibitória nas condições do estudo. Por outro lado, as frações aquosas foram as mais ativas no ensaio realizado e todas as frações acetato de etila de espécies de *Myrcia* foram capazes de exercer esse tipo de atividade biológica.

Apesar de o extrato bruto de *M. tenella* se mostrar ativo na análise com a enzima α -amilase, a fração acetato de etila não apresentou resultado satisfatório. Isso pode ser atribuído a identificação majoritária de ácidos triterpênicos nessa fração, quando comparada ao extrato bruto, que podem ter contribuído para uma menor expressão da atividade. Essa afirmação se sustenta quando observamos a composição química da fração hexânica MTH (Tabela 10, pág. 75) que se apresentou majoritariamente composta por triterpenos e não foi capaz de atuar como antioxidante nem como inibidor das enzimas nas condições estabelecidas por este estudo.

Tabela 17 – Inibição da α -amilase promovida pelas quatro espécies estudadas.

Espécie	Extratos e frações	% inibição [1000 $\mu\text{g/mL}$]	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
<i>M. tenella</i>	Extrato bruto (MT)	54,59 \pm 8,74	ND
	Hexânica (MTH)	18,31 \pm 3,64	ND
	Diclorometanólica (MTD)	16,22 \pm 2,52	ND
	Acetato de etila (MTAc)	25,07 \pm 4,47	ND
	Aquosa (MTAq)	86,48 \pm 0,49	69,38 \pm 9,90 ^{a,b}
<i>M. splendens</i>	Extrato bruto (MS)	50,31 \pm 5,92	ND
	Hexânica (MSH)	15,70 \pm 6,02	ND
	Diclorometanólica (MSD)	5,95 \pm 4,38	ND
	Acetato de etila (MSAc)	84,04 \pm 3,35	248,00 \pm 13,50 ^{a,b}
	Aquosa (MSAq)	84,98 \pm 0,44	1,61 \pm 0,12 ^b
<i>M. neuwiedeana</i>	Extrato bruto (MN)	92,20 \pm 0,46	39,18 \pm 2,7 ^{a,b}
	Hexânica (MNH)	14,72 \pm 2,85	ND
	Diclorometanólica (MND)	-	ND
	Acetato de etila (MNAc)	78,65 \pm 2,39	208,13 \pm 13,30 ^{a,b}
	Aquosa (MNAq)	97,18 \pm 0,44	5,74 \pm 0,79 ^{a,b}
<i>M. neobrasiliensis</i>	Extrato bruto (MNB)	70,36 \pm 1,86	161,3 \pm 4,05 ^{a,b}
	Hexânica (MNBH)	-	ND
	Diclorometanólica (MNBD)	-	ND
	Acetato de etila (MNBAc)	64,14 \pm 2,27	402,10 \pm 5,13 ^{a,b}
	Aquosa (MNBAq)	94,39 \pm 0,70	18,63 \pm 4,40 ^{a,b}
Padrões	Acarbose	95,05 \pm 1,99	1,41 \pm 0,26
	Rutina	-	ND
	Quercetina	75,23 \pm 5,61	432,37 \pm 6,37
	Ácido gálico	35,57 \pm 3,77	ND

(-) ausência de atividade; ND: não determinado; ^a $p < 0,05$ comparado a Acarbose e ^b $p < 0,05$ comparado a Quercetina (ANOVA de uma via com *post test* de Tukey). Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=3).

As espécies *M. splendens* e *M. neobrasilienses* apresentaram os melhores resultados, quando comparados com os resultados expressos pelas outras espécies, principalmente por parte de suas frações aquosas. A fração MNBAq exibiu uma

atividade de inibição significativa e a fração MSAq apresentou um valor de IC₅₀ estatisticamente semelhante ao padrão Acarbose.

Quando todos os resultados apresentados pela espécie *M. neuwiedeana* são analisados mais detalhadamente é possível observar que esta espécie apresentou resultados mais expressivos em relação as demais espécies, tanto no ensaio antioxidante quanto na avaliação com a enzima α -amilase, indicando ser uma grande fonte de compostos bioativos. Os melhores resultados nesse ensaio foram expressos por esta espécie, que obteve IC₅₀ de $39,18 \pm 2,7$ $\mu\text{g/mL}$ pelo extrato MN, $208,13 \pm 13,30$ $\mu\text{g/mL}$ pela fração MNAc e $5,74 \pm 0,79$ $\mu\text{g/mL}$ pela fração MNAq, o que chama a atenção para a bioatividade desta espécie.

Algumas espécies da família Myrtaceae foram estudadas e também apresentaram capacidade de inibir a enzima α -amilase. O extrato etanólico das folhas de *Psidium guajava* L. inibiu 31,70% na concentração de 1,5 mg/mL (acarbose inibiu 52.1% na mesma concentração) e o extrato clorofórmico das folhas de *Syzygium cumini* (L.) inibiu 22,31% na concentração de 10 mg/mL (acarbose inibiu 50 % na concentração de 1,22 mg/mL) (SALES et al., 2012). Com base na literatura, é possível afirmar que as espécies estudadas, principalmente a *M. splendens*, *M. neuwiedeana* e a *M. neobrasiliensis*, apresentaram capacidade de inibir esta enzima e são foram proporcionalmente mais ativas que algumas espécies relatadas como inibidoras da enzima α -amilase. Portanto, estas espécies se tratam de promissoras fontes de compostos com capacidade de inibir a atividade da enzima α -amilase e apresentam grande potencial farmacológico, principalmente as frações mais polares.

4.5.3 Triagem de inibição da α -glicosidase

Devido os expressivos resultados obtidos no ensaio utilizando a enzima α -amilase, os extratos metanólicos brutos das quatro espécies, MT, MS, MN e MNB, também foram avaliados quanto a capacidade de inibir a atividade da enzima α -glicosidase.

Inicialmente, os extratos e o padrão acarbose foram testados à uma concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, onde foi possível observar que todos os extratos foram capazes de inibir a atividade da enzima α -glicosidase em mais de 70% (Figura 44). Os extratos apresentaram resultados estatisticamente diferentes do padrão, apresentando resultados superiores ao expresso pela acarbose.

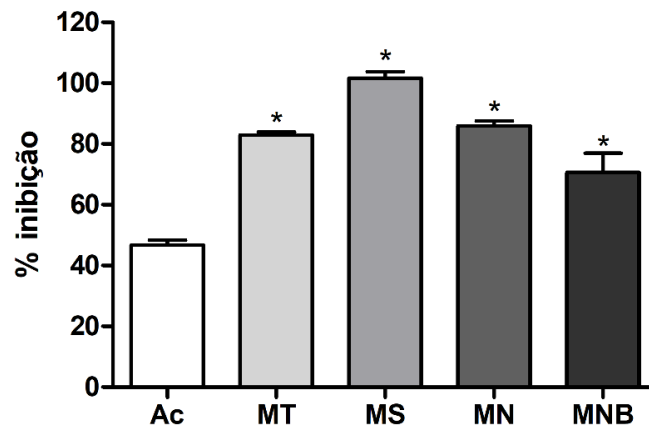


Figura 44 – Inibição da α -glicosidase pelos extratos brutos e padrão acarbose. Ac: Acarbose; MT: Extrato bruto de *M. tenella*; MS: Extrato bruto de *M. splendens*; MN: Extrato bruto de *M. neuwiedeana*; MNB: Extrato bruto de *M. neobrasiliensis*; * $p < 0,05$ comparado com o padrão Ac (ANOVA de uma via com *post test* de Tukey). Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=3$).

O extrato bruto de *M. splendens* foi o mais ativo nas condições de análise ($IC_{50} = 2,96 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$), os extratos de *M. tenella* e *M. neuwiedeana* apresentaram resultados estatisticamente semelhantes entre si ($IC_{50} = 8,86 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$ e $10,22 \pm 0,88 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) e o extrato de *M. neobrasiliensis* foi o menos ativo dentre os extratos analisados ($IC_{50} = 25,95 \pm 1,32 \mu\text{g/mL}$). Por outro lado, o padrão acarbose apresentou IC_{50} igual a $191,40 \pm 1,35 \mu\text{g/mL}$.

Portanto, todos os extratos demonstraram atividade de inibição no ensaio realizado, com destaque para os extratos das espécies *M. splendens*, *M. tenella* e *M. neuwiedeana* que apresentaram excelentes resultados em comparação ao padrão utilizado. Ao analisarmos os resultados obtidos utilizando a enzima α -glicosidase combinados aos resultados obtidos com a enzima α -amilase, podemos afirmar que as espécies *M. splendens* e *M. neuwiedeana* foram as duas mais ativas nos ensaios *in vitro*. Esses resultados mostram que apesar dessas espécies não serem incluídas no grupo de espécies conhecidas como “pedra-ume-caá” e não serem utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diabetes elas se apresentam como fontes de metabólitos secundários com esse potencial e como possíveis adjuvantes farmacológicas para o tratamento e/ou prevenção da diabetes.

Como discutido anteriormente, a composição química descrita para cada uma das espécies pode ajudar a compreender a atividade biológica observada. A presença de:

ácidos fenólicos, como o ácido gálico e ácido elágico; galotaninos, como a digaloilglicose; e flavonoides, como a miricitrina e quercetina, podem justificar a atividade observada no ensaio com a enzima α -glicosidase, uma vez que estes compostos já foram relatados como inibidores desta enzima.

.

5 CONCLUSÃO

As espécies *Myrciaria tenella* (DC.) O.Berg, *Myrcia splendens* (Sw.) DC, *Myrcia neuwiediana* (O.Berg) E.Lucas & C.E.Wilson. e *Myrcia neobrasiliensis* A.R.Lourenço & E.Lucas apresentaram atividade antioxidante frente aos radicais sintéticos ABTS e DPPH e foram capazes de inibir a as enzimas α -amilase e α -glicosidase que são alvos terapêuticos no tratamento da DM2. Além disso, foram detectadas a presença de diversos compostos fenólicos, taninos, flavonoides e terpenos que podem justificar, pelo menos em parte, as atividades biológicas apresentadas pelas diferentes espécies.

O estudo mostrou que o maior potencial para as atividades avaliadas está relacionado aos extratos brutos e frações mais polares. De modo geral as plantas apresentaram vários compostos com efeitos similares. Portanto, os resultados sugerem que as atividades observadas podem ter ocorrido em decorrência do sinergismo entre os componentes detectados nessas frações mais ativas.

De acordo com os resultados químicos obtidos, podemos afirmar que essas espécies se tratam de promissoras fontes de compostos bioativos que podem futuramente ser empregados no tratamento e prevenção de doenças crônicas e degenerativas. Além disso, esses resultados corroboram com os dados disponíveis na literatura acerca das espécies da família Myrtaceae, especialmente do gênero *Myrcia*, que é amplamente conhecido devido as atividades hipoglicêmicas apresentadas.

Sendo assim, este trabalho contribui diretamente para o conhecimento das espécies estudadas, especialmente com a *Myrcia neuwiediana* (O.Berg) E.Lucas & C.E.Wilson e *Myrcia neobrasiliensis* A.R.Lourenço & E.Lucas que não possuem relatos de estudos fitoquímicos e/ou biológicos na literatura.

Ainda hoje, a flora brasileira possui infinitas espécies que nunca foram estudadas quanto ao potencial farmacológico e menor ainda é o número de espécies que tiveram suas composições químicas determinadas. Dessa forma, o presente trabalho demonstrou a grande diversidade de compostos químicos e o potencial hipoglicemiante de diferentes espécies nativas da restinga brasileira, expondo e reafirmando a necessidade de proteção e defesa da Mata Atlântica e dos sistemas

associados, que apresentam uma enorme diversidade que pode ser perdida caso o descaso e a falta de investimento nas pesquisas continuem.

6 REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 8, p. 1679–1687, 2012.
- ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. In: **Diabetes Care**. v. 28p. S37–S42.
- AKTER, M. S. et al. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1728–1732, 2011.
- ALAM, M. R. et al. Evaluation of antidiabetic phytochemicals in *Syzygium cumini* (L.) skeels (Family: Myrtaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 10, p. 094–098, 2012.
- ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. D. G. B.; SILVA, A. C. M. Constituents of the essential oil of *Myrciaria tenella* (DC.) O. Berg. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 1, p. 93–94, 2006.
- APEL, M. A. et al. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p. 433–438, 2010.
- ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547–553, 1 set. 2016.
- ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAGEORGIOU, V. P. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Chia. **Biomedical Chromatography**, v. 19, n. 4, p. 285–311, 2005.
- AYUSMAN, S. et al. Bioactive constituents, vitamin analysis, antioxidant capacity and α -glucosidase inhibition of *Canna indica* L. rhizome extracts. **Food Bioscience**, v. 35, p. 100544, 2020.
- AZEVEDO, M. M. L. et al. Lupane triterpenoids, antioxidant potential and antimicrobial activity of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg. **Natural Product Research**, v. 6419, n. November, p. 1–10, 2017.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BATISTA, A. N. D. L. et al. Development and validation of a HPLC method for standardization of herbal and commercial extracts of *Myrcia uniflora*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 402–406, 2011.
- BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methods in enzymology**, v. 1, p. 149–158, 1995.
- BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal

properties of Myrciaria genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224–233, 2014.

BRASIL, 2006. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília – DF, 2006.

<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>

Acesso em: 24/12/20 às 12:15 h

BRASIL, 2020. Mata Atlântica. 2020 < https://antigo.mma.gov.br/biomas/mata-atl%C3%A2ntica_emdesenvolvimento.html> Acesso em: 21/12/20 às 17:20 h

CÂNDIDO, C. S. et al. Effects of Myrcia ovata cambess. Essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm formation of Enterococcus faecalis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 621–627, 2010.

CASCAES, M. M. et al. Constituents and pharmacological activities of Myrcia (Myrtaceae): A review of an aromatic and medicinal group of plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23881–23904, 2015.

CASCAES, M. M. et al. Flavonoids, antioxidant potential and antimicrobial activity of Myrcia rufipila mcvaugh leaves (myrtaceae). **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–5, 2019.

CERQUEIRA, M. D. Dissertação de Mestrado (Química Orgânica – UFBA): Estudo Fitoquímico de *Myrcia rotundifolia* (Berg.) Legrand. (Myrtaceae). Universidade Federal da Bahia, 2002.

CHENG, A. Y. Y.; FANTUS, I. G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. **CMAJ**, v. 172, n. 2, p. 213–226, 2005.

CHIRINOS, R. et al. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1019–1024, 2010.

COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. The Leaf Oil Composition of *Myrcia splendens* from Monteverde, Costa Rica. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 11, n. 1, p. 41–44, 2008.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66–76, 1996.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CRUZ, A.; KAPLAN, M. USO MEDICINAL DE ESPÉCIES DAS FAMÍLIAS MYRTACEAE E MELASTOMATACEAE NO BRASIL. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47–52, 2012.

CUNHA, A. P. D. (Org). Farmacognosia e fitoquímica. 3. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010. 670 p.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009.

FAITANIN, R. D. et al. Chemical study and evaluation of antioxidant activity and α -glucosidase inhibition of *Myrciaria strigipes* O. Berg (Myrtaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 03, p. 120–125, 2018.

FERREIRA, I. C. F. DE S.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicity of medicinal plant extracts in Salmonella/microsome assay. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 5, p. 397–400, 1999.

FROTA, J.T. Avaliação das atividades hipoglicemiantes e hipolipidêmica da mistura de α - β amirina, triterpenos pentacíclicos isolados do *Protium heptaphyllum*, em camundongos. Dissertação. Universidade Federal do Ceará. 2011.

GAMA, D. . et al. O cambuí (*Myrciaria tenella* (DC.) O. BERG; MYRTACEAE): extrativismo e geração de renda em Ribeira do Pombal-Bahia. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 12, n. 1, p. 42–51, 2017.

GASPAROTTO JUNIOR, A.; DE SOUZA, P.; LÍVERO, F. A. DOS R. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel: A comprehensive ethnopharmacological review of a genuinely Brazilian species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 245, n. 12, 2019.

GIARETTA, A.; PEIXOTO, A. L. Myrtaceae da restinga no norte do Espírito Santo , Brasil. **Bol.Mus.Biol.Mello Leitão**, v. 37, n. 1, p. 45–126, 2015.

GOMES, R. B. DE A. et al. Residues from the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolia* Raddi) processing industry: Chemical profile and antimicrobial activity of extracts against hospital bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 143, 2020.

GOTTLIEB, O. R.; DA SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S. Eucalyptin from *Eugenia* and *Myrcia* species. **Phytochemistry**, v. 11, n. 3, p. 1185, mar. 1972.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509–530, 2006.

GÜLÇİN, I.; BERASHVILI, D.; GEPIREMEN, A. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1–3, p. 287–293, 2005.

GULDBRANDSEN, N. et al. Screening of panamanian plant extracts for pesticidal properties and hplc-based identification of active compounds. **Scientia Pharmaceutica**, v. 83, n. 2, p. 353–367, 2015.

GURUPRIYA, S. et al. In vitro antidiabetic and antioxidant activities of lupeol isolated from the methanolic extract of *Andrographis echiodes* leaves. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 4, p. 768–775, 2018.

HAN, D. H.; LEE, M. J.; KIM, J. H. Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid. **Anticancer Research**, v. 26, n. 5 A, p. 3601–3606, 2006.

KANDRA, L. et al. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 319, n. 4, p. 1265–1271, 2004.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596–603, 2012.

LIMA, C. C. DE et al. Antibacterial and cytotoxic activity of extracts and isolated compounds from *Myrciaria ferruginea* (Myrtaceae). **Records of Natural Products**, v. 11, n. 1, p. 51–56, 2017.

LIMA, R. DE C. L. et al. Brazilian insulin plant as a bifunctional food: Dual high-resolution PTP1B and α -glucosidase inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for identification of antidiabetic compounds in *Myrcia rubella* Cambess. **Journal of Functional Foods**, v. 45, n. 4, p. 444–451, 2018.

LIU, S. et al. Effect of steeping temperature on antioxidant and inhibitory activities of green tea extracts against α -amylase, α -glucosidase and intestinal glucose uptake. **Food Chemistry**, v. 234, p. 168–173, 2017.

LOURENÇO, A. R. D. L.; BARBOSA, M. R. D. V. Myrtaceae in the restinga vegetation at the northern limit of the Atlantic coastal forest, Brazil. **Rodriguesia**, v. 63, n. 2, p. 373–393, 2012.

LU, Q. et al. Investigation of the Interaction Between Gallic Acid and α -Amylase by Spectroscopy. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 11, p. 2481–2494, 2016.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ^{13}C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids - A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517–1575, 1994.

MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* link. **Quimica Nova**, v. 35, n. 3, p. 517–522, 2012.

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

MELO JÚNIOR, J. C. F. DE; BOEGER, M. R. T. Riqueza, estrutura e interações edáficas em um gradiente de restinga do Parque Estadual do Acaraí, Estado de Santa Catarina, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, n. 2, p. 207–232, 2015.

MONTEIRO, J. R. B. et al. Anti-helicobacter pylori and anti-inflammatory properties of *Eugenia uniflora* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

MONTEIRO, M. M. et al. Composição e estrutura de uma restinga arbustiva aberta no norte do Espírito Santo e relações florísticas com formações similares no Sudeste do Brasil. **Rodriguesia**, v. 65, n. 1, p. 61–72, 2014.

MONTEIRO, S. S. et al. Leaf Essential Oil from *Eugenia luschnathiana* and *Myrciaria tenella* (Myrtaceae) from Two Different Accesses in Southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 19, n. 7, p. 1675–1683, 2016.

MORAIS, L.; CONCEIÇÃO, G. M. DA; NASCIMENTO, J. DE M. Família Myrtaceae: Análise Morfológica E Distribuição Geográfica. **Agrarian academy**, v. 1, n. 1, p. 317–346, 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.

MUFFLER, K. et al. Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 1–15, 2011.

MYODA, T. et al. Antioxidative and antimicrobial potential of residues of camu-camu juice production. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 8, n. 2, p. 304–307, 2010.

NAKAMURA, M. J. et al. Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 6, p. 1170–1175, 2010.

OBOH, G. et al. Influence of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 3, p. 627–634, 2016.

OLIVEIRA, F. M. G. DE; ROMÃO, W.; KUSTER, R. M. Identification of phenolic compounds in: *Eugenia uniflora* leaves by FTICR MS in association with different ionization sources. **Analytical Methods**, v. 10, n. 14, p. 1647–1655, 2018.

OOI, K. L. et al. Cytotoxic, apoptotic and anti- α -glucosidase activities of 3,4-di-O-caffeoyl quinic acid, an antioxidant isolated from the polyphenolic-rich extract of *Elephantopus mollis* Kunth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 685–695, 2011.

PADOVAN, A. et al. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 3, p. 695–716, 2014.

PATWARDHAN, B. et al. Ayurveda and traditional Chinese medicine: A comparative overview. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 4, p. 465–473, 2005.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.

PLAGEMANNA, I. et al. Volatile constituents of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg) fruits. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 1, p. 45–51, 2012.

PONTES, F. C. et al. Antifungal and antioxidant activities of mature leaves of *Myrcia splendens* (Sw.) DC. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 1, p. 127–132, 2019.

POONGUNRAN, J. et al. Bioassay-guided fractionation and identification of α -amylase inhibitors from *Syzygium cumini* leaves. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 206–

211, 2017.

PYRZYNSKA, K.; PEKAL, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. **Analytical Methods**, v. 5, n. 17, p. 4288–4295, 2013.

RAYESS, Y. E. et al. **Analytical methods for wine polyphenols analysis and for their antioxidant activity evaluation**. 1. ed. Nova York: Nova Publishers, 2014.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883–890, 2008.

RIBEIRO, A. R. C. et al. Myrciaria tenella (DC.) O. Berg (Myrtaceae) leaves as a source of antioxidant compounds. **Antioxidants**, v. 8, n. 8, p. 310, 2019.

RISHTON, G. M. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. **American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10, p. 43–49, 2008.

RYBKA, A. C. P. et al. Chemical characterization and antioxidant capacity of ‘Cambui’ (Myrciaria tenella) products. **Comunicata Scientiae**, v. 9, n. 4, p. 695–699, 2018.

SÁ, C. F. C. DE. Regeneração de um trecho de floresta de restinga na Reserva Ecológica Estadual de Jacarepiá, Saquarema, Estado do Rio de Janeiro: II - Estrato arbustivo. **Rodriguesia**, v. 53, n. 82, p. 5–23, 2002.

SA, F. A. DA SILVA et al. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of Myrcia tomentosa (Aubl.) DC. leaves. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1–10, 2017.

SAHA, S.; VERMA, R. Inhibitory potential of traditional herbs on α -amylase activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 3, p. 326–331, 2012.

SALES, P. M. DE et al. α -amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 141–183, 2012.

SALVADOR, M. J. et al. Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae plants of the South of Brazil. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 977–982, 2011.

SANTIAGO, L. A.; MAYOR, A. B. R. Lupeol: An antioxidant triterpene in Ficus pseudopalma Blanco (Moraceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 109–118, 2014.

SANTOS, M.F. et al. Myrcia in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em:

<<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB603021>>. Acesso em: 02 jan. 2021

SANTOS, M.F. et al. Myrcia in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020b. Disponível em:

< <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB616160>>. Acesso em: 02 jan. 2021

SBD - **Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**: 2019-2020. São Paulo: Clannad; 2020.

SCALVENZI, L. et al. Myrcia splendens (Sw.) DC. (syn. M. fallax (Rich.) DC.) (Myrtaceae) essential oil from amazonian Ecuador: a chemical characterization and bioactivity profile. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1–12, 2017.

SCHNEIDER, N. F. Z. et al. Estudo dos compostos voláteis e atividade antimicrobiana da Myrciaria tenella (cambuí) Volatile oil composition and antimicrobial activity from Myrciaria tenella. **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, n. 2, p. 131–133, 2008.

SCIO, E. et al. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Some Plant Extracts. **Phytochemicals as Nutraceuticals – Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health**, p. 21–42, 2012.

SHINDE, J. et al. α -Glucosidase inhibitory activity of Syzygium cumini (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 7, p. 1278–1281, 2008.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annu. Rev. Biochem.**, n. 86, p. 715–748, 2017.

SILVA, K. L. DA. **Contribuição ao conhecimento químico de espécies do gênero Protium (Protium hebetatum Daly e Protium leptostachyum Cuatrec.) Burseraceae.** [s.l.] Universidade Federal do Acre, 2016.

SILVA, P. D. **Compostos Fenólicos e Terpenos de Myrcia hiemalis e Myrcia myrtifolia (Myrtaceae) Compostos Fenólicos e Terpenos de Myrcia hiemalis e Myrcia myrtifolia (Myrtaceae).** [s.l.] Universidade Federal da Bahia, 2012.

SILVA, T. L. **Estudo Químico De Bowdichia Virgilioides (Fabaceae) Na Busca De Inibidores Seletivos De Cisteíno Peptidases.** [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SOUSA, L. F. DE; SILVA, A. M. M. DA. The effect of the aqueous extract of Myrcia guianensis (Aubl.) DC and its fractions against the hemorrhagic activity of Bothrops jararaca venom. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 42, p. 3139–3146, 2013.

STEFANELLO, M. É. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73–94, 2011.

TAKAHAMA, U.; HIROTA, S. Interactions of flavonoids with α -amylase and starch

slowing down its digestion. **Food and Function**, v. 9, n. 2, p. 677–687, 2018.

TEIXEIRA, J. et al. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

THOMAZI, R. et al. Um panorama da vegetação das restingas do Espírito Santo no contexto do litoral brasileiro. **Natureza on line**, v. 11, n. 1, p. 1–6, 2013.

TIETBOHL, L. A. C. et al. Comparative study and anticholinesterasic evaluation of essential oils from leaves, stems and flowers of *Myrciaria floribunda* (H.West ex Willd.) O. Berg. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 4, p. 637–641, 2012.

WALKER, T. D. The medicines trade in the portuguese atlantic world: Acquisition and dissemination of healing knowledge from Brazil (c. 1580-1800). **Social History of Medicine**, v. 26, n. 3, p. 403–431, 2013.

WANG, W. H. et al. Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

WANG, Z. W. et al. α -Glucosidase inhibitory triterpenoids from the stem barks of *Uncaria laevigata*. **Fitoterapia**, v. 90, p. 30–37, 2013.

WU, S. B. et al. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7513–7525, 2012.

YAZAWA, K. et al. Anti-inflammatory effects of seeds of the tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 57, n. 1, p. 104–107, 2011.

YEN, G. C.; DUH, P. DER; TSAI, H. L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 307–313, 2002.

YIN, Z. et al. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 3–4, p. 136–174, 2014.

YOSHIKAWA, M. et al. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): Structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 1, p. 113–119, 1998.

YOU, Q. et al. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 164–168, 2012.

ZHANG, B. et al. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. **Food Chemistry**, v. 172, p. 862–872, 2015.